

Synthesen, Konformationen und Röntgenstrukturanalysen von Saccharidketten der Core-Regionen von Glycoproteinen

Von Hans Paulsen *

Bei Glycoproteinen kann der kovalent gebundene Kohlenhydratteil intramolekular das Proteinmolekül stabilisieren, oder er kann eine intermolekulare Funktion bei der biologischen Erkennung ausüben. Die Entdeckung dieser biologischen Phänomene hat zur Renaissance der Chemie und Biochemie der Kohlenhydrate geführt. Sowohl *N*-Glycoproteine als auch *O*-Glycoproteine haben in der Bindungsregion zum Protein spezielle invariante Oligosaccharidketten, die als Core-Regionen bezeichnet werden. Diese Übersicht beschreibt die vielfältigen Synthesewege für Oligosaccharide, über die man zu den Core-Basisstrukturen gelangt. Die Methoden der Oligosaccharidsynthese sind so verbessert, daß auch Strukturen des komplexen Lactosaminotyps und des „bisected“-Typs bis zum Nona- bzw. Undecasaccharid synthetisiert werden können. Oligosaccharidketten sind wesentlich weniger flexibel als Peptidketten. NMR-spektroskopisch lassen sich die bevorzugten Konformationen in Lösung sehr gut ermitteln. Bei einem verzweigten Octasaccharid ist ein Vergleich der Konformationen in Lösung und im Kristall möglich. Oligosaccharide können an die Amidgruppe von Asparagin oder an die Hydroxygruppe von Serin oder Threonin geknüpft werden. Bei entsprechenden Blockierungsfunktionen lassen sich die erhaltenen Glycosylaminosäuren *C*- oder *N*-terminal mit Aminosäuren verlängern. Man gelangt so zu beliebigen Glycopeptidsequenzen. Im Bereich der Verknüpfungsregion sind bei Glycopeptiden bestimmte Konformationen bevorzugt. Eine zukunftssträchtige Aufgabe im Hinblick auf die Funktion der Glycoproteine dürfte die Synthese und biochemische Untersuchung von modifizierten Glycoproteinsegmenten sein.

1. Einleitung

Das Interesse an Glycoproteinen hat nicht ohne Grund im letzten Jahrzehnt enorm zugenommen. Glycoproteine können stark wechselnde Mengen von Sacchariden enthalten (bis > 85 %) [1, 2]. Dank der verbesserten Analysemethoden hat man auch in Verbindungen, die früher als reine Proteine angesprochen wurden, Kohlenhydratreste gefunden. Kohlenhydratreste können die Stabilität, Konformation, Proteolyseanfälligkeit sowie thermische Eigenschaften und die Löslichkeit eines Proteins beeinflussen. Glycoproteine kommen in löslicher Form im Blut und in zahlreichen Sekreten sowie

in fixierter Form eingelagert in Membrandoppelschichten vor [3, 4]. In diesem Fall ist der Kohlenhydratteil extrazellulär angeordnet. Beide Male kann der Kohlenhydratrest wichtige Funktionen ausüben. Hervorzuheben ist eine spezifische Rezeptorwechselwirkung mit funktionellen Proteinen. Glycoproteine sind an der Fixierung und am Transport von Enzymen, Hormonen und Antikörpern sowie an Zell-Zell-Wechselwirkungen beteiligt [7, 8]. Der Kohlenhydratteil kann Hormone, Enzyme, Antikörper und Lectine, aber auch Toxine, Viren und Bakterien binden. Es sei in diesem Zusammenhang auf die entsprechenden Übersichtsartikel verwiesen [1–8].

Es gibt zwei wichtige Arten der chemischen Verknüpfung von Saccharidkette und Proteinkette [1], die sich auch in der Biosynthese unterscheiden. Bei den *N*-Glycoproteinen liegt

[*] Prof. Dr. H. Paulsen
Institut für Organische Chemie der Universität
Martin-Luther-King-Platz 6, D-2000 Hamburg 13

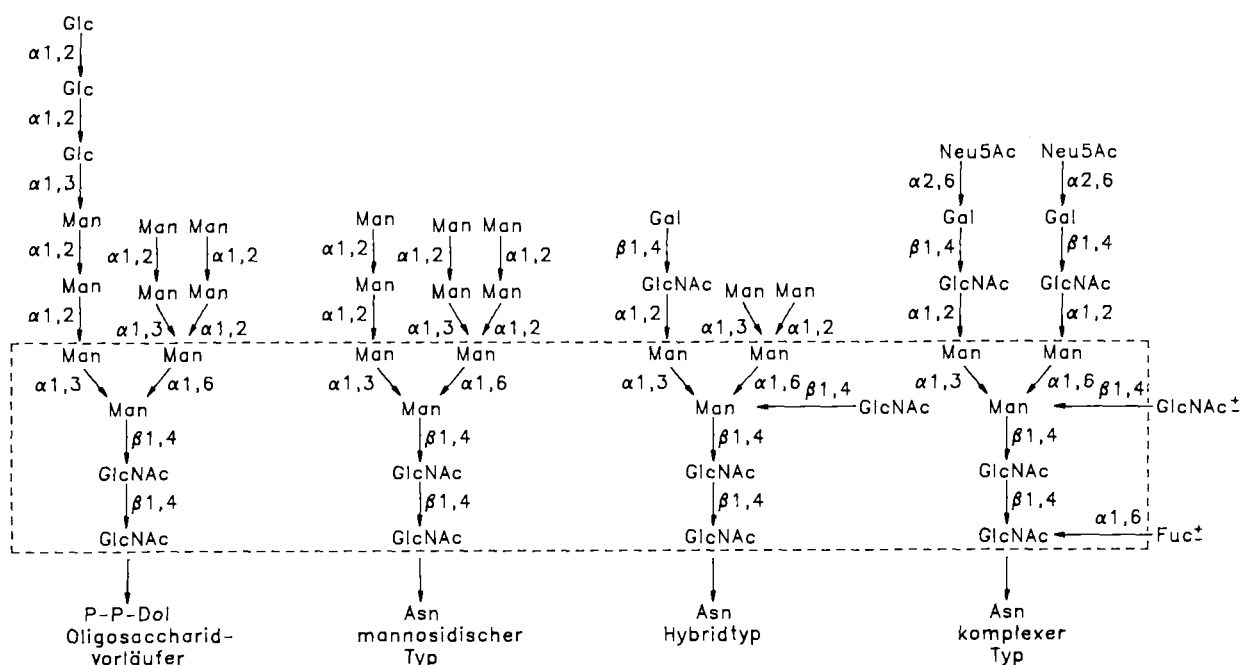


Abb. 1. Basisstrukturen der N-Glycoproteine. Glc = Glucose, Man = Mannose, P-P-Dol = Dolicholpyrophosphat, Asn = Asparagin, Neu5Ac = N-Acetylneuraminsäure, Fuc = Fucose.

eine β -N-glycosidische Verknüpfung von 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucose (GlcNAc) mit der Amidgruppe von Asparagin vor. Durch die Amidanordnung ist die N-Basizität so herabgesetzt, daß die sonst labile Glycosylamino-Gruppe gut stabilisiert wird. Bei den O-Glycoproteinen liegt eine α -O-glycosidische Verknüpfung von 2-Acetamido-2-desoxy-D-galactose (GalNAc) oder eine β -O-glycosidische Verknüpfung von D-Xylose (Xyl) mit der Hydroxygruppe von Serin oder Threonin vor. Bemerkenswert ist, daß der Saccharidteil in der Verknüpfungsregion trotz der großen Vielfalt der Glycoproteine eine gleichartige, ja zum Teil uniforme Sequenz enthält. Diese direkt an das Protein gebundene Sequenz bezeichnet man als Core-Struktur^[1, 2]. Das Auftreten einer jeweils für N- oder O-Glycoproteine charakteristischen Core-Struktur ist durch die jeweilige Biosynthese der Glycoproteine bedingt^[9, 10].

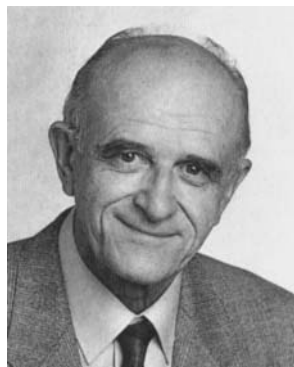
Die chemische Synthese von Segmenten dieser Bindungsregion ist von Interesse zur Strukturbestimmung und zur Aufklärung der Funktion der Glycoproteine sowie zur Bestimmung der Spezifität der Biosyntheseprozesse. Über einen Spacer an größere Moleküle gebundene Oligosaccharidsegmente sind zur Gewinnung von monoclonalen Anti-

körpern geeignete Antigene. An Festkörpersäulen gebunden, können Oligosaccharide bei spezifischer Bindung zur Affinitätschromatographie von Enzymen und Antikörpern eingesetzt werden. Der vorliegende Überblick beschreibt die chemische Synthese und die molekulare Anordnung derartiger Bindungsregionen von Glycoproteinen.

2. N-Glycoproteine: Asparagin-gebundene Oligosaccharide

2.1. Basisstrukturen und Biosynthese

In Abbildung 1 sind die wichtigsten Basisstrukturtypen der N-Glycoproteine zusammengefaßt^[1, 10]. Neben dem Oligosaccharidvorläufer gibt es den mannosidischen Typ, den Hybridtyp und den komplexen Typ, von denen der letztgenannte am häufigsten vorkommt. Es ist erkennbar, daß alle Typen ein gleichartiges Core-Muster enthalten, das aus zwei Resten GlcNAc und einem Verzweigungselement aus



Hans Paulsen, geboren 1922 in Hamburg, promovierte dort 1955 bei Kurt Heyns und habilitierte sich 1962. Im Jahre 1972 übernahm er an der Universität Hamburg einen Lehrstuhl für Naturstoffchemie. Seine Untersuchungen umfaßten das gesamte Gebiet der Saccharidchemie, in den letzten fünfzehn Jahren standen jedoch Oligosaccharidsynthesen im Mittelpunkt. Hierauf aufbauend beschäftigte er sich auch mit biologisch wichtigen Substanzen wie Blutgruppensubstanzen, Glycolipiden und Glycoproteinen, deren große Bedeutung immer mehr sichtbar wird. Sein Wirken hat international Anerkennung gefunden, und es sind ihm alle Ehrungen zuteil geworden, die die Kohlenhydratchemie zu vergeben hat. Die Gesellschaft Deutscher Chemiker verlieh ihm 1980 die Emil-Fischer-Medaille, die Royal Society of Chemistry die Haworth-Memorial-Medaille und die American Chemical Society 1985 den Claude-S.-Hudson-Award. 1989 erhielt er die J.-Heyrovsky-Medaille der tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften.

drei Mannoseeinheiten (Man) besteht. Diese Pentasaccharidstruktur kommt in allen Formeln vor (siehe eingerahmte Struktur). Die vielfältigen Variationen der Strukturen der Glycoproteine erfolgen dann außerhalb dieser Core-Struktur durch weitere Kettenverlängerungen und Verzweigungen an den nach oben gezeichneten Ketten.

Um die Uniformität der Core-Struktur in allen *N*-Glycoproteinen zu verstehen, sei kurz das Prinzip der Biosynthese erläutert^[10]. Im rauen endoplasmatischen Reticulum wird, ausgehend von Dolicholphosphat, mit Hilfe spezifischer Glycosyltransferasen der Oligosaccharidvorläufer (Abb. 1) synthetisiert. Innerhalb des Dolicholphosphatcyclus wird dann das gesamte Oligosaccharid von 14 Saccharideinheiten auf das Asparagin einer Polypeptidkette übertragen, wenn in der Kette die Sequenz Asn-X-Ser/Thr vorliegt. Hierbei kann X eine beliebige Aminosäure sein; die Anwesenheit der Hydroxyaminosäuren Serin oder Threonin ist jedoch für den Übertragungsschritt essentiell.

Das erhaltene *N*-Glycoprotein durchläuft dann die Zisternen des Golgi-Apparates, wo der Trimming-Prozeß einsetzt^[10]. Das Glycoprotein wird durch Glycosidasen abgebaut und durch Glycosyltransferasen neu zu den gewünschten Strukturen aufgebaut. Hierbei wird jedoch die Core-Pentasaccharidstruktur am Asparagin nicht mehr angetastet. Sie bleibt daher in allen Varianten erhalten. Beim mannosidischen Typ wird nur eine Kette abgebaut. Beim Hybridtyp wird an einer Kette Lactosamin angeknüpft. Dieser Typ enthält meistens eine zusätzliche GlcNAc-Einheit, die an der Mannose des Verzweigungsgliedes angeknüpft ist. Der komplexe Typ enthält mehrere Lactosamineinheiten und kann an den Enden vielseitig verzweigt und weiter verlängert werden. Teilweise ist im komplexen Typ am Asparagin-gebundenen GlcNAc zusätzlich Fucose (Fuc) gebunden. Ferner kann beim komplexen Typ wie beim Hybridtyp am Verzweigungsglied eine zusätzliche GlcNAc-Einheit gebunden sein. Man kommt dann zum „bisected“ Typ, der innerhalb der Biosynthese von großer Bedeutung ist und auf den später gesondert eingegangen wird.

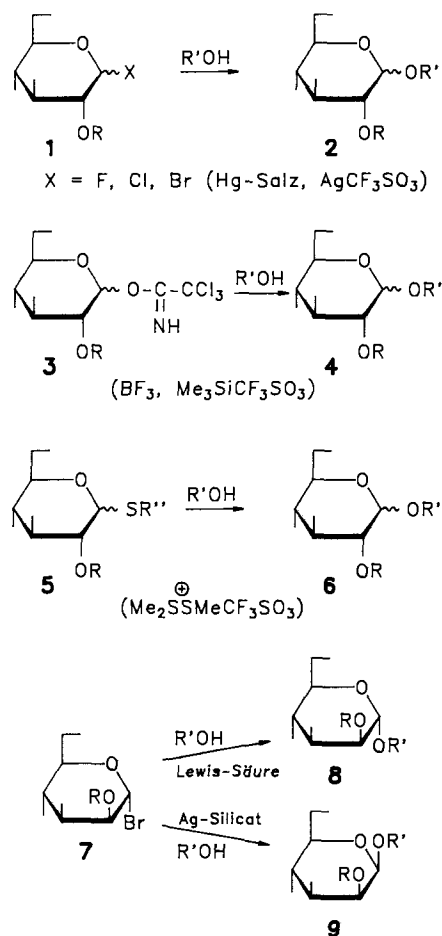
2.2. Chemische Synthesen

2.2.1. Bewährte Glycosidverknüpfungsmethoden

Für die Glycosidverknüpfung zum Aufbau größerer Oligosaccharide haben sich drei Methoden bewährt: Die Halogenid-, die Imidat- und die Thioglycosidmethode. Als Halogeniddonor können die Fluoride, Chloride oder Bromide **1** eingesetzt werden. Lewis-Säuren, Quecksilbersalze und Silbersalze sind gute Katalysatoren^[11]. Das Imidatverfahren nutzt den Donor **3** unter Zugabe von Lewis-Säure-Katalysatoren^[12]. Beim Thioglycosidverfahren ist eine Aktivierung des Schwefelatoms im Donor **5** notwendig, der durch Überführung in eine Sulfoniumstufe in eine gute Abgangsgruppe umgewandelt wird. Als Katalysatoren kommen $\text{Me}_2\text{SS}^+\text{Me}$ -Triflat und eine Reihe anderer Reagentien in Frage^[13a].

Alle drei Verfahren liefern in einer Nachbargruppen-unterstützten Reaktion stereoselektiv das *trans*-Glycosidierungsprodukt, was bedeutet, daß in der *D*-gluco- und der *D*-galacto-Reihe nur das β -Glycosid von **2**, **4** oder **6** gebildet wird. Ohne Nachbargruppenbeteiligung liefern alle drei Verfahren zwar bevorzugt das α -Glycosid, jedoch wird zugleich

in wechselnden Mengen das anomere β -Glycosid gebildet. Die Anteile an α -Glycosid sind stark von Bedingungen wie Lösungsmittel, Katalysator und jeweiliger Struktur der Reaktionspartner abhängig. Optimierungsbemühungen sind in diesem Falle sicherlich notwendig. Es ist nicht einfach, ausgehend vom normalerweise labileren β -anomerem Glycosyldonor eine $\text{S}_{\text{N}}2$ -artige Reaktion zum α -Glycosid durchzuführen. Nach den bisherigen Erfahrungen eignen sich hierzu am besten β -Glycosylchloride. Bei Glycosylfluoriden begünstigt der Katalysator $\text{Cp}_2\text{ZrCl}_2 \cdot \text{AgClO}_4$ die Bildung von α -glycosidischen Verknüpfungen^[13b].



Besondere Verhältnisse liegen bei der *D*-Mannose vor, bei der an C2 die Konfiguration umgekehrt ist. Die Verfahren liefern sowohl bei Nachbargruppen-unterstützter Reaktion als auch ohne Nachbargruppenbeteiligung mit Lewis-Katalysatoren das α -Glycosid **8**. Das β -Glycosid **9** ist auf diesen Wegen nicht erhältlich. Seine Darstellung gelingt nur nach dem von uns entwickelten Verfahren mit einem heterogenen Katalysator wie Silbersilicat^[14]. Hiermit ist in Abwesenheit von Lewis-Säuren der Donor **7** in das β -Glycosid **9** überführbar.

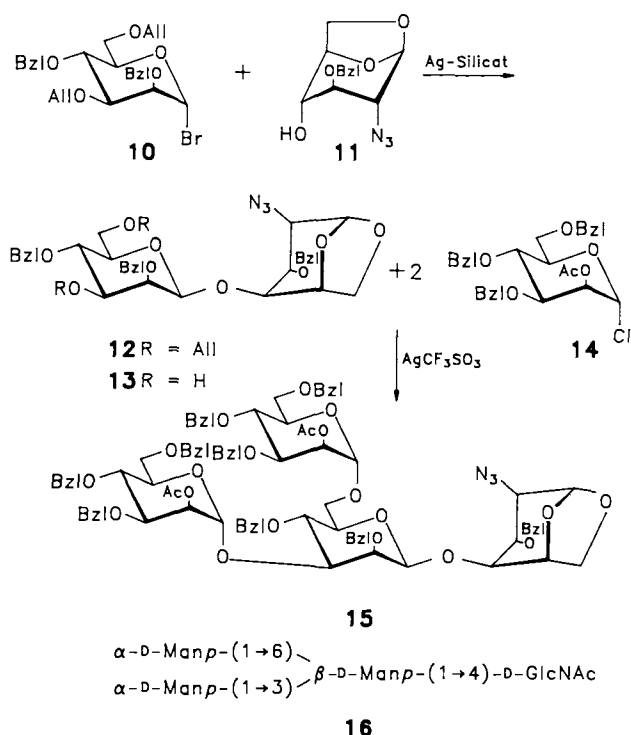
2.2.2. Synthese der Core-Basisstruktur

Syntheseversuche der Core-Basisstruktur (vgl. Abb. 1) wurden bereits frühzeitig von Jeanloz et al.^[15] unternommen. Die Hauptschwierigkeit lag dabei in der Herstellung der (1 → 4)- β -glycosidischen Verknüpfung der Mannose des Verzweigungspunktes zur benachbarten GlcNAc-Einheit.

Diese Verknüpfung war damals nicht herstellbar. Aus diesem Grunde synthetisierte man in geeigneter Blockierung zunächst das Disaccharid β -D-Glc-(1 \rightarrow 4)-D-GlcNAc, da mit der Glucose die β -glycosidische Verknüpfung mit Nachbargruppenbeteiligung sehr viel einfacher herzustellen ist. In der Glc-Einheit mußte dann selektiv die 2-OH-Gruppe freigesetzt und zur Ketogruppe oxidiert werden. Eine anschließende selektive Reduktion überführte diese Einheit in die *manno*-Konfiguration, wodurch das Schlüsseldisaccharid β -D-Man-(1 \rightarrow 4)-D-GlcNAc erhalten wurde^[15]. Dieser Weg erfordert einige Stufen. Er wurde auch zur Herstellung des Trisaccharides β -D-Man-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)-D-GlcNAc beschritten^[16].

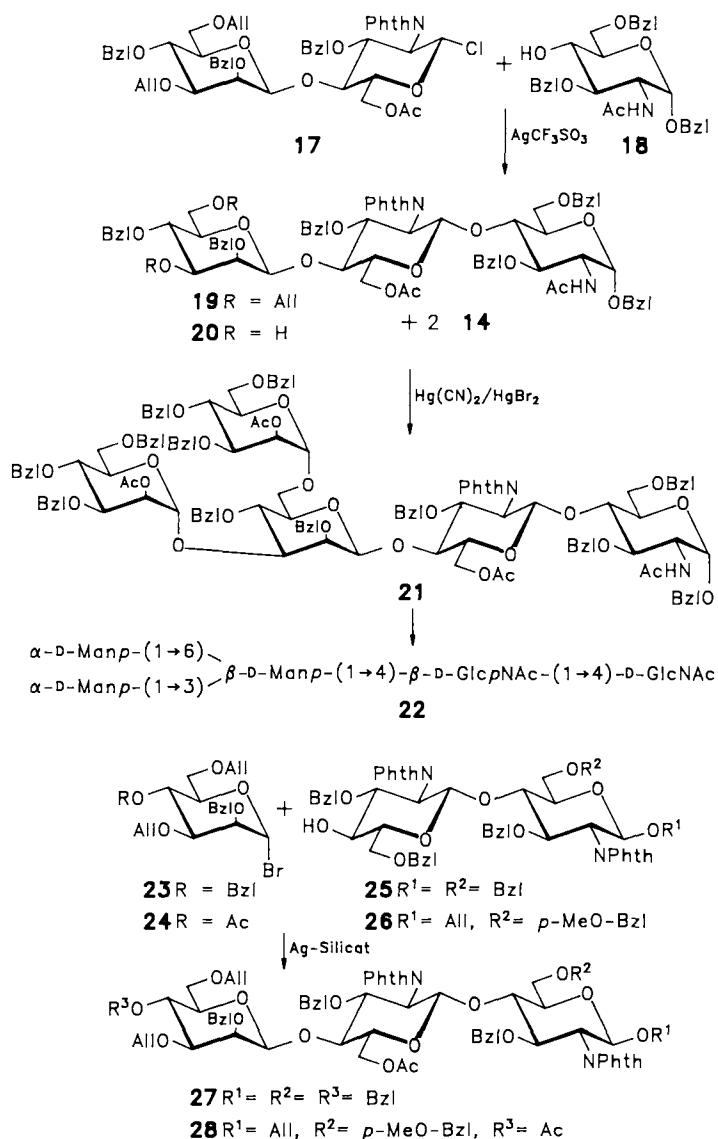
Eine Variante dieses Verfahrens wurde kürzlich von Kunz et al.^[17] beschrieben: Ausgehend vom gleichen Disaccharid Glc-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc wird durch intramolekulare nucleophile Substitution unter Nachbargruppenbeteiligung eines vicinalen Phenylurethanrestes die Inversion einer 2-O-Triflatgruppe an der Glc-Einheit erreicht. Man gelangt auf diesem Wege ohne Oxidation zum gleichen Schlüsseldisaccharid.

Die direkte β -mannosidische Verknüpfung gelingt nur durch heterogene Katalyse mit Silbersilicat^[18]. Hierfür sind reaktive Donoren und Acceptoren notwendig. Der Donor **10** (All = Allyl) ist durch Ethergruppen am anomeren Zentrum aktiviert^[11]. Im Acceptor **11** ist durch Inversion der *gluco*-Konfiguration durch die 1,6-Anhydroform die jetzt in axialer Stellung befindliche 4-OH-Gruppe aktiviert. Die Umsetzung von **10** mit **11** in Gegenwart von Silbersilicat liefert das gewünschte β -glycosidisch verknüpfte Disaccharid **12** in etwa 70% Ausbeute^[19].



Nach Abspaltung der Allylgruppen in **12** zu **13** ist jetzt eine Reaktion mit dem Mannosendonor **14** mit Nachbargruppenbeteiligung möglich, die stereoselektiv zur α -glycosidischen Bindung führt. Diese Reaktion ist erheblich einfacher.

So lassen sich zwei Äquivalente **14** mit **13** zum verzweigten Tetrasaccharid **15** in 82% Ausbeute umsetzen. Durch Entblockierung von **15** ist hieraus die wichtige verzweigte Sequenz der Core-Basisstruktur **16** erhältlich^[19].



Das Tetrasaccharid **16** wurde am reduzierenden Ende um eine weitere GlcNAc-Einheit verlängert, um die vollständige Core-Struktur zu erhalten. Hierzu wurde das Disaccharid **12** in den Glycosyldonor **17** (Phth = Phthaloyl) umgewandelt und mit **18** umgesetzt. Man erhielt stereoselektiv das β -verknüpfte Trisaccharid **19**. Nach Abspaltung der Allylgruppen zu **20** wurde dieses in glatter Reaktion mit zwei Äquivalenten des Mannosederivates **14** in einem Schritt zum Pentasaccharid **21** umgesetzt^[20]. Die Entblockierung ergab dann das vollständige verzweigte Core-Pentasaccharid **22**, das direkt an Asparagin gebunden ist.

Von Ogawa et al.^[21] wurde ein anderer Weg beschritten, um zu der **19** entsprechenden Trisaccharidkette zu gelangen. Bei der Umsetzung des Mannosendonors **23** mit dem Disaccharid **25** nach dem Silbersilicatverfahren kann neben erheblichen Anteilen des α -glycosidisch verknüpften Produktes in 40% Ausbeute das β -glycosidisch verknüpfte Trisaccharid **27** isoliert werden. Dies ist bemerkenswert, da die 4'-OH-

Gruppe in **25** nur sehr wenig reaktiv ist. Das Trisaccharid **27** wurde als Zwischenprodukt für weitere Aufbaureaktionen verwendet.

Van Boeckel et al.^[22] haben systematische Studien der β -Mannosidsynthese nach dem Silbersilicatverfahren durchgeführt. Danach ist das Substitutionsmuster im Glycosyldonor wichtig: An C3 und C6 sollten möglichst elektronenliefernde, an C4 dagegen elektronenziehende Substituenten vorhanden sein, um eine β -Glycosidierung zu begünstigen. Der Donor **24** mit einer 4-OAc-Gruppe hat somit die optimale Substituentenanordnung. Die Umsetzung von **24** mit **26** liefert nach dem Silbersilicatverfahren das gewünschte β -glycosidisch verknüpfte Trisaccharid **28** in der Tat in der erhöhten Ausbeute von 48%, während nur 19% α -Glycosid entstehen^[23]. Auch **28** wurde für weitere Aufbaureaktionen verwendet.

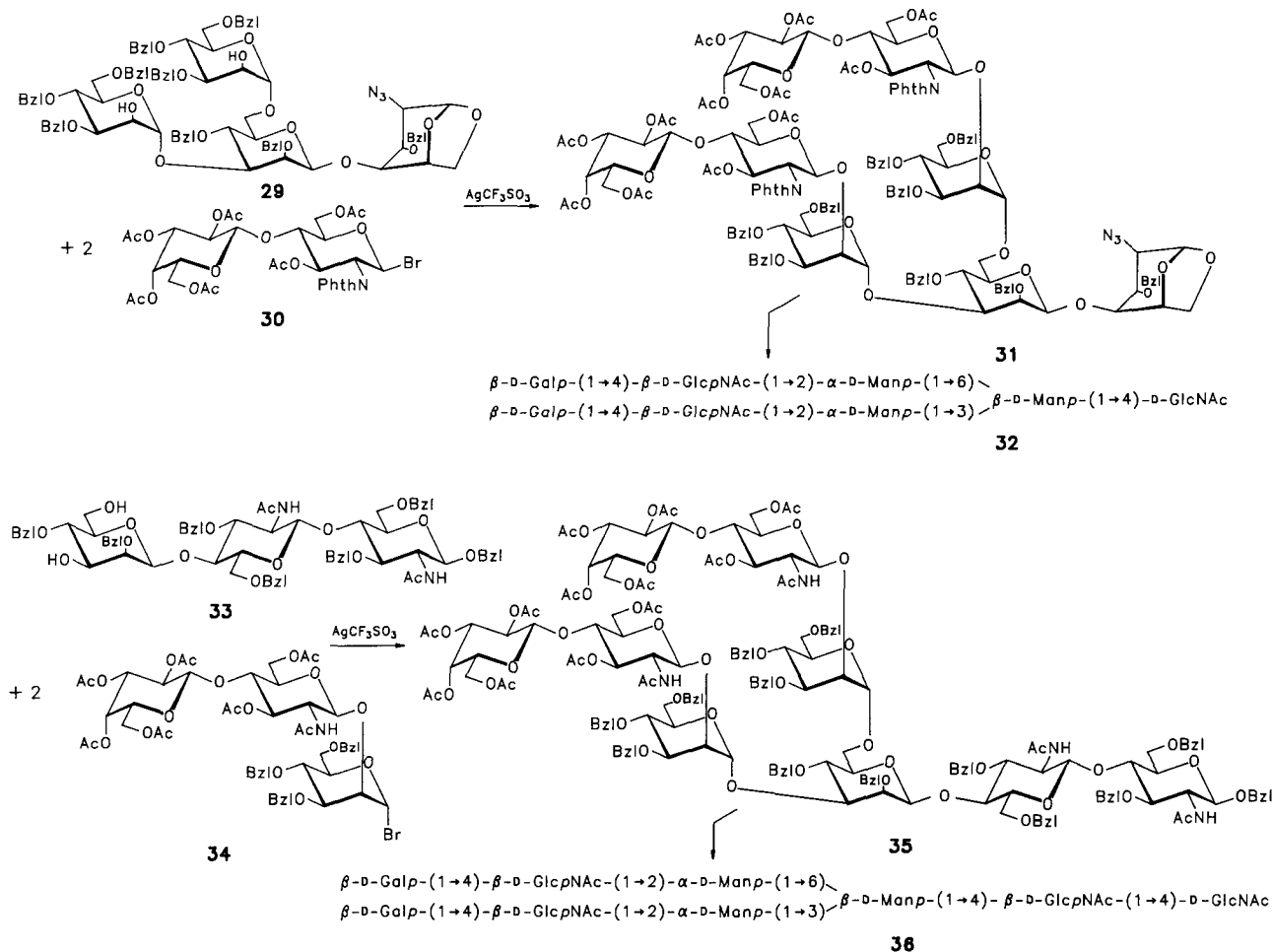
2.2.3. Synthese von Strukturen des Lactosamintyps (komplexer Typ)

Von den Strukturen der Abbildung 1 wird der komplexe Typ am häufigsten in Glycoproteinen gefunden. Hier sind an die Core-Basisstruktur Lactosaminreste geknüpft, die auch als Lactosaminantennen bezeichnet werden. Je nach der Zahl der angeknüpften Lactosaminreste bezeichnet man die Verbindungen als Di-, Tri- oder Tetra-antennary-Strukturen. Die äußeren Reste können durch zusätzliche Reste oder Verzweigungen modifiziert sein^[1, 2]. Als endständige Zuckerreste treten häufig 5-*N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) oder

L-Fucose (Fuc) auf. Die meisten Synthesen wurden in den wichtigen Klassen des Lactosamintyps und des „bisected“ Typs (ebenfalls komplexer Typ in Abb. 1) unternommen. Daher werden in diesem Überblick diese Synthesen besonders behandelt.

Aus dem Basistetrasaccharid **15** ist durch selektive Entblockierung der 2-OH-Gruppe der terminalen Mannosereste der Acceptor **29** erhältlich. Als ausgezeichneter Lactosaminindonor steht das Disaccharid **30** zur Verfügung^[24]. In einem Schritt können zwei Äquivalente **30** mit **29** stereoselektiv unter Bildung β -glycosidischer Verknüpfungen in über 70% Ausbeute zum Octasaccharid **31** umgesetzt werden^[25, 26]. Über eine Reihe von Entblockierungsschritten erhält man hieraus **32**. Auf diesem Wege gelang uns erstmalig die Darstellung einer Bi-antennary-Struktur des Lactosamintyps^[26].

Ogawa et al.^[27, 28] synthetisierten eine Struktur mit einer weiteren GlcNAc-Einheit am reduzierenden Ende, die im *N*-Glycoprotein direkt an Asparagin gebunden ist. Sie benutzen als Acceptor das Trisaccharid **33**, das durch einige Modifizierungen aus **27** erhältlich ist. Sehr interessant ist der Glycosyldonor **34**. Es handelt sich um Trisaccharid aus Lactosamin und Mannose. Die Umsetzung von **33** mit zwei Äquivalenten des Bromids **34** führt in Gegenwart von Silbertriflat in 59% Ausbeute zum Nonasaccharid **35**^[27]. Die Reaktion ist insofern bemerkenswert, als es sich hierbei um die Umsetzung eines α -D-Mannosylbromides ohne Nachbargruppenbeteiligung handelt. Die Reaktion führt in Gegenwart des Lewis-Säure-artigen Katalysators Silbertriflat



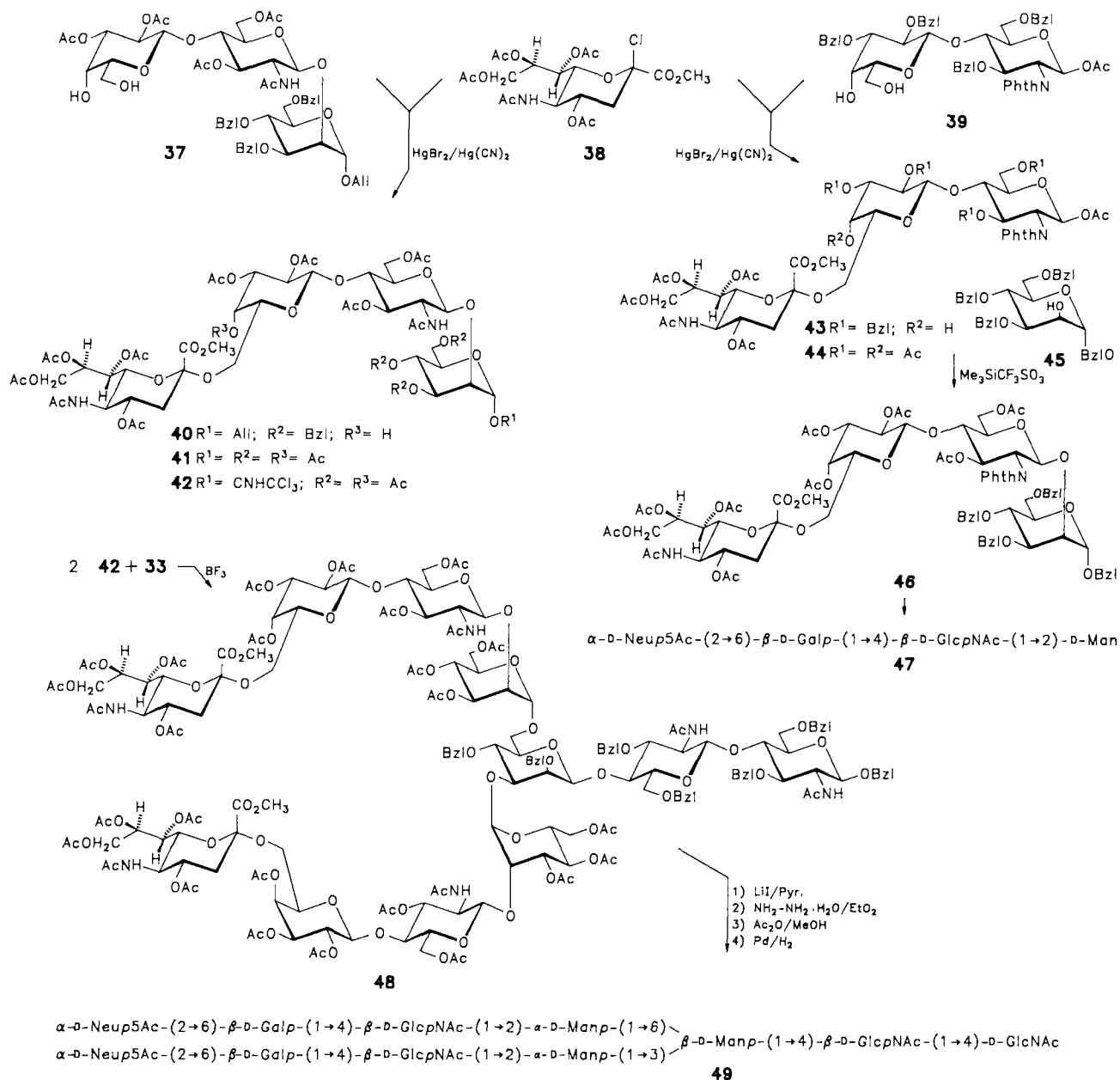
stereoselektiv nur zum Produkt mit α -glycosidisch verknüpften Mannoseresten. Auf diese Besonderheit der Mannose wurde bereits in Abschnitt 2.2.1 hingewiesen. Eine stufenweise Entblockierung von **35** liefert **36**, das die vollständige Core-Struktur mit zwei Lactosaminresten enthält^[27].

Da 5-*N*-Acetylneuraminsäure sehr häufig endständig an Lactosamin gebunden ist, wurden auch Versuche unternommen, Bausteine zu konstruieren, die Neu5Ac enthalten und die dann an andere Reste angeknüpft werden können. Bei der Glycosidsynthese von 5-*N*-Acetylneuraminsäure treten zwei grundsätzliche Schwierigkeiten auf^[29]: Als Konkurrenzreaktion zur Glycosidierung beobachtet man eine β -Eliminierung, die durch die benachbarte Carboxylatgruppe hervorgerufen wird und ein 2,3-ungesättigtes Derivat liefert, das für die Glycosidsynthese verlorengeht. Weiterhin verläuft die Glycosidsynthese der 5-*N*-Acetylneuraminsäure nicht stereoselektiv. Man erhält je nach den Reaktionsbedingungen α - und β -Produkte in wechselnden Anteilen. Dies macht einen Reinigungsschritt zum Abtrennen des unerwünschten Anomers erforderlich. Trotz dieser erheblichen

Erschwernisse bei der Glycosidsynthese wurde eine Reihe von interessanten Bausteinen hergestellt.

Die Umsetzung des Neuraminsäuredonors **38** mit dem Lactosaminacceptor **39** ergibt das Trisaccharid **43** (25%). Überführt man **43** in das Acetat **44**, so hat man einen gut geeigneten Neuraminsäure-haltigen Glycosyldonor zur Hand. Als Beispiel sei die Glycosidierung des Mannosederivates **45** angeführt: In diesem Falle dient Trimethylsilyltriflat als Katalysator, und die 1-*O*-Acetylgruppe fungiert unter Nachbargruppenbeteiligung als Abgangsgruppe. In 47% Ausbeute erhält man das β -glycosidisch verknüpfte Tetrasaccharid **46**, dessen Entblockierung die freie Tetrasaccharidkette **47**^[30] liefert.

Ein anderer Syntheseblock wurde von Ogawa et al.^[31] dargestellt. Er wählte als Glycosylacceptor für den Neuraminsäuredonor **38** das Trisaccharid **37**. Für die Umsetzung erwies sich in allen Fällen das Katalysatorsystem $\text{HgBr}_2/\text{Hg}(\text{CN})_2$ als am günstigsten. Unter optimierten Reaktionsbedingungen ließ sich durch Umsetzung von **37** mit **38** das Tetrasaccharid **40** in 48% Ausbeute gewinnen^[31]. Durch



Umwandlung von **40** in das voll acetylierte Produkt **41** wurde die Substanz stabilisiert. Nach selektiver Hydrolyse der 1-*O*-Acetylgruppe ließ sich das Imidat **42** gewinnen, das sich als ein geeigneter Syntheseblock erwies.

Mit dem schon erwähnten Trisaccharidacceptor **33** ist eine Umsetzung mit zwei Äquivalenten **42** in Gegenwart von Bortrifluorid nur zweistufig möglich. Zunächst wird die reaktive 6''-OH-Gruppe der Mannoseeinheit von **33** mit **42** verknüpft. Man erhält 48 % des monoglycosylierten Produkts, das für den zweiten Schritt gereinigt werden muß. Im zweiten Schritt wird dann die 3'-OH-Gruppe der Mannose mit **42** glycosyliert, und man gelangt in 56 % Ausbeute zum Oligosaccharid **48**^[32]. Die stufenweise Entblockierung dieses Produktes ergibt dann das freie Undecasaccharid **49**. Mit dieser Synthese dürften die derzeitigen Grenzen der chemischen Oligosaccharidsynthese markiert sein.

Es sei noch erwähnt, daß inzwischen zahlreiche Versuche unternommen wurden, die Glycosidsynthese der Neuraminsäure zu verbessern. Man kann am C3-Atom Halogen-^[33], Schwefel- oder Selenreste^[34] einführen und so die konkurrierende Eliminierung vermeiden. Im Endprodukt wird dann die Desoxygruppierung an C3 durch Reduktion wiederhergestellt. Diese Wege erfordern jedoch eine Reihe zusätzlicher Stufen, und man muß die Ausbeute über den Gesamtweg kalkulieren, um zu entscheiden, welche Reaktionsfolge günstiger ist. Die Selektivität in Richtung auf ein α -Glycosid konnte durch Anwendung des Thioglycosidierungsverfahrens (siehe Abschnitt 2.2.1) verbessert werden^[35a]. Dies gilt auch für die Glycosidierung von sekundären Hydroxygruppen, die sich naturgemäß mit Neuraminsäuredonoren noch schwieriger glycosylieren lassen. Nach einer anderen Untersuchung erreicht man durch Einsatz eines heterogenen Katalysators einen hohen Anteil an α -Produkt^[35b].

2.2.4. Synthese von „bisected“ Strukturen

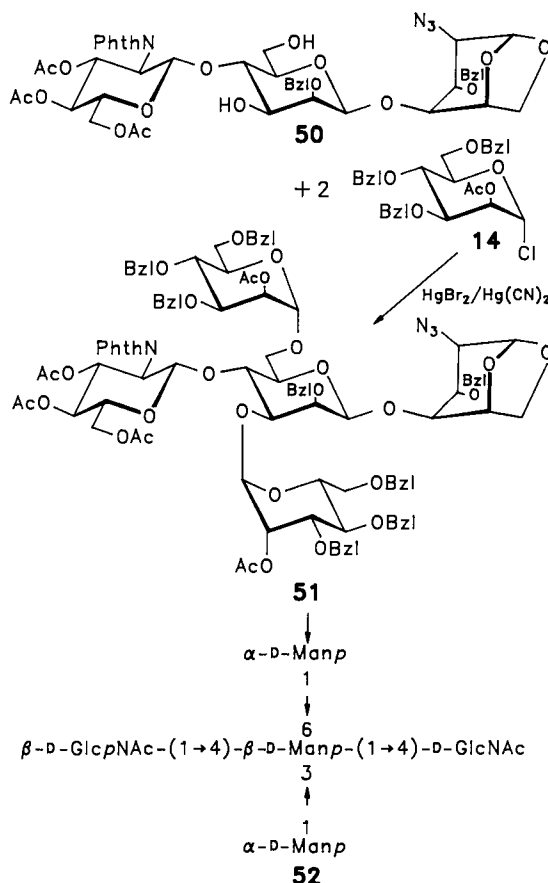
Von den Strukturen des komplexen Typs der Abbildung 1 sind die „bisected“ Strukturen von Interesse, da sie bei der Biosynthese eine wichtige Rolle spielen^[9]. In der „bisected“ Struktur ist an der Mannoseeinheit des Verzweigungspunkts zusätzlich an der 4-OH-Gruppe eine GlcNAc-Einheit gebunden. Dadurch kommt eine sehr stark verzweigte Struktur zustande, deren Aufbau interessante chemische Probleme aufwirft.

Von uns wurde der Trisaccharidacceptor **50** aufgebaut, in dem die mittlere Mannoseeinheit den Verzweigungspunkt ergeben soll. Die Reaktion des Glycosyldonors **14** mit **50** verläuft erheblich träger als diejenige von **14** mit **13**. Bei einem großen Überschuß an **14** gelingt es unter kontrollierten Bedingungen, auch **50** mit zwei Mannoseresten zu **51** (68 %) zu verknüpfen^[36]. Die stufenweise Entblockierung von **51** ergibt dann das stark verzweigte Pentasaccharid **52**.

Es wurden zahlreiche Versuche unternommen, nach Entblockierung an die 2-OH-Gruppen der beiden seitenständigen Mannosereste Lactosaminketten zu knüpfen, um wie beim Lactosamintyp zu größeren Einheiten zu gelangen^[37]. Die Umsetzung mit dem Lactosamindonor **30**, die bei der Reaktion von **29** zu **31** in hervorragender Weise gelingt, ist jedoch mit Derivaten von **51** nicht möglich. Pentasaccharide wie **51** erwiesen sich bei allen Methoden als völlig resistent gegenüber weiteren Kettenverlängerungsreaktionen^[37]. Da-

her mußte hierfür eine andere Strategie eingeschlagen werden.

In einer Blocksynthese sollten zwei Äquivalente eines Trisacchariddonors aus Lactosamin und Mannose mit dem Diol **50** verknüpft werden. Von den verschiedenen aktivierten

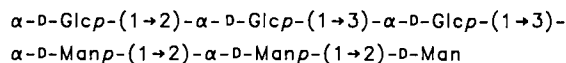


Trisacchariddonoren erwies sich nur das Imidat **53** als reaktiv genug. Es sollte in einer nicht-nachbargruppenaktiven Reaktion selektiv zum α -Glycosid reagieren (vgl. Abschnitt 2.2.1). Die Umsetzung von **50** mit **53** führt jedoch nur zum monosubstituierten Produkt **54** (53 % Ausbeute); nur die reaktive primäre Hydroxygruppe von **50** reagiert. Auch mit einem Überschuß an **53** gelingt es nicht, in **54** die wenig reaktive sekundäre 3'-OH-Gruppe der Mannose umzusetzen^[37].

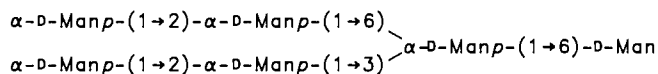
Ein Umweg führt jedoch zum Erfolg: Wird die reaktive 6'-OH-Gruppe in **50** zunächst durch eine Chloracetylgruppe blockiert (**50** \rightarrow **55**), so läßt sich jetzt **55** mit **53** im Überschuß in 19 % Ausbeute zum umgekehrt substituierten Hexasaccharid **56** umsetzen. Nach selektiver Abspaltung der Chloracetylgruppe zu **57** kann dann in einem zweiten Reaktionsschritt mit **53** die zweite Seitenkette in 58 % Ausbeute eingeführt werden, und man gelangt zum gewünschten Nonasaccharid **58**^[37]. Durch konsekutive Entblockierung läßt sich hieraus die freie „bisected“ Einheit **59** gewinnen. Es handelt sich hierbei um eine Oligosaccharidsynthese höchster Komplexität.

Von Ogawa et al.^[38] wurde eine andere „bisected“ Struktur synthetisiert, bei der die Kette am reduzierenden Ende um eine GlcNAc-Einheit verlängert ist. Als Edukt diente das Tetrasaccharid-Diol **60**, das aus einer mit **33** vergleichbaren

Prozesses wieder abgebaut. Die Synthese der α -glycosidisch verknüpften Glucosereste ergibt in der Regel das β -Anomer als Nebenprodukt in wechselnden Anteilen.



66



67

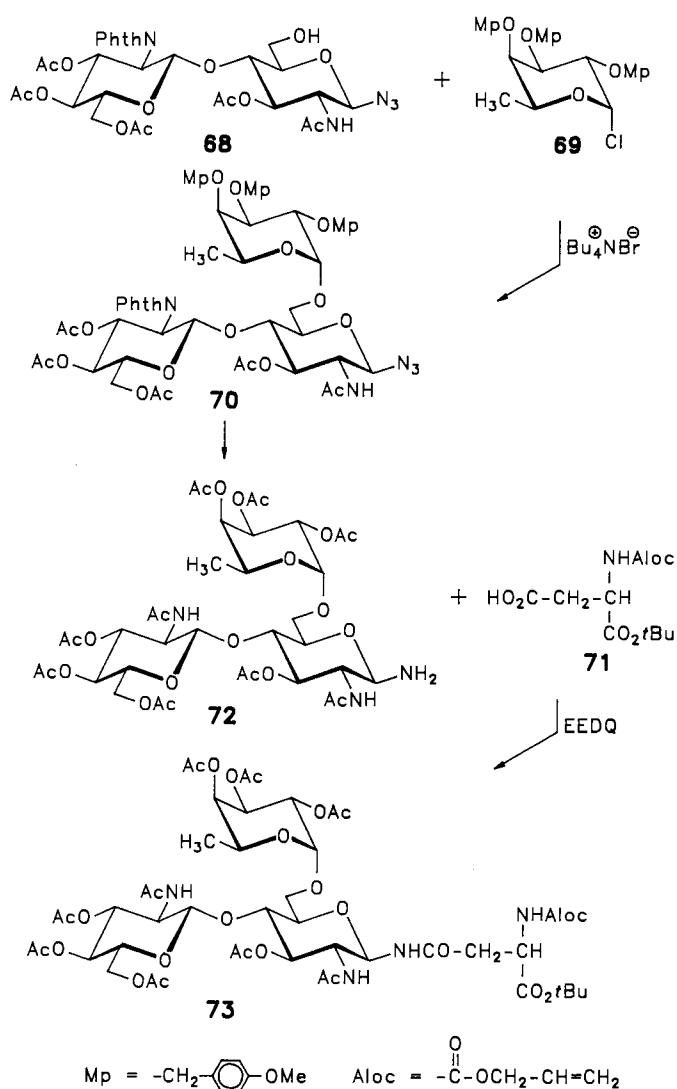
Ferner wurden von Ogawa et al.^[40] Derivate des verzweigten Hexasaccharides **67** synthetisiert, das nur Mannosereste enthält. Die Kette stellt einen Arm des mannosidischen Typs dar. Auch die jeweils um eine Mannoseeinheit am nichtreduzierten Ende verkürzte Struktur wurde synthetisiert^[40]. Dieses Tetrasaccharid kommt sowohl im mannosidischen Typ als auch im Hybridtyp vor (s. Abb. 1).

2.2.6 Synthese von N-Glycopeptiden

Synthesen von N-Glycopeptiden wurden bereits frühzeitig insbesondere von Jeanloz et al.^[41] unternommen. Hierbei wurden GlcNAc^[42] und Chitobiose^[43] N-glycosidisch mit der Amidgruppe von Asparagin verknüpft, das dann mit weiteren Aminosäuren verlängert wurde. Zur Verknüpfung der Saccharidreste mit der Aminosäure wird zunächst das β -Glycosylazid des Aminozuckers hergestellt. Dieses wird zum β -Glycosylamin reduziert, das unmittelbar mit Peptidverknüpfungsreagentien (z. B. 1,2-Dihydro-2-ethoxychinolin-1-carbonsäureethylester, EEDQ) mit der Carboxyseitenkette der Asparaginsäure zur Reaktion gebracht werden muß^[41]. Diese Reaktion ist kritisch, da Glycosylamine labil sind und zur Dimerisierung neigen.

Von Kunz^[44] ist diese Reaktionsfolge wieder aufgegriffen und verbessert worden. Ihm gelang es, das Schlüsseltrisaccharid aus Chitobiose und Fucose mit Asparagin zu verknüpfen^[45a]. Dazu wurde das β -Glycosylazid **68** mit dem Fucosedonor **69** umgesetzt. Die in-situ-Anomerisierung^[11] lieferte stereoselektiv das α -glycosidisch verknüpfte Trisaccharid **70**. Bei Fucosederivaten verlaufen in-situ-Anomerisierungen ohne Nachbargruppenbeteiligung stets besonders vorteilhaft.

Die *p*-Methoxybenzylsubstituenten in **69** wurden deshalb gewählt, um im Fucoseteil von **70** die *O-p*-Methoxybenzylgruppen selektiv oxydativ entfernen und durch *O*-Acetylgruppen ersetzen zu können. Bei der mit Benzylethergruppen geschützten Fucose ist die glycosidische Bindung so labil, daß sie in Anwesenheit von Trifluoressigsäure, die später zur Freisetzung des C-Terminus in den Aminosäureteil benötigt wird, nicht stabil ist. Die Acetat-geschützte Fucose ist dagegen, wie zu erwarten, in ihrer glycosidischen Bindung stabiler. Auf die Reduktion der Azidgruppe zum Glycosylamin **72** folgt die Kupplung mit dem Asparaginsäurederivat **71** zum N-Glycopeptid **73**. Der Aminosäureteil enthält die differenzierte Blockierung Aloc/*t*Bu. Im Asparaginteil kann somit wahlweise der N-Terminus oder der C-Terminus freigesetzt werden, um beliebige andere Aminosäuren zur



Peptidkettenverlängerung anzuknüpfen^[45a]. Es sei hier auf die entsprechenden Übersichten verwiesen^[41, 44].

2.3. Konformation der Oligosaccharide der N-Glycoproteine

2.3.1. Konformation der Core-Basisstruktur und der „bisected“ Form

Konformationsanalysen der Oligosaccharidketten sind deshalb interessant, weil biologische Funktionen häufig mit der Konformation korreliert werden. Bei Oligosaccharidketten ist die Zahl der möglichen Konformationen erheblich eingeschränkt. Liegen wie hier Bausteine der *manno*-, *gluco*- und *galacto*-Konfiguration vor, so nehmen die Pyranoseringe praktisch ausschließlich die ⁴C₁-Sesselkonformation ein (d. h. C-4 befindet sich oberhalb und C-1 unterhalb der Ringebene). Die Größe des glycosidischen Bindungswinkels τ ist demnach sehr geringen Schwankungen unterworfen. Daher können Konformationsänderungen nur durch Änderung der Torsionswinkel ϕ und ψ zwischen den glycosidischen Bindungen (Abb. 2) auftreten. Der Diederwinkel ψ wird stark durch den *exo*-anomeren Effekt eingeschränkt, der eine Bevorzugung der *gauche*-Anordnung des Ring-

sauerstoffatoms bezüglich der O-R-Bindung des Aglycons voraussagt. Modellbetrachtungen und Energieberechnungen zeigen, daß bei zwei über eine sekundäre Hydroxygruppe verknüpften Saccharideinheiten das Energieminimum erreicht ist, wenn die beiden Protonen der anomeren Bindung (z. B. in Abb. 2 H1' und H4) etwa in die gleiche Richtung weisen. Konformationen, in denen ein Ring umgekehrt gedreht wird, sind infolge sterischer Wechselwirkungen so energiereich, daß sie praktisch nicht vorkommen. Liegt eine Verknüpfung einer primären 6-OH-Gruppe vor, so tritt als weitere Variable die Rotation um die C5-C6-Bindung ein, für die der Torsionswinkel ω zu berücksichtigen ist. Bei Verzweigungen an der 6-OH-Gruppe sind somit Anteile unterschiedlicher Konformationen zu erwarten. Eine neuere Zusammenfassung der Konformationsanalyse von Oligosacchariden gibt B. Meyer^[45b].

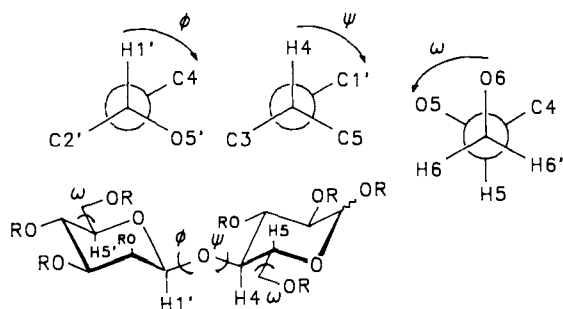


Abb. 2. Definitionen der Diederwinkel ϕ , ψ und ω bei Sacchariden.

Die Konformation in Lösung wird NMR-spektroskopisch bestimmt. Hierzu müssen die Signale möglichst aller Protonen registriert werden. Da infolge der sehr ähnlichen chemischen Verschiebungen der Ringprotonen der verschiedenen Pyranoseringe starke Überlappungen auftreten, müssen die modernen zweidimensionalen Methoden angewendet werden^[46]. Anschließend NOE-, NOESY- oder ROESY-Experimente ergeben Aufschlüsse über NOE-Effekte innerhalb des Moleküls. ROESY-Experimente sind dann angezeigt, wenn ungünstige Molekülkorrelationszeiten zum Verschwinden der Kreuzrelationsrate und damit des NOE-Effekts führt. Bei der Größe der hier behandelten Moleküle kommt dies durchaus häufiger vor. Von Interesse sind die interglycosidischen NOE-Effekte: So findet man bei einer Verknüpfung mit einer sekundären Hydroxygruppe, z. B. zwischen den Protonen H1' und H4 (vgl. Abb. 2), stets starke NOE-Effekte. Damit ergeben sich wertvolle Informationen über die Anordnungen an den glycosidischen Bindungen. Die NOE-Effekte können teilweise auch quantitativ ausgewertet werden.

Die NMR-Messungen lassen sich durch Energieberechnungen mit aufwendigen semiempirischen Programmen wie PCILO^[47] oder Kraftfeldprogrammen wie modifiziertem MM2^[48], AMBER^[49] oder CHARMM^[50] ergänzen. Ein einfaches, speziell für Kohlenhydratsequenzen entwickeltes Verfahren ist das Kraftfeldprogramm GESA, das nach der HSEA-Methode arbeitet^[45b, 51]. Bei diesem empirischen Verfahren wird das Molekül mit Hilfe parameterisierter Potentialfunktionen iterativ berechnet. Die berücksichtigten Energietermine sind van-der-Waal-Wechselwirkungsterme in Form des Kitaigorodsky-Ausdrucks^[52] und der *exo-ano-*

mere Effekt. Die Pyranoseringe werden als starre Einheiten betrachtet, deren Koordinaten aus Röntgenstruktur- und Neutronenbeugungsanalysen entnommen wurden. Dabei werden die Gerüstprotonen im allgemeinen nicht übernommen, wenn die Positionen in den Kristallanalysen ungenau angegeben sind, sondern nachträglich mit einem Hilfsprogramm erzeugt. Die Wasserstoffatome der OH-Gruppen werden in den Berechnungen nicht berücksichtigt. Bei geeigneten Startkonformationen werden sämtliche Diederwinkel ϕ , ψ und ω gleichzeitig optimiert. Dabei wird der Fletcher-Powell-Algorithmus^[53] angewendet. Sorgfältige vergleichende Untersuchungen von Carver et al.^[54] haben gezeigt, daß das wenig aufwendige GESA- oder HSEA-Verfahren sehr ähnliche Ergebnisse liefert wie die oben genannten Kraftfeldprogramme. Bei der Beurteilung der variablen 6-OH-Seitenkettenbindung ist jedoch möglichst die Populationsverteilung der Konformationen zu beachten^[55, 56].

Als Ergebnis einer Konformationsanalyse sind in Abbildung 3 die Minimumkonformationen des verzweigten zentralen Tetrasaccharides **16**^[57] und der „bisected“ Struktur

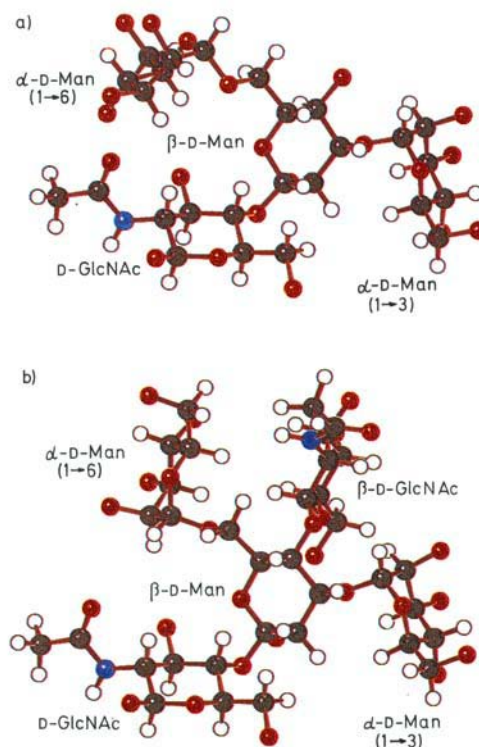


Abb. 3. Minimumkonformationen nach den NMR-Daten und GESA-Berechnungen von a) dem Tetrasaccharid **16** und b) dem „bisected“ Pentasaccharid **52**.

52^[58] wiedergegeben. Es zeigt sich, daß der Teil des Moleküls mit Verknüpfungen von sekundären Hydroxygruppen mit dem (1 → 3)-Arm der Mannose die erwartete günstigste Konformation einnimmt. Dies ist mit den NMR-Daten in Einklang^[57]. Der flexible (1 → 6)-Arm der Mannose ist in **16** zum GlcNAc-Rest geneigt. Interessant ist der Vergleich von **16** mit der „bisected“ Form **52**: Der untere Teil mit dem (1 → 3)-Arm ist nahezu unverändert. Der variable (1 → 6)-Arm bevorzugt jetzt jedoch eine andere Konformation. Dies wird durch interglycosidische NOE-Effekte zwischen der (1 → 6)-Man-Einheit und der „bisected“ (1 → 4)-GlcNAc-Einheit bestätigt^[58]. Was den (1 → 6)-Arm betrifft, so zeigt

Abbildung 3 die Formen mit den höchsten Anteilen der Populationsverteilung.

In Tabelle 1 sind die Torsionswinkel ϕ und ψ für die einzelnen glycosidischen Bindungen von **16** und **52** wiedergegeben. Vergleicht man **16** und **52**, so ist erkennbar, daß die Werte für

Tabelle 1. Torsionswinkel [°] der nach NMR-Daten und GESA-Rechnungen bevorzugten Konformation von **16** und **52** sowie Kristallstrukturdaten.

	$\beta(1 \rightarrow 4)$		$\alpha(1 \rightarrow 3)$		$\alpha(1 \rightarrow 6)$		β -D-Man ω
	ϕ	ψ	ϕ	ψ	ϕ	ψ	
16	57	7	-48	-13	-58	179	48
52	59	-2	-48	-15	-59	152	-66
Kristall[a]	48.1	0.6	-57.6	-19.4	—	—	—

[a] Röntgenstruktur von α -D-Manp-(1 \rightarrow 3)- β -D-Manp-(1 \rightarrow 4)-D-GlcNAc.

die untere Trisaccharidkette nahezu gleich sind. Deutlich zeichnet sich die Variation des (1 \rightarrow 6)-Arms der Mannose ab, der in **52** eine andere Stellung bevorzugt. Von dem unteren Trisaccharid α -D-Man-(1 \rightarrow 3)- β -D-Man-(1 \rightarrow 4)-D-GlcNAc ist als einzigem Oligosaccharid eine Röntgenstrukturanalyse bekannt^[59]. Für diesen Teil der beiden Moleküle **16** und **52** sind daher die ϕ - und ψ -Werte der Röntgenstruktur in Tabelle 1 zusätzlich mit aufgenommen. Diese Werte weichen nicht wesentlich von den für **16** und **52** errechneten Werten ab, was zeigt, daß für den (1 \rightarrow 3)-Arm in Lösung und im Kristall sehr ähnliche Konformationen vorliegen.

2.3.2. Reaktion von modifizierten Core-Oligosacchariden mit GlcNAc-Transferase I

Die Verbindungen **16** und **52** sind hinsichtlich ihres unterschiedlichen Verhaltens gegenüber GlcNAc-Transferase I von großem Interesse. Die GlcNAc-Transferase I ist das Enzym, das während des Trimming-Prozesses mit dem Aufbau der neuen Ketten an die invariante Core-Struktur **22** beginnt^[9]; diese Transferase führt selektiv am (1 \rightarrow 3)-Arm der Mannose die erste GlcNAc-Einheit ein. Die Struktur **74** (Abb. 4) entspricht während dieses Prozesses dem Substrat und reagiert am besten (100% relative Aktivität) mit dem Enzym. Die beiden zusätzlichen Mannosereste in **74** am (1 \rightarrow 6)-Arm werden später durch Mannosidasen abgespalten^[9].

Das Tetrasaccharid **16** ist mit 65% relativer Aktivität gleichfalls ein sehr aktives Substrat für dieses Enzym. Die „bisected“ Struktur **52** wird dagegen nicht glycosyliert^[60]. Die „bisected“ Anordnung ist somit ein Stoppsignal für die GlcNAc-Transferase I. Es lag nahe, diese Inaktivität auf die oben diskutierte starke Konformationsänderung zwischen **16** und **52** zurückzuführen, die durch die zusätzliche GlcNAc-Gruppe am 4'-OH in **52** bewirkt wird.

Um diese Annahme zu prüfen, wurde das modifizierte Tetrasaccharid **75** synthetisiert, das an der Verzweigungseinheit in 4'-Position desoxidiert ist^[61]. Auch **75** ist kein Substrat für die GlcNAc-Transferase I^[62]. Es wurde ferner festgestellt, daß **75** bevorzugt die gleiche Konformation wie **16** einnimmt^[63]. Damit ist gezeigt, daß die Änderung der Konformation in **52** ohne Bedeutung auf die Enzymreaktion ist. Die GlcNAc-Transferase I benötigt vielmehr für ihren Angriff die 4'-OH-Gruppe der zentralen Mannoseeinheit. Interessanterweise ist das modifizierte Tetrasaccharid **76**^[61], das

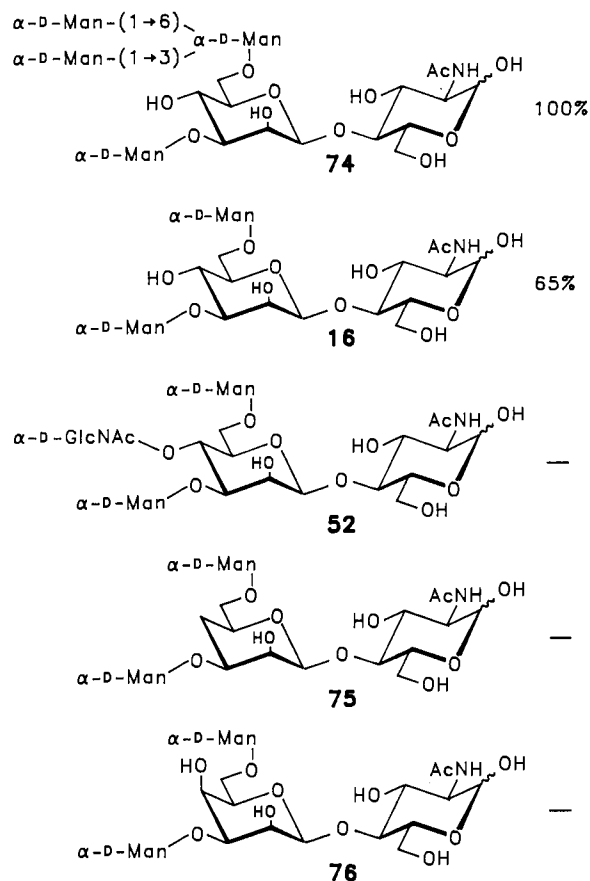


Abb. 4. GlcNAc-Transferase-I-Aktivität von natürlichen und von modifizierten Oligosaccharidsubstraten.

als Verzweigungsglied eine D-Talose enthält, ebenfalls kein Substrat^[63]. Methyliert man in **16** die 4'-OH-Gruppe zur Methylethergruppe, so reagiert die resultierende Verbindung gleichfalls nicht mit GlcNAc-Transferase I.

Aus diesen Befunden kann man den Schluß ziehen, daß die GlcNAc-Transferase I für ihre Bindung am Substrat unbedingt eine äquatoriale 4'-OH-Gruppe benötigt („key polar group“). Das Enzym dürfte mit dieser Gruppe eine Wasserstoffbrückenbindung eingehen, da der entsprechende Methylether nicht reagiert. Dieses Beispiel zeigt in eindrucksvoller Weise, wie man durch Synthese von modifizierten Oligosaccharidsubstraten zu sehr subtilen Kenntnissen über die Bindungsstellen eines Enzyms gelangen kann. Es zeigt aber auch, wie vorsichtig man bei der Beurteilung der Bedeutung von Konformationsänderungen sein muß.

2.3.3. Konformation der Struktur des Lactosamintyps; Vergleich mit der Struktur der Saccharidkette im Immunglobulin

Auch vom Octasaccharid **32** wurde mit den oben beschriebenen NMR- und GESA-Methoden eine Konformationsanalyse durchgeführt (vgl. Abb. 6a)^[64, 65]. Die Pentasaccharidkette mit Verknüpfungen von sekundären Hydroxygruppen des (1 \rightarrow 3)-Armes zeigt die zu erwartende bevorzugte Konformation. Die Seitenkette des (1 \rightarrow 6)-Armes ist wie in **16** zur reduzierenden GlcNAc-Einheit geeignet. Selektive Entschirmungen der Protonen an der reduzierten GlcNAc-Einheit zeigen, daß diese Form in der Tat einen erheblichen Anteil haben sollte.

Die Konformation von **32** kann mit der einer entsprechenden kristallinen Verbindung verglichen werden. Selbstverständlich kristallisiert **32** nicht. Dieses Octasaccharid ist jedoch in einem Immunglobulin enthalten, das von *Huber*^[66] und *Deisenhofer*^[67] kristallisiert wurde und von dem eine Röntgenstrukturanalyse gelungen ist. Abbildung 5 zeigt schematisch das Immunglobulin IgG₁. Der obere Teil ent-

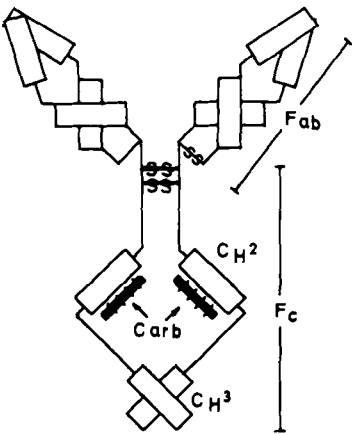


Abb. 5. Schematisches Modell von IgG₁. Carb = Oligosaccharidkette.

hält die leichten Ketten, der untere (Fc-)Teil besteht aus den schweren Ketten, und er enthält zwei einander gegenüberfindliche gleiche Kohlenhydratketten im inneren Teil des Moleküls. Diese beiden Ketten, die *N*-glycosidisch an Asn 297 und Asn 597 gebunden sind, haben die Struktur des komplexen Lactosamintyps. Sie enthalten daher auch die Basisstruktur **32**.

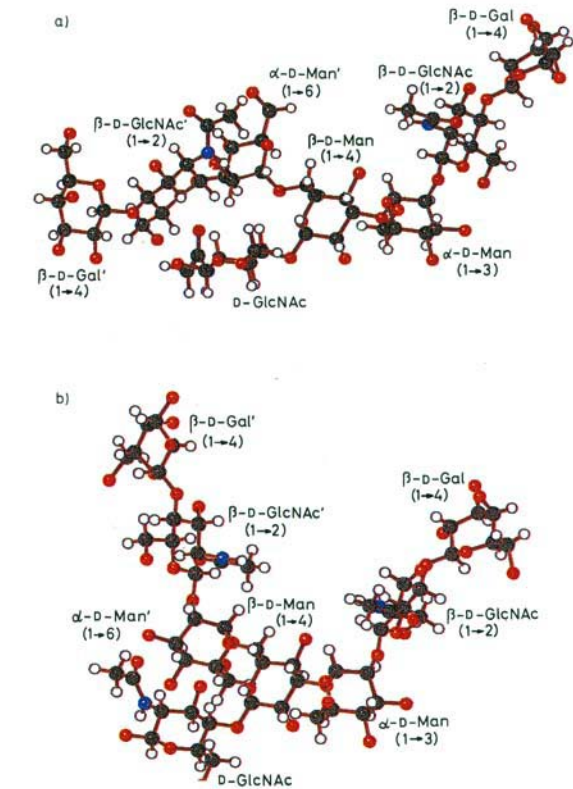


Abb. 6. Konformation des Octasaccharides **32** a) nach den NMR-Daten und GESA-Berechnungen und b) im Kristall des Fc-Fragments von IgG₁.

Es ist *Huber* und *Deisenhofer* gelungen, das abgetrennte Fc-Fragment zu kristallisieren, die Proteinkette aufzuklären und die Kohlenhydratkette bis auf 2.8 Å Ungenauigkeit aufzulösen^[66 – 68]. Diese Auflösung ist bemerkenswert. Sie wurde dadurch gefördert, daß die Kohlenhydratkette im Innenteil des Moleküls weitgehend fixiert ist. Bei anderen Röntgenstrukturanalysen von Glycoproteinen ist in der Regel der Kohlenhydratteil flexibel und kann nur schwierig lokalisiert werden. Die von *Huber* und *Deisenhofer* untersuchte Probe enthielt keine 5-*N*-Acetylneuraminsäure und keine „bisected“-Einheit. Die Asparagin-gebundene GlcNAc-Gruppe enthielt an der 6-OH-Gruppe Fucose als Verzweigungsglied. Alle Saccharideinheiten bis auf die terminale Galactoseeinheit am (1 → 3)-Arm wurden lokalisiert. Diese Einheit ist in den Abbildungen 6 und 7 ergänzt worden. Es sei noch erwähnt, daß der Kohlenhydratteil in den verschiedenen Immunglobulinarten variieren kann und Abweichungen von der hier beschriebenen Struktur möglich sind^[69].

Die Konformation des Octasaccharides **32** im Kristall ist in Abbildung 6 b wiedergegeben. Man erkennt, daß die Konformationen der Pentasaccharidkette mit Verknüpfungen über sekundäre Hydroxygruppen des (1 → 3)-Armes in Lösung und im Kristall durchaus ähnlich sind. Der flexible (1 → 6)-Arm ist jedoch in Lösung völlig anders orientiert als im Kristall. In Tabelle 2 sind die Torsionswinkel ϕ und ψ für beide Konformationen einander gegenübergestellt. Der gravierende Unterschied tritt bei der (1 → 6)-Bindung für den ψ -Wert auf (171° im Kristall, 79° in Lösung). Die anderen Werte bei Verknüpfungen über sekundäre Hydroxygruppen sind einander bemerkenswert ähnlich. Die entsprechenden Teile des Moleküls dürften in Lösung und im Kristall ganz ähnliche Konformationen bevorzugen. Die Abweichung an der reduzierenden GlcNAc-Einheit ist verständlich, da diese im Kristall an einen weiteren GlcNAc-Rest geknüpft ist. Die Variation des (1 → 6)-Armes ist hauptsächlich darin begründet, daß diese Kette des Moleküls auf einer Proteinstruktur liegt. Dies veranlaßte uns, die Anordnung im gesamten Fc-Fragment genauer zu betrachten.

Abbildung 7 a zeigt das gesamte Fc-Fragment in der Anordnung, wie sie sich aus der Röntgenstrukturanalyse ergibt^[45 b, 68]. In der Mitte sind deutlich die beiden Kohlenhydratketten zu erkennen, die von den schweren Proteinketten umrahmt werden. In der linken Hälfte des Moleküls ist ein Teil der Kohlenhydratkette nach vorne angeordnet. Im rechten Teil des Moleküls weist der entsprechende Kohlenhydratstrang nach hinten.

Um die Anordnung zu verdeutlichen, wird in Abbildung 7 b die eine Hälfte des Moleküls wiedergegeben. Die Anknüpfung der Kohlenhydratkette an Asparagin ist ganz oben im Molekül zu sehen, wo auch der aufliegende Fucoseres zu erkennen ist. Die Mannose, die als wichtiges Verzweigungsglied fungiert, liegt im Mittelpunkt der sternförmigen Kohlenhydratkette. Äußerst interessant ist, daß die beiden Lactosaminarme, die vom Verzweigungspunkt ausgehen, ganz unterschiedlich angeordnet sind: Der flexible (1 → 6)-Arm liegt nach links gerichtet direkt auf einer Proteinkette. Der weniger flexible (1 → 3)-Arm zeigt dagegen nach rechts zur Mitte des Gesamtmoleküls. Dieser Arm steht nicht mit Teilen der Proteinkette in Berührung.

Die Abbildungen 7 c, d geben vergrößert die Region wieder, in der sich die Kohlenhydratkette befindet. Abbildung

Tabelle 2. Torsionswinkel [°] der nach NMR-Daten und GESA-Rechnungen bevorzugten Konformation von 32 sowie Konformation von 32 im Kristall des F_c-Fragments von IgG₁.

	β(1 → 4)		(1 → 6)-Lactosaminarm				C5-C6 ω	β(1 → 4)		(1 → 3)-Lactosaminarm				β(1 → 4)	
	φ	ψ	β(1 → 2) φ	ψ	α(1 → 6) φ	ψ		φ	ψ	α(1 → 3) φ	ψ	β(1 → 2) φ	ψ	φ	ψ
NMR/GESA	55	2	47	0	-54	79	38	57	-5	-47	-14	52	23	52	2
Röntgenstruktur	75	-4	51	27	-55	171	68	29	-32	-49	-4	72	28	[a]	

[a] Wegen ungenügender Elektronendichte nicht fixiert.

7c zeigt diese Region ohne Kohlenhydratkette. Hier sind deutlich Phenylringe zu erkennen, die Phenylalanin und Tyrosin zuzuordnen sind. In diesem Abschnitt liegen Phe 241, Phe 243, Val 262, Val 264 und im oberen Teil Tyr 296. Es handelt sich somit um einen hydrophoben Bereich der Proteinkette, in dem sich der flexible (1 → 6)-Arm befindet.

ten Anordnung haben die beiden Lactosaminarme offenbar unterschiedliche Funktionen. Man kann annehmen, daß diese Anordnung zur besonderen Stabilisierung des F_c-Fragments beiträgt, wie sie für Reaktionen des Immunglobulins als Antikörper notwendig ist.

3. O-Glycoproteine

3.1. Basisstrukturen

Auch bei den O-Glycoproteinen kommen stets wiederkehrende Sequenzen als Core-Basisstrukturen vor. Die wichtigsten Sequenzen geben die Formeln 77–81 wieder. In 77 bis 80 ist das Schlüsselement eine α-glycosidisch an die Hydroxygruppe von Serin oder Threonin gebundene Galactosamineinheit. Hieran schließen sich Galactose oder Glucosamingruppen an. Die Typen 77 bis 80 werden als Core-I bis Core-IV bezeichnet. Am wichtigsten ist die Core-I-Struktur 77, die in den Glycoproteinen außerordentlich weit verbreitet ist. Die Core-II-, Core-III- und Core-IV-Strukturen werden besonders in Mucinen und einer Vielzahl schleimiger Sekrete gefunden. In der Struktur 81 ist β-glycosidisch ein Xyloserest an die Hydroxygruppe von Serin gebunden; Galactosereste schließen sich an. Die Sequenz 81 kommt hauptsächlich als Bindungselement zwischen Kohlenhydrat- und Proteinkette in Proteoglycanen und in Hyaluronsäure vor.

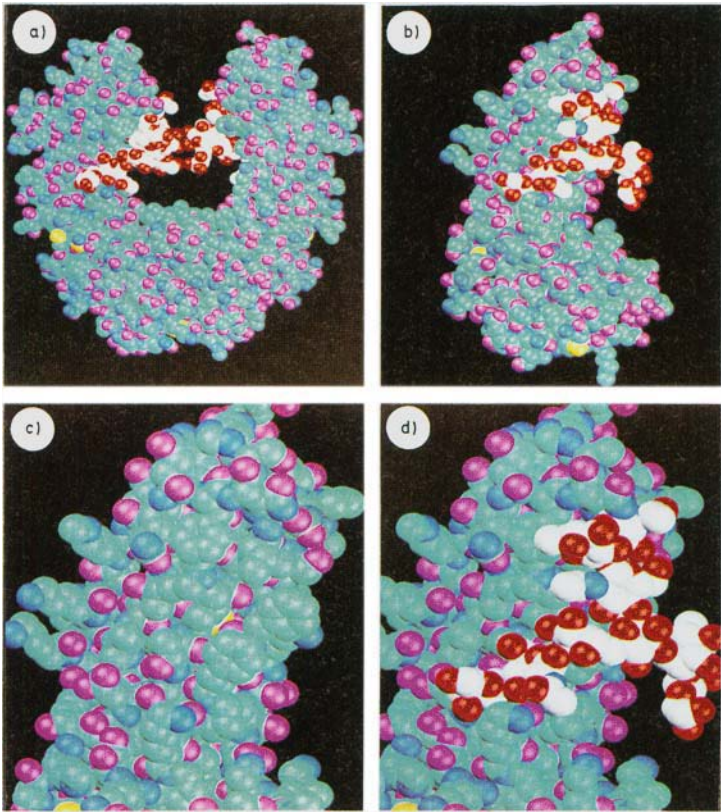
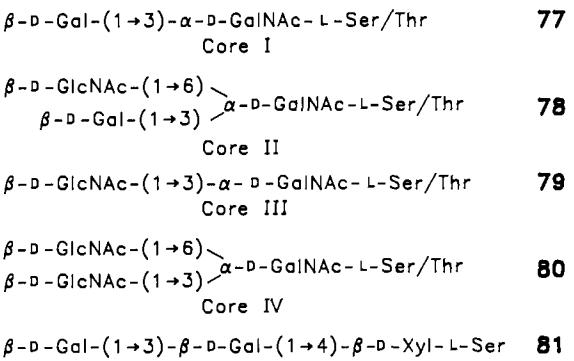


Abb. 7. a) F_c-Fragment von IgG₁ nach der Röntgenstrukturanalyse. b) Eine Hälfte des F_c-Fragments. c) Vergrößerter Ausschnitt des Bereichs der Proteinkette, in dem der Kohlenhydratteil angeordnet ist. Der Kohlenhydratteil wurde hier weggelassen. d) Der gleiche Ausschnitt wie bei 7c, mit Kohlenhydratkette. Kohlenhydratkette: C weiß, O rot, N dunkelblau; Peptidkette: C hellblau, O rosa, N dunkelblau, S gelb.

Dies wird in Abbildung 7d deutlich: Der flexible Kohlenhydrat-(1 → 6)-Arm unten links liegt auf einem hydrophoben Abschnitt der Proteinkette, und ihm dürften mehr hydrophobe Eigenschaften zukommen. Der (1 → 3)-Arm rechts unten zeigt unbeeinflusst in die Mitte des Moleküls. Ihm dürften mehr hydrophile Eigenschaften zuzuordnen sein. Es sei erwähnt, daß dieser Arm keinen Kontakt zu dem anderen (1 → 3)-Arm hat, der von der anderen Hälfte des Moleküls nach innen weist. Im oberen Teil befindet sich die Chitobiose mit daraufgesetzter Fucose. In dieser interessan-

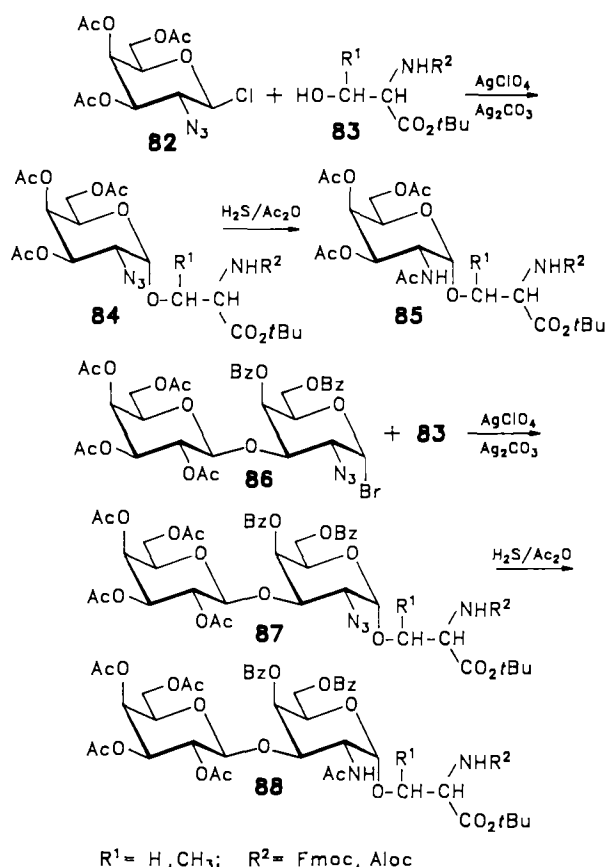
Die Biosynthese der O-Glycoproteine unterscheidet sich grundsätzlich von der oben diskutierten Biosynthese der N-Glycoproteine^[9]. Bei den O-Glycoproteinen wird durch eine spezifische GalNAc-Transferase im Primärschritt ein aktivierter GalNAc-Rest auf eine Hydroxygruppe von Serin oder Threonin übertragen. Bisher ist nicht bekannt, wie dieser Prozeß gesteuert wird und ob es hierfür Signalsequenzen gibt. Vermutlich spielt eine Prolineinheit bei der Übertragung eine Rolle. Die weiteren Kohlenhydratreste werden dann stufenweise jeweils mit entsprechenden spezifischen

Glycosyltransferasen an die GalNAc-Einheit gekuppelt. Es werden also hier nicht wie bei den *N*-Glycoproteinen größere Oligosaccharidreste auf die Peptidkette übertragen, sondern die Synthese verläuft stufenweise an der Peptidkette.

3.2. Synthese von *O*-Glycopeptiden

Zahlreiche Untersuchungen sind durchgeführt worden, um insbesondere Glycopeptide vom Typ der Core-I-Struktur zu synthetisieren^[44, 70]. Das Problem liegt darin, daß eine α -glycosidische Verknüpfung ohne Nachbargruppenbeteiligung mit der Hydroxyaminosäure durchgeführt werden muß. Dieses gelingt mit Derivaten von Galactosamin nicht. Die Halogenide der 2-Azido-2-desoxy-D-galactose sind für diese Reaktion ausgezeichnete Glycosyldonoren^[72–75].

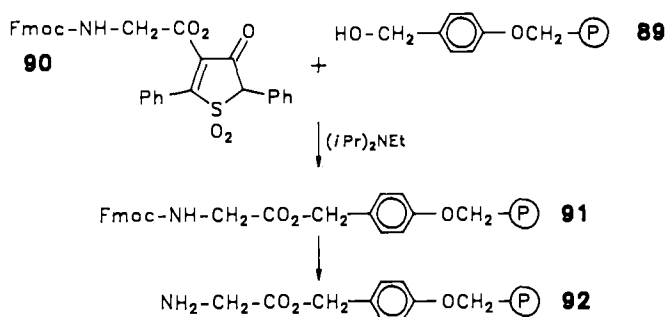
So ergibt der Donor **82**^[71] mit dem Aminosäurederivat **83** in guter Stereoselektivität und guter Ausbeute die Glycosylaminosäure **84**^[76, 77]. Durch Reduktion der Azidgruppe und anschließende Acetylierung erhält man das gewünschte Produkt **85**. In gleicher Weise läßt sich das Disaccharid **86**^[72] in einer Blocksynthese mit der Aminosäure **83** zu **87** umsetzen, aus dem der Syntheseblock **88** gewonnen werden kann^[76, 77].



Im Aminosäureteil der Verbindungen ist eine Blockierung zu wählen, die eine selektive Entblockierung ermöglicht. Von den zahlreichen untersuchten Blockierungsmöglichkeiten^[44, 70] haben sich die Kombinationen (9-Fluorenyl)methoxycarbonyl (Fmoc)/*t*Bu und Allyloxycarbonyl (Aloc)/*t*Bu am besten bewährt. Beide Kombinationen lassen sich selektiv *N*-terminal und *C*-terminal entblockieren. Mit nor-

malen Peptidverknüpfungsmethoden können dann sowohl am *N*- als auch am *C*-Terminus beliebige weitere Aminosäuren oder Glycosylaminosäuren angeknüpft werden. Die genannten Bausteine **85** und **88** können somit an beliebiger Stelle in eine Peptidkette eingefügt werden, wenn dort eine glycosylierte Serin- oder Threonineinheit an bestimmten Stellen gewünscht wird. Nach Entblockierung der Peptidschutzgruppe werden die Acylgruppen des Zuckerteils unter genau kontrollierten Bedingungen abgespalten. Hierbei tritt keine β -Eliminierung oder Racemisierung im Peptidteil auf.

Die *O*-Glycopeptidsynthese kann auch als Festphasensynthese durchgeführt werden^[78, 79]. Hierfür ist neben anderen Harzen das Wang-Harz geeignet^[79], das die Ankergruppierung **89** enthält. Als Thiophendioxid(TDO)-Ester **90** wird zunächst die erste Aminosäure zu **91** angeknüpft^[80]. Nach Freisetzung der Aminogruppe zu **92** können dann die partiell



entblockierten Bausteine der Glycosylaminosäuren **85** oder **88** sowie jede weitere Aminosäure zum Aufbau der Peptidkette verwendet werden. Ein Beispiel für eine derartige *O*-Glycopeptidsynthese zeigt das Reaktionsschema in Abbildung 8^[81]. Das fertiggestellte Glycopeptid kann mit Trifluoressigsäure vom festen Träger ohne Gefährdung des Kohlenhydratteils zu **93** abgespalten werden. Die Entblockierung des Peptidteils und des Zuckerteils ergibt dann das freie Glycopeptid **94**. Dieses Beispiel zeigt, daß auch Glycopeptide mit komplexen Aminosäuren wie Arginin am festen Träger zu synthetisieren sind.

Außer einer Reihe von *O*-Glycopeptiden vom Core-I-Typ wurde auch Verbindung **78** vom Core-II-Typ synthetisiert^[82, 83]. Von der Xylose-haltigen Verbindung **81** ist sowohl das Fragment β -D-Gal(1 \rightarrow 4)- β -D-Xyl-L-Ser^[84] als auch die gesamte Kette von **81** synthetisiert worden^[85] (Zusammenfassungen: ^[44, 70]).

3.3. Konformationsanalyse von *O*-Glycopeptiden

Die Untersuchungen über die Konformation von *O*-Glycopeptiden konzentrierten sich besonders auf die Molekülanordnung im Bereich der Verknüpfung vom Kohlenhydratrest mit der Peptidkette. Die Peptidkette ist in jedem Fall äußerst flexibel. Im Bereich der Anknüpfung des Kohlenhydratrestes sind jedoch bevorzugte Anordnungen zu erwarten. Es ergibt sich auch die Frage, ob die Peptidkette durch Anknüpfung des Kohlenhydratrestes wesentlich beeinflusst wird.

Eingehende Untersuchungen wurden mit den Glycopeptiden **95** bis **98** durchgeführt^[86], Segmenten des *N*-Terminus

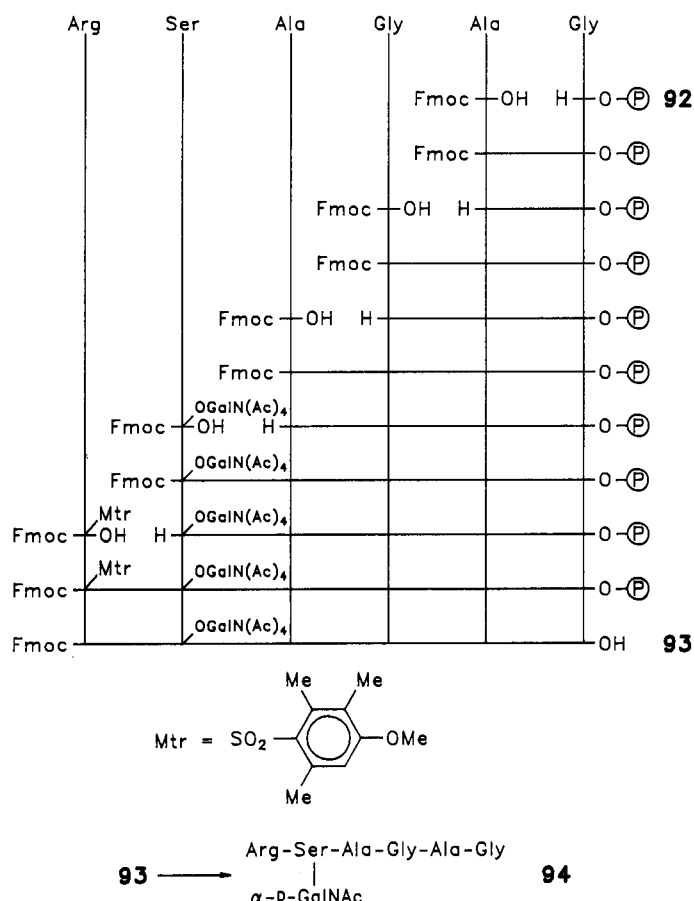


Abb. 8. Beispiel einer Glycopeptidsynthese an einer Festphase (Wang-Harz). Synthese von Arg-Ser[α -D-GalNAc]-Ala-Gly-Ala-Gly 94.

von Interleukin-2. In Interleukin-2 ist Ala *N*-terminal angeordnet. Thr-3 trägt eine Kohlenhydratkette vom Core-I-Typ, die mit 5-*N*-Acetylneuraminsäureresten besetzt ist. Das Gesamtmolekül besteht aus 133 Aminosäuren. Mit den oben genannten Methoden wurden die *N*-terminalen Strukturen 95 bis 98 synthetisiert, wobei die Peptidkette zum C-Terminus sukzessiv um eine oder mehrere Einheiten verlängert wurde^[76]. Hiermit sollte geprüft werden, ob eine Verlängerung der Peptidkette die Konformation am Anknüpfungspunkt des Zuckerrestes wesentlich beeinflusst.

Ala-Pro-Thr-Ser α -D-GalNAc	95
Ala-Pro-Thr-Ser-Ser α -D-GalNAc	96
Ala-Pro-Thr-Ser-Ser-Ser α -D-GalNAc	97
Ala-Pro-Thr-(Ser) ₃ -Thr-(Lys) ₂ -Thr α -D-GalNAc	98
Ala-Ser-Gly-Ile β -D-Xyl	99

Die Konformationsanalyse wurde wie oben beschrieben NMR-spektroskopisch durchgeführt. Nach Zuordnung aller Protonen mit verschiedenen Korrelationsmethoden wurden Kopplungskonstanten und NOE-Effekte durch NOE-, NOESY- und ROESY-Experimente bestimmt^[46]. Die Was-

serstoffbrückenbindungen ergaben sich aus der Temperaturabhängigkeit der chemischen Verschiebungen. Die Relationszeiten lieferten Auskunft über die Beweglichkeit der Atome. Die Auswertung aller Daten ergibt ein in sich geschlossenes Bild, das zeigt, daß um die Verknüpfungsstelle bevorzugte Konformationen in erheblichen Anteilen vorliegen^[86].

Von den Molekülen wurden ferner Energieberechnungen mit dem Programm AMBER^[49] durchgeführt, das vorher auf seine Anwendbarkeit geprüft wurde. Es zeigte sich, daß AMBER für die Berechnung von Peptidketten mit zumindest einer Saccharideinheit geeignet ist. Die für 95 berechnete Minimumkonformation ist in Abbildung 9a wiedergegeben. Es zeigt sich, daß diese Konformation sehr gut mit den gefundenen NMR-Daten, insbesondere den Kopplungskonstanten und NOE-Effekten, vereinbar ist. In Abbildung 9a sind zwischen den Protonen, zwischen denen NOE-Effekte gefunden wurden, Pfeile eingezeichnet. Die angegebenen Zahlen sind die berechneten Entfernungen in Å, wie sie sich aus der AMBER-Berechnung ergeben. Es ist erkennbar, daß bei den angegebenen Entfernungen NOE-Effekte zu erwarten sind.

Die Anordnung von GalNAc zum Threonin wird im wesentlichen durch den *exo*-anomeren Effekt der glycosidischen Bindung bestimmt. Sterische Einflüsse dürften dagegen die Orientierung der Peptidkette zum Zuckerrest beeinflussen. Diese Orientierung ist durch Kopplungskonstanten und NOE-Effekte, z. B. zwischen der Methylgruppe des Acetylrests von GalNAc und dem Serin, nachweisbar. Man findet somit deutlich bevorzugte Anordnungen zwischen der

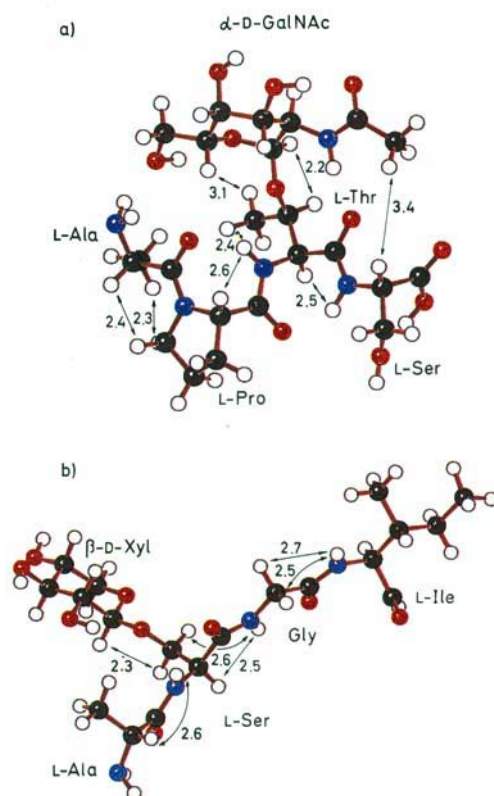


Abb. 9. Bevorzugte Konformation von *O*-Glycopeptiden nach NMR-Daten und Berechnungen mit AMBER. Die Pfeile zeigen die Protonen an, zwischen denen NOE-Effekte gefunden werden, die für die Beurteilung der Konformationen von Bedeutung sind. Die Zahlen bedeuten Entfernungen in Å nach der Berechnung. a) Bevorzugte Konformation von Ala-Pro-Thr[α -D-GalNAc]-Ser 95. b) Bevorzugte Konformation von Ala-Ser[β -D-Xyl]-Gly-Ile 99.

Peptidkette und dem Saccharidrest. Interessant ist jetzt ein Vergleich mit den Verbindungen **96**, **97** und **98**. Es zeigt sich, daß die in Abbildung 9a angegebene Grundanordnung für **95** bei den Kettenverlängerungen zu **96**, **97** und **98** in nahezu unveränderter Form erhalten bleibt. Eine Verlängerung der Peptidkette zum C-Terminus beeinflußt somit kaum die bevorzugte Konformation um den Verknüpfungspunkt zwischen Saccharidrest und Peptidkette^[86].

Es sei erwähnt, daß von Bush et al.^[87] eine Konformationsanalyse von dem Gefrierprotein, das als Gefrierschutz im Blut von antarktischen Tiefseefischen vorkommt, gemacht wurde. Das Gefrierprotein ist ein Homopolymer der Peptideinheit (L-Ala-L-Thr-L-Ala)_n, in dem jede Hydroxygruppe des Threonins mit dem Disaccharid der Core-I-Struktur glycosyliert ist. Die von Bush et al. ermittelte bevorzugte Konformation steht mit der für **95** ermittelten in recht guter Übereinstimmung. Es liegt bisher nur eine Röntgenstrukturanalyse von einer Glycosylaminosäure vor; dabei handelt es sich um die seltene Struktur α -D-Man(1 \rightarrow O)-L-Thr, die in Bakterien vorkommt^[88]. Auch die Anordnung in dieser Struktur zeigt mit der durch AMBER berechneten Minimumkonformation von **95** (Abb. 9a) eine recht gute Übereinstimmung^[86].

Auch mit O-Glycopeptiden, die Xylose und Serin als Verknüpfungsglied enthalten, wurden Konformationsanalysen ausgeführt^[89]. Diese Anordnung ist flexibler, wie schon die NMR-Daten der einfachen Verbindung β -D-Xyl-(1 \rightarrow O)-L-Ser zeigen. Als Beispiel sei das Tetra-O-Peptid **99** genannt, eine Sequenz aus dem Proteodermatansulfat aus Rinderhaut. Die Synthese erfolgte durch direkte Glycosylierung des an den Endgruppen geschützten Tetrapeptids mit β -D-Xylosetetraacetat nach dem Trimethylsilyl-Triflat-Verfahren^[90]. Die Konformation wurde wie bei **95** durch Auswertung aller zugänglichen NMR-Daten und einer Energieberechnung mit dem Programm AMBER bestimmt.

Das Ergebnis ist in Abbildung 9b wiedergegeben^[89]. Auch hier geben die Pfeile die Protonen an, zwischen denen NOE-Effekte gefunden werden. Die Zahlen entsprechen der Entfernung in Å. Der *exo*-anomere Effekt ist hier gleichfalls bestimmend. Weiterhin dürften auch hier sterische Wechselwirkungen von Bedeutung sein. Die NMR-Messungen und Energieberechnungen zeigen deutlich, daß auch bei Strukturen wie **99** bevorzugte Konformationen vorliegen, in denen eine bestimmte Anordnung der Peptidkette zum Saccharidrest eingenommen wird.

Dieser Überblick enthält zu weiten Teilen Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe. Ich bin einer großen Zahl tüchtiger Mitarbeiter für ihren unermüdlichen Einsatz und ihr Durchhaltevermögen zu Dank verpflichtet. An den synthetischen Arbeiten waren zur Hauptsache beteiligt: K. Adermann, M. Heume, R. Lebuhn, G. Merz, H. Nürnberger, T. Peters, M. Raatz, H. Tietz. Alle Konformationsanalysen der N-Proteinstrukturen wurden von Dr. T. Peters und Dr. V. Sinnwell, die der O-Proteinstrukturen von Frau Dr. A. Pollex-Krüger durchgeführt. Besonders danke ich Dr. B. Meyer (Athens) für die Überlassung des GESA-Programms und weitere Rechnungen. Ihm verdanke ich auch die Abbildungen der Kristallstruktur des F_c-Fragments, die an der Universität Georgia (Complex Carbohydrate Research Center, Prof. P. Albersheim) erstellt wurden. Professor R. Huber (München) danke ich für die Überlassung der Daten der Kristallstruktur des F_c-Fragments. Professor J. Deisenhofer (Dallas) stellte freundlicherweise die korrigierten und ver-

feinerten Daten des Kohlenhydrateiles der Kristallstruktur zur Verfügung, die er in Zusammenarbeit mit Dr. B. Meyer ermittelt hatte. Für die Überlassung der Programme MACROMODEL und AMBER danke ich Professor C. W. Still (New York) und Professor P. Kollman (San Francisco). Die Deutsche Forschungsgemeinschaft hat dankenswerterweise über viele Jahre unsere Arbeit wirkungsvoll gefördert.

Eingegangen am 12. Februar 1990 [A 775]

- [1] J. Montreuil, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **37** (1980) 157.
- [2] A. Kobata in V. Ginsburg (Hrsg.): *Biology of Carbohydrates*, Wiley, New York 1984.
- [3] A. Gottschalk (Hrsg.): *Glycoproteins*, Elsevier, Amsterdam 1972.
- [4] M. J. Horowitz, W. Pigman (Hrsg.): *The Glycoconjugates, Vol. I-IV*, Academic Press, New York 1977-1982.
- [5] N. Sharon, H. Lis, *Chem. Eng. News* **58** (1981) 21.
- [6] T. W. Rademacher, R. B. Parekh, R. A. Dwek, *Annu. Rev. Biochem.* **57** (1988) 785.
- [7] E. J. Goldstein (Hrsg.): *Carbohydrate Protein Interaction, ACS Symp. Ser.* **88** (1979).
- [8] T. Feizi, *Nature (London)* **314** (1985) 53; *Biochem. J.* **245** (1987) 1.
- [9] H. Schachter, *Can. J. Biochem. Cell Biol.* **64** (1986) 163.
- [10] R. Kornfeld, S. Kornfeld, *Annu. Rev. Biochem.* **54** (1985) 631.
- [11] H. Paulsen, *Angew. Chem.* **94** (1982) 184, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **21** (1982) 155.
- [12] R. R. Schmidt, *Angew. Chem.* **98** (1986) 213, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **25** (1986) 212.
- [13] a) P. Fügedi, P. J. Garegg, H. Lönn, T. Norberg, *Glycoconjugate J.* **4** (1987) 97; F. Dasgupta, P. J. Garegg, *Carbohydr. Res.* **177** (1988) C 13; b) C. Murakata, T. Ogawa, *Tetrahedron Lett.* **31** (1990) 2439.
- [14] H. Paulsen, O. Lockhoff, *Chem. Ber.* **114** (1981) 3102.
- [15] M. A. E. Shaban, R. W. Jeanloz, *Carbohydr. Res.* **52** (1976) 115.
- [16] C. D. Warren, C. Augé, M. L. Laver, S. Suzuki, D. Power, R. W. Jeanloz, *Carbohydr. Res.* **82** (1980) 71; C. Augé, C. D. Warren, R. W. Jeanloz, M. Kiso, L. Anderson, *ibid.* **82** (1980) 85.
- [17] H. Kunz, W. Günther, *Angew. Chem.* **100** (1988) 1118; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **27** (1988) 1086.
- [18] H. Paulsen, R. Lebuhn, O. Lockhoff, *Carbohydr. Res.* **103** (1982) C7.
- [19] H. Paulsen, R. Lebuhn, *Liebigs Ann. Chem.* **1983**, 1047.
- [20] H. Paulsen, R. Lebuhn, *Carbohydr. Res.* **130** (1984) 85.
- [21] T. Ogawa, T. Kitajima, T. Nukada, *Carbohydr. Res.* **123** (1983) C5.
- [22] C. A. A. van Boeckel, T. Beetz, S. F. van Aelst, *Tetrahedron* **40** (1984) 4097; C. A. A. van Boeckel, T. Beetz, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **104** (1985) 171, 174.
- [23] F. Yamazaki, T. Kukuda, Y. Ito, S. Sato, T. Ogawa, *Tetrahedron Lett.* **30** (1989) 4417.
- [24] J. Arnarp, J. Lönngren, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1980**, 1000; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1981**, 2070.
- [25] H. Paulsen, R. Lebuhn, *Angew. Chem.* **94** (1982) 933; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **21** (1982) 926.
- [26] H. Paulsen, R. Lebuhn, *Carbohydr. Res.* **125** (1984) 21.
- [27] T. Ogawa, T. Kitajima, T. Nukada, *Carbohydr. Res.* **123** (1983) C5, C7.
- [28] T. Ogawa, H. Yamamoto, T. Nukada, T. Kitajima, M. Mamoro, *Pure Appl. Chem.* **56** (1984) 779.
- [29] H. Paulsen, H. Tietz, *Angew. Chem.* **97** (1985) 118; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **24** (1985) 128; *Carbohydr. Res.* **125** (1984) 47.
- [30] H. Paulsen, H. Tietz, *Angew. Chem.* **94** (1982) 934; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **21** (1982) 927; *Carbohydr. Res.* **144** (1985) 205.
- [31] T. Kitajima, M. Sugimoto, T. Nukada, T. Ogawa, *Carbohydr. Res.* **127** (1984) C1.
- [32] T. Ogawa, M. Sugimoto, T. Kitajima, K. K. Sadozai, T. Nukada, *Tetrahedron Lett.* **27** (1986) 5739.
- [33] K. Okamoto, T. Kondo, T. Goto, *Tetrahedron Lett.* **27** (1986) 5229, 5233.
- [34] Y. Itoh, T. Ogawa, *Tetrahedron Lett.* **28** (1987) 6221.
- [35] a) T. Murase, H. Ishida, M. Kiso, A. Hasegawa, *Carbohydr. Res.* **184** (1988) C1; b) R. L. Thomas, A. K. Sakar, K. Kohata, S. A. Abbas, K. L. Matta, *Tetrahedron Lett.* **31** (1990) 2825.
- [36] H. Paulsen, M. Heume, Z. Györgydeak, R. Lebuhn, *Carbohydr. Res.* **144** (1985) 57.
- [37] H. Paulsen, M. Heume, H. Nürnberger, *Carbohydr. Res.* **200** (1990) 127.
- [38] F. Yamazaki, T. Nukada, Y. Itoh, S. Sato, T. Ogawa, *Tetrahedron Lett.* **30** (1989) 4417.
- [39] T. Ogawa, T. Nukada, T. Kitajima, *Carbohydr. Res.* **123** (1983) C12.
- [40] T. Ogawa, T. Nukada, *Carbohydr. Res.* **136** (1985) 135.
- [41] H. G. Garg, R. W. Jeanloz, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **43** (1985) 135.
- [42] H. G. Garg, R. W. Jeanloz, *J. Org. Chem.* **41** (1976) 2480; *Carbohydr. Res.* **70** (1979) 47; *ibid.* **76** (1979) 85; *ibid.* **86** (1980) 68.

- [43] M. Spinola, R. W. Jeanloz, *J. Biol. Chem.* 245 (1970) 4158.
- [44] H. Kunz, *Angew. Chem.* 99 (1987) 297; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 26 (1987) 294.
- [45] a) H. Kunz, C. Unverzagt, *Angew. Chem.* 100 (1988) 1763; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 27 (1988) 1697; b) B. Meyer in J. Thiem (Hrsg.): *Top. Curr. Chem.* 154, *Carbohydrate Chemistry*, Springer, Berlin 1990.
- [46] H. Kessler, M. Gehrke, C. Griesinger, *Angew. Chem.* 100 (1988) 507; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 27 (1988) 490.
- [47] J. S. Yadav, P. Luger, *Carbohydr. Res.* 119 (1983) 57.
- [48] G. A. Jeffrey, R. Tailor, *J. Comput. Chem.* 1 (1980) 99; K. Rasmussen, *Acta Chem. Scand. Ser. A* 36 (1982) 323.
- [49] S. J. Weiner, P. Kollman, D. A. Case, U. S. Singh, C. Yhio, G. Alagona, S. Profeta, P. Weiner, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 765.
- [50] S. N. Ha, A. Giammona, M. Field, J. W. Brady, *Carbohydr. Res.* 180 (1988) 207.
- [51] H. Thøgersen, R. U. Lemieux, K. Bock, B. Meyer, *Can. J. Chem.* 60 (1982) 44.
- [52] A. J. Kitaigorodsky, *Chem. Soc. Rev.* 7 (1978) 133.
- [53] R. Fletcher, M. J. D. Powell, *Comput. J.* 6 (1963) 163.
- [54] D. A. Cummings, J. Carver, *Biochemistry* 26 (1987) 6664.
- [55] D. A. Cummings, J. Carver, *Biochemistry* 26 (1987) 6676.
- [56] S. W. Homans, R. A. Dwek, J. Boyd, M. Mahmoudian, W. G. Richards, T. W. Rademacher, *Biochemistry* 25 (1986) 6342.
- [57] H. Paulsen, T. Peters, V. Sinnwell, R. Lebuhn, B. Meyer, *Liebigs Ann. Chem.* 1984, 951.
- [58] H. Paulsen, T. Peters, V. Sinnwell, M. Heume, B. Meyer, *Carbohydr. Res.* 156 (1986) 87.
- [59] V. Varin, F. Baert, F. Fouret, G. Strecker, G. Spik, B. Fournet, J. Montreuil, *Carbohydr. Res.* 76 (1979) 11.
- [60] G. J. Veller, H. Paulsen, H. Schachter, *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 62 (1984) 409.
- [61] H. Paulsen, T. Peters, *Carbohydr. Res.* 165 (1987) 229.
- [62] Y. Nishikawa, W. Pegg, H. Paulsen, H. Schachter, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 8270.
- [63] H. Paulsen, T. Peters, V. Sinnwell, B. Meyer, *Carbohydr. Res.* 165 (1987) 251.
- [64] H. Paulsen, T. Peters, V. Sinnwell, R. Lebuhn, B. Meyer, *Liebigs Ann. Chem.* 1985, 489.
- [65] S. W. Homans, S. W. Dwek, R. A. Rademacher, *Biochemistry* 26 (1987) 6571.
- [66] R. Huber, *Klin. Wochenschr.* 58 (1980) 1217.
- [67] J. Deisenhofer, *Biochemistry* 20 (1981) 2361.
- [68] B. Meyer, J. Deisenhofer, R. Huber, H. Paulsen, T. Peters, *Biochemistry*, im Druck.
- [69] D. Burton, *Mol. Immunol.* 22 (1985) 161.
- [70] H. Paulsen, K. Adermann, G. Merz, M. Schultz, U. Weichert, *Starch/Stärke* 40 (1988) 465.
- [71] H. Paulsen, J. P. Hölck, *Carbohydr. Res.* 109 (1982) 89.
- [72] H. Paulsen, M. Paal, *Carbohydr. Res.* 135 (1984) 71.
- [73] P. Schultheisz-Reimann, H. Kunz, *Angew. Chem.* 95 (1983) 64; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 22 (1983) 62.
- [74] B. Ferrari, A. A. Pavia, *Tetrahedron* 41 (1985) 1939.
- [75] H. Paulsen, M. Schultz, *Liebigs Ann. Chem.* 1986, 1435.
- [76] H. Paulsen, K. Adermann, *Liebigs Ann. Chem.* 1989, 751.
- [77] H. Paulsen, G. Merz, I. Brockhausen, *Liebigs Ann. Chem.*, im Druck.
- [78] H. Kunz, W. Günther, *Angew. Chem.* 100 (1988) 1118; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 27 (1988) 1086.
- [79] H. Paulsen, G. Merz, U. Weichert, *Angew. Chem.* 100 (1988) 1425; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 27 (1988) 1365.
- [80] R. Kirstgen, A. Olbrich, H. Rehwinkel, W. Steglich, *Liebigs Ann. Chem.* 1988, 437.
- [81] H. Paulsen, U. Weichert, G. Merz, S. Peters, *Liebigs Ann. Chem.*, im Druck.
- [82] H. Paulsen, W. Rauwald, U. Weichert, *Liebigs Ann. Chem.* 1988, 75.
- [83] W. Kinzy, R. R. Schmidt, *Carbohydr. Res.* 166 (1987) 265.
- [84] B. Erbing, B. Lindberg, T. Norberg, *Acta Chem. Scand. Ser. B* 32 (1978) 308.
- [85] P. J. Garegg, B. Lindberg, T. Norberg, *Acta Chem. Scand. Ser. B* 33 (1979) 449.
- [86] A. Pollex-Krüger, *Dissertation*, Universität Hamburg 1989.
- [87] C. A. Bush, R. E. Feeney, *Int. J. Protein Res.* 26 (1986) 386; B. N. N. Rao, C. A. Bush, *Biopolymers* 26 (1987) 1227.
- [88] N. Darbon, Y. Oddon, J. M. Lacombe, A. A. Pavia, *Carbohydr. Res.* 130 (1984) 55.
- [89] H. Paulsen, R. Busch, A. Pollex-Krüger, V. Sinnwell, unveröffentlicht.
- [90] H. Paulsen, M. Brenken, *Liebigs Ann. Chem.* 1988, 649.