

**Reaktionstechnische Untersuchungen zur präparativen enzymatischen  
Synthese und Aktivierung der Neuraminsäurederivate  
3-Fluorneuraminsäure und Glycolylneuraminsäure**

**Dissertation**

Zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von  
**Juliane Beliczey**  
aus Bergisch Gladbach

Bonn, 2003

Angefertigt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Biotechnologie der Universität Bonn unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. C. Wandrey angefertigt. Die praktischen Arbeiten wurden am Institut für Biotechnologie II der Forschungszentrum Jülich GmbH in der Zeit von November 1996 bis April 2000 durchgeführt. Die Fertigstellung der schriftlichen Niederlegung erfolgte im Dezember 2002.

### **Mein Dank gilt,**

meinem geschätzten Doktorvater Herrn Prof. Dr. Christian Wandrey für die interessante Themenstellung, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Arbeitsmittel, und die gute Mischung aus Geduld und Ungeduld,

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Heinrich Wamhoff, Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie Universität Bonn, für die freundliche Übernahme des Korreferats,

den Kooperationspartnern aus dem Institut für Nuklearmedizin, Herrn Prof. Dr. Heinz Hubert Coenen, Herrn Dr. Kurt Hamacher und Herrn Thomas Tierling für die gute Zusammenarbeit auf dem Gebiet der [<sup>18</sup>F]-Chemie,

Frau Ursula Mackfeld für die tatkräftige und zuverlässige Unterstützung bei den praktischen Arbeiten,

Frau Zvezdana Findrik und Frau Prof. Dr. Durda Vasic-Racki für die Hilfe bei der Erstellung des Modells für die Neu5Gc-Synthese,

Frau Doris Hahn für die guten Tipps für den Umgang mit der Synthetase und der CMP-NANA-Synthese,

meinen Praktikanten, Thomas Stillger, Melanie Lobe, Philomena Piacenza, Andrea Weckbecker und Stephan Lütz,

Frau Heike Offermann für die Unterstützung bei der Literaturbeschaffung,

den Herren Holger Paschold und Holger Gieren für die Fermentation und Homogenisierung des *E. coli*,

den Herren Christoph Hoh und Dr. Andreas Liese für die zügige und anregend kritische Durchsicht dieser Arbeit,

den wechselnden Mitgliedern meiner Fahrgemeinschaft für viele unterhaltsame und manchmal auch missmutige Stunden zwischen Bonn und Jülich,

den Insassen meines Büros und allen Tee- und Weinkennern der Enzymgruppe und auch denjenigen, die wir vergeblich zu Tee- oder Weinkennern zu machen versuchten,

den vielen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Biotechnologie, die für eine gute Arbeitsatmosphäre gesorgt haben,

und besonders meiner Familie und meinen Freunden, die mich auf Durststrecken unterstützt und motiviert haben.



Allen, die es mir zugetraut haben



# Inhalt

<b>1</b>	<b><u>Einleitung</u></b> .....	<b>1</b>
1.1	<u>Vorkommen und Bedeutung von Kohlenhydraten</u> .....	1
1.1.1	<u>Glycoconjugate</u> .....	2
1.1.1.1	<u>Die Glycosylierung von Glycoproteinen</u> .....	3
1.1.1.2	<u>Glycolipide</u> .....	4
1.2	<u>Zucker in der modernen Medizin</u> .....	7
1.3	<u>Sonderstellung der Neuraminsäure</u> .....	9
1.3.1	<u>Vorkommen</u> .....	11
1.3.2	<u>Biologische Bedeutung</u> .....	11
1.3.3	<u>Biosynthese der Neuraminsäure</u> .....	12
1.3.4	<u>Herstellung von Neuraminsäure und ihren Derivaten</u> .....	13
1.3.4.1	<u>Enzymatische Synthese von Neu5Ac</u> .....	14
1.3.4.2	<u>Unnatürliche Derivate der Neuraminsäure</u> .....	15
1.3.4.3	<u>Fluorierung von Neuraminsäure zu diagnostischen Zwecken</u> .....	16
<b>2</b>	<b><u>Zielsetzung</u></b> .....	<b>20</b>
2.1	<u>Fluorierung von Neuraminsäure</u> .....	20
2.2	<u>Glycolylneuraminsäure</u> .....	21
<b>3</b>	<b><u>Fluorneuraminsäure</u></b> .....	<b>22</b>
3.1	<u>Auswahl einer geeigneten Fluorierungsposition</u> .....	22
3.2	<u>Darstellung von 3-Fluorneuraminsäure</u> .....	23
3.2.1	<u>Das Enzym N-Acetylneuraminsäure-Aldolase</u> .....	26
3.2.1.1	<u>Mechanismus</u> .....	27
3.2.2	<u>Kinetische Untersuchungen</u> .....	29
3.2.2.1	<u>Kinetisches Modell</u> .....	33
3.2.2.2	<u>Vergleich mit Synthese von Neu5Ac</u> .....	34
3.2.2.3	<u>Abhängigkeit der Aktivität von pH-Wert und Temperatur</u> .....	36
3.2.3	<u>Bildung zweier Epimere</u> .....	38
3.2.4	<u>Präparative Synthese im Repetitive-Batch-Verfahren</u> .....	41
3.2.4.1	<u>Versuchsaufbau des Repetitive-Batch</u> .....	41
3.2.4.2	<u>Durchführung der Neu5Ac3F Synthese</u> .....	44
3.2.4.3	<u>Produktisolierung und Reinigung</u> .....	45
3.2.5	<u>Substratspektrum der Aldolase</u> .....	47
3.3	<u>Aktivierung der Neu5Ac3F zu CMP-Neu5Ac3F</u> .....	50
3.3.1	<u>Das Enzym CMP-Neu5Ac-Synthetase</u> .....	51
3.3.2	<u>Gewinnung des Enzyms CMP-Neu5Ac-Synthetase</u> .....	53
3.3.2.1	<u>Stabilitätsmessungen</u> .....	54
3.3.2.2	<u>Stabilisierung durch Lyophilisierung</u> .....	55
3.3.2.3	<u>pH-Abhängigkeit der Aktivität</u> .....	55
3.3.2.4	<u>Abhängigkeit der Aktivität von Mg<sup>2+</sup> und Phosphat</u> .....	57
3.3.3	<u>Darstellung von CMP-Fluorneuraminsäure</u> .....	59
3.3.3.1	<u>Kinetische Messungen</u> .....	60

---

3.3.3.2	<a href="#">Präparative Synthese</a>	63
3.3.3.3	<a href="#">Produktisolierung</a>	65
3.4	<a href="#">Versuche zur Übertragung von Neu5Ac3F auf Oligosaccharide</a>	67
3.4.1	<a href="#">CMP-Neu5Ac3F als Substrat für Sialyltransferasen</a>	68
3.4.2	<a href="#">Chemischer oder chemoenzymatischer Transferer</a>	71
3.5	<a href="#">Synthese von 3-[<sup>18</sup>F]Fluorneuraminsäure</a>	76
3.5.1	<a href="#">Synthese von [<sup>18</sup>F]Fluorpyruvat</a>	76
3.5.2	<a href="#">Synthese von 3-[<sup>18</sup>F]Fluorneuraminsäure</a>	78
3.6	<a href="#">Zusammenfassung</a>	81
<b>4</b>	<b><a href="#">Glycolylneuraminsäure</a></b>	<b>82</b>
4.1	<a href="#">Biosynthese</a>	83
4.2	<a href="#">Alternative Synthese von Glycolylneuraminsäure</a>	84
4.3	<a href="#">Synthese von Glycolylneuraminsäure im Zwei-Enzym-System</a>	86
4.3.1	<a href="#">Epimerase</a>	87
4.3.2	<a href="#">Epimerase Kinetik</a>	88
4.3.2.1	<a href="#">Epimerasereaktion mit GlcNAc/ManNAc</a>	88
4.3.2.2	<a href="#">Epimerasereaktion mit GlcNGc/ManNGc</a>	92
4.3.3	<a href="#">Aldolase Kinetik</a>	96
4.3.3.1	<a href="#">Hinreaktion</a>	97
4.3.3.2	<a href="#">Rückreaktion</a>	98
4.3.4	<a href="#">Kinetisches Modell</a>	101
4.3.4.1	<a href="#">Epimerase</a>	101
4.3.4.2	<a href="#">Aldolase</a>	103
4.3.5	<a href="#">Satzreaktorversuche</a>	114
4.3.5.1	<a href="#">Enzymverhältnis</a>	116
4.3.6	<a href="#">Präparative Synthese</a>	118
4.4	<a href="#">Aktivierung von Neu5Gc zu CMP-Neu5Gc</a>	120
4.4.1	<a href="#">Kinetische Daten</a>	121
4.4.2	<a href="#">Präparative Synthese</a>	123
4.5	<a href="#">Zusammenfassung</a>	124
<b>5</b>	<b><a href="#">Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick</a></b>	<b>125</b>
5.1	<a href="#">Fluorneuraminsäure</a>	125
5.2	<a href="#">Glycolylneuraminsäure</a>	132
5.3	<a href="#">Essenz</a>	139
5.3.1	<a href="#">Fluorneuraminsäure</a>	139
5.3.2	<a href="#">Glycolylneuraminsäure</a>	139
<b>6</b>	<b><a href="#">Material und Methoden</a></b>	<b>140</b>
6.1	<a href="#">Aufreinigung der CMP-Neu5Ac-Synthetase</a>	140
6.2	<a href="#">Enzymassays</a>	141
6.2.1	<a href="#">Aldolaseassay</a>	141
6.2.2	<a href="#">Epimeraseassay</a>	142
6.2.3	<a href="#">Synthetaseassay</a>	142



---

<a href="#">6.3</a>	<a href="#">Enzymatische Umsetzungen</a>	143
<a href="#">6.3.1</a>	<a href="#">Fluorneuraminsäure</a>	143
<a href="#">6.3.2</a>	<a href="#">Neu5Gc</a>	143
<a href="#">6.4</a>	<a href="#">Aufreinigungen</a>	144
<a href="#">6.5</a>	<a href="#">Chemische Synthesen</a>	146
<a href="#">6.6</a>	<a href="#">Analytik</a>	147
<a href="#">6.6.1</a>	<a href="#">HPLC</a>	147
<a href="#">6.6.2</a>	<a href="#">Kapillarelektrophorese - CE</a>	149
<a href="#">6.6.3</a>	<a href="#">NMR-Spektren</a>	152
<a href="#">6.6.3.1</a>	<a href="#">Auswertung der NMR-Spektren</a>	158
<a href="#">6.7</a>	<a href="#">Sonstige Analysen</a>	160
<a href="#">6.8</a>	<a href="#">Materialien</a>	161
<a href="#">6.8.1</a>	<a href="#">Geräte</a>	161
<a href="#">6.8.2</a>	<a href="#">Chemikalien</a>	162
<b><a href="#">7</a></b>	<b><a href="#">Literatur</a></b>	<b>163</b>

## Abbildungsverzeichnis

<a href="#"><u>Abbildung 1-1: Stammbaum der <i>O</i>-glycosidischen core-Strukturen. Die Quadrate symbolisieren <i>N</i>-Acetylgalactosamin, die Dreiecke Sialinsäure, die Rauten <i>N</i>-Acetylglucosamin und die Kreise Galactose, die verschiedenen Färbungen stehen für die unterschiedlichen Verknüpfungen.</u></a>	4
<a href="#"><u>Abbildung 1-2: Biosyntheschema komplexer Ganglioside. Die Reaktionsschritte werden von membranständigen Glycosyltransferasen im Lumen des Golgi-Apparates katalysiert. Die Quadrate symbolisieren <i>N</i>-Acetylgalactosamin, die Dreiecke Sialinsäure, die Rauten <i>N</i>-Acetylglucosamin und die Kreise Galactose, die verschiedenen Färbungen stehen für die unterschiedlichen Verknüpfungen.</u></a>	5
<a href="#"><u>Abbildung 1-3: Bedeutung glycobiologischer Strukturelemente für unterschiedliche Disziplinen der Grundlagenforschung und Klinik</u></a>	7
<a href="#"><u>Abbildung 1-4: Substitutionen der Hydroxylfunktionen und der <i>N</i>-Acetylfunktion in natürlichen NeuAc Derivaten</u></a>	10
<a href="#"><u>Abbildung 1-5: Biosyntheseweg von Sialoglycoconjugaten in Eukaryonten</u></a>	13
<a href="#"><u>Abbildung 1-6: Synthese von Neu5Ac aus GlcNAc im Zwei-Enzym-System</u></a>	15
<a href="#"><u>Abbildung 1-7: Struktur des als Influenzainhibitor zugelassenen Neuraminsäurederivats Relenza</u></a>	16
<a href="#"><u>Abbildung 2-1: Synthesestrategie für die Darstellung einer fluorierten Neuraminsäure, deren Aktivierung zu CMP-Fluorneuraminsäure und die Übertragung auf ein Oligosaccharid</u></a>	20
<a href="#"><u>Abbildung 2-2: enzymatische Synthese von Neu5Gc aus GlcNGc über ManNGc und ihre Aktivierung zu CMP-Neu5Gc</u></a>	21
<a href="#"><u>Abbildung 3-1: enzymatische Aktivierung von <i>N</i>-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) zu CMP-<i>N</i>-Acetylneuraminsäure (CMP-Neu5Ac)</u></a>	23
<a href="#"><u>Abbildung 3-2: Synthese von <i>N</i>-Acetyl-3-Fluorneuraminsäure (Neu5Ac3F) durch Aldolkondensation aus <i>N</i>-Acetylmannosamin (ManNAc) und Fluorpyruvat</u></a>	24
<a href="#"><u>Abbildung 3-3: Synthese von peracetylierter Neu5Ac7epi3F durch elektrophile Addition von „Selectfluor“ an die Doppelbindung von peracetylierter Neu5Ac2en7epi</u></a>	24
<a href="#"><u>Abbildung 3-4: Strategie zur Darstellung von Neu5Ac3F durch eine Aldolase-katalysierte Kondensation von ManNAc mit Fluorpyruvat</u></a>	25
<a href="#"><u>Abbildung 3-5: Aldolase-katalysierte Spaltung der Neu5Ac unter physiologischen Bedingungen</u></a>	26
<a href="#"><u>Abbildung 3-6: Mechanismus der reversiblen enzymatischen Synthese von Neu5Ac; die im ersten Schritt erfolgende Anlagerung von Pyruvat ist nicht gesondert dargestellt. Der Rahmen soll das aktive Zentrum symbolisieren</u></a>	28
<a href="#"><u>Abbildung 3-7: Aktivität der Aldolase in Abhängigkeit von der ManNAc-Konzentration, der Fluorpyruvatkonzentration und der Neu5Ac3F-Konzentration; (•) Messwerte, (—) berechnet nach Modell aus Gleichung 3-2</u></a>	31

---

<a href="#">Abbildung 3-8: Restanteil der Neu5Ac3F in Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration von Neu5Ac3F</a> .....	32
<a href="#">Abbildung 3-9: pH-Optimum der Aldolase-katalysierten Synthese von 3FNeu5Ac</a> .....	36
<a href="#">Abbildung 3-10: Bestimmung der Aktivierungsenergie aus der temperaturabhängigen Enzymaktivität</a> .....	37
<a href="#">Abbildung 3-11: Konformation des Fluors in der Neuraminsäure in Abhängigkeit von der Konformation des Enamins</a> .....	38
<a href="#">Abbildung 3-12: Aldolase-katalysierte Reaktion von ManNAc und F-Pyr zu beiden Epimeren von Neu5Ac3F</a> .....	39
<a href="#">Abbildung 3-13: Umsatz und <i>de</i> im Gleichgewicht in Abhängigkeit von der Gesamtkonzentration</a> .....	40
<a href="#">Abbildung 3-14: Diastereomerenüberschuss in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration im Gleichgewicht</a> .....	40
<a href="#">Abbildung 3-15: Schematische Darstellung des Repetitive-Batch-Verfahrens</a> .....	42
<a href="#">Abbildung 3-16: Amicon Centriprep, a) Membranstempel, b) Reaktionsgefäß, c) Reaktionsgefäß mit Membranstempel vor Zentrifugation, d) Reaktionsgefäß mit Membranstempel nach Zentrifugation</a> .....	43
<a href="#">Abbildung 3-17: Repetitive-Batch zur präparativen Synthese von 3FNeu5Ac – die ersten 2 von insgesamt 6 Zyklen</a> .....	45
<a href="#">Abbildung 3-18: Chromatographie zur Isolierung der 3FNeu5Ac auf dem Reaktionsgemisch und Trennung beider Epimere in einem Schritt</a> .....	47
<a href="#">Abbildung 3-19: Reaktionen verschiedener anderer Zucker (s. Tabelle 3-4 die ersten 9 der insgesamt 12 aufgeführten) mit F-Pyr zu F-Neuraminsäurederivaten mit Angabe der relativen Aktivitäten (bezogen auf Neu5Ac3F) und der Umsätze</a> .....	48
<a href="#">Abbildung 3-20: Synthetase-katalysierte Synthese von CMP-Neu5Ac</a> .....	51
<a href="#">Abbildung 3-21: Desaktivierung der Synthetase in Abhängigkeit von der Temperatur</a> .....	54
<a href="#">Abbildung 3-22: Versuche zur Stabilisierung der Synthetase</a> .....	55
<a href="#">Abbildung 3-23: Aktivität der Synthetase in Abhängigkeit vom pH-Wert im Vergleich mit den relativen Ergebnissen von T. Portella</a> .....	56
<a href="#">Abbildung 3-24: Desaktivierung der Synthetase in Abhängigkeit vom pH-Wert</a> .....	56
<a href="#">Abbildung 3-25: Aktivität der Synthetase in Abhängigkeit von der Phosphatkonzentration</a> ...	57
<a href="#">Abbildung 3-26: Enzymaktivität der Synthetase bei verschiedenen Phosphatkonzentrationen in Abhängigkeit von der Magnesiumionenkonzentration</a> .....	58
<a href="#">Abbildung 3-27: Enzymatische Synthese von CMP-Neu5Ac3F aus Neu5Ac3F und CTP</a> .....	59
<a href="#">Abbildung 3-28: Enzymaktivität der Synthetase in Abhängigkeit von der CTP-Konzentration, (▪) Messwerte, (—) berechnet nach Modell aus Gleichung 3-5</a> .....	61

---

<a href="#">Abbildung 3-29: Enzymaktivität der Synthetase in Abhängigkeit von der Neu5Ac3F-Konzentration, (+) Messwerte, (—) berechnet nach Modell aus Gleichung 3-5</a> .....	61
<a href="#">Abbildung 3-30: Aufbau des Batchreaktors mit pH-Regelung zur Synthese von CMP-Neu5Ac3F</a> .....	64
<a href="#">Abbildung 3-31: Präparative Synthese von CMP-Neu5Ac3F</a> .....	64
<a href="#">Abbildung 3-32: Verlauf der Säulenchromatographie zur Reinigung von CMP-Neu5Ac3F</a> ...	66
<a href="#">Abbildung 3-33: Fließschema der Diafiltrationsanlage</a> .....	67
<a href="#">Abbildung 3-34: Reaktionsschema für die enzymatische Übertragung von Neu5Ac3F auf Oligosaccharidstrukturen mit Hilfe von Sialyltransferasen</a> .....	68
<a href="#">Abbildung 3-35: Inhibierung der <math>\alpha</math>-2,3-O-SiaT durch CMP-Neu5Ac3F</a> .....	70
<a href="#">Abbildung 3-36: Zersetzung der CMP-Neu5Ac3F bei 20°C und pH-Werten von 5 – 9 im Vergleich mit der Zersetzung von CMP-Neu5Ac</a> .....	71
<a href="#">Abbildung 3-37: Hypothetische chemoenzymatische Synthese eines Neu5Ac3F tragenden Oligosaccharides</a> .....	73
<a href="#">Abbildung 3-38: Konzept für die chemische Synthese eines Neu5Ac3F haltigen Sialyl-Tn-Antigen Bausteins</a> .....	74
<a href="#">Abbildung 3-39: Konzept für die chemische Synthese von <math>\beta</math>-NeuAc<sub>5</sub>3FCOOCH<sub>3</sub>Cl<sub>106</sub></a> .....	75
<a href="#">Abbildung 3-40: Radiochemische Synthese von [<sup>18</sup>F]Fluorpyruvat ausgehend von Brombrenztraubensäureethylester</a> .....	78
<a href="#">Abbildung 3-41: Simulation der Umsetzung von 1 mM F-Pyr mit 125 mM ManNAc nach dem Modell aus Gleichung 3-2 mit den Stoffbilanzen aus Gleichung 3-4</a> .....	79
<a href="#">Abbildung 3-42: HPLC-Chromatogramme der Umsetzung von geträgertem [<sup>18</sup>F]Fluorpyruvat und ManNAc zu 3-[<sup>18</sup>F]Fluorneuraminsäure. a) n.c.a.[<sup>18</sup>F]Fluorpyruvat im Aktivkanal vor der Umsetzung; b) Reaktionsgemisch im Aktivkanal nach 40 min Reaktion; c) Reaktionsgemisch im UV-Kanal nach 40 min Umsetzung</a> .....	80
<a href="#">Abbildung 4-1: CMP-Neu5Ac-Hydroxylase katalysierte Biosynthese von CMP-Neu5Gc aus CMP-Neu5Ac</a> .....	83
<a href="#">Abbildung 4-2: Chemoenzymatische Synthese von ManNGc und Aldolase-katalysierte Neu5Gc Synthese</a> .....	86
<a href="#">Abbildung 4-3: Synthese von Glycolylneuraminsäure im Zwei-Enzym-System</a> .....	87
<a href="#">Abbildung 4-4: Mechanismus der Epimerisierung von GlcNAc zu ManNAc</a> .....	88
<a href="#">Abbildung 4-5: Epimerasereaktion mit GlcNAc/ManNAc</a> .....	89
<a href="#">Abbildung 4-6: Aktivität der Epimerasereaktion in Abhängigkeit von der ManNAc- bzw. GlcNAc-Konzentration</a> .....	89
<a href="#">Abbildung 4-7: Gleichgewichtslage der Epimerasereaktion von GlcNAc und ManNAc</a> .....	90

<a href="#">Abbildung 4-8: Stabilität der Epimerase in einer 5 mg/ml Lösung mit und ohne Zusatz von Substrat</a> .....	92
<a href="#">Abbildung 4-9: Epimerasereaktion mit GlcNGc/ManNGc</a> .....	92
<a href="#">Abbildung 4-10: Aktivität der Epimerasereaktion in Abhängigkeit von der GlcNGc-Konzentration</a> .....	93
<a href="#">Abbildung 4-11: Gleichgewichtslage der Epimerasereaktion von GlcNGc und ManNGc</a> .....	94
<a href="#">Abbildung 4-12: Inhibierung der Epimerase-katalysierten Reaktion von GlcNGc zu ManNGc durch Pyruvat</a> .....	95
<a href="#">Abbildung 4-13: Aldolase-katalysierte Reaktion von ManNGc und Pyruvat zu Neu5Gc</a> .....	96
<a href="#">Abbildung 4-14: Abhängigkeit der Aldolase-katalysierten Synthese von Neu5Gc von der ManNGc-Konzentration</a> .....	97
<a href="#">Abbildung 4-15: Abhängigkeit der Aldolase-katalysierten Synthese von Neu5Gc von der Neu5Gc-Konzentration</a> .....	98
<a href="#">Abbildung 4-16: Abhängigkeit der Aldolase-katalysierten Spaltung von Neu5Gc von der Neu5Gc-Konzentration</a> .....	99
<a href="#">Abbildung 4-17: Abhängigkeit der Aldolase-katalysierten Spaltung von Neu5Gc von der Pyruvatkonzentration</a> .....	100
<a href="#">Abbildung 4-18: Schematische Darstellung der Substratbindung beim <i>ordered bi-uni</i>-Mechanismus</a> .....	106
<a href="#">Abbildung 4-19: gemessene (▪) und simulierte (—) Daten für die Epimerase- und die Aldolasereaktion</a> .....	109
<a href="#">Abbildung 4-20: gemessene (▪) und nach dem Modell mit Überschüßinhibierung der Rückreaktion berechnete (—) kinetische Daten für die Epimerasereaktion</a> .....	112
<a href="#">Abbildung 4-21: gemessene (▪) und nach dem Modell mit Überschüßinhibierung der Rückreaktion berechnete (—) kinetische Daten für die Aldolasereaktion</a> .....	113
<a href="#">Abbildung 4-22: Messwerte (▪) und berechnete Verläufe nach dem ersten Modell (...) und dem Modell mit Überschüßinhibierung der Rückreaktion (—) von sechs Satzreaktorversuchen mit verschiedenen Substrat- und Enzymkonzentrationen</a> .....	115
<a href="#">Abbildung 4-23: Simulation der Neu5Gc-Bildung nach 200 min in Abhängigkeit von der Konzentration des einen Enzyms bei Konstanz des anderen Enzyms (Aldolase 3,3 U/ml bzw. Epimerase 0,81 U/ml) bei Substratkonzentrationen GlcNGc/Pyruvat 400 mM/400 mM und 400 mM/1000 mM</a> .....	117
<a href="#">Abbildung 4-24: Präparative Synthese von Neu5Gc im Zwei-Enzym-System mit Simulation für diesen Versuch und für die Konzentrationen von 400 und 1000 mM Pyruvat</a> .....	119
<a href="#">Abbildung 4-25: Chromatogramm zur Trennung von Neu5Gc über Anionentauscherharz Dowex 1x2, Formiat-Form, mit einem Ameisensäuregradienten von 0 – 1 M</a> .....	120
<a href="#">Abbildung 4-26: Enzymatische Synthese von CMP-Neu5Gc aus Neu5Gc und CTP</a> .....	121
<a href="#">Abbildung 4-27</a> .....	121

---

<a href="#">Abbildung 4-28: Enzymaktivität der Synthetase in Abhängigkeit von der Neu5Gc-Konzentration</a> .....	122
<a href="#">Abbildung 5-1: vermutlicher Übergangszustand für die Sialyltransferasereaktion in Anlehnung an den Übergangszustand der <math>\alpha</math>-1,3-Fucosyltransferase</a> .....	127
<a href="#">Abbildung 5-2: Mechanismus der Transglycosylierung durch Glycosynthasen</a> .....	130
<a href="#">Abbildung 5-3: Synthesevorschlag für die Darstellung von Neu5Ac2,3F<sub>2</sub></a> .....	131
<a href="#">Abbildung 5-4: Alternativer Synthesevorschlag für die Darstellung von Neu5Ac2,3F<sub>2</sub></a> .....	131
<a href="#">Abbildung 5-5: Simulierte Produktbildung und RZA in Abhängigkeit von der Verweilzeit und der Zusammenhang zwischen Produktbildung und RZA für verschiedene Verhältnisse von GlcNGc/Pyr [mM] und die aufgetragen bei einer Aldolasekonzentration von 3,32 U/ml (3,1 mg/ml) und einer Epimerasekonzentration von 2,24 U/ml (8,57 mg/ml)</a> .....	136
<a href="#">Abbildung 6-1: HPLC-Chromatogram Neu5Ac3F Synthese 1) Neu5Ac3F<sub>(equatorial)</sub>, 2) Neu5Ac3F<sub>(axial)</sub>, 3) F-Pyr und 4) ManNAc</a> .....	148
<a href="#">Abbildung 6-2: HPLC-Chromatogram Neu5Gc Synthese 1) Neu5Gc, 2) GlcNGc und ManNGc und 3) Pyr</a> .....	149
<a href="#">Abbildung 6-3: Elektropherogram der Analyse von Nukleotiden und Nukleotidzuckern bei 200 nm und bei 254 nm; 1) Neu5Ac, 2) CMP-Neu5Ac und 3) CTP</a> .....	150
<a href="#">Abbildung 6-4: Elektropherogram der Analyse von Zuckern mit indirekter Detektion bei 200 nm, Referenzkanal 350 nm; 1) Neu5Gc, 2) ManNGc und 3) GlcNGc</a> .....	151
<a href="#">Abbildung 6-5: Neu5Ac3F<sub>(axial)</sub> in D<sub>2</sub>O, 1H-NMR, 400 Hz</a> .....	152
<a href="#">Abbildung 6-6: Neu5Ac3F<sub>(axial)</sub> in D<sub>2</sub>O, 13C-NMR, 400 Hz</a> .....	152
<a href="#">Abbildung 6-7: Neu5Ac3F<sub>(equatorial)</sub> in D<sub>2</sub>O, 1H-NMR, 400 Hz</a> .....	153
<a href="#">Abbildung 6-8: Neu5Ac3F<sub>(equatorial)</sub> in D<sub>2</sub>O, 13C-NMR, 400 Hz</a> .....	153
<a href="#">Abbildung 6-9: Neu5Gc in D<sub>2</sub>O, 1H-NMR, 300 Hz</a> .....	154
<a href="#">Abbildung 6-10: Neu5Gc in D<sub>2</sub>O, 13C-NMR, 300 Hz</a> .....	155
<a href="#">Abbildung 6-11: CMP-Neu5Gc in D<sub>2</sub>O, 1H-NMR, 300 Hz</a> .....	156
<a href="#">Abbildung 6-12: CMP-Neu5Gc in D<sub>2</sub>O, 13C-NMR, 300 Hz</a> .....	156
<a href="#">Abbildung 6-13: CMP-Neu5Ac3F in D<sub>2</sub>O, 1H-NMR, 300 Hz</a> .....	157
<a href="#">Abbildung 6-14: CMP-Neu5Ac3F in D<sub>2</sub>O, 13C-NMR, 300 Hz</a> .....	157
<a href="#">Abbildung 6-15: Nummerierung der Positionen in CMP-Neu5Ac</a> .....	158

## Tabellenverzeichnis

<a href="#">Tabelle 1-1: Ausgewählte zugelassene Kohlenhydratwirkstoffe</a> .....	8
<a href="#">Tabelle 1-2: Einige Kohlenhydratwirkstoffe in klinischer Prüfung</a> .....	9
<a href="#">Tabelle 1-3: Radionuklide zur Tracerdarstellung</a> .....	17
<a href="#">Tabelle 1-4: Radionuklide zur Analogtracerdarstellung</a> .....	18
<a href="#">Tabelle 3-1: Bindungslängen und <i>van der Waals</i> Radien von Wasserstoff, Sauerstoff und Fluor</a> .....	22
<a href="#">Tabelle 3-2: Kinetische Konstanten der Aldolase für die Neu5Ac3F-Synthese im Vergleich mit den entsprechenden Werten für die Neu5Ac-Synthese</a> .....	34
<a href="#">Tabelle 3-3: Standardassay zur Aktivitätsmessung der Aldolase für die Synthese von Neu5Ac3F</a> .....	36
<a href="#">Tabelle 3-4: Reaktionen verschiedener Zucker mit F-Pyr zu F-Neuraminsäurederivaten</a> .....	50
<a href="#">Tabelle 3-5: Quellen für die CMP-Neu5Ac-Synthetase [E.C. 2.7.7.43]</a> .....	52
<a href="#">Tabelle 3-6: Standardassay zur Aktivitätsmessung der Synthetase</a> .....	53
<a href="#">Tabelle 3-7: Vergleichende Aktivitätsmessung der Synthetase für die Substrate Neu5Ac, Neu5Ac3F<sub>axial</sub> und Neu5Ac3F<sub>equatorial</sub></a> .....	59
<a href="#">Tabelle 3-8: Vergleich der kinetischen Parameter der Synthetasereaktion von Neu5Ac und Neu5Ac3F</a> .....	62
<a href="#">Tabelle 3-9: Versuche zur Übertragung von CMP-Neu5Ac3F auf Oligosaccharidstrukturen mit Hilfe von vier verschiedenen Sialyltransferasen</a> .....	69
<a href="#">Tabelle 4-1: Vergleich der kinetischen Parameter der Epimerasen aus <i>E. coli</i> und Schweinenieren</a> .....	91
<a href="#">Tabelle 4-2: Zusammenstellung der kinetischen Parameter der Epimerisierung vom GlcNGc durch die Epimerase aus <i>E. coli</i></a> .....	95
<a href="#">Tabelle 4-3: Standardassay zur Aktivitätsmessung der Epimerase für die Synthese von ManNGc</a> .....	96
<a href="#">Tabelle 4-4: Zusammenstellung der kinetischen Parameter der Synthese und Spaltung von Neu5Gc durch die Aldolase</a> .....	100
<a href="#">Tabelle 4-5: Standardassay zur Aktivitätsmessung der Aldolase für die Synthese von Neu5Gc</a> .....	101
<a href="#">Tabelle 4-6: Gegenüberstellung der durch Anfangsreaktionsgeschwindigkeitsmessung bestimmten und der durch Satzreaktoranpassung ermittelten Parameter</a> .....	108
<a href="#">Tabelle 4-7: Gegenüberstellung der gemessenen und der angepassten Parameter durch das Modell mit Überschußinhibierung der Rückreaktion</a> .....	111
<a href="#">Tabelle 4-8: Vergleich der kinetischen Parameter der Synthetasereaktion von Neu5Ac und Neu5Gc</a> .....	123

---

<a href="#">Tabelle 4-9: Reaktionsbedingungen für die Synthese von CMP-Neu5Gc</a> .....	124
<a href="#">Tabelle 5-1: Gegenüberstellung der kinetischen Parameter für die Epimerase- und Aldolasereaktion zur Bildung von Neu5Gc bzw. Neu5Ac</a> .....	134
<a href="#">Tabelle 5-2: Gegenüberstellung der Raum-Zeit-Ausbeuten der Batch-Synthese von Neu5Gc und der kontinuierlichen Synthese von Neu5Ac</a> .....	135
<a href="#">Tabelle 5-3: Produktkonzentrationen beim Gleichgewichtsumsatz (GU) und die RZA bei dem jeweiligen halben Gleichgewichtsumsatz (<math>\frac{1}{2}</math> GU) für die verschiedenen Substratverhältnisse; alle Größen [mM]</a> .....	137
<a href="#">Tabelle 6-1: Bedingungen zur Isolierung von Neu5Ac3F mittels Anionenaustauschchromatographie</a> .....	145
<a href="#">Tabelle 6-2: Bedingungen zur Isolierung von CMP-Neu5Ac3F mittels Anionenaustauschchromatographie</a> .....	146
<a href="#">Tabelle 6-3: <math>^1\text{H}</math>-Verschiebungen [ppm]</a> .....	158
<a href="#">Tabelle 6-4: <math>J_{\text{H,H}^-}</math>, <math>J_{\text{F,H}^-}</math> und <math>J_{\text{P,H}^-}</math>-Kopplungen im <math>^1\text{H}</math>-NMR [Hz]</a> .....	159
<a href="#">Tabelle 6-5: <math>^{19}\text{F}</math>-Verschiebungen [ppm]</a> .....	159
<a href="#">Tabelle 6-6: <math>^{13}\text{C}</math>-Verschiebungen [ppm]</a> .....	159
<a href="#">Tabelle 6-7: <math>J_{\text{F,C}^-}</math> und <math>J_{\text{P,C}^-}</math>-Kopplungen im <math>^{13}\text{C}</math>-NMR [Hz]</a> .....	160
<a href="#">Tabelle 6-8: Chlorid-, Phosphat- und Magnesium-Gehalt von isoliertem Neu5Ac3F und CMP-Neu5Ac3F</a> .....	160



## Symbole

$C_{(A)}$	mol/l	Konzentration der Komponente A
$E_a$	J/mol	Aktivierungsenergie
Da	g/mol	Dalton
$K_{eq}$		Gleichgewichtskonstante
$K_{eq}^{ald}$	l/mol	Gleichgewichtskonstante der Aldolasereaktion
$K_{eq}^{epi}$		Gleichgewichtskonstante der Epimerasereaktion
$k_i$	mol/l	Inhibierungskonstante
$k_m$	mol/l	Michaelis-Menten-Konstante
R	J/(mol*K)	allgemeine Gaskonstante (8,31 J/(mol*K))
t	min	Zeit
T	K	absolute Temperatur
U	$\mu\text{mol}/\text{min}$	Enzymaktivität
U*	$\mu\text{mol}/\text{min}$	Enzymaktivität bezogen auf Standardassay
V	l	Volumen
$\lambda$	nm	Wellenlänge
v	U/mg	massenspezifische Aktivität
$v_{max}$	U/mg	maximale massenspezifische Aktivität
E	g/l	Enzymkonzentration

## Abkürzungsverzeichnis

Asn	Asparagin
ATP	Adenosintriphosphat
CAPS	3-[Cyclohexylamino]-1-propansulfonsäure
CDP	Cytidindiphosphat
CMP	Cytidinmonophosphat
CMP-Neu5Ac	Cytidinmonophosphat-N-Acetylneuraminsäure
CMP-Neu5Ac3F	Cytidinmonophosphat-N-Acetyl-3-Fluorneuraminsäure
CMP-Neu5Gc	Cytidinmonophosphat-N-Glycolylneuraminsäure
CSTR	Continuously stirred tank reactor (kontinuierlicher Satzreaktor)
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
CTP	Cytidintriphosphat
DAST	Diethylaminoschwefeltrifluorid
de	Diastereomerenüberschuss
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DPA	Dipicolinsäure
E.C.	Enzymklasse
FDA	Food and Drug Administration (amerikanische Gesundheitsbehörde)

F-Pyr	Fluorpyruvat
Gal	Galactose
GalNAc	<i>N</i> -Acetylgalactosamin
GDP	Guanosindiphosphat
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin
GlcNGc	<i>N</i> -Glycolylglucosamin
GSL	Glycosphingolipid
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (hochauflösende Flüssigkeitschromatographie)
IBT 2	Institut für Biotechnologie 2
INC	Institut für Nuklearchemie
KDN	2-Keto-3-desoxy-D- <i>glycero</i> -D- <i>galacto</i> -2-nonulosonsäure
KDO	2-Keto-3-desoxy-D- <i>glycero</i> -D- <i>galacto</i> -2-octulosonsäure
LacNAc	<i>N</i> -Acetylactosamin
MAG	Myelin-assoziiertes Glycerotein
ManNAc	<i>N</i> -Acetylmannosamin
ManNGc	<i>N</i> -Glycolylmannosamin
Neu5Ac3F	<i>N</i> -Acetyl-3-Fluorneuraminsäure
NeuAc/Neu5Ac	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure
NeuGc/Neu5Gc	<i>N</i> -Glycolyneuraminsäure
NeuLev	<i>N</i> -Levulinylneuraminsäure
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Kernresonanz-Spektroskopie)
PEG	Polyethylenglykol
PEP	Phosphoenolpyruvat
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
P <sub>i</sub>	<i>ortho</i> -Phosphat
Ppase	Pyrophosphatase
PP <sub>i</sub>	Pyrophosphat
Pro	Prolin
RT	Raumtemperatur
Ser	Serin
Sia	Sialinsäure
Thr	Threonin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)ammoniummethan
UDP	Uridindiphosphat
Upm	Umdrehung pro Minute

# 1 Einleitung

In der heutigen gesundheits- und ernährungsbewussten Welt wird es kaum jemanden geben, der mit dem Begriff "Kohlenhydrate" nichts anfangen kann. Wer sie allerdings ausschließlich als Verursacher von als lästig empfundener Körperfülle betrachtet, tut ihnen Unrecht und unterschätzt bei weitem Ihre Kapazität.

Zucker stellen zusammen mit Fett und Eiweiß zum einen die Hauptenergiequelle für lebende Organismen dar. Darüber hinaus haben sie eine wesentliche Rolle als Strukturmaterial. In der Vergangenheit lag dabei das Hauptaugenmerk auf einfachen Zuckern und Homopolysacchariden wie Stärke, Glycogen, Cellulose und Chitin.

In den letzten vier Dekaden hat sich jedoch die Aufmerksamkeit der Wissenschaft auf die Studie von komplexen Kohlenhydraten, besonders Glycoproteinen und Glycolipiden, die allgemein als Glycoconjugate bezeichnet werden, gerichtet. Dabei zeigte sich, dass Glycoconjugate als Erkennungsmarker fungieren und so eine herausragende Rolle bei der Steuerung fast aller Körperfunktionen spielen. Ohne sie wäre jede uns bekannte Form höheren Lebens undenkbar.

## 1.1 Vorkommen und Bedeutung von Kohlenhydraten

Kohlenhydrate kommen in Flora und Fauna vor. Beiden dienen D-Glucosepolymere als Energiespeicher. Die grünen Pflanzenzellen bauen Stärke durch Assimilation von Kohlendioxid in ihrer Photosynthesereaktion auf. So werden jährlich über 100 Milliarden Tonnen Kohlenhydrate auf der Erde produziert. Stärke besteht aus Amylose ( $\alpha$ -1,4-Glycan, relative Molekülmasse 17.000 bis 225.000) und Amylopektin ( $\alpha$ -1,4-Glycan mit  $\alpha$ (1,6)-glycosidischen Verzweigungen, relative Molekülmasse 200.000 bis 1.000.000). Durch enzymatische Hydrolyse kann die Pflanze daraus Glucose und Maltose gewinnen.

Der tierische Organismus baut in der Leber Glycogen als Reservekohlenhydrat aus einem Teil der Kohlenhydratnahrung auf. Es wird in der Leber und im Muskelgewebe gespeichert. Glycogen ähnelt sehr dem Amylopektin, ist jedoch noch stärker verzweigt.

Als Strukturpolymere sind vor allem Cellulose und Chitin von Bedeutung. Cellulose bildet als Gerüstsubstanz den Hauptbestandteil der pflanzlichen Zellwände und ist somit das am häufigsten vorkommende Kohlenhydrat. Sie wird durch  $\beta$ (1,4)-glycosidische Verknüpfung von D-Glucose gebildet (relative Molekülmasse 200.000 bis zu einigen Millionen). Häufig finden sich vergesellschaftet mit der Cellulose auch Hemicellulosen, die durch  $\beta$ (1,4)-glycosidische Verknüpfung anderer Hexosen sowie Pentosen entstehen.

Chitin dient als Gerüstsubstanz für Krebstiere und Insekten und als Pilzcellulose in einigen Pilzen (Steinpilze). Es ist analog zur Cellulose aufgebaut, nur ist der Grundbaustein nicht D-Glucose sondern N-Acetyl-D-Glucosamin (GlcNAc).

Das "wahre Können" der Zucker geht allerdings über diese Rolle als Energielieferant und Strukturelement hinaus und liegt in ihrer vielfältigen, strukturellen Komplexität begründet. Es hat sich gezeigt, dass alle Säugerzellen einen Mantel aus Kohlenhydraten tragen<sup>1</sup>. Diese in der Zelloberfläche verankerten Saccharide sind Informationsträger auf molekularer Ebene. Obwohl sich Säugetiere normalerweise auf die Verwendung von nur sieben oder acht Monosaccharidbausteinen beschränken, ist wegen der Multifunktionalität dieser Monomere der Aufbau einer schier unbegrenzten Zahl komplexer Strukturen möglich. So können beispielsweise mehrere Millionen topologisch unterschiedlicher Tetrasaccharide aus diesen wenigen Monosacchariden entstehen, wenn man die Art der Verzweigung, die Konfiguration des glycosidischen C-Atoms und die Modifikation der Hydroxyl- und Aminogruppen in Betracht zieht. Oligosaccharide sind daher in der Lage, effizient die riesigen Datenmengen zu kodieren, die für biologische Erkennungsprozesse, von interzellulärer Kommunikation über Signalübertragung, Zelladhäsion, Infektion und Zelldifferenzierung bis hin zur Zellentwicklung und Metastase, benötigt werden<sup>2</sup>. Alle diese Prozesse basieren auf Interaktion komplementärer Strukturen, wie bei einem Schlüssel-Schloß-Prinzip<sup>3</sup>.

Trotzdem hat es lange gedauert, bis die Kohlenhydrate aus dem Schatten der Proteine treten konnten. Lange Zeit wurden die Zuckerstrukturen, die häufig in Gesellschaft von Proteinen zu beobachten waren und sich schwer oder gar nicht abtrennen ließen, lediglich als Problem für die Analyse dieser Proteine betrachtet<sup>4</sup>. Erst die Entwicklung neuer Analysetechniken zeigte auf, dass diese kovalent gebundenen Zuckerstrukturen wesentlich zur Funktion dieser Glycoproteine beitragen.<sup>5</sup>

### 1.1.1 Glycoconjugate

Der Begriff Glycoconjugat wurde von Montreuil 1973 für Glycoproteine, Proteoglycane und Glycolipide geprägt.

Die Oligosaccharidketten der Glycoconjugate werden bei Säugetieren durch die, nach ihrem Entdecker *Luis F. Leloir* benannten, *Leloir-Glycosyltransferasen* biosynthetisiert<sup>6</sup>. Dabei wird der Glycosyldonor, ein als Nucleosidphosphat aktivierter Monosaccharid auf den Akzeptor unter Abspaltung des Nucleosidphosphats übertragen. Oligosaccharide können auch durch Nicht-*Leloir-Glycosyltransferasen* biosynthetisiert werden.

Die membrangebundenen Glycosyltransferasen der Säugetiere beschränken sich auf die folgenden acht Zuckernucleotide um die große Vielfalt der Oligosaccharide in den Glycoconjugaten aufzubauen: UDP-*N*-Acetylglucosamin, UDP-*N*-Acetylgalactosamin, UDP-

---

<sup>1</sup> Sharon, N., Lis, H., Kohlenhydrate und Zellerkennung, *Spektrum der Wissenschaft*, März 1993, 66-74

<sup>2</sup> Wong, C.-H., Halcomb, R.L., Ichikawa, Y., Kajimoto, T., Enzyme in der organischen Synthese: Das Problem der Molekularen Erkennung von Kohlenhydraten (Teil I), *Angew. Chem.*, 1995, 107, 453-474

<sup>3</sup> Lis, H., Sharon, N., Proteinglycosylation, *Eur. J. Biochem.*, 1993, 218, 1-27

<sup>4</sup> Schmidt, R.R., Neue Methoden zur Glycosid- und Oligosaccharidsynthese – gibt es Alternativen zu Koenigs-Knorr-Methode?, *Angew. Chem.* 1986, 98, 213-236

<sup>5</sup> Paulson, J.C., Fortschritte bei der selektiven chemischen Synthese komplexer Oligosaccharide, *Angew. Chem.* 1982, 94, 184-201

<sup>6</sup> Leloir, L.F., Two decades of research on the biosynthesis of saccharides, *Science*, 1971, 172, 1299-1303

Glucose, UDP-Galactose, GDP-Mannose, GDP-Fucose, UDP-Gluconsäure und CMP-Neuraminsäure, das einzige Nucleosidmonophosphat.

### 1.1.1.1 Die Glycosylierung von Glycoproteinen

Der Aufbau der Oligosaccharide auf Proteinen oder Lipiden wird als Glycosylierung bezeichnet. Die Glycoprotein-Glycosylierung lässt sich in zwei Klassen unterteilen, bezeichnet als N- und O-Glycosylierung.

N-Glycane sind über eine  $\beta$ -glycosidische Bindung von N-Acetylglucosamin an Asparagin (Asn) in einer Polypeptidkette gebunden. Die notwendige aber nicht hinreichende Bedingung für Protein N-Glycosylierung ist die Präsenz einer Asn-x-Ser/Thr Sequenz (Sequon), wobei x jede Aminosäure außer Prolin (Pro) sein kann. Es werden drei Untergruppen unterschieden, die jedoch auf eine gemeinsame core-Struktur aufbauen<sup>7</sup>.

O-Glycosylierung erfolgt an Serin (Ser) oder Threonin (Thr) Resten, trotzdem gibt es kein bekanntes Sequon für O-Glycosylierung. Die O-verknüpften Kohlenhydrate sind tendenziell kürzere Strukturen als die N-verknüpften, zeichnen sich aber durch eine viel höhere Strukturvielfalt aus.<sup>8</sup> Die Bindung erfolgt bei Säugern meistens  $\alpha$ -glycosidisch über einen N-Acetylgalactosamin (GalNAc) Rest. In diesem Fall spricht man vom Mucin-Typ, da diese Verknüpfung im Mucin<sup>x</sup> zuerst entdeckt wurde.

Auf der GalNAc-Thr/Ser-Struktur basieren eine Reihe von core-Strukturen (Abbildung 1-1)<sup>9</sup>.

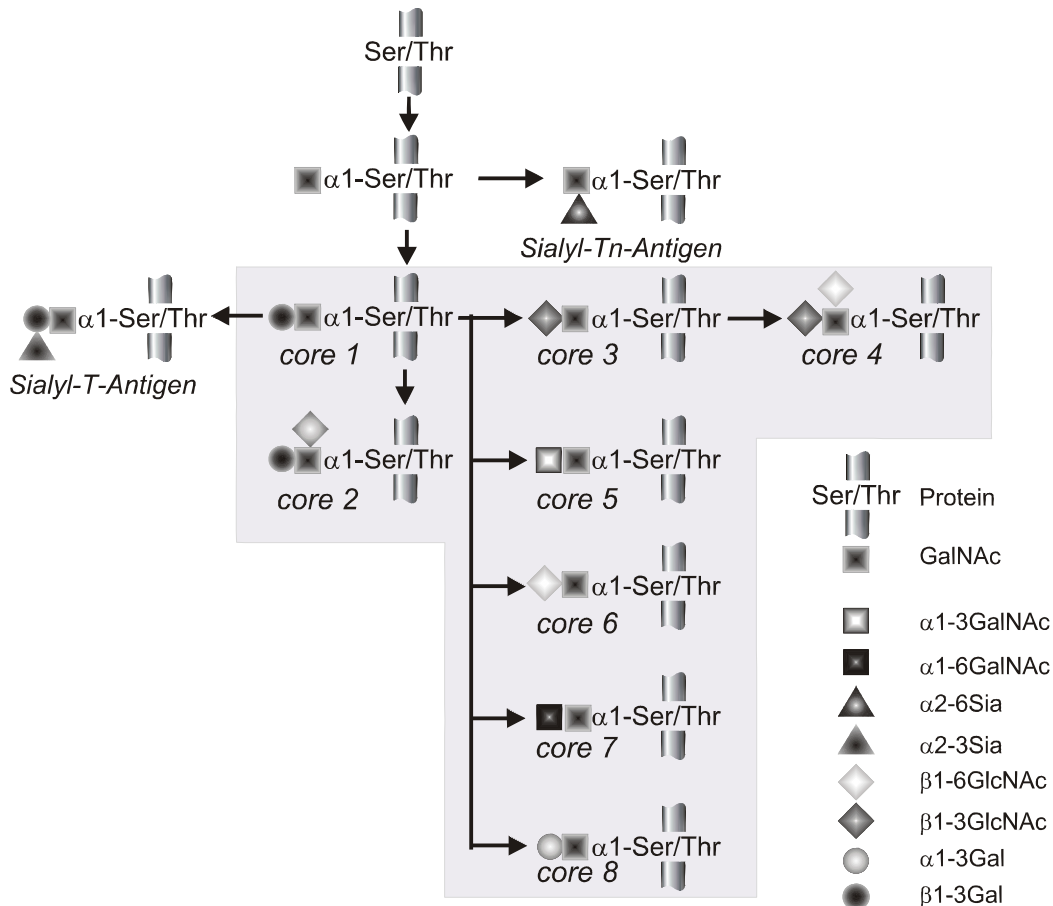
---

<sup>7</sup> Fukuda, M., Cell surface carbohydrates: cell-type specific expression, in: *Molecular glycobiology*, (Hrsg. Fukuda, M., Hingault, O.), Oxford University Press, Oxford, **1994**, 1-52

<sup>8</sup> Hounsell, E.F., in: *Glycoprotein Analysis in Biomedicine*, (Hrsg. Hounsell, E.F.), Humana Press, Totowa, **1993**, 1-15

<sup>x</sup> Mucin: von lat. mucus = Schleim

<sup>9</sup> Van der Stehen, P., Rudd, P.M., Dwek, R.A., Opdenakker, G., Concepts and principles of O-linked glycosylation, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **1998**, 33, 151-208



**Abbildung 1-1:** Stammbaum der *O-glycosidischen* core-Strukturen. Die Quadrate symbolisieren *N*-Acetylgalactosamin, die Dreiecke Sialinsäure, die Rauten *N*-Acetylglucosamin und die Kreise Galactose, die verschiedenen Färbungen stehen für die unterschiedlichen Verknüpfungen.

Die meisten tierischen Plasmaproteine sind glycosyliert, obwohl es wesentliche Ausnahmen wie z.B. Serum Albumin gibt. Viele eukaryontische Zelloberflächenrezeptoren (Lektine) und andere membrangebundene Proteine sind ebenfalls glycosyliert. Jüngere Arbeiten von Hart haben gezeigt, dass viele eukaryontische cytosolische Proteine ebenfalls glycosyliert sind und *O-glycosidisch* *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) Reste tragen. Diese Glycosylierung ist dynamisch und könnte eine regulatorische Rolle spielen<sup>10</sup>.

Den meisten Prokaryonten auf der anderen Seite fehlen die zellulären Mechanismen, um Proteine in dieser Art zu glycosylieren. Mit Ausnahme der strukturellen Peptidoglycane sind die meisten prokaryontischen Proteine nicht glycosyliert.

### 1.1.1.2 Glycolipide

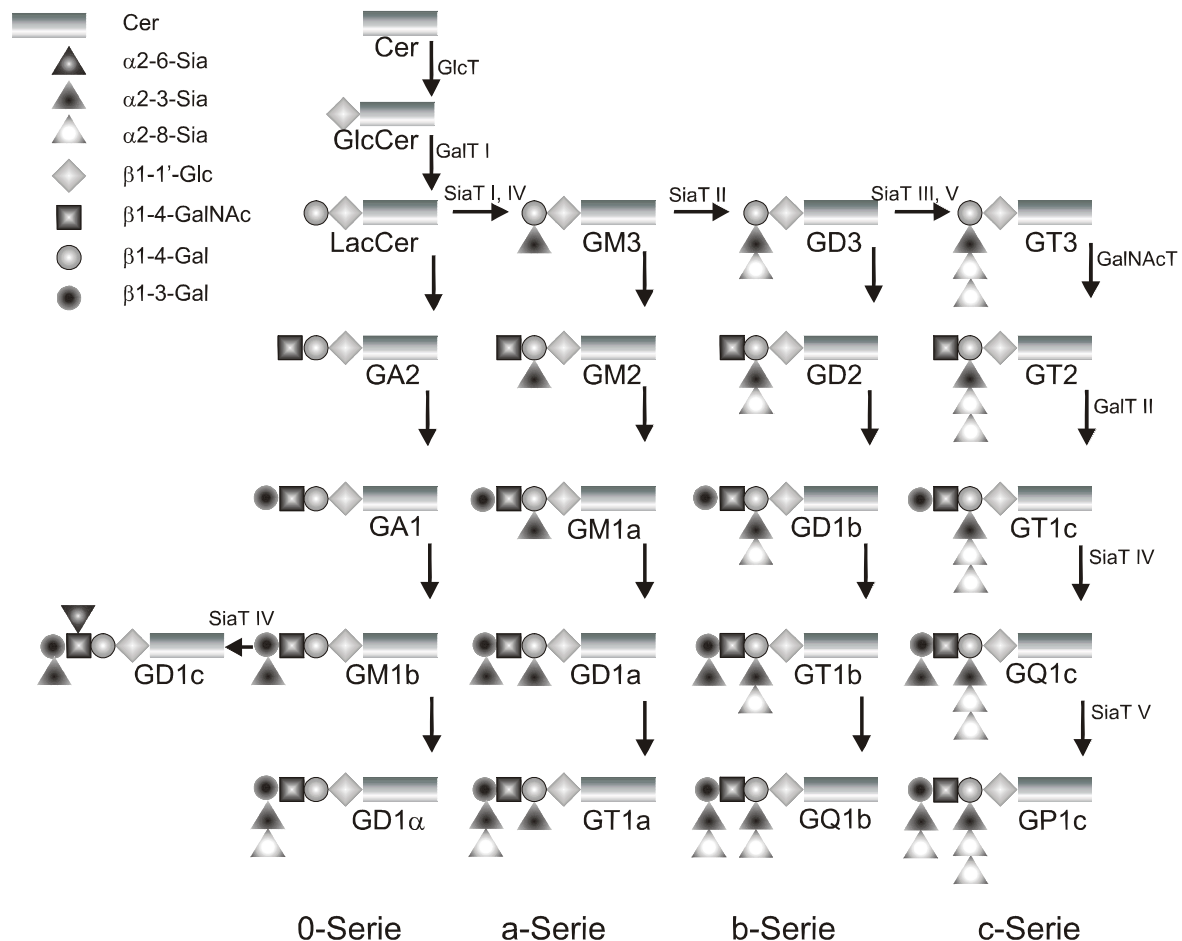
Glycolipide oder auch Glycosphingolipide (GSL) sind ebenfalls Bausteine von Plasmamembranen eukaryontischer Zellen. Zusammen mit den Glycoproteinen bilden sie die Kohlenhy

<sup>10</sup> Haltiwanger, R.S., Kelly, W.G., Roquemore, E.P., Blomberg, M.A., Dong, L.-Y.D., Kreppel, L., Chou, T.-Y., Hart, G.W., Glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins is ubiquitous and dynamic, *Biochem. Soc. Trans.*, **1992**, *20*, 264-269

dratschicht, die die Zelloberfläche bedeckt. Durch einen Sphingolipidrest werden die Kohlenhydrate in der Zelloberfläche verankert.

In der Natur existiert eine Vielzahl von GSL, die sich in Art, Zahl und Verknüpfung der einzelnen Zuckerbausteine unterscheiden.

Ende der Dreißiger Jahre entdeckte Klenk im menschlichen Gehirn eine neue Untergruppe saurer GSL<sup>11</sup>. Er bezeichnete sie als Ganglioside und die saure Komponente als Neuraminsäure. Kuhn gelang es 1962 die Struktur der *N*-Acetylneuraminsäure (s. Abbildung 1-4) und 1963 die Struktur des ersten Gangliosides GM1, dem häufigsten Gangliosid im adulten menschlichen Gehirn, aufzuklären<sup>12</sup>. Es gibt vier Serien von Gangliosiden, die sich in Ihrer Komplexität und Anzahl der Neuraminsäuren und deren Bindung unterscheiden (Abbildung 1-2).



**Abbildung 1-2:** Biosyntheschema komplexer Ganglioside. Die Reaktionsschritte werden von membranständigen Glycosyltransferasen im Lumen des Golgi-Apparates katalysiert. Die Quadrate symbolisieren *N*-Acetylgalactosamin, die Dreiecke Sialinsäure, die Rauten *N*-Acetylglucosamin und die Kreise Galactose, die verschiedenen Färbungen stehen für die unterschiedlichen Verknüpfungen.

Die Ausstattung eines Organismus mit Glycoconjugaten ist artspezifisch. Glycoconjugate bilden auf der Zelloberfläche zelltypische Muster, die sich während der Entwicklung, Differenzierung oder Erkrankung einer Zelle in charakteristischer Weise ändern. Kohlenhydrate auf Krebszellen beispielsweise unterscheiden sich in Quantität wie auch in Qualität von denen auf normalen Oberflächen. Jenes Kohlenhydrat, das von E-Selektin<sup>x</sup> erkannt wird, kommt auf verschiedenen Tumorzellen vor. Es wurde beobachtet, dass sich wenigstens ein Typ von menschlichen Tumorzellen spezifisch an E-Selectin-Moleküle auf aktiviertem Endothel<sup>xx</sup> bindet. Möglicherweise machen sich also gewisse maligne Zellen die in die Immunabwehr involvierten Adhäsionsmoleküle zunutze, um ihre eigene Metastatisierungsfähigkeit zu fördern; dann könnten eventuell anti-adhesive Medikamente zugleich anti-metastatisch wirken<sup>13</sup>.

Glycoconjugate bieten aber auch Bindungsstellen für Toxine, Viren und Bakterien. Zelladhäsionsphänomene dieser Art beruhen auf einer Bindung des Kohlenhydratanteils membranständiger Glycoconjugate durch Lektine außerhalb der Zelle. Auf diesem Prinzip beruht auch die Bildung von Myelinscheiden um die Axone von Nervenzellen. Hier sind Ganglioside auf der Oberfläche neuronaler Zellen Liganden für das Myelin-assoziierte Glycoprotein (MAG), das sich auf der Oberfläche myelinisierender Gliazellen befindet und für die Inhibierung der Nervenregeneration nach einer Verletzung (z.B. Querschnittslähmung) verantwortlich ist<sup>14</sup>. Durch die Substitution der Neuraminsäure durch Glycolylneuraminsäure, kann diese Bindung nahezu vollständig unterbunden werden<sup>15</sup>.

Diese Beispiele zeigen auf, wie wichtig das Erforschen dieser Mechanismen für die moderne Medizin ist, da sie potentielle Relevanz für unterschiedliche Disziplinen der Grundlagenforschung und Klinik haben (Abbildung 1-3)<sup>16</sup>.

---

<sup>11</sup> Klenk, E., Über die Ganglioside, eine neue Gruppe von zuckerhaltigen Gehirnlipoiden, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1942**, 273, 76-86

<sup>12</sup> Kuhn, R., Baschang, G., Die Konfiguration der Sialinsäuren am C-Atom 4, *Chem. Ber.*, **1962**, 95, 2384-2385

<sup>x</sup> Selektine sind Lektine, die Bindungen zwischen den Gefäßen und den Leukozyten bei entzündlichen Prozessen vermitteln. P- und E-Selektin werden auf dem aktivierten Endothel exprimiert, L-Selektin auf den Leukozyten.

<sup>xx</sup> von plattenförmigen Zellen (Plattenepithel) gebildete innere Auskleidung des Herzens sowie der Blut- und Lymphgefäße

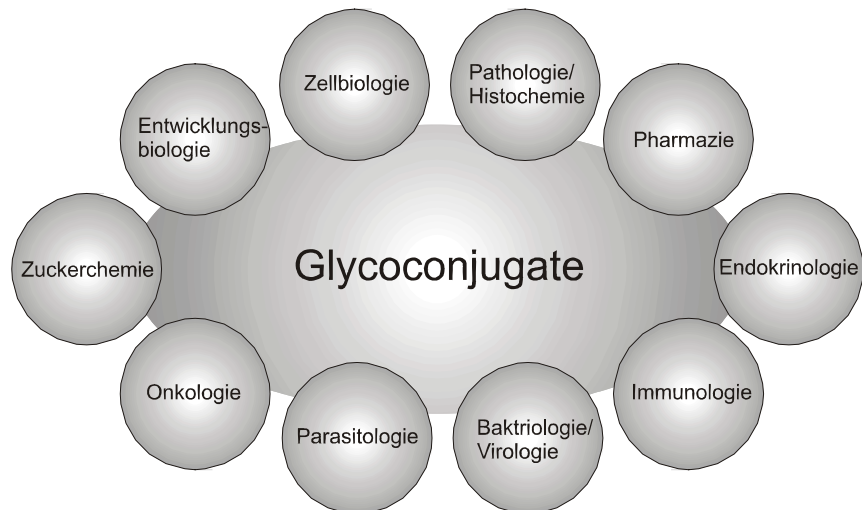
<sup>13</sup> Sharon, N., Lis, H., Kohlenhydrate und Zellerkennung, *Spektrum der Wissenschaft*, März **1993**, 66-74

<sup>14</sup> Kolter, T., Sandhoff, K., Sphingolipide – ihre Stoffwechselwege und die Pathobiochemie neurodegenerativer Erkrankungen, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 1632-1670

<sup>15</sup> Collins, B.E., Fralich, T.J., Itonori, S., Ichikawa, Y., Schnaar, R.L., Conversion of cellular sialic acid expression from *N*-acetyl- to *N*-glycolylneuraminic acid using a synthetic precursor, *N*-glycolylmannosamine pentaacetate: inhibition of myelin-associated glycoprotein binding to neutral cells, *Glycobiology*, **2000**, 10, 11-20; Collins, B.E., Yang, L.J.S., Mukhopadhyay, G., Filbin, M.T., Kiso, M., Hasegawa, A., Schnaar, R.L., Sialic acid specificity of myelin-associated glycoprotein binding, *J. Biol. Chem.*, **1997**, 272, 1248-1255

<sup>16</sup> Gabius, H.J., Kayser, K., Gabius, S., Protein-Zucker-Erkennung, Grundlagen und medizinische Anwendung am Beispiel der Tumorerkennung, *Naturwissenschaften*, **1995**, 82, 533-543





**Abbildung 1-3:** Bedeutung glycobiochemischer Strukturelemente für unterschiedliche Disziplinen der Grundlagenforschung und Klinik

## 1.2 Zucker in der modernen Medizin

In der Anwendung von Kohlenhydrat basierten potentiellen Arzneiwirkstoffen stellen sich etliche Probleme. Zum Einen neigen sie dazu, nur einen schwachen Halt auf ihren Targets zu haben, was bedeutet, das sie in hohen Dosen verabreicht werden müssen um den gewünschten Effekt zu erzielen. Außerdem werden sie aufgrund ihrer physiologischen Struktur *in vivo* leicht abgebaut oder ausgeschieden. Zu guter Letzt stellen die verzweigten Strukturen komplexer Oligosaccharide eine große Herausforderung an die Synthese und die Analytik dar, und die Übertragung in einen größeren Maßstab ist nur sehr schwer möglich, was die Produktionskosten immens in die Höhe treibt.

Daher werden große Anstrengungen zur Entwicklung automatisierter Synthesetechniken unternommen<sup>17</sup>.

Trotz dieser Widrigkeiten haben bereits mehr als 80 zuckerbasierte Wirkstoffe eine FDA-Zulassung (Tabelle 1-1) oder sind in einer klinischen Prüfphase (Tabelle 1-2). Bekannte Beispiele<sup>18</sup> sind ein Impfstoff gegen *Haemophilus influenzae* Typ b bei dem es sich um ein proteinkonjugiertes Polyribosylribitolphosphat (PRP), ein kapsuläres Polysaccharid des Erregers<sup>x</sup>, handelt. Bei EPO (Erythropoietin), das eine etwas unrühmliche Bekanntheit durch Doping erlangt hat, handelt es sich um ein glycosyliertes Protein, das als Wachstumshormon für die Produktion roter Blutkörperchen verantwortlich ist. Die Glycosylierung ist nicht entscheidend für die Wirkung als solche, ist aber notwendig, damit EPO lange genug in der Blutbahn bleibt. Außerdem gibt es zwei Wirkstoffe gegen Influenza, bei denen es sich um sialidaseinhibierende künstliche Neuraminsäurederivate handelt (Kap. 1.3.4.2). Darüber

<sup>17</sup> Sears, P., Wong, C.-H., Toward Automated Synthesis of Oligosaccharides and Glycoproteins, *Science*, **2001**, 291, 2344-2350

<sup>18</sup> Alper, J., Searching for Medicine's Sweet Spot, *Science*, **2001**, 291,2338-2343

<sup>x</sup> Erreger einer bakteriellen Meningitis bei Kindern, an dem früher bis zu 25.000 Kinder pro Jahr allein in den USA starben.

hinaus gibt es eine Vielzahl von Herzglycosiden, Antibiotika und anderen Therapeutika, von denen einige ausgewählte in Tabelle 1-1 aufgeführt sind.

Wirkstoff	Indikation	Klasse/Struktur	Darstellung
Acarbose	antidiabetisch, $\alpha$ -Glucosidaseinhibitor	modifiziertes Glucosetetrasaccharid	synthetisch
Acetyldigitoxin	kardiotonisch, Herzglycosid	Steroid mit modifiziertem Oligosaccharid	synthetisch
Aclarubicin	antineoplastisch	kondensierte Aromaten mit modifizierter Oligosaccharidseitenkette	fermentativ aus <i>Streptomyces galiaeus</i>
Ademetionine	antirheumatisch	Adenosylmethionin	fermentativ aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Amikacin	Aminoglycosid-Antibiotikum	Aminozuckerkette	synthetisch
Azacitidine	antineoplastisch	Cytidinderivat	synthetisch
Benexate	cytoprotectives Agens, chymotrypsin Inhibitor	$\beta$ -Cyclodextrin-Wirkstoffkomplex	synthetisch
Bucladhesin Natrium	kardiotonisch, Phosphodiesterase Inhibitor	Adenosinderivat	synthetisch
Cadixomer iodine	antiseptisch für die Behandlung von Venengeschwüren	Iod-Dextrin-Komplex	synthetisch
Citicoline	Cerebrostimulant, antiparkinson, lipometabolisches Coenzym	Cytidindiphosphatderivat	synthetisch
Didanosine	anti-AIDS Therapeutikum	Guanosinderivat	fermentativ aus <i>Acinetobacter Iwoffii</i>
Erythromycin	makrolides Antibiotikum	hochchirales Oxacyclotetradecanderivat mit Zuckersubstituenten	fermentativ aus <i>Streptomyces erytreus</i>
Heparin	Antikoagulant, antithrombolytisch	Mucopolysaccharidpolyschwefelsäureester	aus tierischem Gewebe
Idoxuridine	Chemotherapeutikum (Herpes Simplex)	Uridinderivat	synthetisch
Inositol	Lebertherapeutikum	myo-Inositol	aus Mais
Lactulose	Laxativ	Lactosederivat	synthetisch
Lentinan	Immunostimulant, antineoplastisch	verzweigtes $\alpha$ -Glucosepolymer	aus Fungus <i>Lentinus edodes</i>
Mepartricin	polyenes Antibiotikum	Partricinmethylester	fermentativ aus <i>Streptomyces aureofaciens</i>
Metrizamide	Röntgenkontrastmittel	Metrizoyldesoxyglucopyranose	synthetisch
Mizoribine	Immunsuppressivum	Ribofuranosylimidazolderivat	fermentativ aus <i>Eupenicillium brefeldianum</i>
Ribavirin	antiviral	Ribofuranosyltriazolderivat	synthetisch
Streptaniazid	tuberkulostatisch	Trisaccharid aus künstlichen Zuckerderivaten	synthetisch
Vancomycin	Antibiotikum	Glucosaccharid	fermentativ aus <i>Nocardia orientalis</i>
Zidovudine (Azidotymidin AZT)	anti-AIDS Therapeutikum, Reverse Transcriptase Inhibitor	3'Azid-3'desoxythymidin	synthetisch

**Tabelle 1-1:** Ausgewählte zugelassene Kohlenhydratwirkstoffe

Die beinhaltete Zuckerstruktur übernimmt dabei verschiedene Funktionen. Sie kann die eigentlich wirksame Struktureinheit des Wirkstoffs sein, sie kann aber auch eine Funktion für den Transport durch die Zellmembran oder für die Löslichkeit des Wirkstoffs haben.

Weitere Felder für die Forschung sind vor allem in der Krebsbehandlung, Infektionsbekämpfung, Stoffwechselerkrankungen, Entzündungshemmung<sup>19</sup> Krebsimpfung und Krebsdiagnostik<sup>20</sup>.

In Tabelle 1-2 sind einige Beispiele für Kohlenhydratwirkstoffe aufgeführt, die sich derzeit in verschiedenen klinischen Prüfphasen befinden.

Firma	Indikation	Klasse/Struktur	Status
SafeScience	Krebs	Pectin-basierter Oligosacch.	Phase II
GLYCODesign	Nierencarcinom	Swainsonin Analogon	Phase II
Progenics	Melanoma	GD <sub>2</sub> /KLH Konjugat	Phase III
Progenics	Krebs	GM <sub>2</sub> /GD <sub>2</sub> /KLH Konjugat	Phase I/II
Austin Res. Inst.	Brustkrebs	Mannan/Mucin Formulierung	Phase III
Progen Indus.	Krebs	Sulfatiertes Oligosaccharid	Phase I
Synsorb Biotech	<i>C. difficile</i> Infektion	Oligosacch. Konjugat	Phase III
Synsorb Biotech	<i>E. coli</i> O157:H7 Infektion	Oligosacch. Konjugat	Phase III
Biomira	Metastatisierendes Karzinom	Sialyl Tn Antigen Konjugat	Phase III
Oxford Glycosci.	Gaucher's	Imino Zucker Analogon	Phase III

**Tabelle 1-2:** Einige Kohlenhydratwirkstoffe in klinischer Prüfung<sup>21</sup>

### 1.3 Sonderstellung der Neuraminsäure

*N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac, NeuAc), systematischer Name 5-Acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero-D-galacto-nonulopyranosonsäure, ist der Hauptvertreter der mehr als 40 bekannten, natürlichen Derivate der Sialinsäuren. Die Neuraminsäure ist ein aus neun Kohlenstoffen bestehender saurer Aminozucker, wobei die Säurefunktion in der Natur aber nur in substituierter bzw. dissoziierter Form vorliegt. Die große strukturelle Vielfalt erschließt sich durch Substitution einer oder mehrerer Hydroxylgruppen oder der Acetylfunktion<sup>22</sup>. Das nach der Neu5Ac häufigste Derivat ist die *N*-Glycolyneuraminsäure (Neu5Gc, NeuGc). Die Acetylgruppe an der Aminogruppe in C-5 ist hier durch eine Glycolylgruppe ersetzt. Wie in Abbildung 1-4 gezeigt können weiterhin *O*-Acetylierungen in den Positionen C-4, C-7, C-8 und C-9 erfolgen, sowie Sulfatierung an C-8 und C-9, Methylierung an C-8 oder Lactoylierung oder Phosphorylierung an C-9<sup>23</sup>.

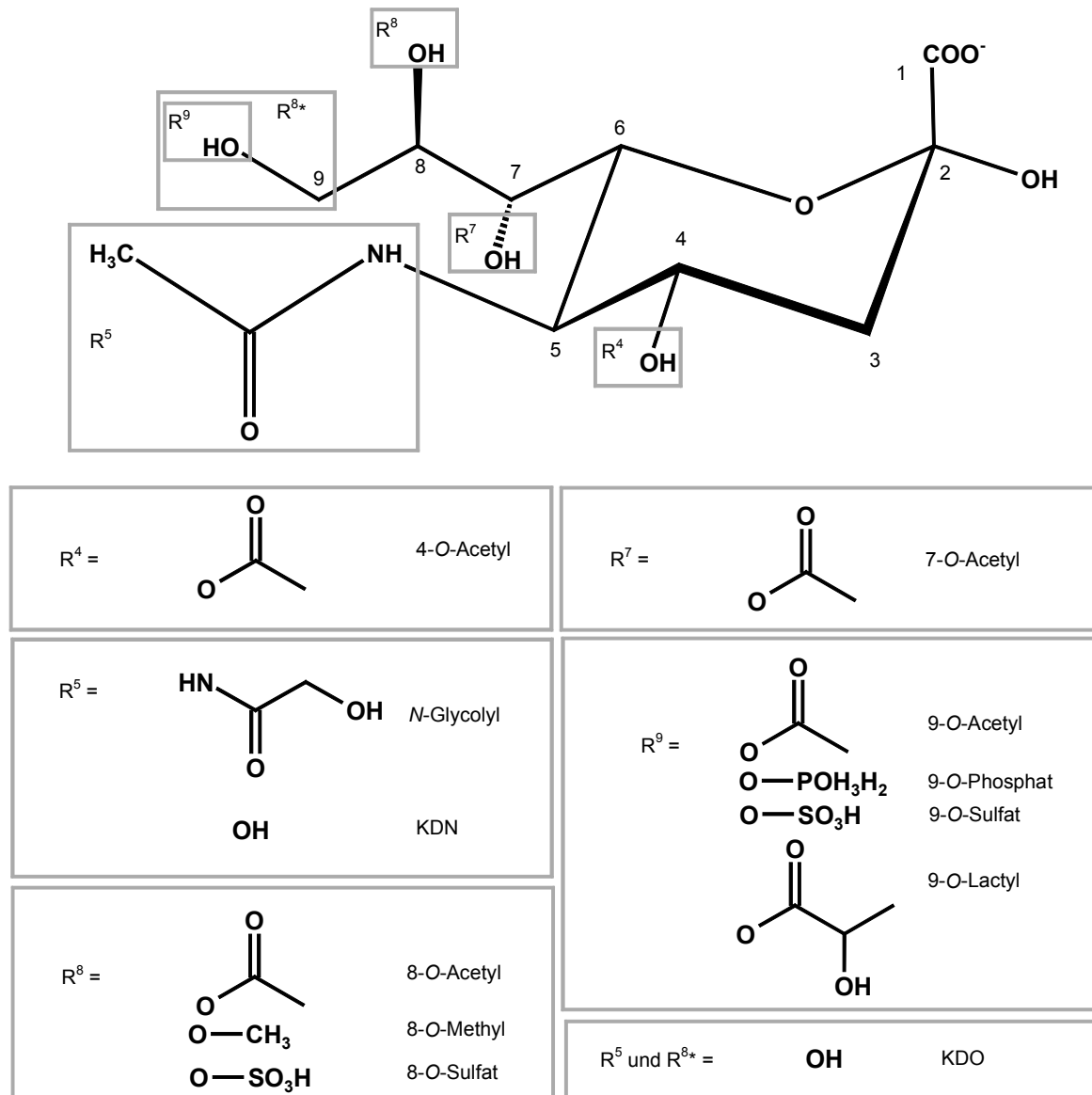
<sup>19</sup> Dudziak, G., Reaktionstechnische Untersuchungen zur enzymatischen Glycosylierung von Peptiden, Dissertation Universität Bonn, **1999**

<sup>20</sup> Pal, S., Chatterjee, M., Bhattacharya, D.K., Bandhyopadhyay, S., Mandal, C., Identification and purification of cytolytic antibodies directed against *O*-acetylated sialic acid in childhood acute lymphoblastic leukemia, *Glycobiology*, **2000**, *10*, 539-549

<sup>21</sup> Service, R.F., After the Fall, *Science*, **2001**, *291*, 2340-2341

<sup>22</sup> Varki, A., Diversity in the sialic acids, *Glycobiology*, **1992**, *2*, 25-40; Schauer, R., Kammerling, J.P., Chemistry, biochemistry and biology of sialic acids, in: *Glycoproteins II*, (Hrsg. Montreuil, J., Vliegenthart, J.F.G., Schachter, H.), Elsevier, Amsterdam, **1997**, 243-402

<sup>23</sup> Taverning, C., Schauer, R., Structure, function and metabolism of sialic acids, *Cell Mol. Life Sci.*, **1998**, *54*, 1330-1349



**Abbildung 1-4:** Substitutionen der Hydroxylfunktionen und der *N*-Acetylfunktion in natürlichen NeuAc Derivaten

Außerdem kommen noch wenigstens drei ungesättigte Neuraminsäurederivate, Neu5Ac2en, Neu2en5Gc und Neu2en5Gc8Me, mit einer Doppelbindung zwischen C-2 und C-3 vor<sup>24</sup>.

Eine ungewöhnliche Modifikation wurde 1986 in Lachseiern<sup>25</sup> und 1990 in Forelleneiern gefunden. Es handelt sich dabei um 2-Keto-3-desoxy-D-glycero-D-galacto-2-nonulosonsäure (KDN) bei der die *N*-Acetylfunktion in C-5 durch eine Hydroxylgruppe substituiert ist. Eine weitere Variante, die noch deutlicher von der NeuAc abweicht, ist die 2-Keto-3-desoxy-

<sup>24</sup> Shukla, A.K., Schöder, C., Nöhle, U., Schauer, R., Natural occurrence and preparation of O-Acetylated 2,3-unsaturated sialic acids, *Carbohydr. Res.*, **1987**, 168, 199-209

<sup>25</sup> Nadano, D., Iwasaki, M., Endo, S., Kitajima, K., Inoue, S., Inoue, Y., A Naturally Occurring Deaminated Neuraminic Acid, 3-Deoxy-D-glycero-D-galacto-nonulosonic Acid (KDN), *J. Biol. Chem.*, **1986**, 261, 11550-11557

D-glycero-D-galacto-2-octulosonsäure (KDO), die im Vergleich zur KDN außerdem kein C-9 hat.<sup>26</sup>

### 1.3.1 Vorkommen

Sialinsäuren kommen im Tierreich von den Echinodermaten<sup>x</sup> bis zu den Säugetieren vor<sup>27</sup>. Die Sialokonjugate befinden sich sowohl auf den Zelloberflächen, als auch in intrazellulären Membranen wie zum Beispiel dem Golgi-Apparat<sup>28</sup>. Auch in etlichen Insekten werden, allerdings nur in bestimmten Entwicklungsphasen, Neuraminsäuren gefunden<sup>29</sup>. Pflanzen weisen keine Neuraminsäuren auf, wohingegen bei einigen Pilzen Neuraminsäure auf der Oberfläche gefunden wurde.

In den letzten Jahren wurden auch bei einigen Viren und Protozoen Sialinsäuren entdeckt. Von den Bakterien weiß man hingegen schon länger, dass sie Sialinsäuren enthalten. Seitdem Barry<sup>30</sup> im Jahr 1959 bei *E.coli* die ersten Sialinsäuren fand, hat die Kenntnis über Sialinsäure bildende Arten stark zugenommen. Es ist auffällig, dass es sich dabei überwiegend um pathogene Arten handelt<sup>31</sup>. Teilweise besitzen sie Kapseln aus Sialinsäurehomopolymeren, die für die Pathogenese wichtig sein können, z.B. für die Invasion und Besiedelung der Hirnhaut<sup>32</sup>. Andere verfügen über sialinsäuremaskierte Lipopolysaccharide, was sie durch Mimese humaner Glycoproteine vor der Erkennung durch das Immunsystem schützt<sup>33</sup>.

### 1.3.2 Biologische Bedeutung

Die strukturelle Vielfalt der Sialinsäuren spiegelt sich auch in der Mannigfaltigkeit der Funktionen dieser Zucker wieder<sup>34</sup>. Bedingt durch den hydrophilen Charakter und die elektronegative Ladung (pK-Wert = 2,2) sind sie in die Bindung und den Transport von positiv geladenen Ionen (z.B.  $Ca^{2+}$ ) involviert<sup>35</sup>. Vor allem aber spielen Sialinsäuren wegen ihrer Polyfunktionalität und der exponierten, häufig terminalen Anordnung in den Oligosaccharidstrukturen der Glycoconjugate eine zentrale Rolle als Liganden bei den Zellerkennungs- und Adhäsionsvorgängen. Dabei sind verschiedene Sialinsäure bindende Rezeptoren

---

<sup>26</sup> Kragl, U., Gödde, A., Wandrey, C., Lubin, M., Augé, C., New Synthetic Applications of Sialic Acid Aldolase, a Useful Catalyst for KDO Synthesis. Relation between Substrate Conformation and Enzyme Stereoselectivity, *Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1994**, 119-124

<sup>x</sup> Stachelhäuter, seit dem Kambrium bekannte marine wirbellose Deuterostomier mit rd. 6000, wenige mm bis über 1 m große Arten, Bsp. Seestern

<sup>27</sup> Cornfield, A.P., Schauer, R., Occurrence of sialic acids, in: *Sialic Acids Chemistry, Metabolism and Function*, (Hrsg. Schauer, R.) Springer, Wien, New York, **1982**, 5-50

<sup>28</sup> Taverning, C., Schauer, R., Structure, function and metabolism of sialic acids, *Cell Mol. Life Sci*, **1998**, *54*, 1330-1349

<sup>29</sup> Karaçali, S., Kirmizigül, S., Dveci, R., Sialic acids in developing testis of *Galleria mellonella* (Lepidoptera), *Invertbr. Reprod. Dev.*, **1999**, *35*, 225-229; Roth, J., Kempf, A., Reuter, G., Schauer, R., Gehring, W.J., Occurrence of sialic acids in *Drosophila melanogaster*, *Science*, **1992**, *256*, 673-675

<sup>30</sup> Barry, G.T., Detection of sialic acids in various *Escherichia coli* strains and in other species of bacteria, *Nature*, **1959**, 117-118

<sup>31</sup> Wasylnka, J.A., Simmer, M.I., Moore, M.M., Pathogenicity and Medical Microbiology: Differences in sialic acid density in pathogenic and non-pathogenic *Aspergillus* species, *Microbiology*, **2001**, *147*, 869-877

<sup>32</sup> Troy, F.A., Polysialylation: from bacteria to brains, *Glycobiology*, **1992**, *2*, 5-23

<sup>33</sup> Parsons, N.J., Andrade, J.R., Patel, P.V., Cole, J.A., Smith, H., Sialylation of liposaccharid and loss of absorption of bactericidal antibody during conversion of gonococci to serum resistance by cytidine 5'-monophospho-N-acetyl neuraminic acid. *Microb Pathog*, **1989**, *7*, 63-72; Wirth, H.-P., Yang, M., Karita, M., Blaser, M.J., Expression of human cell surface glycoconjugates Lewis x and Lewis y by *Helicobacter pylori* isolates is related to *cagA* status, *Infect. Immun.*, **1996**, *64*, 4598-4605

<sup>34</sup> Schauer, R., Kelm, S., Reuter, G., Roggentin, P., Shaw, L., Biochemistry and role of sialic acids, in: *Biology of the Sialic Acids*, (Hrsg. Rosenber, A.), Plenum Press, New York, **1995**, 7-67

<sup>35</sup> Jeanloz, R.W., Coddington, J.F., Their biological role of sialic acid at the cell surface, in: *Biological Roles of Sialic Acid*, Hrsg. Rosenber, A., Schengrund, C.L.), Plenum Press, New York, **1976**, 201-238

ren wie Siglecs<sup>x</sup>, Selektine und andere Lektine für Zellinteraktionen von großer Bedeutung<sup>36</sup>. Aufgrund ihrer exponierten Stellung an den Oligosaccharidketten dienen sie als Schutzschild für die Subterminalen Moleküle vor degradierenden Enzymen wie Proteasen<sup>37</sup>, sind aber daneben auch Rezeptoren für pathogene Toxine wie z.B. das Cholera-Toxin, das an GM1 bindet.

Die Anheftung von Mikroorganismen an ihre Wirtszellen ist ebenfalls oft sialinsäureabhängig. Einerseits kann die Bindung von z.B. *Actinomyces viscosus* durch *N*-Acetylneuraminsäure inhibiert werden, andererseits binden gerade pathogene Organismen wie *Trypanosoma cruzi*, *Helicobacter pylori* oder Influenza-Viren über sialinsäurehaltige Rezeptoren an ihre Wirtszellen<sup>38</sup>.

### 1.3.3 Biosynthese der Neuraminsäure

Die *N*-Acetylneuraminsäure wird, wie in Abbildung 1-5 gezeigt, *in vivo* in der Leber im Cytosol aus *N*-acetyliertem D-Mannosamin (ManNAc) bzw. D-Glucosamin (GlcNAc) synthetisiert. GlcNAc wird über das 6-Phosphat zum 1-Phosphat umgesetzt und dann zu UDP-GlcNAc aktiviert. Durch die UDP-GlcNAc 2-Epimerase wird dieses unter UDP-Abspaltung weiter zu ManNAc umgesetzt. Es konnte an der Rattenleber gezeigt werden, dass die UDP-GlcNAc 2-Epimerase/ManNAc-Kinase<sup>xx</sup> das Schlüsselenzym für die Regulation der Zelloberflächen-Sialylierung ist<sup>39</sup>.

Alternativ dazu kann die Synthese von ManNAc aus GlcNAc in einem Schritt durch Epimerisierung durch die *N*-Acetylglucosamin 2-Epimerase erfolgen, jedoch ist die Rolle dieser Route im tierischen Stoffwechsel noch weitgehend ungeklärt. Möglicherweise kommt sie nur zum Tragen, wenn der normale Weg über GlcNAc-6-Phosphat und UDP-GlcNAc blockiert ist<sup>40</sup>. ManNAc wird anschließend durch die ManNAc-Kinase wiederum in das 6-Phosphat überführt und mit Phosphoenolpyruvat durch die NeuAc-9-P-Synthase zu NeuAc-9-Phosphat und von dort aus unter Phosphatabspaltung zu NeuAc umgesetzt. NeuAc wird im Nukleus mit CTP durch die CMP-NeuAc-Synthetase zu CMP-NeuAc aktiviert. CMP-NeuAc wird in den Golgi Apparat transportiert und dort mit Hilfe von spezifischen Sialyltransferasen an das nicht reduzierende Ende von Oligosaccharidketten in Glycoproteinen und Glycolipiden gebunden.

<sup>x</sup> sialic acid-binding immunoglobulin superfamily lectins, früher als Sialoadhesine bezeichnet, gehören zu einer Familie von I-Typ Lektinen, die an Sialinsäuren auf Zelloberflächen binden

<sup>36</sup> Kelm, S., Schauer, R., Crocker, P.R., The Sialoadhesins – A family of sialic acid dependent cellular recognition molecules within the immunoglobulin superfamily, *Glycoconjugate Journal*, **1996**, *13*, 913-926; Varki, A., Selectin Ligands, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1994**, *91*, 7390-7397; Kelm, S., Brossmer, R., Isecke, R., Gross, H.J., Strenge, K., Schauer, R., Funktional groups of sialic acids involved in binding of siglecs (sialoadhesins) deduced from interactions with synthetic analogues, *Eur. J. Biochem.*, **1998**, *255*, 663-672

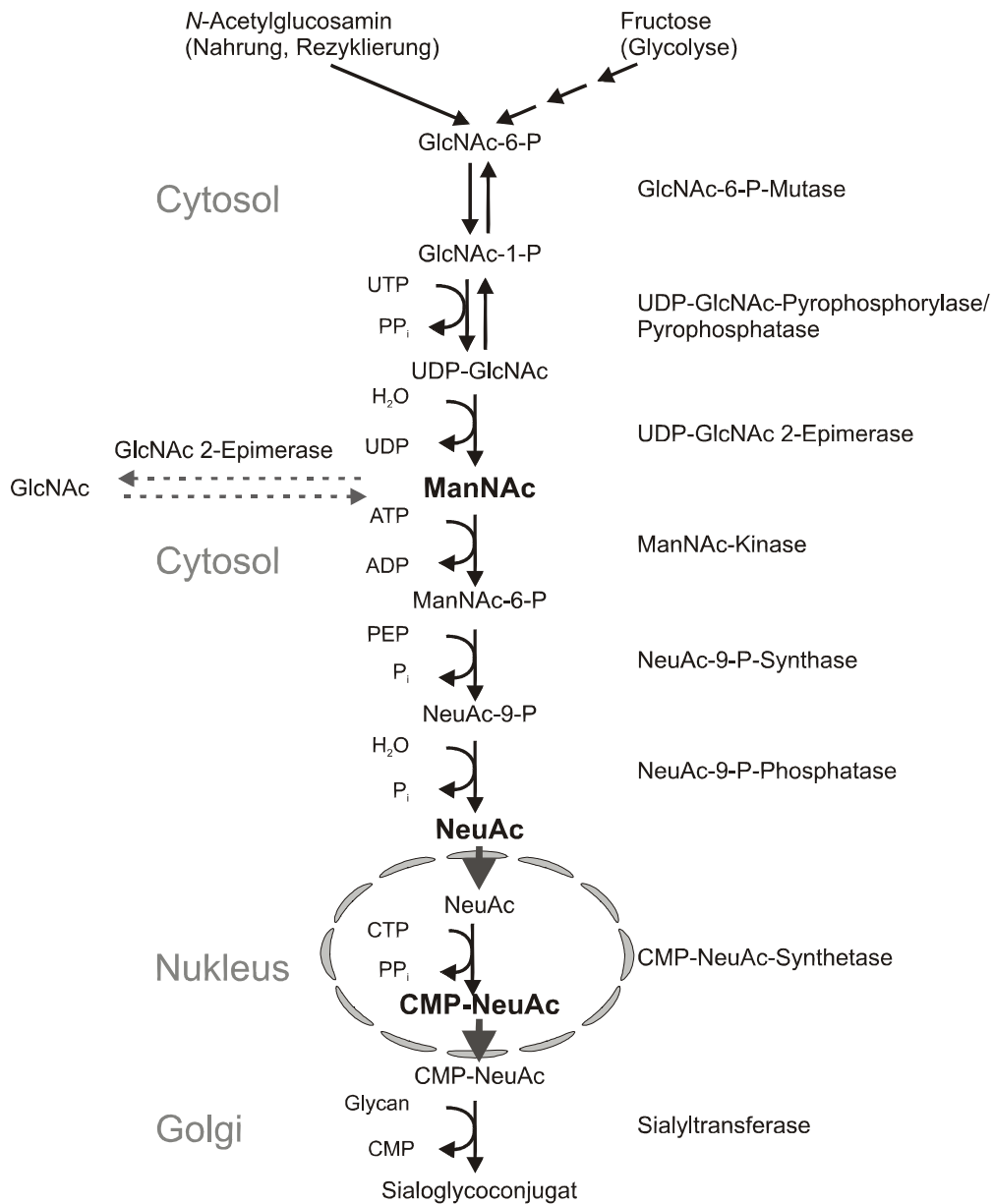
<sup>37</sup> Schauer, R., Sialic acids and their role as biological marks, *Trends Biochem. Sci.*, **1985**, *10*, 357-360

<sup>38</sup> Schauer, R., Kammerling, J.P., Chemistry, biochemistry and biology of sialic acids, in: *Glycoproteins II*, (Hrsg. Montreuil, J., Vliegthart, J.F.G., Schachter, H.), Elsevier, Amsterdam, **1997**, 243-402

<sup>xx</sup> Die UDP-GlcNAc 2-Epimerase und die ManNAc-Kinase sind in einem Enzym vereinigt. Es ist aber möglich, selektiv je eine der beiden Aktivitäten durch *site-directed* Mutagenese auszuschalten.

<sup>39</sup> Effertz, K., Hinderlich, S., Reutter, W., Selective Loss of either the Epimerase or Kinase Activity of UDP-*N*-Acetylglucosamine 2-Epimerase/*N*-Acetylmannosamine Kinase due to Site-directed Mutagenesis Based on Sequence Alignments, *J. Biol. Chem.*, **1999**, *274*, 28771-28778

<sup>40</sup> Schauer, R., Sialic acids – chemistry, metabolism and function, Springer Verlag, New York, **1982**



**Abbildung 1-5:** Biosyntheseweg von Sialoglycoconjugaten in Eukaryonten

### 1.3.4 Herstellung von Neuraminsäure und ihren Derivaten

Um die Fülle biochemischer und biologischer Funktionen, die die terminalen Sialinsäurereste im Zusammenspiel mit den Sialidasen<sup>x</sup> erfüllen, zu untersuchen und zu verstehen, werden zunehmend größere Mengen von NeuAc und ihren Derivaten benötigt. Es reicht nicht mehr aus, diese aus natürlichen Quellen zu isolieren<sup>41</sup>. Die chemische Synthese ist aufwendig und

<sup>x</sup> Sialinsäure abspaltendes Enzym

<sup>41</sup> Schauer, R., Chemistry, metabolism and biological function of sialic acids, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **1982**, *40*, 131-234; Juneja, L.R., Koketsu, M., Nishimoto, K., Kim, M., Yamamoto, T., Itoh, T., Large-scale preparation of sialic acid from chalaza and egg-yolk membrane, *Carbohydr. Res.*, **1991**, *214*, 179-186

verlangt, wie häufig in der Kohlenhydratchemie, komplexe Schützungs- und Entschützungsreaktionen<sup>42</sup>.

#### 1.3.4.1 Enzymatische Synthese von Neu5Ac

Eine praktikable Alternative ist die enzymatische Synthese von Neu5Ac aus *N*-Acetyl-D-Mannosamin (ManNAc) und Pyruvat mit Neu5Ac Aldolase [E.C. 4.1.3.3]<sup>xx</sup> als Katalysator<sup>43</sup>. Diese Aldolase kommt in Bakterien und tierischen Geweben vor und katalysiert *in vivo* die Spaltung von Neu5Ac in ManNAc und Pyruvat bzw. Brenztraubensäure. Mit der Verfügbarkeit der Aldolase aus rekombinanten Quellen<sup>44</sup>, ist diese die bevorzugte Route für die Herstellung von großen Mengen geworden. ManNAc wird aus *N*-Acetyl-Glucosamin (GlcNAc) chemisch durch basekatalysierte Epimerisierung<sup>45</sup>, oder enzymatisch durch *N*-Acetyl-D-Glucosamin 2-Epimerase [E.C. 5.1.3.8] gewonnen. Im Gleichgewicht der Epimerisierung liegen jedoch weniger als 20% ManNAc vor. *Kragl et al.* haben eine sehr effiziente Methode zur kontinuierlichen, enzymatischen Synthese von NeuAc im Enzym-Membran-Reaktor mit *in situ* Synthese von ManNAc aus GlcNAc unter Einsatz des in Abbildung 1-6 gezeigten Zwei-Enzym-Systems aus Aldolase und Epimerase entwickelt<sup>46</sup>.

---

<sup>42</sup> de Ninno, M.P., The synthesis and glycosidation of *N*-acetyl-D-neuraminic acid. *Synthesis*, **1991**, 8, 583-593

<sup>xx</sup> Bezeichnung der Enzymklasse

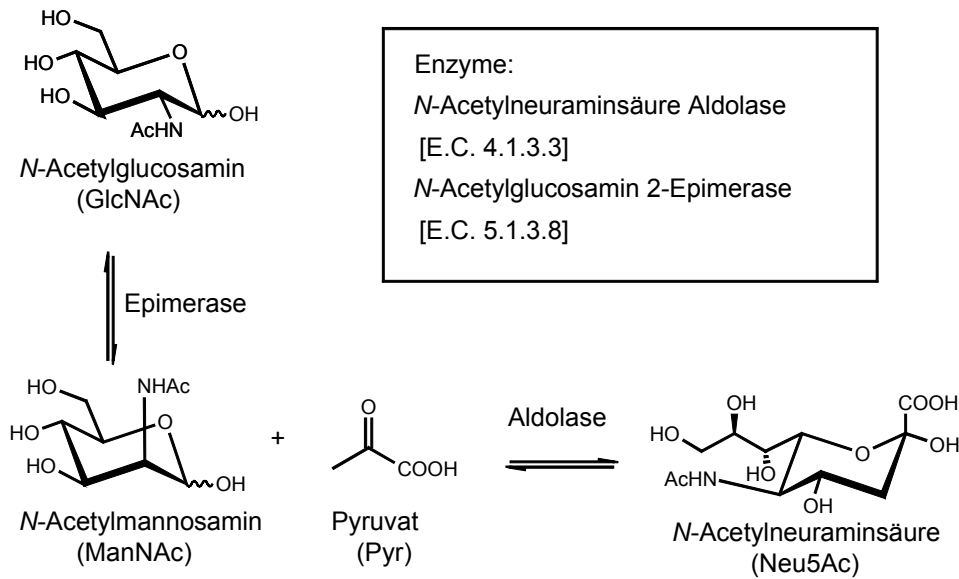
<sup>43</sup> Comb, D.G., Roseman, S., The sialic acids. The structure and synthesis of *N*-acetyl-D-neuraminic acid, *J. Biol. Chem.* **1960**, 235, 2529-2537; Augé, C., David, S., Gautheron, C., Synthesis and immobilised enzyme of the most important sialic acid, *Tetrahedron Lett.*, **1984**, 25, 4663-4664; Bednarski, M.D., Chenauld, H.K., Simon, E.S., Whitesides, G.M., Membrane-enclosed enzymatic catalysis (MEEC); a useful, practical new method for the manipulation of enzymes in organic synthesis, *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, 109, 1283-1285; Kim, M.J., Hennen, W.A.J., Sweers, H.M., Wong, C.-H., Enzymes in carbohydrate synthesis: *N*-acetyl-D-neuraminic acid aldolase-catalysed reactions and preparations of *N*-acetyl-2-deoxy-D-neuraminic acid derivatives, *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110, 6481-6484

<sup>44</sup> Aisaka, K., Uwajima, T., Cloning and constitutive expression of the *N*-acetyl-D-neuraminic acid aldolase gene of *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **1986**, 51, 562-565; Ohta, Y., Shimosaka, M., Murata, K., Tsukada, Y., Kimura, A., Molecular cloning of the *N*-acetyl-D-neuraminic acid aldolase gene in *Escherichia coli* K-12, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1986**, 24, 386-391; Lilley, G.G., von Itzstein, M., Ivancic, N., High level production and purification of *Escherichia coli* *N*-acetyl-D-neuraminic acid aldolase (EC 4.1.3.3), *Pro. Expression Purif.*, **1992**, 3, 434-440

<sup>45</sup> Spivak, C.T., Roseman, S., Preparation of *N*-acetyl-D-mannosamine (2-acetamido-deoxy-D-mannose) and D-mannosamine hydrochloride (2-amino-2-deoxy-D-mannose). *J. Am. Chem. Soc.*, **1959**, 81, 2403-2404

<sup>46</sup> Kragl, U., Gyax, D., Ghisalba, O., Wandrey, C., Enzymatic Two-Step Synthesis of *N*-Acetyl-neuraminic Acid in the Enzyme Membrane Reactor, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1991**, 30, 827-828; Kragl, U., Kittelmann, M., Ghisalba, O., Wandrey, C., *N*-Acetylneuraminic acid, From a Rare Chemical from Natural Sources to a Multikilogram Enzymatic Synthesis for Industrial Application, *Annals New York Academy of Sciences*, **1995**, 750, 300-305; EP 0 428 947 B1 Enzymatisches Verfahren zur Herstellung von *N*-Acetylneuraminsäure, **1995**; Beliczey, J., Kragl, U., From chitin to *N*-acetylneuraminic acid – *N*-acetylglucosamine as Intermediate, *Chitin Handbook*, (Hrsg. Muzzarelli, R.A.A., Peter, M.G.), European Chitin Society, **1997**, 221-226





**Abbildung 1-6:** Synthese von Neu5Ac aus GlcNAc im Zwei-Enzym-System

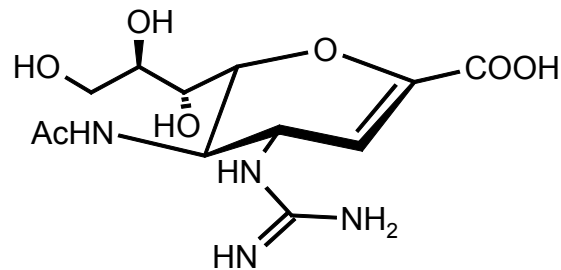
### 1.3.4.2 Unnatürliche Derivate der Neuraminsäure

Neben diesen Arbeiten zur präparativen Synthese von Neuraminsäure richtet sich die Aufmerksamkeit auf die Synthese von nicht natürlichen Derivaten, die auf ihre biologische Wirksamkeit, z.B. als Inhibitoren für Enzyme untersucht werden. In diesem Zusammenhang wurde vor einiger Zeit eine auffallend hohe Hemmwirkung von 5-Acetamido-2,3-didehydro-3,5-didesoxy-neuraminsäure gegenüber Sialidasen gefunden.

Von *Itzstein et al.* entdeckten, dass die Auswechslung der Hydroxylgruppe bei 5-Acetamido-2,3-didehydro-3,5-didesoxy-neuraminsäure an C-4 durch eine positiv geladene Aminogruppe zu noch besserer Inhibierung führt. Die Einführung einer Guanidingruppe in Position C-4 führte zu einem potenten Inhibitor der Influenza A Neuraminidase<sup>x</sup>. Diese Komponente bekam den Namen Zanamivir und ist seit 1999 für Glaxo Welcome unter dem Namen Relenza als Arzneimittel gegen Influenza zugelassen<sup>47</sup>.

<sup>x</sup> Typ A Viren können, wenn zwei Viren eine Zelle befallen, ihre RNA mischen und so Hybridviren bilden, die vom Immunsystem nicht erkannt werden. Daher sind sie besonders gefährlich.

<sup>47</sup> von Itzstein, M., Wu, W.Y., Kok, G.B., Pegg, M.S., Dyason, J.C., Jin, B., Phen, T.V., Smythe, M.L., White, H.F., Oliver, S.W., Colman, P.M., Varghese, J.N., Ryan, D.M., Woods, J.M., Bethell, R.C., Hotham, V.J., Cameron, J.M., Pen, C.R., Rational design of potent sialidase based inhibitors of influenza virus replication, *Nature*, **1993**, 363, 418-423; Itzstein, M. von, Synthesis of Phosphonic Acid Analogues of Sialic Acids (Neu5Ac and KDN) as Potential Sialidase Inhibitors; *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 3500-3504; Florio, P., Thomson, R. J., Alafaci, A., Abo, S., and von Itzstein, M., Synthesis of delta4-beta-D-glucopyranosiduronic acids as mimetics of 2,3-unsaturated sialic acids for sialidase inhibition. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **1999**, 9, 2065-2068; Lew, W., Escarpe, P. A., Mendel, D. B., Sweeny, D. J., and Kim, C. U., Stereospecific synthesis of a GS 4104 metabolite: Determination of absolute stereochemistry and influenza neuraminidase inhibitory activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*., **1999**, 9, 2811-2814



**Abbildung 1-7:** Struktur des als Influenzainhibitor zugelassenen Neuraminsäurederivats Relenza

Ein völlig anderes Anwendungsfeld für NeuAc Derivate wird von Lee<sup>48</sup> zum Einschleusen recombinanter DNA in tierische Zellen durch Viren erforscht. Die Abwesenheit von viralen Rezeptoren ist bei vielen Zellen eine große Hürde für den Gentransfer durch virale Infektion, wie er in der Gentechnik verfolgt wird. Durch den Ersatz von NeuAc durch NeuLev (*N*-Levulinylneuraminsäure) auf den Zelloberflächen wird eine Ketofunktion eingebaut, die durch kovalente Anbindung von Biotinhydrazid einen künstlichen Rezeptor für Adenoviren schafft. So wird die Infektion resistenter Zellen möglich.

#### 1.3.4.3 Fluorierung von Neuraminsäure zu diagnostischen Zwecken

Für die Untersuchung von Mechanismen und Wechselwirkungen, an denen Neuraminsäure beteiligt ist, wurden verschiedene Markierungsprozeduren angewendet. So wurden Sialoconjugate im Neuraminsäurerest mit radioaktiven, fluoreszierenden oder biotinylierten Substanzen chemisch markiert<sup>49</sup>. Sie ermöglichen die *in vitro* Beobachtung z.B. an Gewebeschnitten durch Fluoreszenzdetektoren.

Für *in vivo* Untersuchungen eignen sich

- Labeling mit einem NMR-Kern zur *in vivo* Untersuchung mit Kernresonanztomographie<sup>50</sup>
- oder Labeling mit Radioisotopen kurzer oder langer Halbwertszeit für *in vivo* Untersuchungen mit PET (Positronen Emissions Tomographie)<sup>51</sup>.

Diese Methoden finden unter anderem Anwendung in der Untersuchung von *in vivo* Pharmakokinetiken, zur Metabolismusaufklärung, zur nicht invasiven Diagnose, Quantifizierung und Therapie von pathophysiologischen Prozessen<sup>52</sup>.

Für die Kernresonanztomographie muss ein NMR-Kern gewählt werden, der in physiologischen Systemen normalerweise nicht vorkommt. Dafür kommt Fluor in Frage. Fluor liegt in

<sup>48</sup> Lee, J.H., Baker, T.J., Mahal, L.K., Zabener, J., Bertozzi, C.R., Wiemer, D.F., Welsh, J., Engineering Novel Cell Surface Receptors for Virus-mediated Gene Transfer, *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274, 21878-21884

<sup>49</sup> Gross, H.J., Brossmer, R., Enzymatic introduction of a fluorescent sialic acid into oligosaccharide chains of glycoproteins, *Eur. J. Biochem.*, **1988**, 177, 583-589; Gross, H.J., Brossmer, R., A highly Sensitive Fluorometric Assay for Sialyltransferase Activity Using CMP-9-fluoresceinyl-NeuAc as Donor, *Anal. Biochem.*, **1990**, 186, 127-134

<sup>50</sup> Port, R.E., Schlemmer, H.-P., Bachert, P., Pharmacokinetic Analysis of Sparse *in vivo* NMR Spectroscopy Data Using Relative Parameters and the Population Approach; *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **1994**, 47, 187-193

<sup>51</sup> Brix, G., Bellermann, M.E., Haberkorn, U., Gerlach, L., Lorenz, W.J., Assentment of the Biodistribution and Metabolism of 5-Fluorouracil as Monitored by <sup>18</sup>F PET and <sup>19</sup>F MRI: A Comparative Animal Study; *Nuclear Medicine & Biology*, **1996**, 23, 897-906

<sup>52</sup> Stöcklin, G., Tracers for metabolic imaging of brain and heart. Radiochemistry and Radiopharmacology. *Eur. J. Nucl. Med.*, **1992**, 19, 527-551; Coenen, H.H., Biochemistry and evaluation of fluoroamino acids, *PET studies on amino acid metabolism and protein Synthesis*, (Hrsg. Mazoyer, B.M., Heiss, W.D., Comar, D.) Kluwer Academic Publisher, Netherlands **1993**, 109-129

der Natur zu 100% als  $^{19}\text{F}$  vor.  $^{19}\text{F}$  hat einen Kernspin von  $\frac{1}{2}$  und ein gyromagnetisches Verhältnis von  $25,18 \cdot 10^7 \text{ rad/Ts}$  das dem des Wasserstoffs ( $26,75 \cdot 10^7 \text{ rad/Ts}$ ) sehr ähnlich ist. Elektronisch verhält sich Fluor ähnlich wie eine Hydroxylfunktion, sterisch aber ähnlich wie ein Proton.

Für PET Messungen kommen mehrere Kerne, die sogenannten Positronenstrahler, in Frage. Positronenstrahler sind neutronenarme Radionuklide. Die Radionuklide müssen kurze Halbwertszeiten und hohe spezifische Aktivitäten besitzen, damit die Strahlenbelastung möglichst gering und die Detektierbarkeit gut ist.

Geeignet sind  $\gamma$ -Strahler mit  $\gamma$ -Energien von 100-300 keV, die sich unter Aussendung eines Positrons ( $\beta^+$ ) und eines Neutrinos ( $\nu$ ) umwandeln. Das Positron wird beim Auftreffen auf ein Elektron unter Aussendung von zwei 511 keV  $\gamma$ -Quanten, die im Winkel von  $180^\circ$  emittiert werden, vernichtet. Diese sogenannte Anihilationsstrahlung wird detektiert. Die Methode ist sehr sensitiv, da prinzipiell jedes einzelne Zerfallsereignis nachweisbar ist.

Bei Molekülen, die Radionuklide enthalten, spricht man von Tracern, wenn ein Kern durch sein radioaktives Isotop ersetzt ist bzw. von Analogtracern, wenn ein Kern durch ein radioaktives Isotop eines anderen Elementes ersetzt ist.

In Tabelle 1-3 und Tabelle 1-4 sind einige Radionuklide zur Tracer- bzw. Analogtracerdarstellung aufgeführt und die Vor- und Nachteile der beiden Methoden abgewogen.

	Kern	$t_{1/2}$ [min]
<b>Radionuklide zur Tracerdarstellung</b>	$^{11}\text{C}$	20,3
	$^{13}\text{N}$	9,96
	$^{15}\text{O}$	2,03

**Tabelle 1-3:** Radionuklide zur Tracerdarstellung

- Vorteil:** Elemente kommen in Biomolekülen vor
- chemisch kein Unterschied zwischen markierter und nichtmarkierter Substanz
  - gleiche Kinetik
- Nachteil:** kurze Halbwertszeit
- nicht geeignet für mehrstufige Synthesen
  - nur für kurze Messungen

	Kern	$t_{1/2}$ [min]	Sterisch ähnlich zu	Polarität ähnlich zu
<b>Radionuklide zur Analogtracerdarstellung</b>	$^{18}\text{F}^{\times}$	109,7	H	OH
	$^{75}\text{Br}$	98	$\text{CH}_4$	
	$^{73}\text{Se}$	426		S

**Tabelle 1-4:** Radionuklide zur Analogtracerdarstellung

- Vorteil:** längere Halbwertszeiten
- ermöglicht auch aufwendigere Synthesen
  - ermöglicht Studium langsamer physiologischer Prozesse
- Nachteil:** chemisch nur ähnlich
- Kinetik kann sich anders verhalten

Die kurzlebigen Radioisotope kommen in diesem Fall nicht in Frage, da es sich um aufwendigere Synthesen handelt. Von den längerlebigen Isotopen eignet sich weder Selen noch Brom, da weder Schwefel noch eine  $\text{CH}_4$  Gruppe im Molekül vorkommt. Fluor hingegen kann als Ersatz für Wasserstoff (sterisch ähnlich) oder eine Hydroxylgruppe (elektronisch ähnlich) eingesetzt werden.

Fluor bietet weiterhin den Vorteil, dass mit einer Synthesestrategie gleichzeitig der Weg zur PET-Messung und zur NMR-Messung erschlossen wird.

Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurde der Versuch unternommen, Fluoratome in Zuckermoleküle einzuführen. Der Grund dafür ist die Bedeutung der fluorierten Zucker als Reagenz für sowohl metabolische Studien als auch als Diagnostika wie z.B. der Einsatz von 2-Desoxy-2- $^{18}\text{F}$ -D-glucose, -D-galctose und -D-fucose in der Positronen-Emissions-Tomographie (PET). So wurden auch verschiedene fluorierte Derivate der Neuraminsäure hergestellt, wie z.B. *N*-Acetyl-9-desoxy-9-fluorneuraminsäure ( $\text{Neu5Ac9F}$ )<sup>53</sup> und *N*-Acetyl-2-desoxy-2- $\alpha$ - und  $\beta$ -fluorneuraminsäure ( $\text{Neu5Ac2F}$ )<sup>54</sup>. Es wurden auch verschiedene Versuche unternommen, *N*-Acetyl-3-fluorneuraminsäure herzustellen. Zum Einen wurde eine Aldolkondensation von 3-Fluorpyruvat mit *N*-Acetyl-D-mannosamin durchgeführt<sup>55</sup> und zum

<sup>x</sup>  $^{18}\text{F}$  ist ein künstliches Isotop, dass über die  $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$ -Kernreaktion (s.a. Kapitel 3.5) hergestellt wird.

<sup>53</sup> Petrie, C.R., Sharma, M., Simmons, O.D., Korytnyk, W., Synthesis of Analogues of *N*-acetylneuraminic acid and their effect on CMP-sialate Synthase, *Carbohydr. Res.*, **1989**, 186, 326-334

<sup>54</sup> Sharma, M.N., Eby, R., Synthesis and conformational studies of 2- $\beta$ -chloro, 2- $\alpha$ -fluoro, and 2- $\beta$ -fluoro derivatives of 2-deoxy-*N*-acetyl-neuraminic acid, *Carbohydr. Res.*, **1984**, 201-210

<sup>55</sup> Gantt, R., Millner, S., Binkley, S.B., Inhibition of *N*-Acetylneuraminic Acid Aldolase by 3-Fluorosialic Acid, *Biochemistry*, **1964**, 3, 1952-1960

Anderen eine Addition von F<sub>2</sub> bzw. AcOF an Neu5Ac2en<sup>56</sup>. In beiden Fällen wurden nur sehr unzureichende Ausbeuten von 1-7% erzielt.

Neu5Ac9F stellt ein gutes Substrat für die CMP-Neuraminsäure-Synthetase dar, Neu5Ac3F weist sich als starker Inhibitor der Neu5Ac-Aldolase aus.

---

<sup>56</sup> Nakajama, T., Hori, H., Ohrai, H., Meguro, M., Ido, T., Synthesis of *N*-Acetyl-3-fluoro-neuraminic Acids, *Agric. Biol. Chem.*, **1988**, 52, 1209-1215

## 2 Zielsetzung

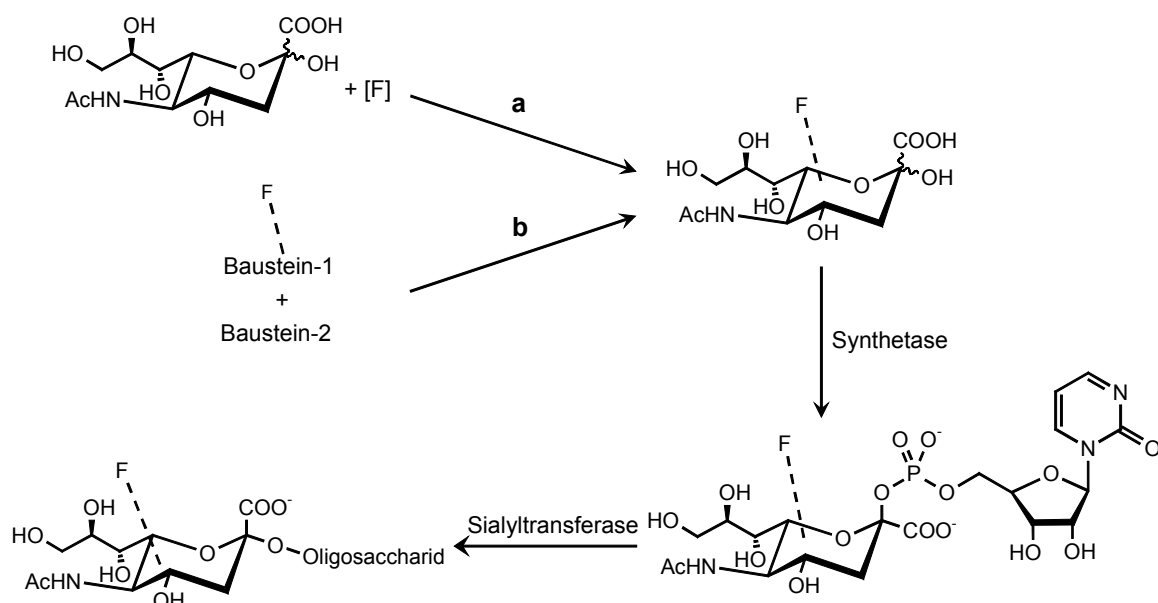
Die Ausführungen in der Einleitung zeigen die Bedeutung der Neuraminsäure und ihrer Derivate auf. Im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen zwei Vertreter dieses Aminozuckers:

1. Fluorneuraminsäure
2. Glycolylneuraminsäure

Fluorneuraminsäure soll einen Weg zur *in vivo* Untersuchung physiologischer Vorgänge eröffnen. Glycolylneuraminsäure ist wesentlich für Studien zu den Unterschieden der Funktionen von Neu5Ac und Neu5Gc.

### 2.1 Fluorierung von Neuraminsäure

Ziel ist es, ein Fluorneuraminsäurederivat in der in Abbildung 2-1 gezeigten Art und Weise in eine Oligosaccharidstruktur einzuführen. Dazu muss zunächst eine geeignete Position für die Fluorierung der Neuraminsäure gefunden werden, die sowohl die Synthese dieser Verbindung mit einem vertretbaren Aufwand ermöglicht, als auch gute Aussichten auf die Umsetzung der Verbindung in den beiden aufgeführten enzymatischen Reaktionen hat. Als Strategie für die Einführung eines Fluoratoms in die Neuraminsäurestruktur sind zwei grundlegend verschiedene Routen zu unterscheiden. Entweder erfolgt die Fluorierung an der bereits konsistenten Neuraminsäurestruktur (Route a), oder die Synthese der Neuraminsäure geht von einem bereits fluorierten Baustein aus (Route b).



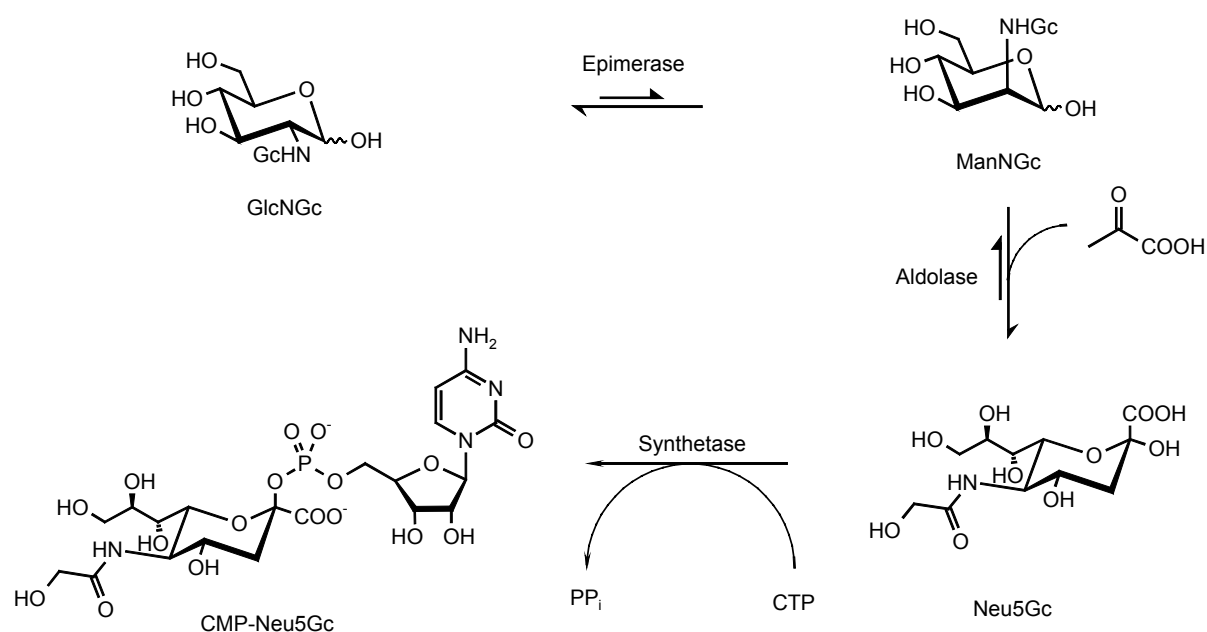
**Abbildung 2-1:** Synthesestrategie für die Darstellung einer fluorierten Neuraminsäure, deren Aktivierung zu CMP-Fluorneuraminsäure und die Übertragung auf ein Oligosaccharid

Die Synthese soll charakterisiert und optimiert und im präparativen Maßstab durchgeführt werden. Es soll durch eine Zusammenarbeit mit dem INC<sup>x</sup> die Synthese der entsprechenden [<sup>18</sup>F]-fluorierten Verbindung erschlossen werden.

Die enzymatischen Reaktionen für die Aktivierung mit der im IBT2<sup>xx</sup> vorhandenen CMP-Neu5Ac-Synthetase aus *E. coli* K235 und Übertragung der Fluorneuraminsäure mit käuflichen Sialyltransferasen sollen ebenfalls untersucht und präparativ durchgeführt werden.

## 2.2 Glycolyneuraminsäure

Da es weder eine reichhaltige natürliche Quelle noch eine besonders effektive Synthese-strategie für Neu5Gc gibt, soll in dieser Arbeit versucht werden, das von Kragl<sup>67</sup> für die Neu5Ac-Synthese eingesetzte Zwei-Enzym-System aus Epimerase und Aldolase zur Synthese von Neu5Gc zu nutzen, wie in Abbildung 2-2 gezeigt. Es ist bisher nicht bekannt, ob GlcNGc ein geeignetes Substrat für die Epimerase darstellt. Dieses soll geklärt werden und die Reaktion gegebenenfalls für beide Enzyme charakterisiert werden.



**Abbildung 2-2:** enzymatische Synthese von Neu5Gc aus GlcNGc über ManNGc und ihre Aktivierung zu CMP-Neu5Gc

Die Zweienzymreaktion soll im präparativen Maßstab durchgeführt werden. Es soll außerdem getestet werden, ob sich Neu5Gc durch die CMP-Neu5Ac-Synthetase aus *E. coli* zu CMP-Neu5Gc aktivieren lässt. Bislang wurde dieses nur mit tierischen Synthetasen erreicht.

<sup>x</sup> Institut für Nuklearchemie der Forschungszentrum Jülich GmbH

<sup>xx</sup> Institut für Biotechnologie 2 der Forschungszentrum Jülich GmbH

<sup>67</sup> Kragl, U., Reaktionstechnik biokatalytischer Prozesse am Beispiel der kontinuierlichen Synthese von *N*-Acetylneuraminsäure, Dissertation Universität Bonn, 1992

### 3 Fluorneuraminsäure

#### 3.1 Auswahl einer geeigneten Fluorierungsposition

Bei der Auswahl einer geeigneten Position für die Einführung des Fluors in die Neuraminsäure und der Planung der Synthese muss verschiedenen Erwägungen Rechnung getragen werden:

- Die fluorierte Verbindung sollte sich möglichst ähnlich zu Neu5Ac verhalten.
- Die Synthese muss in einem der kurzen Halbwertszeit ( $\tau_{1/2} = 109,7$  min) von  $^{18}\text{F}$  entsprechenden Zeitrahmen durchführbar sein.

Die Ähnlichkeit der Verbindung zu Neu5Ac ist in zweierlei Hinsicht wichtig.

1. Da die Verbindung zur Untersuchung physiologischer Wechselwirkungen herangezogen werden soll, dürfen diese nicht durch eine abweichende Struktur unterbunden werden.
2. Für die Darstellung von komplexeren, sialinsäurehaltigen Strukturen sind enzymatische Reaktionsschritte notwendig, die der Substratstruktur enge Grenzen setzen.

Tabelle 3-1 zeigt die Bindungslängen und *van der Waals Radien* von Wasserstoff, Sauerstoff und Fluor<sup>58</sup>.

Element	Bindungslänge (C-X) [Å]	<i>van der Waals</i> Radius [Å]
H	1,09	1,20
O	1,43	1,40
F	1,37-1,42	1,35

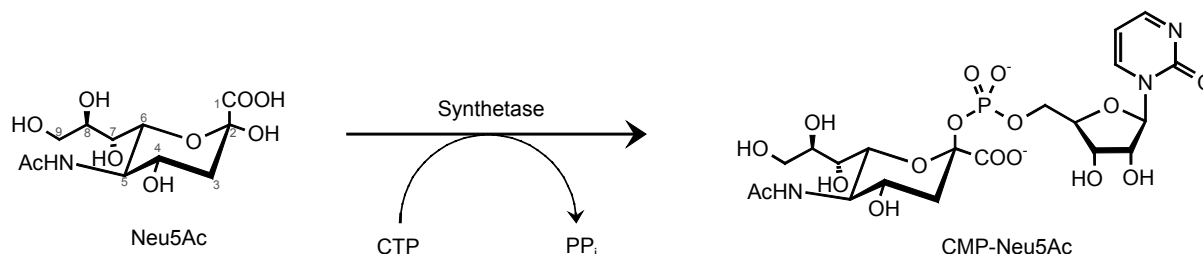
**Tabelle 3-1:** Bindungslängen und *van der Waals* Radien von Wasserstoff, Sauerstoff und Fluor

Fluor liegt in seinen sterischen Eigenschaften zwischen Wasserstoff und Sauerstoff. Die Hydroxylgruppe ist mit einem *van der Waals* Radius von 1.65 Å noch etwas größer als Sauerstoff. Es wird angenommen, dass das Fluoratom in einer C-F- Bindung zwar in der Lage ist, mit einem Wasserstoffbrückenbindungs-Donor Wasserstoffbrückenbindungen zu bilden, nicht aber mit einem Akzeptor. Daher erscheint es sinnvoll, ein Proton zu ersetzen, da die Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen der Hydroxylfunktionen für die Funktionen der Zucker von Bedeutung sind.

<sup>58</sup> Williams, S.J., Withers, S.G., Glycosyl fluorides in enzymatic reactions, *Carbohydr. Res.*, **2000**, 327, 27-46



Der erste Schritt zum Aufbau komplexer Neu5Ac-haltiger Verbindungen ist die Aktivierung zum Nukleotidzucker Cytidinmonophosphat-Neu5Ac (Abbildung 3-1). Dieser enzymatisch durch CMP-Neu5Ac-Synthetase katalysierte Schritt schränkt die möglichen Positionen für die Fluorsubstitution schon stark ein.



**Abbildung 3-1:** enzymatische Aktivierung von *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) zu CMP-*N*-Acetylneuraminsäure (CMP-Neu5Ac)

Zahlreiche Arbeiten von *Zbiral et al.*<sup>59</sup> haben gezeigt, dass die koaxial zur  $\beta$ -orientierten glycosidischen 2-OH-Gruppe liegenden 8-OH- und 5-NH-Gruppe, aber auch die axialen 4-H und 6-H-Protonen für die Umsetzung der Neu5Ac mit CMP-Neu5Ac-Synthetase aus Rattenleber wesentlich sind. Das Fehlen der 7-OH-Gruppe wirkt sich ebenfalls negativ aus, jedoch findet eine Umsetzung statt. Substitution der 9-OH-Gruppe oder sogar das Entfernen des C-9 hat nur einen geringen Einfluss auf die Reaktivität. In einer Arbeit von *Petrie et al.*<sup>60</sup> werden verschiedene Fluorderivate der Neuraminsäure als Substrate für CMP-Neu5Ac-Synthetase aus Pferde-Unterkieferdrüse getestet. Es zeigt sich, dass Neu5Ac9F (9-OH ersetzt durch Fluor) ein gutes Substrat darstellt, Neu5Ac3F<sub>eq</sub> (equatoriales 3-H ersetzt durch Fluor) hingegen nicht umgesetzt wird.

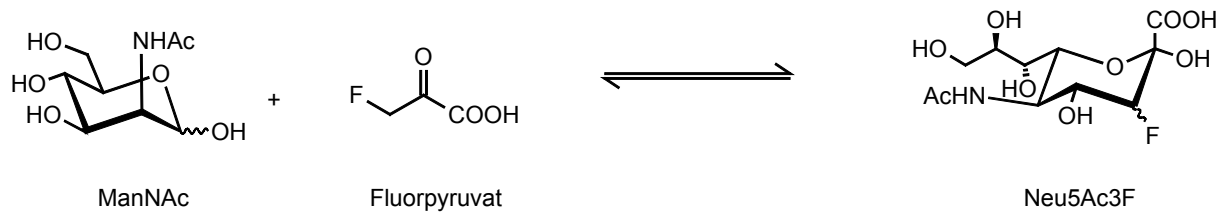
### 3.2 Darstellung von 3-Fluorneuraminsäure

Nach diesen Vorüberlegungen kommen nur OH-9, OH-7, H-5 und H-3 (axiales Proton) für eine Substitution durch Fluor in Frage. Die Synthese von Neu5Ac9F, Neu5Ac7F oder Neu5Ac5F ist aufwendig<sup>61</sup>. Neu5Ac3F (systematischer Name 5-Acetamido-3,5-dideoxy-3-fluoro-*D*-glycero-*D*-galacto-nonulopyranosonsäure) hingegen ist theoretisch das Produkt einer Aldolkondensation von *N*-Acetylmannosamin (ManNAc) mit  $\beta$ -Fluorpyruvat (F-Pyr), wobei ein Epimerengemisch aus equatorial- und axialständigem Fluor zu erwarten wäre.

<sup>59</sup> E. Zbiral, E. Schreiner, R. Christian; Synthesis of the 4-acetamido-4-deoxy analogue of *N*-acetylneuraminic acid and its behaviour towards CMP-sialate synthase; *Carbohydrate Research*, **1989**, 194, c15-c18; Christian, R., Schulz, G., Brandstetter, H.H., Zbiral, E., On the side-chain conformation of *N*-acetylneuraminic acid and its epimers at C-7, C-8, and C-7,8, *Carbohydr. Res.* **1987**, 162, 1-11

<sup>60</sup> Petrie, C.R., Sharma, M., Simmons, O.D., Korytnyk, W., Synthesis of Analogues of *N*-acetylneuraminic acid and their effect on CMP-sialate Synthase, *Carbohydr. Res.*, **1989**, 186, 326-334

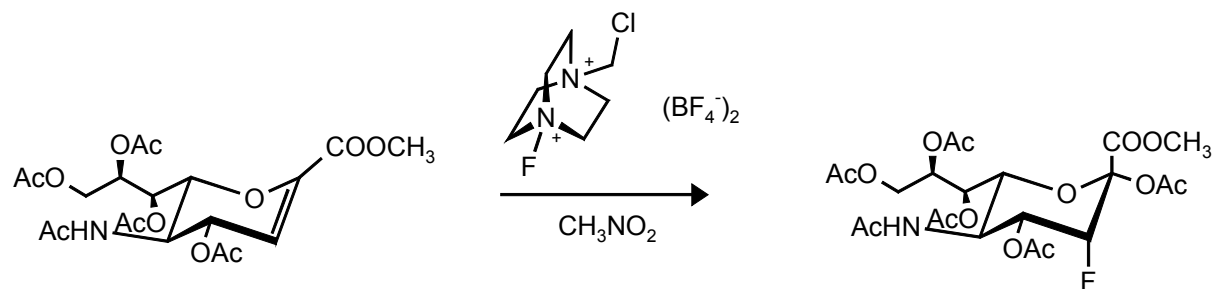
<sup>61</sup> Liu, J. L.-C., Shen, G.-J., Ichikawa, Y., Rutan, J. F., Zapata, G., Vann, W. F., Wong, C.H., Overproduction of CMP-Sialic Acid Synthetase of Organic Synthesis; *J. Am. Chem. Soc.*; **1992**, 114, 3901-3910



**Abbildung 3-2:** Synthese von *N*-Acetyl-3-Fluorneuraminsäure (Neu5Ac3F) durch Aldolkondensation aus *N*-Acetylmannosamin (ManNAc) und Fluorpyruvat

In einer unkatalysierten Aldolreaktion wurden jedoch nur moderate 1,5 – 3% Ausbeute erreicht<sup>62</sup>.

Neuere Arbeiten von *Wong et al.*<sup>63</sup> gehen den Weg über eine elektrophile selektive Fluorierung. „Selectfluor“ (1-Chlormethyl-4-fluoro-1,4-diazoniabicyclo[2.2.2]octan bis(tetrafluoroborat)) wird in Gegenwart eines Nukleophils an die Doppelbindung eines Glycals addiert. Allerdings kann so nur das 7-epi-Derivat<sup>x</sup> der 3-Fluorneuraminsäure gebildet werden.



**Abbildung 3-3:** Synthese von peracetylierter Neu5Ac7epi3F durch elektrophile Addition von „Selectfluor“ an die Doppelbindung von peracetylierter Neu5Ac2en7epi

Bei dem hier eingesetzten Neuraminsäurederivat handelt es sich um das peracetylierte 7-epi-2-en-Derivat. Hier werden gute Ausbeuten (80%) erreicht. Das Fluor geht dabei bevorzugt in die axiale Position, es wird ein Verhältnis von 3:1 *axial:equatorial* erreicht. Durch den Einsatz von Schutzgruppen und die verhältnismäßig lange Reaktionszeit von 12 h kommt diese Synthese für die Einführung von <sup>18</sup>F nicht in Frage, da die Halbwertszeit des <sup>18</sup>F mit 110 min eine starke Limitierung darstellt.

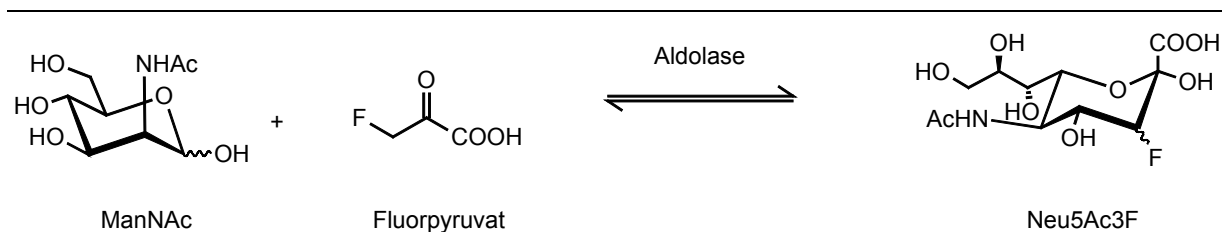
Aussichtsreich scheint der Versuch der Aldolase-katalysierten Aldolkondensation nach dem Vorbild der in Kapitel 1.3.4.1 erwähnten Neu5Ac-Synthese. Diese enzymatische Synthese der Neu5Ac geht von ManNAc und Pyruvat aus. In einer *N*-Acetylneuraminsäure-Aldolase katalysierten Reaktion wird Neuraminsäure gebildet. Die Synthese von *N*-Acetylneuraminsäure auf enzymatischem Wege wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen auch in

<sup>62</sup> Gantt, R., Millner, S., Binkley, S.B., Inhibition of *N*-Acetylneuraminic Acid Aldolase by 3-Fluorosialic Acid, *Biochemistry*, **1964**, *3*, 1952-1960

<sup>63</sup> M.D. Burkart, Z.Z. Shang-Cheng Hung, C.H. Wong; *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 11743-11746

<sup>x</sup> An C-7 ist die Chiralität umgekehrt

größerem Maßstab durchgeführt. Das System wurde von Kragl<sup>64</sup> umfassend kinetisch charakterisiert. Das Enzym *N*-Acetylneuraminsäure-Aldolase [E.C. 4.1.3.3] wird in Kapitel 3.2.1 besprochen. Ein Einsatz von  $\beta$ -Fluorpyruvat würde formal wie in Abbildung 3-4 dargestellt zu 3-Fluorneuramisäure führen.



**Abbildung 3-4:** Strategie zur Darstellung von Neu5Ac3F durch eine Aldolase-katalysierte Kondensation von ManNAc mit Fluorpyruvat

In der Literatur wird über Versuche berichtet, durch Variation von sowohl der Zuckerkomponente<sup>65</sup> als auch des Pyruvats, zu Neuraminsäurederivaten zu gelangen<sup>66</sup>. Je nach Quelle des Enzyms ist das Substratspektrum für Zucker relativ groß. Die Variabilität des Pyruvats hingegen ist sehr eingeschränkt. Umfangreichere Untersuchungen dazu liegen von Uchida *et al.* vor<sup>67</sup>. Unter den von Uchida gewählten Bedingungen (50 mM von beiden Substraten, 0,1 U\*/ml\* *N*-Acetylneuraminsäure Aldolase aus *E. coli* in Wasser auf pH 7,7 gepuffert bei 37°C für 24 h inkubiert) konnte keine Umsetzung von  $\beta$ -Fluorpyruvat (F-Pyr) mit ManNAc festgestellt werden. Dieses Ergebnis konnte in der vorliegenden Arbeit reproduziert werden.

In einer Arbeit von Shelton<sup>68</sup> wurde gezeigt, dass F-Pyr durch die 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconat Aldolase (KDPG Aldolase [E.C. 4.1.2.14]) mit D-Glycerinaldehyd-3-phosphat umgesetzt werden kann (Bedingungen: 50 mM von beiden Substraten, 35-50 U/ml Aldolase). Die Ausbeuten liegen dabei je nach Stamm (*P. putida*, *E. coli* und *Z. mobilis*) zwischen >0 und 50%. Die Enzymkonzentration ist 300 bis 500 mal so hoch wie bei Uchidas Versuchen mit der Neu5Ac-Aldolase.

<sup>64</sup> Kragl, U., Reaktionstechnik biokatalytischer Prozesse am Beispiel der kontinuierlichen Synthese von *N*-Acetylneuraminsäure, Dissertation Universität Bonn, **1992**

<sup>65</sup> Wong, C.-H., Enzymes in Carbohydrate Chemistry, Chapter 2; (Hrsg. Benarski, M.D, Simon, E.S.), **1991**, 23-37

<sup>66</sup> Kim, M.J., Hennen, W.A.J., Sweers, H.M., Wong, C.-H., Enzymes in carbohydrate synthesis: *N*-acetyl-D-neuraminic acid aldolase-catalysed reactions and preparations of *N*-acetyl-2-deoxy-D-neuraminic acid derivatives, *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, 6481-6484

<sup>67</sup> Uchida, Y., Tsukada, Y., Sugimori, T., Purification and Properties of *N*-Acetylneuraminic Lyase from *Escherichia coli*; *J. Biochem.*, **1984**, *96*, 507-514

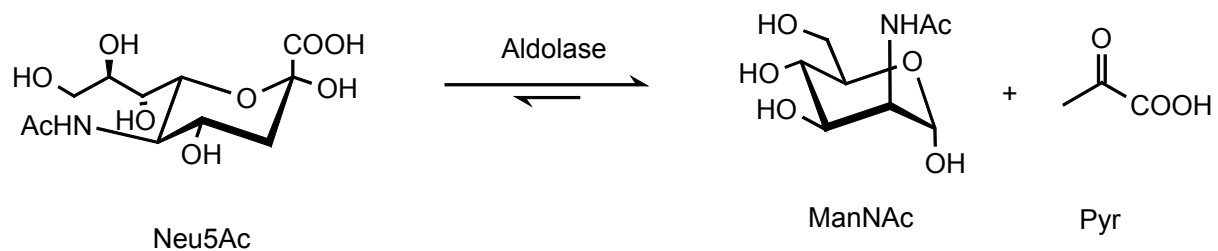
\* U\* ist die Aktivitätsangabe des Herstellers (Toyobo) und bezieht sich auf das Standardassay für die Spaltung von Neu5Ac zu Pyruvat und *N*-Acetylmannosamin

<sup>68</sup> Shelton, M.C., Cotterhill, I.C., Novak, S.T.A., Poonawala, R.M., Sudarshan, S. Toone, E.J., 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconate Aldolases as Catalysts for Stereocontrolled Carbon-Carbon Bond Formation; *J. Am. Chem. Soc.*; **1996**, *118*, 2117-2125

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass durch eine entsprechende Erhöhung der Enzymkonzentration F-Pyr mit ManNAc katalysiert durch Neu5Ac-Aldolase zu Neu5Ac3F umgesetzt werden kann (s. Kapitel 3.2.2).<sup>69</sup>

### 3.2.1 Das Enzym *N*-Acetylneuraminsäure-Aldolase

*N*-Acetylneuraminsäure-Aldolase [E.C. 4.1.3.3], Synonym *N*-Acetylneuraminat pyruvat Lyase, kommt in Bakterien und tierischen Geweben vor. *In vivo* katalysiert das Enzym die Spaltung von Neu5Ac in ManNAc und Pyruvat bzw. Brenztraubensäure. Im Gleichgewicht der Reaktion liegen unter physiologischen Bedingungen aufgrund der geringen Neu5Ac-Konzentration und der Gleichgewichtskonstante  $K_{eq}$  von 29 l/mol vor allem die Spaltprodukte vor (Abbildung 3-5).



**Abbildung 3-5:** Aldolase-katalysierte Spaltung der Neu5Ac unter physiologischen Bedingungen

Die Aldolase wurde zuerst aus hochgradig pathogenen Mikroorganismen wie *Vibrio cholerae*<sup>70</sup> (Choleraerreger) und *Clostridium perfringens*<sup>71</sup> (Gasbranderreger) isoliert. Oft produzieren diese Bakterien auch Sialidasen, die sie in die Lage versetzen, endständige Neuraminsäurereste aus Glycoconjugaten abspalten zu können.

In tierischen Geweben gehört die Aldolase ebenfalls zum Katabolismus. Die Biosynthese der Neu5Ac dagegen, erfolgt wie in Abbildung 1-5 dargestellt aus ManNAc-6-Phosphat und Phosphoenolpyruvat.

<sup>69</sup> Beliczey, J., Kragl, U., Liese, A., Wandrey, C., Coenen, H., Hamacher, K., Tierling, T., Enzymatic synthesis of 3-fluoroneuraminic acid (5-acetamido-3,5-dideoxy-3-fluoro-D-glycero-D-galacto-nonulopyranosonic acid) and other 3,5-dideoxy-3-fluorononulopyranosonic acid derivatives, US 6,355,453 B1 **2002** (patent application: US 09/156322, 18.09.1998)

<sup>70</sup> Heimer, R., Meyer, K., Studies on sialic acid of submaxillary mucoid, *Proc. Natl. Sci. USA*, **1956**, *42*, 728-734

<sup>71</sup> Comb, D.G., Roseman, S., Composition and enzymatic synthesis of *N*-Acetylneuraminic acid (sialic acid), *J. Am. Chem. Soc.*, **1958**, *80*, 497-499

Nach der ersten Beschreibung im Jahr 1960<sup>72</sup> wurde 1984 die Neu5Ac-Aldolase aus *Escherichia coli* K 235 isoliert und umfassend charakterisiert<sup>73</sup>. Inzwischen stehen genetisch modifizierte *E. coli*-Stämme zur Verfügung, mit denen die Aldolase preiswert in großen Mengen produziert werden kann<sup>74</sup>. Das industriell hergestellte Enzym wird im wesentlichen für klinische Tests eingesetzt, da bestimmte Krankheitszustände am erhöhten Sialinsäurespiegel im Serum und im Urin erkannt werden können<sup>75</sup>.

Alle Neu5Ac-Aldolasen aus den oben genannten Quellen gehören zur Gruppe der Klasse-I-Aldolasen, bei denen die Substratbindung über die Ausbildung einer Schiff'schen Base erfolgt<sup>76</sup>. Bei den Klasse-II-Aldolasen sind zweiwertige Kationen an der Substratbindung beteiligt<sup>77</sup>.

Für die Aldolasen aus *C. perfringens* und *E. coli* werden im Wesentlichen identische Eigenschaften berichtet. Ein Unterschied besteht lediglich in der Anzahl der Subunits: Die Aldolase aus *C. perfringens* besitzt 2 Subunits einer Molmasse von ca. 50.000 kDa, während die Aldolase aus *E. coli* 3 Subunits einer Molmasse von ca. 35.000 kDa besitzt.

### 3.2.1.1 Mechanismus

Umfassende Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus sind nur für die Aldolase aus *C. perfringens* durchgeführt worden.

Obwohl über die Konformationsänderungen und Umlagerungen der Kohlenhydratkette im aktiven Zentrum während der Reaktion und die Frage, in welcher Form die Kohlenhydrate (offenkettig oder in Ringform) am Enzym gebunden werden noch keine hinreichende Klarheit besteht, haben *Baumann et al.* nach Untersuchungen mit <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie den in Abbildung 3-6 dargestellten Mechanismus vorgeschlagen.

---

<sup>72</sup> Comb, D.G., Roseman, S., The sialic acids; the structure and enzymatic synthesis of *N*-acetylneuraminic acid, *J. Biol. Chem.*, **1969**, 235, 2529-2537

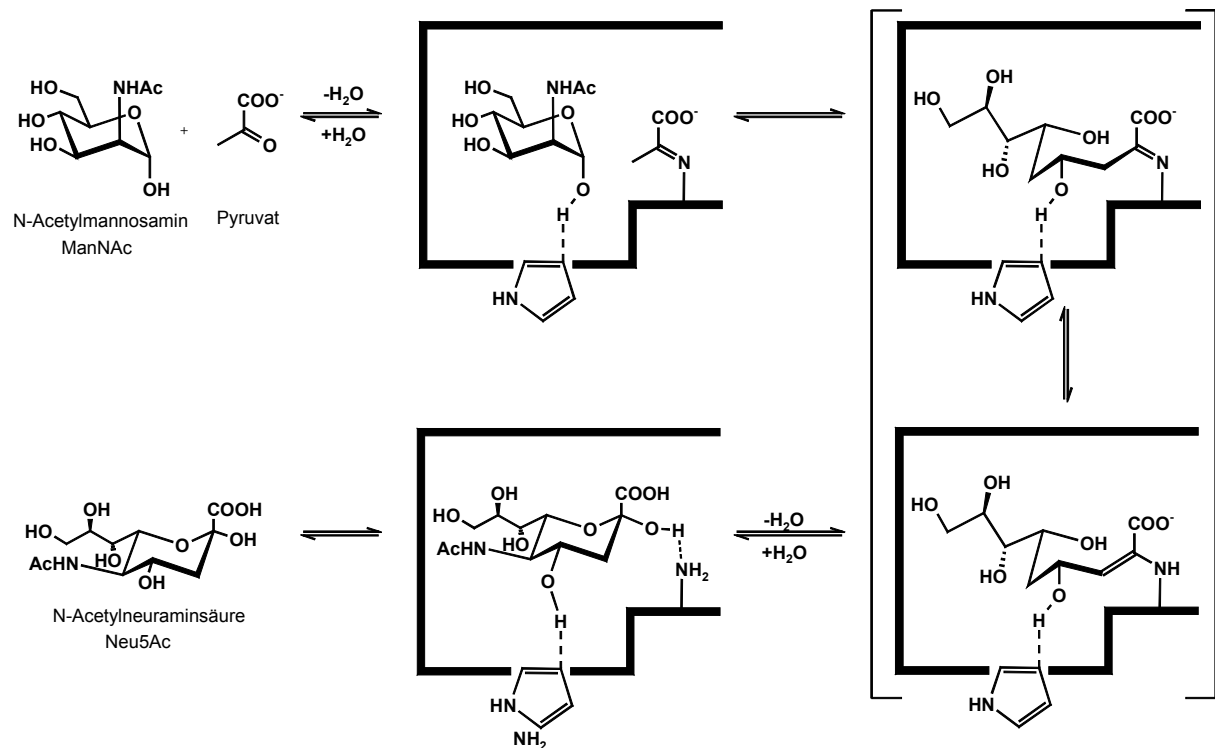
<sup>73</sup> Uchida, Y., Tsukada, Y., Sugimori, T., Purification and Properties of *N*-Acetylneuraminate Lyase from *Escherichia coli*; *J. Biochem.*, **1984**, 96, 507-514

<sup>74</sup> Aisaka, K., Tamura, S., Arai, Y., Uwajima, T., Hyperproduction of *N*-acetylneuraminate lyase by the gene-cloned strain of *Escherichia coli*, *Biotechnol. Lett.*, **1987**, 9, 633-637; Aisaka, K., Igarashi, A., Yamaguchi, K., Uwajima, T., Purification, crystallization and characterisation of *N*-Acetylneuraminate Lyase from *Escherichia coli*; *Biochem. J.* **1991**, 276, 541-546

<sup>75</sup> Araki, H., Yamada, M., Sialic acid, *Methods of Enzymatic Analysis Vol. 6*, (Hrsg. Bergmeyer, H.U.), Verlag Chemie, Weinheim, **1984**, 80-90; Toyobo, Datenblatt zur *N*-Acetylneuraminsäure-Aldolase, **1996**

<sup>76</sup> Hupe, D.J., Enzyme reactions involving imine formation, *Enzyme mechanisms*, (Hrsg. Page, M.I.) University Press, Belfast, **1987**, 317-344

<sup>77</sup> Horecker, B.L., Tsolas, O., Lai, C.Y., Aldolases, *The Enzymes Vol 7*, (Hrsg. Boyer, P.D.) Academic Press, New York, **1972**, 213-261



**Abbildung 3-6:** Mechanismus der reversiblen enzymatischen Synthese von Neu5Ac<sup>78</sup>; die im ersten Schritt erfolgende Anlagerung von Pyruvat ist nicht gesondert dargestellt. Der Rahmen soll das aktive Zentrum symbolisieren.

<sup>78</sup> Baumann, W., Freidenreich, J., Weisshaar, G., Brossmer, R., Friebolin, H., Spaltung und Synthese von Sialinsäuren mit Aldolase; <sup>1</sup>H-NMR-Untersuchungen zur Stereochemie, zur Kinetik und zum Mechanismus, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **1989**, 370, 141-149

1. Pyruvat bildet mit der  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysinrestes der Aldolase eine Schiff'sche Base, die mit dem tautomeren Enamin (nicht dargestellt) im Gleichgewicht steht.
2.  $\alpha$ -ManNAc wird über eine Wasserstoffbrückenbindung der axialständigen OH-Gruppe am C-1 an das unprotonierte Stickstoffatom eines Histidin-Imidazolrings im aktiven Zentrum gebunden.
3. Unter Öffnung des Pyranoserings greift das C-3 des Enamins (Pyruvat als Donor) nukleophil an das C-1 des ManNAc (Akzeptor) an.
4. Durch Ringschluss bildet sich  $\alpha$ -Neu5Ac, was durch  $H_2O$ -Anlagerung freigesetzt wird.

Es ist wahrscheinlich, dass ein analoger Mechanismus auch für das Enzym aus *E. coli* gilt, da auch hier zwischen dem Enzym und Pyruvat bzw. Neu5Ac als Substrat eine *Schiff'sche* Base gebildet wird<sup>79</sup>.

Die einzelnen Reaktionen beschreiben in ihrer Gesamtheit einen "ordered bi-uni"-Mechanismus. Bei diesem Mechanismus werden bei der Synthesereaktion die beiden Substrate nacheinander in einer bestimmten Reihenfolge gebunden. Entsprechend werden die bei der Spaltung entstehenden Produkte nacheinander freigesetzt.

### 3.2.2 Kinetische Untersuchungen

Es ist sinnvoll vor dem Einsatz der Enzymreaktion zur präparativen Synthese von Neu5Ac3F, das System kinetisch zu charakterisieren, um so Betriebspunkte für eine effiziente Synthese festlegen zu können.

Die für die folgenden kinetischen Messungen verwendete Neu5Ac-Aldolase aus einem nicht näher benannten Mikroorganismus von *Toyobo* ist in großen Mengen preiswert erhältlich (1000 Units\* für 36 DM)<sup>80</sup>. Die Messungen wurden mit einer sehr hohen Aktivität von 24 U\*/ml (24 U\*/mg Enzymlyophilisat\*) durchgeführt.

Einige der Messungen wurden unter Verwendung von Neu5Ac-Aldolase aus *C. perfringens* und aus *E. coli* von *Sigma* wiederholt. Hier ergaben sich analoge Ergebnisse.

Bei der Aldolase-katalysierten Aldolkondensation handelt es sich um eine Gleichgewichtsreaktion. Zunächst wurde für die Hinreaktion die Aktivität in Abhängigkeit von der Konzentration beider Substrate und der Produktkonzentration gemessen. F-Pyr und ManNAc wurden von *Sigma* bezogen.

Die Aktivitäten wurden durch Anfangsreaktionsgeschwindigkeitsmessungen bestimmt. Das bedeutet, dass die Reaktionsgeschwindigkeit unter den für die Messungen bzw. Messpunkte angegebenen Bedingungen aus der Produktbildung pro Zeiteinheit bis zu einem maximalen Umsatz von 5% bezogen auf den erreichbaren Gleichgewichtsumsatz bestimmt wurde.

---

<sup>79</sup> Aisaka, K., Igarashi, A., Yamaguchi, K., Uwajima, T., Purification, crystallization and characterisation of *N*-Acetylneuraminase Lyase from *Escherichia coli*; *Biochem. J.* **1991**, 276, 541-546

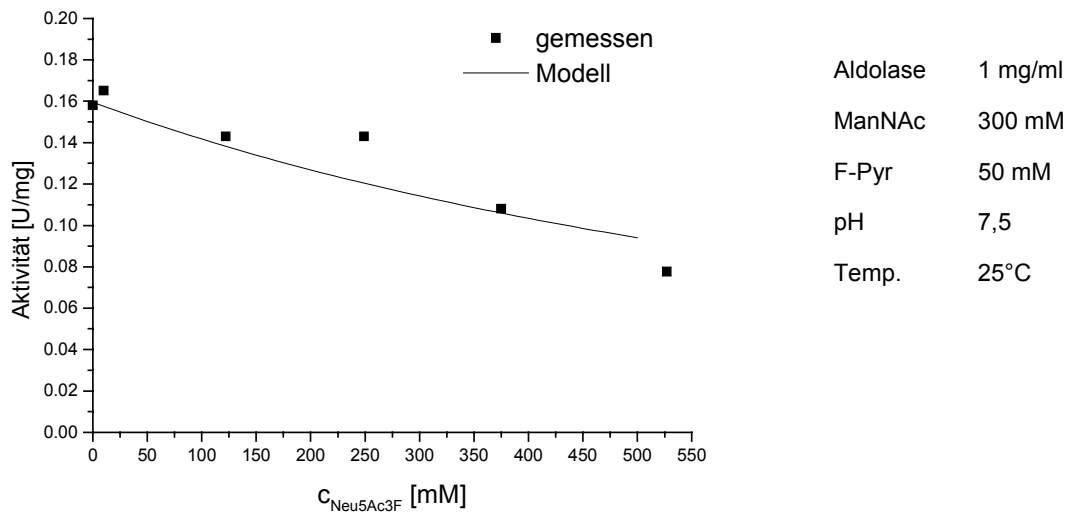
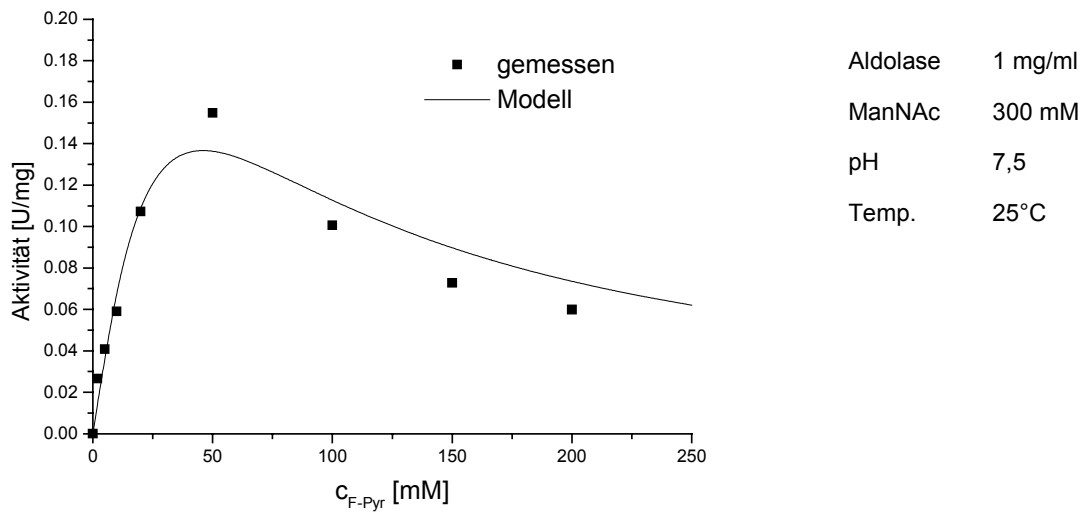
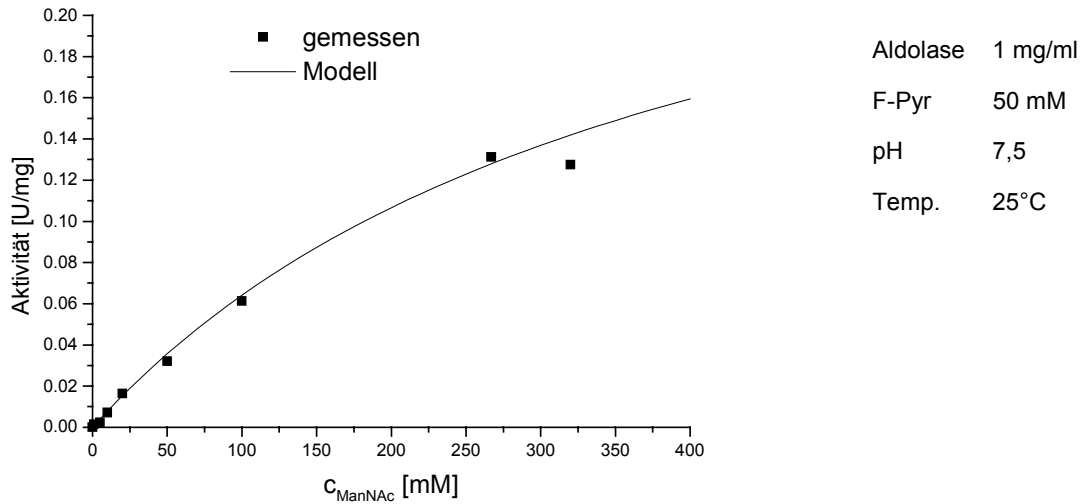
<sup>80</sup> Firma : Sorachim, 39 rue Gambetta, 72000 Le Mans, France, 1997 (europäische Vertretung von Toyobo)

\* U\* ist die Aktivitätsangabe des Herstellers und bezieht sich auf das Standardassay für die Spaltung von Neu5Ac zu Pyruvat und *N*-Acetylmannosamin

Dabei wird vereinfachend angenommen, dass diese geringe Umsetzung keine relevante Veränderung der Reaktionsbedingungen hervorruft.

Zur Analytik wurde eine von *Kragl* entwickelte HPLC-Methode verwendet, die die Quantifizierung aller Reaktionskomponenten erlaubt. Diese Analytik trennt auch die beiden Epimere Neu5Ac3F<sub>axial</sub> und Neu5Ac3F<sub>equatorial</sub> auf. Bei den folgenden Messungen werden die beiden Epimere der Neu5Ac3F allerdings als ein Produkt zusammengefasst. Die Ergebnisse der Messungen sind als Punkte (▪) in Abbildung 3-7 dargestellt. Die Linie (—) entspricht der Berechnung mit dem in Kapitel 3.2.2.1 aus diesen Messungen abgeleiteten Modell.

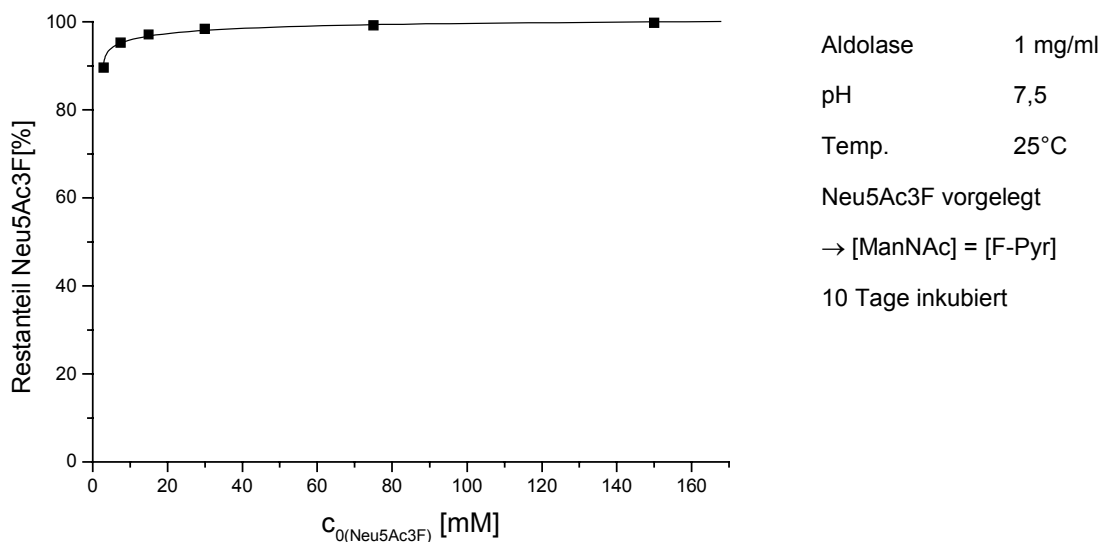




**Abbildung 3-7:** Aktivität der Aldolase in Abhängigkeit von der ManNAc-Konzentration, der Fluorpyruvatkonzentration und der Neu5Ac3F-Konzentration; (▪) Messwerte, (—) berechnet nach Modell aus Gleichung 3-2

Die Abhängigkeit von der ManNAc Konzentration zeigt einen einfachen Michaelis-Menten Verlauf mit einem verhältnismäßig hohen  $k_m$ -Wert. Der Verlauf der Aktivität in Abhängigkeit von der F-Pyr-Konzentration weist eine Substratüberschußinhibierung aus, und für die Abhängigkeit von der Neu5Ac3F-Konzentration lässt sich eine schwache Produktinhibierung ablesen. Dieser Effekt kann nicht auf die einsetzende Rückreaktion zurückgeführt werden, da es sich gezeigt hat, dass diese Reaktion im Gleichgewicht sehr hohe Umsätze von bis zu >99% erreicht. Die Rückreaktion war so geringfügig, dass sie nicht quantifiziert werden konnte.

Abbildung 3-8 zeigt den prozentualen Anteil von Neu5Ac3F in der Rückreaktion in Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration von Neu5Ac3F nach 10 Tagen Inkubation mit Aldolase. Die Aldolase ist hinreichend stabil für Messungen über diesen Zeitraum.



**Abbildung 3-8:** Restanteil der Neu5Ac3F in Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration von Neu5Ac3F

Unter der Annahme, dass sich in diesem Zeitraum das Gleichgewicht eingestellt hat, lässt sich aus diesem Umsatz die Gleichgewichtskonstante berechnen. Aufgrund der sehr hohen Gleichgewichtsumsätze ist die Bestimmung der Gleichgewichtskonstante nach Gleichung 3-1 schwierig, da die Analytik für die Bestimmung der Edukte an ihre Fehlergrenzen stößt. Daher wird für die Ermittlung der Gleichgewichtskonstante lediglich die Messung bei einer Gesamtkonzentration von 3 mM herangezogen, da hier der Gleichgewichtsumsatz am geringsten ist und somit die Analytikfehler minimiert werden.

$$K_{eq} = \frac{c_{(Neu5Ac3F)}}{c_{(ManNAc)} \cdot c_{(F-Pyr)}} \quad \text{für} \quad \frac{d[Neu5Ac3F]}{dt} = 0$$

**Gleichung 3-1:**

$$K_{eq} = 31800 \text{ l/mol}$$

Es wird ein Wert von  $K_{eq} = 31800 \text{ l/mol}$  ermittelt. Dieser Wert ist unverhältnismäßig hoch im Vergleich zu der Gleichgewichtskonstanten für das Standardsystem mit Neuraminsäure von 29 mM. Das deutet auf eine Grundsätzliche Veränderung im Molekül hin. Dieser hohe Wert mag durch den Einfluss des Fluors auf die Bindung zwischen C-3 und C-4 hervorgerufen werden. Bei der Spaltungsreaktion muss diese Bindung geöffnet werden, wobei das Elektronenpaar am C-4 bleibt (s. Mechanismus Abbildung 3-6). Durch den induktiven elektronenziehenden Effekt des Fluors auf C-3, wird das Elektronenpaar wahrscheinlich schwer abgegeben.

**3.2.2.1 Kinetisches Modell**

Da bei dieser Reaktion so gut wie keine Rückreaktion beobachtet werden kann, wird ein einfacher formalkinetischer Ansatz zur Beschreibung der Reaktion verwendet. Aus einer Michaelis-Menten-Doppelsubstrat-Kinetik, die multiplikative Verknüpfung zweier Michaelis-Menten-Kinetiken, werden die kinetischen Parameter  $v_{max}$  (maximale Reaktionsgeschwindigkeit),  $k_{m(F-Pyr)}$  ( $k_m$ -Wert von F-Pyr),  $k_{m(ManNAc)}$  ( $k_m$ -Wert von ManNAc) bestimmt. Außerdem werden Terme für die beobachtete Substratüberschußinhibition durch F-Pyr und die Produktinhibition durch Neu5Ac3F eingefügt und so die Größen  $k_{i(F-Pyr)}$  ( $k_i$ -Wert von F-Pyr) und  $k_{i(Neu5Ac3F)}$  ( $k_i$ -Wert von Neu5Ac3F) bestimmt.

Die Reaktionsgeschwindigkeit  $v$ , bzw. Enzymaktivität hängt wie folgt von den Substratkonzentrationen  $c_{(F-Pyr)}$  und  $c_{(ManNAc)}$ , der Produktkonzentration  $c_{(Neu5Ac3F)}$  ab:

$$v = \frac{[E]^{ald} \cdot c_{(F-Pyr)} \cdot c_{(ManNAc)} \cdot v_{max}}{\left[ c_{(F-Pyr)} + \frac{c_{(F-Pyr)}^2}{k_{i(F-Pyr)}} + k_{m(F-Pyr)} \cdot \left( 1 + \frac{c_{(Neu5Ac3F)}}{k_{i(Neu5Ac3F)}} \right) \right] \cdot \left[ c_{(ManNAc)} + k_{m(ManNAc)} \cdot \left( 1 + \frac{c_{(Neu5Ac3F)}}{k_{i(Neu5Ac3F)}} \right) \right]}$$

**Gleichung 3-2:**

$c_{(x)}$	[mM]	Konzentration der Komponente x
$v$	[U/mg]	Reaktionsgeschwindigkeit der Neu5Ac3F-Synthese
$[E]^{ald}$	[mg/ml]	Enzymkonzentration der Aldolase
$v_{max}$	[U/mg]	maximale massenspezifische Aktivität der Synthese
$k_{m(ManNAc)}$	[mM]	Michaelis-Menten-Konstante der Komponente ManNAc
$k_{m(F-Pyr)}$	[mM]	Michaelis-Menten-Konstante der Komponente Fluorpyruvat
$k_{i(Neu5Ac3F)}$	[mM]	Michaelis-Menten-Konstante der Komponente Neu5Ac3F
$k_{i(F-Pyr)}$	[mM]	Inhibierungskonstante der Komponente Fluorpyruvat

Parameter	Einheit	Neu5Ac3F <sup>1</sup>	Neu5Ac <sup>2</sup>
$v_{max}$	U/mg	0,898 +/- 0,347	13,8
$k_{m(ManNAc)}$	mM	393 +/- 168	402
$k_{m(F-Pyr)}$ bzw. $k_{m(Pyr)}$	mM	41 +/- 20	0,136
$k_{i(F-Pyr)}$	mM	49 +/- 25	
$k_{i(Neu5Ac3F)}$	mM	644 +/- 123	

<sup>1</sup> gemessen in dieser Arbeit mit einer Enzymcharge von 24 U\*/mg\*

<sup>2</sup> gemessen von Kragl mit einer Enzymcharge von >15U\*/mg

**Tabelle 3-2:** Kinetische Konstanten der Aldolase für die Neu5Ac3F-Synthese im Vergleich mit den entsprechenden Werten für die Neu5Ac-Synthese

Dieser Vergleich mit den von Kragl bestimmten Werten für die Neu5Ac-Synthese ist nur bedingt zulässig, da die Ansätze für die kinetischen Modelle (hier Michaelis-Menten, bei Kragl Gleichgewichtsansatz) verschieden sind. So zeigt Neu5Ac z.B. eine deutlich stärkere Produktinhibition als Neu5Ac3F, die im Modell aber nicht durch eine Konstante  $k_{i(Neu5Ac)}$  erfasst wird, sondern durch den Term für die Rückreaktion.

### 3.2.2.2 Vergleich mit Synthese von Neu5Ac

Die wesentlichen Unterschiede der Kinetiken der Neu5Ac3F-Synthese und der Neu5Ac-Synthese sind:

- Die Aktivität für die Synthese von Neu5Ac3F ist um ein Vielfaches herabgesetzt gegenüber der Synthese von Neu5Ac.
- Im Gegensatz zu Pyr wird durch F-Pyr eine Substratüberschußinhibierung hervorgerufen.
- Im Gegensatz zur Neu5Ac ist keine ausgeprägte Produktinhibierung durch Neu5Ac3F zu beobachten.
- Bei der Reaktion zu Neu5Ac3F findet im Gegensatz zur Neu5Ac Synthese nur eine sehr geringe Rückreaktion statt.

Der  $k_m$ -Wert für ManNAc (393 mM) stimmt gut mit Literaturwerten (402 mM) für die Standardreaktion von ManNAc mit Pyr<sup>81</sup> überein. Der  $k_m$ -Wert für das F-Pyr liegt mit 41 mM ca. um den Faktor 300 höher als bei der Standardreaktion (0,136 mM) und es ist eine Substratüberschussinhibierung festzustellen. Während bei der Standardreaktion eine maximale Aktivität  $v_{max}$  von 13,8 U/mg (bei einer Enzymcharge von >15U\*/mg)<sup>x</sup> erreicht wird, ist die maximale Aktivität  $v_{max}$  bei der Reaktion mit F-Pyr auf 0,9 U/mg (bei einer Enzymcharge von 24 U\*/mg) herabgesetzt.

➤ Das entspricht einer relativen Aktivität von nur 4 %.

Das erklärt, warum *Uchida et al.* In ihrem Experiment<sup>67</sup> keine Umsetzung beobachten konnten. Die Konzentration von 50 mM F-Pyr ist zwar günstig hinsichtlich  $k_m$ -Wert und Substratüberschußinhibierung von F-Pyr gewählt, aber die Konzentration des ManNAc liegt mit 50 mM deutlich unter dem  $k_m$ -Wert von 393 mM. Bei dieser Konzentration wird nur eine Aktivität von 0,035 U/mg Enzym (bei 24 U\*/mg) erreicht, was ungefähr einem 1/685 der hier erreichten Aktivität entspricht. Bei 0,1 U\*/ml entspräche das einer Aktivität von  $1,46 \cdot 10^{-4}$  U/ml. Bei der Definition von Unit

1 U = 1  $\mu$ mol/min

bedeutet das eine Produktbildung von  $1,46 \cdot 10^{-4}$   $\mu$ mol/min bzw. 0,21  $\mu$ mol/d.

So steht das in dieser Arbeit erzielte Ergebnis nicht im Widerspruch zu den Ausführungen in der Literatur. Aber die Umsetzung von ManNAc und F-Pyr zu Neu5Ac3F wird erst durch die gezielte Wahl der Reaktionsbedingungen möglich.

Die Aktivität der Aldolase für die Synthese von Neu5Ac3F wird hier unter den in Tabelle 3-6 angegebenen Standardassaybedingungen auf 0,16 U/mg festgelegt.

---

<sup>81</sup> Kragl, U., Reaktionstechnik biokatalytischer Prozesse am Beispiel der kontinuierlichen Synthese von *N*-Acetylneuraminsäure, Dissertation Universität Bonn, 1992

<sup>x</sup> U\* ist die Aktivitätsangabe des Herstellers (Toyobo) und bezieht sich auf ein Assay für die Spaltung von Neu5Ac zu Pyruvat und *N*-Acetylmannosamin

---

ManNAc	400 mM	
F-Pyr	50 mM	
Aldolase	1 mg/ml	
pH	7,5	10 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
T	25°C	

**Aktivität: 0,16 U/mg**

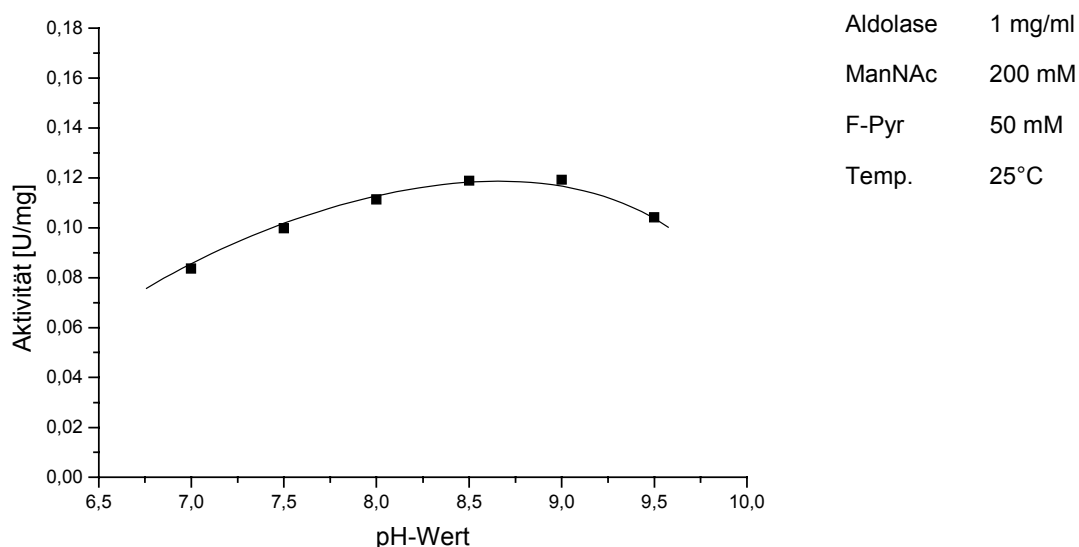
**Tabelle 3-3:** Standardassay zur Aktivitätsmessung der Aldolase für die Synthese von Neu5Ac3F

---

### 3.2.2.3 Abhängigkeit der Aktivität von pH-Wert und Temperatur

Es ist ein weit verbreiteter Trugschluss, dass enzymatische Reaktionen unter physiologischen Bedingungen immer am besten laufen. Natürlich ist es richtig, dass der überwiegende Anteil der Enzyme auf extreme Bedingungen hinsichtlich pH-Wert, Temperatur oder auch Lösungsmittel mit Desaktivierung reagieren. Es gibt aber durchaus Enzyme, die eine gewisse Toleranz gegenüber diesen Parametern aufweisen. Außerdem ist zu beobachten, dass der pH-Wert für die maximale Aktivität nicht unbedingt mit dem pH-Wert für die maximale Stabilität des Enzyms übereinstimmt. Bei der Temperatur verhält es sich so, dass die Enzyme bei niedrigen Temperaturen am stabilsten sind, wohingegen die Aktivität nach den Gesetzen der Thermodynamik mit der Temperatur steigt.

Für die Synthese von Neu5Ac hat *Kragl* ein flaches pH-Aktivitätsmaximum zwischen 7 und 8 beschrieben. Die hier ermittelte pH-Abhängigkeit der Synthese von Neu5Ac3F ist in Abbildung 3-9 dargestellt.



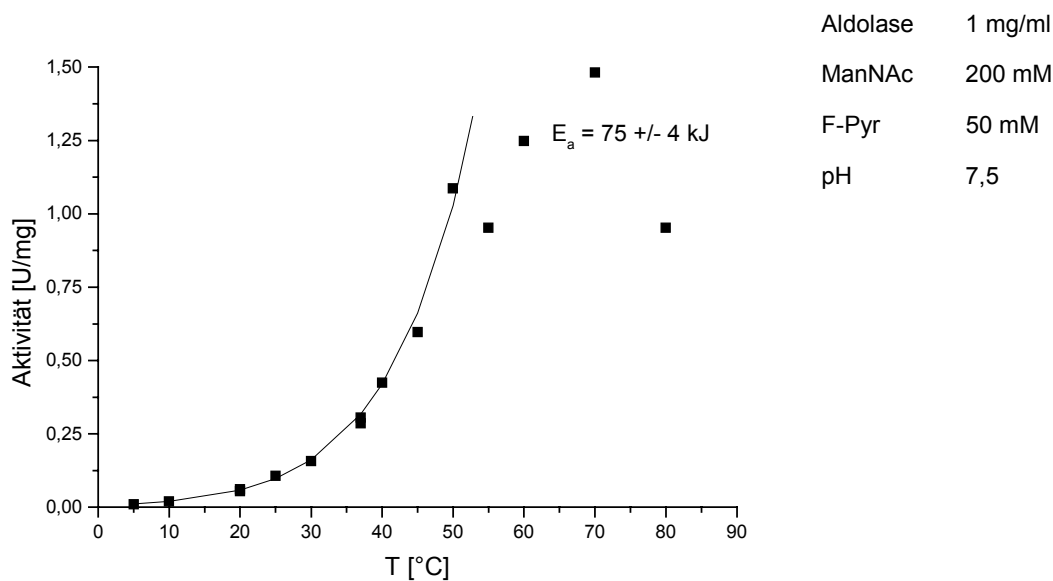
**Abbildung 3-9:** pH-Optimum der Aldolase-katalysierten Synthese von 3FNeu5Ac

---

Auch hier ist das pH-Aktivitätsmaximum nur sehr schwach ausgeprägt. Es liegt mit 8 bis 9 höher als bei der Synthese von Neu5Ac. Stabilitätsmessungen über vier Tage zeigten bei pH-Werten von 7,5 bis 9 keine signifikante Desaktivierung des Enzyms.

Da die Aktivitätsunterschiede jedoch so gering sind, wurde in Hinblick auf die Instabilität der Reaktanten bei höheren pH-Werten, speziell des F-Pyr, der von *Kragl* gewählte pH-Wert von 7,5 beibehalten.

In Abbildung 3-10 ist die Abhängigkeit der Aktivität von der Temperatur dargestellt.



**Abbildung 3-10:** Bestimmung der Aktivierungsenergie aus der temperaturabhängigen Enzymaktivität

Wie zu erwarten, steigt die Aktivität mit der Temperatur deutlich an. Bei einer Temperatur von über 50°C setzt durch die starke thermische Desaktivierung des Enzyms ein gegenläufiger Effekt ein. Diese Messung zeigt, dass sich die Aktivität durch eine Erhöhung der Temperatur von 25°C auf 50 °C verzehnfachen lässt. Die hier durchgeführten Versuche wurden dennoch bei 25°C durchgeführt, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse nicht durch verstärkte thermische Desaktivierung des Enzyms zu erschweren.

Allerdings bietet dieser Aspekt hohes Potential für die Beschleunigung der Neu5Ac3F Synthese und könnte für die Synthese der radioaktiven  $^{18}\text{F}$ -Verbindung die in Kapitel 3.5.2 besprochen wird, von Interesse sein, da es dort vor allem um Geschwindigkeit geht.

Aus der Messung der Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur lässt sich über die Arrhenius-Gleichung die Aktivierungsenergie der Reaktion ermitteln.

$$k_{kat} = A \cdot e^{-E_a/RT}$$

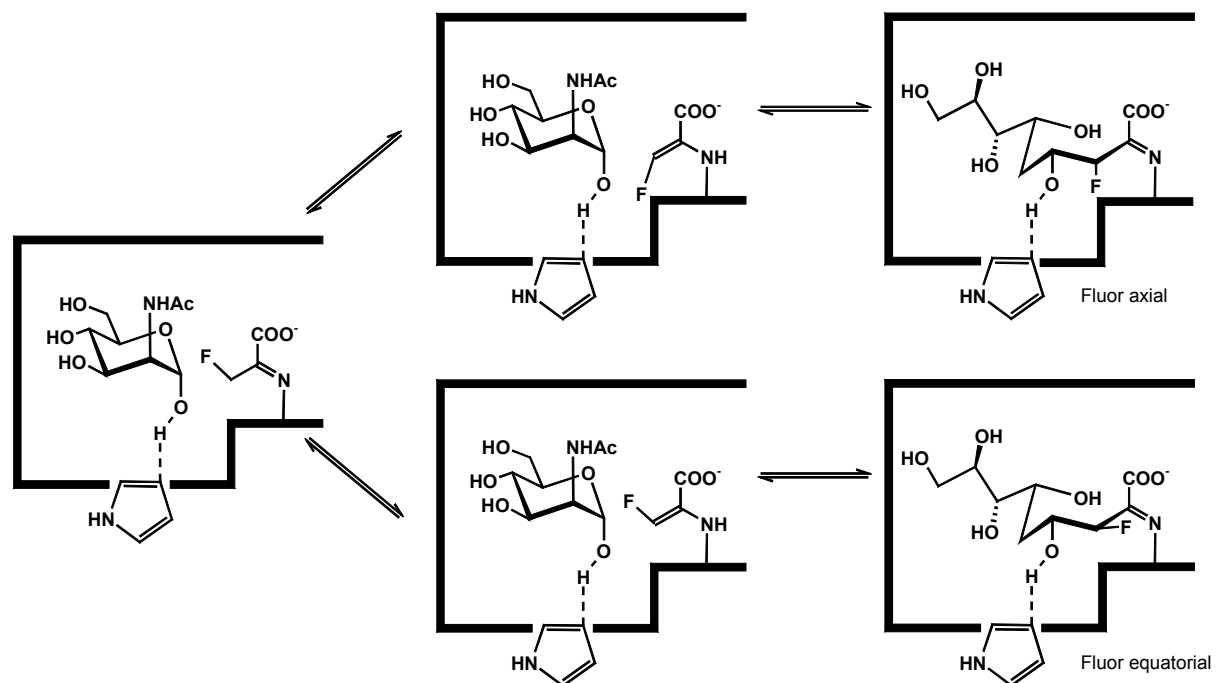
### Gleichung 3-3: Arrheniusgleichung

$k_{kat}$	= Geschwindigkeitskonstante des katalytischen Umsatzes (Aktivität)
$A$	= Integrationskonstante ~ Häufigkeit der Zusammenstöße der reagierenden Moleküle
$E_a$	= Aktivierungsenergie = 75 kJ +/- 4
$R$	= Gaskonstante = 8,3154 J/(mol·K)
$T$	= Temperatur (K)

Die Aktivierungsenergie errechnet sich zu 75 kJ/mol +/- 4. Gemeinhin liegt die Aktivierungsenergie von Enzymreaktionen in einem Bereich von 40-80 kJ/mol. Damit ist die hier bestimmte Aktivierungsenergie im oberen Bereich des normalen Rahmens.

### 3.2.3 Bildung zweier Epimere

Wie in Abbildung 3-4 bereits angedeutet, besteht die Möglichkeit der Bildung zweier Epimere bei der Synthese von Neu5Ac3F. Das Fluor kann in axialer oder in equatorialer Ausrichtung in Position C-3 eingebaut sein. Die Ursache hierfür lässt sich im Reaktionsmechanismus (vgl. Abbildung 3-6) in der Ausbildung des Enamins finden. Bei der Abspaltung eines Protons am C-3 des Fluorpyruvats kann das Fluor, wie in Abbildung 3-11 gezeigt, durch die entstehende Doppelbindung zwei unterscheidbare Positionen einnehmen. Die Konformation dieses Enamins bestimmt die Konformation des Fluors in der entstehenden Neu5Ac3F.



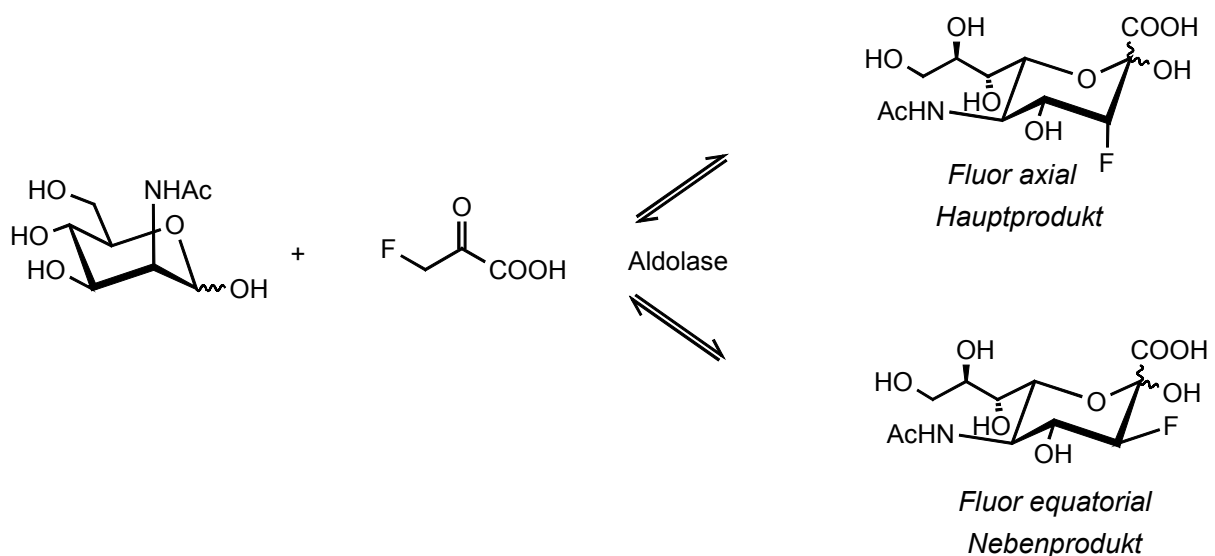
**Abbildung 3-11:** Konformation des Fluors in der Neuraminsäure in Abhängigkeit von der Konformation des Enamins



Dabei ist der hier dargestellte absolute Zusammenhang zwischen der Konformation des Enamins und des Fluors in der Neuraminsäure nicht zwingend. Dieser hängt davon ab, ob der nukleophile Angriff des C-3 im Pyruvat and das C-1 im ManNAc bei diesem Mechanismus von vorne oder von hinten erfolgt.

Tatsächlich wurde in dieser Arbeit die Bildung beider Epimere beobachtet. Bei der enzymatischen Umsetzung werden diese in unterschiedlichen Mengen gebildet. Wie in Abbildung 3-12 gezeigt, entsteht als Hauptprodukt die Verbindung mit dem axialständigen Fluor und als Nebenprodukt die Verbindung mit dem equatorialständigen Fluor. Die beiden Epimere lassen sich durch die verwendete HPLC-Methode trennen (s. Kapitel 6.6.1) und die Konformation durch  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektroskopie über die verschiedenen Kopplungen des Fluors zum Proton an C-4 zuordnen (s. Kapitel 6.6.3.1).

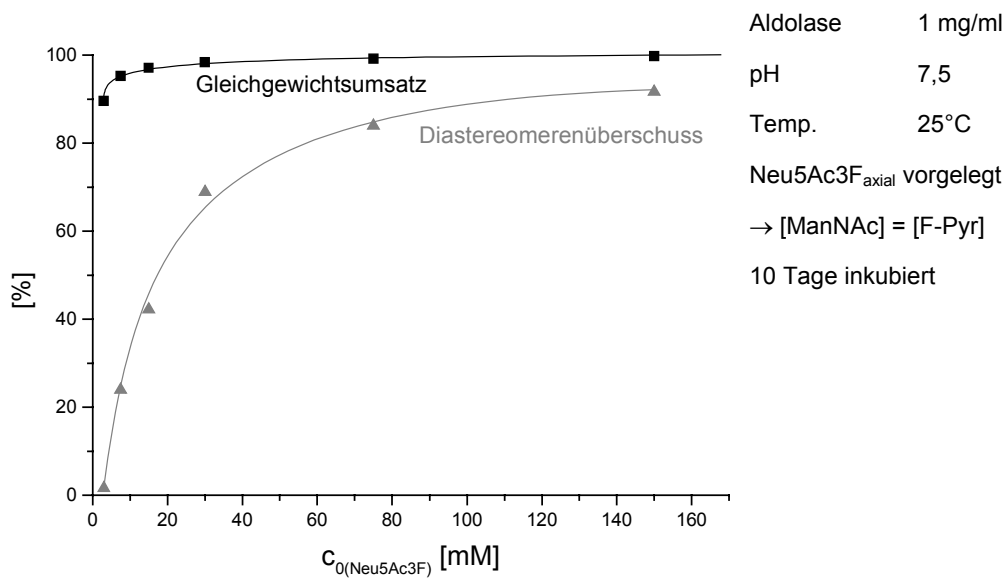
Diese Bevorzugung der Bildung eines Epimers führt zu Spekulationen über den Reaktionsmechanismus. Es ist grundsätzlich möglich, dass diese Bevorzugung bereits bei der Ausbildung des Enamins erfolgt. Es kann aber auch sein, dass trotz gleichmäßiger Ausbildung beider Enamine aus sterischen Gründen der nukleophile Angriff durch eines der beiden Enamine bevorzugt stattfindet. Diese Überlegungen zeigen, dass dieses Reaktionssystem möglicherweise ein Schlüssel zu weiteren Erkenntnissen über den Mechanismus dieser Aldolasereaktion sein kann.



**Abbildung 3-12:** Aldolase-katalysierte Reaktion von ManNAc und F-Pyr zu beiden Epimeren von Neu5Ac3F

Das Verhältnis der beiden Verbindungen wird durch die Reaktionsbedingungen (Gesamtkonzentration, Substratverhältnis, Enzymkonzentration und Umsatz) beeinflusst.

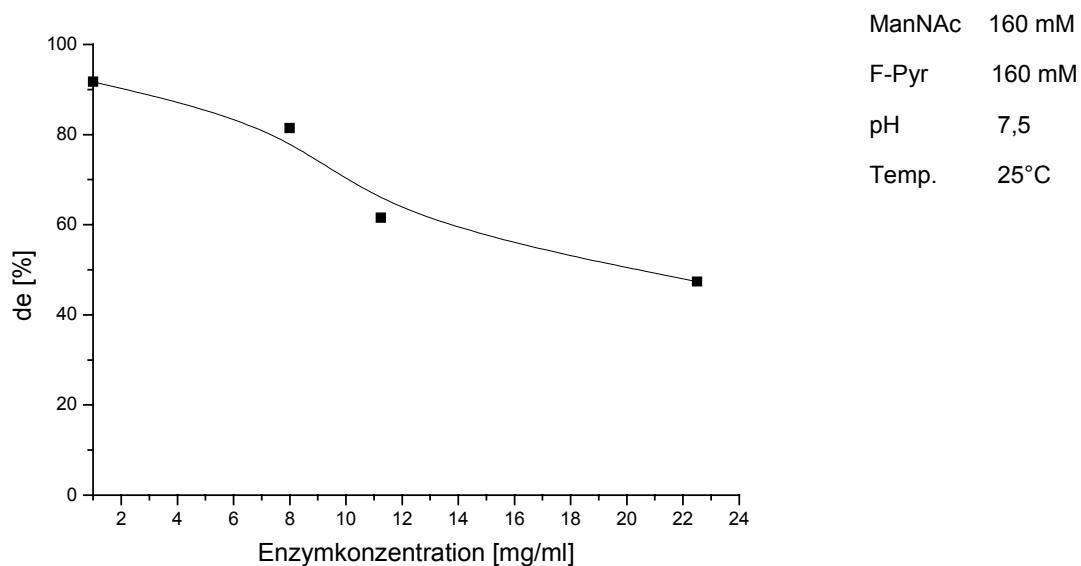
Der Gleichgewichtsumsatz und der Diastereomerenüberschuss (*de*) hängen wie in Abbildung 3-13 gezeigt von der Gesamtkonzentration ( $[\text{ManNAc}] + [\text{Neu5Ac3F}]$ ) mit  $[\text{F-Pyr}] = [\text{ManNAc}]$  ab.



**Abbildung 3-13:** Umsatz und *de* im Gleichgewicht in Abhängigkeit von der Gesamtkonzentration

In diesem Versuch wurde reine Neu5Ac3F<sub>axial</sub> vorgelegt. Mit steigender Gesamtkonzentration und somit steigendem Gesamtumsatz steigt auch der Diastereomerenüberschuss an.

In Abbildung 3-14 ist der Einfluss der Enzymkonzentration auf den Diastereomerenüberschuss dargestellt.



**Abbildung 3-14:** Diastereomerenüberschuss in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration im Gleichgewicht

Es zeigt sich, dass mit zunehmender Enzymkonzentration die Reaktion unspezifischer wird, also der Diastereomerenüberschuss sinkt.

Diese Ergebnisse legen die Annahme nahe, dass das Hauptprodukt nur kinetisch bevorzugt gebildet wird und dass die  $\Delta G$  Werte für das axiale und das äquatoriale Produkt fast gleich sein müssen. Nachdem sich bei der Reaktion zunächst ein Gleichgewicht einstellt, bei dem das axiale Produkt in großem Überschuss vorliegt, tritt mit zunehmendem Einfluss der Rückreaktion eine Epimerisierung ein. Bei der kleinsten Neuraminsäure-Konzentration (Abbildung 3-13) kommt es zur stärksten Rückwärtsreaktion, da hier die Triebkraft für die Rückwärtsreaktion am größten ist. Der Diastereomerenüberschuss geht fast auf Null zurück.

Zu dieser Interpretation passen auch die Ergebnisse aus Abbildung 3-14. Mit zunehmender Enzymkonzentration wird während der Inkubationszeit die an und für sich sehr langsame Rückwärtsreaktion in höherem Maße ermöglicht. Auch dieses würde wiederum belegen, dass das Hauptprodukt nur kinetisch bevorzugt gebildet wird.

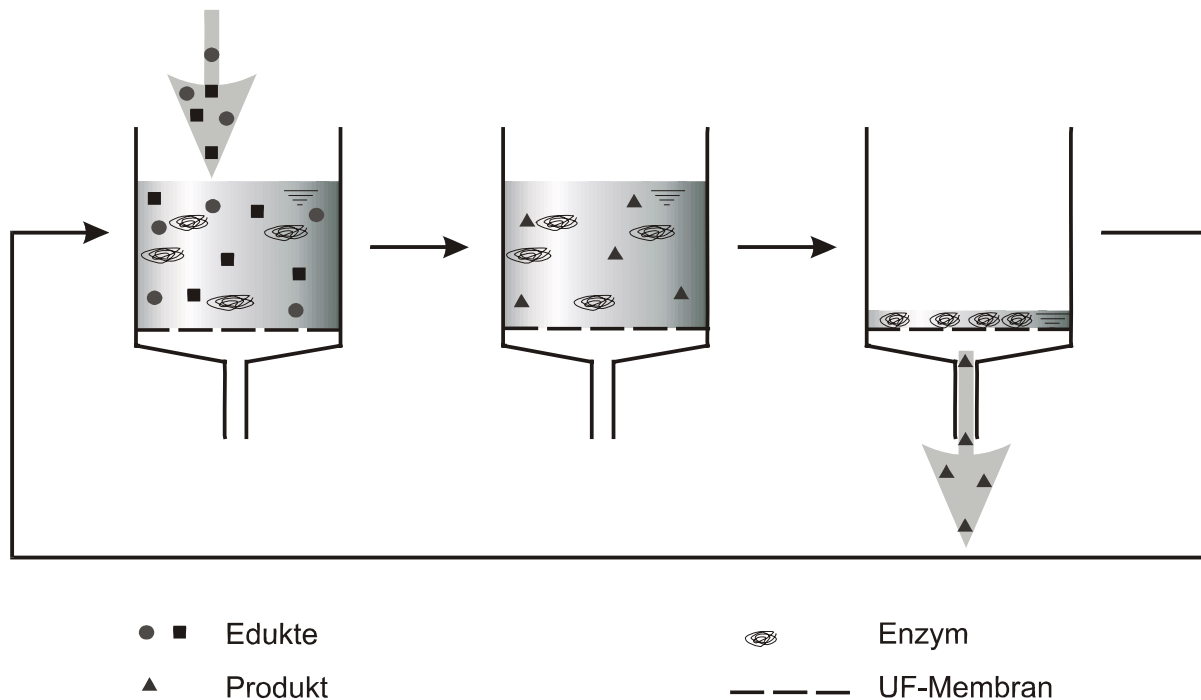
Es könnte von Interesse sein, diese Zusammenhänge systematisch zu untersuchen. Auch hier könnten sich neue Aspekte zum Reaktionsmechanismus erschließen.

### **3.2.4 Präparative Synthese im Repetitive-Batch-Verfahren**

Für die präparative Synthese von Neu5Ac3F wurde das Prinzip des Repetitive-Batch-Verfahrens angewendet. Die Charakteristik der Reaktion erfordert keine reaktionstechnischen Kunstgriffe, da im Gegensatz zur Neu5Ac Synthese im Satzreaktor bei Einsatz equimolarer Mengen beider Substrate ein nahezu quantitativer Umsatz erreicht werden kann.

#### **3.2.4.1 Versuchsaufbau des Repetitive-Batch**

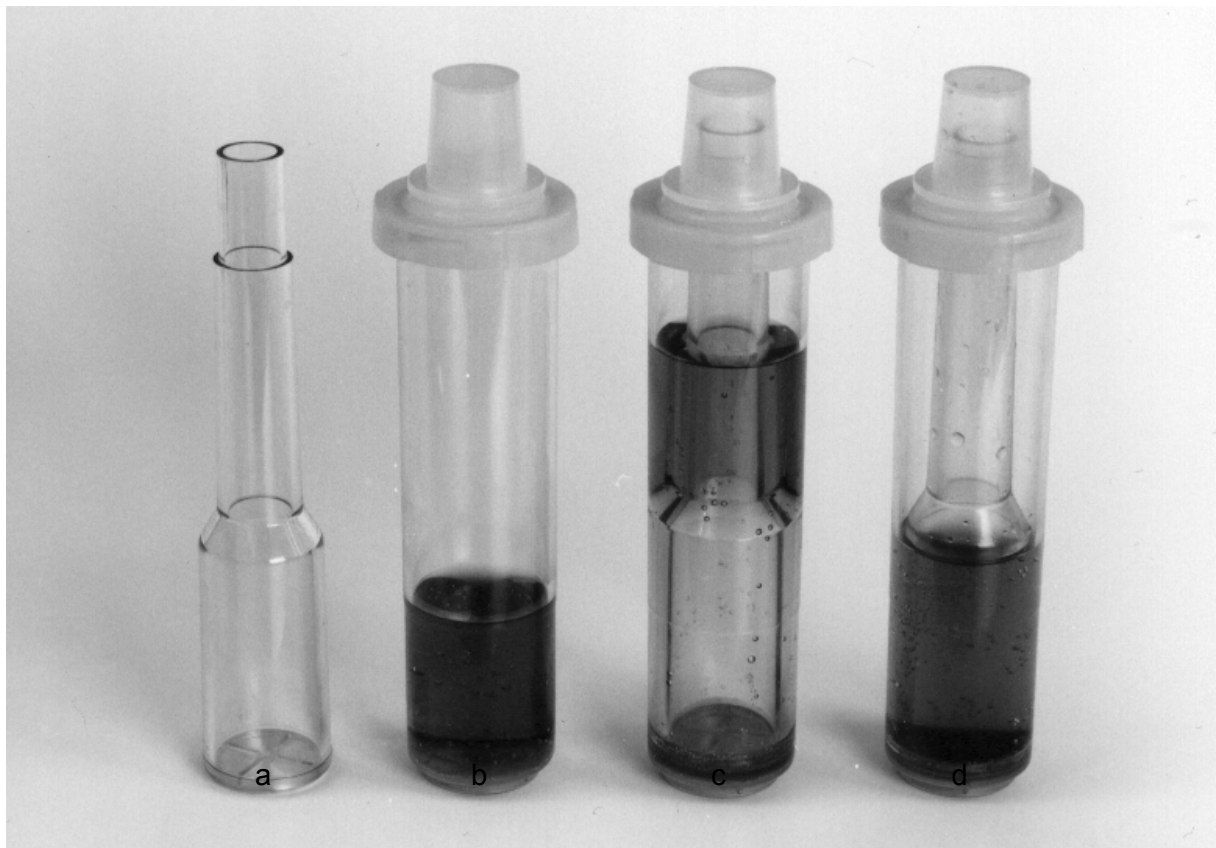
Abbildung 3-15 zeigt schematisch den Ablauf des Repetitive-Batch-Verfahrens.



**Abbildung 3-15:** Schematische Darstellung des Repetitive-Batch-Verfahrens

Die Reaktanten werden mit dem Enzym im Reaktionsgefäß vorgelegt. Nach Vollendung der Reaktion wird die Produktlösung über eine Membran aus dem Reaktionsgefäß abgelassen, während das Enzym zurückgehalten wird. Ein neuer Zyklus beginnt indem frische Eduktlösung zu dem Enzymkonzentrat gegeben wird.

Abbildung 3-16 zeigt den hier verwendeten praktischen Versuchsaufbau.



**Abbildung 3-16:** Amicon Centriprep, a) Membranstempel, b) Reaktionsgefäß, c) Reaktionsgefäß mit Membranstempel vor Zentrifugation, d) Reaktionsgefäß mit Membranstempel nach Zentrifugation

Als Reaktionsgefäß wurde ein Amicon Centriprep YM-10 verwendet. Es besteht aus einem 135 mm hohen Polycarbonat-Gefäß des Durchmessers 28 mm und einem Membranstempel, der als Filtratkollektor dient. Bei der Membran handelt es sich um eine Ultracel-YM regenerierte Zellulose Membran mit einer Ausschlussgrenze von 10.000 kDa und einer aktiven Fläche von 2,84 cm<sup>2</sup>. Die maximale zulässige Zentrifugalkraft beträgt 3.000 g.

Die Reaktion wurde in dem Polycarbonatgefäß durchgeführt, die Temperierung erfolgte im Wasserbad. Nach vollendeter Umsetzung wird der Membranstempel in das Gefäß eingesetzt. Der Stempel verdrängt die Flüssigkeit aus dem unteren Teil des Gefäßes und lässt nur ein kleines Reservoir unterhalb der Membran. Durch Zentrifugation drückt die Lösung von unten durch die Membran in den Membranstempel, bis das Flüssigkeitsniveau innerhalb und außerhalb des Stempels gleich ist. Durch Dekantieren des Filtrats und erneutes Zentrifugieren kann so die Lösung im Gefäß bis auf 0,7 ml eingengt werden. Für die Zentrifugation wird ein *swinging bucket* Rotor für 50 ml Röhrchen verwendet.

Durch Zugabe frischer Eduktlösung zum Enzymkonzentrat wird der nächste Zyklus gestartet.

### 3.2.4.2 Durchführung der Neu5Ac3F Synthese

Für die Durchführung der Synthese sind zwei kinetische Parameter von Bedeutung. Zum einen ist das der relativ hohe  $k_m$ -Wert von 393 mM für ManNAc und zum anderen der  $k_i$  Wert von 49 mM für F-Pyr. Der  $k_m$ -Wert für ManNAc begünstigt die Wahl von möglichst hohen Eduktkonzentrationen, wohingegen die Inhibierung durch F-Pyr bereits bei einer Konzentration von ca. 50 mM zu einer Aktivitätsverminderung führt. Optimal wäre in diesem Fall ein Fed-Batch, bei dem ManNAc in entsprechend hoher Konzentration vorgelegt wird und F-Pyr durch sukzessive Zudosierung auf einem Level von 50 mM gehalten wird. Um jedoch den Aufwand einer Regelung zu umgehen, wurde eine Reduktion der Enzymaktivität durch suboptimale Substratkonzentrationen in Kauf genommen. Es wurde eine Konzentration beider Edukte von 200 mM eingesetzt. Das entspricht etwa der Hälfte des  $k_m$ -Wertes von ManNAc und bei dieser F-Pyr-Konzentration ist die Aktivität auf etwa die Hälfte vermindert (s. Abbildung 3-7). Bei Fortschreiten der Reaktion sind zwei gegenläufige Effekte zu erwarten. Die sinkende ManNAc-Konzentration wirkt reduzierend auf die Aktivität, die sinkende F-Pyr-Konzentration steigernd. Bis zu einem Umsatz von etwa 75%, wenn beide Edukte auf 50 mM absinken, sollten die beiden Effekte sich die Waage halten, so dass bis dahin ein annähernd linearer Verlauf der Umsatzes zu erwarten ist.

Das Enzym wird in einer Menge von 8 mg/ml eingesetzt, was bezogen auf das in Gleichung 3-2 errechnete  $v_{max}$  für diese Reaktion einer Aktivität von 7,2 U/ml entspricht.

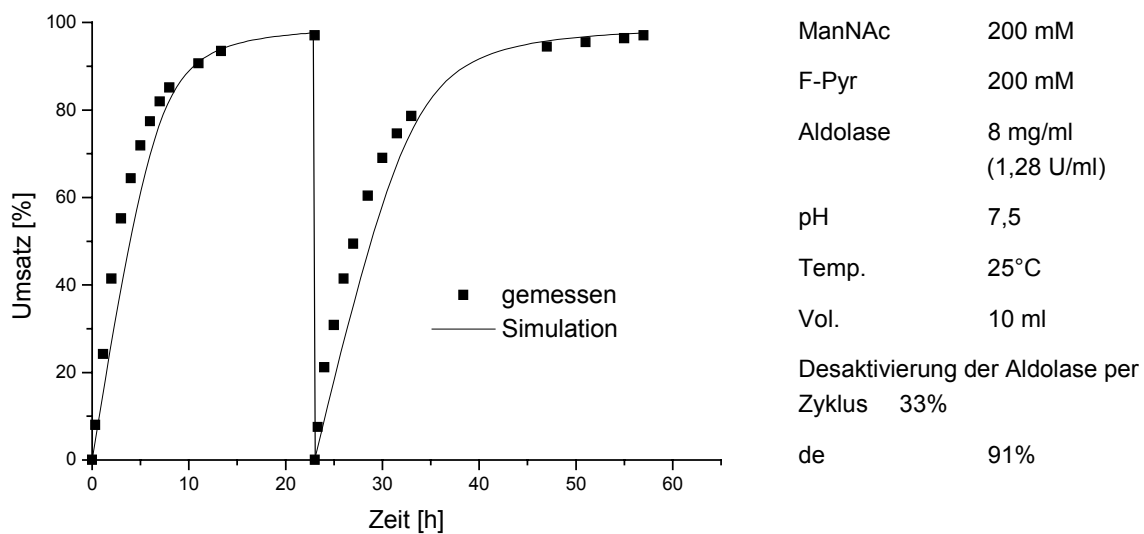
Da durch die Reaktion keine Veränderung des pH-Wertes erfolgt, ist ein Zusatz von Puffer nicht erforderlich. Die Reaktionslösung wird vor Zugabe des Enzyms auf den pH-Wert von 7,5 eingestellt.

Abbildung 3-17 zeigt für die beiden ersten Zyklen von insgesamt sechs des durchgeführten Repetitive-Batch die Entwicklung des Umsatzes über die Zeit.

Unter Zuhilfenahme der in Gleichung 3-4 aufgeführten Stoffbilanzen wird mit dem Modell aus Gleichung 3-2 der Verlauf der Reaktion simuliert.

$$\begin{aligned}\frac{d[ManNAc]}{dt} &= -v_{ald} \\ \frac{d[F-Pyr]}{dt} &= -v_{ald} \\ \frac{d[Neu5Ac3F]}{dt} &= v_{ald} \\ [Pyr]_0 &= [Pyr] + [Neu5Ac3F] \\ [ManNAc]_0 &= [ManNAc] + [Neu5Ac3F]\end{aligned}$$

**Gleichung 3-4:** Stoffbilanzen der Reaktanten der Neu5Ac3F Synthese



**Abbildung 3-17:** Repetitive-Batch zur präparativen Synthese von 3FNeu5Ac – die ersten 2 von insgesamt 6 Zyklen

Das kinetische Modell ist in der Lage, den Verlauf des Batchversuches sehr gut zu beschreiben und wie erwartet steigt der Umsatz bis ca. 75% fast linear an.

Die vergleichsweise hohe Desaktivierung<sup>x</sup> des Enzyms kommt bei den Filtrationsschritten zustande, was daran zu sehen ist, dass in einem einzelnen Zyklus keine Verlangsamung der gemessenen Reaktion gegenüber den Berechnungen mit dem Modell vorliegt. Da es sich bei den Filtrationsschritten um eine *dead-end* Filtration mit einer nicht vorbelegten Membran handelt, bleibt sehr wahrscheinlich ein Teil des Enzyms auf der Membran haften und steht so, nach entfernen der Membran aus dem System, im nächsten Zyklus nicht mehr zur Verfügung. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurde bei jeder Filtration eine neue Membran verwendet. Durch die Desaktivierung werden die Zyklen immer länger. Die letzten drei Zyklen wurden wegen der langen Reaktionszeiten vor Erreichen des maximalen Umsatzes bei ca. 80-85% abgebrochen. Für sechs Zyklen wurde eine Gesamtlaufzeit von zwei Wochen erreicht. Die vereinigten Lösungen aller sechs Zyklen hatten ein Volumen von 55 ml und enthielten 175 mM Neu5Ac3F. Das entspricht einer Raum-Zeit-Ausbeute von 4,1 g/(l\*d) und einem Produktmengen-spezifischer Enzymverbrauch von 4,06 U/g.

### 3.2.4.3 Produktisolierung und Reinigung

Die Produktlösungen der sechs Läufe wurden vereinigt und zusammen aufgearbeitet. Durch den hohen Umsatz der Reaktion konnte die Aufreinigung ohne große Schwierigkeiten in einem Schritt durchgeführt werden.

<sup>x</sup> Kragl berichtet von einer Desaktivierung pro Tag von 1,5% in einem Eppendorf-Cup, von 5% im Polypropylen-EMR und von 20% in einem Edelstahl-EMR

Zur Isolierung und Reinigung von Sialinsäuren ist die Ionenaustauschchromatographie unter Verwendung stark basischer Anionentauscher eine etablierte Methode<sup>82</sup>. Das Produkt Neuraminsäure muss im Reaktionsgemisch als anionogene Verbindung von den Edukten, dem Pyruvat, einer ebenfalls anionogenen Verbindung und dem ManNAc, einer ungeladenen Substanz, getrennt werden. Zwei wesentliche Vorteile dieser Methode sind im Folgenden aufgelistet<sup>83</sup>.

- Der eingesetzte Ionentauscher Dowex 1x2 wird in industriellen Verfahren eingesetzt und ist deshalb preiswert erhältlich. Das Material kann nach einem Lauf regeneriert und wiederverwendet werden.
- Die Verwendung von im Vakuum flüchtigen Elutionsmitteln (in diesem Fall Ameisensäure) ermöglicht die Gewinnung des reinen Produktes durch Gefriertrocknung ohne weitere Abtrennungsschritte.

Die Produktlösung enthält die Reaktionskomponenten in etwa der folgenden Zusammensetzung:

Neu5Ac3F	175 mM
ManNAc	25 mM
F-Pyr	25 mM

Die Anionenchromatographie wird nach den von *Kragl* optimierten Bedingungen durchgeführt.

- Der Anionentauscher wird durch Spülen mit 1 M Ameisensäure in die Formiat-Form überführt, anschließend wird bis zur Neutralisation mit Wasser gespült
- Die Produktlösung wird langsam auf die Ionentauschersäule aufgepumpt. Die anionogenen Verbindungen werden gebunden, wohingegen ManNAc annähernd keine Wechselwirkung mit dem Anionentauscher zeigt und zusammen mit Na<sup>+</sup>- und den freigesetzten Formationen eluiert.
- Die Säule wird ausgiebig mit Wasser gespült, um das ManNAc auszuwaschen.
- Die Elution von Neu5Ac3F und F-Pyr erfolgt durch Ameisensäure. Jedoch ist festzustellen, dass durch die Elution mit 1 M Ameisensäure eine nicht zufriedenstellende Trennung von Neu5Ac3F und F-Pyr erreicht wird. Daher werden die Bedingungen dahingehend verändert, dass die Elution mit einem Ameisensäuregradienten von 0 - 1 M erfolgt.
- Die Produktfraktionen werden gefriergetrocknet und im Ölpumpenvakuum von Resten von Ameisensäure befreit.

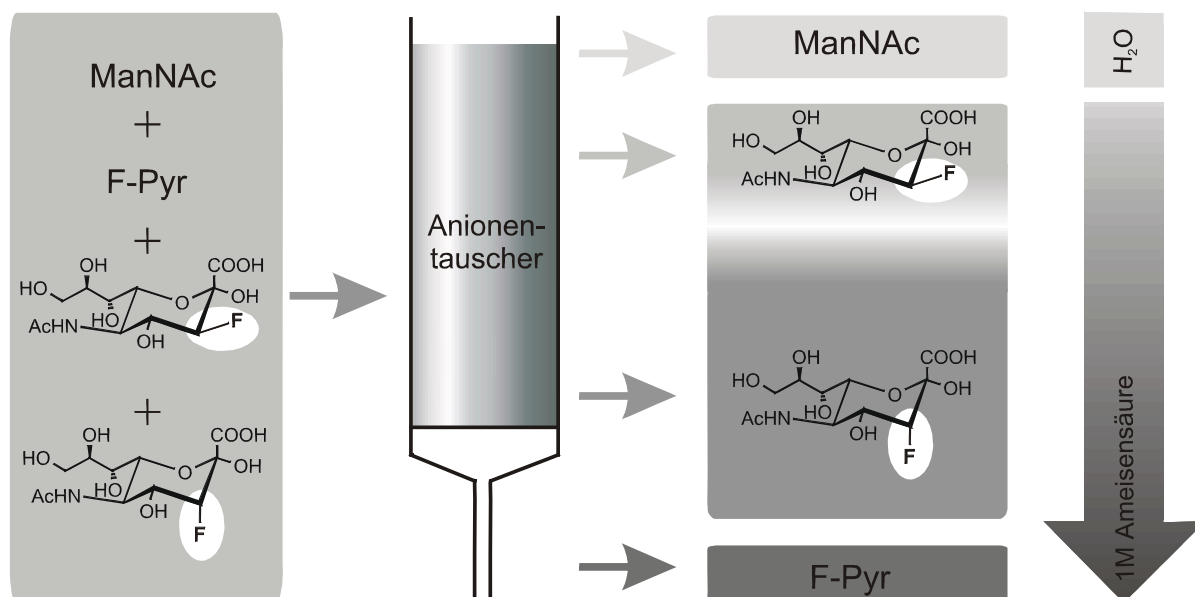
Die Reinigung ist schematisch in Abbildung 3-18 dargestellt. Die Bedingungen für die Trennung sind in Tabelle 6-1 zusammengefasst.

---

<sup>82</sup> Schauer, R., *Sialic acids – chemistry, metabolism and function*, Springer Verlag, New York, **1982**

<sup>83</sup> Kragl, U., *Reaktionstechnik biokatalytischer Prozesse am Beispiel der kontinuierlichen Synthese von N-Acetylneuraminsäure*, Dissertation Universität Bonn, **1992**





**Abbildung 3-18:** Chromatographie zur Isolierung der 3FNeu5Ac auf dem Reaktionsgemisch und Trennung beider Epimere in einem Schritt.

Durch die Verwendung des Gradienten gelingt es nicht nur, das F-Pyr vollständig vom Produkt zu trennen, sondern außerdem, die beiden Epimere der Neu5Ac3F zu trennen. Neu5Ac3F<sub>equatorial</sub> eluiert zuerst, dann folgt eine Mischfraktion beider Epimere und anschließend Neu5Ac3F<sub>axial</sub>.

Es konnten so 2,55 g Neu5Ac3F<sub>axial</sub> und 150 mg Neu5Ac3F<sub>equatorial</sub> isoliert werden. Das entspricht einer isolierten Ausbeute in der Reinigung von 85 % und einer isolierten Ausbeute bezogen auf die Gesamtreaktion von 69%.

Die so hier hergestellte Neu5Ac3F wird über Calbiochem vertrieben.

Verluste bei der Aufreinigung kommen in erster Linie durch die Mischfraktion beider Epimere zustande und dadurch, dass Neu5Ac3F trotz ausreichender Ionentauscherkapazität nicht quantitativ gebunden wird. Ca. 8% eluieren zusammen mit ManNAc vor dem Start des Ameisensäuregradienten. Das mag damit zusammenhängen, dass durch die Bindung der anionogenen Verbindungen Ameisensäure in ausreichend hoher Konzentration freigesetzt wird, um mit der Neu5Ac3F um die Bindung mit dem Anionentauscher konkurrieren.

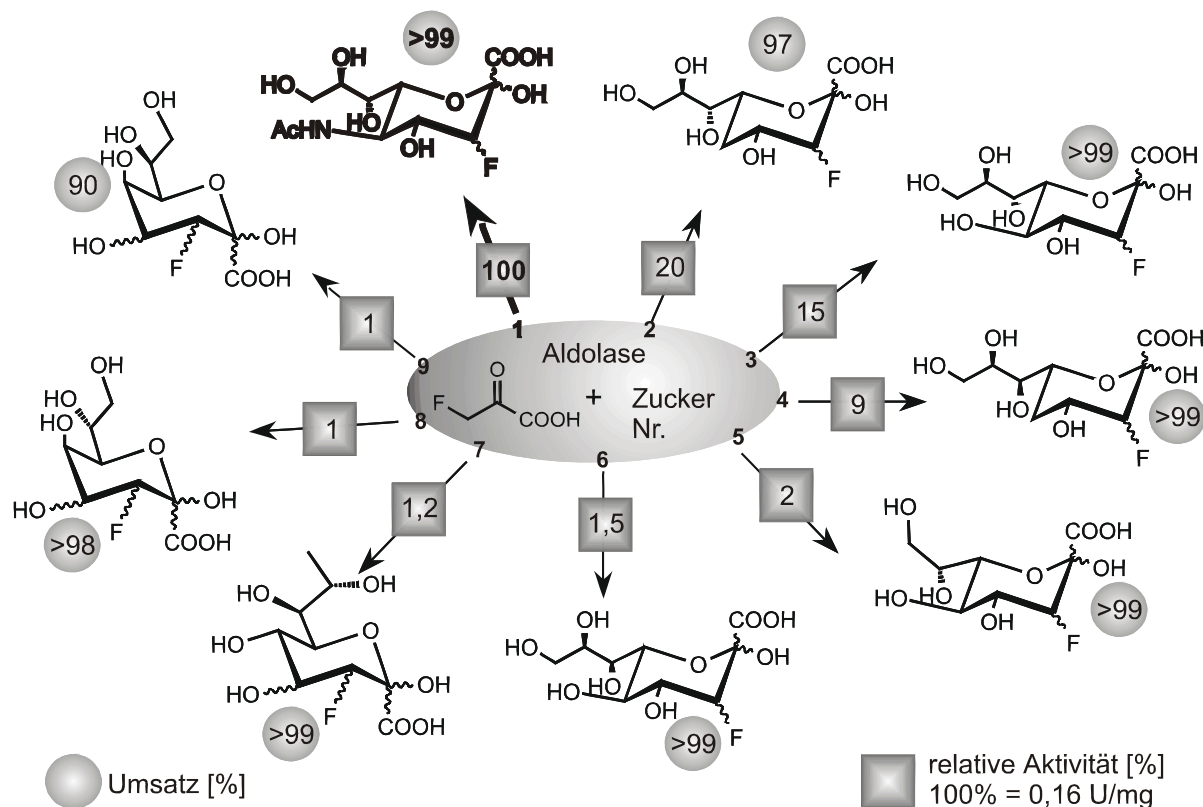
Die so getrennten Epimere wurde zu den Untersuchungen zu Reaktionsgleichgewicht verwendet.

### 3.2.5 Substratspektrum der Aldolase

Da diese Aldolase-katalysierte Synthese von Neu5Ac3F einen Weg für die schnelle Synthese eines fluorierten Zuckers liefert, wurden außer den Versuchen zur Synthese der Neu5Ac3F aus F-Pyr und ManNAc ausgehend von anderen Zuckerkomponenten weitere Versuche zur Darstellung von in C-3 Position fluorierter Neuraminsäurederivate durchge

führt<sup>84</sup>. Die Bedingungen waren dabei eine Enzymkonzentration von 1 mg/ml Aldolase für die Zucker 1-3 und 5 mg/ml für die restlichen Zucker, Substratkonzentrationen von 400 mM Zucker und 50 mM F-Pyruvat, ein pH-Wert von 7,5 und eine Temperatur von 25°C.


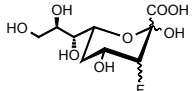
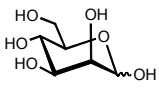
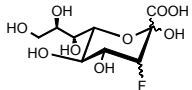
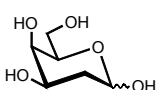
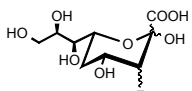
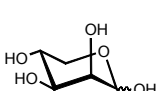
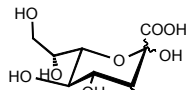
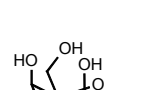
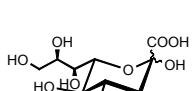

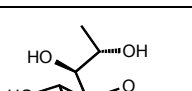
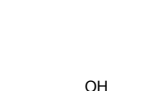
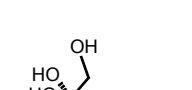
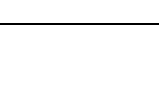
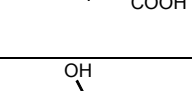
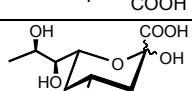
Abbildung 3-19 zeigt eine Zusammenstellung dieser Reaktionen mit Angabe der relativen Aktivitäten in Bezug auf die Synthese von Neu5Ac3F und der Umsätze.

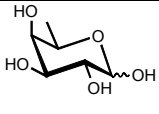
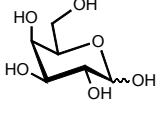
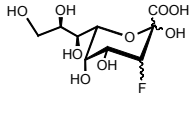
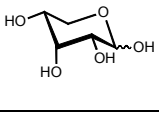
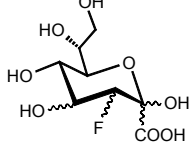


**Abbildung 3-19:** Reaktionen verschiedener anderer Zucker (s. Tabelle 3-4 die ersten 9 der insgesamt 12 aufgeführten) mit F-Pyr zu F-Neuraminsäurederivaten mit Angabe der relativen Aktivitäten (bezogen auf Neu5Ac3F) und der Umsätze

Bei allen Derivaten werden beide Fluorepimere in unterschiedlichen Mengenverhältnissen gebildet. Einige zeigen darüber hinaus eine Epimerisierung der Hydroxyfunktion an C-4. Es zeigt sich, wie zu erwarten, dass ManNAc als natürliches Substrat für die Aldolase am schnellsten umgesetzt wird. Eine Umsetzung in ähnlicher Größenordnung zeigen außerdem noch 2-Desoxy-D-glucose (20%) und D-Mannose (15%), das Substrat für die Synthese von KDN. In einer präparativen Synthese konnten 500 mg 3F-KDN mit einem *de* von >90% hergestellt werden. Tabelle 3-4 zeigt die vollständige Auflistung der eingesetzten Zucker.

<sup>84</sup> Beliczey, J., Kragl, U., Liese, A., Wandrey, C., Coenen, H., Hamacher, K., Tierling, T., Verfahren zur Herstellung von potentiell in der in vivo-Pharmakokinetik verwendbaren organischen Fluorverbindungen sowie 3-Desoxy-3-Fluorocytolopyranonsäuren und 3-Desoxy-3-Fluoronolopyranonsäuren, DE 198 42 133.8-43 (patent application: 15.09.98)

Nr	Edukt		Produkt		Aktivität [U/mg]	Umsatz [%]
	Name	Struktur	Name	Struktur		
1	<i>N</i> -Acetylman- nosamin		5-Acetamido-3,5-dideoxy-3-fluor-D- <i>glycero</i> - D- <i>galacto</i> -nonulosonsäure		$160 \cdot 10^{-3}$	>99
2	2-Desoxy- D-Glucose		3,5-Dideoxy-3-fluor-D- <i>arabino</i> -D- <i>glycero</i> - nonulosonsäure		$31 \cdot 10^{-3}$	97
3	D-Mannose		3-Desoxy-3-fluor-D- <i>glycero</i> -D- <i>galacto</i> - nonulosonsäure		$24 \cdot 10^{-3}$	>99
4	2-Desoxy- D-Galactose		3,5-Dideoxy-3-fluor-D- <i>lyxo</i> -D- <i>glycero</i> - nonulosonsäure		$14 \cdot 10^{-3}$	>99
5	D-Lyxose		3-Desoxy-3-fluor-D- <i>galacto</i> -octulosonsäure		$3,4 \cdot 10^{-3}$	>99
6	D-Talose		3-Desoxy-3-fluor-D- <i>glycero</i> -L- <i>altro</i> - nonulosonsäure		$2,5 \cdot 10^{-3}$	>99
7	L-Rhamnose		3,9-Dideoxy-3-fluor-L- <i>glycero</i> -L- <i>galacto</i> - nonulosonsäure (a <sup>1</sup> ), 3,9-Dideoxy-3-fluor- L- <i>glycero</i> -D- <i>talo</i> -nonulosonsäure (b <sup>2</sup> )		$1,9 \cdot 10^{-3}$	>99
8	D-Arabinose		3-Desoxy-3-fluor-D- <i>manno</i> -octulosonsäure (a), 3-Desoxy-3-fluor-D- <i>gluco</i> -octuloson- säure (b)		$1,6 \cdot 10^{-3}$	>98
9	L-Xylose		3-Desoxy-3-fluor-L- <i>gulo</i> -octulosonsäure (a), 3-Desoxy-3-fluor-L- <i>ido</i> -octulosonsäure (b)		$1,5 \cdot 10^{-3}$	90
10	D-Fucose		3,9-Dideoxy-3-fluor-D- <i>glycero</i> -L- <i>manno</i> - nonulosonsäure		$0,62 \cdot 10^{-3}$	49

						
11	D-Galactose		3-Desoxy-3-fluor-D-glycero-L-manno- nonulosonsäure		$0,44 \cdot 10^{-3}$	96
12	D-Ribose		3-Desoxy-3-fluor-D-altrio-ulosonsäure (a) 3-Desoxy-3-fluor-D-allo-ulosonsäure (b)		$0,14 \cdot 10^{-3}$	66

<sup>1</sup> a bezeichnet die Verbindung mit equatorialständiger OH-Gruppe in 4 Position  
<sup>2</sup> b bezeichnet die Verbindung mit axialständiger OH-Gruppe in 4 Position

**Tabelle 3-4:** Reaktionen verschiedener Zucker mit F-Pyr zu F-Neuraminsäurederivaten

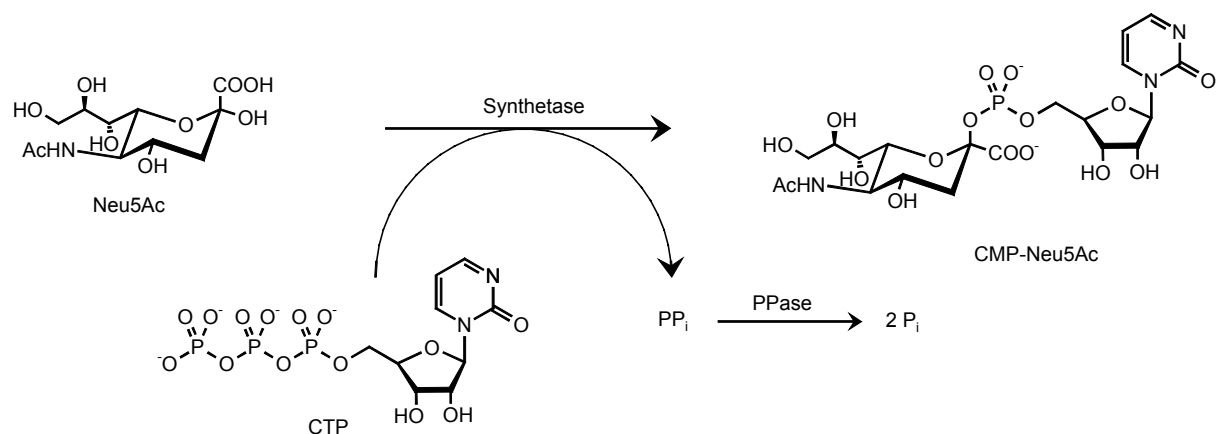
### 3.3 Aktivierung der Neu5Ac3F zu CMP-Neu5Ac3F

Der nächste Schritt auf dem Weg zur Addition der Neu5Ac3F an ein Oligosaccharid ist die Aktivierung zu CMP-Neu5Ac3F. Obwohl dieser Schritt für etliche Neuraminsäurederivate beschrieben ist<sup>85</sup>, hat bislang niemand Neu5Ac3F mit diesem Enzym umgesetzt. Aus dem Arbeitskreis Wong wird von dem vergeblichen Versuch berichtet, die in Abbildung 3-3 dargestellte Neu5Ac7epi3F mit einer Synthetase aus einem genetisch verändertem *E. coli* umzusetzen<sup>86</sup>. Die Ursache für dieses Scheitern mag aber darin liegen, dass die Hydroxylfunktion an C-7, wie in Kapitel 3.1 erwähnt, für die Umsetzung mit Synthetase von Bedeutung ist.

So war also erstmalig die Frage zu klären, ob die hier hergestellte Neu5Ac3F mit Hilfe der Synthetase, nach dem in Abbildung 3-20 dargestellten Schema für die Synthese von CMP-Neu5Ac, zu CMP-Neu5Ac3F umgesetzt werden kann.

<sup>85</sup> Liu, J. L.-C., Shen, G.-J., Ichikawa, Y., Rutan, J. F., Zapata, G., Vann, W. F., Wong, C.H., Overproduction of CMP-Sialic Acid Synthetase of Organic Synthesis; *J. Am. Chem. Soc.*; **1992**, *114*, 3901-3910, Zbiral E., Schreiner E., Christian R. Synthesis of the 4-Acetamido-4-deoxy Analogue of N-Acetylneuraminic Acid and its Behaviour Towards CMP-Sialate Synthase; *Carbohydr. Res.*, **1989**, *194*, c15-c18; Petrie, C.R., Sharma, M., Simmons, O.D., Korytnyk, W., Synthesis of Analogues of N-acetylneuraminic acid and their effect on CMP-sialate Synthase, *Carbohydr. Res.*, **1989**, *186*, 326-334

<sup>86</sup> Burkhard, M.D., Vincent, S.P., Wong, C.-H., An efficient synthesis of CMP-3-fluoroneuraminic acid, *Chem. Commun.*, **1999**, 1525-1526



**Abbildung 3-20:** Synthetase-katalysierte Synthese von CMP-Neu5Ac

Das Enzym CMP-Neu5Ac-Synthetase setzt direkt die freie Neu5Ac in das  $\beta$ -konfigurierte Nukleosidmonophosphat um, ohne dabei, wie die Aktivierung anderer primärer Nukleotidzucker, über das Hexose-1-Phosphat zu gehen. Damit stellt diese Reaktion eine Ausnahme bei der Aktivierung der Zucker zu ihren entsprechenden Nukleotidzuckern dar. Die  $\beta$ -Konfiguration ist elektronisch bevorzugt. Durch das Fehlen einer Funktion an der C-3 Position gibt es keine Einflussmöglichkeiten der Stereochemie am anomeren Zentrum.

Das entstehende Pyrophosphat (PP<sub>i</sub>), das eine stark inhibierende Wirkung auf die Reaktion hat, wird in einer *in situ* Folgereaktion durch eine anorganische Pyrophosphatase (PPase) in *ortho*-Phosphat (P<sub>i</sub>) überführt.

### 3.3.1 Das Enzym CMP-Neu5Ac-Synthetase

Im Jahr 1959 berichteten *Comb et al.*<sup>87</sup> von der Entdeckung eines neuen Nukleotidzuckers, der Cytidinmonophosphat-*N*-acetylneuraminsäure (CMP-Neu5Ac). Die Verbindung wurde

<sup>87</sup> Comb, D.G., Shimizu, F., Roseman, S., Isolation of cytidine-5'-nono-phospho-*N*-acetylneuraminic acid, *J. Am. Chem. Soc.*, **1959**, *81*, 5513

aus den Zellen von *Escherichia coli* K-235 isoliert. 1966 folgte ebenfalls durch *Comb et al.*<sup>88</sup> die ausführliche Charakterisierung dieser CMP-Neu5Ac.

Die enzymatische Synthese von CMP-Neu5Ac wurde erstmals 1962 durch *Roseman* berichtet<sup>89</sup>, der eine Enzympräparation aus Schweineunterkieferdrüsen einsetzte und von *Warren et al.*, die eine Präparation aus *Neisseria meningitidis* verwendeten<sup>90</sup>.

Die CMP-Neu5Ac-Synthetase [E.C. 2.7.7.43] kann aus sehr unterschiedlichen Quellen gewonnen werden. Tabelle 3-5 zeigt die wichtigsten Quellen auf:

Tierische Zellen	Kalb, Ratte, Schaf	Hirn
	Ratte, Frosch, Maus, Schwein,	Leber
	Rind	Speicheldrüse
Mikroorganismen	<i>Neisseria meningitidis</i> Gruppe B, <i>Corynebakterium parvum</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Salmonella djakarta</i> , <i>Salmonella dahlem</i> , <i>Salmonella tovera</i> , <i>Streptococcus</i> Serotyp B, <i>Escherichia coli</i> K235, <i>Escherichia coli</i> Serotyp K1, <i>Actinomyces viscosus</i>	
Gentechnisch veränderte Mikroorganismen	<i>Escherichia coli</i>	

**Tabelle 3-5:** Quellen für die CMP-Neu5Ac-Synthetase [E.C. 2.7.7.43]<sup>91</sup>

Hier wurde das von *Portela* charakterisierte Enzym aus *E. coli* K235/CS1 eingesetzt<sup>92</sup>. Bei dem Organismus handelt es sich um eine bei Dr. M. Kittelmann von der Firma Novartis isolierte Mutante, die sich durch stabile und hohe Enzymproduktion auszeichnet. Da sich der Stamm vom *E. coli* Stamm K1 ableitet, handelt es sich um einen fakultativ pathogenen Organismus, wodurch die Fermentation und Aufarbeitung des Enzyms unter entsprechenden Sicherheitsmaßnahmen durchgeführt werden muss.

Die Serotypen von *E. coli* werden anhand der Antigen-Strukturen charakterisiert. Es gibt die O-, die H- und die K-Antigenstruktur. Die K-Antigene sind die Kapsel-Antigene, die sich in 80 Serotypen unterscheiden. Einige von ihnen haben bestimmte Virulenzeigenschaften. Stämme mit dem K1 Antigen werden hauptsächlich bei Blutvergiftungen (Sepsis) und Hirnhautentzündungen (Meningitis) von Neugeborenen und Säuglingen gefunden. *E. coli*

<sup>88</sup> Comb, D.G., Watson, D.R., Roseman, S., The sialic acids: IX. Isolation of cytidine-5'-monophospho-*N*-acetylneuraminic acid from *Escherichia coli* K 235, *J. Biol. Chem.*, **1966**, *241*, 5637-5642

<sup>89</sup> Roseman, S., Enzymatic synthesis of cytidine-5'-monophospho-sialic acids, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1962**, *48*, 437-441

<sup>90</sup> Warren, L., Blacklow, R.S., Biosynthesis of *N*-acetylneuraminic acid and cytidine-5'-monophospho-*N*-acetylneuraminic acid in *Neisseria meningitidis*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1962**, *7*, 433-438

<sup>91</sup> Shoyab, M., Bachhawat, B.K., Purification and properties of the CMP-*N*-acetylneuraminic acid synthesizing enzyme from sheep brain, *J. Neurochem.*, **1964**, *11*, 639-646 ; Van den Eijnden, D.H., Meems, L., Roukema, P.A. The regional distribution of the cytidine-5'-monophospho-*N*-acetylneuraminic acid synthetase in calf brain, *J. Neurochem.*, **1972**, *19*, 1649-1658 ; Hultsch, E., Reutter, W., Decker, K., Conversion of *N*-acetylglucosamin to CMP-*N*-acetylneuraminic acid in a cell-free system of rat liver, *Biochim. Biophys. Acta*, **1972**, *237*, 132-140; Scheuer, R., Haverkamp, J., Ehrlich, K., Isolation and characterization of acetylneuraminic acid cytidyltransferase from frog-liver, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **1980**, *361*, 641-648

<sup>92</sup> Portela Klein, M.T.S., Enzymkatalysierte Herstellung von Cytidinmonophosphat *N*-Acetylneuraminsäure aus *Escherichia coli* (K 235/CS1), Dissertation Universität Bonn, **1994**

Kulturen, die das K1 Antigen besitzen, produzieren Kolominsäure, ein Homopolymer aus  $\alpha(2-8)$  verknüpften Sialinsäuren<sup>93</sup>. Wie in Kapitel 1.3.1 bereits erwähnt, haben diese Sialylierungen eine Bedeutung in der Pathogenese für die Besiedlung der Hirnhaut<sup>94</sup>.

### 3.3.2 Gewinnung des Enzyms CMP-Neu5Ac-Synthetase

Die Fermentation des *E.coli* K 235/CS1 wurde im Technikum des IBT2 von H. Paschold im 200 l Maßstab durchgeführt. Nach der Zellseparation wurde die Zellmasse im Homogenisator von H. Gieren aufgeschlossen.

Die Isolierung des Enzyms erfolgte nach der von *Portela* ausgearbeiteten Methode durch zwei Extraktionsschritte in einem Zweiphasensystem aus 1550 PEG/Na-Citrat und einer anschließenden Entsalzung des so erhaltenen Enzymkonzentrats durch Diafiltration über ein Cross-Flow-Modul. Diese Methode liefert die Synthetase in Gesellschaft mit anderen Proteinen, die jedoch keine störenden Nebenaktivitäten zeigen. Aus 2 l Zellhomogenat wurden 340 U Synthetase in 1 l Lösung gewonnen.

Die Aktivitätsmessungen wurden, soweit nicht anders erwähnt, nach folgendem Standardassay durchgeführt:

---

Trispuffer	125 mM, pH 9,3
T	30°C
DTT	1 mM
Mg <sup>2+</sup>	40 mM
CTP	3 mM
Neu5Ac	17 mM

**Tabelle 3-6:** Standardassay zur Aktivitätsmessung der Synthetase

---

Zur Bestimmung der Aktivität wurde eine Analytikmethode auf der Kapillarelektrophorese nach einer Methode von *Engelhard et al.*<sup>95</sup> erarbeitet und etabliert. Die Methode zeigte

- eine gute Reproduzierbarkeit,
- eine gute Trennung von CMP, CDP, CTP, CMP-Neu5Ac,
- die Detektion und Trennung von Neu5Ac,
- eine Trennung beider Neu5Ac3F Derivate,
- eine kurze Analysenzeit von 9 min.

Die im folgenden beschriebenen Messungen wurden mit dieser Analytik durchgeführt.

---

<sup>93</sup> Kundig, F.D., Aminoff, D., Roseman, S., The Sialic Acids: Synthesis of colomononic acid by a sialyltransferase from *Escherichia coli* K-235, *J. Biol. Chem.*, **1971**, *246*, 2543-2550

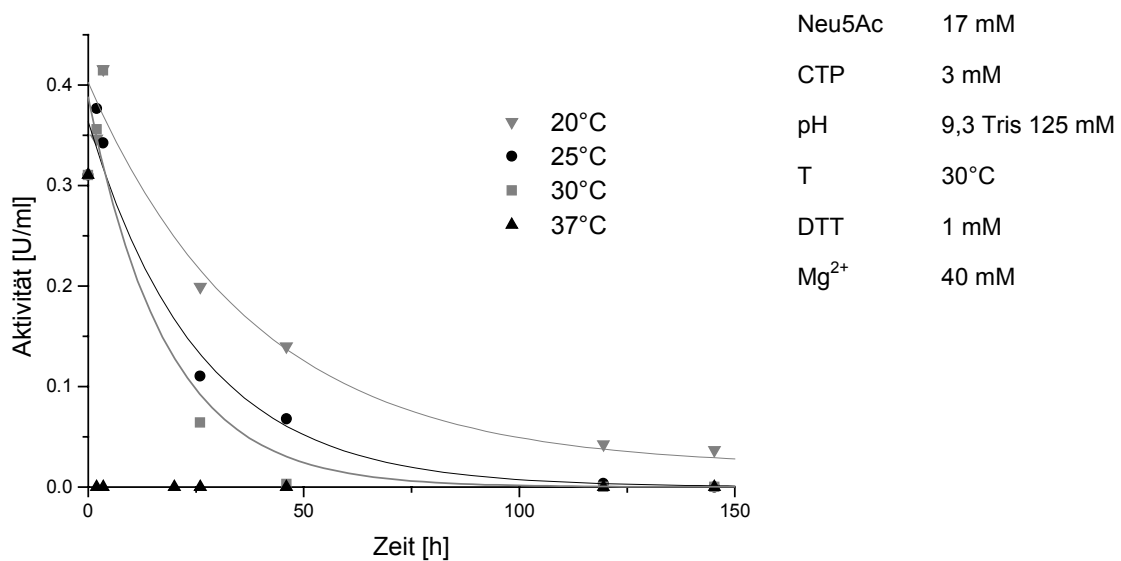
<sup>94</sup> Troy, F.A., Polysialylation: from bacteria to brains, *Glycobiology*, **1992**, *2*, 5-23

<sup>95</sup> Engelhard, H., Beck, W., Schmidt, T., Kapillarelektrophorese: Methoden und Möglichkeiten, *Angew. Chem.*, **1993**, *105*, 659-804

Da die Bedingungen der Fermentation nicht vergleichbar mit denen nach *Portela* waren, wurden zuerst einige Messungen zur Stabilität und zum pH-Aktivitätsmaximum des Enzyms durchgeführt. Außerdem wurde der Einfluss der Magnesium- und der Phosphatkonzentration bestimmt, da diese Größen bei *Portela* keine Berücksichtigung fanden.

### 3.3.2.1 Stabilitätsmessungen

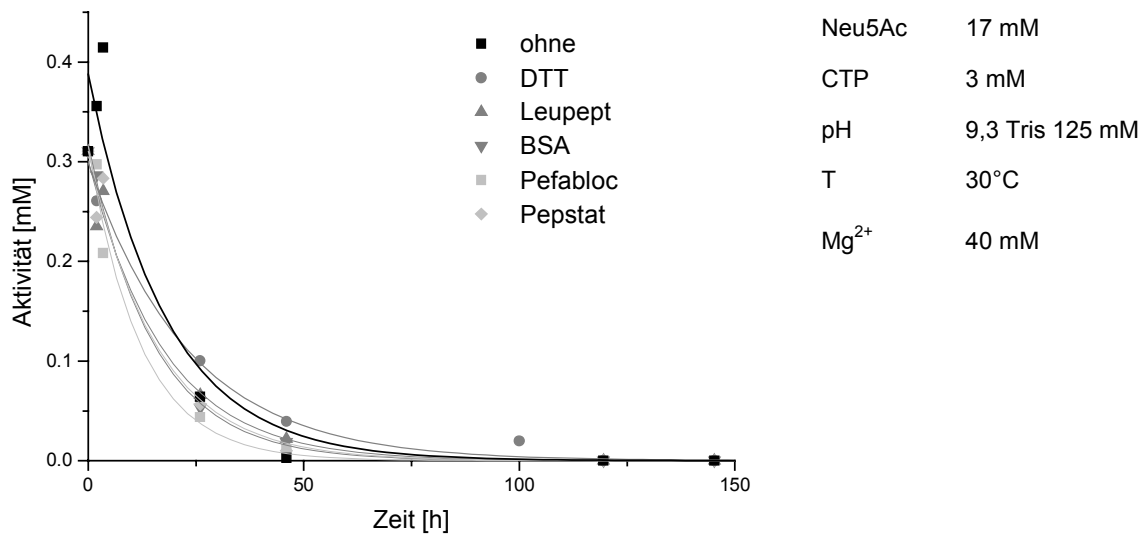
Zunächst wurden Messungen zu Bestimmung der thermischen Stabilität des Enzyms durchgeführt, wie in Abbildung 3-21 gezeigt.



**Abbildung 3-21:** Desaktivierung der Synthetase in Abhängigkeit von der Temperatur

Die Synthetase zeigt einen markanten Mangel an Stabilität unter Reaktionsbedingungen (30°C). Daher wurden verschiedene Versuche zur Stabilisierung des Enzyms unternommen. Die in Abbildung 3-22 gezeigten Versuche zur Stabilisierung des Enzyms durch verschiedene proteinstabilisierende Zusätze bzw. Proteaseinhibitoren lassen jedoch keine signifikante Wirkung erkennen.





**Abbildung 3-22:** Versuche zur Stabilisierung der Synthetase

Die Ursache für diese Destabilität könnte darin liegen, dass das Enzym nicht in isolierter Form vorliegt, sondern in einer nicht definierten Protein Fraktion, die außerdem noch weitere niedermolekulare Verbindungen aus dem Mikroorganismus enthält. Möglicherweise enthält dieses Gemisch Proteasen in größeren Mengen, so dass auch ein Einsatz von Proteaseinhibitoren den Abbau des Enzyms nicht verhindern kann.

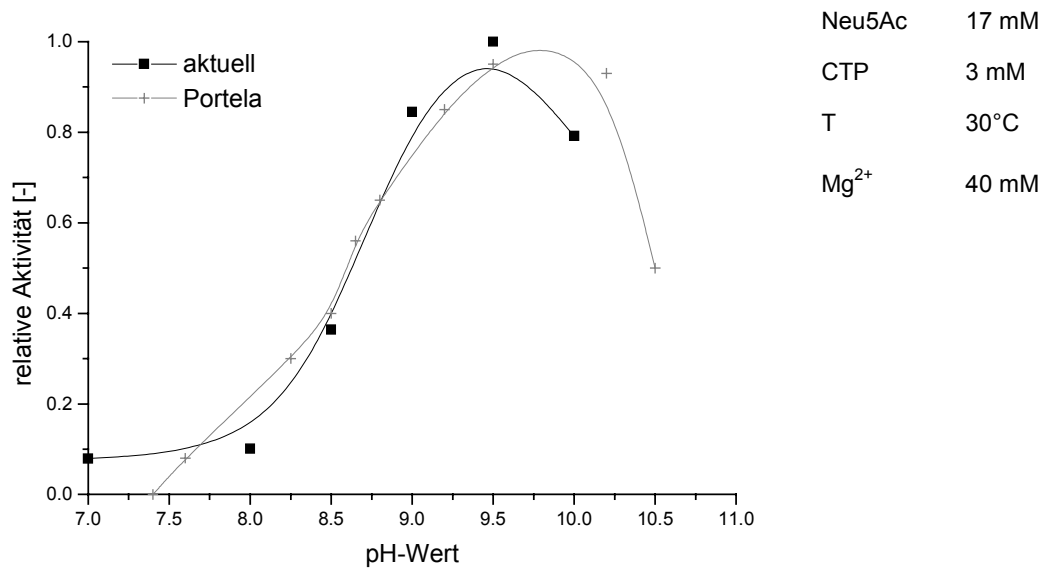
### 3.3.2.2 Stabilisierung durch Lyophilisierung

Diese Destabilität stellt auch ein Problem bei der Lagerung der Enzymlösung dar. Um die Aktivität zu konservieren ist eine Aufbewahrung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  erforderlich. Daher wurde der Versuch zur Lyophilisierung des Enzyms unternommen. Es wurden 18 mg Lyophilisat je 1 ml Enzymlösung mit einer Aktivität von 0,022 U/mg erhalten. Die Aktivität bleibt durch die Lyophilisierung vollständig erhalten. Außerdem ist das Lyophilisat über einen Zeitraum von einer Woche bei Raumtemperatur absolut stabil. Ein weiterer Vorteil der Verwendung eines Lyophilisates ist, dass sich die Handhabung des Enzyms in der Versuchsvorbereitung besser vereinheitlichen lässt, im Gegensatz zu schwer reproduzierbaren Auftauprozeduren.

Für die weiteren Versuche wurde das Enzymlyophilisat eingesetzt, dass auf die Ausgangskonzentration verdünnt wurde. Die im Folgenden weiterverwendete Aktivitätsangabe in U/ml bezieht sich auf diese Ausgangskonzentration von 18 mg/ml.

### 3.3.2.3 pH-Abhängigkeit der Aktivität

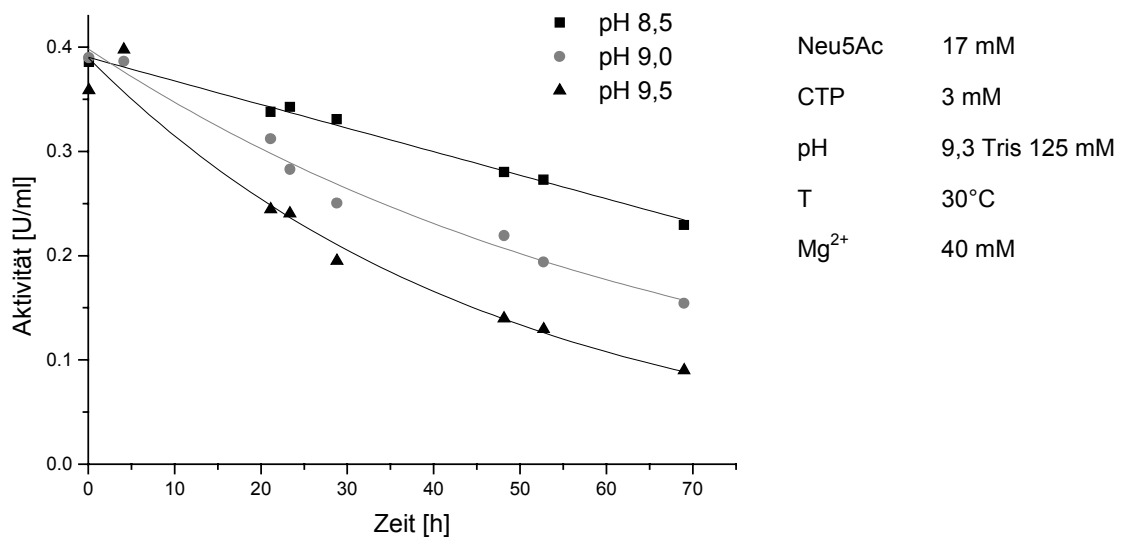
Die Aktivität des Enzyms in Abhängigkeit vom pH-Wert ist in Abbildung 3-23 gezeigt.



**Abbildung 3-23:** Aktivität der Synthetase in Abhängigkeit vom pH-Wert im Vergleich mit den relativen Ergebnissen von T. Portella

Ein Vergleich mit den Ergebnissen von *Portela* zeigt eine geringfügige Verschiebung des pH-Aktivitätsmaximums von 9,8 auf 9,4.

In Abbildung 3-24 ist die Abhängigkeit der Desaktivierung vom pH-Wert dargestellt.



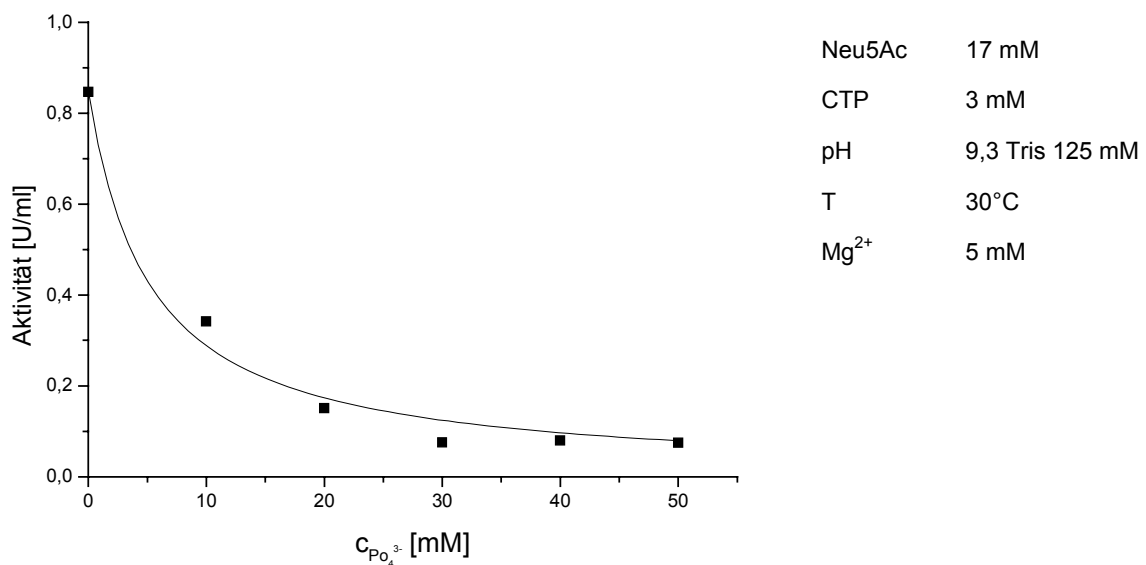
**Abbildung 3-24:** Desaktivierung der Synthetase in Abhängigkeit vom pH-Wert

Wie zu erwarten nimmt die Desaktivierung mit steigendem pH-Wert deutlich zu. Beim pH-Aktivitätsmaximum von etwa 9,5 verliert die Synthetase innerhalb von 32 Stunden die Hälfte ihrer Aktivität.

Dieser Versuch zeigt aber auch, dass die Stabilität im Vergleich zu den Versuchen vor der Lyophilisierung (s. Abbildung 3-21 bei 30°C) des Enzyms stark zugenommen hat.

### 3.3.2.4 Abhängigkeit der Aktivität von $Mg^{2+}$ und Phosphat

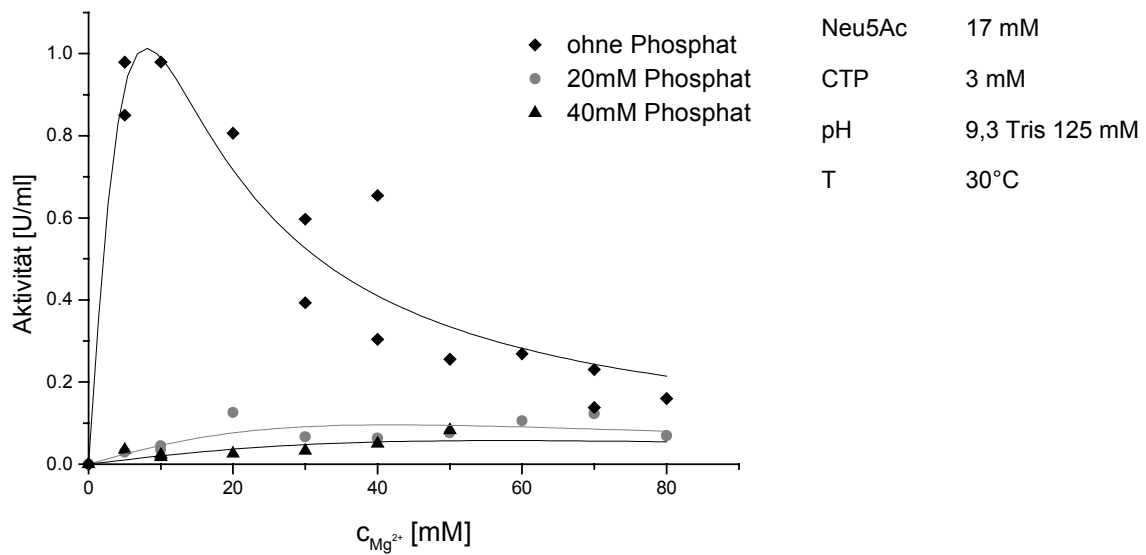
Das Enzym ist von zweiwertigen Metallkationen abhängig. Dabei liefert Magnesium die beste Aktivität<sup>96</sup>. Während der Reaktion entstehen, wie in Abbildung 3-20 zu sehen, durch die Zersetzung von Pyrophosphat durch die anorganische Pyrophosphatase zwei Äquivalente Phosphat. Dieses bildet mit Magnesium bei alkalischen pH-Werten allmählich einen schwerlöslichen Niederschlag  $Mg_3(PO_4)_2$ . So wird dem Enzym das Magnesium entzogen. In Abbildung 3-25 ist die Aktivität der Synthetase in Abhängigkeit von der Phosphatkonzentration gezeigt.



**Abbildung 3-25:** Aktivität der Synthetase in Abhängigkeit von der Phosphatkonzentration

Der Aktivitätsverlust ist dem, von *Portela* gemessenen Verlust durch die Inhibierung durch Pyrophosphat durchaus vergleichbar. Um zu untersuchen, ob dieser Effekt durch eine erhöhte Dosierung von Magnesium kompensiert werden kann, wurde, wie in Abbildung 3-26 gezeigt, die Aktivität der Synthetase in Abhängigkeit von der Magnesiumkonzentration bei verschiedenen Phosphatkonzentrationen gemessen.

<sup>96</sup> Portela Klein, M.T.S., Enzymkatalysierte Herstellung von Cytidinmonophosphat *N*-Acetylneuraminsäure aus *Escherichia coli* (K 235/CS1), Dissertation Universität Bonn, 1994



**Abbildung 3-26:** Enzymaktivität der Synthetase bei verschiedenen Phosphatkonzentrationen in Abhängigkeit von der Magnesiumionenkonzentration

In Abwesenheit von Phosphat zeigt sich bei Magnesiumkonzentrationen oberhalb 10 mM eine Inhibierung der Reaktion mit der Charakteristik einer Überschussinhibierung. Der Zusatz von 20 mM und 40 mM Phosphat, Konzentrationen, die bei den hier gewählten Bedingungen bei fortschreitendem Umsatz erreicht werden, bedingt eine gravierende Verminderung der Aktivität. Die Versuche weisen eine hohe Streuung auf und Probleme bei der Reproduzierbarkeit. Das mag damit zusammenhängen, dass die Ausfällung des Magnesiumphosphats ein langsamer Prozess ist, so dass nicht sichergestellt ist, dass die Ausfällung jeweils vollständig abgeschlossen ist.

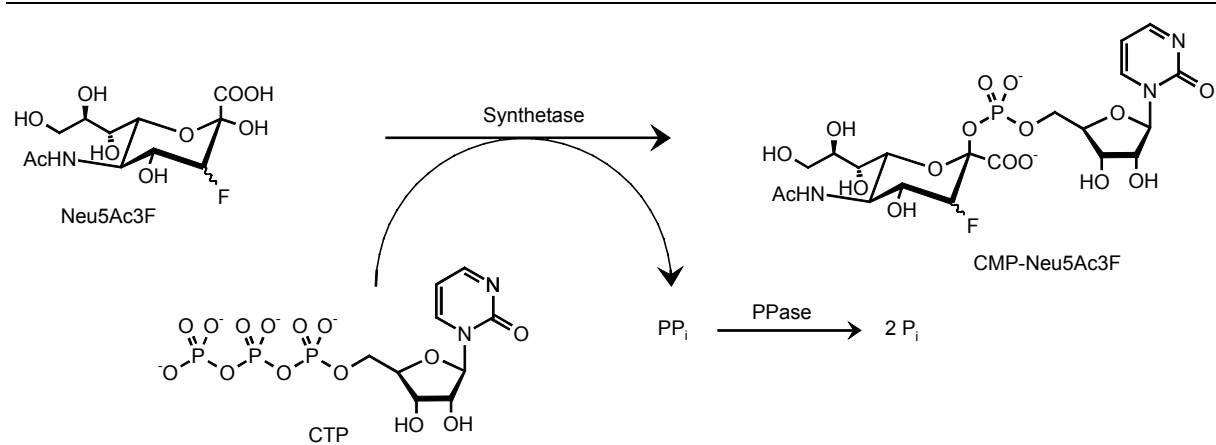
Die Charakteristik der Kurve mit Phosphat entspricht nicht mehr einer Überschussinhibierung. Diese Messung macht deutlich, dass die Inhibierung des Enzyms durch Phosphat nicht allein auf den Entzug des Magnesiums zurückzuführen ist, da sonst die Aktivität in Anwesenheit von Phosphat bei Erreichen der 3/2-fachen Magnesiumkonzentration (nach der Summenformel  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$  ist dann mehr Magnesium vorhanden als ausgefällt werden kann) einen ähnlichen Verlauf wie die Messung ohne Phosphat zeigen sollte.

Trotz dieses starken inhibierenden Einflusses des Phosphats hat sich im Batchversuch gezeigt, dass die Zersetzung von Pyrophosphat zu Phosphat sinnvoll ist, da die Reaktionsgeschwindigkeit bei Zugabe der Pyrophosphatase bei fortgeschrittener Reaktion wieder leicht ansteigt.

Da die Batchversuche über Zeiträume von vielen Stunden laufen, ist davon auszugehen, dass die Ausfällung des Magnesiumphosphats dort einen gravierenderen Effekt zeigt. Deshalb wird in Intervallen Magnesium nachdosiert.

### 3.3.3 Darstellung von CMP-Fluorneuraminsäure

In Abbildung 3-27 ist das Schema für die zu untersuchende Synthese von CMP-Neu5Ac3F abgebildet.



**Abbildung 3-27:** Enzymatische Synthese von CMP-Neu5Ac3F aus Neu5Ac3F und CTP

Es stellen sich zwei zentrale Fragen:

1. Akzeptiert die Synthetase Neu5Ac3F als Substrat?
2. Wird zwischen den Epimeren unterschieden?

Unter Standardbedingungen wurde die Aktivität der Synthetase für die Umsetzung von Neu5Ac und die beiden Epimere der Neu5Ac3F zum jeweiligen CMP-Neuraminsäurederivat bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-7 zusammengefasst.

Substrat	Aktivität [U/ml]	relative Aktivität [%]
	0.36	100
	0.047	13
	n.d.	<<1

**Tabelle 3-7:** Vergleichende Aktivitätsmessung der Synthetase für die Substrate Neu5Ac, Neu5Ac3F<sub>axial</sub> und Neu5Ac3F<sub>equatorial</sub>

Hier kann erstmalig die Synthese von CMP-Neu5Ac3F durchgeführt werden. Diese Verbindung ist bislang weder chemisch, noch enzymatisch dargestellt worden.

Neu5Ac3F<sub>axial</sub> wird mit einer relativen Aktivität von 13 % umgesetzt. Diese verhältnismäßig hohe Aktivität erschließt den Weg zu einer präparativen Synthese.

In Analogie der Experimente von Petrie<sup>97</sup> mit der Synthetase aus Pferde-Unterkieferdrüse (s. Kapitel 3.1) konnte mit der Synthetase aus *E. coli* für Neu5Ac3F<sub>equatorial</sub> keine Umsetzung beobachtet werden. Allerdings scheint dieses Epimer eine nicht quantifizierte inhibierende Wirkung auf die Synthetase zu haben.

### 3.3.3.1 Kinetische Messungen

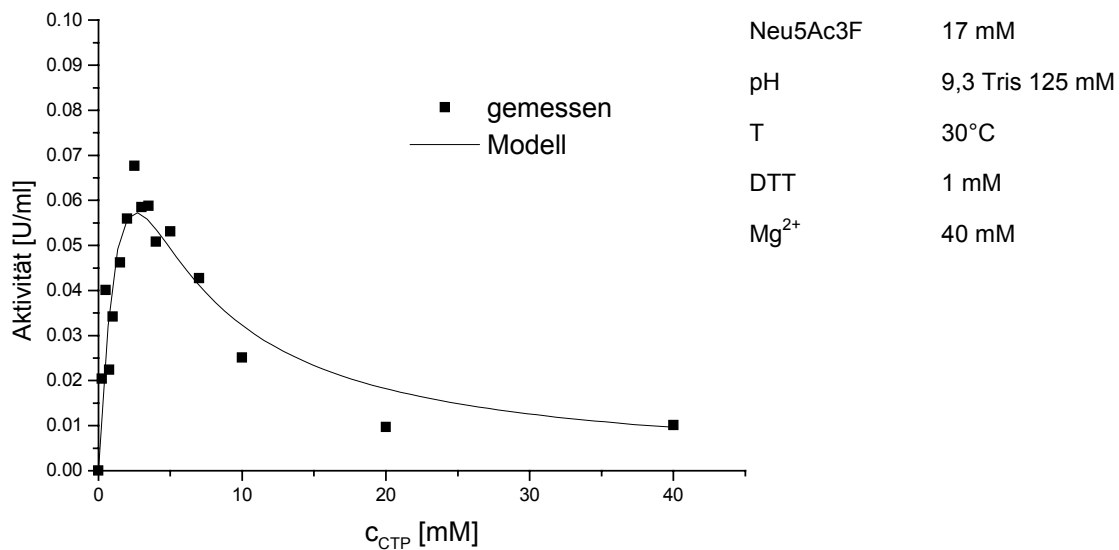
Für dieses System wurden diejenigen kinetischen Parameter bestimmt, die für die Wahl günstiger Reaktionsbedingungen für eine präparative Synthese von Bedeutung sind. Es ging dabei nicht um die vollständige Erfassung der Reaktionscharakteristik.

Nach der von *Portela* für die CMP-Neu5Ac Synthese erstellten Kinetik lässt sich die Reaktion durch eine Michaelis-Menten Doppelsubstratkinetik mit Substratüberschubinhibition durch CTP beschreiben. Der Einfluss der Produktbildung wird durch eine kompetitive Hemmung des Pyrophosphats gegenüber CTP beherrscht. Durch den Einsatz der anorganischen Pyrophosphatase kann das Pyrophosphat jedoch zu Phosphat abgebaut werden. Für CMP-Neu5Ac wurde keine Produktinhibition gemessen. Im Gleichgewicht der Reaktion liegen weitestgehend die Produkte vor, was unter anderem durch den hohen Energieverbrauch der Bildung von CTP bedingt ist<sup>98</sup>. Zusätzlich wird durch die Pyrophosphatase ein Produkt dem Gleichgewicht entzogen.

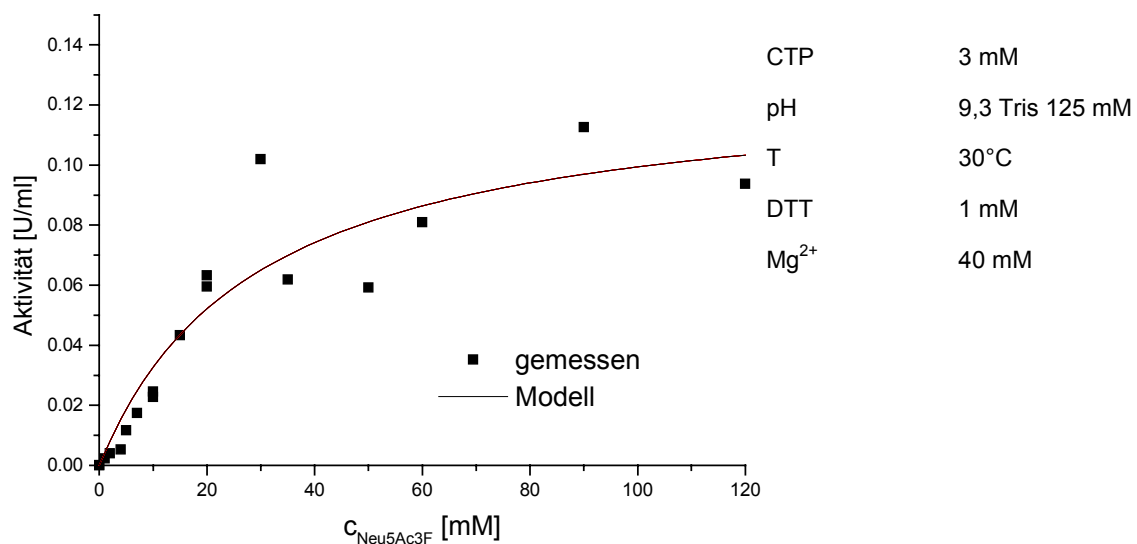
Für die Wahl der Reaktionsbedingungen sind die Größen  $v_{\max}$ ,  $k_{m(\text{Neu5Ac3F})}$ ,  $k_{m(\text{CTP})}$  und  $k_{i(\text{CTP})}$  wesentlich. Dazu wurde die Aktivität des Enzyms, wie in Abbildung 3-28 dargestellt, in Abhängigkeit von der CTP-Konzentration und in Abbildung 3-29 in Abhängigkeit von der Neu5Ac3F-Konzentration gemessen.

<sup>97</sup> Petrie, C.R., Sharma, M., Simmons, O.D., Korytnyk, W., Synthesis of Analogues of *N*-acetylneuraminic acid and their effect on CMP-sialate synthase, *Carbohydr. Res.*, **1989**, *186*, 326-334

<sup>98</sup> Karlson, P., *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler*, Thieme Verlag, New York, **1988**



**Abbildung 3-28:** Enzymaktivität der Synthetase in Abhängigkeit von der CTP-Konzentration, (▪) Messwerte, (—) berechnet nach Modell aus Gleichung 3-5



**Abbildung 3-29:** Enzymaktivität der Synthetase in Abhängigkeit von der Neu5Ac3F-Konzentration, (▪) Messwerte, (—) berechnet nach Modell aus Gleichung 3-5

Aus diesen Messungen lassen sich aus der in Gleichung 3-5 beschriebenen Michaelis-Menten Doppelsubstratkinetik mit Substratüberschußinhibition die Größen  $v_{max}$ ,  $k_{m(\text{Neu5Ac3F})}$ ,  $k_{m(\text{CTP})}$  und  $k_{i(\text{CTP})}$  berechnen.

$$v = \frac{[E]^{Syn} \cdot c_{(Neu5Ac3F)} \cdot c_{(CTP)} \cdot v_{max}}{\left( c_{(Neu5Ac3F)} + k_{m(Neu5Ac3F)} \right) \cdot \left( c_{(CTP)} + \frac{c_{(CTP)}^2}{k_{i(CTP)}} + k_{m(CTP)} \right)}$$

**Gleichung 3-5:**

$$v_{max} = 0,61 \pm 0,08 \text{ U/ml}$$

$$c_{(Neu5Ac3F)} \text{ [mM]} \quad k_{m(Neu5Ac3F)} = 29 \pm 9 \text{ mM}$$

$$c_{(CTP)} \text{ [mM]} \quad k_{m(CTP)} = 3,8 \pm 0,5 \text{ mM} \quad k_{i(CTP)} = 1,8 \pm 0,2 \text{ mM}$$

Ein Vergleich mit den von *Portela* bestimmten kinetischen Parametern für Neu5Ac ist in Tabelle 3-8 aufgeführt. Da es sich bei dieser Arbeit um eine andere Enzympräparation handelt als bei *Portela*, ist ein Vergleich der  $v_{max}$  Werte nicht sinnvoll. Daher wird die in Tabelle 3-7 ermittelte Aktivität von 13% in Relation zum Standardreaktionssystem mit Neu5Ac im Standardassay (Tabelle 3-6) herangezogen. Das entspricht einer Aktivität von 0,047 U/ml bzw. von  $2,6 \cdot 10^{-3}$  U/mg der Synthetase für die Synthese von CMP-Neu5Ac3F.

Neu5Ac		Neu5Ac3F	
relative Aktivität <sup>1</sup>	1	relative Aktivität <sup>1</sup>	0,13
$k_{m(Neu5Ac)}^2$	4,85 ± 0,16 mM	$k_{m(Neu5Ac3F)}^1$	29 ± 9 mM
$k_{m(CTP)}^2$	22,1 ± 0,4 mM	$k_{m(CTP)}^1$	3,8 ± 0,5 mM
$k_{i(CTP)}^2$	6,5 ± 0,1 mM	$k_{i(CTP)}^1$	1,8 ± 0,2 mM

<sup>1</sup> gemessen in dieser Arbeit

<sup>2</sup> gemessen von *Portela*

**Tabelle 3-8:** Vergleich der kinetischen Parameter der Synthetasereaktion von Neu5Ac und Neu5Ac3F

Der  $k_m$ -Wert für Neu5Ac3F ist etwa sechs mal so groß wie für Neu5Ac. Die Aktivität sinkt mit 13% in der gleichen Größenordnung auf etwas weniger als ein siebtel. Der  $k_m$ -Wert und der  $k_i$ -Wert für CTP weisen eine deutliche Verschiebung in einen niedrigeren Bereich auf. Durch den kleinen  $k_i$ -Wert ist der Wert für  $v_{max}$  nur ein theoretischer Wert, da lange vor Erreichen der notwendigen CTP-Konzentration die Inhibierung stark einsetzt und  $v_{max}$  somit nicht erreicht werden kann. Diese starke Inhibierung ist von Bedeutung für die präparative Synthese von CMP-Neu5Ac3F. So empfiehlt es sich, das CTP nicht in voller Konzentration vorzulegen, sondern dosiert einzusetzen. Dieses Vorgehen ist auch ohne dies sinnvoll, da das CTP außerdem bei dem hohen pH-Wert in der Reaktionslösung über die Zeit zersetzt wird.



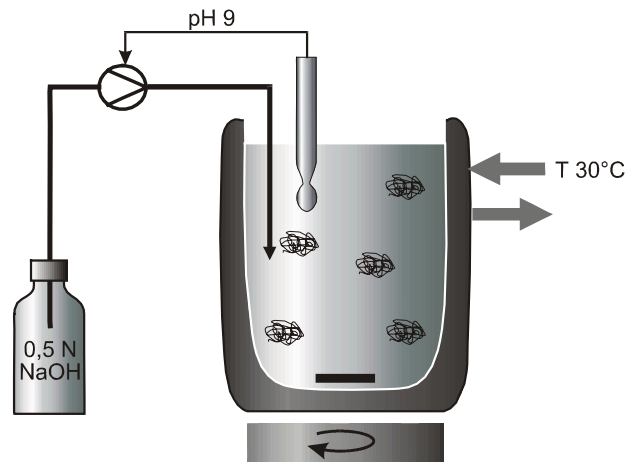
### 3.3.3.2 Präparative Synthese

Obwohl die Messungen zum pH-Aktivitätsmaximum gezeigt haben, dass die maximale Aktivität bei einem pH-Wert von ca. 9,5 liegt, wird für die präparative Synthese der etwas niedrigere Wert von 9 gewählt, bei dem die relative Aktivität bei ca. 85% liegt. Der Grund dafür liegt in der Stabilität des Enzyms und der Reaktionskomponenten. Vor allem aber haben die Voruntersuchungen gezeigt, dass bei einem pH-Wert von über 9 große Niederschlagsmengen ausfallen. Dabei handelt es sich wahrscheinlich zum größten Teil um denaturiertes Protein, aber auch um Magnesiumsalze. Dieser Niederschlag scheint außerdem Teile der Reaktionskomponenten mitzureißen, wodurch die Messungen nicht mehr reproduzierbar sind und außerdem Produkt verloren geht.

Die Bedingungen für die präparative Synthese werden wie folgt gewählt:

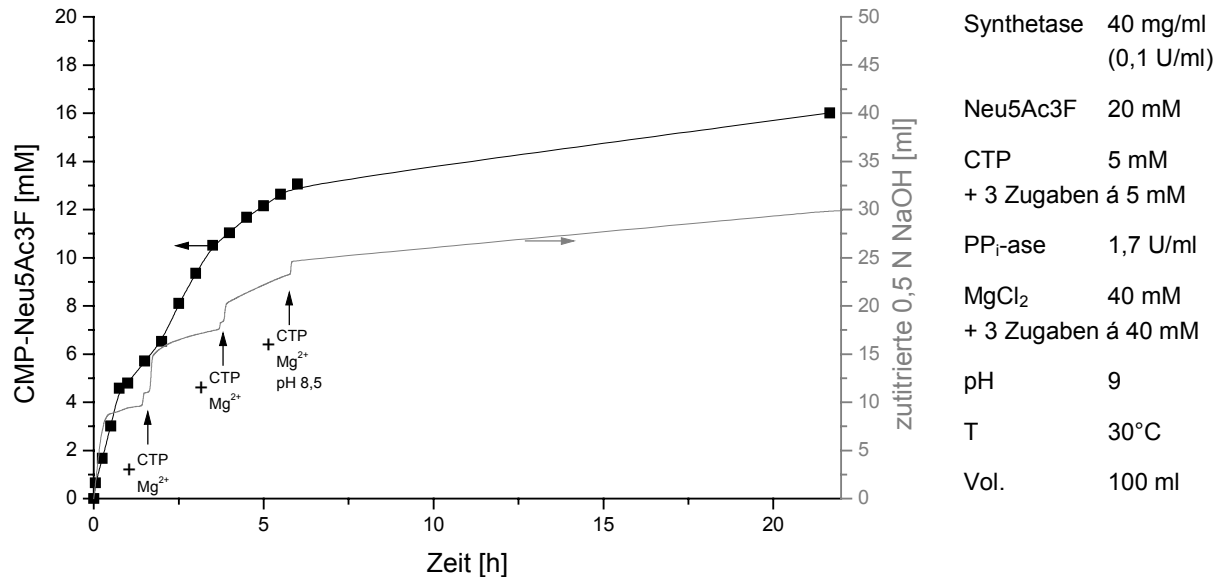
- Die Reaktion wird in einem auf 30°C temperierten Doppelmantelsatzreaktor aus Glas durchgeführt, der mittels eines Magnetrührers durchmischt wird (Abbildung 3-30).
- Durch die Bildung von Pyrophosphat bzw. Phosphat während der Reaktion, sinkt der pH-Wert kontinuierlich ab. Wegen dieses pH-Shifts wird der pH-Wert durch Zugabe von 0,5 N NaOH über einen Dosimaten, gekoppelt an eine pH-Elektrode, auf pH 9 geregelt.
- Neu5Ac3F wird in einer Konzentration von 20 mM eingesetzt. Diese Konzentration liegt knapp unter dem  $k_m$ -Wert, allerdings erscheinen höhere Konzentrationen nicht sinnvoll, da die Reaktionsgeschwindigkeit durch die Bildung von Phosphat während der Reaktion stark abnimmt (s. Abbildung 3-25).
- Aufgrund der Substratüberschußinhibierung und der Destabilität des CTP bei höheren pH-Werten, wird CTP in einer Konzentration von nur 5 mM vorgelegt und während der Reaktion nach Kontrolle des Umsatzes drei mal in gleicher Menge nachgegeben. Es wurde auch der Versuch unternommen, die CTP-Zugabe an die Dosierung der NaOH zu koppeln. Es stellte sich allerdings heraus, dass der pH-Wert der Reaktionslösung nicht ausschließlich durch die Freisetzung der Pyrophosphats bzw. des Phosphats beeinflusst wird, sondern darüber hinaus andere nicht quantifizierbare Faktoren, u.a. die Fällung von Magnesiumphosphat, den pH-Wert absinken lassen. So kam es zu einem übermäßigen Anstieg der CTP-Konzentration, womit dieser Ansatz nicht den gewünschten Effekt hatte und verworfen wurde.
- Magnesium wird in einer Konzentration von 40 mM vorgelegt und zusammen mit dem CTP ebenfalls drei mal in gleicher Menge nachgegeben. Beide Substanzen werden in Pulverform zugegeben. Dieses muss langsam erfolgen, da der pH-Wert sonst durch die leichte Verzögerung der pH-Regelung in den sauren Bereich absinken kann, was zu einer schnellen Zerstörung des Produktes und einem Überschwingen des pH-Wertes über pH 9 führen kann.
- Für die Zersetzung des Pyrophosphats zu Phosphat werden 1,7 U/ml anorganische Pyrophosphatase zugegeben.

- Die Synthese wird durch die Zugabe von 40 mg/ml Synthetase (17 U/ml bezogen auf das in Gleichung 3-5 ermittelte  $v_{\max}$  von 2,37 U/ml) gestartet.



**Abbildung 3-30:** Aufbau des Batchreaktors mit pH-Regelung zur Synthese von CMP-Neu5Ac3F

Der Umsatzverlauf der Synthese ist in Abbildung 3-31 dargestellt.



**Abbildung 3-31:** Präparative Synthese von CMP-Neu5Ac3F

Die Synthese der CMP-Neu5Ac3F wurde über einen Zeitraum von 22 Stunden bis zu einem Umsatz von 80% geführt. Das entspricht einer RZA von 11,1 g/(l\*d) und einem Enzymverbrauch von 10,26 U/g. Nach 6 Stunden wurde der pH-Wert auf 8,5 gesenkt, um eine Zersetzung des Produktes bei dem hohen pH-Wert über Nacht zu vermeiden.

### 3.3.3.3 Produktisolierung

Die Isolierung der CMP-Neu5Ac3F erfordert wiederum eine Säulenchromatographie. Obwohl Fällungsmethoden mit Ethanol und Methanol für CMP-Neu5Ac bekannt sind, kommt es dabei oft zu Schwierigkeiten und die Reinheit des Produktes ist nicht reproduzierbar<sup>99</sup>. Die Ursache dafür kann in der nicht definierten Zusammensetzung der Enzymfraktion liegen.

Zunächst werden die restlichen Nukleotidphosphate aus dem Reaktionsgemisch entfernt. Dazu werden nach Beendigung der Umsetzung dem Reaktionsgemisch 2 U/ml alkalische Phosphatase zugesetzt, die das restliche CTP und das durch Zersetzung entstandene CMP und CDP in Cytidin überführen. Diese Zersetzung ist nach einer Stunde abgeschlossen.

Der während der Umsetzung entstandene Niederschlag aus Proteinen und Salzen wird abzentrifugiert, anschließend werden die Enzyme über eine Amicon YM 10 Membran abfiltriert und verworfen. Eine Wiederverwendung der Enzyme ist nicht möglich, da die alkalische Phosphatase in einem Repetitive-Batch das als Edukt eingesetzte CTP sofort zersetzen würde. Außerdem ist der Aktivitätsverlust der Synthetase so beträchtlich, dass ein zweiter Einsatz nicht sinnvoll ist.

Da CMP-Neu5Ac nicht säurebeständig ist, kommt die zur Aufreinigung der Neu5Ac3F herangezogene Methode nicht in Frage, da die Elution dort über Ameisensäure erfolgt. Die Chromatographie über einen basischen Anionentauscher ist aber dennoch eine sehr gut geeignete Methode. Als alternative Eluenten kommen Ammoniumformiat, Natriumformiat und Natriumchlorid in Frage.

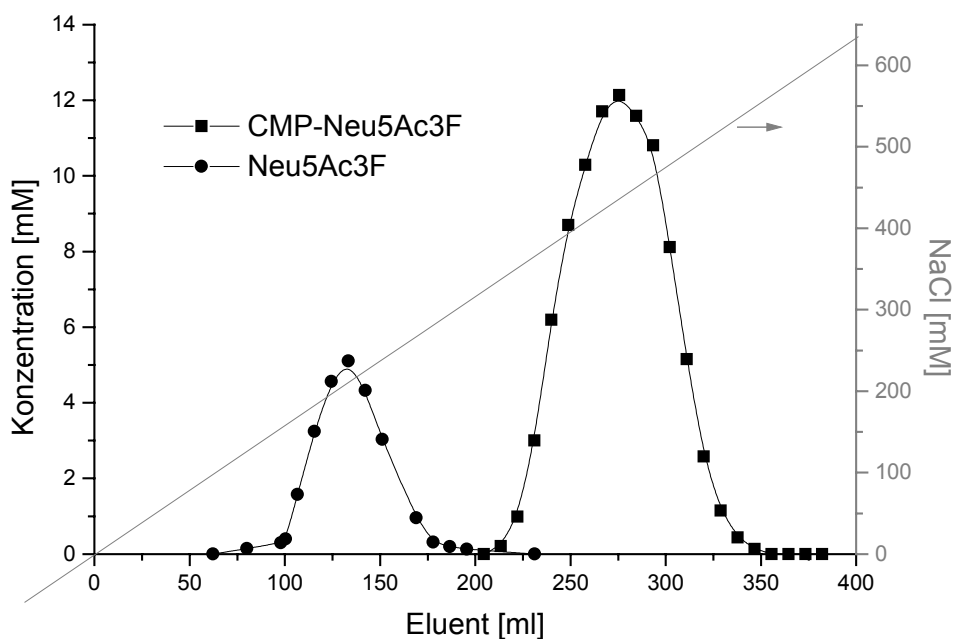
Es wurden Aufreinigungsversuche mit den Dowex-Harzen der Vernetzung 1x2 und 1x8 durchgeführt<sup>x</sup>. Das Harz Dowex 1x8 konnte die CMP-Neu5Ac3F in allen Fällen nicht binden. Mit Dowex 1x2 wurden hingegen zufriedenstellende Ergebnisse erzielt. Die optimierten Bedingungen für Dowex 1x2 sind in Tabelle 6-2 S. 140 gezeigt.

Cytidin bindet nicht an den Anionentauscher und wird so bei der Spülung mit Wasser ausgeschwemmt. Nach dem Start des NaCl Gradienten eluiert zuerst Neu5Ac3F und anschließend mit Grundlinientrennung CMP-Neu5Ac3F. Abbildung 3-32 zeigt den Verlauf der Säulenchromatographie.

---

<sup>99</sup> Doris Hahn, persönliche Mitteilung, 1998

<sup>x</sup> Bei diesen Harzen handelt es sich um quervernetzte Polystyrenharze. Die Bezeichnungen 1x2 und 1x8 geben Auskunft über den prozentualen Anteil der Vernetzung (2% bzw. 8%).

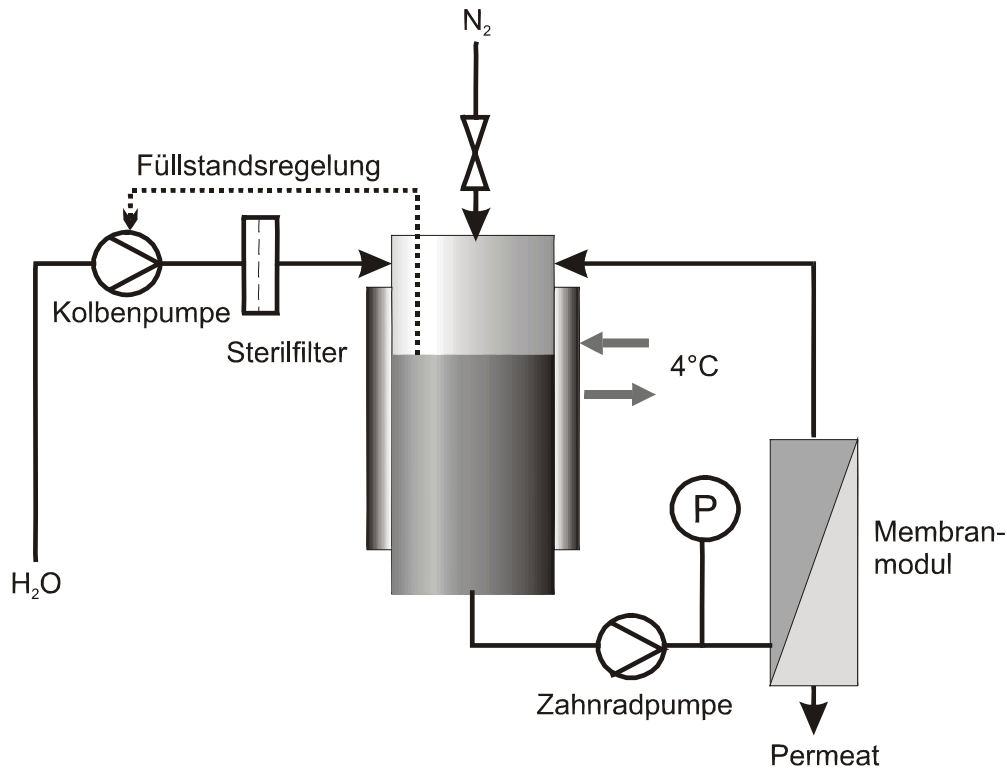


**Abbildung 3-32:** Verlauf der Säulenchromatographie zur Reinigung von CMP-Neu5Ac3F

Die Chromatographie liefert das Produkt in knapp 10 g NaCl. Zur Abtrennung des Salzes wird eine Diafiltration über eine Nanofiltrationsmembran durchgeführt<sup>100</sup>.

Dazu wurde die Laboranlage P 28 der Firma Celfa eingesetzt, deren Fließschema in Abbildung 3-33 gezeigt ist. Sie besteht aus einem auf 4°C thermostatisierten Druckzylinder des Volumens 500 ml, einer Zahnradpumpe zur Umwälzung der Lösung und einem Membranmodul, das unterhalb des Druckzylinders angebracht ist. Als Membran wird eine MX 07 Membran der Firma Osmonics eingesetzt. Durch Drucküberlagerung mit einem Inertgas wird die Anlage mit einem Druck von 8 bar beaufschlagt. Der Volumenverlust durch das ablaufende Permeat wird über eine füllstandgesteuerte gegendruckstabile Wechselkolbenpumpe über Zugabe von Wasser ausgeglichen.

<sup>100</sup> Dudziak, G., Fey, S., Hassbach, L., Kragl, U., Nanofiltration for purification of nucleotide sugars, *J. Carbohydr. Chem.*, **1999**, *18*, 41-50



**Abbildung 3-33:** Fließschema der Diafiltrationsanlage

Die Salzkonzentration in Permeat und Retentat wird in Abständen über eine Leitfähigkeitsmessung bestimmt. Nach 36 Stunden ist der Salzgehalt des Retentats auf weniger als 5% in Relation zur CMP-Neu5Ac3F gesunken. Nach Lyophilisierung des Retentats werden

- 600 mg CMP-Neu5Ac3F
- mit einer Reinheit >99% (CE) gewonnen
- was einer isolierten Ausbeute von 47% entspricht.

So wurde CMP-Neu5Ac3F erstmalig dargestellt und in präparativer Menge isoliert.

### 3.4 Versuche zur Übertragung von Neu5Ac3F auf Oligosaccharide

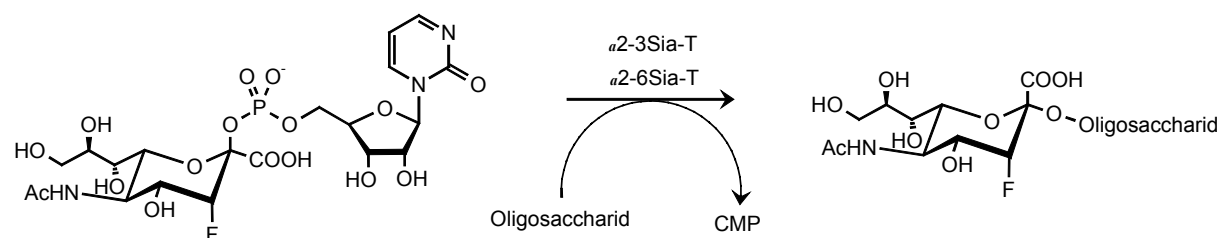
Nukleotidzucker werden als aktivierte Zucker bezeichnet, da ihre glycosidische Bindung sehr labil ist und somit leicht gespalten werden kann. Das kann entweder zur Zersetzung des Nukleotidzuckers in den Zucker und das Nukleotidphosphat führen, oder unter Mitwirkung von Enzymen, den sogenannten Transferasen, zur Ausbildung einer ebenfalls glycosidischen Bindung zu einem anderen Zuckerbaustein. Der Nukleotidzucker wird dabei als Donor bezeichnet und die Zuckerstruktur auf die übertragen wird als Akzeptor. Der Einsatz dieser Enzyme führt zur spezifischen Ausbildung definierter Strukturen. Es wurde das *one enzyme – one linkage* Konzept formuliert. Die Enzyme sind spezifisch hinsichtlich des Donorsubstrats, des Akzeptorsubstrats und der Art der Verknüpfung.

### 3.4.1 CMP-Neu5Ac3F als Substrat für Sialyltransferasen

Die Transferasen, die Neu5Ac von CMP-Neu5Ac auf Zucker übertragen, werden als Sialyltransferasen bezeichnet. Es gibt verschiedene Sialyltransferasen, die sich hinsichtlich Akzeptorspezifität und Bindungsposition unterscheiden. Im Wesentlichen sind die diversen  $\alpha$ 2-3- und die  $\alpha$ 2-6-Sialyltransferasen zu nennen, von denen einige in Tabelle 3-9 aufgeführt werden, die je nach Spezifität die Neuraminsäure auf verschiedene Oligosaccharidakzeptoren übertragen, und die  $\alpha$ 2-8-Sialyltransferasen, die in den meisten Fällen Homopolymere der Neuraminsäure aufbauen.

Sowohl auf der Donor-, als auch auf der Akzeptorseite zeigen die Sialyltransferasen eine gewisse Toleranz im Substratspektrum<sup>101</sup>.

Abbildung 3-34 zeigt das allgemeine Schema für die Übertragung von Neu5Ac3F auf Oligosaccharide.



**Abbildung 3-34:** Reaktionsschema für die enzymatische Übertragung von Neu5Ac3F auf Oligosaccharidstrukturen mit Hilfe von Sialyltransferasen

Vier verschiedene kommerziell erhältliche Sialyltransferasen wurden auf die Umsetzung von CMP-Neu5Ac3F getestet. Die Bedingungen der Experimente sind in Tabelle 3-9 zusammengefasst. Zur Kontrolle wurde bei allen Versuchen eine Vergleichsmessung mit dem Standardsubstrat CMP-Neu5Ac durchgeführt.

<sup>101</sup> Lubineau, A., Sommé, V., Augé, C., Sialyltransferase-catalyzed transfer of KDN onto oligosaccharides, *J. Mol. Cat. B*, **1998**, *5*, 235-240; Lubineau, A., Basset-Carpentier, K., Augé, C., Porcine liver (2→3)- $\alpha$ -sialyltransferase: substrate specificity studies and application of the immobilized enzyme to the synthesis of various sialylated oligosaccharide sequences, *Carbohydr. Res.*, **1997**, *300*, 161-167

Enzym	Ursprung	Akzeptor	Bedingungen	Umsetzung
$\alpha$ -2,3- <i>N</i> -SiaT Calbiochem 566218	Ratte, rekombinant, <i>Spodoptera frugiperda</i>	LacNAc <sup>1</sup>	CMP-Neu5Ac3F 2 ; 10 ; 50 mM LacNAc 20 mM Enzym 10 mU/ml pH 7,4 MOPS 50 mM 1 mg/ml BSA, 2,5 mg/ml TRITON X-100 T 37°C	n.d.
$\alpha$ -2,3- <i>O</i> -SiaT Calbiochem 566227	Ratte, rekombinant, <i>Spodoptera frugiperda</i>	Core1-Bn <sup>2</sup>	CMP-Neu5Ac3F 0,02; 2; 10; 50 mM Core1-Bn 1mM Enzym 6,8 mU/ml pH 6 Mes 50 mM T 37°C	n.d.
$\alpha$ -2,6- <i>N</i> -SiaT Calbiochem 566222	Ratte, rekombinant, <i>Spodoptera frugiperda</i>	LacNAc	CMP-Neu5Ac3F 2 mM LacNAc 10 M Enzym 10 mU/ml pH 6 Mes 50 mM T 37°C	n.d.
$\alpha$ -2,6- <i>N</i> -SiaT Calbiochem 566217	Rattenleber	asialo GM1 <sup>3</sup>	CMP-Neu5Ac3F 2 mM asialo GM1 10 mM Enzym 10 mU/ml pH 6 Mes 35 mM T 37°C	n.d.

<sup>1</sup>N-Acetyllactosamin, <sup>2</sup>GalNAc $\beta$ 1,3Gal $\alpha$ 1-benzyl, <sup>3</sup>GM1 desialyliert

**Tabelle 3-9:** Versuche zur Übertragung von CMP-Neu5Ac3F auf Oligosaccharidstrukturen mit Hilfe von vier verschiedenen Sialyltransferasen

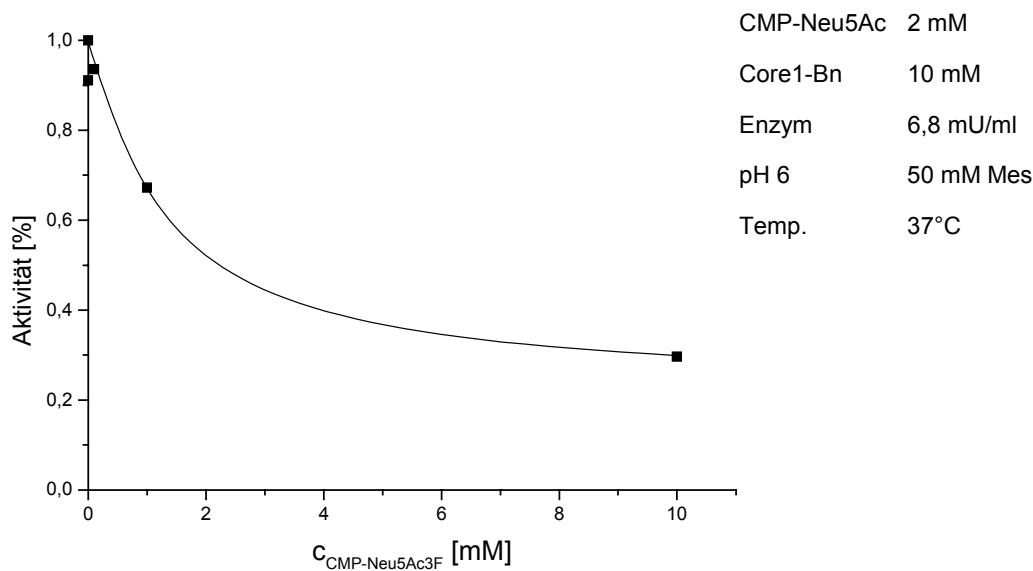
Für keine der Transferasen konnte eine Umsetzung von CMP-Neu5Ac3F gemessen werden, wohingegen die Kontrollmessungen mit CMP-Neu5Ac erwartungsgemäße Umsetzungen zeigten. Es konnte auch keine Spaltung der CMP-Neu5Ac3F in CMP und Neu5Ac3F beobachtet werden. Auch die im Arbeitskreis von Frau Prof. *Gerardy-Schahn*<sup>x</sup> mit  $\alpha$ 2-8-Sialyltransferasen durchgeführten Versuche blieben erfolglos.

Es kann verschiedene Gründe für die nicht erfolgte Umsetzung geben. So besteht zum einen die Möglichkeit, dass das Fluorderivat durch die veränderte Struktur nicht an das aktive Zentrum des Enzyms binden kann. Zum anderen kann das Fluor, das in unmittelbarer Nachbarschaft zu der zu spaltenden und neu zu bildenden Bindung steht, über elektronische Einflüsse diese Bindungsspaltung verhindern.

Um Aufschluss darüber zu erhalten welche dieser beiden Möglichkeiten zutrifft, wurden zunächst Messungen zur Inhibierung der Sialyltransferase durch CMP-Neu5Ac3F durchge

<sup>x</sup> Medizinische Hochschule Hannover, Institut für medizinische Mikrobiologie

führt. In Abbildung 3-35 ist die Inhibierung der  $\alpha$ -2,3-O-SiaT durch CMP-Neu5Ac3F dargestellt.

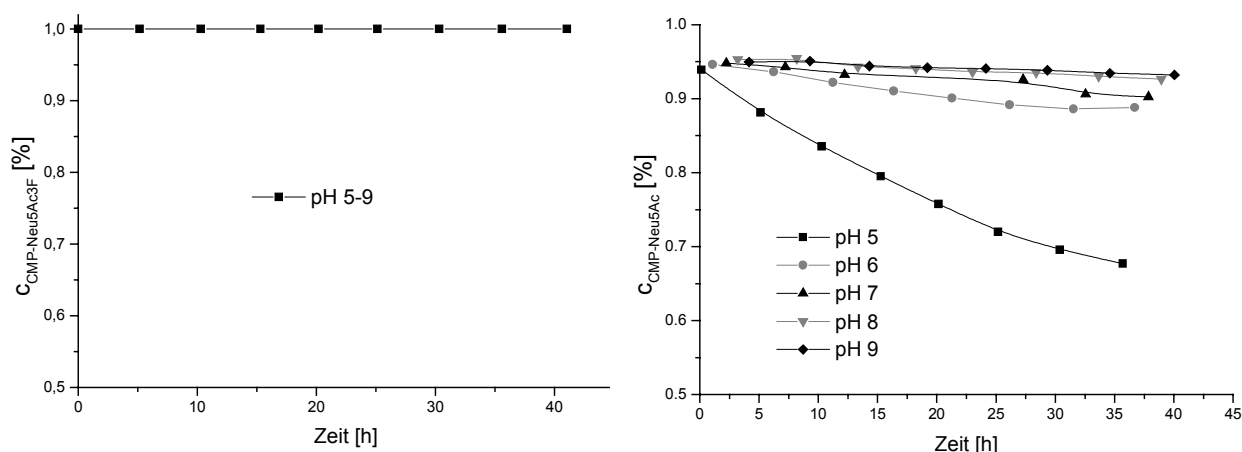


**Abbildung 3-35:** Inhibierung der  $\alpha$ -2,3-O-SiaT durch CMP-Neu5Ac3F

Die Messung zeigt eine Inhibierung der  $\alpha$ -2,3-O-SiaT durch CMP-Neu5Ac3F. Das kann ein Zeichen dafür sein, dass obwohl die Substanz vom Enzym nicht umgesetzt wird, obwohl eine Bindung an das aktive Zentrum des Enzyms stattfindet. Daneben besteht aber auch die Möglichkeit, dass die Inhibierung durch eine Bindung an einer anderen Stelle des Enzyms hervorgerufen wird. Die  $\alpha$ -2,6-N-SiaT wurde ebenfalls zu Inhibierungsversuchen herangezogen, jedoch zeigte die Messung eine derartig schlechte Reproduzierbarkeit, dass die Ergebnisse nicht dargestellt werden.

Um einen Einfluss des Fluor auf die Bindung zum CMP-Rest zu prüfen, wurde, wie in Abbildung 3-36 dargestellt, die Stabilität der CMP-Neu5Ac3F bei pH-Werten von 5-9 im Vergleich zu der Stabilität der CMP-Neu5Ac gemessen.





**Abbildung 3-36:** Zersetzung der CMP-Neu5Ac3F bei 20°C und pH-Werten von 5 – 9 im Vergleich mit der Zersetzung von CMP-Neu5Ac

Während die CMP-Neu5Ac erwartungsgemäß mit sinkendem pH-Wert immer schneller in Neu5Ac und CMP zerfällt, kann bei CMP-Neu5Ac3F keine Zersetzung detektiert werden. Das belegt, dass das Fluor offensichtlich einen deutlichen stabilisierenden Effekt auf die Bindung zum Nukleotidphosphat hat. Zur Ursache für diese Stabilisierung werden in Kapitel 5 Überlegungen angestellt.

Das Fazit ist, dass man CMP-Neu5Ac3F eigentlich nicht mehr als aktivierten Zucker betrachten kann, da die entscheidende Eigenschaft, nämlich die labile Bindung die die Spaltung als ersten Schritt für die Übertragung des Zuckers ermöglicht, nicht mehr vorhanden ist.

### 3.4.2 Chemischer oder chemoenzymatischer Transferer

Da die Übertragung der Neu5Ac3F auf eine Oligosaccharidstruktur auf enzymatischem Wege nicht zum Ziel geführt hat, wurde über weitere Alternativen für die Synthese eines Neu5Ac3F haltigen Oligosaccharids nachgedacht.

Neben den Glycosyltransferasen haben auch die Glycosidasen, also die Enzyme, die normalerweise glycosidische Bindungen spalten, unter bestimmten Bedingungen die Fähigkeit, glycosidische Bindungen zu knüpfen<sup>102</sup>.

Man unterscheidet dabei zwei Fälle, die Reverse Hydrolyse und die Transglycosylierung. Beide Fälle nutzen aus, dass es sich bei der Spaltung der glycosidischen Bindung um Gleichgewichtsreaktionen handelt. Im Fall der Reversen Hydrolyse werden zwei Zuckermoleküle unter Abspaltung von Wasser kondensiert. Diese Reaktion ist thermodynamisch

<sup>102</sup> Thiem, J., Applications of enzymes in synthetic carbohydrate chemistry, *FEMS Microbiol. Rev.*, **1995**, *16*, 193-211; Fernández-Mayoralas, A., Synthesis and modification of carbohydrates using glycosidases and lipases, *Topics Curr. Chem.*, **1997**, *186*, 1-21; Kren, V., Thiem, J., Glycosylation employing biosystems: from enzymes to whole cells, *Chem. Soc. Rev.*, **1997**, *26*, 463-473

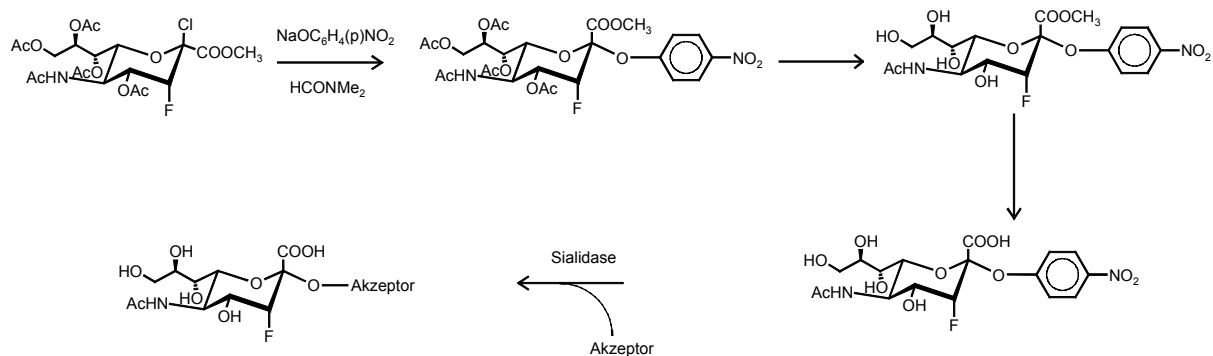
kontrolliert. Da im Gleichgewicht vor allem die Substrate vorliegen, muss z.B. durch Erhöhung der Konzentration die Reaktion in Richtung des Produktes gedrängt werden. Die Ausbeuten bleiben jedoch im Normalfall unter 20%.

Die Transglycosylierungsreaktion läuft hingegen kinetisch kontrolliert ab. Hier wird ein anomer verknüpfter Zucker mit hoher Affinität zum Enzym verwendet. Das kann ein Disaccharid oder ein Arylglycosid sein. In Analogie zu den Donoren für Glycosyltransferase-katalysierte Reaktionen spricht man auch hier von aktivierten Zuckern. Dieser aktivierte Zucker wird im aktiven Zentrum gebunden. Nach dem Lösen der anomeren Bindung kann entweder Glycosylierung durch einen nukleophilen Angriff des Akzeptors oder Hydrolyse durch den nukleophilen Angriff von Wasser erfolgen. Diese beiden Reaktionen laufen in Konkurrenz ab. Das Glycosylierungsprodukt ist aber wiederum ein Substrat für die Spaltung durch die selbe Glycosidase. Ein wesentlicher Gesichtspunkt bei der Transglycosylierungsreaktion ist, dass der aktivierte Donor als deutlich besserer Glycosyl-Donor fungieren muss, also ein größeres  $v_{\max}/k_m$  Verhältnis haben muss, als das Produkt, um eine Akkumulierung des Transglycosylierungs-Produkts zu erlauben. Außerdem muss die Reaktion rechtzeitig abgebrochen werden, bevor die Spaltung die dominante Reaktion wird. Auch hier wird die Bildung des Glycosylierungs-Produktes durch hohe Substrat- und Akzeptor-Konzentrationen begünstigt. Obwohl die Ausbeuten in der Regel unter 30% liegen, sind die Glycosidase-katalysierten Reaktionen aufgrund der geringen Enzym- und Substratkosten interessant. Durch kontinuierliche Transgalactosylierung im Membranreaktor gelang z.B. die kostengünstige Multigramm-Synthese von LacNAc<sup>103</sup>.

In Abbildung 3-37 ist eine denkbare Reaktion von Neu5Ac3F-2-para-Nitrophenol als Donor für eine Transglycosylierung mit Sialidase dargestellt. Als Ausgangssubstanz dient eine geschützte und in 2-Position durch Chlorid chemisch aktivierte  $\beta$ -NeuAc<sub>5</sub>3FCOOCH<sub>3</sub>Cl.

---

<sup>103</sup> Herrmann, G.F., Kragl, U., Wandrey, C., Kontinuierliche katalytische Herstellung von *N*-Acetyllactosamin, *Angew. Chem.*, **1993**, *105*, 1399-1400



**Abbildung 3-37:** Hypothetische chemoenzymatische Synthese eines Neu5Ac3F tragenden Oligosaccharides

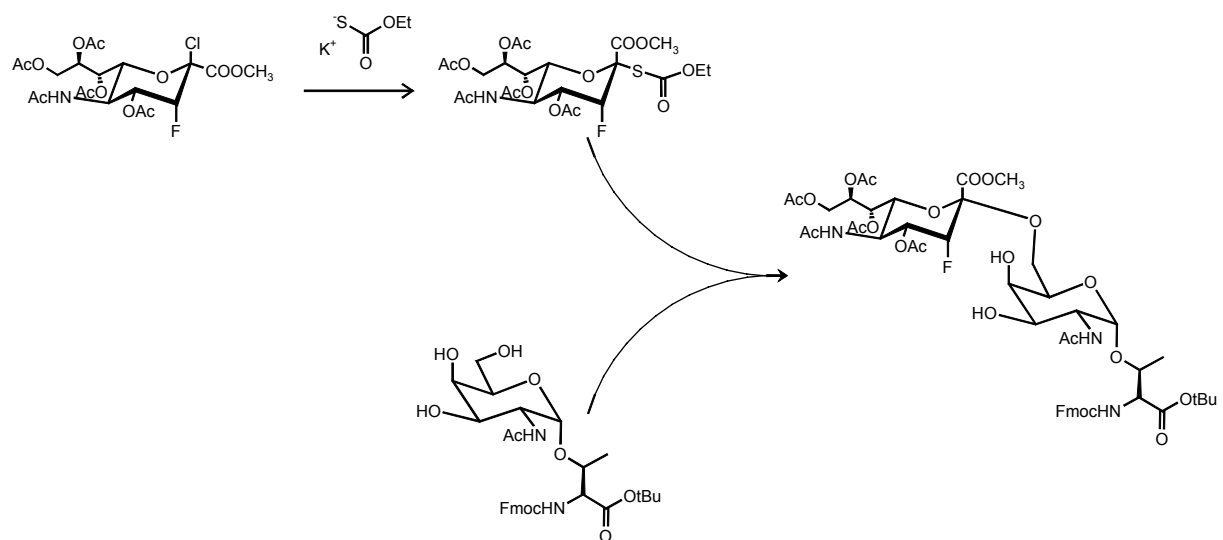
Als zweite Alternative wurde eine andere Art der Glykokonjugatsynthese, mit der sich unter anderem der Arbeitskreis *Kunz* an der Universität Mainz befasst, erwogen. In diesem Ansatz wird zuerst eine Zuckerstruktur auf einer geschützten Aminosäure aufgebaut, um diese dann mittels Festphasensynthese in ein Peptid zu integrieren.

Die von Merrifield entwickelte Festphasensynthese wird heute in Syntheseautomaten routinemäßig zur Herstellung von Peptiden eingesetzt. Dabei gelang es mittlerweile auch, zuckerverknüpfte Aminosäuren einzusetzen<sup>104</sup>.

Abbildung 3-38 zeigt die vorstellbare Synthese eines Sialy-Tn-Antigen Bausteins aus ebenfalls der chemisch aktivierten  $\beta$ -NeuAc<sub>5</sub>3FCOOCH<sub>3</sub>Cl und einem GalNAc-Thr-Baustein. Die Synthese des GalNAc-Thr-Bausteins verläuft über 5 Stufen in 25% Ausbeute<sup>105</sup>.

<sup>104</sup> Gururaja, T., Ramasubbu, N., Levine, M.J., Solid-phase synthesis of human salivary mucin-derived O-linked glycopeptides, *Letts. Pept. Sci.*, **1996**, *3*, 79-88; Klich, G., Paulsen, H., Meyer, B., Meldal, M., Bock, K., Synthesis and characterization of highly glycosylated glycopeptides with Tn-antigenic structures corresponding to human glycoporphin AN, *Carbohydr. Res.*, **1997**, *299*, 33-48; Schleyer, A., Meldal, M., Renil, M., Paulsen, H., Bock, K., Direkte Festphasen-Glycosylierung von Peptiden an einem neuartigen Polyethylenglycol-Harz, *Angew. Chem.*, **1997**, *109*, 2064-2067; St. Hillaire, P.M., Lowary, T.L., Meldal, M., Bock, K., Oligosaccharide mimetics obtained by novel, rapid screening of carboxylic acid encoded glycopeptide libraries, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 13312-13320

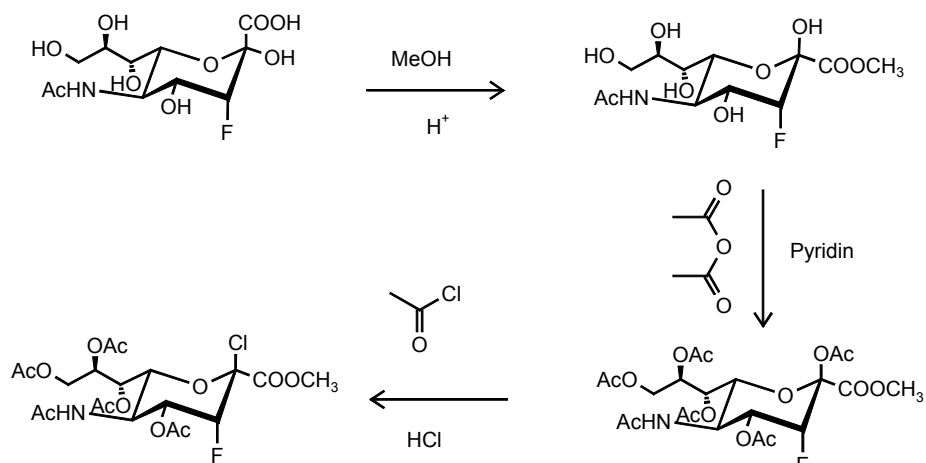
<sup>105</sup> Liebe, B., Kunz, H., Solid phase synthesis of a sialyl-Tn-glycoundecapeptide of the MUC1 repeating unit, *Helv. Chim. Acta*, **1997**, *80*, 1473



**Abbildung 3-38:** Konzept für die chemische Synthese eines Neu5Ac3F haltigen Sialyl-Tn-Antigen Bausteins<sup>106</sup>

Beide Alternativen gehen von der gleichen Ausgangssubstanz aus, nämlich der  $\beta$ -NeuAc<sub>5</sub>3FCOOCH<sub>3</sub>Cl. Durch die in Abbildung 3-39 gezeigte Synthese sollte diese Schlüsselsubstanz hergestellt werden.

<sup>106</sup> persönliche Mitteilung von Nicole Bézay, 1999



**Abbildung 3-39:** Konzept für die chemische Synthese von  $\beta$ -NeuAc<sub>5</sub>3FCOOCH<sub>3</sub>Cl<sup>106</sup>

Die beiden ersten Stufen dieser Synthese ließen sich problemlos in nahezu quantitativer Ausbeute durchführen. Es erwies sich jedoch als Problem, den peracetylierten Methylester der Neu5Ac3F zum 2-Chlorid zu aktivieren. Es konnte keine Umsetzung beobachtet werden. Mit der entsprechenden Neu5Ac-Verbindung lässt sich dieser Schritt unter moderaten Bedingungen mit einer Ausbeute von etwa 90% ausführen.

Auch durch Variation der Reaktionsbedingungen zu extremeren Verhältnissen hinsichtlich Temperatur, Reaktionsdauer und Aktivität der Chlorierungsreagenzes durch Pyridinzusatz konnte keine Umsetzung erreicht werden.

Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass die Fluorierung der 3-Position einen deutlich stärkeren Einfluss auf die benachbarte 2-Position ausübt als in der Planung angenommen. Wie auch bei CMP-Neu5Ac3F scheint sich dieser Einfluss massiv auf die Stabilität der OR-Gruppe an der 2-Position auszuwirken. Als Erklärung ist anzunehmen, dass das Fluor durch seinen starken Elektronenbedarf nicht nur auf das Kohlenstoffatom, an das es unmittelbar gebunden ist, einen Elektronenmangel hervorruft, sondern dieser sogar bis zum benachbarten C-2 reicht. Dadurch wird das Elektronenpaar der Bindung zwischen C-2 und der O-PO<sub>3</sub>R Gruppe so fest gebunden wird, dass die Abspaltung dieser Gruppe kaum möglich ist.

Zu diesem Thema werden in der abschließenden Diskussion in Kapitel 5 einige Überlegungen angestellt.

Außer diesen Überlegungen zur Neu5Ac3F Übertragung wird es für zukünftige Arbeiten auch interessant sein, Neu5Ac3F<sub>axial</sub> als Inhibitor für Sialidasen zu testen, da Verbindungen der Neuraminsäure mit einer Doppelbindung zwischen C-2 und C-3 bekanntermaßen potente Inhibitoren sind, aber nur sehr wenige andere Derivate mit einer Variation in 3 Position vorhanden sind.

### 3.5 Synthese von 3-[<sup>18</sup>F]Fluorneuraminsäure

Zur Synthese der <sup>18</sup>F markierten Verbindung wurde am Institut für Nuklearchemie (INC) des Forschungszentrums Jülich im Zeitraum von März bis Dezember 1997 von Herrn Thomas Tierling unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H.-H. Coenen eine Diplomarbeit mit dem Titel "Zur Synthese von 3-[<sup>18</sup>F]Fluorsialinsäure durch enzymatische Addition von [<sup>18</sup>F]Fluorpyruvat an Mannosamin" angefertigt<sup>107</sup>.

Der Schwerpunkt der Arbeit lag auf der Entwicklung einer Radiosynthese zur Darstellung von *no carrier added* (n.c.a.) [<sup>18</sup>F]Fluorpyruvat, das anschließend durch die in Kapitel 3.2 beschriebene Aldolase-katalysierte Reaktion mit ManNAc zu 3-[<sup>18</sup>F]Fluorneuraminsäure umgesetzt werden sollte. Die Arbeiten zur enzymatischen Synthese waren Bestandteil einer Kooperation zwischen dem INC und dem IBT 2.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen an dieser Stelle in aller Kürze zusammengefasst werden.

#### 3.5.1 Synthese von [<sup>18</sup>F]Fluorpyruvat

Eine grundlegende Schwierigkeit bei Radiosynthesen ("heiße Synthesen") ist durch den Einsatz von geringsten Substanzmengen gegeben. Nicht die Substanzmenge, sondern die eingesetzte Radioaktivität ist hier ausschlaggebend. Die Mengen werden nicht in Molaritäten, sondern in mCi (Millicurie) angegeben. Obwohl die chemischen Eigenschaften der radioaktiven Komponenten die Gleichen sind, wie bei den entsprechenden nicht radioaktiven Verbindung, folgen die Reaktionen wegen der kaum messbaren Konzentrationen (picomolarer Bereich) keiner klassischen Kinetik, wodurch sich die "kalten" Synthesen der entsprechenden Zielverbindungen nicht 1:1 auf die "heißen" Synthesen übertragen lassen. Außerdem kann auch die Schwierigkeit auftreten, dass Empfindlichkeiten der markierten Verbindung gegenüber anderen im Überschuß vorhandenen Reaktionskomponenten (z.B. Säuren oder Basen) zu einer sehr schnellen Zersetzung dieser Kleinstmengen führt.

Es besteht die Möglichkeit, durch Zusatz des entsprechenden "kalten" Substrats, einem sogenannten *carrier*, die Konzentration zu erhöhen, so das die Reaktion dennoch der Kinetik der kalten Reaktion folgt. Im Idealfall geschieht das jedoch nicht und man spricht dann von n.c.a., was bedeutet, *no carrier added*.

Aufgrund der Halbwertszeit des <sup>18</sup>F von 110 min und den erhöhten Anforderungen an die Handhabung und die Arbeitssicherheit ist eine Syntheseroute zu bevorzugen, die sich als "Eintopfreaktion" durchführen lässt. Die Synthesestrategie muss die Darstellung des [<sup>18</sup>F]Fluorpyruvat in möglichst kurzer Zeit und hoher radiochemischer Ausbeute ermöglichen.

Als Synthesestrategie für das markierte Fluorpyruvat bietet sich eine direkte <sup>18</sup>F-Fluorierung eines an der Carboxylgruppe geschützten Brenztraubensäure-Derivates an, welches in

---

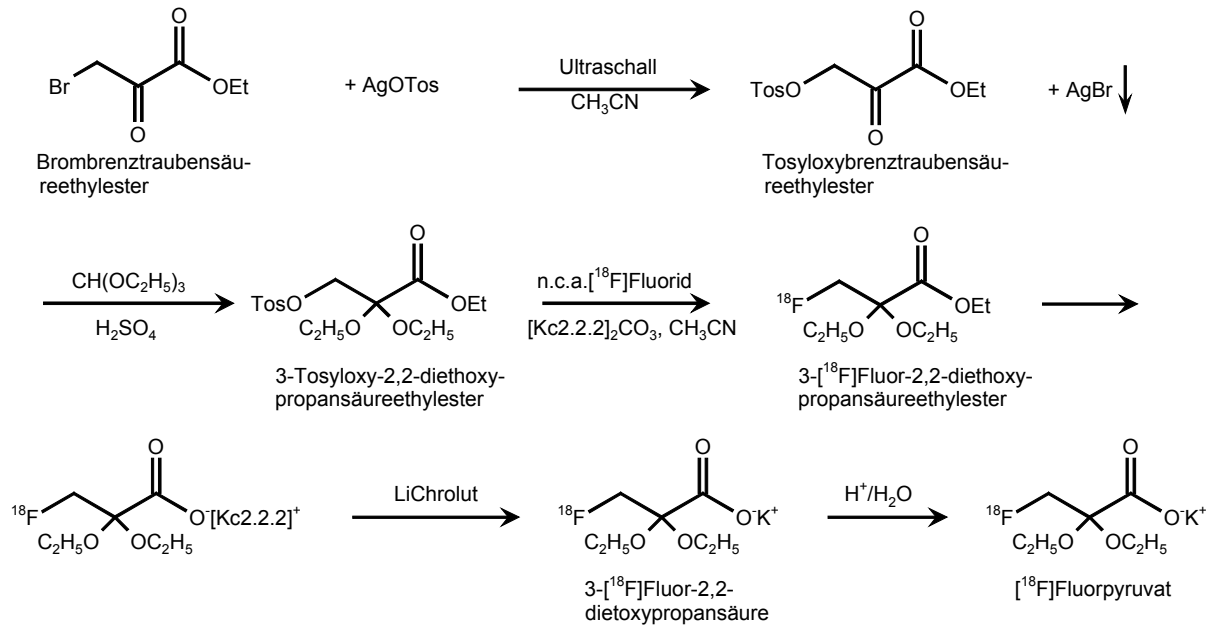
<sup>107</sup> Tierling, T., Zur Synthese von 3-[<sup>18</sup>F]Fluorsialinsäure durch enzymatische Addition von [<sup>18</sup>F]Fluorpyruvat an Mannosamin, Diplomarbeit Universität Köln, 1997

$\beta$ -Position Tosylat als geeignete Abgangsgruppe trägt, mit anschließender Schutzgruppenabspaltung. Anschließend ist eine schnelle Abtrennung und Isolierung des [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorpyruvat in neutraler wässriger Phase erforderlich, damit die erhaltene Lösung direkt für die enzymatische Synthese eingesetzt werden kann.

n.c.a. [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorid wurde für die nukleophilen Markierungssynthesen über die  $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ -Kernreaktion in einem  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ -Target am Babyzyklotron BC 1710 des INC erzeugt. Das wässrig vorliegende [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorid wird durch die Zugabe des Kryptats  $[\text{K}^{2.2.2}]_2\text{CO}_3$  in ein nacktes Anion überführt, wodurch die nukleophilen Eigenschaften des [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorid extrem gesteigert werden. Um eine ausreichende Löslichkeit des Kryptats zu gewährleisten, muss Acetonitril als Lösungsvermittler zugesetzt werden.

Da die Ketofunktion der Brenztraubensäure unter den stark basischen Bedingungen des Kryptats nicht stabil ist, muss eine zusätzliche Schutzgruppe für diese Funktion eingeführt werden. Dieses erfolgt durch eine Ketalisierung mit Orthoameisensäureester.

Unter Einsatz des  $[\text{K}^{2.2.2}]_2\text{CO}_3$  Kryptatsystems zur Aktivierung des n.c.a. [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorids in Acetonitril bei  $80^\circ\text{C}$  konnte durch nukleophile  $^{18}\text{F}$ -Fluorierung des 3-Tosyloxy-2,2-diethoxypropansäureethylesters und die durch die alkalischen Eigenschaften des Kryptats *in situ* erfolgende Verseifung des intermediär gebildeten 3- $^{18}\text{F}$ Fluor-2,2-diethoxypropansäureesters, das Produkt 3- $^{18}\text{F}$ Fluor-2,2-diethoxypropansäure innerhalb von 20 min mit einer radiochemischen Ausbeute von über 50% dargestellt werden. Die Reinigung und Isolierung des Markierungsproduktes gelang ohne größere Aktivitätsverluste mittels Festphasenextraktion in LiChrolut<sup>®</sup>, so dass durch anschließende saure Abspaltung der Ketalschutzgruppe n.c.a. [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorpyruvat mit einer radiochemischen Ausbeute von 36% erhalten werden konnte. Die Synthese ist in Abbildung 3-40 dargestellt.



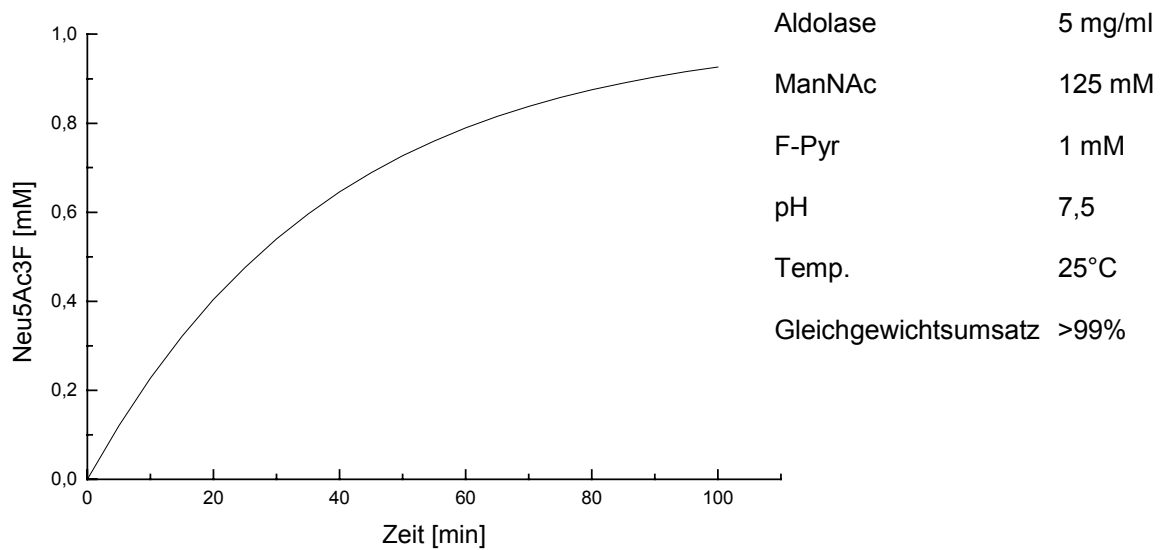
**Abbildung 3-40:** Radiochemische Synthese von  $[^{18}\text{F}]$ Fluorpyruvat ausgehend von Brombenzoyl-ethylester

### 3.5.2 Synthese von 3- $[^{18}\text{F}]$ Fluorneuraminsäure

Die enzymatische Synthese von 3- $[^{18}\text{F}]$ Fluorneuraminsäure aus  $[^{18}\text{F}]$ Fluorpyruvat und ManNAc wurde in einem 2,5 ml Wheaton-Reaktor durchgeführt. Dem System von 3,7 – 11,1 MBq (100 – 300  $\mu\text{Ci}$ ) des  $[^{18}\text{F}]$ Fluorpyruvats wurde 1 mM "kaltes" Fluorpyruvat als Träger zugesetzt, um die Gesetzmäßigkeiten der Kinetik aufrechtzuerhalten. Da sich die radioaktive Verbindung chemisch nicht von der "kalten" Verbindung unterscheidet, werden beide im gleichen Verhältnis umgesetzt. Das bedeutet, dass bei einer Umsetzung von einem Prozent der "kalten" Verbindung auch ein Prozent der "heißen" Verbindung umgesetzt wird. ManNAc wurde im großen Überschuss von 125 mM eingesetzt, um die Reaktionsgeschwindigkeit zu steigern. Die Aldolase wurde in einer Menge von 5 mg/ml eingesetzt.

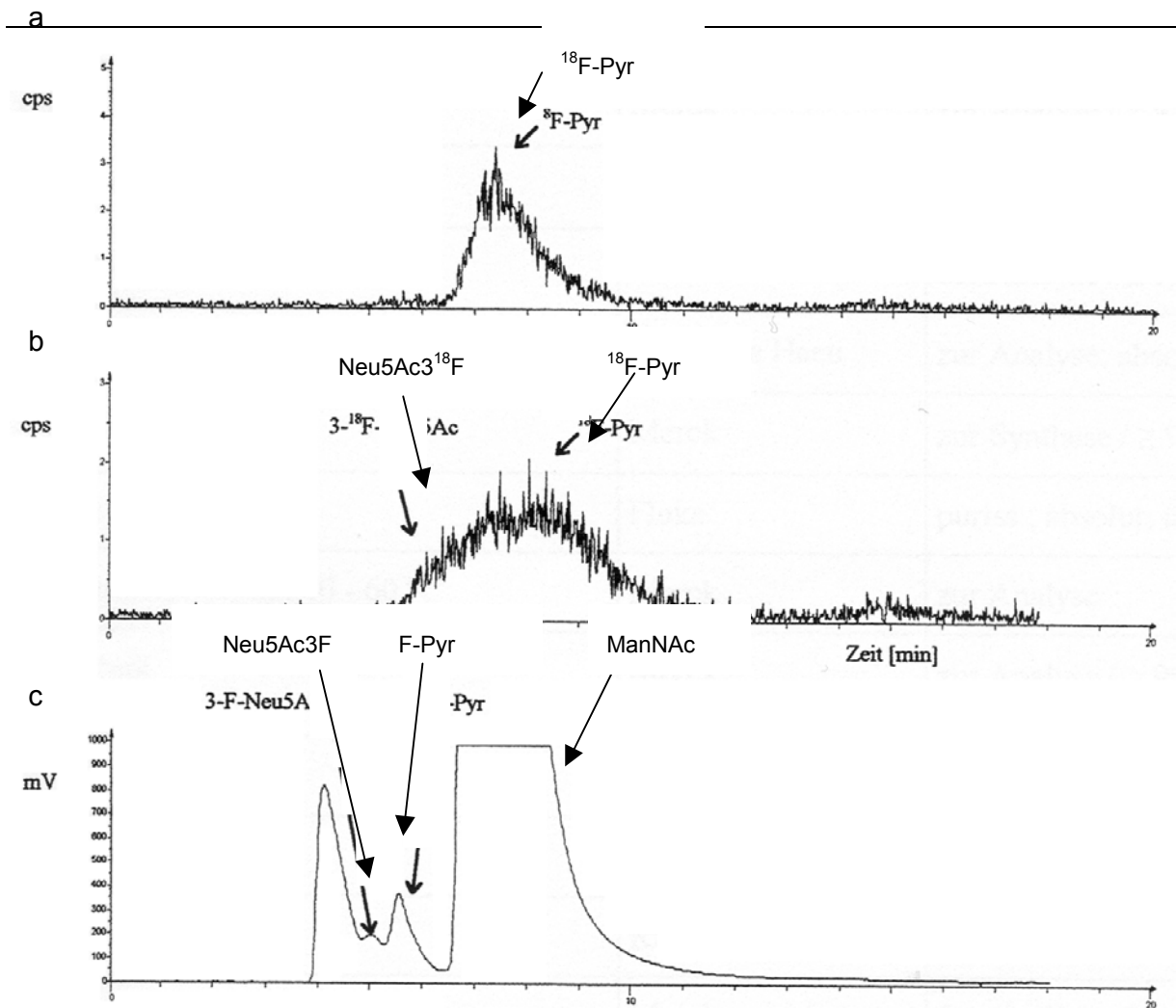
Mit dem Modell aus Gleichung 3-2 wird unter Zuhilfenahme der in Gleichung 3-4 aufgeführten Stoffbilanzen der Verlauf der Reaktion simuliert.





**Abbildung 3-41:** Simulation der Umsetzung von 1 mM F-Pyr mit 125 mM ManNAc nach dem Modell aus Gleichung 3-2 mit den Stoffbilanzen aus Gleichung 3-4

Die Umsetzung wurde durch HPLC-Messungen kontrolliert. Die Detektion der radioaktiven Komponenten erfolgt über einen NaI(Tl)-Bohrlochkristalldetektor (Aktivkanal). Dieser liefert die in Abbildung 3-42 a und b gezeigten breiten Signale, die eine hinreichende Trennung und Quantifizierung der Komponenten erschwert. Die Detektion mit dem vorgeschalteten UV-Detektor (UV-Kanal Abbildung 3-42 c) ist wegen der geringen Konzentrationen für die aktiven Verbindungen nicht möglich, sondern nur für die zugesetzten nicht aktiven Verbindungen.



**Abbildung 3-42:** HPLC-Chromatogramme der Umsetzung von geträgertem [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorpyruvat und ManNAc zu 3-[ $^{18}\text{F}$ ]Fluorneuraminsäure. a) n.c.a.[ $^{18}\text{F}$ ]Fluorpyruvat im Aktivkanal vor der Umsetzung; b) Reaktionsgemisch im Aktivkanal nach 40 min Reaktion; c) Reaktionsgemisch im UV-Kanal nach 40 min Umsetzung

Die Chromatogramme zeigen:

- das nach der Synthese in Abbildung 3-40 synthetisierte n.c.a.[ $^{18}\text{F}$ ]Fluorpyruvat vor der Umsetzung mit ManNAc im Aktivkanal,
- das Reaktionsgemisch aus [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorpyruvat, kaltem Fluorpyruvat und ManNAc nach 40 min Reaktion in Gegenwart von Aldolase im Aktivkanal,
- das Reaktionsgemisch nach 40 min Reaktion im UV-Kanal.

Die Chromatogramme zeigen deutlich, dass eine Reaktion eingesetzt hat. Durch die Peakgeometrie ist es jedoch nicht möglich, die Umsetzung zu quantifizieren.

Somit konnte gezeigt werden, dass [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorpyruvat durch die Aldolase zu 3-[ $^{18}\text{F}$ ]Fluorneuraminsäure umgesetzt wird.

### 3.6 Zusammenfassung

- Neu5Ac3F konnte erstmalig enzymatisch aus ManNAc und F-Pyr Aldolase-katalysiert hergestellt werden.
- Für diese Reaktion wurde ein kinetisches Modell aufgestellt, welches für die Simulation von Satzreaktoren genutzt wurde.
- Die präparative Synthese im 6-fachen Repetitive-Batch bestätigte dieses Modell. Mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von 4,1 g/(l\*d) und einem Produktmengen-spezifischer Enzymverbrauch von 4,06 U/g ist es erstmalig gelungen Neu5Ac3F in einer sehr praktikablen Synthese mit hohen Ausbeuten im präparativen Maßstab herzustellen.
- Es konnten so 2,55 g Neu5Ac3F<sub>axial</sub> und 150 mg Neu5Ac3F<sub>equatorial</sub> isoliert werden. Das entspricht einer isolierten Ausbeute in der Reinigung von 85 % und einer isolierten Ausbeute bezogen auf die Gesamtreaktion von 69%.
- Elf weitere Zucker wurden nach diesem Schema zu fluorierten Neuraminsäurederivaten umgesetzt. 3F-KDN wurde im 500 mg Maßstab hergestellt.
- Es ist gelungen, in der Aldolase-katalysierten Reaktion 3-[<sup>18</sup>F]Fluorneuraminsäure im geträgerten System aus [<sup>18</sup>F]Fluorpyruvat und ManNAc darzustellen.
- Neu5Ac3F<sub>axial</sub> konnte erstmalig zu CMP-Neu5Ac3F umgesetzt werden mit einer RZA von 11,1 g/(l\*d) und einem Enzymverbrauch von 0,098 U/g und in einer Menge von 600 mg isoliert werden.
- CMP-Neu5Ac3F kann nicht durch Sialyltransferasen umgesetzt werden, da die Nucleotidphosphatbindung durch das Fluor stabilisiert ist.
- CMP-Neu5Ac3F wirkt inhibierend auf  $\alpha$ -2,3-O-SiaT.
- Chemische und chemoenzymatische Versuche zur Übertragung von Neu5Ac3F auf Oligosaccharide scheitern ebenfalls am Einfluss des Fluors auf die C-2 Position.
- Die hier hergestellte Neu5Ac3F und CMP-Neu5Ac3F werden über Calbiochem vertrieben

## 4 Glycolylneuraminsäure

Im Gegensatz zu Neu5Ac findet sich Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc) fast ausschließlich bei Tieren und auch dort vor allem in spezifischen Organen<sup>108</sup>. Obwohl auffallende Verschiedenheiten in Morphologie und kognitiven Fähigkeiten bestehen, weisen die nächsten Verwandten des Menschen, die vier noch existierenden großen Menschenaffen (Chimpanzen, Gorillas, Bonobos und Orangutans) ein zu 98 – 99% gleiches Genom wie der Mensch auf. Viele dieser artspezifischen Merkmale scheinen eher durch quantitative Unterschiede in der Genexpression als durch strukturelle Veränderungen der Genprodukte hervorgerufen zu werden<sup>109</sup>. Die einzige bislang gut charakterisierte biochemische Differenz zwischen diesen Affen und dem Menschen ist das Unvermögen des Menschen, die hydroxylierte Form der Neu5Ac, die Neu5Gc zu bilden. Die Ursache dafür liegt in einer 92-bp Elimination<sup>110</sup> auf dem Gen, das für die Codierung der relevanten Hydroxylase zuständig ist<sup>111</sup>.

Aufgrund der in Kapitel 1.3.2 besprochenen Bedeutung der Neuraminsäuren für die Funktion der Glycoconjugate ist diesem Unterschied eine besondere Bedeutung zuzumessen. Neben den augenfälligen Verschiedenheiten zwischen Mensch und Affe sind Unterschiede in der Anfälligkeit gegenüber infektiösen Krankheiten wie z.B. AIDS und Malaria, aber auch gegenüber Alzheimer ausgeprägt. Auch scheinen Affen bestimmte Formen von Krebs nicht zu entwickeln.

Dennoch haben Neu5Gc enthaltende Glycoconjugate auch beim Menschen eine biologische Relevanz, zum Beispiel in der Infektion durch den Influenza Virus von Tieren auf den Menschen, in humanem fetalem Gewebe und als Tumormarker<sup>112</sup>. In etlichen humanen Karzinomen werden kleine Mengen von Neu5Gc in Sialoglycoconjugaten gefunden. Sie werden als Hanganutziu Deicher (HD) Antigene bezeichnet. Sowohl Menschen mit solchen

---

<sup>108</sup> Schauer, R., Stoll, S., Reuter, G., Differences in the amount of *N*-acetyl- and *N*-glycolyl-neuraminic acid, as well as *O*-acylated sialic acids, of fetal and adult bovine tissues, *Carbohydr. Res.*, **1991**, 213, 353-359

<sup>109</sup> Enard, W., Khaitvich, P., Klose, J., Zöllner, S., Heissig, F., Giavalisco, P., Nieselt-Struwe, K., Muchmore, E., Varki, A., Ravid, R., Doxiadis, G.M., Bontrop, R.E., Pääbo, S., Intra- and Interspecific Variation in Primate Gene Expression Patterns, *Science*, **2002**, 296, 340-343

<sup>110</sup> Irie, A., Koyama, S., Kozutsumi, Y., Kawasaki, T., Suzuki, A., The Molecular Basis for the Absence of *N*-Glycolylneuraminic Acid in Humans, *J Biol Chem*, **1998**, 273, 15866-15871; Chou, H.-H., Takematsu, H., Diaz, S., Iber, J., Nickerson, E., Wright, K.L., Muchmore, E.A., Nelson, D.A., Warren, S.T., Varki, A., A mutation in human CMP-sialic acid hydroxylase occurred after the Homo-Pan divergence (Pongidae/evolution/neuraminic acids/PCR/hominoids), *J. Biol. Chem.*, **1998**, 95, 11751-11756

<sup>111</sup> Muchmore, E.A., Diaz, S., Varki, A., A Structural Difference Between the Cell Surfaces of Humans and the Great Apes, *Am. J. Phys. Anthropol.*, **1998**, 107, 187-198; Pääbo, S., Human Evolution, *Millenium Issue TCB TIBS TIG*, **1999**, M13-M16

<sup>112</sup> Higashi, H., Hirabayashi, Y., Fukui, Y., Naiki, M., Matsomoto, M., Ueda, S., Kato, S., Characterization of *N*-Glycolylneuraminic acid-containing gangliosides as tumor-associated Hanganutziu-Deicher antigen in human colon cancer, *Cancer Res.*, **1985**, 45, 3796-3802; Hirabayashi, Y., Kasakura, H., Matsumoto, M., Higashi, H., Kato, S., Kasai, N., Naiki, M., Specific expression of unusual GM2 ganglioside with Hanganutziu-Deicher antigen activity on human colon cancers, *Jpn. J. Cancer Res.*, **1987**, 78, 251-26; Miyake, M., The abnormal occurrence and the differentiation-dependent distribution of *N*-acetyl and *N*-glycolyl species of the ganglioside GM2 in human germ cell tumors, *Cancer*, **1990**, 65, 499-505; Kawai, T., Kato, A., Higashi, H., Kato, S., Naiki, M., Quantitative determination of *N*-Glycolylneuraminic acid expression in human cancerous tissues and avian lymphoma cell lines as a tumor associated sialic acid by gas-chromatography-mass spectrometry, *Cancer Res.*, **1991**, 51, 1242-1246; Devine, P.L., Clark, B.A., Birrell, G.W., Layton, G.T., Ward, B.G., Alewood, P.F., McKenzie, I.F.C., The Breast Tumor-associated Epitope Defined by Monoclonal Antibody 3E1.2 Is an *O*-linked Mucin Carbohydrate Containing *N*-Glycolylneuraminic acid, *Cancer Res.*, **1991**, 51, 5826-5836

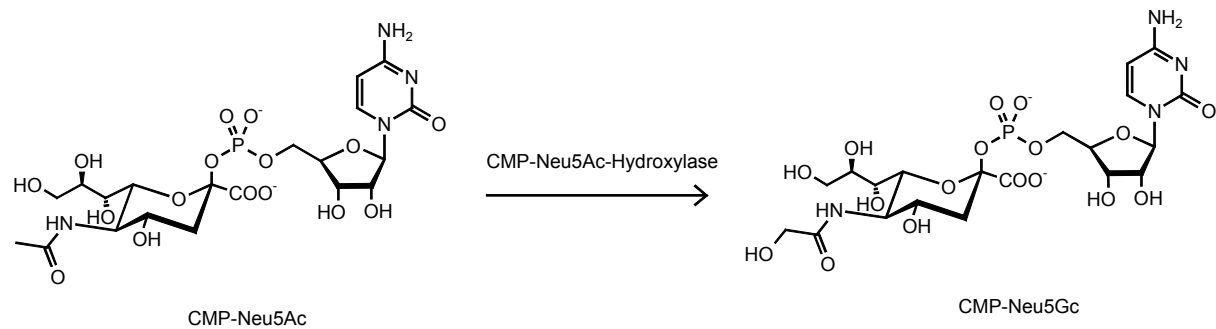
malignen Erkrankungen, als auch mit einigen infektiösen oder entzündlichen Erkrankungen entwickeln häufig einen hohen Antikörpertiter gegen Neu5Gc-tragende Antigene.

Varki *et al.* haben außerdem festgestellt, dass Neu5Gc, obwohl es sonst überall im tierischen Körper gefunden wird, im tierischen Hirn, einschließlich des Affenhirns, nur in geringsten Spuren gefunden wird. Weitere Studien werden betrieben, um zu erforschen ob, und wenn ja welche Bedeutung das Fehlen dieser Sialinsäure im Hirn hat<sup>113</sup>.

So richtet sich steigendes Interesse auf die Synthese und Biologie von Neu5Gc und entsprechender Glycoconjugate<sup>114</sup>.

#### 4.1 Biosynthese

In der Biosynthese von Neu5Gc-haltigen Oligosacchariden, wird im allgemeinen die extra Hydroxylgruppe der Neu5Gc erst auf der Stufe der CMP-Neu5Ac in die Neuraminsäure eingeführt.



**Abbildung 4-1:** CMP-Neu5Ac-Hydroxylase katalysierte Biosynthese von CMP-Neu5Gc aus CMP-Neu5Ac

Daher findet sich in der Natur keine reiche Quelle für Neu5Gc oder deren Vorläufer. Eine Ausnahme wurde von *Mukuria et al.* gefunden. In der Unterkieferdrüse von Schweinen konnte neben der von *Schauer et al.* beschriebenen CMP-N-Acetylneuraminsäurehydroxy

<sup>113</sup> Alper, J., Sugar Separates Humans From Apes, *Science*, **2001**, 291, 2340

<sup>114</sup> Kuboki, A., Okazaki, H., Sugai, T., Otha, H., An Expedient Route to N-Glycolylneuraminic acid Based on Enzyme-catalysed Reaction, *Tetrahedron*, **1997**, 53, 2387-2400

lase [E.C. 1.14.99.88] in der löslichen Fraktion ein Neu5Ac-hydroxylierendes Enzym gefunden werden<sup>115</sup>.

Versuche zur Aktivierung von Neu5Ac und Neu5Gc mit Synthetasen aus Kalbshirn, Rinder- und Pferdedrüsenngewebe zeigten, dass beide Substrate vergleichbar gut umgesetzt werden. Martensen ist es gelungen, eine CMP-Neu5Ac Hydroxylase aus Seestern zu klonieren und in *E. coli* als aktives Enzym zu exprimieren<sup>116</sup>.

Auch die Übertragung auf verschiedene Oligosaccharidstrukturen mit sechs verschiedenen Sialyltransferasen aus Schweine-, Rinder- und Rattengewebe verläuft sehr gut<sup>117</sup>.

## 4.2 Alternative Synthese von Glycolylneuraminsäure

Arbeiten von *Collins et al.* zur Unterbindung der Bildung von Myelinschichten um die Axone von Nervenzellen (s. Kapitel 1.1.1.2) haben gezeigt, dass Neuroblastomglioma-Hybridzellen in der Lage sind, in Gegenwart von peracetyliertem *N*-Glycolylmannosamin (ManNGc) innerhalb von 5 Tagen 80% ihrer gangliosidassoziierten und 70% ihrer glycoproteinassoziierten Neu5Ac durch Neu5Gc zu ersetzen<sup>118</sup>. Das bedeutet, das peracetyliertes ManNGc nach Abspaltung der Acetylgruppen durch unspezifische Esterasen in den in Abbildung 1-5 dargestellten Biosyntheseweg von Sialoglycoconjugaten eingefügt werden kann.

Nach Studien von *Keppler et al.* lässt sich diese Strategie zum Einbau von *N*-Acetylmodifizierten Neuraminsäuren bei einem breiten Spektrum von tierischen Zellen auf eine ganze Reihe von unphysiologischen ManNAc Derivaten ausweiten<sup>119</sup>. Der Einbau von unphysiologischen Sialinsäuren in lebende Zellen bietet die Möglichkeit zum Studium von spezifischen Verteilungen von Sialinsäuren und dem Einfluss der *N*-Acetyl-Seitenkette auf sialinsäureabhängige Ligand-Rezeptor Wechselwirkungen.

Diese Untersuchungen zeigen, dass die Synthese auf dem in Kapitel 3.2 bereits ausführlich beschriebenen Weg über die Aldolase-katalysierte Aldolkondensation von ManNGc mit Pyruvat eine Alternative für die Synthese von Neu5Gc bietet. Tatsächlich haben einige Arbeitsgruppen diesen Weg bereits erfolgreich beschrritten.

<sup>115</sup> Mukuria, C.J., Mwangi, W.D., Noguchi, A., Waiyaki, G.P., Asono, T., Naiki, Masaharu, Evidence of a free *N*-acetylneuraminic acid-hydroxylating enzyme in pig mandibular gland soluble fraction, *Biochem. J.*, **1995**, 305, 459-464; Shaw, L., Schauer, R., The Biosynthesis of *N*-Glycolylneuraminic Acid Occurs by Hydroxylation of the CMP-Glycoside of *N*-Acetylneuraminic Acid, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **1988**, 369, 477-486, **1988**, 369, 477-486

<sup>116</sup> Martensen, I., Schauer, R., Shaw, L., Cloning and expression of a membrane-bound CMP-*N*-acetylneuraminic acid hydrolase from the starfish *Asterias rubens*, *Eur. J. Biochem.*, **2001**, 268, 5157-5166

<sup>117</sup> Higa, H.H., Paulson, J.C., Sialylation of Glycoprotein Oligosaccharides with *N*-Acetyl-, *N*-Glycolyl, and *N*-O-Diacetylneuraminic acids, *J. Biol. Chem.*, **1985**, 260, 8838-8849; Lubineau A., Augé, C., Gautheron-LeNarvor, C., Ginet, J.C., Combined chemical and enzymatic synthesis of the sialylated non reducing terminal sequence of GM1b glycolylated ganglioside, a potential human tumor marker. *BioMed. Chem.*, **1994**, 2, 669- 674

<sup>118</sup> Collins, B.E., Fralich, T.J., Itonori, S., Ichikawa, Y., Schnaar, R.L., Conversion of cellular sialic acid expression from *N*-acetyl- to *N*-glycolylneuraminic acid using a synthetic precursor, *N*-glycolylmannosamine pentaacetate: inhibition of myelin-associated glycoprotein binding to neutral cells, *Glycobiology*, **2000**, 10, 11-20

<sup>119</sup> Keppler, O.T., Horstkorte, R., Pawlita, M., Schmidt, C., Reutter, W., Biochemical engineering of the *N*-acyl side chain of sialic acid: biological implications, *Glycobiology*, **2001**, 11, 11R-18R; Kayser, H., Ats, C., Lehmann, J., Reutter, W., New amino sugar analogs are incorporated at different rates into glycoproteins of mouse organs, *Experientia*, **1993**, 49, 885-887

*Kuboki et al.* berichten von einer relativen Unsetzungsrate von ManNGc gegenüber ManNAc von 58%<sup>120</sup>.

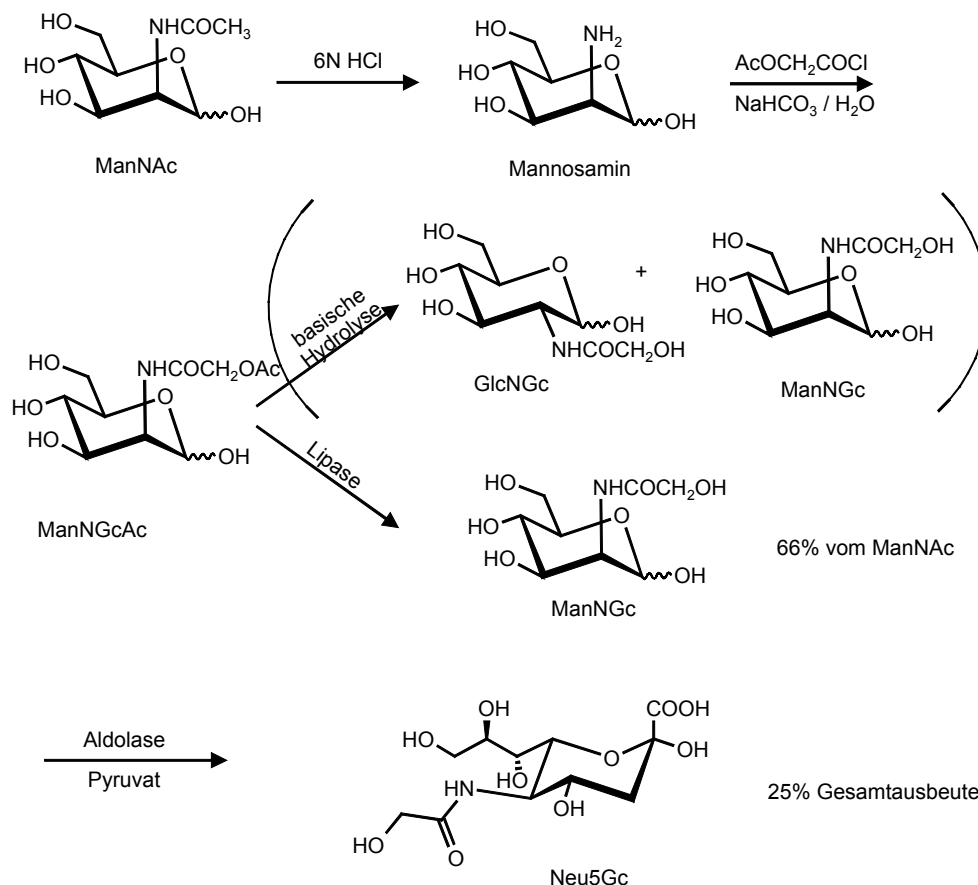
Eine Schwierigkeit bei dieser Synthese ist die Verfügbarkeit des Substrats. *Lubineau et al.* haben GlcNGc in einer vierstufigen Synthese aus Anisalglucosamin in einer Ausbeute über alles von 20% dargestellt und durch alkalische Epimerisierung und fraktionierte Fällung daraus ein ManNGc/GlcNGc Gemisch im Verhältnis von 3/2 gewonnen<sup>121</sup>. Diese fraktionierte Fällung läuft deutlich schlechter als bei ManNAc/GlcNAc und erzielt schlechtere Ausbeuten und ein weniger konzentriertes Mannosederivat (bei ManNAc/GlcNAc 4/1). *Wong et al.* berichten die Synthese von *N*-substituierten Mannosaminderivaten über Kopplung einer Carboxylgruppe an Mannosaminhydrochlorid in Gegenwart von *N*-Hydroxysuccinimid und 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid HCl in Dimethylformamid in einer Ausbeute von 70-88% nach einer Säulenchromatographie<sup>122</sup>. Allerdings wird dort keine Synthese von ManNGc durchgeführt. *Kuboki et al.* haben die in Abbildung 4-2 gezeigte dreistufige chemoenzymatische Route ausgehend von reinem ManNAc für die Synthese von reinem ManNGc mit einer Gesamtausbeute von 66% entwickelt und dieses anschließend Aldolase-katalysiert zu Neu5Gc mit einer Ausbeute von 38% (25% bezogen auf ManNAc) umgesetzt.

---

<sup>120</sup> Kuboki, A., Okazaki, H., Sugai, T., Otha, H., An Expedient Route to *N*-Glycolylneuraminic acid Based on Enzyme-catalysed Reaction, *Tetrahedron*, **1997**, 53, 2387-2400

<sup>121</sup> Lubineau A., Augé, C., Gautheron-LeNarvor, C., Ginet, J.C., Combined chemical and enzymatic synthesis of the sialylated non reducing terminal sequence of GM1b glycolylated ganglioside, a potential human tumor marker. *BioMed. Chem.*, **1994**, 2, 669- 674

<sup>122</sup> Lin, C.-C., Lin, C.-H., Wong, C.-H., Sialic Acid Aldolase-Catalyzed Condensation of Pyruvate and *N*-Substituted Mannosamine: A Useful Method for the Synthesis of *N*-Substituted Sialic Acids, *Tetrahedron Lett.*, **1997**, 38, 2649-2652



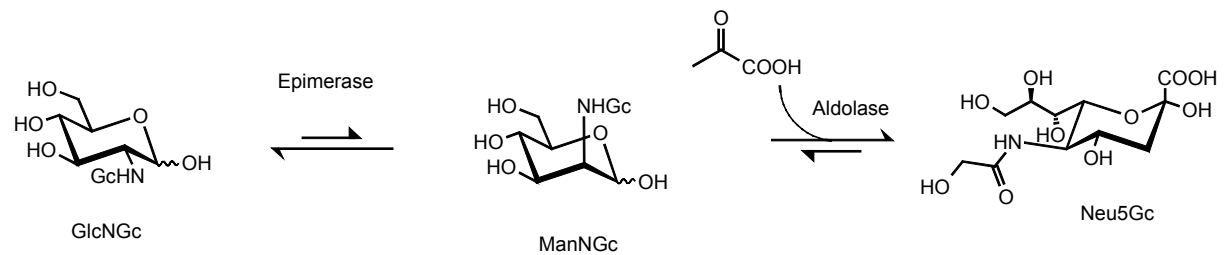
**Abbildung 4-2:** Chemoenzymatische Synthese von ManNGc und Aldolase-katalysierte Neu5Gc Synthese

### 4.3 Synthese von Glycolylneuraminsäure im Zwei-Enzym-System

Eine bisher noch nicht beschriebene Alternative für die Synthese von ManNGc bietet die enzymatische Epimerisierung von GlcNGc mithilfe einer *N*-Acetylglucosamin 2-Epimerase. Diese Variante eröffnet die Möglichkeit der in Abbildung 4-3 gezeigten Zwei-Enzym-Synthese zur Durchführung der Aldolase-katalysierten Neu5Gc Synthese mit *in situ* Generierung von ManNGc durch Epimerase-katalysierte Epimerisierung von GlcNGc, wie sie von Kragl<sup>123</sup> für die Synthese von Neu5Ac beschrieben wurde (s. Kapitel 1.3.4.1).

<sup>123</sup> Kragl, U., Reaktionstechnik biokatalytischer Prozesse am Beispiel der kontinuierlichen Synthese von *N*-Acetylneuraminsäure, Dissertation Universität Bonn, **1992**; Kragl, U., Gygax, D., Ghisalba, O., Wandrey, C., Enzymatic Two-Step Synthesis of *N*-Acetyl-neuraminic Acid in the Enzyme Membrane Reactor, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1991**, 30, 827-828





**Abbildung 4-3:** Synthese von Glycolylneuraminsäure im Zwei-Enzym-System

In der vorliegenden Arbeit soll diese Alternative erschlossen werden und die Erkenntnisse aus der Synthese von Neu5Ac sollen als Grundlage dienen.

### 4.3.1 Epimerase

*N*-Acetylglucosamin 2-Epimerase [E.C. 5.1.3.8] wurde zuerst aus Schweinenieren isoliert<sup>124</sup>. Ihre Rolle im tierischen Stoffwechsel ist noch weitgehend ungeklärt. Möglicherweise spielt sie eine Rolle bei der Synthese von Neu5Ac, wenn der normale Weg über GlcNAc-6-Phosphat und UDP-GlcNAc zum ManNAc blockiert ist<sup>125</sup>. In Bakterien und Hefen ist die Epimerase als katabolisches Enzym induzierbar, allerdings werden nur geringe Aktivitäten erzielt<sup>126</sup>.

ATP wirkt als allosterischer Aktivator der Epimerase, das heißt es vergrößert die Aktivität und die Substrataffinität des Enzyms<sup>127</sup>.

Die *N*-Acetylglucosamin 2-Epimerase gehört zu den Isomerasen, die die Enzymklasse 5 bilden. Der Mechanismus läuft wahrscheinlich ebenso wie der der basenkatalysierten Epimerisierung über ein Enol als Zwischenstufe<sup>128</sup>.

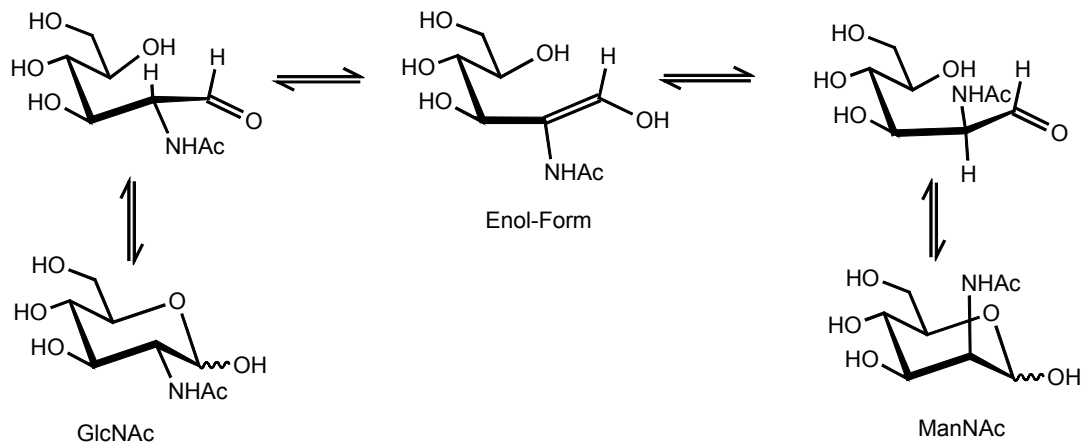
<sup>124</sup> Ghosh, S., Roseman, S., The sialic acids: V. *N*-Acyl-D-glucosamine 2-epimerase, *J. Biol. Chem.*, **1965**, *240*, 1531-1536

<sup>125</sup> Schauer, R., Sialic acids – chemistry, metabolism and function, Springer Verlag, New York, **1982**

<sup>126</sup> Biswas, M., Singh, B., Rai, Y.P., Datta, A., Turnover of inducible *N*-acetylglucosamine catabolic enzymes in *Candida albicans*, *Indian J. Exp. Biol.*, **1982**, *20*, 829-834

<sup>127</sup> Datta, A., Regulatory role of adenosine triphosphate on hog kidney *N*-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase, *Biochemistry*, **1970**, *9*, 3363-3370; Datta, A., *N*-Acetylglucosamin 2-epimerase from hog kidneys, *Methods Enzymol.*, **1975**, *41*, 407-412

<sup>128</sup> Ghosh, S., Roseman, S., The sialic acids: IV. *N*-Acyl-D-glucosamine 6-phosphate 2-epimerase, *J. Biol. Chem.*, **1965**, *240*, 1525-1530; Glaser, L., Epimerases, *The Enzymes Vol 6*, (Hrsg. Boyer, P.D.) Academic Press, New York, **1972**, 355-380



**Abbildung 4-4:** Mechanismus der Epimerisierung von GlcNAc zu ManNAc<sup>129</sup>

Während *Kragl* eine Epimerase der Firma *Toyobo* aus Schweinenieren verwendete, wurde in dieser Arbeit ein Enzym der *Kyoto Research Laboratories Marukin Shoyu Co. LTD* eingesetzt. Nach Aussage der *Kyoto Research Laboratories* handelt es sich dabei um das in *E. coli* überexprimierte Enzym<sup>130</sup>.

### 4.3.2 Epimerase Kinetik

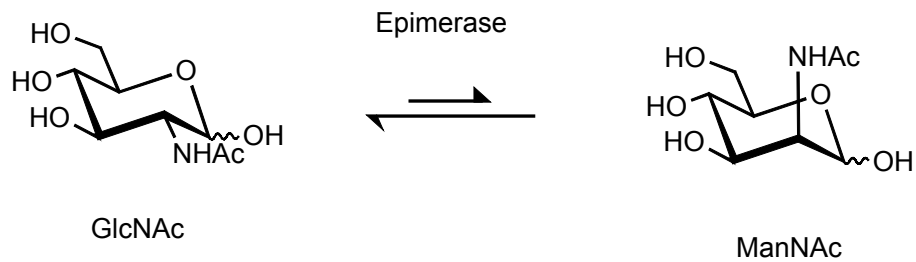
In diesem Kapitel wird die Bestimmung der kinetischen Parameter der *N*-Acetylglucosamin 2-Epimerase beschrieben. Alle Messungen erfolgten durch Anfangsreaktionsgeschwindigkeitsmessungen bis zu einem maximalen Umsatz von 5% bezogen auf den Gleichgewichtsumsatz. Aus den Messungen werden zunächst mit einfachen Michaelis-Menten-Gleichungen die kinetischen Parameter bestimmt, die später in Kapitel 4.3.4 als Startparameter für die Anpassung eines komplexen Modells verwendet werden.

#### 4.3.2.1 Epimerasereaktion mit GlcNAc/ManNAc

Da es sich bei dem hier verwendeten Enzym nicht um das gleiche wie dem von *Kragl* für die ManNAc-Synthese eingesetzten handelt, wurden zunächst einige Messungen zur Kinetik der Epimerasereaktion von GlcNAc und ManNAc durchgeführt um die Ergebnisse später vergleichen zu können (s. Abbildung 4-5).

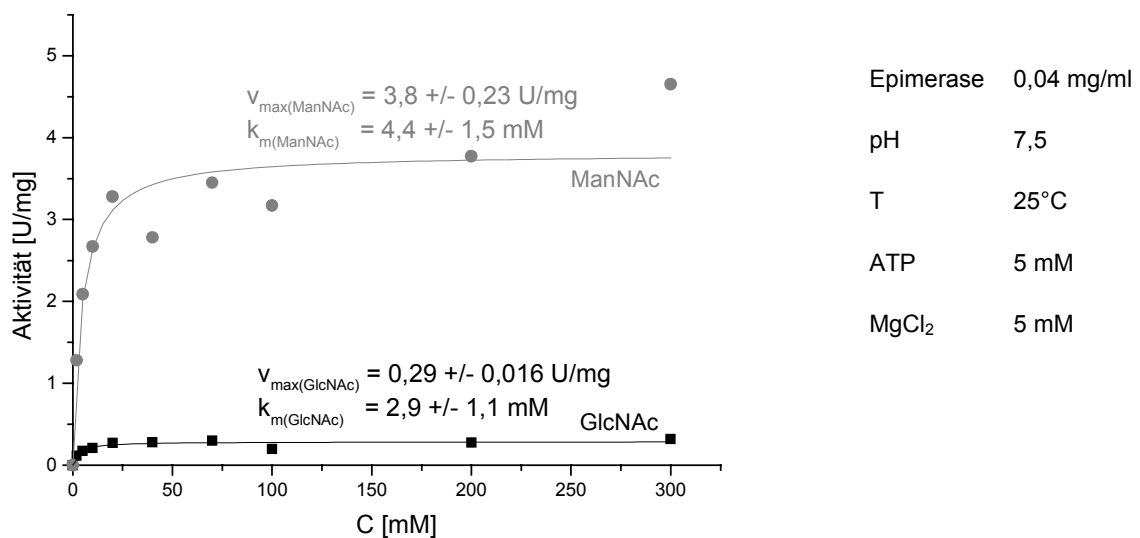
<sup>129</sup> Salo, W., Hamari, M., Hallcher, L., Preparation of [2-<sup>2</sup>H]-2-acetamido-2-deoxy-D-glucose by epimerization of 2-acetamido-2-deoxy-D-mannose in basic deuterium oxide; and proposal of a unifying type of mechanism for the 2-epimerization of 2-acetamido-2-deoxyhexoses, *Carbohydr. Res.*, **1976**, *50*, 287-291

<sup>130</sup> persönliche Mitteilung von T. Daußmann, **1999**



**Abbildung 4-5:** Epimerasereaktion mit GlcNAc/ManNAc

In Abbildung 4-6 ist die Aktivität der Epimerasereaktion in Abhängigkeit von der ManNAc-Konzentration und von der GlcNAc-Konzentration dargestellt.



**Abbildung 4-6:** Aktivität der Epimerasereaktion in Abhängigkeit von der ManNAc- bzw. GlcNAc-Konzentration

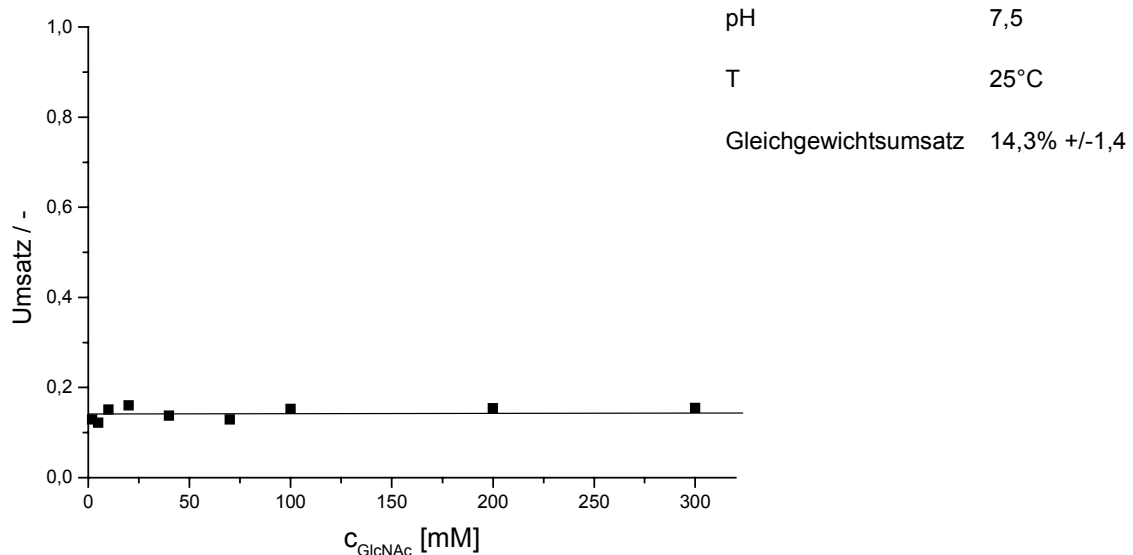
Die kinetischen Parameter  $v_{\max}$  und  $k_m$  wurden hier durch die einfache Michaelis-Menten-Kinetik bestimmt (Gleichung 4-1).

$$v = [E]^{epi} \cdot \frac{c_{(x)} \cdot v_{\max(x)}}{c_{(x)} + k_{m(x)}}$$

**Gleichung 4-1:**

$c_{(x)}$	[mM]	Konzentration der Komponente x
$v_{\max(x)}$	[U/mg]	Reaktionsgeschwindigkeit der Synthese der Komponente x
$[E]^{epi}$	[mg/ml]	Enzymkonzentration der Epimerase
$k_{m(x)}$	[mM]	Michaelis-Menten-Konstante der Komponente x
Komponente x		ManNAc bzw. GlcNAc

In Abbildung 4-7 ist der Gleichgewichtsumsatz in Abhängigkeit von der GlcNAc-Konzentration aufgetragen.



**Abbildung 4-7:** Gleichgewichtslage der Epimerasereaktion von GlcNAc und ManNAc

Aus der Gleichgewichtslage lässt sich mit Hilfe von Gleichung 4-2 die Gleichgewichtskonstante  $K_{eq}$  bestimmen. Die Größen werden in dieser Gleichung in mol/l eingesetzt.

$$K_{eq} = \frac{c_{(\text{ManNAc})}}{c_{(\text{GlcNAc})}}$$

**Gleichung 4-2:**

$$K_{eq} = 0,167 \pm 0,019$$

Tabelle 4-1 zeigt, dass die Epimerase aus *E. coli* sowohl für die Hin- als auch die Rückreaktion um einen Faktor von etwa vier aktiver ist als die Epimerase aus Schweinenieren und außerdem die  $k_m$ -Werte fast um eine Zehnerpotenz niedriger liegen. Die Gleichgewichtskonstante ist allerdings geringer. Die Epimerase aus Schweinenieren liefert im Gleichgewicht 19% ManNAc, wohingegen die Epimerase aus *E. coli* nur 14,3% ManNAc liefert.

Kinetische Parameter	<i>E. coli</i> <sup>1</sup>	Schweinenieren <sup>2</sup>
$v_{max(ManNAc)}$ [U/mg]	3,8 +/- 0,23	0,829
$v_{max(GlcNAc)}$ [U/mg]	0,29 +/- 0,016	0,0780
$k_m(ManNAc)$ [mM]	4,4 +/- 1,5	35,19
$k_m(GlcNAc)$ [mM]	2,9 +/- 1,1	14,01
$K_{eq}$ [-]	0,17 +/- 0,02	0,20

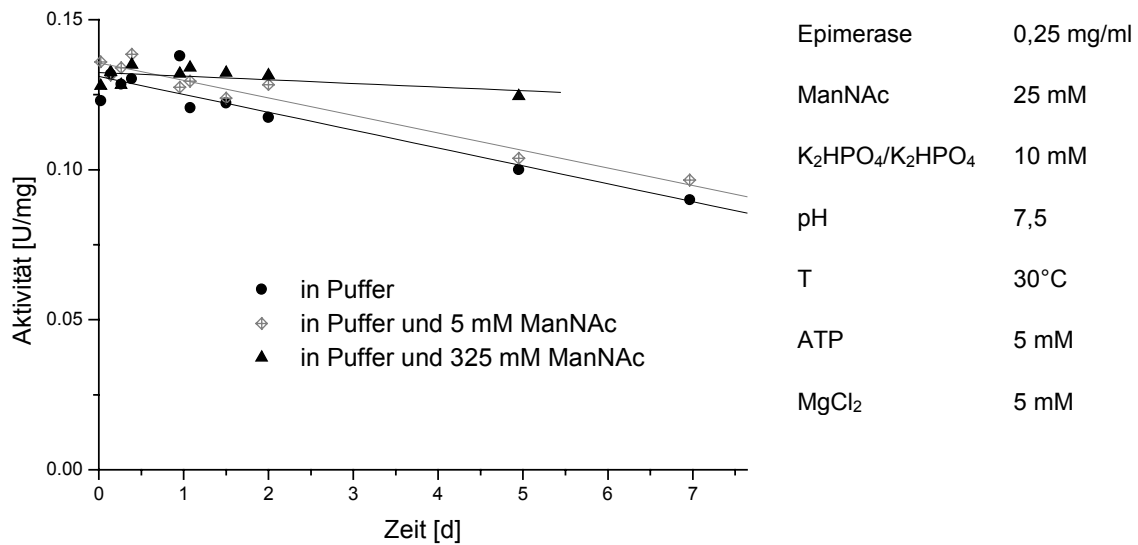
1 in dieser Arbeit verwendet

2 bei Kragl verwendet

**Tabelle 4-1:** Vergleich der kinetischen Parameter der Epimerasen aus *E. coli* und Schweinenieren

Es fällt auf, dass die hier ermittelte Gleichgewichtskonstante leicht von den Ergebnissen von Kragl abweicht. Da sich die Thermodynamik der Reaktion nicht ändert, müssten die Konstanten in beiden Fällen gleich sein. Zieht man allerdings den Fehler in Betracht, so liegen die Ergebnisse in einer durchaus vergleichbaren Größenordnung.

Eine weitere wichtige Größe ist die Stabilität des Enzyms. Wie in Abbildung 4-8 dargestellt, wurde die Stabilität über einen Zeitraum von sieben Tagen gemessen. Da das Substrat generell stabilisierend auf ein Enzym wirken kann, wurde die Messung einmal ohne Substrat, dann mit einer geringen Konzentration von 5 mM ManNAc und außerdem mit einer Konzentration von 325 mM ManNAc durchgeführt.

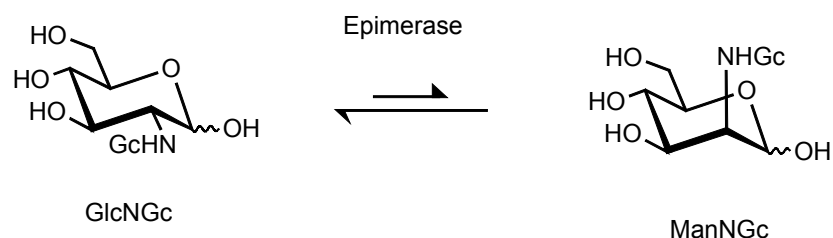


**Abbildung 4-8:** Stabilität der Epimerase in einer 5 mg/ml Lösung mit und ohne Zusatz von Substrat

Die Epimerase zeigt bereits ohne Substratzusatz eine verhältnismäßig gute Stabilität. Nach 5 Tagen ist ein Aktivitätsverlust von 22% zu verzeichnen. Der Zusatz von 5 mM ManNAc hat keine signifikanten Auswirkungen. Allerdings kann der Aktivitätsverlust durch den Zusatz von 325 mM ManNAc, was im Bereich der Konzentration für eine präparative Synthese liegt, auf 5% reduziert werden. Somit kann die Desaktivierung des Enzyms für die weiteren Betrachtungen außer Acht gelassen werden.

#### 4.3.2.2 Epimerasereaktion mit GlcNGc/ManNGc

Nach den Voruntersuchungen am GlcNAc/ManNAc System wurde die Epimerasereaktion auf das in Abbildung 4-9 gezeigte GlcNGc/ManNGc System angewendet. Diese Umsetzung ist bislang nicht für die Epimerase beschrieben worden.



**Abbildung 4-9:** Epimerasereaktion mit GlcNGc/ManNGc

Weder GlcNGc noch ManNGc ist kommerziell verfügbar. Mögliche Syntheserouten für ManNGc sind in Kapitel 4.2 aufgezeichnet. GlcNGc sollte sich analog zur Synthese von Wong *et al.* über die Kopplung der Carboxylgruppe an Glucosaminhydrochlorid in Gegenwart

von *N*-Hydroxysuccinimid und 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid HCl in Dimethylformamid darstellen lassen.

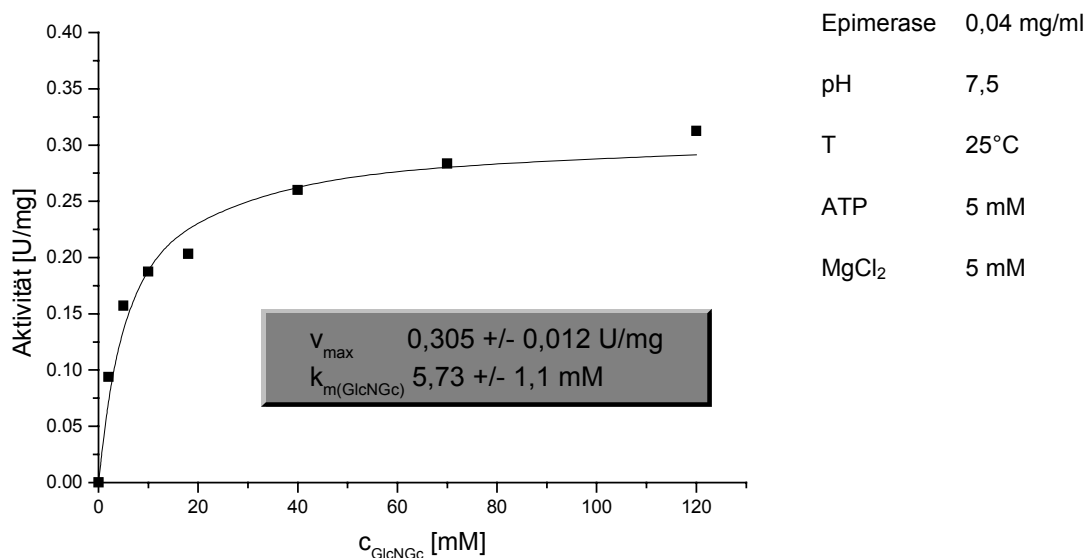
GlcNGc wurde freundlicherweise durch Dr. M. Kittelmann von der Firma Novartis zur Verfügung gestellt. Sein Interesse an den Arbeiten mit diesem System galten der Synthese von CMP-Glycolylneuraminsäure.

ManNGc wurde erst zum Ende dieser Arbeit durch Dr. N. Bovin (M.M. Shemyakin–Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow) zur Verfügung gestellt, der wiederum Interesse an einer präparativen Menge von Neu5Gc hatte.

Für die Epimerasereaktion mit GlcNGc und ManNGc musste eine alternative Analytik gefunden werden, da die HPLC-Methode nicht zur Trennung dieser beiden Epimere in der Lage ist. Auf Basis einer Kapillarelektrophorese-Methode der Firma *Hewlett-Packard* wurde eine Analytik entwickelt und etabliert, die die Trennung von GlcNGc, ManNGc und Neu5Gc gestattet.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die in *E. coli* clonierte *N*-Acetylglucosamin 2-Epimerase in der Lage ist, GlcNGc zu ManNGc umzusetzen.

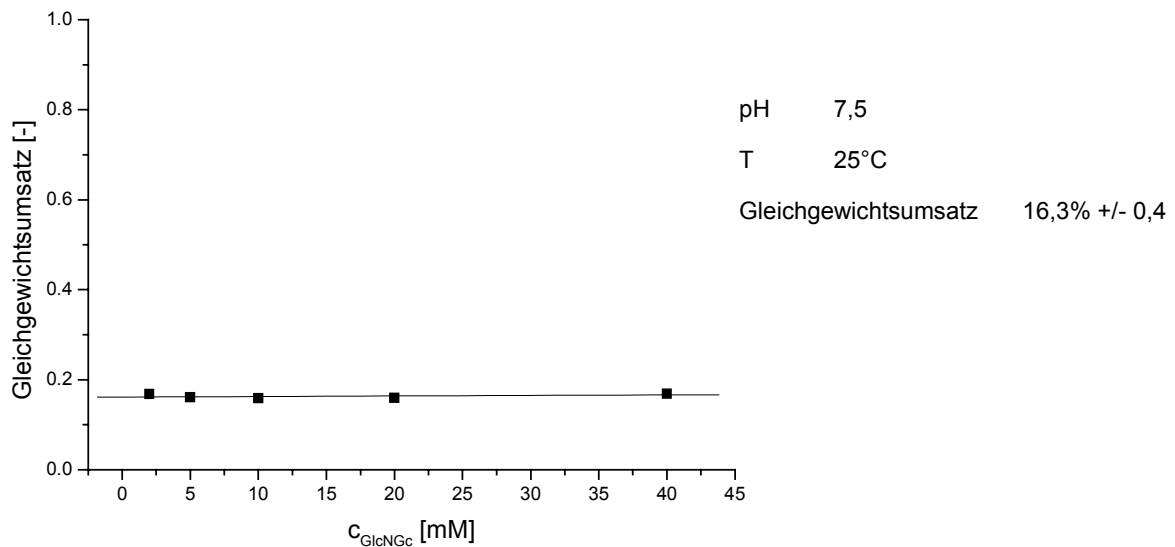
Abbildung 4-10 zeigt die Aktivität der Epimerasereaktion in Abhängigkeit von der GlcNGc-Konzentration.



**Abbildung 4-10:** Aktivität der Epimerasereaktion in Abhängigkeit von der GlcNGc-Konzentration

Die Charakteristik der Kurve ist dem Verlauf bei GlcNAc sehr ähnlich. Der wiederum durch die Michaelis-Menten-Gleichung in Gleichung 4-1 bestimmte  $v_{\max}$  Wert ist annähernd identisch. Der  $k_m$ -Wert liegt für GlcNGc etwa doppelt so hoch.

Der Gleichgewichtsumsatz der Reaktion ist in Abbildung 4-11 gezeigt.



**Abbildung 4-11:** Gleichgewichtslage der Epimerasereaktion von GlcNGc und ManNGc

Der Gleichgewichtsumsatz liegt mit 16,3 % um 2% höher als bei dem GlcNAc/ManNAc System. Daraus lässt sich wiederum durch Gleichung 4-3 die Gleichgewichtskonstante  $K_{eq} = 0,195$  bestimmen.

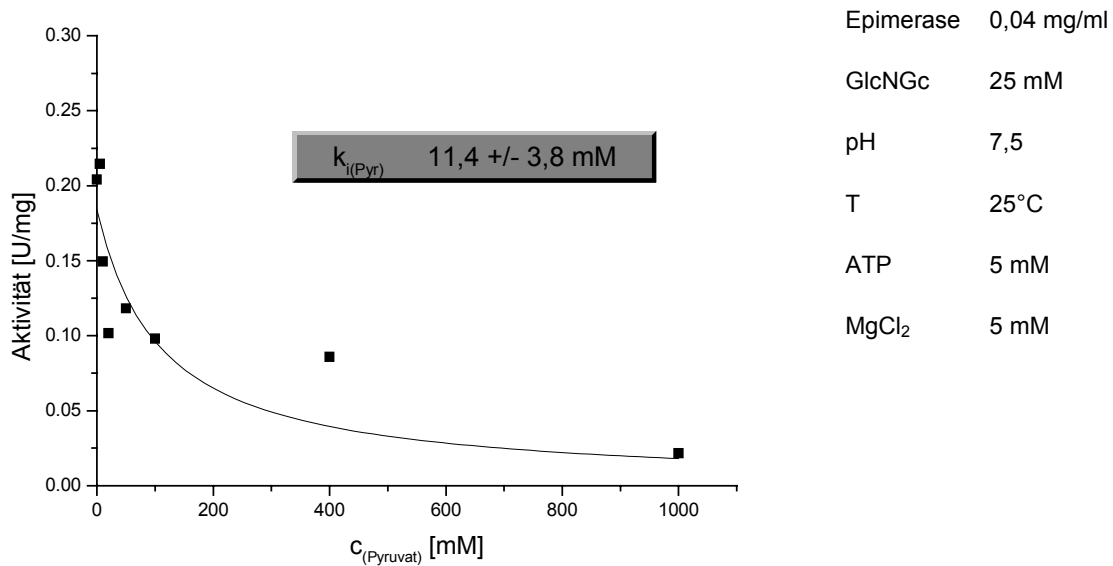
$$K_{eq} = \frac{c_{(ManNGc)}}{c_{(GlcNGc)}}$$

**Gleichung 4-3:**

$$K_{eq} = 0,195 \pm 0,007$$

Da das Enzym in einer Zwei-Enzymreaktion mit der Aldolase zum Einsatz kommen soll, muss auch der Einfluss der Komponenten dieser Reaktion durch eventuelle Querinhibierungen untersucht werden. Daher wurde die Abhängigkeit der Epimerasereaktion von der Pyruvatkonzentration und von der Neu5Gc-Konzentration gemessen. Neu5Gc beeinflusst, anders als bei *Kragl*, die Epimerase in keiner Weise. Für Pyruvat wird allerdings, wie in Abbildung 4-12 gezeigt, eine deutliche Inhibierung gemessen.





**Abbildung 4-12:** Inhibition der Epimerase-katalysierten Reaktion von GlcNGc zu ManNGc durch Pyruvat

Über eine Michaelis-Menten Gleichung mit einer kompetitiven Inhibition durch Pyruvat lässt sich ein  $k_i$  Wert von 11,38 mM bestimmen. Bei *Kragl* wurde für die Hinreaktion keine signifikante Inhibition durch Pyruvat gefunden, sondern lediglich für die Rückreaktion, also die Synthese von GlcNAc.

Kinetische Parameter	Epimerase <i>E. coli</i>
$v_{max}(\text{GlcNGc})$ [U/mg]	0,305 +/- 0,012
$k_m(\text{GlcNGc})$ [mM]	5,73 +/- 1,1
$k_i(\text{Pyr})$ [mM]	11,4 +/- 3,8
$K_{eq}$ [-]	0,195 +/- 0,007

**Tabelle 4-2:** Zusammenstellung der kinetischen Parameter der Epimerisierung vom GlcNGc durch die Epimerase aus *E. coli*

Die Aktivität der Epimerase für die Synthese von ManNGc wird hier unter den in Tabelle 4-3 angegebenen Standardassaybedingungen auf 0,26 U/mg festgelegt.

GlcNGc	40 mM	
Epimerase	0,4 mg/ml	
pH	7,5	10 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
T	25°C	

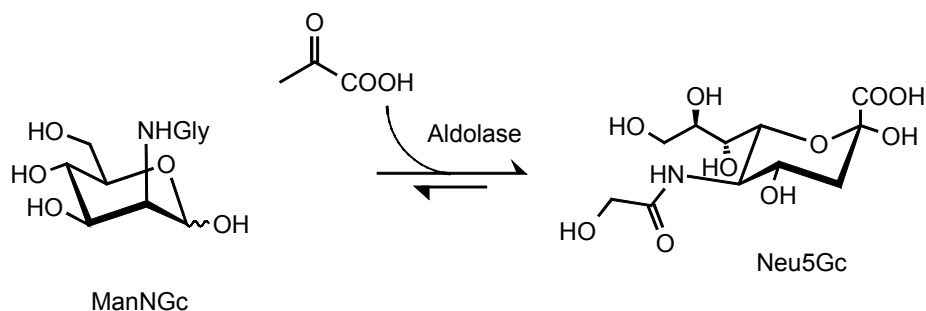
ATP            5 mM  
MgCl<sub>2</sub>        5 mM

**Aktivität: 0,26 U/mg**

**Tabelle 4-3:** Standardassay zur Aktivitätsmessung der Epimerase für die Synthese von ManNGc

### 4.3.3 Aldolase Kinetik

In dem angestrebten Zwei-Enzym-System wird in der Folgereaktion, wie in Abbildung 4-13 gezeigt, das durch die Epimerase *in situ* gebildete ManNGc unter Zugabe von Pyruvat in der Aldolase-katalysierten Aldolkondensation zu Neu5Gc umgesetzt.



**Abbildung 4-13:** Aldolase-katalysierte Reaktion von ManNGc und Pyruvat zu Neu5Gc

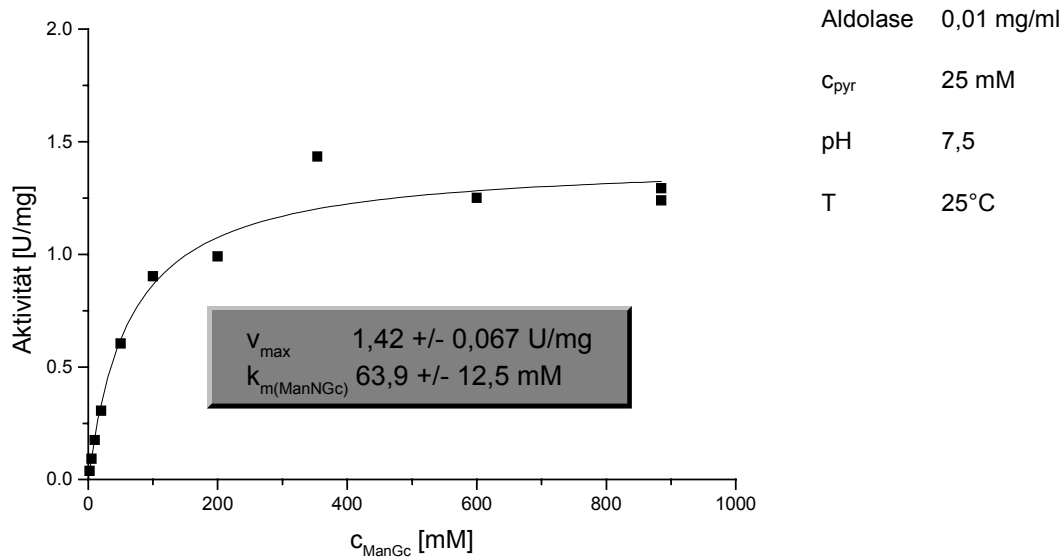
Die Aldolasereaktion für die Synthese von Neu5Gc wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben (s. Kapitel 4.2). Bislang ist allerdings noch keine kinetische Charakterisierung des Systems erfolgt. Eine solche Charakterisierung ist aber unbedingt sinnvoll, da nur so vernünftige Reaktionsbedingungen ermittelt werden können, die maximale Umsätze bei moderaten Reaktionszeiten erlauben. Da es sich bei den Ausgangssubstanzen um teure Verbindungen handelt, ist dieses von besonderer Wichtigkeit.

Auch hier erfolgten alle Messungen durch Anfangsreaktionsgeschwindigkeitsmessungen bis zu einem maximalen Umsatz von 5% bezogen auf den Gleichgewichtsumsatz. Auch aus diesen Messungen werden zunächst mit einfachen Michaelis-Menten-Gleichungen die kinetischen Parameter bestimmt, die später in Kapitel 4.3.4 als Startparameter für die Anpassung eines komplexen Modells verwendet werden. Da unter Anfangsreaktionsbedingungen gemessen wird ist dieses Vorgehen zur Ermittlung der Startparameter zulässig, obwohl ein einfaches Michaelis-Menten Modell nicht für die Beschreibung einer Gleichgewichtsreaktion geeignet ist. Das Modell wird nach dem Studium der Charakteristiken dieser kinetischen Messungen aus dem Literaturmodell<sup>131</sup> abgeleitet.

<sup>131</sup> Kragl, U., Reaktionstechnik biokatalytischer Prozesse am Beispiel der kontinuierlichen Synthese von *N*-Acetylneuraminsäure, Dissertation Universität Bonn, 1992

### 4.3.3.1 Hinreaktion

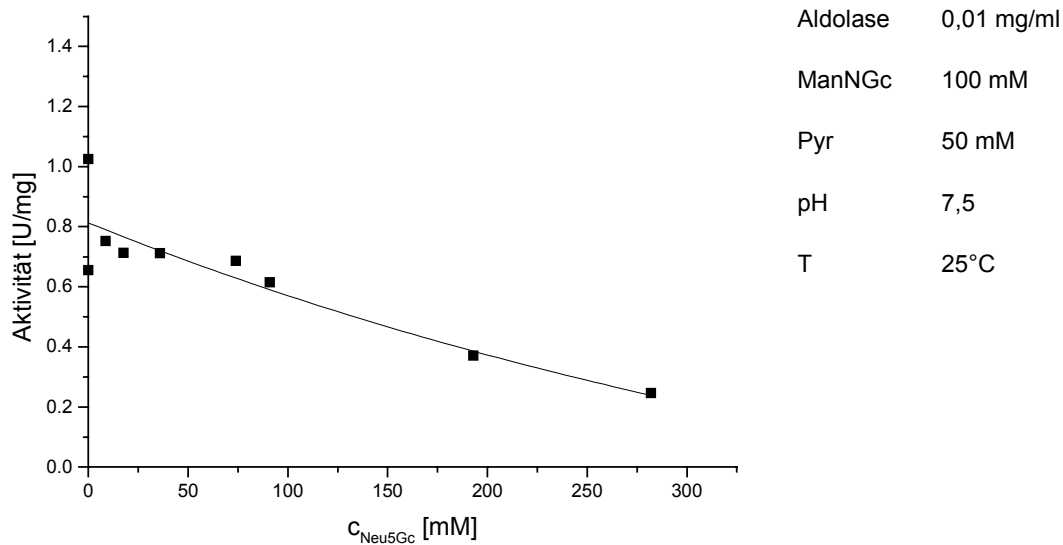
Die Abhängigkeit der Neu5Gc Synthesereaktion von der ManNGc-Konzentration ist in Abbildung 4-14 abgebildet.



**Abbildung 4-14:** Abhängigkeit der Aldolase-katalysierten Synthese von Neu5Gc von der ManNGc-Konzentration

Mit einer Michaelis-Menten-Doppelsubstratkinetik wird eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit von 1,42 U/mg und ein  $k_{\text{m}}$ -Wert von 63,9 mM für ManNGc bestimmt.

Die Abhängigkeit der Synthese von der Produktkonzentration ist in Abbildung 4-15 dargestellt.

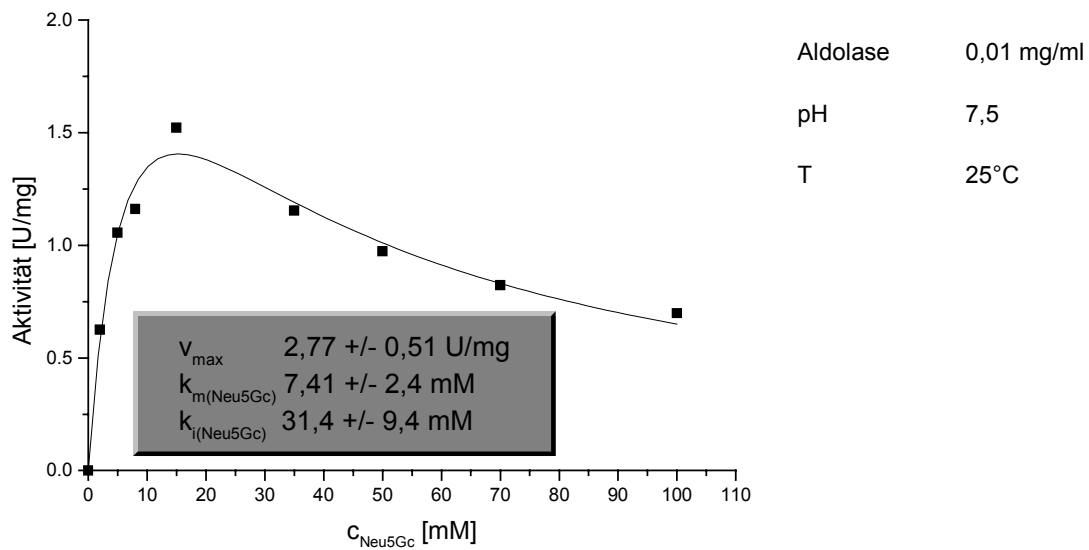


**Abbildung 4-15:** Abhängigkeit der Aldolase-katalysierten Synthese von Neu5Gc von der Neu5Gc-Konzentration

Das Produkt führt, wie zu erwarten, zu einer Verminderung der Reaktionsgeschwindigkeit, was ist auf die mit zunehmender Produktkonzentration einsetzende Konkurrenzreaktion, die Spaltung der Neu5Gc, zurückzuführen ist.

#### 4.3.3.2 Rückreaktion

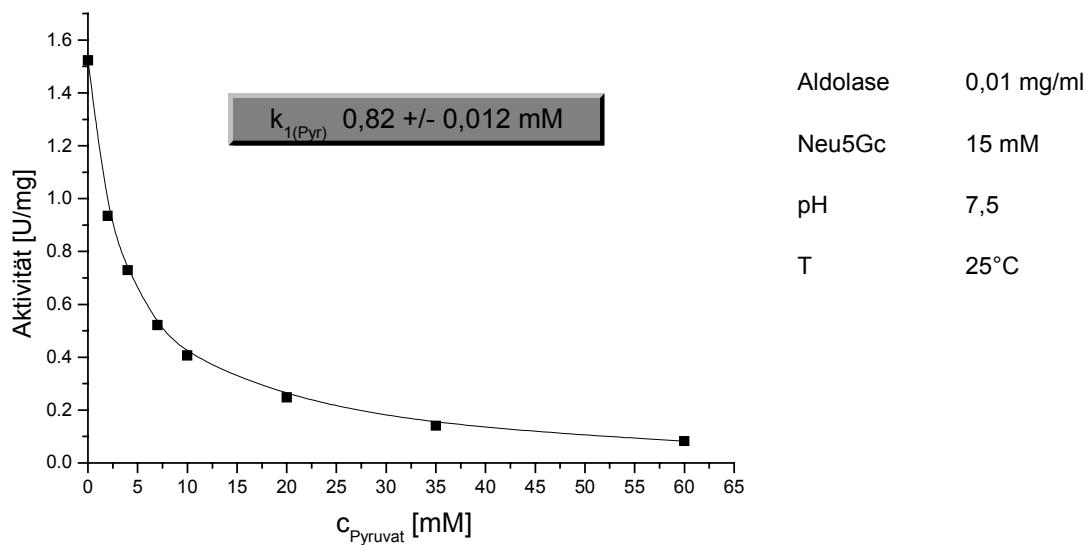
Für die Spaltung des Produktes ist die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Neu5Gc-Konzentration in Abbildung 4-16 aufgezeigt.



**Abbildung 4-16:** Abhängigkeit der Aldolase-katalysierten Spaltung von Neu5Gc von der Neu5Gc-Konzentration

Der Verlauf zeigt die Charakteristik einer Substratüberschußinhibierung. Mit einer entsprechenden Michaelis-Menten-Gleichung lassen sich die maximale Reaktionsgeschwindigkeit auf 2,77 U/mg, der  $k_m$ -Wert auf 7,41 mM und der  $k_i$  Wert auf 31,4 mM bestimmen.

Wie in Abbildung 4-17 gezeigt unterliegt die Rückreaktion einer starken Inhibierung durch Pyruvat.



**Abbildung 4-17:** Abhängigkeit der Aldolase-katalysierten Spaltung von Neu5Gc von der Pyruvatkonzentration

Der  $k_i$  Wert wird auf 0,82 mM bestimmt. Diese Inhibition wird dazu beitragen, dass eine hohe Pyruvatkonzentration den Gleichgewichtsumsatz zugunsten des Produktes verlagert, obwohl sich die Gleichgewichtskonstante natürlich nicht ändert.

Kinetische Parameter	Aldolase
<b>Hinreaktion</b>	
$v_{max}$ [U/mg]	1,42 +/- 0,067
$k_m(ManNGc)$ [mM]	63,9 +/- 12,5
<b>Rückreaktion</b>	
$v_{max}$ [U/mg]	2,77 +/- 0,51
$k_m(Neu5Gc)$ [mM]	7,41 +/- 2,4
$k_i(Neu5Gc)$ [mM]	31,4 +/- 9,4
$k_i(Pyruv)$ [mM]	0,82 +/- 0,012

**Tabelle 4-4:** Zusammenstellung der kinetischen Parameter der Synthese und Spaltung von Neu5Gc durch die Aldolase

Die Aktivität der Aldolase für die Synthese von Neu5Gc wird hier unter den in Tabelle 4-5 angegebenen Standardassaybedingungen auf 1,07 U/mg festgelegt.

---

ManNGc	200 mM	
Pyr	25 mM	
Aldolase	0,01 mg/ml	
pH	7,5	10 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
T	25°C	

**Aktivität: 1,07 U/mg**

**Tabelle 4-5:** Standardassay zur Aktivitätsmessung der Aldolase für die Synthese von Neu5Gc

---

#### 4.3.4 Kinetisches Modell

Obwohl das System nicht vollständig untersucht worden ist, soll der Versuch unternommen werden, mit den in den Kapiteln 4.3.2 und 4.3.3 gewonnenen Daten ein kinetisches Modell aufzustellen und dieses durch die Anpassung der Parameter an die in Kapitel 4.3.5 beschriebenen Satzreaktorversuche zu verifizieren.

##### 4.3.4.1 Epimerase

Bei der Epimerasereaktion handelt es sich um eine ausgeprägte Gleichgewichtsreaktion. Es ist daher wesentlich, die Gleichgewichtslage in das Modell einzubeziehen. Außerdem muss der Querinhibierung durch Pyruvat Rechnung getragen werden. In Zusammenarbeit mit Frau *Findrik* aus dem Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. *Vasic-Racki*<sup>x</sup> wurde für diese Reaktion der in Gleichung 4-4 dargestellte Gleichgewichtsansatz aufgestellt.

---

<sup>x</sup> Universität Zagreb, Fakultät Chemieingenieurwesen, Abteilung Reaktionstechnik und Katalyse

$$v_{Epi} = [E]^{epi} \cdot v_{\max}^{epi} \frac{c_{(GlcNGc)} - \frac{c_{(ManNGc)}}{K_{eq}^{epi}}}{k_m(GlcNGc) \cdot \left( 1 + \frac{c_{(ManNGc)}}{k_m^{epi}(ManNGc)} + \frac{c_{(Pyr)}}{k_i^{epi}(Pyr)} \right) + c_{(GlcNGc)}}$$

**Gleichung 4-4**

$c_{(x)}$	[mM]	Konzentration der Komponente x
$v_{Epi}$	[U/mg]	Reaktionsgeschwindigkeit der ManNGc-Synthese
$[E]^{epi}$	[mg/ml]	Enzymkonzentration der Epimerase
$v_{\max}^{epi}$	[U/mg]	maximale massenspezifische Aktivität der Synthese
$K_{eq}^{epi}$	[mM]	Gleichgewichtskonstante der ManNGc-Synthese
$k_m(GlcNGc)$	[mM]	Michaelis-Menten-Konstante der Komponente GlcNGc
$k_m^{epi}(ManNGc)$	[mM]	Michaelis-Menten-Konstante der Komponente ManNGc
$k_i^{epi}(Pyr)$	[mM]	Inhibierungskonstante der Komponente Pyruvat

Diese Gleichung berücksichtigt die Lage des Gleichgewichts durch die Einbeziehung der Größe  $K_{eq}$ , die aus der Messung in Abbildung 4-11 ermittelt wurde. So kann auf die nicht ermittelte Geschwindigkeit der Rückreaktion verzichtet werden, da diese durch die *Haldane*-Beziehung, die in Gleichung 4-5 dargestellt ist, in der Größe  $K_{eq}$  enthalten ist. Diese Beziehung verknüpft die thermodynamischen und die kinetischen Konstanten miteinander. Voraussetzung für die Gültigkeit der Beziehung ist das Vorliegen des Gleichgewichtszustands.

$$K_{eq}^{epi} = \frac{v_{\max}^{epi} \cdot k_m^{epi}(ManNGc)}{v_{\max}^{epi} \cdot k_m^{epi}(GlcNGc)} \quad \text{für} \quad \frac{d[ManNGc]}{dt} = 0$$

**Gleichung 4-5**

Löst man die Gleichung nach  $v_{\max}^{epi}$  auf und setzt die Werte aus Tabelle 4-2 ein, dann erhält man einen den Wert 1,20 U/mg für die maximale Reaktionsgeschwindigkeit der Rückreaktion. Für den ebenfalls nicht ermittelten Wert  $k_m(ManNGc)$  wird in erster Näherung der aus Abbildung 4-6 bestimmte Wert für das Substrat ManNAc eingesetzt, da für die Glucoseform die  $k_m$ -Werte für das *N*-Acetyl- und das *N*-Glycolylderivat sehr ähnlich liegen. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit für die Hinreaktion und der  $k_m$ -Wert für GlcNGc wurden aus der Messung in Abbildung 4-10 bestimmt. Der in der Gleichung präsente  $k_i$ -Wert für Pyruvat wurde aus Abbildung 4-12 ermittelt.



#### 4.3.4.2 Aldolase

Für die Aldolasereaktion wird das von *Kragl* verwendete Modell für einen *ordered bi-uni*-Mechanismus vorausgesetzt. Für die Ableitung der Geschwindigkeitsgleichung (Gleichung 4-6) gibt es mehrere schematische Methoden, die bei Segel und Cornish-Bowden ausführlich beschrieben werden<sup>132</sup>.

Auch bei dieser Reaktion handelt es sich um eine ausgeprägte Gleichgewichtsreaktion. Die Reaktionsgeschwindigkeit für die Synthese von Neu5Gc wird durch die Differenz aus der Synthesegeschwindigkeit und der Spaltungsgeschwindigkeit beschrieben. Für die Herleitung des Modells wurde ein *steady-state* Ansatz (Fließgleichgewicht) gewählt. Dieser Ansatz geht davon aus, dass sich bald nach Beginn der Reaktion eine konstante Konzentration eines Enzym-Substrat-Komplexes einstellt ( $d[ES]/dt = 0$ ).

---

<sup>132</sup> Segel, I.H., *Enzyme kinetics – behaviour and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems*, John Wiley & Sons, New York, **1975**, speziell Kapitel 2 und 9; Cornish-Bowden, A., *Fundamentals of enzyme kinetics*, Butterworths, London, **1981**, speziell Kapitel 4 und 6

$$v_{ald} = \frac{d[Neu5Gc]}{dt} = \frac{[E]^{ald} \cdot \left( \frac{v_{max}^{ald} \cdot c_{(Pyr)} \cdot c_{(ManNGc)}}{k_{i(Pyr)}^{ald} \cdot k_{m(ManNGc)}^{ald}} - \frac{v_{max}^{ald} \cdot c_{(Neu5Gc)}}{k_{m(Neu5Gc)}^{ald}} \right)}{1 + \frac{c_{(Pyr)}}{k_{i(Pyr)}^{ald}} + \frac{k_{m(Pyr)} \cdot c_{(ManNGc)}}{k_{i(Pyr)}^{ald} \cdot k_{m(ManNGc)}^{ald}} + \frac{c_{(Pyr)} \cdot c_{(ManNGc)}}{k_{i(Pyr)}^{ald} \cdot k_{m(ManNGc)}^{ald}} + \frac{c_{(Neu5Gc)}}{k_{m(Neu5Gc)}^{ald}} + \frac{c_{(Neu5Gc)} \cdot c_{(ManNGc)}}{k_{i(ManNGc)} \cdot k_{m(Neu5Gc)}^{ald}}}$$

**Gleichung 4-6:**

$c_{(x)}$	[mM]	Konzentration der Komponente x
$v_{ald}$	[U/mg]	Reaktionsgeschwindigkeit der Neu5Gc-Synthese
$[E]^{ald}$	[mg/ml]	Enzymkonzentration der Aldolase
$v_{max}^{ald}$	[U/mg]	maximale massenspezifische Aktivität der Synthese
$v_{max}^{ald}$	[U/mg]	maximale massenspezifische Aktivität der Spaltung
$k_{m(ManNGc)}^{ald}$	[mM]	Michaelis-Menten-Konstante der Komponente ManNGc
$k_{m(Pyr)}$	[mM]	Michaelis-Menten-Konstante der Komponente Pyruvat
$k_{m(Neu5Gc)}$	[mM]	Michaelis-Menten-Konstante der Komponente Neu5Gc
$k_{i(ManNGc)}$	[mM]	Inhibierungskonstante der Komponente ManNGc
$k_{i(Pyr)}^{ald}$	[mM]	Inhibierungskonstante der Komponente Pyruvat

Bei der Gleichung handelt es sich formal um die Differenz der beiden Michaelis-Menten Kinetiken für die Hin- und Rückreaktion, die um  $k_{i(Pyr)}$  und  $k_{m(ManNGc)}$  bzw.  $k_{m(Neu5Gc)}$  erweitert und mit einigen Vereinfachungen zu einem Term zusammengezogen wurden. Durch die Erweiterungen wird die Gleichgewichtslage der Reaktion berücksichtigt, da die Größen, die nach der Gleichung von *Haldane* (Gleichung 4-7) das Gleichgewicht bestimmen, in diese Gleichung einfließen.

$$K_{eq}^{ald} = \frac{v_{max}^H \cdot k_{m(Neu5Gc)}}{v_{max}^R \cdot k_{i(Pyr)} \cdot k_{m(ManNGc)}} \quad \text{für} \quad \frac{d[Neu5Gc]}{dt} = 0$$

**Gleichung 4-7:**

$$K_{eq}^{ald} \quad [l/mol]$$

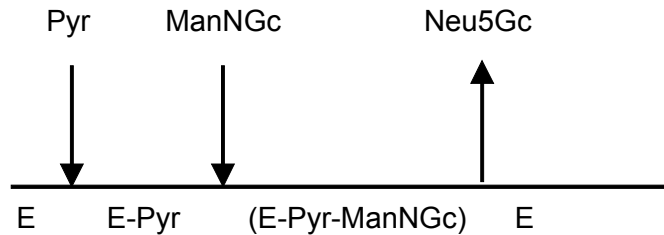
- $v_{\max}$  ist die maximale massenspezifische Aktivität. Das Produkt  $v_{\max} * [E]$  beschreibt die maximal erreichbare Reaktionsgeschwindigkeit, wenn die Sättigungskonzentration beider Substrate (Hinreaktion) oder des Substrates (Rückreaktion) erreicht wird.
- $k_{m(\text{ManNGc})}$ ,  $k_{m(\text{Pyr})}$  und  $k_{m(\text{Neu5Gc})}$  sind die Michaelis-Menten Konstanten der Substrate, wobei im Fall der Hinreaktion für das zweite Substrat die Sättigungskonzentration vorliegt.
- $k_{i(\text{Pyr})}$  ist die Dissoziationskonstante des Enzym-Pyruvat-Komplexes und spielt nur eine Rolle, wenn die Konzentration von ManNGc gegen null geht.
- $k_{i(\text{ManNGc})}$  beschreibt den inhibierenden Einfluss von ManNGc auf die Rückreaktion.
- Die Form der einzelnen Terme ergibt sich aus dem formalkinetischen Ansatz zur Ableitung der Geschwindigkeitsgleichung. Ein anschaulicher Grund für das Auftreten des Produktes  $c_{(\text{Neu5Gc})} * c_{(\text{ManNGc})}$  im sechsten Term des Nenners lässt sich nicht angeben. Aus den Zahlenwerten nach Einsetzen der Werte aus Tabelle 4-6 ergibt sich, dass dieser Term für die Synthese die Produktinhibierung bei hohen Substratkonzentrationen sowie die Inhibierung der Spaltung durch die Komponente ManNGc beschreibt.
- Bei niedrigen Substratkonzentrationen wirkt sich zugegebenes Produkt vor allem in den Zahlenwerten des Zählers aus, da dann aufgrund der Gleichgewichtslage die Spaltung abläuft.
- Der vierte Term im Nenner  $c_{(\text{Pyr})} * c_{(\text{ManNGc})}$  spielt nur bei hohen Substratkonzentrationen eine Rolle.
- Der dritte Term im Nenner  $k_{m(\text{Pyr})} * c_{(\text{ManNGc})}$  trägt unter allen denkbaren Bedingungen nur einen vernachlässigbaren Teil zum Gesamtwert des Nenners bei. Dies ist kein Anzeichen für ein fehlerhaftes kinetisches Modell. Entfernt man den Quotienten  $k_{m(\text{pyr})}/k_{i(\text{Pyr})}^{\text{ald}}$  aus diesem Term, so gelangt man zum Modell eines *random*-Mechanismus, der den einfachsten Fall für eine Zweisubstratreaktion darstellt<sup>133</sup>. Durch den um zwei Größenordnungen höheren  $k_m$ -Wert für das zweite Substrat ManNGc wird auch bei der Annahme eines *random*-Mechanismus durch die sehr viel höhere Affinität des Pyruvats zum Enzym eine Bindungsreihenfolge berücksichtigt.

Zwei der in Gleichung 4-6 aufgeführten Parameter wurden in Kapitel 4.3.3 nicht bestimmt. Es handelt sich dabei um die Größen  $k_{m(\text{Pyr})}$  und  $k_{i(\text{ManNAC})}$ .

Der *ordered bi-uni*-Mechanismus ist bezüglich der beiden Substrate nicht symmetrisch. In diesem Fall wird, wie in Abbildung 4-18 schematisch dargestellt, Pyruvat zuerst an das Enzym gebunden und erst anschließend bindet ManNGc.

---

<sup>133</sup> Biselli, M., Enzymkatalysierte Racematspaltung von Aminosäuren mit integrierter Rückführung, dargestellt am Beispiel der Umsetzung von D,L-Alanin zu L-Alanin, Dissertation Universität Bonn, 1991



**Abbildung 4-18:** Schematische Darstellung der Substratbindung beim *ordered bi-uni*-Mechanismus

So erscheint die Annahme zulässig, dass die Bindung des Pyruvats nicht durch die Beschaffenheit des Mannosederivates beeinflusst wird. Daher wird der hier nicht bestimmte  $k_m$ -Wert für Pyruvat mit dem von *Kragl* bestimmten  $k_m$ -Wert gleichgesetzt. Da dieser Wert mit 0,136 mM sehr klein ist, fiel selbst eine stärkere Abweichung nicht ins Gewicht, da das Pyruvat in ausreichend hoher Konzentration eingesetzt wird, um auch bei einem höheren Wert in Sättigungskonzentration vorzuliegen.

Der  $k_i$ -Wert von ManNGc beschreibt die Konkurrenz von ManNGc zu Neu5Gc um die Bindung an das Enzym. Die Affinität des Substrates ManNGc wird durch den  $k_m$ -Wert von ManNGc, der für die Hinreaktion bestimmt wurde, erfasst. Somit sind der  $k_m$ -Wert und der  $k_i$ -Wert miteinander korreliert. Daher erscheint die Annahme zulässig, dass das Verhältnis  $k_{m(\text{ManNGc})}$  zu  $k_{i(\text{ManNGc})}$  die gleiche Größenordnung aufweist wie das Verhältnis der von *Kragl* bestimmten Größen  $k_{m(\text{ManNAc})}$  und  $k_{i(\text{ManNAc})}$  von  $402,2/23,8 = 16,9$ .

Um die so abgeschätzten Parameter zu verifizieren, eignet sich eine Anpassung an Satzreaktorversuche. Diese Methode hat grundsätzlich den Vorteil, zum einen die Erfassung der Parameter über einen großen Umsatzbereich zu ermöglichen und zum anderen alle relevanten Größen, auch die nicht durch Anfangsreaktionsgeschwindigkeitsmessungen bestimmten, zu ermitteln.

Unter Zuhilfenahme der folgenden Stoffbilanzen lassen sich die Modelle für beide Teilreaktionen zur Beschreibung von Satzreaktorversuchen mit dem Zwei-Enzym-System für die Synthese von Neu5Gc aus GlcNGc und Pyruvat einsetzen.

$$\begin{aligned}\frac{d[\text{GlcNGc}]}{dt} &= -v_{\text{epi}} \\ \frac{d[\text{ManNGc}]}{dt} &= -v_{\text{ald}} + v_{\text{epi}} \\ \frac{d[\text{Pyr}]}{dt} &= -v_{\text{ald}} \\ \frac{d[\text{Neu5Gc}]}{dt} &= v_{\text{ald}} \\ [\text{Pyr}]_0 &= [\text{Pyr}] + [\text{Neu5Gc}] \\ [\text{GlcNGc}]_0 &= [\text{GlcNGc}] + [\text{ManNGc}] + [\text{Neu5Gc}]\end{aligned}$$

---

**Gleichung 4-8:** Stoffbilanzen der Reaktanten des Zwei-Enzym-Systems
 

---

Die Anpassung der Parameter erfolgt durch Simplex-Optimierung mit Hilfe des Programms "Scientist". Dazu werden Gleichung 4-4 bis Gleichung 4-8 als kinetische- bzw. Stoffbilanzgleichungen eingesetzt. Als unabhängige Variable werden die Größen  $T$ ,  $[\text{Pyr}]_0$ ,  $[\text{GlcNGc}]_0$ ,  $E_{\text{epi}}$ ,  $E_{\text{ald}}$ , als abhängige Variable die Größen  $[\text{Neu5Gc}]$ ,  $[\text{Pyr}]$ ,  $[\text{GlcNGc}]$ ,  $[\text{ManNGc}]$ , und als Parameter die in Tabelle 4-6 aufgeführten Größen eingesetzt. Die Anpassung wird an die in Abbildung 4-22 dargestellten Satzreaktorversuche durchgeführt. Diese Versuche wurden unter Variation der Startkonzentrationen  $[\text{Pyr}]_0$ ,  $[\text{GlcNGc}]_0$ , und der Enzymkonzentrationen  $E_{\text{epi}}$ ,  $E_{\text{ald}}$  durchgeführt.

Als Ausgangswerte für die Parameteroptimierung werden die durch Michaelis-Menten-Gleichungen aus den Messungen in Abbildung 4-10 bis Abbildung 4-12 und Abbildung 4-14 bis Abbildung 4-17 ermittelten Werte eingesetzt. Die Gleichgewichtskonstante der Gesamtreaktion  $K_{\text{eq}}^{\text{ges}}$  bestimmt sich als Produkt der beiden einzelnen Gleichgewichtskonstanten.

Alle Parameter sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt. Die Tabelle enthält die Startwerte und die an die Satzreaktorversuche angepassten Parameter.

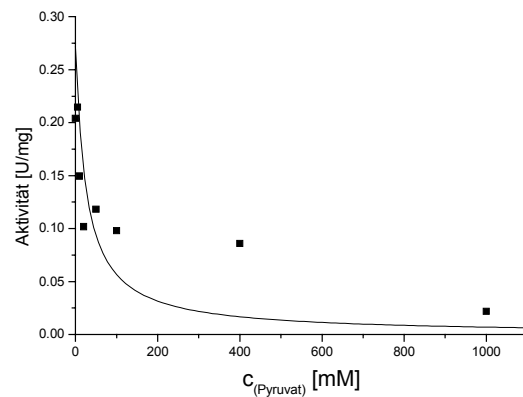
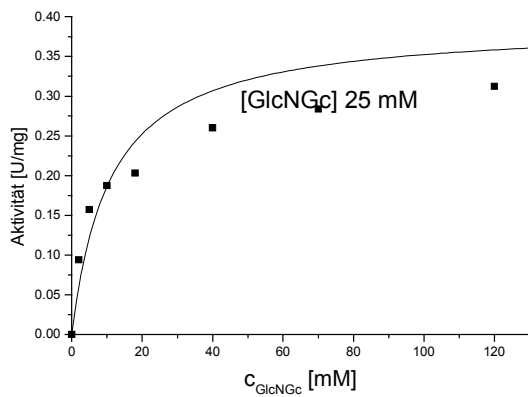
Parameter	Einheit	Anfangsreaktionsgeschwindigkeitsmessungen	alternative Bestimmung	Satzreaktoranpassung
$v_{\max}^{\text{epi}^H}$	U/mg	0,305		0,391
$v_{\max}^{\text{ald}^H}$	U/mg	1,42		1,88
$v_{\max}^{\text{ald}^R}$	U/mg	2,77		5,84
$k_{m(\text{GlcNGc})}$	mM	5,73		11,0
$k_{m(\text{ManNGc})}^{\text{epi}}$	mM		4,4 (ManNAc)	9,38
$k_{i(\text{Pyr})}^{\text{epi}}$	mM	11,4		7,99
$k_{m(\text{ManNGc})}^{\text{ald}}$	mM	63,9		54,7
$k_{m(\text{Pyr})}$	mM		0,136 (Kragl)	0,146
$k_{i(\text{Pyr})}^{\text{ald}}$	mM	0,82		1,04
$k_{m(\text{Neu5Gc})}$	mM	7,4		7,83
$k_{i(\text{ManNGc})}$	mM		3,77 (Verhältnis $k_m/k_i$ )	4,82
$K_{eq}^{\text{epi}}$	-	0,195		0,201
$K_{eq}^{\text{ald}}$	l/mol	72,4	errechnet	44,3
$K_{eq}^{\text{ges}}$	l/mol	14,1	errechnet	8,86

**Tabelle 4-6:** Gegenüberstellung der durch Anfangsreaktionsgeschwindigkeitsmessung bestimmten und der durch Satzreaktoranpassung ermittelten Parameter

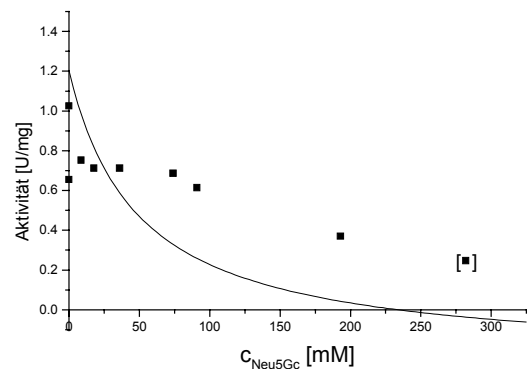
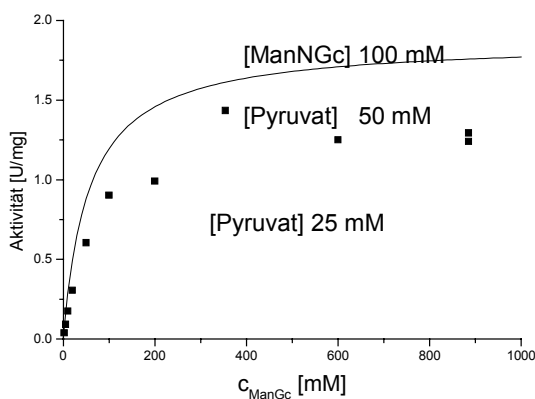
Die Optimierung der Parameter liefert zufriedenstellende Ergebnisse. Der Verlauf der Satzreaktorversuche wird sehr gut erfasst (in Abbildung 4-22 als gestrichelte Linie dargestellt), ohne dass die Parameter allzu stark verändert werden müssen.

Es zeigt sich jedoch erwartungsgemäß, dass das Modell nicht hinreichend in der Lage ist, die kinetischen Anfangsreaktionsgeschwindigkeitsmessungen zu beschreiben. Abbildung 4-19 zeigt die Messungen aus Kapitel 4.3.2 und 4.3.3 zusammen mit dem durch das Modell beschriebenen Verlauf.

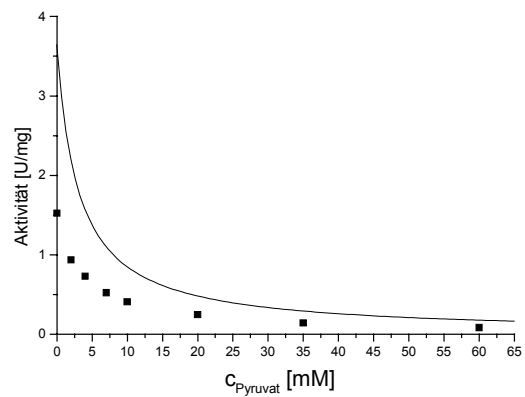
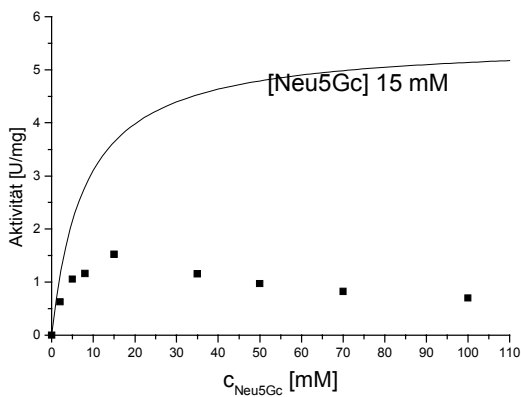
## Epimerase Hinreaktion



## Aldolase Hinreaktion



## Aldolase Rückreaktion



**Abbildung 4-19:** gemessene (▪) und simulierte (—) Daten für die Epimerase- und die Aldolasereaktion

Die Epimerasekinetik wird durch das Modell hinreichend gut erfasst. Bei der Aldolase zeigen sich allerdings erhebliche Abweichungen.

× An der Stelle des Nulldurchlaufs sind die Geschwindigkeiten der Synthese- und Spaltungsreaktion gleich. Negative Aktivitätswerte bedeuten, dass die Spaltung der Neu5Gc die dominierende Reaktion wird. Der Wert bei 280 mM wird ausgeklammert, da die Messung so nah am Gleichgewicht einen großen Fehler aufweist.

Der Grund dafür ist darin zu suchen, dass für die Aldolase Rückreaktion, wie in Abbildung 4-16 dargestellt, eine Kinetik in Charakteristik einer Substratüberschußinhibierung gefunden wurde. Dieses ist eine Abweichung zu den Ergebnissen von *Kragl*, der keine solche Inhibierung für die Neu5Ac gefunden hat.

Daher wurde der Versuch unternommen, das Modell durch eine Einbeziehung dieser Inhibierung für dieses System zu verbessern. Anstelle des durch  $k_{m(Neu5Gc)}$  erweiterten Terms

für die Rückreaktion im Nenner

$$\frac{c_{(Neu5Gc)}}{k_{m(Neu5Gc)}} + \frac{c_{(Neu5Gc)} \cdot c_{(ManNGc)}}{k_{i(ManNGc)} \cdot k_{m(Neu5Gc)}}$$

wird der ebenfalls um  $k_{m(Neu5Gc)}$  erweiterte Term für eine Substratüberschußinhibierung der

Rückreaktion eingesetzt.

$$\frac{c_{(Neu5Gc)}}{k_{m(Neu5Gc)}} + \frac{c_{(Neu5Gc)}^2}{k_{i(Neu5Gc)} \cdot k_{m(Neu5Gc)}}$$

Bei dem hier eingeführten  $k_{i(Neu5Gc)}$  handelt es sich um eine klassische Michaelis-Menten Konstante für die Substratüberschußinhibierung. Damit wird aus Gleichung 4-6 die folgende Gleichung:

---


$$v_{ald} = \frac{d[Neu5Gc]}{dt} = \frac{[E]^{ald} \cdot \left( \frac{v_{max}^{ald} \cdot c_{(Pyr)} \cdot c_{(ManNGc)}}{k_{i(Pyr)}^{ald} \cdot k_{m(ManNGc)}^{ald}} - \frac{v_{max}^{ald} \cdot c_{(Neu5Gc)}}{k_{m(Neu5Gc)}} \right)}{1 + \frac{c_{(Pyr)}}{k_{i(Pyr)}^{ald}} + \frac{k_{m(Pyr)} \cdot c_{(ManNGc)}}{k_{i(Pyr)}^{ald} \cdot k_{m(ManNGc)}^{ald}} + \frac{c_{(Pyr)} \cdot c_{(ManNGc)}}{k_{i(Pyr)}^{ald} \cdot k_{m(ManNGc)}^{ald}} + \frac{c_{(Neu5Gc)}}{k_{m(Neu5Gc)}} + \frac{c_{(Neu5Gc)}^2}{k_{i(Neu5Gc)} \cdot k_{m(Neu5Gc)}}$$

**Gleichung 4-9:**

$$k_{i(Neu5Gc)} \quad [mM] \quad \text{Inhibierungskonstante der Komponente Neu5Gc}$$

alle anderen Größen siehe Gleichung 4-6

---

Der nicht bestimmte Wert  $k_{i(ManNGc)}$  taucht in dieser Gleichung nicht mehr auf, dafür wird der aus Abbildung 4-16 bestimmte Wert für  $k_{i(Neu5Gc)}$  eingesetzt.

Diese Gleichung wird mit der unveränderten Gleichung für die Epimerasereaktion und den Bilanzgleichungen wie zuvor zur Optimierung der Parameter herangezogen.

In Tabelle 4-7 sind wiederum die gemessenen Werte den optimierten Werten gegenübergestellt.

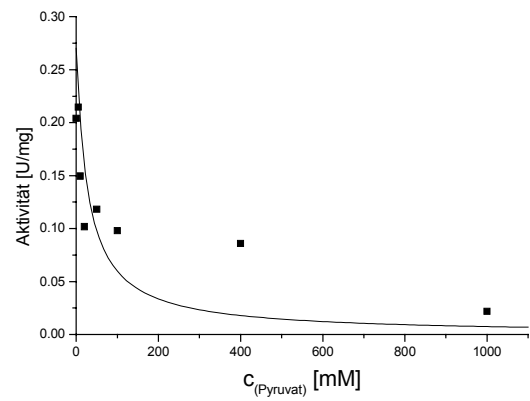
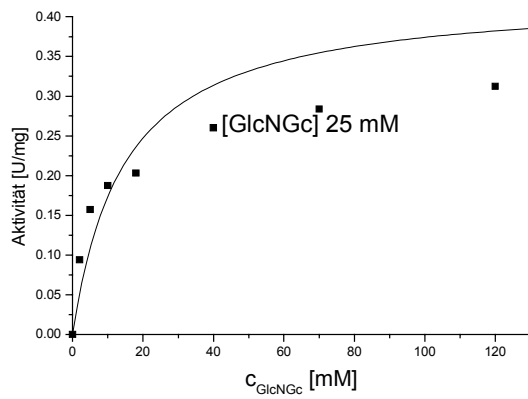


Parameter	Einheit	Anfangsreaktions- geschwindigkeits- messungen	alternative Bestimmung	Satzreaktor- anpassung
$v_{\max}^{epi}$	U/mg	0,305		0,429
$v_{\max}^{ald}$	U/mg	1,42		1,39
$v_{\max}^{ald}$	U/mg	2,77		2,96
$k_{m(GlcNGc)}$	mM	5,73		14,7
$k_{m(ManNGc)}^{epi}$	mM		4,4 (ManNAc)	7,98
$k_{i(Pyr)}^{epi}$	mM	11,4		10,5
$k_{m(ManNGc)}^{ald}$	mM	63,9		61,1
$k_{m(Pyr)}$	mM		0,136 (Kragl)	0,141
$k_{i(Pyr)}^{ald}$	mM	0,8195		1,08
$k_{m(Neu5Gc)}$	mM	7,4		7,34
$k_{i(Neu5Gc)}$	mM	31,3		30,7
$K_{eq}^{epi}$	-	0,195		0,189
$K_{eq}^{ald}$	l/mol	72,4	errechnet nach Haldane	52,2
$K_{eq}^{ges}$	l/mol	14,1	errechnet	9,87

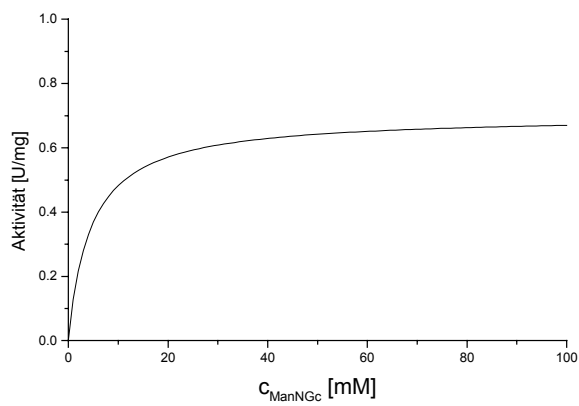
**Tabelle 4-7:** Gegenüberstellung der gemessenen und der angepassten Parameter durch das Modell mit Überschußinhibierung der Rückreaktion

Bis auf die Werte für  $v_{\max}^{epi}$  und  $k_{m(GlcNGc)}$  bleiben die Werte fast unverändert. Die Satzreaktorversuche in Abbildung 4-22 werden ähnlich gut wie zuvor beschrieben (dargestellt durch die durchgezogene Linie). Die Anwendung des Modells und der optimierten Parameter auf die kinetischen Messungen ist in Abbildung 4-21 und Abbildung 4-21 dargestellt. Die fehlenden Messungen für die Epimerase-Rückreaktion in Abhängigkeit von der ManNGc-Konzentration und der Aldolase-Hintreaktion in Abhängigkeit von der Pyruvat-Konzentration sind ausschließlich durch Modellierung dargestellt.

## Epimerase Hinreaktion

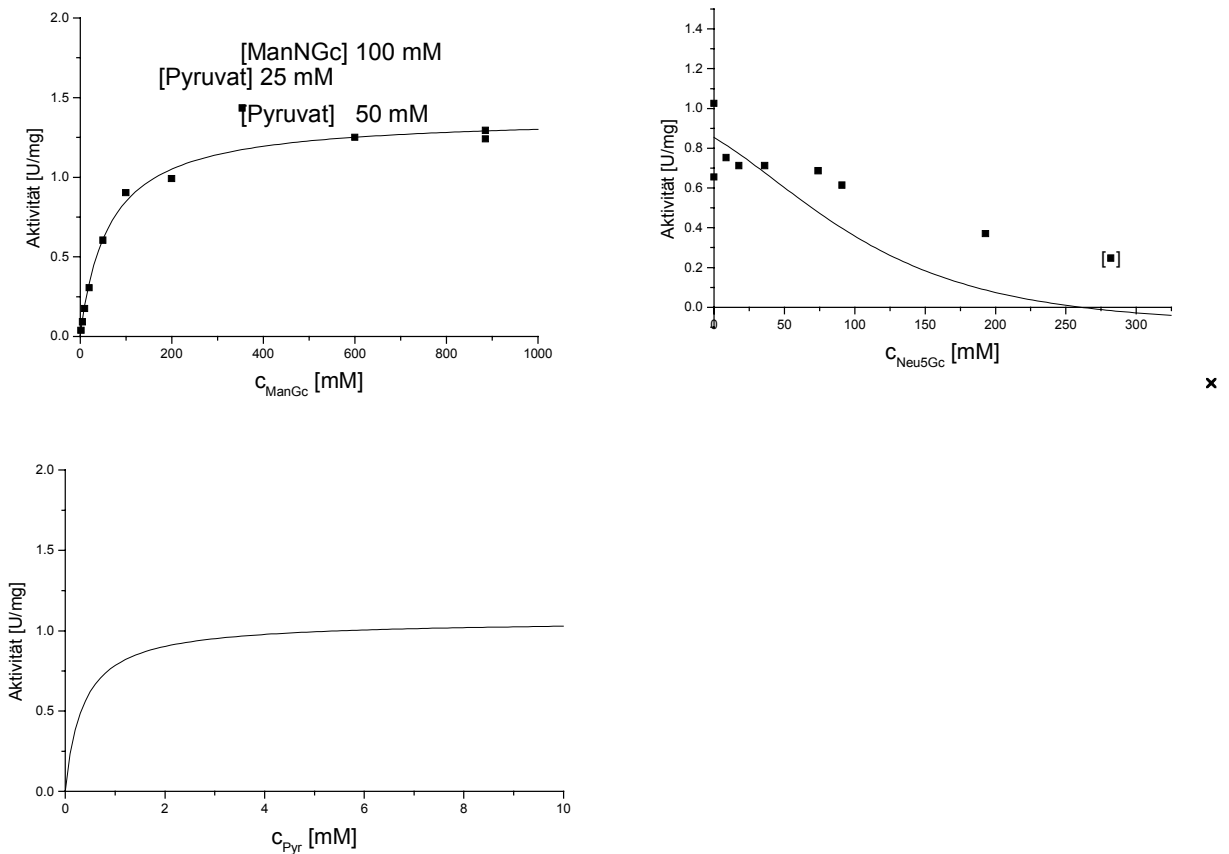


## Epimerase Rückreaktion

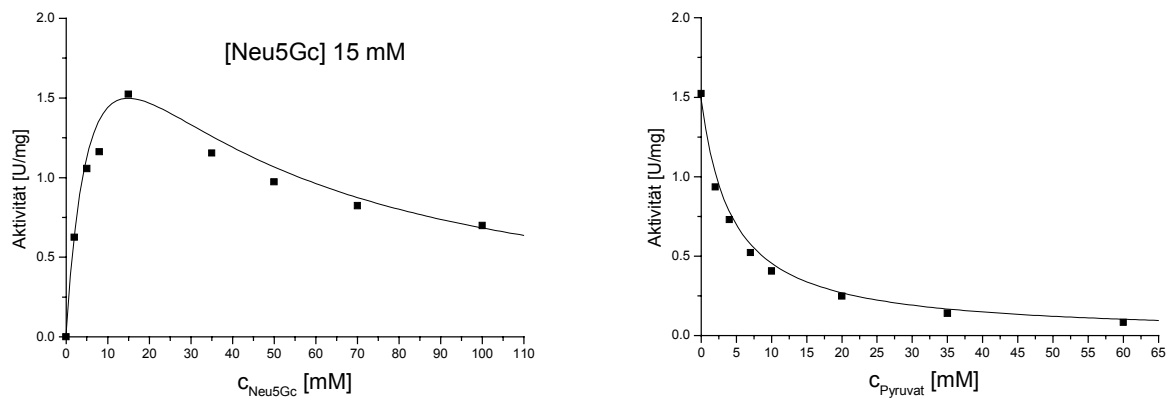


**Abbildung 4-20:** gemessene (•) und nach dem Modell mit Überschußinhibierung der Rückreaktion berechnete (—) kinetische Daten für die Epimerasereaktion

## Aldolase Hinreaktion



## Aldolase Rückreaktion



**Abbildung 4-21:** gemessene (•) und nach dem Modell mit Überschußinhibierung der Rückreaktion berechnete (—) kinetische Daten für die Aldolasereaktion

Die Anpassung an diese Daten ist sehr zufriedenstellend.

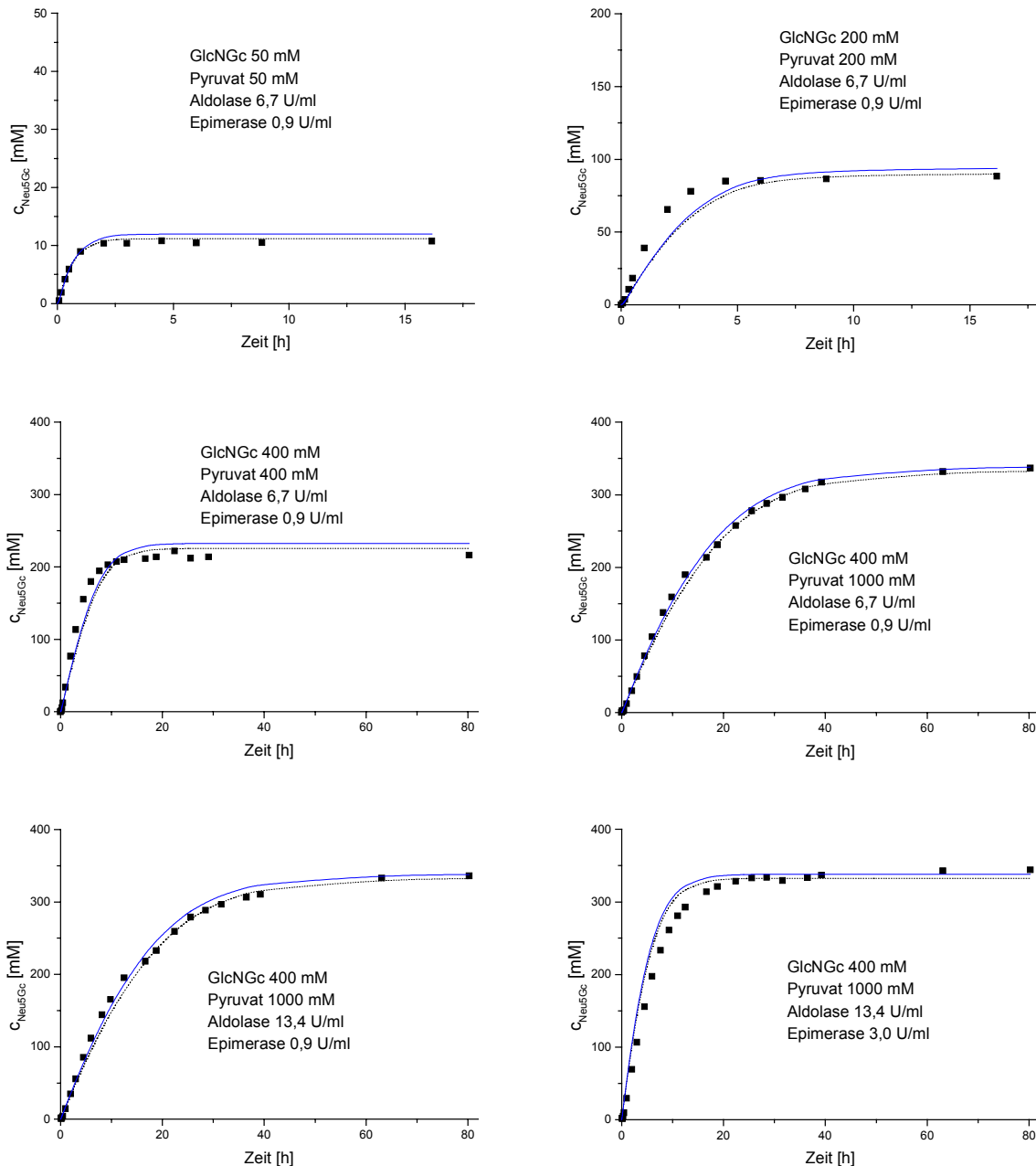
Das eingesetzte kinetische Modell kann durch die gute Anpassung an sowohl die Satzreaktorversuche, als auch die kinetischen Messungen verifiziert werden.

× An der Stelle des Nulldurchlaufs sind die Geschwindigkeiten der Synthese- und Spaltungsreaktion gleich. Negative Aktivitätswerte bedeuten, dass die Spaltung der Neu5Gc die dominierende Reaktion wird. Der Wert bei 280 mM wird ausgeklammert, da die Messung so nah am Gleichgewicht einen großen Fehler aufweist.

Man sieht an dieser kinetischen Analyse, dass beide Informationen, sowohl die Anfangsreaktionsgeschwindigkeitsmessungen, als auch die Integralmessungen erst ein korrektes Modell liefern können. Außerdem konnte gezeigt werden, dass fehlende Daten aus Anfangsreaktionsgeschwindigkeitsmessungen (hier bedingt durch die ungenügende Zugänglichkeit von Reaktionskomponenten) durch die Integralmessungen so ergänzt werden konnten, dass das Reaktionssystem sehr zufriedenstellend charakterisiert werden kann.

#### **4.3.5 Satzreaktorversuche**

Wie oben bereits gesagt, wurden für die Anpassung bzw. Bestimmung der kinetischen Parameter die in Abbildung 4-22 gezeigten sechs Satzreaktorversuche durchgeführt. Dabei wurden in den ersten vier Versuchen die Substratkonzentrationen von 50 mM bis 400 mM für GlcNGc und bis 1000 mM für Pyruvat variiert. In den beiden letzten Versuchen wurde erst die Aldolasekonzentration und dann auch noch die Epimerasekonzentration angehoben. Die Messungen wurden bei der Anpassung keiner Wichtung unterzogen. Das ist zu vertreten, da so die Anpassung bei den technisch wichtigen hohen Konzentrationen betont wird.



**Abbildung 4-22:** Messwerte (•) und berechnete Verläufe nach dem ersten Modell (···) und dem Modell mit Überschüßinhibierung der Rückreaktion (—) von sechs Satzreaktorversuchen mit verschiedenen Substrat- und Enzymkonzentrationen

Beide Modelle geben sowohl den Verlauf, als auch den Gleichgewichtsumsatz der Satzreaktorverläufe gut wieder. Es ist nicht sehr verwunderlich, dass diese beiden verschiedenen Modelle diesen Anspruch erfüllen können, da lediglich einer von sechs additiven Termen im Nenner unterschiedlich ist. Somit kommt diese Veränderung erst dann voll zum Tragen, wenn einige dieser sechs Terme gegen Null gehen, was bei der Anpassung an die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten in Abbildung 4-19 und Abbildung 4-21 der Fall ist, da dort einige Komponenten den Wert Null haben.

Aus diesen Satzreaktorversuchen lässt sich über den Gleichgewichtsumsatz eine alternative Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten  $K_{eq}^{ges}$  und daraus über der Zusammenhang

$$K_{eq}^{ges} = K_{eq}^{epi} \cdot K_{eq}^{ald}$$

mithilfe der durch Gleichgewichtsmessung bestimmten Konstante  $K_{eq}^{epi}$  die Konstante  $K_{eq}^{ald}$  bestimmen. Während die Haldane Beziehung (Gleichung 4-7) diese Konstante aus der Kinetik über den gesamten Verlauf der Reaktion bestimmt, wird hier ausschließlich die Thermodynamik über den Gleichgewichtsumsatz betrachtet.

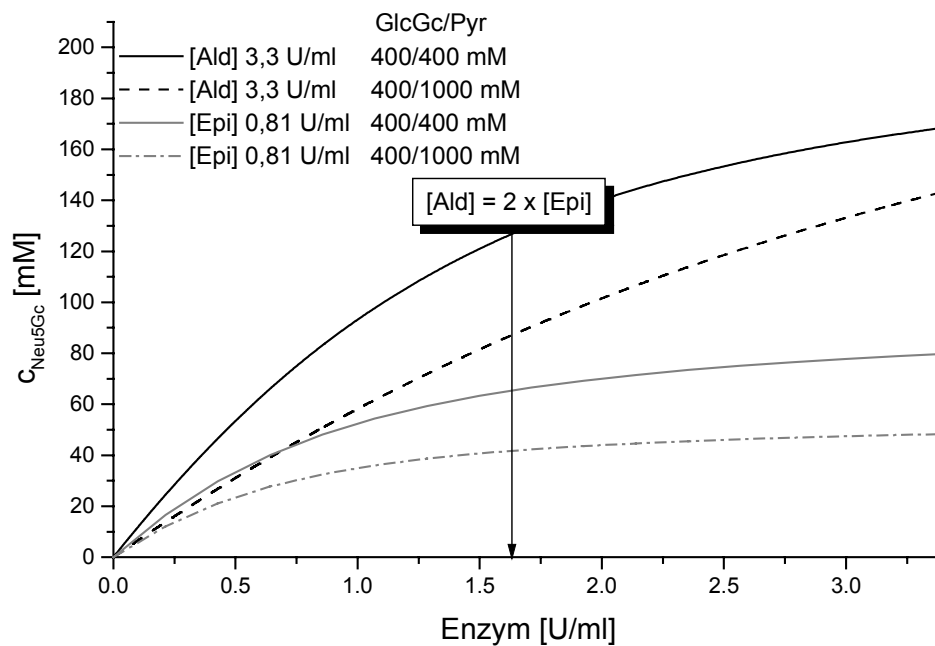
Diese thermodynamische Bestimmung liefert die Werte:

$$K_{eq}^{ges} = 7,3 \text{ l/mol} \quad \text{und} \quad K_{eq}^{ald} = 38,8 \text{ l/mol}$$

Der so ermittelte Wert für die Gleichgewichtskonstante der Aldolasereaktion von Neu5Gc liegt somit zwischen dem aus der Haldane Beziehung mit 52,2 l/mol bestimmten Wert und dem Wert von 29,4 l/mol für die Standardreaktion von Neu5Ac.

#### 4.3.5.1 Enzymverhältnis

Um ein günstiges Verhältnis der Mengen beider Enzyme für eine präparative Synthese im Zwei-Enzym-System zu ermitteln, wurden mit Hilfe des erstellten kinetischen Modells die Produktbildung für verschiedene Verhältnisse bestimmt. Abbildung 4-23 zeigt die Produktbildung nach einer Reaktionszeit von 200 Minuten bei Variation jeweils des einen Enzyms unter Konstanthaltung des andern bei zwei verschiedenen Substratkonzentrationen.



**Abbildung 4-23:** Simulation der Neu5Gc-Bildung nach 200 min in Abhängigkeit von der Konzentration des einen Enzyms bei Konstanz des anderen Enzyms (Aldolase 3,3 U/ml bzw. Epimerase 0,81 U/ml) bei Substratkonzentrationen GlcNGc/Pyruv 400 mM/400 mM und 400 mM/1000 mM

Die Simulation zeigt, dass es bei Variation der Aldolasekonzentration in keinem der beiden Fälle sinnvoll ist, mehr als die doppelte Konzentration an Aldolase gegenüber der Epimerase einzusetzen. Die Reaktionsgeschwindigkeit lässt sich so praktisch nicht mehr steigern. Bei der Variation der Epimerasekonzentration zeigt sich bis zum Erreichen der halben Aktivität Epimerase verglichen mit der Aldolase, ein fast linearer Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit, der dann sehr langsam abflacht. Bei der höheren Pyruvatkonzentration dauert der Anstieg noch länger an.

Diese Beobachtung ist so zu verstehen, dass eine unverhältnismäßige Erhöhung der Aldolasekonzentration dazu führt, dass das von der Epimerase gebildete ManNGc so schnell verbraucht wird, dass die Konzentration gegen null geht und somit auch sehr hohe Aldolasekonzentrationen zu keiner weiteren Umsetzung führen können.

Diese Berechnung zeigt aber auch eine Schwäche der vorangegangenen Satzreaktorversuche für die Parameteranpassung. In keinem der sechs Fälle liegt die Aldolasekonzentration ähnlich hoch wie die Epimerasekonzentration. Da allerdings bei den geringeren Konzentrationen (50 mM und 200 mM) und auch bei kürzeren Laufzeiten die Krümmung der Kurve flacher wird, somit also ein Ansteigen der Aldolasekonzentration über die Epimerasekonzentration noch signifikant ist, sind in diesen Messungen dennoch genügend Informationen zum Enzymverhältnis vorhanden.

### 4.3.6 Präparative Synthese

Mit dem zuvor gesagten werden sinnvolle Bedingungen für eine präparative Synthese von Neu5Gc erstellt.

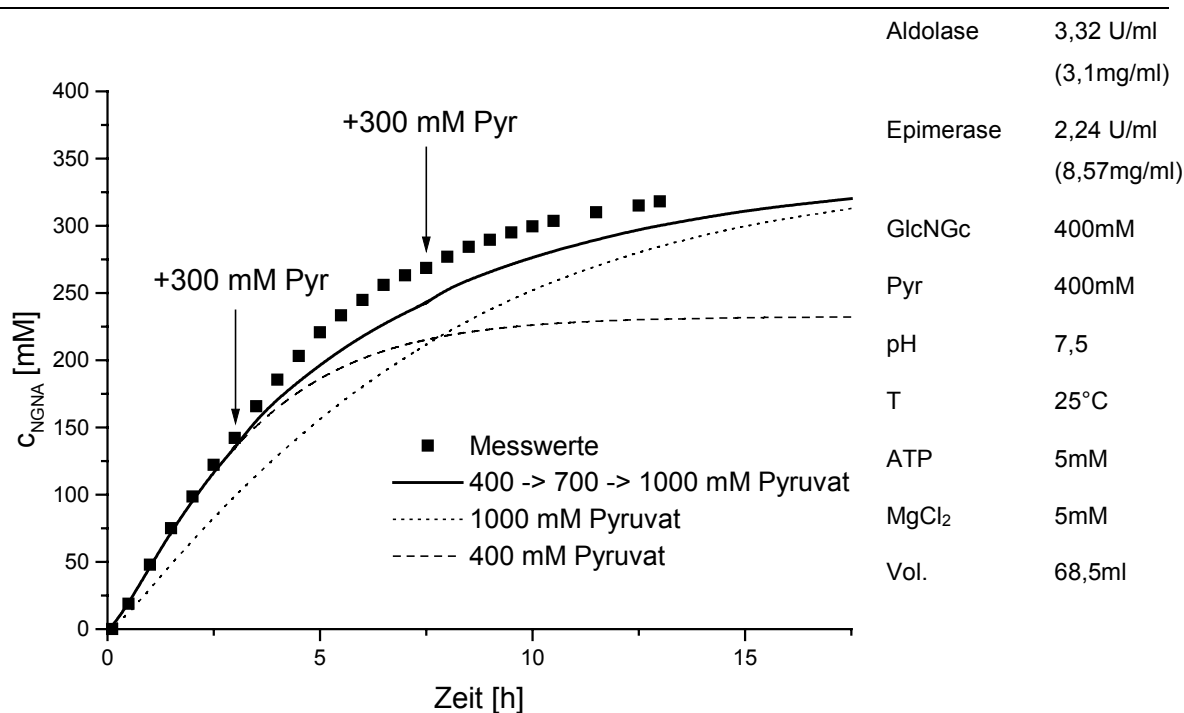
- Da bei der Aldolasereaktion durch die Neu5Ac-Synthese die Molarität verringert wird, begünstigen hohe Konzentrationen die Produktbildung, führen also zu einem höheren Gleichgewichtsumsatz.
- Eine hohe Pyruvatkonzentration führt zu einer starken Inhibierung der Epimerase.
- Die Epimerasekonzentration sollte, wie in Abbildung 4-23 gezeigt, mindestens halb so hoch sein wie die Aldolasekonzentration.

Als Anfangskonzentrationen werden je 400 mM GlcNGc und Pyruvat vorgelegt. Da das Pyruvat bei dieser Reaktion die billigere bzw. leichter zugängliche Komponente ist, wird die Pyruvatkonzentration auf 1000 mM erhöht um den Gleichgewichtsumsatz in Richtung des Produktes zu verschieben. Dieses erfolgt schrittweise, um nicht schon zu Beginn die Aktivität der Epimerase zu senken.

Die Aldolase wird in 3,32 U/ml (3,1 mg/ml) und die Epimerase in 2,24 U/ml (8,6 mg/ml) Konzentration eingesetzt. Das Reaktionsvolumen beträgt 70 ml.

Der Verlauf der präparativen Synthese ist in Abbildung 4-24 dargestellt. Mit Hilfe des Modells (Gleichung 4-4 und Gleichung 4-9) und der Stoffbilanzen (Gleichung 4-8) wurde der Reaktionsverlauf simuliert. Außerdem wurde eine Simulation durchgeführt, die den Verlauf beim Einsatz von 1000 mM Pyruvat von Beginn der Reaktion an zeigt und eine Simulation, bei der die Pyruvatkonzentration nicht über die anfänglichen 400 mM hinaus erhöht wird.





**Abbildung 4-24:** Präparative Synthese von Neu5Gc im Zwei-Enzym-System mit Simulation für diesen Versuch und für die Konzentrationen von 400 und 1000 mM Pyruvat

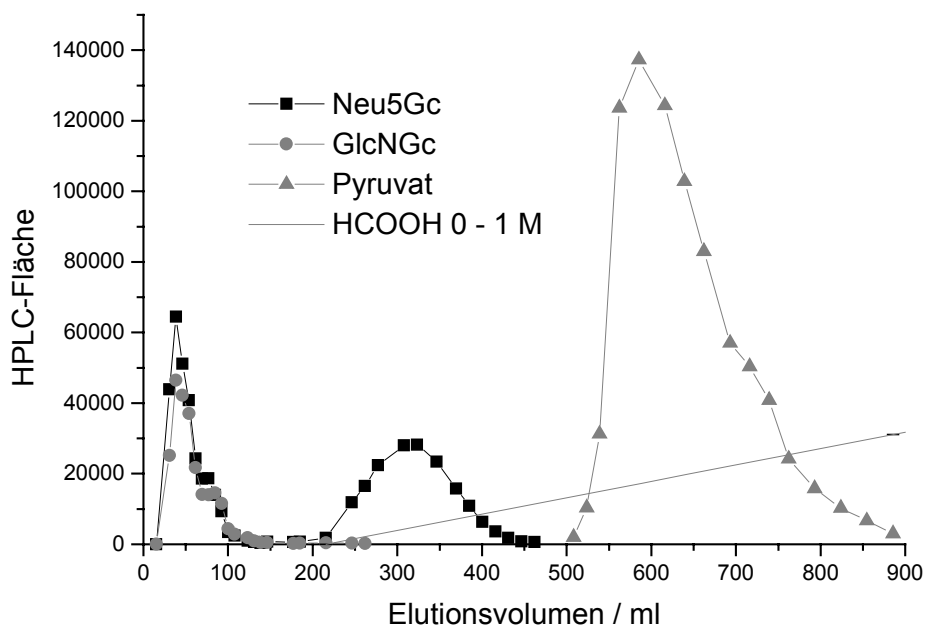
Nach 13,3 h wird eine Ausbeute von ca. 320 mM erreicht. Das entspricht einer Raum-Zeit-Ausbeute von 192 g/(l\*d) und einem Enzymverbrauch bezogen auf 1 g des Endproduktes von 31,9 U Aldolase und 21,4 U Epimerase.

Die maximale Ausbeute liegt nach dem Modell bzw. den entsprechenden Satzreaktorversuchen aus Kapitel 4.3.5 bei 338 mM. Man kann sehen, dass der Verlauf durch das Modell im wesentlichen wiedergegeben wird. Nach Zugabe der ersten 300 mM Pyruvat steigen die Messwerte etwas stärker an, als im Modell berechnet. Daher erreicht das Modell die Ausbeute von 320 mM erst nach ca. 16,7 h.

Wie erwartet verläuft die Kurve für die Simulation mit 400 mM Pyruvat nach 3 h ohne die weitere Pyruvatzugabe flacher als mit der Zugabe und geht gegen den Grenzwert von 238 mM. Die Kurve für die Pyruvatkonzentration von 1000 mM verläuft durch die Inhibition der Epimerase zu Beginn flacher, läuft aber gegen den selben Grenzwert wie der Versuch mit der sukzessiven Zugabe. So ist der Gewinn an Reaktionsgeschwindigkeit durch die portionsweise Zugabe des Pyruvats deutlich zu sehen.

Die Reinigung und Isolierung erfolgt analog dem bei der Neu5Ac3F eingesetzten Verfahren (Kapitel 3.2.4.3). Allerdings wurde das Säulenvolumen entsprechend der größeren Substanzmengen verdoppelt.

Unerwünschterweise eluiert ein erheblicher Teil der Neu5Gc zusammen mit dem Gemisch aus GlcNGc und ManNGc im Vorlauf (Abbildung 4-25).



**Abbildung 4-25:** Chromatogramm zur Trennung von Neu5Gc über Anionenaustauscherharz Dowex 1x2, Formiat-Form, mit einem Ameisensäuregradienten von 0 – 1 M

Es handelt sich dabei nicht um ein Kapazitätsproblem, da auch ein erneuter Trennversuch mit der entsprechend verringerten Menge dieser nicht getrennten Fraktion aus dem Vorlauf der ersten Säule wieder zu einer Elution eines Teils der Neu5Gc mit dem GlcNGc/ManNGc Gemisch führt. Erst mit einem dritten Säulenlauf kann der Großteil der Neu5Gc isoliert werden.

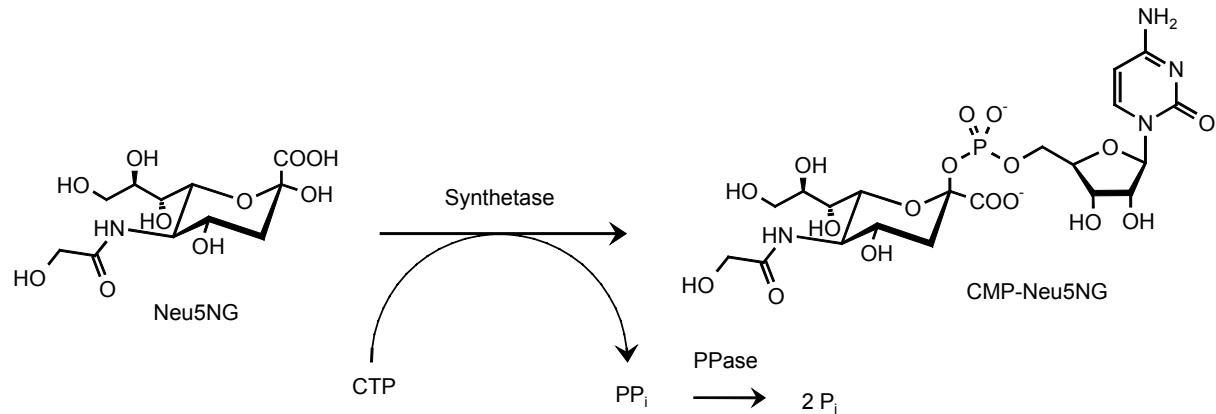
Dieser Sachverhalt lässt sich wahrscheinlich auf die chromatographischen Eigenschaften der Neu5Gc zurückführen. Bereits bei der Etablierung der HPLC-Analytik für die Trennung von ManNGc und GlcNGc (s. Kapitel 4.3.2.2) wurde gezeigt, dass die Glycolylgruppe sich in einer Anionenchromatographie anders verhält, als die Acetylgruppe.

Durch Vereinigung der Produktfraktionen aus allen drei Säulenläufen können nach Lyophilisierung 5,7 g Neu5Gc gewonnen werden. Dieses entspricht eine Ausbeute bei der Reinigung von 80% und einer Gesamtausbeute bezogen auf die Ausgangsmenge von GlcNGc von 64%.

#### 4.4 Aktivierung von Neu5Gc zu CMP-Neu5Gc

Vergleichende Versuche in anderen Arbeitskreisen zur Aktivierung von Neu5Ac und Neu5Gc mit Synthetasen aus Kalbshirn, Rinder- und Pferdedrüsenengewebe zeigten, dass beide Substrate von diesen Enzymen vergleichbar gut umgesetzt werden. Bislang wurde jedoch noch nicht beschrieben, dass Neu5Gc durch eine Synthetase aus *E. coli* aktiviert werden kann.

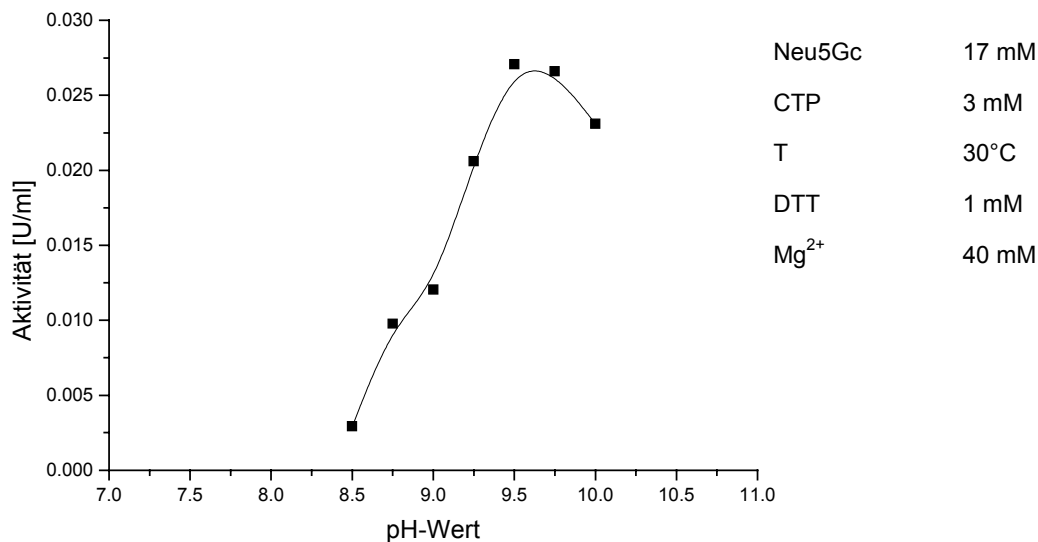
In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Neu5Gc ein Substrat für die CMP-Neu5Ac-Synthetase aus *E.coli* K 235/CS1 darstellt. Abbildung 4-26 zeigt die entsprechende Aktivierungsreaktion.



**Abbildung 4-26:** Enzymatische Synthese von CMP-Neu5Gc aus Neu5Gc und CTP

#### 4.4.1 Kinetische Daten

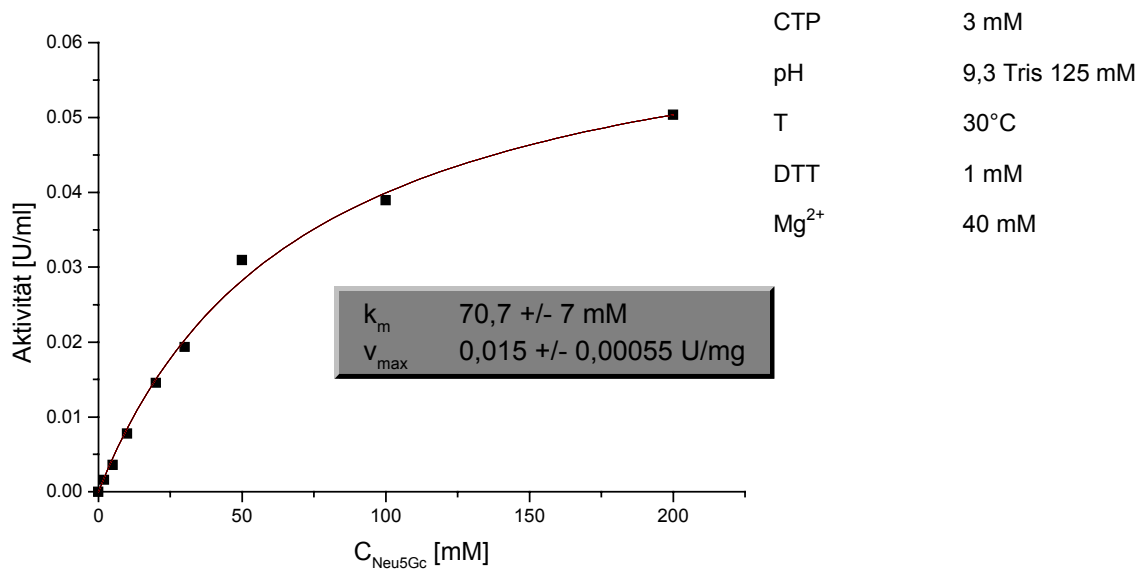
Zunächst wurde, wie in Abbildung 4-27 gezeigt, die Aktivität der Synthetase in Abhängigkeit vom pH-Wert gemessen.



**Abbildung 4-27**

Auch hier liegt das pH-Aktivitätsmaximum zwischen 9,25 und 9,5. Allerdings ist das Maximum schmäler als bei Neu5Ac3F (Abbildung 3-23).

Die Synthetase zeigt gegenüber der Neu5Gc eine deutlich verminderte Aktivität. Die Abhängigkeit der Aktivität von der Neu5Gc-Konzentration ist in Abbildung 4-28 dargestellt.



**Abbildung 4-28:** Enzymaktivität der Synthetase in Abhängigkeit von der Neu5Gc-Konzentration

Es wird angenommen, dass die Charakteristik der Abhängigkeit von CTP wie in Kapitel 3.3.3.1 bestimmt verläuft. Dieser Verlauf ist durch eine starke Substratüberschußinhibierung geprägt. Die Konstanten  $k_{m(CTP)}$  und  $k_{i(CTP)}$  werden von dort übernommen. Mit der in Gleichung 4-10 aufgeführten Michaelis-Menten Doppelsubstratkinetik mit Substratüberschußinhibierung durch CTP werden die Größen  $v_{max}$  und  $k_{m(Neu5Gc)}$  berechnet. Auch hier ist durch den kleinen  $k_i$ -Wert der Wert für  $v_{max}$  nur ein theoretischer Wert, da lange vor Erreichen der notwendigen CTP-Konzentration die Inhibierung stark einsetzt und  $v_{max}$  somit nicht erreicht werden kann. Diese starke Inhibierung ist von Bedeutung für die präparative Synthese von CMP-Neu5Gc. So empfiehlt es sich, das CTP nicht in voller Konzentration vorzulegen, sondern dosiert einzusetzen. Dieses Vorgehen ist auch ohne dies sinnvoll, da das CTP außerdem bei dem hohen pH-Wert in der Reaktionslösung über die Zeit zersetzt wird.

$$v = \frac{[E]^{Syn} \cdot c_{(Neu5Gc)} \cdot c_{(CTP)} \cdot v_{max}}{\left( c_{(Neu5Gc)} + k_{m(Neu5Gc)} \right) \cdot \left( c_{(CTP)} + \frac{c_{(CTP)}^2}{k_{i(CTP)}} + k_{m(CTP)} \right)}$$

**Gleichung 4-10:**

$$v_{max} = 0,27 \pm 0,01 \text{ U/ml}$$

$$c_{(Neu5Gc)} \text{ [mM]} \quad k_{m(Neu5Gc)} = 70 \pm 7 \text{ mM}$$

$$c_{(CTP)} \text{ [mM]} \quad k_{m(CTP)}^* = 3,8 \pm 0,5 \text{ mM}$$

$$k_{i(CTP)}^* = 1,8 \pm 0,2 \text{ mM}$$

\* bestimmt in Kapitel 3.3.3.1 für die Synthese von CMP-Neu5Ac3F

Da aus den in Kapitel 3.3.3.1 genannten Gründen ein Vergleich der  $v_{max}$ -Werte zwischen dem Standardsystem und dem Neu5Gc-System nicht sinnvoll ist, wird wiederum der Vergleich der Aktivität unter Standardassay-Bedingungen (s. Tabelle 3-6) vorgenommen. Der Vergleich beider Systeme ist in Tabelle 4-8 zusammengestellt.

Neu5Ac		Neu5Gc	
relative Aktivität <sup>1</sup>	1	relative Aktivität <sup>1</sup>	0,04
$k_{m(Neu5Ac)}^2$	4,85 ± 0,16 mM	$k_{m(Neu5Gc)}^1$	70 ± 7 mM
$k_{m(CTP)}^2$	22,1 ± 0,4 mM	$k_{m(CTP)}^1$	3,8 ± 0,5 mM
$k_{i(CTP)}^2$	6,5 ± 0,1 mM	$k_{i(CTP)}^1$	1,8 ± 0,2 mM

<sup>1</sup> gemessen in dieser Arbeit

<sup>2</sup> gemessen von Portela

**Tabelle 4-8:** Vergleich der kinetischen Parameter der Synthetasereaktion von Neu5Ac und Neu5Gc.

Die Aktivität gegenüber dem Standardsystem ist dramatisch reduziert. Sowohl die geringe maximale Aktivität als auch der um gut eine Größenordnung höhere  $k_m$ -Wert für Neu5Gc sind dafür verantwortlich, dass die Aktivität unter Standardbedingungen nur 4 % der Aktivität für Neu5Ac beträgt.

Wie zu Beginn gesagt, wird Neu5Gc von Synthetasen aus verschiedenen tierischen Geweben vergleichbar zur Neu5Ac umgesetzt. Die hier im Gegensatz dazu gefundene schwache Aktivität der Synthetase aus *E. coli* lässt sich mit der Beobachtung korrelieren, dass Neu5Gc ausschließlich in tierischem Gewebe vorkommt.

#### 4.4.2 Präparative Synthese

Trotz der schwachen Aktivität soll der Versuch unternommen werden, CMP-Neu5Gc präparativ herzustellen.

Der Versuchsaufbau ist identisch zu dem in Kapitel 3.3.3.2. Die Bedingungen sind in Tabelle 4-9 aufgeführt.

---

Synthetase	40 mg/ml (0,032 U/ml)
Neu5Gc	20 mM
CTP	5 mM
PP <sub>i</sub> -ase	1,7 U/ml
MgCl <sub>2</sub>	40 mM
pH	9
T	30°C
Vol.	154 ml

---

**Tabelle 4-9:** Reaktionsbedingungen für die Synthese von CMP-Neu5Gc

---

Es stellt sich als Problem heraus, dass die Reaktion sehr langsam verläuft. Weil die Enzymfraktion nicht sterilfiltriert werden kann, da sich dabei ihre Aktivität völlig verliert, neigt die Reaktionslösung zum Bewuchs mit Mikroorganismen. Aufgrund der langen Reaktionsdauer kommt es in diesem Experiment zu mikrobiellen Bewuchs, so dass der Versuch abgebrochen werden muss. Durch den Bewuchs ist der überwiegende Teil der Edukte und des Produktes verschwunden.

Dennoch gelingt es durch eine Anionenaustauschchromatographie und anschließende reverse Osmose, wie sie in Kapitel 3.3.3.3 beschrieben ist, eine kleine Menge von 70 mg der CMP-Neu5Gc in einer Reinheit von über 97 % zu isolieren.

#### 4.5 Zusammenfassung

- Es konnte erstmalig gezeigt werden, dass GlcNGc durch eine rekombinante *N*-Acetylglucosamin 2-Epimerase [E.C. 5.1.3.8] zu ManNGc epimerisiert wird.
- Die Epimerisierung von GlcNGc und die anschließende Aldolase-katalysierte Aldolkondensation mit Pyruvat wurde kinetisch charakterisiert.
- Für beide Enzymreaktionen wurde, basierend auf dem von Kragl erstellten Modell für die Synthese von Neu5Ac, ein modifiziertes kinetisches Modell erstellt.
- Die kinetischen Modelle konnten durch Anpassung der Parameter an sechs Satzreaktorversuche zur Synthese von Neu5Gc aus GlcNGc und Pyruvat im Zwei-Enzym-System verifiziert werden.
- Aus einer präparativen Fed-Batch Synthese konnten nach Anionenchromatographie 5,7 g Neu5Gc gewonnen werden
- Erstmals konnte gezeigt werden, dass Neu5Gc durch eine Synthetase aus *E. coli* mit einer relativen Aktivität von 4% umgesetzt werden kann.
- Aus einer präparativen Synthese von CMP-Neu5Gc mit dieser Synthetase konnten 70 mg Produkt isoliert werden.

## 5 Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick

In der Einleitung zu dieser Arbeit wird ausführlich auf die zentrale Rolle, die die Neuraminsäure und ihre Derivate wegen ihrer Polyfunktionalität und der exponierten, häufig terminalen Anordnung in den Oligosaccharidstrukturen, für die Funktionen von Glycoconjugaten einnehmen, eingegangen. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Entwicklung und Charakterisierung von präparativen enzymatischen Routen zur Synthese und Aktivierung zweier interessanter Derivate der Neuraminsäure, der 3-Fluorneuraminsäure und der Glycolylneuraminsäure.

### 5.1 Fluorneuraminsäure

Die Fluorneuraminsäure ist als künstliches Derivat der Neuraminsäure bemerkenswert, das eventuell für die Untersuchung von Mechanismen und Wechselwirkungen, an denen Neuraminsäure beteiligt ist, geeignet ist. Das natürliche  $^{19}\text{F}$ -Isotop des Fluorkerns eignet sich als NMR-Kern zur Untersuchung mit Kernresonanztomographie, das künstliche, radioaktive  $^{18}\text{F}$ -Isotop für Untersuchungen mit PET (Positronen Emissions Tomographie).

Zur Wahl der C-3 Position für die Fluorsubstitution führte die Annahme, dass der Austausch eines Protons durch das sterisch etwa gleich anspruchsvolle Fluor nur geringfügigen Einfluss auf die Eigenschaften der Verbindung nimmt.

Für diese Verbindung wurde eine Synthesestrategie entwickelt, die erstmalig die präparative Synthese von Neu5Ac3F in einer Aldolase-katalysierten Kondensation von ManNAc und Fluorpyruvat ermöglichte. Der entscheidende Vorteil dieser Synthesestrategie und somit auch der 3-Position des Fluor war die erstmalige Eröffnung eines einfachen Weges für die schnelle Synthese einer radioaktiv markierten  $^{18}\text{F}$ [F]Fluorneuraminsäure aus  $^{18}\text{F}$ [F]Fluorpyruvat und ManNAc.

In der Aldolase-katalysierten Neu5Ac3F Synthese wurden beide möglichen Fluorepimere gebildet, jedoch stellt das axiale Epimer mit über 90% (abhängig von den Reaktionsbedingungen) das Hauptprodukt dar. Durch Anfangsreaktionsgeschwindigkeitsmessungen wurden die kinetischen Daten der Reaktion ermittelt, aus denen ein effektives Modell zur Charakterisierung der Reaktion erstellt werden konnte. So war es trotz einer relativen Aktivität von nur 4% bezogen auf die Standardreaktion der Aldolase mit ManNAc und Pyruvat möglich, durch die Wahl sinnvoller Reaktionsbedingungen, Neu5Ac3F in einem sechsfachen Repetitive-Batch in einer Menge von 2,7 g mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von 4,1 g/(l\*d) herzustellen. Die Aufreinigung und Isolierung des axialen Hauptproduktes (2,55 g) und die Abtrennung und Isolierung des equatorialen Nebenproduktes (150 mg) war in einem einzigen anionenchromatographischen Schritt aus dem Reaktionsgemisch möglich. Die Gesamtausbeute lag bei 69%. Die Synthese ist keinesfalls auf diesen Maßstab limitiert sondern kann ohne die Aussicht auf Schwierigkeiten einem *upscaling* unterzogen werden.

Elf weitere Zucker wurden nach diesem Reaktionsschema zu fluorierten Neuraminsäurederivaten umgesetzt. Bei allen Derivaten wurden beide Fluorepimere in unterschiedlichen Mengenverhältnissen gebildet. Einige zeigen darüber hinaus eine Epimerisierung der Hydroxylfunktion an C-4. Die Aktivitäten lagen, außer bei den Substraten 2-Desoxy-D-glucose und D-Mannose, dem Substrat für die Synthese von KDN, weit unter denen für die Neu5Ac3F-Synthese. 3F-KDN wurde im 500 mg Maßstab mit einem *de* von >90% hergestellt.

In Zusammenarbeit mit dem Institut für Nuklearchemie ist es gelungen, in der Aldolase-katalysierten Reaktion 3-[<sup>18</sup>F]Fluorneuraminsäure im geträgerten System aus [<sup>18</sup>F]Fluorpyruvat und ManNAc darzustellen. Dieses ist ein Beweis für die Schnelligkeit und Effizienz der entwickelten Methode, die diese Synthese trotz der kurzen Halbwertszeit des <sup>18</sup>F-Isotops von 110 min ermöglicht. Die Synthese der "heißen" Fluorneuraminsäure ist ein wichtiger Schritt zur Ermöglichung von Wechselwirkungsstudien mit Neu5Ac3F.

Versuche zur Aktivierung beider Epimere durch CMP-Neu5Ac-Synthetase aus *E. coli* zeigten keine Umsetzung für das equatoriale Nebenprodukt, jedoch wurde das axiale Hauptprodukt mit einer relativen Aktivität zum Standardsystem von Neu5Ac von 13% umgesetzt. Durch diese Synthese konnte erstmalig die Substanz CMP-Neu5Ac3F dargestellt werden. Die Reaktionsbedingungen wurden optimiert, so dass das Produkt in einer präparativen Synthese dargestellt und in einer Menge von 600 mg isoliert werden konnte.

Die Versuche zur Übertragung von Neu5Ac3F aus CMP-Neu5Ac3F auf Oligosaccharidstrukturen mit diversen  $\alpha$ 2-3-,  $\alpha$ 2-6- und  $\alpha$ 2-8-Sialyltransferasen waren jedoch nicht erfolgreich. Das zeigt, dass das Fluor einen stärkeren Einfluss auf die Eigenschaften der Verbindung ausübt, als zuvor angenommen wurde. Die nicht erfolgende Umsetzung kann durch mangelnde Bindung des Substrats an das Enzym oder aber durch die Unfähigkeit des Enzyms die Bindung zum CMP zu lösen um dann eine glycosidische Bindung auszubilden, hervorgerufen sein. CMP-Neu5Ac3F übt auf die  $\alpha$ -2,3-O-SiaT eine inhibierende Wirkung aus, was darauf hindeutet, dass obwohl keine Umsetzung zu beobachten ist, dennoch eine Bindung an das Enzym erfolgt.

Versuche zur Stabilität von CMP-Neu5Ac3F legen die Vermutung nahe, dass die Bindung von Neu5Ac3F so stabil ist, dass sie durch das Enzym nicht gespalten werden kann. Es handelt sich also nur noch formal um einen aktivierten Zucker.

Es gibt bislang keine ausführlichen Studien über den Mechanismus der Sialyltransferasereaktionen. Ausgehend von dem von *Murray et al.* postulierten Mechanismus<sup>134</sup> für die  $\alpha$ -1,3-Fucosyltransferase V haben *Kolter* und *Sandhoff* eine Hypothese über diesen Mechanismus aufgestellt<sup>135</sup>. Dabei wird die Besonderheit berücksichtigt, dass Sialinsäuren die einzigen Zucker sind, die in Konjugaten bislang ausschließlich  $\alpha$ -konfiguriert gefunden wurden. Wie bei der Fucosyltransferase (FucT) wird auch hier im Übergangszustand, wie in Abbildung 5-1

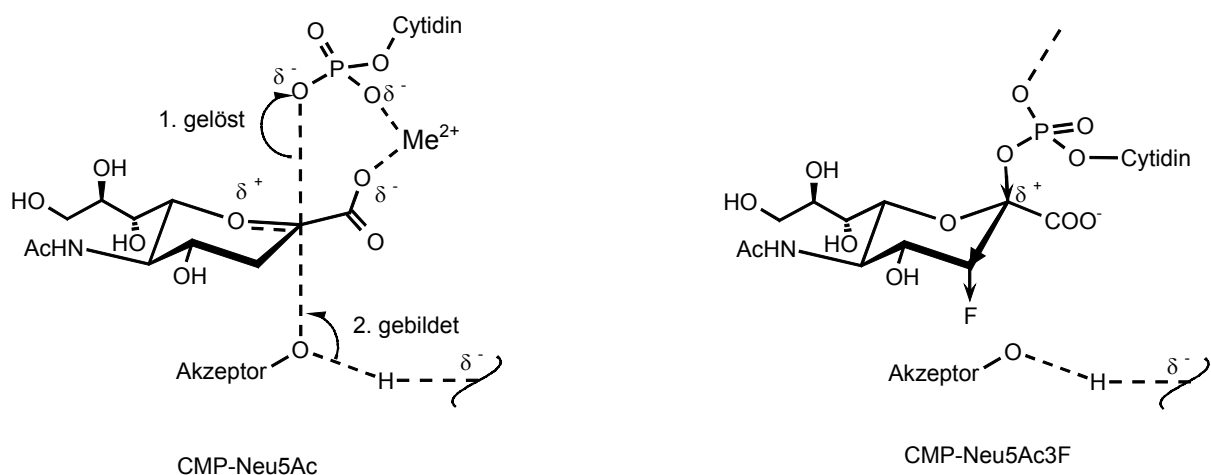
<sup>134</sup> Murray, B.W., Wittmann, V., Burkart, M.D., Hung, S.-C., Wong, C.-H., Mechanism of Human  $\alpha$ -1,3-Fucosyltransferase V: Glycosidic Cleavage Occurs Prior to Nucleophilic Attack *Biochemistry*, **1997**, *36*; 823-831

<sup>135</sup> Kolter, T., Sandhoff, K., Sialic acids – why allways  $\alpha$ -linked?, *Glycobiology*, **1997**, *7*, vii-x



dargestellt, ein Carbokation (Oxoniumion) gebildet. Durch die Präsenz der Carboxylfunktion wird das zweiwertige Metallkation, was bei der FucT zweizählig durch das Diphosphat chelatisiert wird, durch das Monophosphat und die Carboxylfunktion chelatisiert. So kann das CMP nach der Abspaltung nicht durch einen von oben angreifenden Akzeptor verdrängt werden, wodurch der Angriff ausschließlich von unten erfolgt, was zu der  $\alpha$ -Konformation führt.

Für die Frage, warum Neu5Ac3F durch eine SiaT nicht aus CMP-Neu5Ac3F auf den entsprechenden Akzeptor übertragen wird, ist das Oxoniumion im Übergangszustand entscheidend. Als Erklärung ist anzunehmen, dass das Fluor durch seinen starken Elektronenbedarf einen Elektronenmangel an C-2 hervorruft, der dazu führt, dass das Elektronenpaar der Bindung zwischen C-2 und der O-PO<sub>3</sub>R Gruppe so fest gebunden wird, das die Abspaltung dieser Gruppe unter Ausbildung des für die Übertragung notwendigen Carbokations nicht möglich ist.



**Abbildung 5-1:** vermutlicher Übergangszustand für die Sialyltransferasereaktion in Anlehnung an den Übergangszustand der  $\alpha$ -1,3-Fucosyltransferase

Diese Überlegung könnte CMP-Neu5Ac3F für mechanistische Studien an Sialyltransferasen interessant machen.

Tatsächlich wurden in der Vergangenheit unter anderem 2-Fluorozucker<sup>x</sup> für die Erforschung der Mechanismen verschiedener Glycosyltransferasen eingesetzt<sup>136</sup>. Es wird berichtet, dass einige 2-Fluorozucker inhibierend auf die entsprechenden Transferasen wirken. Dabei lassen sich die Fälle von irreversibler Inhibierung durch die Bildung eines kovalenten Adduktes und

<sup>x</sup> Die C-2 Position ist bei anderen Zuckern analog zur C-3 Position in der Neuraminsäure, da die anderen Zucker nicht die Säurefunktion tragen die bei Neu5Ac die C-1 Position einnimmt.

<sup>136</sup> Murray, B.W., Takayama, S., Schultz, J., Wong, C.-H., Mechanism and Specificity of Human  $\alpha$ -1,3-Fucosyltransferase V, *Biochemistry*, **1996**, 35, 11183-11195; McCarter, J.D.; Withers, S.G., 5-Fluoro Glycosides: A New Class of Mechanism-Based Inhibitors of Both  $\alpha$ - and  $\beta$ -Glucosidases, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 241-242; Porter, D.J.T., Merrill, B.M., Short, S.A., Identification of the Active Site Nucleophile in Nucleoside 2-Desoxyriboseyltransferase as Glutamic Acid 98, *J. Biol. Chem.*, **1995**, 270, 15551-15556

kompetitiver Inhibierung unterscheiden. Das kovalente Addukt wird in einer Proteolysereaktion nicht sequenziert. Dadurch kann die Region des aktiven Zentrums identifiziert werden.

Die Ausbildung einer kovalenten Bindung könnte auch im Falle der Sialyltransferasen zu den in Kapitel 3.4.1 erwähnten Schwierigkeiten bei der Reproduzierbarkeit der Inhibierungsmessungen führen. Die Inhibierung hängt maßgeblich von der Inkubationszeit des Inhibitors mit dem Enzym ab. Daher ist es sinnvoll, die Stärke der Inhibierung unter definierter Variation dieser Inkubationszeit zu untersuchen.

Da die Übertragung der Neu5Ac3F auf eine Oligosaccharidstruktur auf enzymatischem Wege nicht zum Ziel geführt hat, wurde der Versuch unternommen, eine Route zur Synthese eines Neu5Ac3F haltigen Oligosaccharids über eine Transglycosylierungsreaktion bzw. über eine chemische Synthese zu entwickeln.

Als Ausgangssubstanz für diese beiden Alternativen dient eine geschützte und in 2-Position durch Chlor chemisch aktivierte  $\beta$ -NeuAc<sub>5</sub>3FCOOCH<sub>3</sub>Cl. Es erwies sich jedoch als Problem, den peracetylierten Methylester der Neu5Ac3F zum 2-Chlorid zu aktivieren. Auch durch Variation der Reaktionsbedingungen zu extremeren Verhältnissen hinsichtlich Temperatur, Reaktionsdauer und Aktivität des Chlorierungsreagenzes durch Pyridinzusatz konnte keine Umsetzung erreicht werden.

Dieses Ergebnis zeigt, dass der Einfluss der Fluorierung in der C-3 Position so stark ist, dass moderate chemische Methoden nicht zum Erfolg führen.

Weitere Alternativen zur 2-Chlor- bzw. 2-Bromsubstitution des peracetylierten Neu5Ac3F Methylesters könnten

1. eine weitere Aktivierung des Chlorierungsreagenzes durch Zusatz von DMAP (Steglichbase) und Pyridin,
2. der Einsatz von Titantrichlorid als Chlorierungsreagenz,
3. oder der Einsatz von Titantribromid als Bromierungsreagenz zur Synthese der bromierten Verbindung sein<sup>137</sup>.

Eine Alternative zur Chlorierung bzw. Bromierung könnte sich in der Aktivierung der Fluor-neuraminsäure durch Substitution der anomeren Hydroxylfunktion durch ein weiteres Fluoratom bieten. Es liegen umfangreiche Arbeiten vor, die den Einsatz von C-1-fluorierten Hexosen als Substrate für Glycosidasen, Glycosynthasen (s.u.) und sogar Glycosyltransferasen beschreiben<sup>138</sup>.

Als  $\alpha$ -Fluoroether sind diese Glycosylfluoride relativ reaktive Komponenten, speziell, wenn sie durch Bindung an ein aktives Zentrum eines Enzyms aktiviert werden. Gleichzeitig sind

---

<sup>137</sup> Lemieux, R.U., Brice, C., The Mechanisms of Glucose Pentaacetate Anomerization and Levoglucosan Formation, *Can. J. Chem.*, **1952**, *30*, 295-310; Lemieux, R.U., Hayami, J.-I., The Mechanism of the Anomerization of the Tetra-O-acetyl-D-Glucopyranosyl Chlorides, *Can. J. Chem.*, **1965**, *43*, 2162-2173

<sup>138</sup> Williams, S.J., Withers, S.G., Review, Glycosyl fluorides in enzymatic reactions, *Carbohydr. Res.*, **2000**, *327*, 27-46

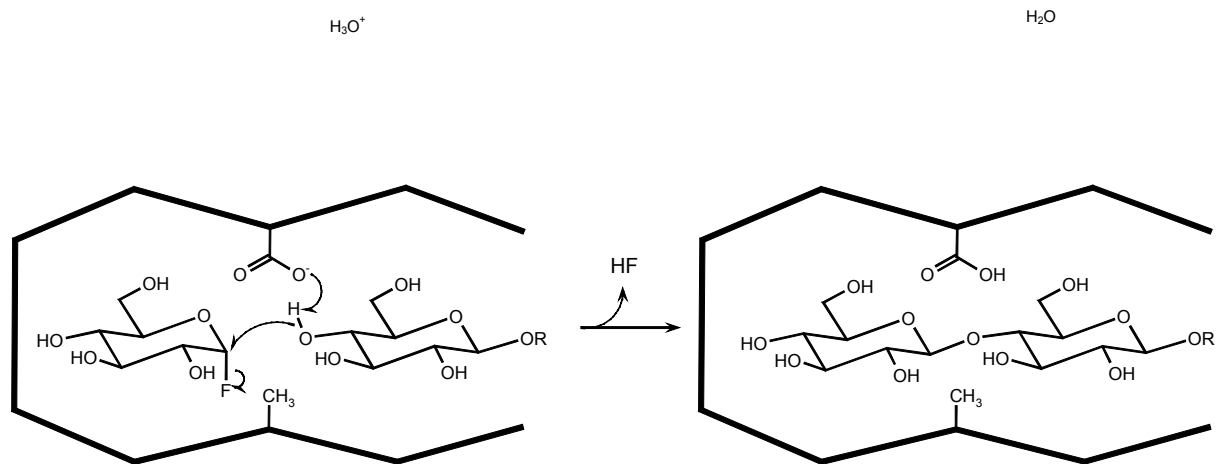
sie die einzigen Glycosylhalide, die ausreichend stabil sind, um nach Entschützung in gepufferten wässrigen Systemen gelöst zu werden ohne spontan zu hydrolysieren.

Im Allgemeinen sind Glycosylfluoride exzellente Substrate für Glycosidasen mit hohen  $v_{\max}/k_m$ -Verhältnissen. Im Gegensatz zu anderen chemisch aktivierten Zuckern wie z.B. Arylglycosiden ist kein Fall bekannt, in dem eine Glycosidase das entsprechende 1-Fluorglycosid nicht umsetzen kann. In vielen Fällen ist es sogar möglich, dass das falsche Anomer umgesetzt wird, da das Fluor als einzige Abgangsgruppe klein genug ist, um im aktiven Zentrum an einer Stelle zu binden, die von der räumlichen Ausdehnung sonst nur die Bindung von Wasser zulässt.

Bislang wurden jedoch noch keine Versuche dieser Art mit Sialidasen und den entsprechenden 2-Fluorneuraminsäuren berichtet. Insofern ist die Synthese solcher Fluorneuraminsäurederivate generell von Interesse.

Neben der erwähnten Hydrolyse eignen sich die 1-Fluorglycoside auch für die in Kapitel 3.4.2 geschilderte Transglycosylierung. Hier hat das Fluor den weiteren Vorteil, dass als Hauptnebenprodukt nur Fluorid entsteht, was sich leicht abtrennen lässt.

Eine Weiterentwicklung der Transglycosylierung mit Glycosidasen ist die Transglycosylierung mit Glycosynthasen. Glycosynthasen sind mutante Enzyme, die sich aus retendierenden Glycosidasen ableiten und bei denen die zweite Carboxylfunktion im aktiven Zentrum, die als katalytisches Nukleophil für die Hydrolyse des im ersten Schritt entstehenden Glycosyl-Enzym-Intermediats verantwortlich ist, durch eine Methylgruppe ersetzt ist. Bislang wurden zwei Glycosynthasen beschrieben, eine Glu358Ala Mutante einer  $\beta$ -Glucosidase aus *Agrobacterium sp.* und eine Glu134Ala Mutante einer (1-3)-(1-4)- $\beta$ -Glucanase aus *Bacillus licheniformis*. Durch die Unfähigkeit zur Hydrolyse kann die Glycosyl-Enzym-Bindung nur durch ein nicht enzymgebundenes Nukleophil gespalten werden. So können Transglycosylierungsreaktionen, wie eine beispielhaft in Abbildung 5-2 dargestellt ist, mit annähernd quantitativem Umsatz durchgeführt werden.



**Abbildung 5-2:** Mechanismus der Transglycosylierung durch Glycosynthasen

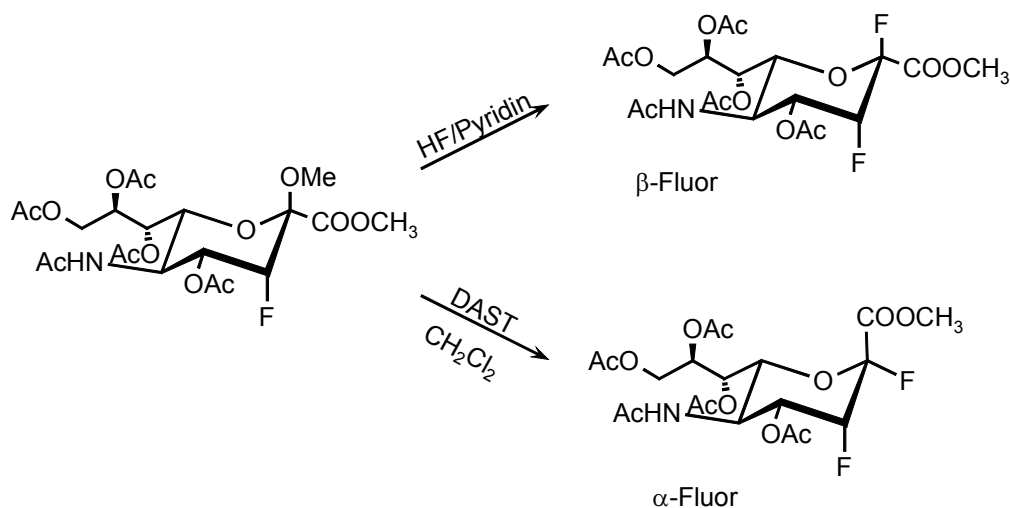
Diese Eigenschaften der 1-Fluorglycoside führten *Lougheed et al.* zu der Frage, ob die geringe Größe und hohe Reaktivität der Fluoridabgangsgruppe diese Verbindungen auch zu Substraten für Nucleotiddiphosphat-abhängige Glycosyltransferasen macht. Bislang war noch kein funktionelles Substratanalog für die Nucleotiddiphosphatzucker berichtet worden. Tatsächlich zeigte sich, dass  $\alpha$ -Galactosylfluorid als Substrat an Stelle von UDP-Galactose für die  $\alpha$ -Galactosyltransferase aus *Neisseria meningitis* fungiert. Die Reaktion findet allerdings nur in Gegenwart von katalytischen Mengen UDP statt.<sup>139</sup> In Abwesenheit eines passenden Akzeptors wird UDP-Galactose synthetisiert. Es wird angenommen, dass UDP notwendig ist, um eine optimale Ausrichtung der Reaktanten zu gewährleisten. Die geringe Größe des Fluorsubstituenten lässt eine koinzidente Bindung sowohl des  $\alpha$ -Fluorglycosids als auch des UDPs zu. Analog zu den retendierenden Glycosidasen wird vermutlich ein Intermediat gebildet, welches dann mit dem Glycosylakzeptor reagiert. Sollte sich herausstellen, dass dieses Konzept universell auf Transferasen anwendbar ist, hat dieses große Bedeutung für die Oligosaccharidsynthese und damit auch für die Übertragung von Neuraminsäure.

Nach dem oben Gesagten ist es im Fall der Neu5Ac3F durchaus möglich, dass ein Fluor in 2-Position eine ausreichend reaktive Abgangsgruppe darstellt, um trotz des Einfluss des Fluors in der 3-Position eine Umsetzung durch beispielsweise eine Sialidase-katalysierte Transglycosylierung zu ermöglichen.

Allgemein können die in den genannten Reaktionen verwendeten 1-Fluorglycoside aus den acetylierten hemiacetalen der entsprechenden Zucker durch eine Reaktion mit Hydrogenfluorid in Pyridin zum thermodynamisch stabileren Produkt, oder durch Umsetzung mit DAST

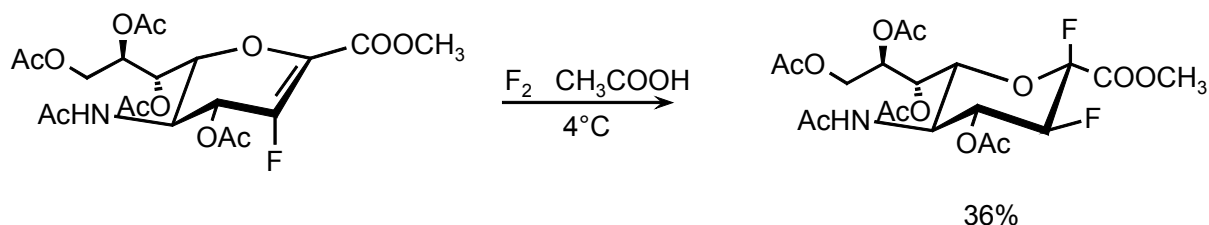
<sup>139</sup> Lougheed, B., Ly, H.D., Wakarchuk, W.W., Withers, S.G., Glycosyl Fluorides Can Function as Substrates for Nucleotide Phosphorsugar-dependent Glycosyltransferases, *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274, 37717-37722

(Diethylaminoschwefeltrifluorid) oder Behandlung der entsprechenden Chloride bzw. Bromide mit Silberfluorid oder Silbertetrafluorid zum Produkt mit invertierter Stereochemie umgesetzt werden. Diese Synthese sähe in analoger Anwendung auf Neu5Ac3F wie in Abbildung 5-3 gezeigt aus.



**Abbildung 5-3:** Synthesevorschlag für die Darstellung von Neu5Ac<sub>2</sub>,3F<sub>2</sub>

Sollte diese Syntheseroute nicht möglich sein, so bietet sich eine Alternative in der in Abbildung 5-4 dargestellten Route. Bei dieser Synthese geht man von peracetylierter Neu5Ac<sub>2</sub>en aus. Durch elektrophile Addition entsteht neben geringen Mengen der einfach fluorierten Neu5Ac3F<sub>axial</sub> und Neu5Ac3F<sub>equatorial</sub> das zweifach fluorierte Produkt mit α-ständigem anomeren Fluor und equatorialem Fluor in 3-Position in 36%iger Ausbeute<sup>140</sup>.



**Abbildung 5-4:** Alternativer Synthesevorschlag für die Darstellung von Neu5Ac<sub>2</sub>,3F<sub>2</sub>

Für weitere Versuch zur Übertragung der in dieser Arbeit dargestellten Neu5Ac3F auf Oligosaccharide könnte eine andere, rein enzymatische Alternative in der Reversen Hydrolyse liegen. Hier wird ausgenutzt, dass es sich bei der Glycosidase-katalysierten Hydrolyse um eine Gleichgewichtsreaktion handelt<sup>141</sup>. Durch den Einsatz sehr hoher Konzentrationen können die unter normalen bzw. physiologischen Bedingungen entstehenden Spaltprodukte unter Abspaltung von Wasser kondensiert werden. Möglicherweise fällt hier der Einfluss des Fluors weniger ins Gewicht. Jedoch muss auch hier die Bindung zwischen C-2 und der anomeren Hydroxylfunktion gelöst werden.

Außer diesen Überlegungen zur Neu5Ac3F Übertragung ist es aber auch interessant, Neu5Ac3F<sub>axial</sub> als Inhibitor für Sialidasen zu testen, da Verbindungen der Neuraminsäure mit einer Doppelbindung zwischen C-2 und C-3 bekanntermaßen potente Inhibitoren sind, aber nur sehr wenige andere Derivate mit einer Variation in 3 Position vorhanden sind. In der Literatur zeigen Untersuchungen mit Neu5Ac3F<sub>equatorial</sub> und Neu5Ac2,3F<sub>2</sub> eine Inhibierung von Sialidasen aus *A. ureafaciens*, *Streptococcus sp.*, *C. perfringens*, *V. cholerae* und aus dem Homogenat aus Mausmilz<sup>142</sup>. Auch bei anderen Glycosidasen lässt sich eine Inhibierung durch in 2-Position fluorierte Zucker beobachten. Auch in diesem Fall wird die Inhibierung durch das Unvermögen zur Ausbildung des im Übergangszustand notwendigen Oxoniumions hervorgerufen. Daher waren und sind auch bei den Glycosidasen die 2-Fluorglycoside für mechanistische Studien von großem Wert. Verfügt das 2-Fluorglycosid über eine sehr gute Aglycon-Abgangsgruppe, so kann es kovalent an das aktive Zentrum binden und sind somit als mechanismusbasierter Inhibitor wirken. Die Stärke der Inhibierung ist bei verschiedenen Glycosidasen unterschiedlich. Die Inhibierung von  $\beta$ -Glucosidase und  $\beta$ -Mannosidase durch 2-Desoxy-2-fluoro- $\beta$ -glucopyranosyl- und 2-Desoxy-2-fluoro- $\beta$ -mannopyranosylfluoride konnte sogar an Ratten *in vivo* demonstriert werden. Die Inhibierung der entsprechenden Glycosidasen im Hirn beweisen, dass diese Verbindungen sogar die Blut/Hirn Schranke überwinden. Radiomarkiertes 2-Desoxy-2-[<sup>18</sup>F]-fluoro- $\beta$ -mannopyranosylfluorid wird daher als potentielle *imaging* Substanz für Glycosidasen durch PET vorgeschlagen<sup>143</sup>.

## 5.2 Glycolylneuraminsäure

Glycolylneuraminsäure ist deshalb von besonderem Interesse, weil sie im Gegensatz zu NeuAc fast ausschließlich bei Tieren, nicht aber beim Menschen vorkommt. Bei einem zu 98 - 99% gleichen Genom von Affen und Menschen ist dieser Unterschied die einzige,

---

<sup>140</sup> Nakajima, T., Hori, H., Ohrai, H., Meguro, M., Ido, T., Synthesis of *N*-Acetyl-3-fluoro-neuraminic Acids, *Agric. Biol. Chem.*, **1988**, 52, 1209-1215

<sup>141</sup> Thiem, J., Applications of enzymes in synthetic carbohydrate chemistry, *FEMS Microbiol. Rev.*, **1995**, 16, 193-211; Fernández-Mayoralas, A., Synthesis and modification of carbohydrates using glycosidases and lipases, *Topics Curr. Chem.*, **1997**, 186, 1-21; Kren, V., Thiem, J., Glycosylation employing biosystems: from enzymes to whole cells, *Chem. Soc. Rev.*, **1997**, 26, 463-473

<sup>142</sup> Hagiwara, T., Kijima-Suda, I., Ido, T., Ohrai, H., Tomita, K., Inhibition of bacterial and viral sialidasen by 3-fluoro-*N*-acetylneuraminic acid, *Carbohydr. Res.*, **1994**, 263, 167-172

<sup>143</sup> McCarter, J., Adam, M., Withers, J., *Label. Compd. Rad.*, **1992**, 31, 1005-1009

bislang gut charakterisierte biochemische Differenz zwischen Affen und dem Menschen. Für die Untersuchung der Funktion von Neu5Gc werden größere Mengen dieser Substanz benötigt. Da es keine reichhaltige natürliche Quelle und bislang kaum effektive Ansätze für eine technische Synthese für Neu5Gc gibt, ist die Entwicklung einer solchen Synthese von großem Interesse.

Ziel war es, das von *Kragl* charakterisierte Zwei-Enzym-System aus Epimerase und Aldolase für die Synthese von Neu5Ac aus GlcNAc und Pyruvat für die Synthese von Neu5Gc einzusetzen. Während die Umsetzung von ManNGc und Pyruvat durch die *N*-Acetylneuraminsäure-Aldolase in der Literatur bereits berichtet wird, wurde die Epimerisierung von GlcNGc zu ManNGc noch nicht beschrieben.

In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass GlcNGc durch eine in *E. coli* clonierte *N*-Acetylglucosamin 2-Epimerase [E.C. 5.1.3.8] zu ManNGc epimerisiert wird. Diese Epimerisierung wurde kinetisch charakterisiert.

Wenn auch die Aldolase-katalysierte Kondensation von ManNGc mit Pyruvat zu Neu5Gc bereits beschrieben wurde, so wurde sie hier ebenfalls erstmalig kinetisch charakterisiert.

Für beide Enzymreaktionen wurde ein effektives kinetisches Modell erstellt. Diese kinetischen Modelle konnten durch Anpassung der Parameter an sechs Batchversuche zur Synthese von Neu5Gc aus GlcNGc und Pyruvat im Zwei-Enzym-System optimiert und verifiziert werden.

Mit Hilfe der kinetischen Daten wurden Bedingungen für eine präparative Synthese von Neu5Gc ermittelt. Aus 6,5 g GlcNGc konnten in einer Fed-Batch Synthese nach einer Aufreinigung durch Anionenchromatographie 5,7 g Neu5Gc gewonnen werden, was einer 64%igen Gesamtausbeute entspricht. Auch diese Reaktion ist keinesfalls auf diesen Maßstab limitiert. Auch hier bietet sich ein Repetitive-Batch oder sogar ein CSTR (continuously stirred tank reactor) für eine effizientere Enzymnutzung an.

Tabelle 5-1 zeigt eine Gegenüberstellung der in dieser Arbeit gemessenen kinetischen Größen der Neu5Gc und der von *Kragl* bestimmten Parameter für die Neu5Ac<sup>144</sup>.

Die wesentlichen Unterschiede sind die um etwa den Faktor fünf höhere Aktivität der Epimerasereaktion für GlcNGc<sup>x</sup>, die um den Faktor zehn höhere Aktivität der Aldolase für ManNAc und der um den Faktor 6,6 kleinere  $k_m$ -Wert der Aldolase für ManNGc. Unter anderem aus diesem kleinen  $k_m$ -Wert resultiert die um den Faktor 1,7 höhere Gleichgewichtskonstante der Gesamtreaktion zur Bildung von Neu5Gc gegenüber Neu5Ac.

---

<sup>144</sup> Kragl, U., Reaktionstechnik biokatalytischer Prozesse am Beispiel der kontinuierlichen Synthese von *N*-Acetylneuraminsäure, Dissertation Universität Bonn, 1992

<sup>x</sup> Bei den in dieser Arbeit und bei *Kragl* verwendeten Epimerasen handelt es sich um verschiedene Enzyme! Das hier verwendete Enzym hat für GlcNAc nur eine geringfügig kleinere Aktivität als für GlcNGc.

Parameter <sup>1</sup>	Einheit	Neu5Gc	Neu5Ac <sup>2</sup>
$v_{\max}^{epi}$	U/mg	<b>0,429</b>	<b>0,078</b>
$v_{\max}^{ald}$	U/mg	<b>1,39</b>	<b>13,8</b>
$v_{\max}^{ald}$	U/mg	2,96	8,51
$k_{m(GlcNGc)}$	mM	14,7	14,0
$k_{m(ManNGc)}^{epi}$	mM	7,98	35,2
$k_{i(Pyr)}^{epi}$	mM	10,5	40,5
$k_{m(ManNGc)}^{ald}$	mM	61,1	402
$k_{m(Pyr)}$	mM	0,141	0,136
$k_{i(Pyr)}^{ald}$	mM	1,08	1,30
$k_{m(Neu5Gc)}$	mM	7,34	9,44
$k_{i(Neu5Gc)}$	mM	30,7	-
$K_{eq}^{epi}$	-	0,189	0,201
$K_{eq}^{ald}$ (Haldane)	l/mol	<b>52,2</b>	<b>29,4</b>
$K_{eq}^{ald}$ (Gleichgew.)	l/mol	<b>38,8</b>	
$K_{eq}^{ges}$	l/mol	<b>9,87</b>	<b>5,90</b>

1 Für Neu5Ac ist Gc durch Ac zu ersetzen; Bedeutung der Konstanten s. Kapitel 4.3.4  
 2 von *Kragl* gemessen

**Tabelle 5-1:** Gegenüberstellung der kinetischen Parameter für die Epimerase- und Aldolasereaktion zur Bildung von Neu5Gc bzw. Neu5Ac

Die größere Gleichgewichtskonstante führt nach Gleichung 5-1 zu einem um den Faktor 1,7 höheren Gleichgewichtsumsatz.

$$K_{eq}^{ges} = \frac{c_{(Neu5Gc)}}{c_{(GlcNGc)} \cdot c_{(Pyr)}}$$

**Gleichung 5-1:**

Der kleine  $k_m$ -Wert für ManNGc gleicht die verringerte maximale Aktivität fast aus, da durch die vorgeschaltete Epimerasereaktion das Substrat für die Aldolase über den gesamten Zeitraum der Reaktion nur in limitierter Menge vorhanden ist, und daher bei der Neu5Ac Synthese die Sättigungskonzentration und somit die maximale Aktivität bei weitem nicht erreicht wird. So kommt es zustande, dass in der präparativen Neu5Gc-Batch-Synthese, die mit vergleichbaren Enzymkonzentrationen (s. Tabelle 5-1) wie die kontinuierliche Synthese



von Neu5Ac im Enzymmembranreaktor (CSTR) gelaufen ist, die Raum-Zeit-Ausbeute etwas höher liegt.

	Einheit	Neu5Gc <sup>1</sup> Batch	Neu5Ac <sup>2</sup> CSTR
Epimerase	U/ml	2,24	11,9
Aldolase	U/ml	3,32	4
GlcNGc(Ac)	mM	400	200
Pyr	mM	1000	100
RZA	g/(l*d)	192	165

1 in dieser Arbeit durchgeführt  
2 von Kragl durchgeführt

**Tabelle 5-2:** Gegenüberstellung der Raum-Zeit-Ausbeuten der Batch-Synthese von Neu5Gc und der kontinuierlichen Synthese von Neu5Ac

Um die Raum-Zeit-Ausbeute für die Neu5Gc-Synthese weiter zu steigern und den Enzymverbrauch zu senken, bietet sich auch hier der Einsatz eines kontinuierlichen Verfahrens an.

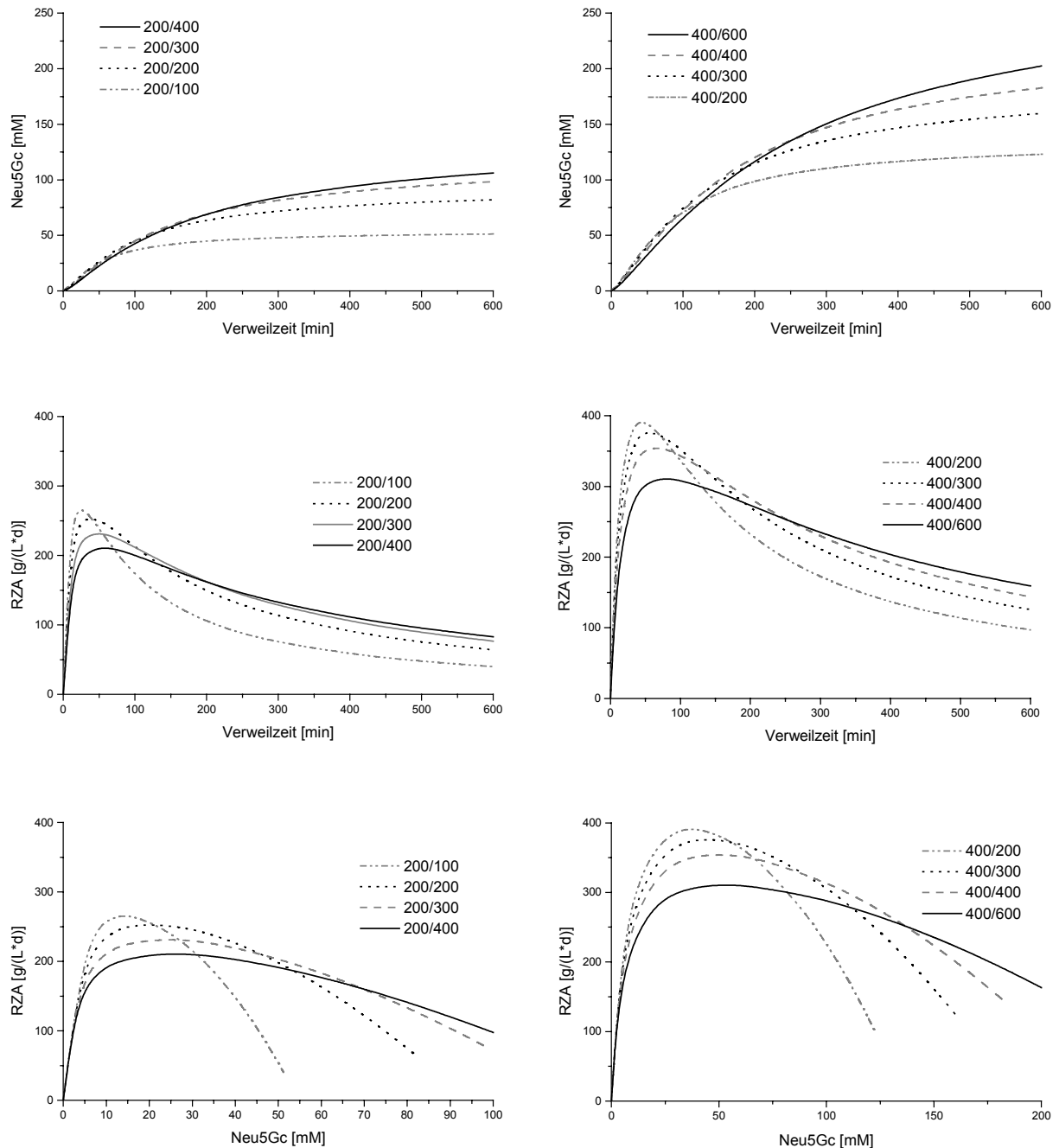
Im folgenden sind daher einige Simulationen zur RZA für die Neu5Gc-Synthese angeführt, unter Zuhilfenahme des in Kapitel 4.3.4 erstellten Modells und Erweiterung der in Gleichung 3-4 aufgeführten Stoffbilanzen um den Konvektionsterm für den CSTR.

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{GlcNGc}]}{dt} &= -v_{\text{epi}} + \frac{[\text{GlcNGc}]_0 - [\text{GlcNGc}]}{\tau} \\ \frac{d[\text{ManNGc}]}{dt} &= -v_{\text{ald}} + v_{\text{epi}} + \frac{[\text{ManNGc}]_0 - [\text{ManNGc}]}{\tau} \\ \frac{d[\text{Pyr}]}{dt} &= -v_{\text{ald}} + \frac{[\text{Pyr}]_0 - [\text{Pyr}]}{\tau} \\ \frac{d[\text{Neu5Gc}]}{dt} &= v_{\text{ald}} + \frac{[\text{Neu5Gc}]_0 - [\text{Neu5Gc}]}{\tau} \end{aligned}$$

**Gleichung 5-2:** Stoffbilanzen der Reaktanten des Zwei-Enzym-Systems im CSTR

Als Enzymkonzentrationen wurden die für die Batch-Synthese aufgrund der in Kapitel 4.3.5.1 gewonnenen Erkenntnisse eingesetzt.

In Abbildung 5-5 sind für verschiedene Verhältnisse von GlcNGc/Pyr die Produktbildung und die RZA in Abhängigkeit von der Verweilzeit und der Zusammenhang zwischen Produktbildung und RZA aufgetragen.



**Abbildung 5-5:** Simulierte Produktbildung und RZA in Abhängigkeit von der Verweilzeit und der Zusammenhang zwischen Produktbildung und RZA für verschiedene Verhältnisse von GlcNGc/Pyr [mM] und die aufgetragen bei einer Aldolasekonzentration von 3,32 U/ml (3,1 mg/ml) und einer Epimerasekonzentration von 2,24 U/ml (8,57 mg/ml)

Da die Reaktionsgeschwindigkeit mit zunehmendem Umsatz also mit zunehmender Verweilzeit sinkt, fällt die RZA nachdem sie ein Maximum durchlaufen hat mit steigender Verweilzeit ab. Die maximale RZA wird bei den ausgewählten Bedingungen mit 395 g/(L\*d) nach 50 min bei einem Substratverhältnis von GlcNGc zu Pyr von 400 mM/200 mM erreicht. Zu diesem Zeitpunkt hat das Produkt eine Konzentration von ca. 43 mM erreicht.

Da das Produkt aus der Produktlösung isoliert werden muss, ist ein zu geringer Umsatz trotz der hohen RZA kontraproduktiv, da die Verluste auch bei Rückführung der Edukte und der Zeitaufwand für die Reinigung zu hoch sind. Es gilt daher, ein günstiges Verhältnis von Umsatz zu RZA zu finden, das zu einer möglichst hohen isolierten RZA führen kann. Da der Aufwand für die Reinigung jedoch nicht quantifiziert wurde, muss dieser Punkt für die jeweilige Anwendung abgeschätzt werden. Sinnvoll erscheint mindestens die Hälfte des Gleichgewichtsumsatzes zu erreichen.

In Tabelle 5-3 sind die Produktkonzentrationen beim Gleichgewichtsumsatz für die verschiedenen Substratverhältnisse aufgeführt und die RZA bei dem jeweiligen halben Gleichgewichtsumsatz.

GlcNGc/Pyr	200/100	200/200	200/300	200/400	400/200	400/300	400/400	400/600
Produkt bei GU [mM]	54,7	93,7	120	137	137	190	233	288
½ GU [mM]	27,4	46,9	60	68,5	68,5	95	117	144
RZA bei ½ GU [g/(l*d)]	288	206	184	163	346	315	289	241

**Tabelle 5-3:** Produktkonzentrationen beim Gleichgewichtsumsatz (GU) und die RZA bei dem jeweiligen halben Gleichgewichtsumsatz (½ GU) für die verschiedenen Substratverhältnisse; alle Größen [mM]

Demnach ist auf alle Fälle eine Konzentration von 400 mM GlcNGc zu wählen und eine Pyruvatkonzentration von 300 – 400 mM, da hier sowohl guter Raum-Zeit-Ausbeuten, als auch gute Produktausbeuten erreicht werden.

Die weitere Umsetzung von Neu5Gc zu CMP-Neu5Gc ist bislang nur durch tierische Synthetasen beschrieben worden. Hier konnte erstmalig gezeigt werden, dass Neu5Gc durch eine Synthetase aus *E. coli* mit einer relativen Aktivität von 4% zum Standardsystem mit Neu5Ac umgesetzt wird.

In der präparativen Synthese von CMP-Neu5Gc trat das Problem auf, dass durch den, aufgrund der geringen Aktivität langsamen Reaktionsverlauf und die Tatsache, dass die Enzymfraktion nicht ohne Verlust ihrer Aktivität sterilfiltriert werden kann, ein mikrobieller Bewuchs auftrat. Durch den Bewuchs ist der überwiegende Teil der Edukte und des Produktes verschwunden.

Dennoch gelang es durch eine Anionenaustauschchromatographie und anschließende reverse Osmose eine kleine Menge von 70 mg der CMP-Neu5Gc in einer Reinheit von über 97% zu isolieren.

Trotz dieser Schwierigkeit ist es lohnend, die Synthese von CMP-Neu5Gc mit diesem Enzym weiterzuentwickeln. Obwohl die Aktivität des Enzyms für dieses Substrat so gering ist, scheint diese Route praktikabler als die Umsetzung mit tierischen Synthetasen, da das Enzym aus *E. coli* im Gegensatz zu den tierischen Enzymen in großen Mengen zugänglich ist.

Die hier durchgeführten Arbeiten mit diesen beiden Derivaten der Neuraminsäure zeigen, dass auch nicht-natürliche Substrate, für die ein Enzym nur schwache Aktivität zeigt, durch eine gezielte reaktionstechnische Optimierung, effektiv umgesetzt werden können.

*„Von den Enzymen lernen, heißt siegen lernen“*

C. Wandrey

## 5.3 Essenz

### 5.3.1 Fluorneuraminsäure

- Neu5Ac3F konnte erstmalig enzymatisch aus ManNAc und F-Pyr Aldolase-katalysiert hergestellt werden.
- Für diese Reaktion wurde ein kinetisches Modell aufgestellt, welches für die Simulation von Satzreaktoren genutzt wurde.
- In einem 6-fachen Repetitive-Batch konnte Neu5Ac3F mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von 4,1 g/(l\*d) hergestellt und in einer Menge von **2,55 g Neu5Ac3F<sub>axial</sub>** und 150 mg Neu5Ac3F<sub>equatorial</sub> isoliert werden.
- Elf weitere Zucker wurden nach diesem Schema zu fluorierten Neuraminsäurederivaten umgesetzt. 3F-KDN wurde im 500 mg Maßstab hergestellt.
- Es ist **erstmalig** gelungen, **3-[<sup>18</sup>F]Fluorneuraminsäure** darzustellen durch die Aldolase-katalysierte Reaktion im geträgerten System aus [<sup>18</sup>F]Fluorpyruvat und ManNAc.
- Neu5Ac3F<sub>axial</sub> konnte **erstmalig** zu **CMP-Neu5Ac3F** umgesetzt werden mit einer RZA von 11,1 g/(l\*d) und in einer Menge von **600 mg** isoliert werden.
- Die hier hergestellte Neu5Ac3F und CMP-Neu5Ac3F werden über Calbiochem vertrieben

### 5.3.2 Glycolylneuraminsäure

- Es konnte erstmalig gezeigt werden, dass GlcNGc durch eine rekombinante *N*-Acetylglucosamin 2-Epimerase [E.C. 5.1.3.8] zu ManNGc epimerisiert wird.
- Die Epimerisierung von GlcNGc und die anschließende Aldolase-katalysierte Aldolkondensation mit Pyruvat wurde kinetisch charakterisiert.
- Für beide Enzymreaktionen wurde ein kinetisches Modell erstellt.
- Die kinetischen Modelle konnten durch Anpassung der Parameter an sechs Satzreaktorversuche zur Synthese von Neu5Gc aus GlcNGc und Pyruvat im Zwei-Enzym-System verifiziert werden.
- Aus einer präparativen Fed-Batch Synthese konnten nach Anionenchromatographie **5,7 g Neu5Gc** gewonnen werden
- Erstmalig konnte gezeigt werden, dass Neu5Gc durch eine Synthetase aus *E. coli* mit einer relativen Aktivität von 4% umgesetzt werden kann.
- Aus einer präparativen Synthese von **CMP-Neu5Gc** mit dieser Synthetase konnten **70 mg** Produkt isoliert werden.

## 6 Material und Methoden

### 6.1 Aufreinigung der CMP-Neu5Ac-Synthetase

Die CMP-Neu5Ac-Synthetase wird aus dem Zellhomogenat des *E. coli* K235 gewonnen. Es erfolgen zwei Extraktionsschritte, eine Extraktion in eine PEG-Phase und eine Rückextraktion in eine Natriumcitratphase, und eine anschließende Entsalzung der Natriumcitratphase über Diafiltration.

#### Extraktionslösungen

Für die Extraktion werden folgende Lösungen angesetzt:

1. PEG-1550, 60%ig (w/w)  
3 kg PEG-1550 werden unter Erwärmen in 2 kg Bidest aufgelöst.
2. Na-Citrat \* 2H<sub>2</sub>O, 40%ig (w/w), pH 7,5  
2 kg Na-Citrat \* 2H<sub>2</sub>O werden unter Erwärmen in 3 kg Bidest aufgelöst und dann mit 40 %iger (w/w) Zitronensäure auf pH 7,5 titriert.

#### Sicherheitsmaßnahmen

Die Homogenisierung liefert kein zellfreies Homogenat. Aufgrund der fakultativ pathogenen Eigenschaften des *E. coli* müssen die Arbeiten mit dem Zellhomogenat unter besonderen Vorsichtsmaßnahmen erfolgen, um Kontamination der Umgebung und von Personen zu vermeiden. Tragen von Mundschutz, Handschuhen und Kittel ist unerlässlich, die Schutzkleidung muss bei Verlassen des Arbeitsraumes abgelegt werden. Verunreinigungen sind sofort wirksam zu desinfizieren (70%ige Ethanollösung, Mukozid oder konz. Natronlauge).

#### PEG-Extraktion

2 kg Zellhomogenat  
1,34 kg PEG 1550 60%ig  
1,14 kg Na-Citrat 40%ig, pH 7,5

werden in ein geschlossenes Gefäß gegeben und gut durchmischt bis eine Emulsion entsteht. Das Gemisch wird in große Zentrifugenbecher gepumpt und 30 min unter Kühlung auf 4-8°C bei 7000-8000 Upm zentrifugiert. Das Gemisch trennt sich dabei in eine flüssige überstehende Phase und in eine feste Phase. Der Überstand wird abgepumpt und die verbleibenden Pallets mit 5 M NaOH aus den Zentrifugenbechern herausgelöst, autoklaviert und verworfen.

#### Rückextraktion

2 kg Überstand aus der PEG-Extraktion  
1,6 kg Na-Citrat 40%ig, pH 7,5  
0,4 kg Bidest

wie oben beschrieben mischen und Zentrifugieren. Das Gemisch trennt sich in zwei flüssige Phasen, zwischen denen eine trübe Mittelschicht liegt. Die obere Phase, die Citratphase, die den Synthetaserohextrakt enthält, wird abgepumpt. Die untere Phase und die Mittelschicht werden autoklaviert und verworfen.

### **Diafiltration**

Die Synthetase liegt in etwa 1300 ml zähflüssiger Citratphase vor. Durch langsames kontinuierliches Umpumpen der Lösung über ein Filtronmodul mit zwei Membranstapeln (10.000) bei 4°C wird das Citrat langsam mit 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer mit pH 7,5 ausgewaschen. Es ist ratsam regelmäßig die Enzymaktivität in Retentat und Permeat zu kontrollieren.

Die Diafiltration kann beendet werden, wenn ca. das 20-fache Volumen der Ausgangslösung mit Puffer aus dem Membranmodul ausgespült wurde. Die Enzymlösung wird über das Modul so weit wie möglich eingeeengt und mit dem Puffer aus dem Membranstapel ausgespült.

So wurde 1 l Synthetase-Rohextrakt mit einer Aktivität von 0,34 U/ml nach Standardassay gewonnen

### **Synthetase-Standardassay**

Stammlösungen:

1. Tris-HCl-Puffer  
1,5 M Tris-HCl +10 mM DTT lösen und mit HCl auf pH 9,3 bringen, dann 0,4 M MgCl<sub>2</sub> dazugeben
2. 300 mM Neu5Ac in Puffer lösen und mit NaOH auf pH 8 bringen
3. 300 mM CTP in Puffer lösen und mit NaOH auf pH 8 bringen

Assay:

25 µl Puffer  
205 µl Bidest  
17 µl Neu5Ac-Lsg  
3 µl CTP-Lsg  
5 µl Synthetase zum Starten  
bei 30°C 30 min reagieren lassen  
mit 200 µl Acetonitril abstoppen, Probe 5 min ins -20°C Eisfach stellen und anschließend abzentrifugieren

## **6.2 Enzymassays**

### **6.2.1 Aldolaseassay**

**Für die Messungen zur Synthese von Neu5Ac3F**

Aldolase Stammlösung      10 mg/ml in Puffer

Aldolase	1 mg/ml	
pH	7,5	Puffer 10 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Temp.	25°C	

- Substratkonzentrationen wie in entsprechenden Abbildungen angegeben
- Starten durch Enzymzugabe
- Reaktionsdauer abhängig von Aktivität für die jeweiligen Bedingungen (6-8 Probennahmen zwischen 5 min und 60 min)
- Stoppen durch 1/1 Verdünnung mit 0,1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

#### **Für die Messungen zur Synthese von Neu5Gc**

Aldolase Stammlösung	1mg/ml in Puffer gelöst	
Aldolase	0,01 mg/ml	
pH	7,5	Puffer 10 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
T	25°C	

- Substratkonzentrationen wie in entsprechenden Abbildungen angegeben
- Starten durch Enzymzugabe
- Reaktionsdauer abhängig von Aktivität für die jeweiligen Bedingungen (6-8 Probennahmen zwischen 5 min und 60 min)
- Stoppen durch 1/1 Verdünnung mit 0,1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

### **6.2.2 Epimeraseassay**

#### **Für die Epimerisierung von GlcNGc/GlcNAc zu ManNGc/ManNAc**

Epimerase Stammlösung	0,8 mg/ml in Puffer gelöst	
Epimerase	0,04 mg/ml	
pH	7,5	Puffer 10 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
T	25°C	
ATP	5 mM	
MgCl <sub>2</sub>	5 mM	

- Substratkonzentrationen wie in entsprechenden Abbildungen angegeben
- Starten durch Enzymzugabe
- Reaktionsdauer abhängig von Aktivität für die jeweiligen Bedingungen (6-8 Probennahmen zwischen 5 min und 60 min)
- Stoppen durch 1/1 Verdünnung mit 0,1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

### **6.2.3 Synthetaseassay**

Stammlösungen:

1. Synthetase 18 mg/ml in bidest
2. Tris-HCl-Puffer  
1,5 M Tris-HCl +10 mM DTT lösen und mit HCl auf pH 9,3 bringen, dann 0,4 M MgCl<sub>2</sub> dazugeben



3. 300 mM Neu5Ac in Puffer lösen und mit NaOH auf pH 8 bringen
4. 300 mM CTP in Puffer lösen und mit NaOH auf pH 8 bringen

**Assay:**

Puffer 10 % (V/V)  
Synthetase 6,7 % (V/V) bei Neu5Ac3F  
Synthetase 8,3 % (V/V) bei Neu5Gc

- Substratkonzentrationen wie in entsprechenden Abbildungen angegeben
- Starten durch Enzymzugabe
- Reaktionsdauer abhängig von Aktivität für die jeweiligen Bedingungen (6-8 Probennahmen zwischen 5 min und 60 min)
- Stoppen durch 3/2 mit Verdünnung mit Acetonitril, anschließend Probe 5 min. ins  $-20^{\circ}\text{C}$  Eisfach stellen und anschließend abzentrifugieren

### 6.3 Enzymatische Umsetzungen

#### 6.3.1 Fluorneuraminsäure

##### Präparative Repetitive-Batch Synthese

ManNAc	200 mM
F-Pyr	200 mM
Aldolase	8 mg/ml
pH	7,5
Temp.	25°C
Vol.	10 ml

- Synthese gestartet durch Enzymzugabe in Pulverform
- Wiederholungszyklen gestartet durch Substratlösungszugabe

##### Präparative Synthese von CMP-Neu5Ac3F

Synthetase	40 mg/ml	
Neu5Ac3F	20 mM	
CTP	5 mM	+ 3 Zugaben á 5 mM
PP <sub>i</sub> -ase	1,7 U/ml	
MgCl <sub>2</sub>	40 mM	+ 3 Zugaben á 40 mM
pH	9	
T	30°C	
Vol.	100 ml	

- Reaktion gestartet durch Enzymzugabe in Pulverform

#### 6.3.2 Neu5Gc

##### Batches zur Verifizierung der Kinetik

pH	7,5	Puffer 10 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
T	25°C	
ATP	5 mM	
MgCl <sub>2</sub>	5 mM	

- Beide Enzyme in Puffer gelöst, Konzentrationen wie in entsprechenden Abbildungen angegeben
- Substratkonzentrationen wie in entsprechenden Abbildungen angegeben
- Batches gestartet durch GlcNGc Zugabe

#### Präparativer Batch

Aldolase	3,1 mg/ml	
Epimerase	8,57 mg/ml	
GlcNGc	400 mM	
Pyr	400 mM	
pH	7,5	Puffer 10 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
T	25°C	
ATP	5 mM	
MgCl <sub>2</sub>	5 mM	
Vol.	68,5 ml	

- Batch gestartet durch GlcNGc Zugabe

#### Präparative Synthese von CMP-Neu5Ac3F

Synthetase	40 mg/ml
Neu5Gc	20 mM
CTP	5 mM
PP <sub>i</sub> -ase	1,7 U/ml
MgCl <sub>2</sub>	40 mM
pH	9
T	30°C
Vol.	154 ml

- Reaktion gestartet durch Enzymzugabe in Pulverform

## 6.4 Aufreinigungen

### Neu5Ac3F

Das Enzym wird über eine Ultracel-YM regenerierte Zellulose Membran mit einer Ausschlussgrenze von 10.000 kDa abgetrennt.

Die Produktlösung enthält die Reaktionskomponenten in etwa der folgenden Zusammensetzung:

---

Neu5Ac3F	175 mM
ManNAc	25 mM
F-Pyr	25 mM

Über eine Anionenchromatographie wird das Produkt nach den in Tabelle 6-1 aufgeführten Bedingungen aufgereinigt und durch Lyophilisierung isoliert.

---

Anionentauscherharz	Dowex 1x2, Formiat-Form
Korngröße	200 – 400 mesh, entspricht 37 – 74 $\mu\text{m}$
Kapazität	900 mval/l Gel
Säulenbettdimensionen	$\varnothing$ 2,1 cm, h = 20, V = 69 ml
Produktlösung	55 ml
Flussrate Probenaufgabe	10 ml/h (50 ml über 5 h)
Flussrate H <sub>2</sub> O	10 ml/h (200 ml über 20 h)
Flussrate HCOOH Gradient	75 ml/h (500 ml über 7 h)
HCOOH Gradient	0 –1 M

**Tabelle 6-1:** Bedingungen zur Isolierung von Neu5Ac3F mittels Anionenaustauschchromatographie

---

### **CMP-Neu5Ac3F**

Zunächst werden die restlichen Nukleotidphosphate aus dem Reaktionsgemisch entfernt. Dazu werden nach Beendigung der Umsetzung dem Reaktionsgemisch 2 U/ml alkalische Phosphatase zugesetzt, die das restliche CTP und das durch Zersetzung entstandene CMP und CDP in Cytidin überführen. Diese Zersetzung ist nach einer Stunde abgeschlossen.

Der während der Umsetzung entstandene Niederschlag aus Proteinen und Salzen wird abzentrifugiert, anschließend werden die Enzyme über eine Amicon YM 10 Membran abfiltriert und verworfen. Über eine Anionenchromatographie wird das Produkt nach den in Tabelle 6-2 aufgeführten Bedingungen aufgereinigt.

---

Anionentauscherharz	Dowex 1x2, Chlorid-Form
Korngröße	200 – 400 mesh, entspricht 37 – 74 µm
Kapazität	900 mval/l Gel
Säulenbettdimensionen	∅ 2,5 cm, h = 13, V = 128 ml
Produktlösung	400 ml
Flussrate Probenaufgabe	50 ml/h (400 ml über 8 h)
Flussrate H <sub>2</sub> O	50 ml/h (200 ml über 4 h)
Flussrate NaCl Gradient	50 ml/h (550 ml über 11 h)
NaCl Gradient	0 –1 M
Temp.	4°C

**Tabelle 6-2:** Bedingungen zur Isolierung von CMP-Neu5Ac3F mittels Anionenaustauschchromatographie

---

Die Chromatographie liefert das Produkt in knapp 10 g NaCl. Zur Abtrennung des Salzes wird eine reverse Osmose durchgeführt<sup>145</sup>.

Dazu wurde die Laboranlage P 28 der Firma Celfa eingesetzt. Sie besteht aus einem auf 4°C thermostatisierten Druckzylinder des Volumens 500 ml, einer Zahnradschleife zur Umwälzung der Lösung und einem Membranmodul, das unterhalb des Druckzylinders angebracht ist. Als Membran wird eine MX 07 Membran der Firma Osmonics eingesetzt. Durch Drucküberlagerung mit einem Inertgas wird die Anlage mit einem Druck von 8 bar beaufschlagt. Der Volumenverlust durch das ablaufende Permeat wird über eine füllstandgesteuerte gegen-druckstabile Wechselkolbenpumpe über Zugabe von Wasser ausgeglichen.

### Neu5Gc

Die Reinigung und Isolierung erfolgt analog dem bei der Neu5Ac3F eingesetzten Verfahren. Allerdings wurde das Säulenvolumen entsprechend der größeren Substanzmengen verdoppelt.

### CMP-Neu5Gc

Die Reinigung und Isolierung erfolgt analog dem bei der CMP-Neu5Ac3F eingesetzten Verfahren.

## 6.5 Chemische Synthesen

### Methyl-5-acetamido-3,5-didesoxy-3-fluor- $\alpha,\beta$ -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosonat (Neu5Ac3FCOOCH<sub>3</sub>)

4,5 g stark saurer Ionentauscher AG 50W-X8 (BioRad) 100-200 Mesh, Hydrogenform wird mit etwas Methanol abs. gewaschen. Eine Suspension aus 1,5 g (4,57 mmol) Neu5Ac3F in 300 ml absolutem Methanol wird mit dem Ionentauscher bei RT gerührt. Im Laufe der

---

<sup>145</sup> Dudziak, G., Fey, S., Hassbach, L., Kragl, U., Nanofiltration for purification of nucleotide sugars, *J., Carbohydr. Chem.*, **1999**, *18*, 41-50

Reaktion entsteht eine klare Lösung. Nach 3 h wird die Lösung abdekantiert und der Ionentauscher mit weiteren 150 ml gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden unter Vakuum zur Trockne eingedampft. Es entsteht ein glasiger Feststoff.

Ausbeute 1,5 g (96%), farbloser Feststoff,  $R_f$  0,35 (1-Butanol/Eisessig/Wasser = 5/2/2)

$C_{12}H_{20}FNO_9$  341,3 g/mol

**Methyl-5-acetamido-2,4,7,8,9-penta-O-acetyl-3,5-didesoxy-3-fluor- $\alpha,\beta$ -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosonat (NeuAc<sub>6</sub>3FCOOCH<sub>3</sub>)**

Zu einer Lösung von 1,5 g (4,39 mmol) Neu5Ac3FCOOCH<sub>3</sub> in 21 ml Pyridin werden 21 ml Essigsäureanhydrid zugetropft. Die Reaktionslösung wird über 16 h bei RT gerührt. Dann werden 105 ml Dichlormethan zugefügt. Die Mischung wird auf Eis gegossen und die organische Phase viermal mit 35 ml Wasser ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wird dreimal mit Toluol codestilliert.

Ausbeute 2,4 g (quantitativ), farbloser Feststoff,  $R_f$  0,71 (Essigester/Ethanol = 10/2)

$C_{22}H_{30}FNO_{14}$  551,5 g/mol

**Methyl-5-acetamido-2,4,7,8,9-penta-O-acetyl-3,5-didesoxy-3-fluor- $\alpha$ -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylchlorid)onat (NeuAc<sub>5</sub>3FCOOCH<sub>3</sub>Cl)**

Zu einer auf 0°C gekühlten Lösung von 100 mg (0,18 mmol) NeuAc<sub>6</sub>3FCOOCH<sub>3</sub> in 2 ml Acetylchlorid wird 1 ml einer bei 0°C hergestellten Lösung von Chlorwasserstoff in Acetylchlorid (entsteht durch Zugabe eines Tropfens Wasser zum Acetylchlorid) hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wird 16 h bei RT gerührt. Nach abdestillieren des Acetylchlorids wird das Rohprodukt dreimal mit Toluol codestilliert.

Bei dem erhaltenen Rückstand handelt es sich um das Edukt. Es erfolgte keine Umsetzung

Variation der Reaktionsbedingungen:

1. Reaktionszeit auf eine Woche verlängert  $\Rightarrow$  keine Umsetzung
2. Reaktionstemperatur auf 50°C erhöht  $\Rightarrow$  keine Umsetzung
3. Zusatz von katalytischen Mengen Pyridin  $\Rightarrow$  keine Umsetzung

## 6.6 Analytik

### 6.6.1 HPLC

Dieses HPLC-System wurde eingesetzt,

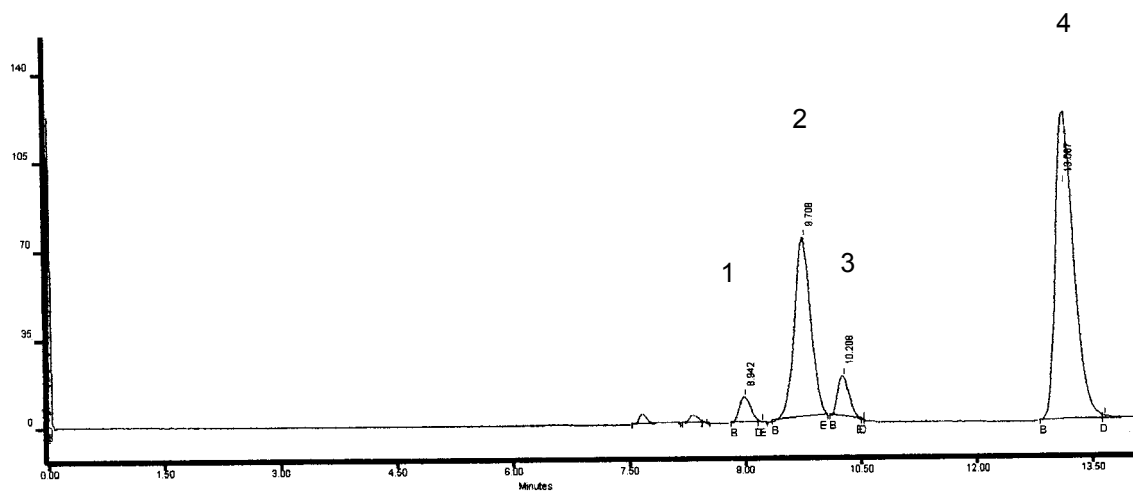
- für die kinetischen Untersuchungen der Aldolasereaktion im System ManNAc/F-Pyr/ Neu5Ac3F<sub>(axial)</sub>/Neu5Ac3F<sub>(equatorial)</sub> und die Synthesen von Neu5Ac3F (Abbildung 6-1)

- für die kinetischen Untersuchungen der Aldolasereaktion im System GlcNGc/ManNGc/Pyr/Neu5Gc und die Synthesen von Neu5Gc (Abbildung 6-2)
- für die kinetischen Untersuchungen der Epimerasereaktion im System GlcNAc/ManNAc

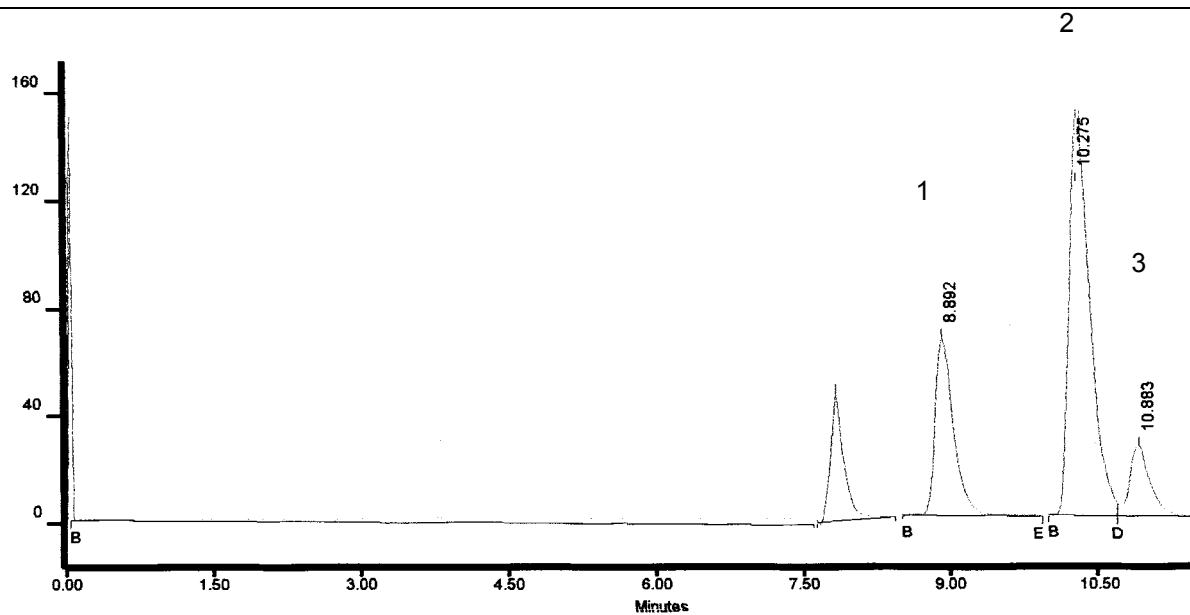
System:

Vakuumbtgasler RC-3312	ERMA CR., über Sycam
S 1100 Solvent delivery System	Sycam, Gilching
851-AS Probengeber	Jasco, Groß-Zimmern
Säulenofen GAT-CH-150	Gamma Analysen Technik, über Sycam
UV-Detektor Linear™ 206 PHD	Linear Instruments, Northport Loop West USA
Integrator Pyramid Software	Sycam, Gilching

Vorsäule	Micro-Guard Cation H Cartridge	Bio-Rad, München
Säule	Aminex HPX-87-H (300•7,8 mm)	Bio-Rad, München
Säulentemperatur	65°C	
Eluent	6 mM H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	
Flußrate	isokratisch bei 0,6 ml/min	
Wellenlänge	195 nm	



**Abbildung 6-1:** HPLC-Chromatogram Neu5Ac3F Synthese 1) Neu5Ac3F<sub>(equatorial)</sub>, 2) Neu5Ac3F<sub>(axial)</sub>, 3) F-Pyr und 4) ManNAc



**Abbildung 6-2:** HPLC-Chromatogram Neu5Gc Synthese 1) Neu5Gc, 2) GlcNGc und ManNGc und 3) Pyr

### 6.6.2 Kapillarelektrophorese - CE

Bei der Kapillarelektrophorese handelt es sich um ein modernes Standard-Analyseverfahren in der Biochemie. Die Analyte wandern in einem elektrischen Feld. Das Trennprinzip beruht auf unterschiedlichen Verhältnissen von Molekülladung zu Volumen. Die Kapillarelektrophorese ist kein chromatographisches Verfahren. Chromatographische Verfahren beruhen auf Wechselwirkungen zwischen stationärer und mobiler Phase. Bei der CE sind diese Wechselwirkungen idealerweise nicht vorhanden. So stellt sie eine komplementäre Methode zu herkömmlichen chromatographischen Methoden dar.

Die CE wurde eingesetzt für

- für die kinetischen Untersuchungen der Synthetasereaktion im System Neu5Ac/CMP-Neu5Ac, im System Neu5Ac3F/CMP-Neu5Ac3F und im System Neu5Gc/CMP-Neu5Gc und die Synthesen von CPM-Neu5Ac3F und CMP-Neu5Gc (Methode 1, Abbildung 6-3)
- für die kinetischen Untersuchungen der Epimerasereaktion im System GlcNGc/ManNGc/Pyr/Neu5Gc (Methode 2, Abbildung 6-4)
- für die Untersuchungen der SiaT-Reaktionen mit CMP-Neu5Ac und CMP-Neu5Ac3F (Methode 1)

System:

MDQ mit Diodenarray-Detektor

Beckman, München

## Methode 1

Analyse von Nucleotiden und Nucleotidzuckern

Unbeschichtete Kapillare: L = 50 cm, ID = 75 µm

Puffer: 80 mM CAPS, pH 10,4

Spannung: 30 kV

## Methode 2

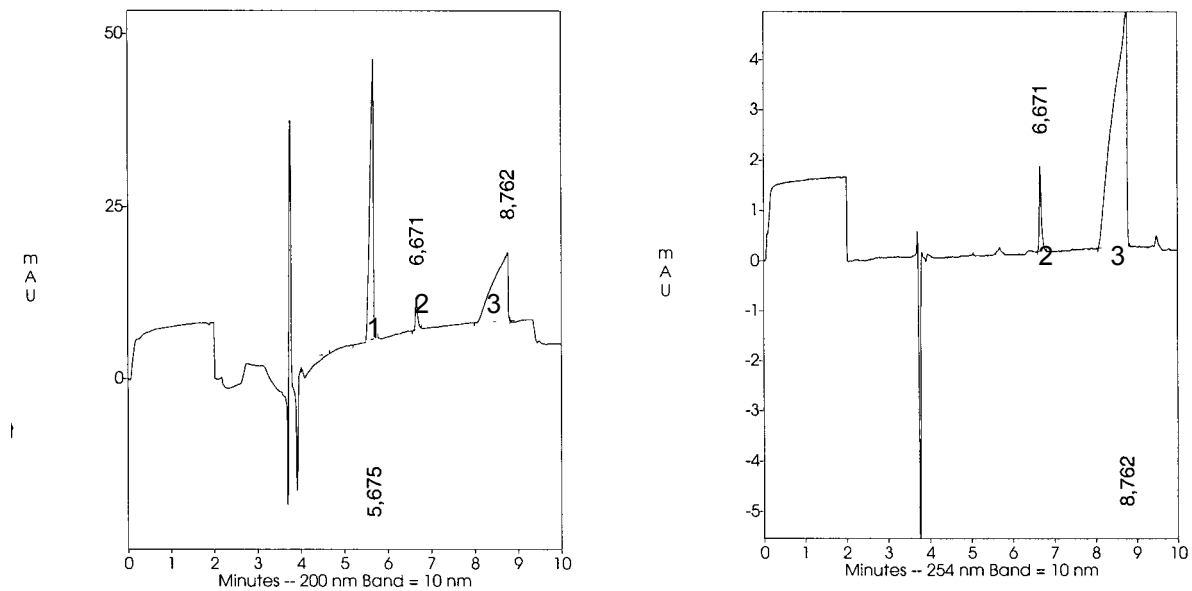
Analyse von Zuckern mit indirekter Detektion<sup>x</sup>

Unbeschichtete Kapillare: L = 50 cm, ID = 75 µm

Puffer: 20 mM DPA und 4 mM CTAB, pH 12,1

Spannung 25 kV reverse Polarität

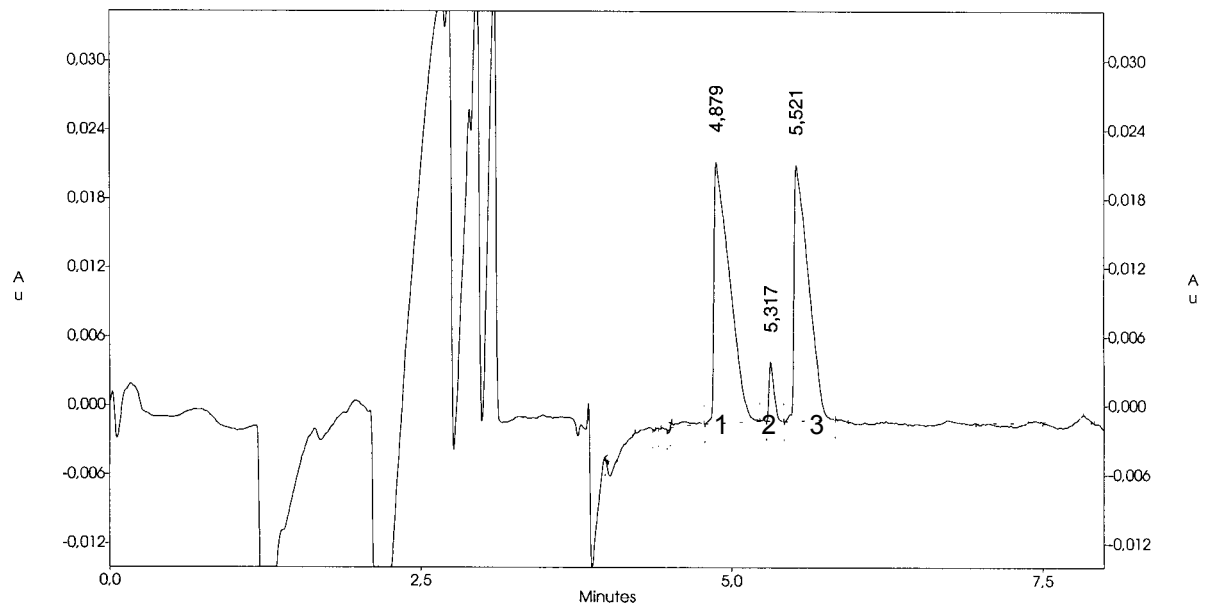
Der Puffer muß alle 2 h frisch angesetzt werden, da er aufgrund des hohen pH-Wertes nicht stabil ist.



**Abbildung 6-3:** Elektropherogramm der Analyse von Nucleotiden und Nucleotidzuckern bei 200 nm und bei 254 nm; 1) Neu5Ac, 2) CMP-Neu5Ac und 3) CTP

<sup>x</sup> Mit der indirekten Detektion können Verbindungen gemessen werden, die keine ausreichende UV-Aktivität zur Detektion aufweisen. Es wird ein UV-aktiver Puffer verwendet, dessen Verdrängung durch die weniger UV-aktiven Analyten als negative Peaks sichtbar ist. Durch Subtraktion eines Referenzkanals werden diese in positive Peaks umgewandelt.





**Abbildung 6-4:** Elektropherogram der Analyse von Zuckern mit indirekter Detektion bei 200 nm, Referenzkanal 350 nm; 1) Neu5Gc, 2) ManNGc und 3) GlcNGc

### 6.6.3 NMR-Spektren

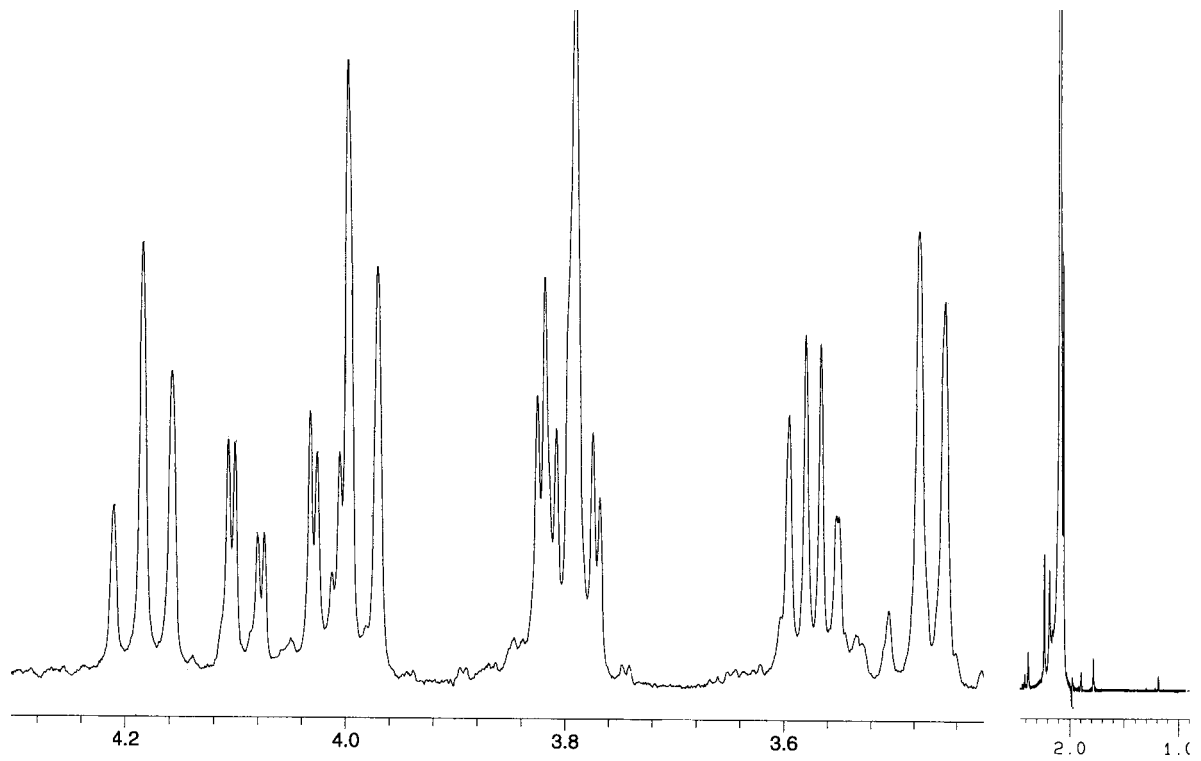


Abbildung 6-5: Neu5Ac3F<sub>(axial)</sub> in D<sub>2</sub>O, <sup>1</sup>H-NMR, 400 Hz

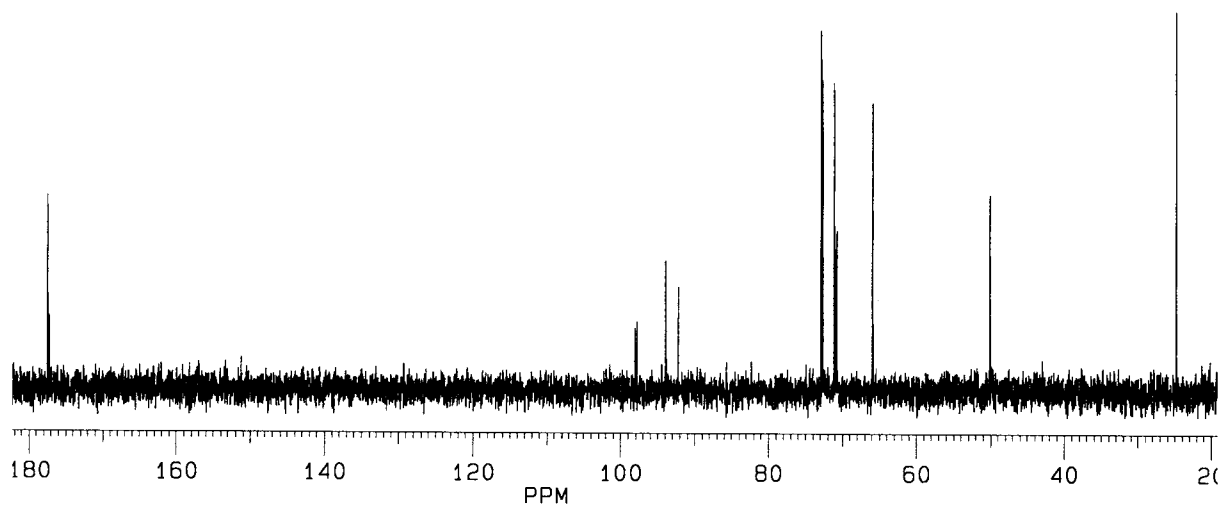


Abbildung 6-6: Neu5Ac3F<sub>(axial)</sub> in D<sub>2</sub>O, <sup>13</sup>C-NMR, 400 Hz

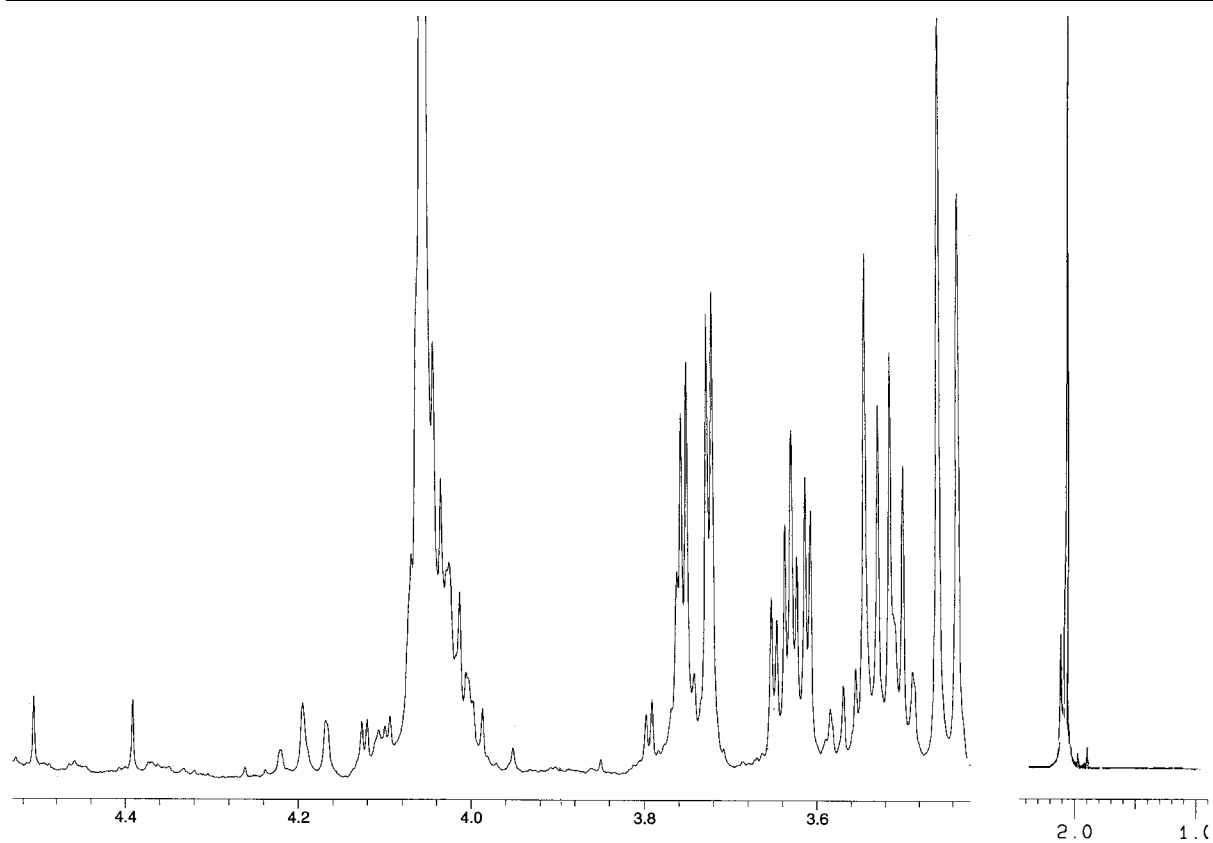


Abbildung 6-7: Neu5Ac3F<sub>(equatorial)</sub> in  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $^1\text{H-NMR}$ , 400 Hz

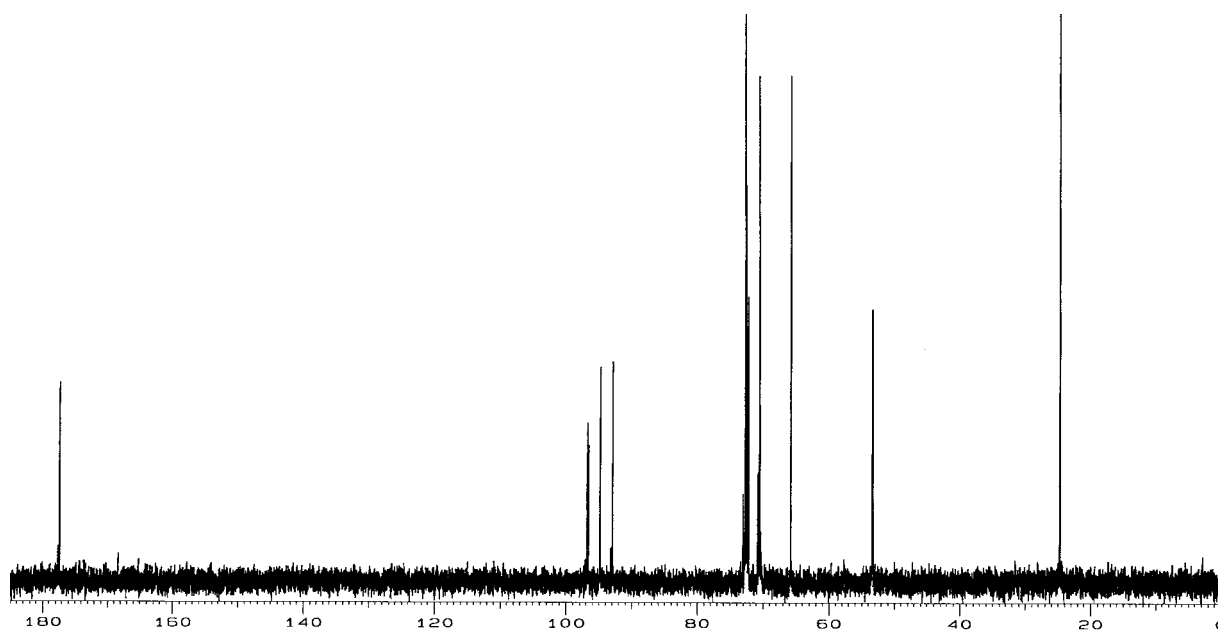
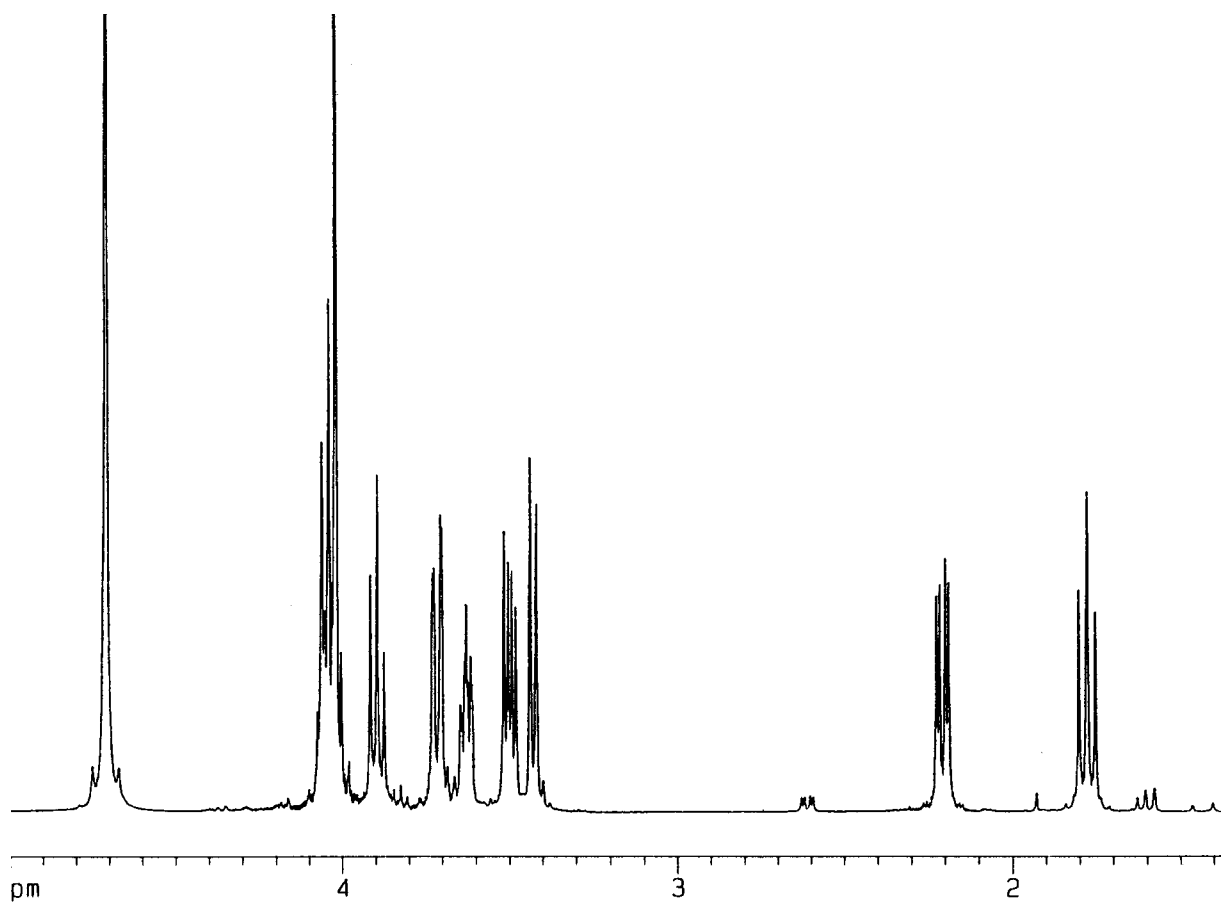


Abbildung 6-8: Neu5Ac3F<sub>(equatorial)</sub> in  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , 400 Hz



**Abbildung 6-9:** Neu5Gc in D<sub>2</sub>O, <sup>1</sup>H-NMR, 300 Hz

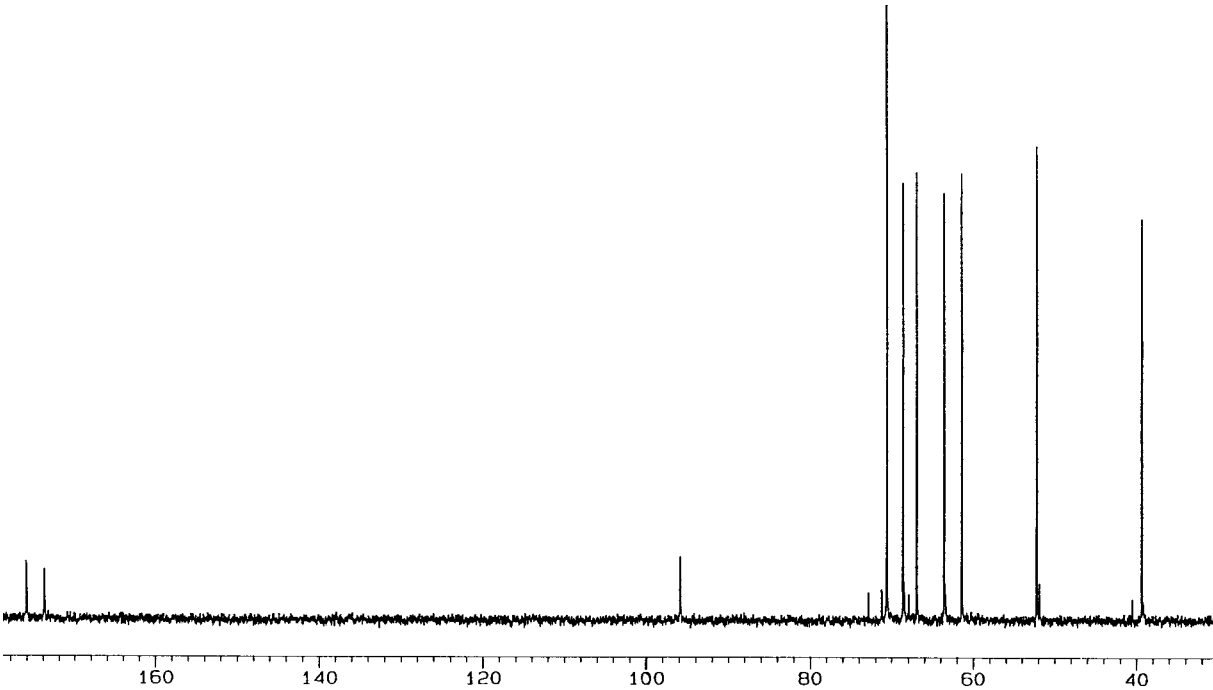
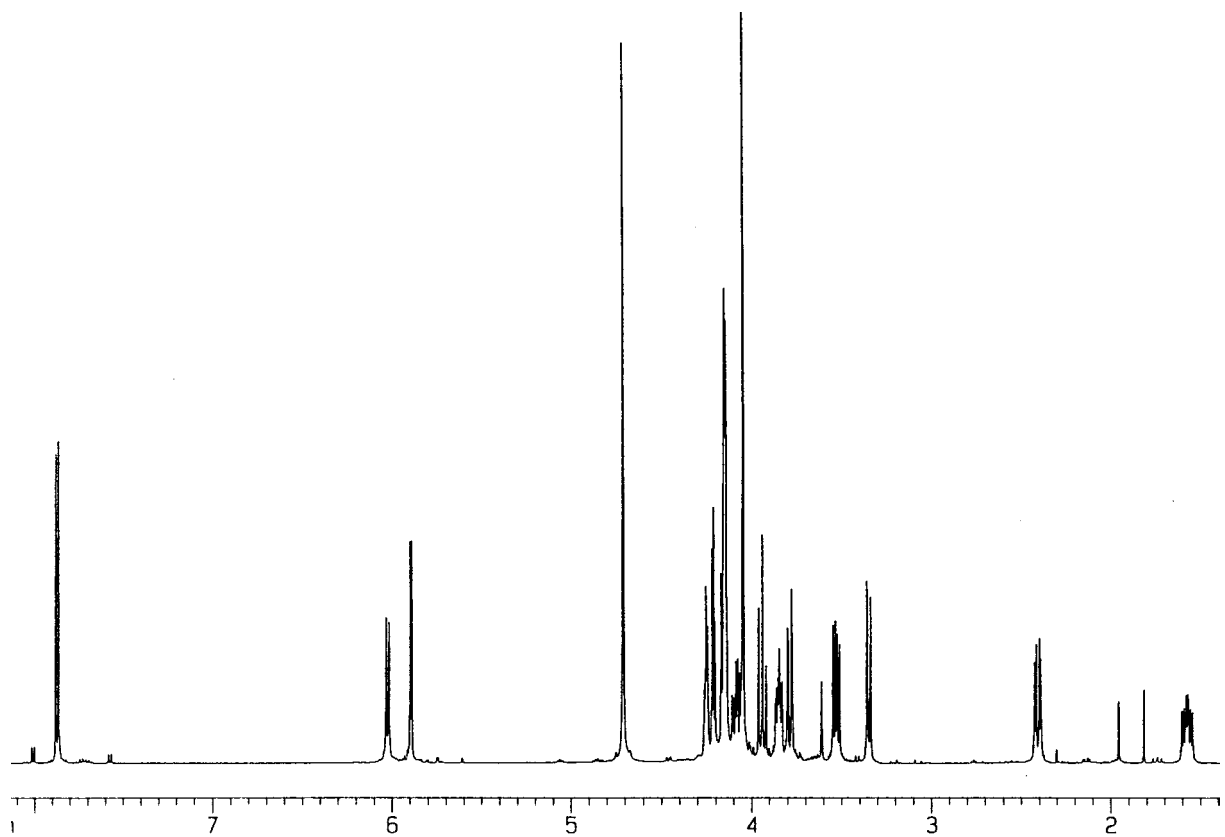
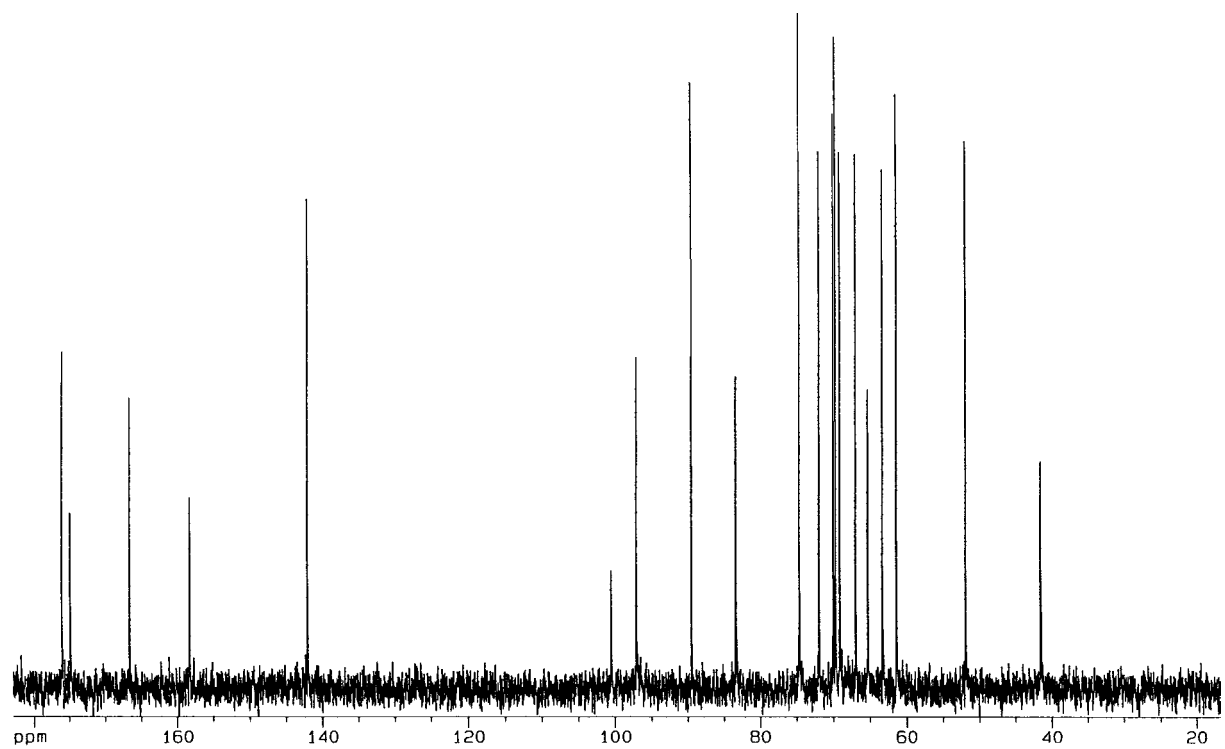


Abbildung 6-10: Neu5Gc in D<sub>2</sub>O, <sup>13</sup>C-NMR, 300 Hz



**Abbildung 6-11:** CMP-Neu5Gc in  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $^1\text{H-NMR}$ , 300 Hz



**Abbildung 6-12:** CMP-Neu5Gc in  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , 300 Hz

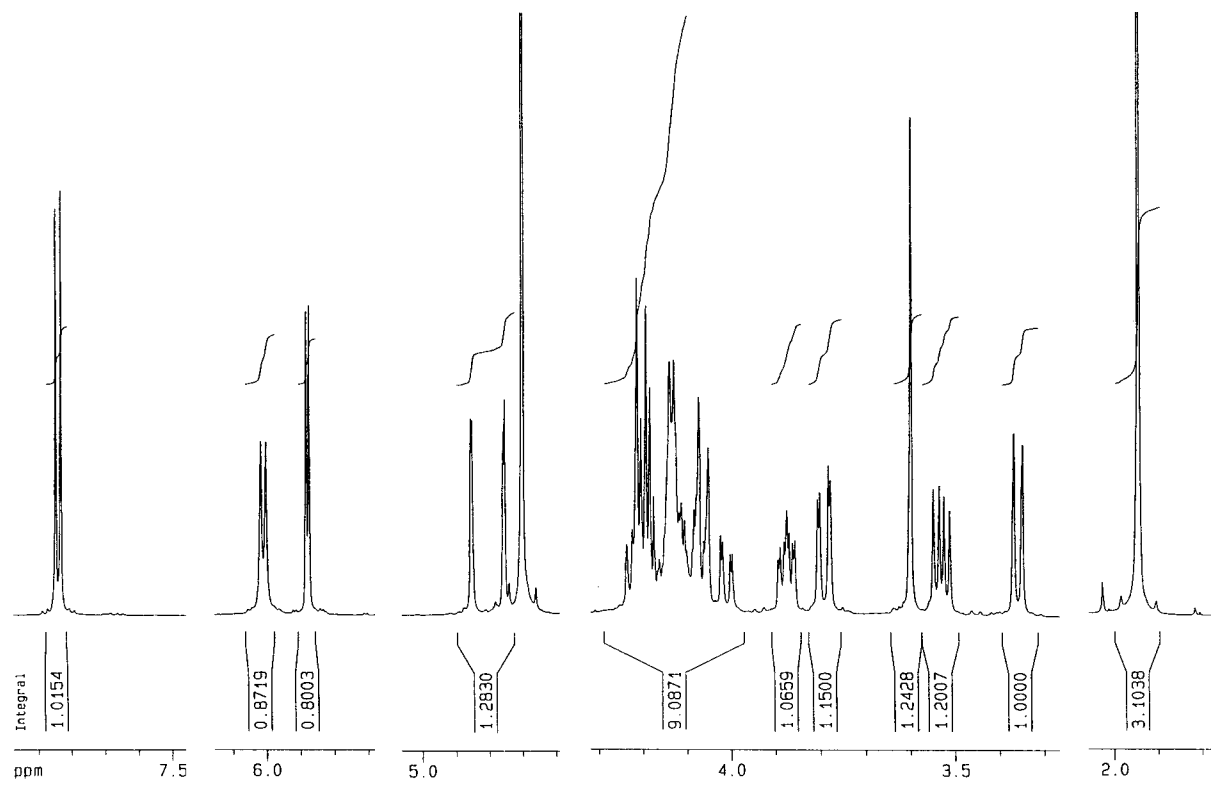


Abbildung 6-13: CMP-Neu5Ac3F in D<sub>2</sub>O, <sup>1</sup>H-NMR, 300 Hz

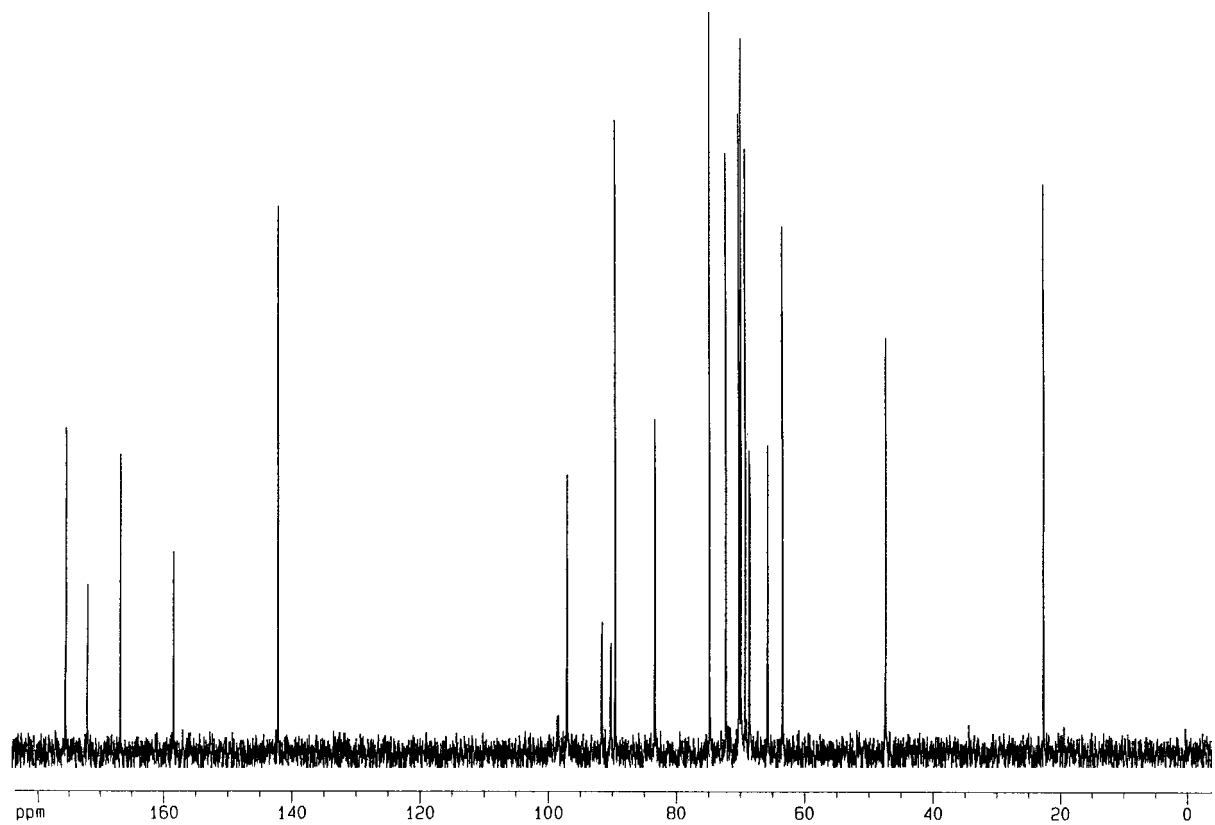
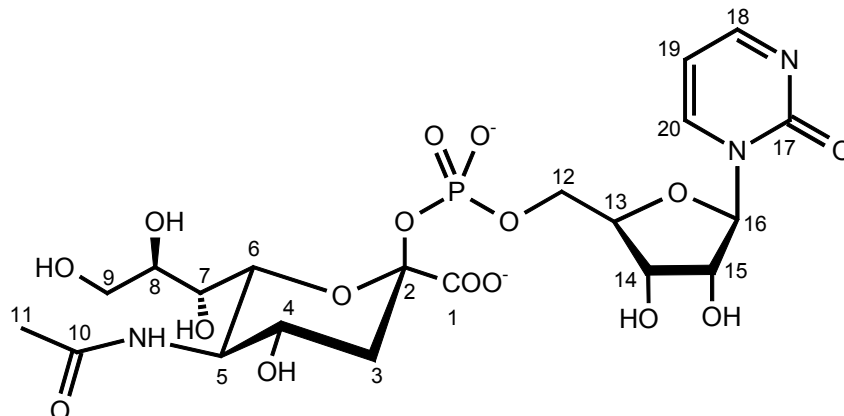


Abbildung 6-14: CMP-Neu5Ac3F in D<sub>2</sub>O, <sup>13</sup>C-NMR, 300 Hz

### 6.6.3.1 Auswertung der NMR-Spektren

Abbildung 6-15 zeigt die für die Auswertung der NMR-Spektren relevante Nummerierung der Positionen in CMP-Neu5Ac.



**Abbildung 6-15:** Nummerierung der Positionen in CMP-Neu5Ac

Aus den gezeigten NMR-Spektren wurden die Verschiebungen und Kopplungen, wie in Tabelle 6-3 bis Tabelle 6-7 aufgeführt, zugeordnet.

	H3 <sub>a</sub>	H3 <sub>e</sub>	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H9'	H11	H12,12',13,14	H15	H16	H19	H20
Neu5Ac3F <sub>e</sub>	4,6		3,98 – 4,09			3,52	3,62	3,56	3,67	1,95					
Neu5Ac3F <sub>a</sub>		4,82	4,05	4,18	3,99	3,46	3,76-3,84	3,57	3,76-3,84	1,95					
CMP-Neu5Ac3F		4,80	4,04	4,21	4,06	3,36	3,88	3,53	3,79	1,95	4,04-4,23	4,09-4,23	5,87	6,02	7,85
Neu5Gc	1,77	2,20	4,03	3,89	4,05	3,42	3,62	3,49	3,71	4,01					
CMP-Neu5Gc	1,57	2,40	4,02-4,11	3,93	4,02-4,11	3,34	3,84	3,52	3,78	4,04	4,04-4,25	4,20	5,87	6,02	7,85

**Tabelle 6-3:** <sup>1</sup>H-Verschiebungen [ppm]



	$J_{H,H}$ Kopplungen													$J_{F,H}$		$J_{P,H}$
	3,3	3 <sub>a</sub> ,4	3 <sub>e</sub> ,4	4,5	5,6	6,7	7,8	8,9	8,9'	9,9'	14,15	15,16	19,20	3,3	3,4	3 <sub>a</sub> ,P
Neu5Ac3F <sub>e</sub>		8,4		a	a	0	8,8	6,1	2,8	11,9				49,8	11,4	
Neu5Ac3F <sub>a</sub>			2,6	10,6	10,6	1,1	8,8	6,0	a	11,2				49,3	29,2	
CMP-Neu5Ac3F			2,3	10,6	10,6	0	9,5	6,6	2,5	11,9	4,4	4,4	7,6	48,3	29,9	
Neu5Gc	13,0	11,6	5,0	10,2	10,2	0	9,1	6,1	2,6	11,9						
CMP-Neu5Gc	13,3	11,5	4,8	10,3	10,3	0,9	9,5	6,6	2,5	11,8	5,3	4,5	7,6			5,8

a aufgrund von Signalüberlagerung können die Kopplungen nicht abgelesen werden  
Die  $J_{F,H}$ -Kopplungen für Neu5Ac3F<sub>e</sub> wurden auf dem <sup>19</sup>F-NMR entnommen

**Tabelle 6-4:**  $J_{H,H^-}$ ,  $J_{F,H^-}$  und  $J_{P,H^-}$ -Kopplungen im <sup>1</sup>H-NMR [Hz]

	F <sub>e</sub>	F <sub>a</sub>
Neu5Ac3F <sub>e</sub>	-200,142	
Neu5Ac3F <sub>a</sub>		-209,035

**Tabelle 6-5:** <sup>19</sup>F-Verschiebungen [ppm]

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11
Neu5Ac3F <sub>e</sub>	173,51	96,60	93,80	72,27	53,31	72,62	70,48	72,72	65,72	177,30	24,67
Neu5Ac3F <sub>a</sub>	177,45	97,74	93,01	70,85	50,06	72,69	71,12	72,89	65,90	177,21	24,76
CMP-Neu5Ac3F	175,13	98,39	90,71	68,34	47,21	69,93; 69,69; 69,04			63,23	171,69	22,45
Neu5Gc	176,03	95,73	39,21	66,81	52,08	70,50	68,48	70,50	61,30	173,79	63,46
CMP-Neu5Gc	175,91	100,44	41,45	66,90	51,83	69,98; 69,68; 69,07			61,35	174,72	63,23
	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19	C20		
CMP-Neu5Ac3F	65,52	83,16	74,60	72,06	89,39	158,16	166,53	96,95	141,91		
CMP-Neu5Gc	65,22	83,26	74,60	71,91	89,42	158,17	166,53	96,97	141,92		

**Tabelle 6-6:** <sup>13</sup>C-Verschiebungen [ppm]

	$J_{F,C}$ Kopplungen					$J_{P,C}$ Kopplungen			
	3,1	3,2	3,3	3,4	3,5	P,2	P,3	P,12	P,13
Neu5Ac3F <sub>e</sub>	0	-21	-189	-18,2	-7,6				
Neu5Ac3F <sub>a</sub>	0	-33	-175,8	-18,2	0				
CMP-Neu5Ac3F	0	-33	-175,9	-18,0	0	14,7	11	5,2	8,8
CMP-Neu5Gc						9,6	7,6	5,5	7,8

**Tabelle 6-7:**  $J_{F,C}$ - und  $J_{P,C}$ -Kopplungen im  $^{13}\text{C}$ -NMR [Hz]

## 6.7 Sonstige Analysen

	Chlorid-Gehalt <sup>1</sup> [%]	Phosphat-Gehalt <sup>1</sup> [%]	Magnesium-Gehalt <sup>2</sup> [%]
Neu5Ac3F	2,4	0,24	0,05
CMP-Neu5Ac3F	4,1	1	0,18

<sup>1</sup> Bestimmung durch Ionenchromatographie

<sup>2</sup> Bestimmung durch Atom-Absorptions-Spektrometrie

**Tabelle 6-8:** Chlorid-, Phosphat- und Magnesium-Gehalt von isoliertem Neu5Ac3F und CMP-Neu5Ac3F

## 6.8 Materialien

### 6.8.1 Geräte

Amicon, Witten	Centriprep YM-10 Ultrafiltrationszellen der Serie 8000 Ultrafiltrationsmembran YM 10
Beckmann, München	MDQ mit Diodenarray-Detektor Zentrifuge Microfuge E
Bio-Rad, München	Aminex HPX-87-H (300•7,8 mm) Micro-Guard Cation H Cartridge
Büchi Laboratoriumstechnik GmbH, Göppingen	Rotationsverdampfer Rotavapor
Celfa, Seewen CH	Filtrationsanlage P28
Christ, Osterode	Gefriertrockner Alpha 2-4
Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg	Tischzentrifuge
ERMA CR., über Sycam	Vakuumbtgaser RC-3312
Gamma Analysen Technik, über Sycam	Säulenofen GAT-CH-150
Haake, Karlsruhe	Kryostat K20, DC3 Wärmebad G-D8 Wasserbad F 3 digital
IKA Labortechnik, Staufen	Magnetrührer Ikamag RET-G
Ingold, Messtechnik	pH-Elektrode
Jasco, Groß-Zimmern	851-AS Probengeber
Labsystems, Frankfurt	Pipetten Finnpipette Colour
Latek, Heidelberg	Teflonschläuche Verbindungsstücke Chromatographiesäulen mit Thermostatisier- mantel
LAUDA, Lauda-Königshofen	Wärmebad C6-CS
Leybold-Heareus, München	Ölschiebervacuumpumpen DIVAC 2.4 L, TRIVAC D 4B Vakuummessgerät Thermovac TM 210
Linear Instruments, Northport Loop West USA	UV-Detektor Linear™ 206 PHD
Metrohm, Herisau CH	Dosimat 665 mit Wechseleinheit 552 pH-Meter 691
Millipore, Eschborn	Micropure Filtereinheiten
Osmonics, USA	Membran MX 07
Pharmacia LKB, Freiburg	Kolbenpumpe P-500 HPLC-Pumpe 2150 Fraktionssammler Frac-100 Chromatographiesäulen
Satorius, Göttingen	Glas-Vakuumfiltrationsgerät, Sterilfilter, Filterhalter, Vorfilter

	Analysewaage Analytic AC 210 P Laborwaage LC 2200 S
Schott Glas, Mainz	diverse Glasgeräte
Scientific Ind., Bohemia USA	Vortex Genie 2
Sycam, Gilching	S 1100 Solvent delivery System Integrator Pyramid Software
Watson-Marlow Ltd., Flamouth GB	Schlauchpumpen 504 U und 503 U/RL

## 6.8.2 Chemikalien

Acetonitril	Merck, Darmstadt
Acetylchlorid	Aldrich, Steinheim
CAPS	Sigma, München
CTAB	Sigma, München
CTP	Sigma, München
Dichlormethan	Aldrich, Steinheim
Dowex 1x2	Sigma, München
DPA	Sigma, München
DTT	Merck, Darmstadt
Essigsäureanhydrid	Aldrich, Steinheim
Ethanol	Merck, Darmstadt
Fluorpyruvat	Sigma, München
GlcNAc	Sigma, München
GlcNGc	Dr. N. Bovin, M.M. Shemyakin–Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow
HCl	Merck, Darmstadt
Iontauscher AG 50W-X8	BioRad, München
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
ManNAc	Sigma, München
ManNGc	Dr. M. Kittelmann, Novartis, Basel
Methanol	Fluka, Buchs CH
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat * 2H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Neu5Ac-Aldolase, <i>C. perfringens</i>	Sigma, München
Neu5Ac-Aldolase, <i>E. coli</i>	Sorachim, Le Mans F. (Toyobo Vertretung)
PEG-1550	Sigma, München
PP <sub>i</sub> -ase	Boehringer Ingelheim
Pyridin	Aldrich, Steinheim
Pyruvat	Sigma, München
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
Toluol	Merck, Darmstadt
Tris-HCl	Sigma, München
Wasser, bidest	Forschungszentrum Jülich
Zitronensäure	Sigma, München

## 7 Literatur

- Aisaka, K., Igarashi, A., Yamaguchi, K., Uwajima, T., Purification, crystallization and characterisation of *N*-Acetylneuraminase Lyase from *Escherichia coli*; *Biochem. J.* **1991**, *276*, 541-546
- Aisaka, K., Tamura, S., Arai, Y., Uwajima, T., Hyperproduction of *N*-acetylneuraminase lyase by the gene-cloned strain of *Escherichia coli*, *Biotechnol. Lett.*, **1987**, *9*, 633-637
- Aisaka, K., Uwajima, T., Cloning and constitutive expression of the *N*-acetyl-D-neuraminase lyase gene of *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **1986**, *51*, 562-565
- Alper, J., Saving Lives With Sugar, *Science*, **2001**, *291*, 2339
- Alper, J., Searching for Medicine's Sweet Spot, *Science*, **2001**, *291*, 2338-2343
- Alper, J., Sugar Separates Humans From Apes, *Science*, **2001**, *291*, 2340
- Araki, H., Yamada, M., Sialic acid, *Methods of Enzymatic Analysis Vol. 6*, (Hrsg. Bergmeyer, H.U.), Verlag Chemie, Weinheim, **1984**, 80-90; Toyobo, Datenblatt zur *N*-Acetylneuraminsäure-Aldolase, **1996**
- Augé, C., David, S., Gautheron, C., Synthesis and immobilised enzyme of the most important sialic acid, *Tetrahedron Lett.*, **1984**, *25*, 4663-4664
- Balter, M., Bent Out of Shape, *Science*, **2001**, *291*, 2343
- Barry, G.T., Detection of sialic acids in various *Escherichia coli* strains and in other species of bacteria, *Nature*, **1959**, 117-118
- Baumann, W., Freidenreich, J., Weisshaar, G., Brossmer, R., Friebolin, H., Spaltung und Synthese von Sialinsäuren mit Aldolase; <sup>1</sup>H-NMR-Untersuchungen zur Stereochemie, Zur Kinetik und zum Mechanismus; *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **1989**, *370*, 141-149
- Bednarski, M.D., Chenault, H.K., Simon, E.S., Whitesides, G.M., Membrane-enclosed enzymatic catalysis (MEEC); a useful, practical new method for the manipulation of enzymes in organic synthesis, *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, *109*, 1283-1285
- Beliczey, J., Kragl, U., From chitin to *N*-acetylneuraminic acid – *N*-acetylglucosamine as Intermediate, *Chitin Handbook*, (Hrsg. Muzzarelli, R.A.A., Peter, M.G.), European Chitin Society, **1997**, 221-226
- Beliczey, J., Kragl, U., Liese, A., Wandrey, C., Coenen, H., Hamacher, K., Tierling, T., Verfahren zur Herstellung von potentiell in der in vivo-Pharmakokinetik verwendbaren organischen Fluorverbindungen sowie 3-Desoxy-3-Fluorocitrylopyranosonsäuren und 3-Desoxy-3-Fluorononulopyranosonsäuren, DE 198 42 133.8-43 (patent application: 15.09.98)
- Beliczey, J., Kragl, U., Liese, A., Wandrey, C., Coenen, H., Hamacher, K., Tierling, T., Enzymatic synthesis of 3-fluoroneuraminic acid (5-acetamido-3,5-dideoxy-3-fluoro-D-glycero-D-galacto-nonulopyranosonic acid) and other 3,5-dideoxy-3-fluorononulopyranosonic acid derivatives, US 6,355,453 B1 **2002** (patent application: US 09/156322, 18.09.1998)

- Berger, E.G. (1994) „Glycobiologie: Ein neuer Zugang zur Entzündungsforschung, Neue Züricher Zeitung, 26.5.1994, Zürich
- Bertozzi, C.R., Kiessling, L.L., Chemical Glycobiology, *Science*, **2001**, 291, 2357-2364.
- Bézay N., persönliche Mitteilung von, **1999**
- Biselli, M., Enzymkatalysierte Racematspaltung von Aminosäuren mit integrierter Rückführung, dargestellt am Beispiel der Umsetzung von D,L-Alanin zu L-Alanin, Dissertation Universität Bonn, **1991**
- Biswas, M., Singh, B., Rai, Y.P., Datta, A., Turnover of inducible *N*-acetylglucosamine catabolic enzymes in *Candida albicans*, *Indian J. Exp. Biol.*, **1982**, 20, 829-834
- Brinkman-Van der Linden, E.C.M., Sjöberg, E.R., Juneja, L.R., Crocker, P.R., Varki, N., Varki, A., Loss Of *N*-Glycolyl-Neuraminic Acid In Human Evolution: Implications For Sialic Acid Recognition By Siglecs. *J.Biol.Chem.*, **2000**, 275, 8633-8640
- Brix, G., Bellermann, M.E., Haberkorn, U., Gerlach, L., Lorenz, W.J., Assentment of the Biodistribution and Metabolism of 5-Fluorouracil as Monitored by <sup>18</sup>F PET and <sup>19</sup>F MRI: A Comparative Animal Study; *Nuclear Medicine & Biology*, **1996**, 23, 897-906
- Burkhard, M.D., Zhang, Z., Hung, S.-C., Wong, C.-H., A New Method for the Synthesis of Fluoro-Carbohydrates and Glycosides Using Selectfluor *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 11743-11746
- Burkhard, M.D., Vincent, S.P., Wong, C.-H., An efficient synthesis of CMP-3-fluoroneuraminic acid, *Chem. Commun.*, **1999**, 1525-1526
- Chammas, R., Sonnenburg, J.L., Watson, N.E., Tai, T., Farquhar, M.G., Varki, N.M., Varki, A., De-*N*-acetyl-gangliosides in Humans - Unusual Subcellular Distribution of a Novel Tumor Antigen, *Cancer Research*, **1999**, 59, 1337-1346
- Chappell, M.D., Halcomb, R.L., Enzyme-Catalysed Synthesis of Oligosaccharides that Contain Functionalized Sialic Acids; *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 3393-3394
- Chappell, M.D., Halcomb, R.L., Synthesis of CMP-Sialic Acid Conjugates: Substrates for the Enzymatic Synthesis of Natural and Designed Sialyl Oligosaccharides, *Tetrahedron*, **1997**, 32, 11109-11120
- Charter, N. W., Mahal, L.K., Koshland Jr, D.E., Bertozzi C.R., Differential Effects of Unnatural Sialic Acids on the Polysialylation of the Neural Cell Adhesion Molecule and Neuronal Behavior, *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277, 9255-9261
- Chou, H.-H., Takematsu, H., Diaz, S., Iber, J., Nickerson, E., Wright, K.L., Muchmore, E.A., Nelson, D.A., Warren, S.T., Varki, A., A mutation in human CMP-sialic acid hydroxylase occurred after the Homo-Pan divergence, *J. Biol. Chem.*, **1998**, 95, 11751-11756
- Christian, R., Schulz, G., Brandstetter, H.H., Zbiral, E., On the side-chain conformation of *N*-acetylneuraminic acid and its epimers at C-7, C-8, and C-7,8, *Carbohydr. Res.* **1987**, 162, 1-11
- Coenen, H.H., Biochemistry and evaluation of fluoroamino acids, *PET studies on amino acid metabolism and protein Synthesis*, (Hrsg. Mazoyer, B.M., Heiss, W.D., Comar, D.) Kluwer Academic Publisher, Netherlands **1993**, 109-129
- Collins, B.E., Fralich, T.J., Itonori, S., Ichikawa, Y., Schnaar, R.L., Conversion of cellular sialic acid expression from *N*-acetyl- to *N*-glycolylneuraminic acid using a synthetic

- percursor, *N*-glycolylmannosamine pentaacetate: inhibition of myelin-associated glycoprotein binding to neutral cells, *Glycobiology*, **2000**, *10*, 11-20
- Collins, B.E., Yang, L.J.-S., Mukhopadhyay, G., Filbin, M.T., Kiso, M., Hasegawa, A., Schnaar, R.L., Sialic Acid Specificity of Myelin-associated Glycoprotein Binding, *J. Biol. Chem.*, **1997**, *272*, 1248-1255
- Comb, D.G., Roseman, S., Composition and enzymatic synthesis of *N*-Acetylneuraminic acid (sialic acid), *J. Am. Chem. Soc.*, **1958**, *80*, 497-499
- Comb, D.G., Roseman, S., The sialic acids. The structure and synthesis of *N*-acetyl-D-neuraminic acid, *J. Biol. Chem.* **1960**, *235*, 2529-2537
- Comb, D.G., Roseman, S., The sialic acids; the structure and enzymatic synthesis of *N*-acetylneuraminic acid, *J. Biol. Chem.*, **1969**, *235*, 2529-2537
- Comb, D.G., Shimizu, F., Roseman, S., Isolation of cytidine-5'-nono-phospho-*N*-acetylneuraminic acid, *J. Am. Chem. Soc.*, **1959**, *81*, 5513
- Comb, D.G., Watson, D.R., Roseman, S., The sialic acids: IX. Isolation of cytidine-5'-monophospho-*N*-acetylneraminic acid from *Escherichia coli* K 235, *J. Biol. Chem.*, **1966**, *241*, 5637-5642
- Cornfield, A.P., Schauer, R., Occurrence of sialic acids, in: *Sialic Acids Chemistry, Metabolism and Function*, (Hrsg. Schauer, R.) Springer, Wien, New York, **1982**, 5-50
- Cornish-Browden, A., Fundamentals of enzyme kinetics, Butterworths, London, **1981**, speziell Kapitel 4 und 6
- Datta, A., *N*-Acetylglucosamin 2-epimerase from hog kidneys, *Methods Enzymol.*, **1975**, *41*, 407-412
- Datta, A., Regulatory role of adenosine triphosphate on hog kidney *N*-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase, *Biochemistry*, **1970**, *9*, 3363-3370
- de Ninno, M.P., The synthesis and glycosidation of *N*-acetyl-D-neuraminic acid. *Synthesis*, **1991**, *8*, 583-593
- Dessinges, A., Olesker, A., Lukacs, G., Carbohydrate synthesis for nuclear medicine: A new, rapid, and stereospecific route to 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose, *Carbohydr. Res.*, **1984**, *C6-C8*
- Devine, P.L., Clark, B.A., Birrell, G.W., Layton, G.T., Ward, B.G., Alewood, P.F., McKenzie, I.F.C., The Breast Tumor-associated Epitope Defined by Monoclonal Antibody 3E1.2 Is an O-linked Mucin Carbohydrate Containing *N*-Glycolylneuraminic acid, *Cancer Res.*, **1991**, *51*, 5826-5836
- Dudziak, G., Reaktionstechnische Untersuchungen zur enzymatischen Glycosylierung von Peptiden, Dissertation Universität Bonn, **1999**
- Dudziak, G., Fey., S., Hassbach, L, Kragl, U., Nanofiltration for purification of nukleotide sugars, *J. Carbohydr. Chem.*, **1999**, *18*, 41-50
- Effertz, K., Hinderlich, S., Reutter, W., Selective Loss of either the Epimerase or Kinase Activity of UDP-*N*-Acetylglucosamine 2-Epimerase/*N*-Acetylmannosamine Kinase due to Site-directed Mutagenesis Based on Sequence Alignments, *J. Biol. Chem.*, **1999**, *274*, 28771-28778
- Enard, W., Khaitovich, P., Klose, J., Zöllner, S., Heissig, F., Giavalisco, P., Nieselt-Struwe, K., Muchmore, E., Varki, A., Ravid, R., Doxiadis, G.M., Bontrop, R.E., Pääbo, S., In

- tra- and Interspecific Variation in Primate Gene Expression Patterns *Science* **2002**, *296*, 340-343
- Engelhard, H., Beck, W., Schmidt, T., Kapillarelektrophorese: Methoden und Möglichkeiten, *Angew. Chem.*, **1993**, *105*, 659-804
- EP 0 428 947 B1 Enzymatisches Verfahren zur Herstellung von *N*-Acetylneuraminsäure, **1995**
- Fernández-Mayoralas, A., Synthesis and modification of carbohydrates using glycosidases and lipases, *Topics Curr. Chem.*, **1997**, *186*, 1-21
- Florio, P., Thomson, R. J., Alafaci, A., Abo, S., and von Itzstein, M., Synthesis of delta4-beta-D-glucopyranosiduronic acids as mimetics of 2,3-unsaturated sialic acids for sialidase inhibition. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **1999**, *9*, 2065-2068
- Fukuda, M., Cell surface carbohydrates: cell-type specific expression, in: *Molecular glycobiology*, (Hrsg. Fukuda, M., Hingault, O.), Oxford University Press, Oxford, **1994**, 1-52
- Gabius, H.J., Kayser, K., Gabius, S., Protein-Zucker-Erkennung, Grundlagen und medizinische Anwendung am Beispiel der Tumorektinologie, *Naturwissenschaften*, **1995**, *82*, 533-543
- Gabius, H.J., Kayser, K., Gabius, S., Protein-Zucker-Erkennung, Grundlagen und medizinische Anwendung am Beispiel der Tumorektinologie, *Naturwissenschaften*, **1995**, *82*, 533-543
- Gantt, R., Millner, S., Binkley, S.B., Inhibition of *N*-Acetylneuraminic Acid Aldolase by 3-Fluorosialic Acid, *Biochemistry*, **1964**, *3*, 1952-1960
- Ghosh, S., Roseman, S., The sialic acids: IV. *N*-Acyl-D-glucosamine 6-phosphate 2-epimerase, *J. Biol. Chem.*, **1965**, *240*, 1525-1530
- Ghosh, S., Roseman, S., The sialic acids: V. *N*-Acyl-D-glucosamine 2-epimerase, *J. Biol. Chem.*, **1965**, *240*, 1531-1536
- Glaser, L., Epimerases, *The Enzymes Vol 6*, (Hrsg. Boyer, P.D.) Academic Press, New York, **1972**, 355-380
- Gross, H.J., Brossmer, R., A highly Sensitive Fluorometric Assay for Sialyltransferase Activity Using CMP-9-fluoresceinyl-NeuAc as Donor, *Anal. Biochem.*, **1990**, *186*, 127-134
- Gross, H.J., Brossmer, R., Enzymatic introduction of a fluorescent sialic acid into oligosaccharide chains of glycoproteins, *Eur. J. Biochem.*, **1988**, *177*, 583-589
- Gururaja, T., Ramasubbu, N., Levine, M.J., Solid-phase synthesis of human salivary mucin-derived *O*-linked glycopeptides, *Leit. Pept. Sci.*, **1996**, *3*, 79-88
- Hagiwara, T., Kijima-Suda, I., Ido, T., Ohru, H., Tomita, K., Inhibition of bacterial and viral sialidases by 3-fluoro-*N*-acetylneuraminic acid, *Carbohydr. Res.*, **1994**, *263*, 167-172
- Haltiwanger, R.S., Kelly, W.G., Roquemore, E.P., Blomberg, M.A., Dong, L.-Y.D., Kreppel, L., Chou, T.-Y., Hart, G.W., Glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins is ubiquitous and dynamic, *Biochem. Soc. Trans.*, **1992**, *20*, 264-269
- Hamacher, K., Coenen, H.H., Stöcklin, G., Efficient Stereospecific Synthesis of No-Carrier-Added 2-[<sup>18</sup>F]-Fluoro-2-Deoxy-D-Glucose Using Aminopolyether Supported Nucleophilic Substitution; *J. Nucl. Med.*, **1986**, *27*, 235-238



- Heimer, R., Meyer, K., Studies on sialic acid of submaxillary mucoid, *Proc. Natl. Sci. USA*, **1956**, *42*, 728-734
- Helenius, A., Aebi, M., Intracellular Functions of *N*-Linked Glycans, *Science*, **2001**, *291*, 2364-2369.
- Herrmann, G.F., Kragl, U., Wandrey, C., Kontinuierliche katalytische Herstellung von *N*-Acetyllactosamin, *Angew. Chem.*, **1993**, *105*, 1399-1400
- Higa, H.H., Paulson, J.C., Sialylation of Glycoprotein Oligosaccharides with *N*-Acetyl-, *N*-Glycolyl, and *N*-*O*-Diacetylneuraminic acids, *J. Biol. Chem.*, **1985**, *260*, 8838-8849
- Higashi, H., Hirabayashi, Y., Fukui, Y., Naiki, M., Matsomoto, M., Ueda, S., Kato, S., Characterization of *N*-Glycolylneuraminic acid-containing gangliosides as tumor-associated Hanganutziu-Deicher antigen in human colon cancer, *Cancer Res.*, **1985**, *45*, 3796-3802
- Hirabayashi, Y., Kasakura, H., Matsumoto, M., Higashi, H., Kato, S., Kasai, N., Naiki, M., Specific expression of unusual GM2 ganglioside with Hanganutziu-Deicher antigen activity on human colon cancers, *Jpn. J. Cancer Res.*, **1987**, *78*, 251-26
- Horecker, B.L., Tsolas, O., Lai, C.Y., Aldolases, *The Enzymes Vol 7*, (Hrsg. Boyer, P.D.) Academic Press, New York, **1972**, 213-261
- Hounsell, E.F., in: *Glycoprotein Analysis in Biomedicine*, (Hrsg. Hounsell, E.F.), Humana Press, Totowa, **1993**, 1-15
- Hultsch, E., Reutter, W., Decker, K., Conversion of *N*-acetylglucosamin to CMP-*N*-acetylneuraminic acid in a cell-free system of rat liver, *Biochim. Biophys. Acta*, **1972**, *237*, 132-140
- Hupe, D.J., Enzyme reactions involving imine formation, *Enzyme mechanisms*, (Hrsg. Page, M.I.) University Press, Belfast, **1987**, 317-344
- Irie, A., Koyama, S., Kozutsumi, Y., Kawasaki, T., Suzuki, A., The Molecular Basis for the Absence of *N*-Glycolylneuraminic Acid in Humans, *J Biol Chem*, **1998**, *273*, 15866-15871
- Itzstein, M. von, Synthesis of Phosphonic Acid Analogues of Sialic Acids (Neu5Ac and KDN) as Potential Sialidase Inhibitors; *J. Org. Chem.*, **1997**, *62*, 3500-3504
- Itzstein, M. von, Wu, W.Y., Kok, G.B., Pegg, M.S., Dyason, J.C., Jin, B., Phen, T.V., Smythe, M.L., White, H.F., Oliver, S.W., Colman, P.M., Varghese, J.N., Ryan, D.M., Woods, J.M., Bethell, R.C., Hotham, V.J., Cameron, J.M., Pen, C.R., Rational design of potent sialidase based inhibitors of influenza virus replication, *Nature*, **1993**, *363*, 418-423
- Jeanloz, R.W., Coddington, J.F., Their biological role of sialic acid at the cell surface, in: *Biological Roles of Sialic Acid*, Hrsg. Rosenber, A., Schengrund, C.L.), Plenum Press, New York, **1976**, 201-238
- Juneja, L.R., Koketsu, M., Nishimoto, K., Kim, M., Yamamoto, T., Itoh, T., Large-scale preparation of sialic acid from chalaza and egg-yolk membrane, *Carbohydr. Res.*, **1991**, *214*, 179-186
- Karaçali, S., Kirmizigül, S., Dveci, R., Sialic acids in developing testis of *Galleria mellonella* (Lepidoptera), *Invertbr. Reprod. Dev.*, **1999**, *35*, 225-229; Roth, J., Kempf, A., Reuter, G., Schauer, R., Gehring, W.J., Occurrence of sialic acids in *Drosophila melanogaster*, *Science*, **1992**, *256*, 673-675

- Karaçali, S., Kirmizigül, S., Dveci, R., sialic acids in developing testis of *Galleria mellonella* (Lepidoptera), *Invertbr. Reprod. Dev.*, **1999**, *35*, 225-229;
- Karlson, N.G., Olson, F.J., Jovall, P.-A., Andersch, Y., Enderbäck, L., Hansson, G.C., Identification or transient alterations of sialylated mucin oligosaccharides during infection by the rat intestinal parasite *Nippostrongylus brasiliensis*, *Biochem. J.*, **2000**, *350*, 805-814
- Karlson, P., *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler*, Thieme Verlag, New York, **1988**
- Kawai, T., Kato, A., Higashi, H., Kato, S., Naiki, M., Quantitative determination of *N*-Glycolylneuraminic acid expression in human cancerous tissues and avian lymphoma cell lines as a tumor associated sialic acid by gas-chromatography-mass spectrometry, *Cancer Res.*, **1991**, *51*, 1242-1246
- Kayser, H., Ats, C., Lehmann, J., Reutter, W., New amino sugar analogs are incorporated at different rates into glycoproteins of mouse organs, *Experientia*, **1993**, *49*, 885-887
- Kelm, S., Brossmer, R., Isecke, R., Gross, H.J., Strenge, K., Schauer, R., Funktional groups of sialic acids involved in binding of siglecs (sialoadhesins) deduced from interactions with synthetic analogues, *Eur. J. Biochem.*, **1998**, *255*, 663-672
- Kelm, S., Schauer, R., Crocker, P.R., The Sialoadhesins – A family of sialic acid dependent cellular recognition molecules within the immunoglobulin superfamily, *Glycoconjugate Journal*, **1996**, *13*, 913-926
- Keppler, O.T., Horstkorte, R., Pawlita, M., Schmidt, C., Reutter, W., Biochemical engineering of the *N*-acyl side chain of sialic acid: biological implications, *Glycobiology*, **2001**, *11*, 11R-18R
- Kim, M.J., Hennen, W.A.J., Sweers, H.M., Wong, C.-H., Enzymes in carbohydrate synthesis: *N*-acetyl-D-neuraminic acid aldolase-catalysed reactions and preparations of *N*-acetyl-2-deoxy-D-neuraminic acid derivatives, *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, 6481-6484
- Klenk, E., Über die Ganglioside, eine neue Gruppe von zuckerhaltigen Gehirnlipoiden, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1942**, *273*, 76-86
- Klich, G., Paulsen, H., Meyer, B., Meldal, M., Bock, K., Synthesis and characterization of highly glycosylated glycopeptides with Tn-antigenic structures corresponding to human glycophorin AN, *Carbohydr. Res.*, **1997**, *299*, 33-48
- Kolter, T., Sandhoff, K., Sialic acids – why always  $\alpha$ -linked?, *Glycobiology*, **1997**, *7*, vii-x
- Kolter, T., Sandhoff, K., Sphingolipide – ihre Stoffwechselwege und die Pathobiochemie neurodegenerativer Erkrankungen, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1632-1670
- Korytnyk, W., A Convenient Synthesis of 1,2-Difluoro-1,2-Dideoxyhexoses Using Xenon Fluoride, *Tetrahedron Lett.*, **1982**, *38*, 2547-2550
- Korytnyk, W., Reactions Of Glycals With Xenon Fluoride: An Improved Synthesis Of 2-Deoxy-2-Fluorosaccharides *Tetrahedron Lett.*, **1980**, *21*, 1493-1496
- Kragl, U., Gödde, A., Wandrey, C., Lubin, M., Augé, C., New Synthetic Applications of Sialic Acid Aldolase, a Useful Catalyst for KDO Synthesis. Relation between Substrate Conformation and Enzyme Stereoselectivity, *Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1994**, 119-124

- Kragl, U., Gyax, D., Ghisalba, O., Wandrey, C., Enzymatic Two-Step Synthesis of *N*-Acetylneuraminic Acid in the Enzyme Membrane Reactor, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1991**, *30*, 827-828
- Kragl, U., Kittelmann, M., Ghisalba, O., Wandrey, C., *N*-Acetylneuraminic acid, From a Rare Chemical from Natural Sources to a Multikilogram Enzymatic Synthesis for Industrial Application, *Annals New York Academy of Sciences*, **1995**, *750*, 300-305
- Kragl, U., Reaktionstechnik biokatalytischer Prozesse am Beispiel der kontinuierlichen Synthese von *N*-Acetylneuraminsäure, Dissertation Universität Bonn, **1992**
- Kren, V., Thiem, J., Glycosylation employing biosystems: from enzymes to whole cells, *Chem. Soc. Rev.*, **1997**, *26*, 463-473
- Kuboki, A., Okazaki, H., Sugai, T., Ohta, H., An Expedious Route to *N*-Glycolylneuraminic acid Based on Enzyme-catalysed Reaction, *Tetrahedron*, **1997**, *53*, 2387-2400
- Kuhn, R., Baschang, G., Die Konfiguration der Sialinsäuren am C-Atom 4, *Chem. Ber.*, **1962**, *95*, 2384-2385
- Kundig, F.D., Aminoff, D., Roseman, S., The Sialic Acids: Synthesis of colomonic acid by a sialyltransferase from *Escherichia coli* K-235, *J. Biol. Chem.*, **1971**, *246*, 2543-2550
- Lee, J.H., Baker, T.J., Mahal, L.K., Zabener, J., Bertozzi, C.R., Wiemer, D.F., Welsh, J., Engineering Novel Cell Surface Receptors for Virus-mediated Gene Transfer, *J. Biol. Chem.*, **1999**, *274*, 21878-21884
- Leloir, L.F., Two decades of research on the biosynthesis of saccharides, *Science*, **1971**, *172*, 1299-1303
- Lemieux, R.U., Brice, C., The Mechanisms of Glucose Pentaacetate Anomerization and Levoglucosan Formation, *Can. J. Chem.*, **1952**, *30*, 295-310
- Lemieux, R.U., Hayami, J.-I., The Mechanism of the Anomerization of the Tetra-O-acetyl-D-Glucopyranosil Chlorides, *Can. J. Chem.*, **1965**, *43*, 2162-2173
- Lew, W., Escarpe, P. A., Mendel, D. B., Sweeny, D. J., and Kim, C. U., Stereospecific synthesis of a GS 4104 metabolite: Determination of absolute stereochemistry and influenza neuraminidase inhibitory activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.*, **1999**, *9*, 2811-2814
- Liebe, B., Kunz, H., Solid phase synthesis of a sialyl-Tn-glycoundecapeptide of the MUC1 repeating unit, *Helv. Chim. Acta*, **1997**, *80*, 1473
- Lilley, G.G., von Itzstein, M., Ivancic, N., High level production and purification of *Escherichia coli* *N*-acetyl-D-neuraminic acid aldolase (EC 4.1.3.3), *Pro. ExpressionPurif.*, **1992**, *3*, 434-440
- Lin, C.-C., Lin, C.-H., Wong, C.-H., Sialic Acid Aldolase-Catalyzed Condensation of Pyruvate and *N*-Substituted Mannosamine: A Useful Method for the Synthesis of *N*-Substituted Sialic Acids, *Tetrahedron Lett.*, **1997**, *38*, 2649-2652
- Lis, H., Sharon, N., Proteinglycosylation, *Eur. J. Biochem*, **1993**, *218*, 1-27
- Liu, J. L.-C., Shen, G.-J., Ichikawa, Y., Rutan, J. F., Zapata, G., Vann, W. F., Wong, C.H., Overproduction of CMP-Sialic Acid Synthetase of Organic Synthesis; *J. Am. Chem. Soc.*; **1992**, *114*, 3901-3910

- Liu, T., Guo, Z., Yang, Q., Sad, S., Jennings, H.J., Biochemical Engineering of Surface  $\alpha$ 2-8 Polysialic Acid for Immunotargeting Tumor Cells, *J. Biol. Chem.*, **2000**, 275, 32832-32836
- Lougheed, B., Ly, H.D., Wakarchuk, W.W., Withers, S.G., Glycosyl Fluorides Can Function as Substrates for Nucleotide Phosphorsugar-dependent Glycosyltransferases, *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274, 37717-37722
- Lubineau A., Augé, C., Gautheron-LeNarvor, C., Ginet, J.C., Combined chemical and enzymatic synthesis of the sialylated non reducing terminal sequence of GM1b glycolylated ganglioside, a potential human tumor marker. *BioMed. Chem.*, **1994**, 2, 669-674
- Lubineau, A., Basset-Carpentier, K., Augé, C., Porcine liver (2 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -sialyltransferase : substrate specificity studies and application of the immobilized enzyme to the synthesis of various sialylated oligosaccharide sequences, *Carbohydr. Res.*, **1997**, 300, 161-167
- Lubineau, A., Sommé, V., Augé, C., Sialyltransferase-catalyzed transfer of KDN onto oligosaccharides, *J. Mol. Cat. B*, **1998**, 5, 235-240
- Martensen, I., Schauer, R., Shaw, L., Cloning and expression of a membrane-bound CMP-*N*-acetylneuraminic acid hydrolase from the starfish *Asterias rubens*, *Eur. J. Biochem.*, **2001**, 268, 5157-5166
- Martin, T.J., Schmidt, R.R., Convenient Chemical Synthesis of CMP-*N*-Acetylneuramate (CMP-Neu-5-Ac), *Tetrahedron Lett.*, **1993**, 34, 1765-1768
- McCarter, J.D., Adam, M.J., Braun, C., Namchuk, M., Tull, D., Withers, S.G., Syntheses of 2-deoxy-2-fluoro mono- and oligo-saccharide glycosides from glycals and evaluation as glycosidase inhibitors, *Carbohydr. Res.*, **1993**, 249, 77-90
- McCarter, J., Adam, M., Withers, J., *Label. Compd. Rad.*, **1992**, 31, 1005-1009
- McCarter, J.D.; Withers, S.G., 5-Fluoro Glycosides: A New Class of Mechanism-Based Inhibitors of Both  $\alpha$ - and  $\beta$ -Glucosidases, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 241-242
- Miyake, M., The abnormal occurrence and the differentiation-dependent distribution of *N*-acetyl and *N*-glycolyl species of the ganglioside GM2 in human germ cell tumors, *Cancer*, **1990**, 65, 499-505
- Muchmoore, E.A., Diaz, S., Varki, A., A Structural Difference Between the Cell Surfaces of Humans and the Great Apes, *Am. J. Phys. Anthropol.*, **1998**, 107, 187-198
- Mukuria CJ, Mwangi WD, Noguchi A, Waiyaki GP, Asano T, Naiki M, Evidence for a free *N*-acetylneuraminic acid-hydroxylating enzyme in pig mandibular gland soluble fraction, *Biochem. J.*, **1995**, 305, 459-464
- Murray, B.W., Takayama, S., Schultz, J., Wong, C.-H., Mechanism and Specificity of Human  $\alpha$ -1,3-Fucosyltransferase V, *Biochemistry*, **1996**, 35, 11183-11195
- Murray, B.W., Wittmann, V., Burkart, M.D., Hung, S.-C., Wong, C.-H., Mechanism of Human  $\alpha$ -1,3-Fucosyltransferase V: Glycosidic Cleavage Occurs Prior to Nucleophilic Attack *Biochemistry*, **1997**, 36, 823-831
- Nadano, D., Iwasaki, M., Endo, S., Kitajima, K., Inoue, S., Inoue, Y., A Naturally Occurring Deaminated Neuraminic Acid, 3-Deoxy-D-*glycero*-D-*galacto*-nonulosonic Acid (KDN), *J. Biol. Chem.*, **1986**, 261, 11550-11557

- Nakajima, T., Hori, H., Ohrai, H., Meguro, M., Ido, T., Synthesis of *N*-Acetyl-3-fluoro-neuraminic Acids, *Agric. Biol. Chem.*, **1988**, 52, 1209-1215
- Normile, D., COMPARATIVE GENOMICS: Gene Expression Differs in Human and Chimp Brains, *Science* **2001**, 292, 44-45
- Ohta, Y., Shimosaka, M., Murata, K., Tsukada, Y., Kimura, A., Molecular cloning of the *N*-acetyl-D-neuraminic lyase gene in *Escherichia coli* K-12, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1986**, 24, 386-391
- Pääbo, S., Human Evolution, *Millenium Issue TCB TIBS TIG*, **1999**, M13-M16
- Pal, S., Chatterjee, M., Bhattacharya, D.K., Bandhyopadhyay, S., Mandal, C., Identification and purification of cytolytic antibodies directed against *O*-acetylated sialic acid in childhood acute lymphoblastic leukemia, *Glycobiology*, **2000**, 10, 539-549
- Parsons, N.J., Andrade, J.R., Patel, P.V., Cole, J.A., Smith, H., Sialylation of liposaccharid and loss of absorption of bactericidal antibody during conversion of gonococci to serum resistance by cytidine 5'-monophospho-*N*-acetyl neuraminic acid. *Microb Pathog*, **1989**, 7,63-72
- Paulson, J.C., Fortschritte bei der selektiven chemischen Synthese komplexer Oligosaccharide, *Angew. Chem.* **1982**, 94,184-201
- Petrie, C.R., Korytnyk, W., A High-Performance Method for the Assay of Cytidine Monophosphate-Sialic Acid Synthetase, *Anal. Biochem*, **1983**, 131, 153-159
- Petrie, C.R., Sharma, M., Simmons, O.D., Korytnyk, W., Synthesis of Analogues of *N*-acetylneuraminic acid and their effect on CMP-sialate Synthase, *Carbohydr. Res.*, **1989**, 186, 326-334
- Pommerencke, J., Untersuchungen zur *O*-Acetylierung der Sialinsäuren im Liposaccharid von *Escherichia coli* 21701, Dissertation, Kiel **2000**
- Port, R.E., Schlemmer, H.-P., Bachert, P., Pharmacokinetic Analysis of Sparse *in vivo* NMR Spectroscopy Data Using Relative Parameters and the Population Approach; *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **1994**, 47, 187-193
- Portela Klein, M.T.S, Enzymkatalysierte Herstellung von Cytidinmonophosphat *N*-Acetylneuraminsäure aus *Escherichia coli* (K 235/CS1), Dissertation Universität Bonn, **1994**
- Porter, D.J.T., Merrill, B.M., Short, S.A., Identification of the Active Site Nucleophile in Nucleoside 2-Desoxyribosyltransferase as Glutamic Acid 98, *J. Biol. Chem.*, **1995**, 270, 15551-15556
- Roseman, S., Enzymatic synthesis of cytidine-5'-monophospho-sialic acids, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1962**, 48, 437-441
- Roth, J., Kempf, A., Reuter, G., Schauer, R., Gehring, W.J., Occurrence of sialic acids in *Drosophila melanogaster*, *Science*, **1992**, 256, 673-675
- Rudd, P.M., Elliott, T., Cresswell, P., Wilson, I.A., Dwek, R.A., Glycosylation and the Immune System, *Science*, **2001**, 291, 2370-2376.
- Salo, W., Hamari, M., Hallcher, L., Preparation of [2-<sup>2</sup>H]-2-acetamido-2-deoxy-D-glucose by epimerization of 2-acetamido-2-deoxy-D-mannose in basic deuterium oxide; and proposal of a unifying type of mechanism for the 2-epimerization of 2-acetamido-2-deoxyhexoses, *Carbohydr. Res.*, **1976**, 50, 287-291

- Saxon, E., Bertozzi, C.R., Chemical and Biological Strategies for Engineering Cell Surface Glycosylation, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **2001**, *17*, 1-23.
- Schauer, R., Chemistry, metabolism and biological function of sialic acids, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **1982**, *40*, 131-234;
- Schauer, R., Kammerling, J.P., Chemistry, biochemistry and biology of sialic acids, in: *Glycoproteins II*, (Hrsg. Montreuil, J., Vliegthart, J.F.G., Schachter, H.), Elsevier, Amsterdam, **1997**, 243-402
- Schauer, R., Kammerling, J.P., Chemistry, biochemistry and biology of sialic acids, in: *Glycoproteins II*, (Hrsg. Montreuil, J., Vliegthart, J.F.G., Schachter, H.), Elsevier, Amsterdam, **1997**, 243-402
- Schauer, R., Kelm, S., Reuter, G., Roggentin, P., Shaw, L., Biochemistry and role of sialic acids, in: *Biology of the Sialic Acids*, (Hrsg. Rosenber, A.), Plenum Press, New York, **1995**, 7-67
- Schauer, R., Sialic acids – chemistry, metabolism and function, Springer Verlag, New York, **1982**
- Schauer, R., Sialic acids and their role as biological marks, *Trends Biochem. Sci.*, **1985**, *10*, 357-360
- Schauer, R., Stoll, S., Reuter, G., Differences in the amount of *N*-acetyl- and *N*-glycoloyl-neuraminic acid, as well as *O*-acylated sialic acids, of fetal and adult bovine tissues, *Carbohydr. Res.*, **1991**, *213*, 353-359
- Scheuer, R., Haverkamp, J., Ehrlich, K., Isolation and characterization of acetylneuraminic acid cytidyltransferase from frog-liver, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **1980**, *361*, 641-648
- Schilling, B., Goon, S., Samuels, N.M., Gaucher S.P., Leary, J.A., Bertozzi, C.R., Gibson, B.W., Biosynthesis of Sialylated Lipooligosaccharides in *Haemophilus ducreyi* Is Dependent on Exogenous Sialic Acid and Not Mannosamine. Incorporation Studies Using *N*-Acylmannosamine Analogs, and *N*-Glycolyl and <sup>13</sup>C-labeled *N*-Acetyl Neuraminic Acid.. *Biochemistry*, **2001**, *40*, 12666-12677.
- Schleyer, A., Meldal, M., Renil, M., Paulsen, H., Bock, K., Direkte Festphasen-Glycosylierung von Peptiden an einem neuartigen Polyethylenglycol-Harz, *Angew. Chem.*, **1997**, *109*, 2064-2067
- Schmidt, C., Stehling, P., Schnitzler, J., Reutter, W., Horstkorte, R., Biochemical Engineering of Neural Cell Surfaces by the Synthetic *N*-Propanoyl-substituted Neuraminic Acid Precursor, *J. Biol. Chem.*, **1998**, *273*, 19146-19152(Uptake of unnatural Sialic acids in Cell surface Glycoconj.)
- Schmidt, R.R., Neue Methoden zur Glycosid- und Oligosaccharidsynthese – gibt es Alternativen zu Koenigs-Knorr-Methode?, *Angew. Chem.* **1986**, *98*, 213-236
- Sears, P., Wong, C.-H., Toward Automated Synthesis of Oligosaccharides and Glycoproteins, *Science*, **2001**, *291*, 2344-2350
- Segel, I.H., Enzyme kinetics – behaviour and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems, John Wiley & Sons, New York, **1975**, speziell Kapitel 2 und 9
- Service, R.F., After the Fall, *Science*, **2001**, *291*, 2340-2341
- Service, R.F., The Best of Both Worlds? *Science*, **2001**, *291*, 2342

- Shames, S.L., Simon, E.S., Christopher, C.W., Schmid, W., Whitesides, G.M., Yang, L.L., CMP-*N*-acetylneuraminic acid synthetase of *Escherichia coli*: high level expression, purification and use in the enzymatic synthesis of CMP-*N*-acetylneuraminic acid and CMP-neuraminic acid derivatives, *Glycobiology*, **1991**, *1*, 187 - 191.
- Sharma, M.N., Eby, R., Synthesis and conformational studies of 2- $\beta$ -chloro, 2- $\alpha$ -fluoro, and 2- $\beta$ -fluoro derivatives of 2-deoxy-*N*-acetylneuraminic acid, *Carbohydr. Res.*, **1984**, *201-210*
- Sharon, N., Lis, H., Kohlenhydrate und Zellerkennung, *Spektrum der Wissenschaft*, März **1993**, 66-74
- Shaw, L., Schauer, R., The Biosynthesis of *N*-Glycolylneuraminic Acid Occurs by Hydroxylation of the CMP-Glycoside of *N*-Acetylneuraminic Acid, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **1988**, *369*, 477-486
- Shelton, M.C., Cotterhill, I.C., Novak, S.T.A., Poonawala, R.M., Sudarshan, S. Toone, E.J., 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconate Aldolases as Catalysts for Stereocontrolled Carbon-Carbon Bond Formation; *J. Am. Chem. Soc.*; **1996**, *118*, 2117-2125
- Shoyab, M., Bachhawat, B.K., Purification and properties of the CMP-*N*-acetylneuraminic acid synthesizing enzyme from sheep brain, *J. Neurochem.*, **1964**, *11*, 639-646
- Shukla, A.K., Schöder, C., Nöhle, U., Schauer, R., Natural occurrence and preparation of *O*-Acetylated 2,3-unsaturated sialic acids, *Carbohydr. Res.*, **1987**, *168*, 199-209
- Spivak, C.T., Roseman, S., Preparation of *N*-acetyl-D-mannosamine (2-acetamido-deoxy-D-mannose) and D-mannosamine hydrochloride (2-amino-2-deoxy-D-mannose). *J. Am. Chem. Soc.*, **1959**, *81*, 2403-2404
- St. Hillaire, P.M., Lowary, T.L., Meldal, M., Bock, K., Oligosaccharide mimetics obtained by novel, rapid screening of carboxylic acid encoded glycopeptide libraries, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 13312-13320
- Stöcklin, G., Tracers for metabolic imaging of brain and heart. Radiochemistry and Radiopharmacology. *Eur. J. Nucl. Med.*, **1992**, *19*, 527-551
- Taverning, C., Schauer, R., Structure, function and metabolism of sialic acids, *Cell Mol. Life Sci.*, **1998**, *54*, 1330-1349
- Tierling, T., Zur Synthese von 3-[<sup>18</sup>F]Fluorsialinsäure durch enzymatische Addition von [<sup>18</sup>F]Fluorpyruvat an Mannosamin, Diplomarbeit Universität Köln, 1997
- Thiem, J., Applications of enzymes in synthetic carbohydrate chemistry, *FEMS Microbiol. Rev.*, **1995**, *16*, 193-211
- Troy, F.A., Polysialylation: from bacteria to brains, *Glycobiology*, **1992**, *2*, 5-23
- Uchida, Y., Tsukada, Y., Sugimori, T., Purification and Properties of *N*-Acetylneuraminic Lyase from *Escherichia coli*; *J. Biochem.*, **1984**, *96*, 507-514
- Van den Eijnden, D.H., Meems, L., Roukema, P.A. The regional distribution of the cytidine-5'-monophospho-*N*-acetylneuraminic acid synthetase in calf brain, *J. Neurochem.*, **1972**, *19*, 1649-1658
- Van der Stehen, P., Rudd, P.M., Dwek, R.A., Opdenakker, G., Concepts and principles of *O*-linked glycosylation, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **1998**, *33*, 151-208
- Varki, A., Diversity in the sialic acids, *Glycobiology*, **1992**, *2*, 25-40

- Varki, A., Selectin Ligands, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1994**, *91*, 7390-7397
- Warren, L., Blacklow, R.S., Biosynthesis of *N*-acetylneuraminic acid and cytidine-5'-monophospho-*N*-acetylneuraminic acid in *Neisseria meningitidis*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1962**, *7*, 433-438
- Wasylnka, J.A., Simmer, M.I., Moore, M.M., Pathogenicity and Medical Microbiology: Differences in sialic acid density in pathogenic and non-pathogenic *Aspergillus* species, *Microbiology*, **2001**, *147*, 869-877
- Wester, H.-J., Zur praktisch trägerfreien <sup>18</sup>F-Fluorierung von Proteinen, Peptiden und Tyrosin, Dissertation Universität Köln, **1996**
- Williams, S.J., Withers, S.G., Review, Glycosyl fluorides in enzymatic reactions, *Carbohydr. Res.*, **2000**, *327*, 27-46
- Wirth, H.-P., Yang, M., Karita, M., Blaser, M.J., Expression of human cell surface glycoconjugates Lewis x and Lewis y by *Helicobacter pylori* isolates is related to *cagA* status, *Infect. Immun.*, **1996**, *64*, 4598-4605
- Wong, C.-H., Enzymes in Carbohydrate Chemistry, Chapter 2; (Hrsg. Benarski, M.D, Simon, E.S.), **1991**, 23-37
- Wong, C.-H., Halcomb, R.L., Ichikawa, Y., Kajimoto, T., Enzyme in der organischen Synthese: Das Problem der Molekularen Erkennung von Kohlenhydraten (Teil I), *Angew. Chem.*, **1995**, *107*, 453-474
- Yasuo Suzuki, Y., Ito, T., Suzuki, T., Holland Jr., R.E., Chambers, T.M., Kiso, M., Ishida, H., Kawaoka, Y., Sialic Acid Species as a Determinant of the Host Range of Influenza A Viruses, *Journal of Virology*, **2000**, *74*, 11825-11831
- Zbiral E., Schreiner E., Christian R. Synthesis of the 4-Acetamido-4-deoxy Analogue of *N*-Acetylneuraminic Acid and its Behaviour Towards CMP-Sialate Synthase; *Carbohydr. Res.*, **1989**, *194*, c15-c18
- Zbiral, E., Brandstetter, H.H., Schreiner, E.P., Strukturelle Abwandlungen an *N*-Acetylneuraminsäuren, 8 [1] Synthese von 7-, 8-, 9-Desoxy- und 4,7-Didesoxyneuraminsäure, *Monatehefte für Chemie*, **1988**, *119*, 127-141
- Zimmer G., Klenk, H.-D., Herrler, G., Identification of a 40-kDa Cell Surface Sialoglycoprotein with the Characteristics of a Major Influenza C Virus Receptor in a Madin-Darby Canine Kidney Cell Line, *J. Biol. Chem.*, **1995**, *270*, 17815-17822