

- [1] a) D. J. Cram, *Science* 219 (1983) 1177; b) F. Vögtle, E. Weber: *Host-Guest Complex Chemistry/Macrocycles*, Springer, Berlin 1985; c) L. F. Lindoy: *The Chemistry of Macrocyclic Ligands*, Cambridge University Press, Cambridge 1989.
- [2] a) M. Newcomb, J. H. Horner, M. T. Blanda, P. J. Squattrito, *J. Am. Chem. Soc.* 111 (1989) 6294; b) M. Newcomb, M. T. Blanda, *Tetrahedron Lett.* 29 (1988) 4261; c) M. Newcomb, A. M. Madonik, M. T. Blanda, J. K. Judice, *Organometallics* 6 (1987) 145; d) K. Jurkschat, H. G. Kuivila, S. Liu, J. A. Zubieta, *ibid.* 8 (1989) 2755; e) K. Jurkschat, A. Rühlemann, A. Tzschach, *J. Organomet. Chem.* 381 (1990) C53.
- [3] a) J. D. Wuest, B. Zacharie, *Organometallics* 4 (1985) 410; b) A. L. Beauchamp, M. J. Olivier, J. D. Wuest, B. Zacharie, *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 73; c) J. D. Wuest, B. Zacharie, *ibid.* 107 (1985) 6121; d) *ibid.* 109 (1987) 4714; e) F. Nadeau, M. Simard, J. D. Wuest, *Organometallics* 9 (1990) 1311.
- [4] M. E. Jung, H. Xia, *Tetrahedron Lett.* 29 (1988) 297.
- [5] a) H. E. Katz, *Organometallics* 6 (1987) 1134; b) *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 7640; c) *ibid.* 107 (1985) 1420; d) *J. Org. Chem.* 54 (1989) 2179; e) Anmerkung der Redaktion: Reetz et al. berichten in zwei Zuschriften in diesem Heft über neueste Ergebnisse mit Bor-haltigen Wirtmolekülen: M. T. Reetz, C. M. Niemeyer, K. Harms, *Angew. Chem.* 103 (1991) 1515; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 30 (1991) Nr. 11; *ibid.* 103 (1991) 1517 bzw. 30 (1991) Nr. 11.
- [6] a) J. Rebek, Jr., *Science* 235 (1987) 1478; b) J. Hine, S.-M. Linden, V. M. Kanagasabapathy, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 1082.
- [7] R. N. Grimes: *Carboranes*, Academic Press, New York 1970, S. 66.
- [8] Kristallographische Daten für I-CILi:  $C_{10}H_{40}B_{10}Hg_4ClLi$ , tetragonal, Raumgruppe  $P4/mcc$ ,  $a = 14.3233(8)$ ,  $c = 11.2641(7)$  Å,  $V = 2311$  Å<sup>3</sup>,  $Z = 2$  (1/8 des Tetramers pro asymmetrische Einheit),  $\rho_{\text{ber}} = 2.03$  g cm<sup>-3</sup>,  $\mu(\text{MoK}\alpha) = 2.03$  cm<sup>-1</sup>,  $T = 25^\circ\text{C}$ . Die Datensammlung erfolgte auf einem Huber-Diffraktometer unter Verwendung von  $\text{MoK}\alpha$ -Strahlung bis zu einem  $2\theta$ -Wert von  $60^\circ$ , wobei 1608 unabhängige Reflexe aufgezeichnet wurden. Die Struktur wurde mit Schweratommethoden gelöst;  $R = 0.041$  und  $R_w = 0.060$  für 1207 symmetrieunabhängige Reflexe mit  $I > 3\sigma$ . Weitere Einzelheiten zur Kristallstrukturuntersuchung können beim Fachinformationszentrum Karlsruhe, Gesellschaft für wissenschaftlich-technische Information mbH, W-7514 Eggenstein-Leopoldshafen 2, unter Angabe der Hinterlegungsnummer CSD-55584, der Autoren und des Zeitschriftenzitats angefordert werden.
- [9] J. L. Wardell in G. Wilkinson, F. G. A. Stone, E. W. Abel (Hrsg.): *Comprehensive Organometallic Chemistry*, Vol. 2, Pergamon, Oxford, S. 863-978.
- [10] D. S. Brown, A. G. Massey, D. A. Wickens, *Acta Crystallogr. B* 34 (1978) 1695.
- [11] C. M. Woodard, G. Hughes, A. G. Massey, *J. Organomet. Chem.* 112 (1976) 9.
- [12] D. S. Brown, A. G. Massey, D. A. Wickens, *Inorg. Chim. Acta* 44 (1980) L193.
- [13] M. DeSousa Healy, A. J. Rest, *Adv. Inorg. Chem. Radiochem.* 21 (1978) 1.
- [14] H. L. Anderson, J. K. M. Sanders, *Angew. Chem.* 102 (1990) 1478; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 29 (1990) 1400.
- [15] C. A. Salata, M.-T. Youinou, C. J. Burrows, *J. Am. Chem. Soc.* 111 (1989) 9278.
- [16] Zur Bildung von Komplexen aus Anionen und anorganischen Wirtverbindungen siehe: A. Müller, M. Penk, R. Rohlfing, E. Krickemeyer, J. Dörring, *Angew. Chem.* 102 (1990) 927; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 29 (1990) 926; vgl. auch die Diskussion: P. C. H. Mitchell, *Nature* 348 (1990) 15; A. Müller, *ibid.* 352 (1991) 115; V. W. Day, W. G. Klempner, O. M. Yaghi, *ibid.* 352 (1991) 115; P. C. H. Mitchell, *ibid.* 352 (1991) 116.
- [17] Das cyclische Trimer  $[(C_6H_4Hg)_3]$  ist bemerkenswerterweise nicht in der Lage, Anionen zu binden. Vgl. auch Lit. [11] und die dort angeführten Literaturzitate.
- [18] D. J. Cram, *Angew. Chem.* 98 (1986) 1041; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 25 (1986) 1039.
- [19] M. A. Sen, N. K. Wilson, P. D. Ellis, J. D. Odom, *J. Magn. Reson.* 19 (1975) 323.

## Chemoenzymatische Synthesen von Sialyloligosacchariden mit immobilisierter Sialidase\*\*

Von Joachim Thiem\* und Bernd Sauerbrey

Sialylierte Oligosaccharide sind als Bestandteile von Glycoproteinen und -lipiden an zahlreichen biologischen Pro-

[\*] Prof. Dr. J. Thiem, Dipl.-Chem. B. Sauerbrey  
Institut für Organische Chemie der Universität  
Martin-Luther-King-Platz 6, W-2000 Hamburg 13

[\*\*] Diese Arbeit wurde vom Fonds der Chemischen Industrie und dem Bundesministerium für Forschung und Technologie gefördert.

zessen beteiligt<sup>[1a, b]</sup>. Sie haben essentielle Funktionen als terminale Komponenten in Zellrezeptoren<sup>[1c, d]</sup> zur spezifischen Anbindung von Viren, Blutgruppen- und Tumor-erkennenden Antikörpern, bakteriellen Toxinen sowie einer Vielzahl von Lectinen<sup>[1a, e, f]</sup>. Um diese Erkennungsphänomene auf molekularer Ebene zu verstehen, sind Untersuchungen mit entsprechenden Vergleichssubstanzen notwendig, deren Synthesen auf klassisch-chemischen Wegen zwar möglich, aber häufig noch stufenreich und kompliziert sind<sup>[2]</sup>. Der chemoenzymatische Zugang mit Sialyl-Transferasen ist bereits zu einem präparativen Verfahren ausgearbeitet worden<sup>[3]</sup>. Die Isolierung dieser Enzyme ist allerdings aufwendig, da insbesondere die (2-3)-Sialyl-Transferasen in tierischen Geweben nur in sehr geringer Konzentration vorliegen und äußerst instabil sind. Zudem führt die ausgeprägte Acceptor-Spezifität der Transferasen zu Einschränkungen der Synthesemöglichkeiten<sup>[2d, 3b]</sup>.

Unser Hauptaugenmerk galt zunächst der Synthese von häufig in der Natur auftretenden Partialstrukturen, in denen *N*-Acetylneuraminsäure **1** (Neu5Ac) terminal mit  $\beta$ -Galactose  $\alpha(2-3)$ - und  $\alpha(2-6)$ -glycosidisch verknüpft vorliegt. Darüber hinaus interessierte uns die Darstellung ungewöhnlicher und unphysiologischer Sialyloligosaccharide. Um Sialidase (EC 3.2.1.18) für Sialyloligosaccharidsynthesen nutzbar zu machen, mußte zunächst untersucht werden, ob sie neben ihrer physiologisch bedeutsamen Hydrolyseaktivität auch eine Transferaktivität aufweist. Dazu wurden, in Anlehnung an erfolgreiche Umsetzungen mit anderen Glycosidasen<sup>[4]</sup>, Versuche zur Umkehr der Hydrolyseaktivität (reverse Hydrolyse) und zur Transglycosylierung durchgeführt (Abb. 1).

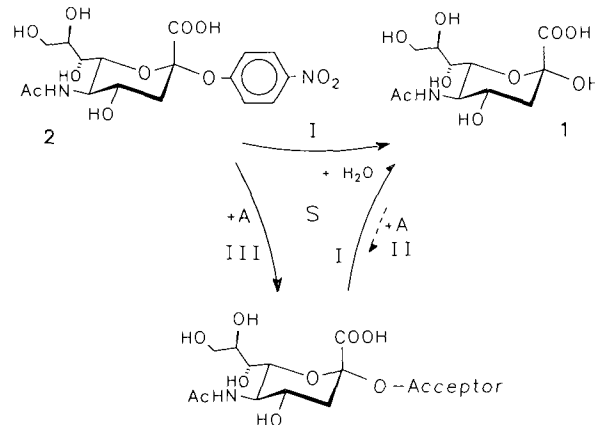


Abb. 1. Sialidase-Katalyse der Transsialylierung und der möglichen Nebenreaktionen; I = Hydrolyse, II = reverse Hydrolyse, III = Transglycosylierung, A = Acceptor, S = Sialidase.

Sialidase aus *Vibrio cholerae*<sup>[5]</sup> ( $1 \text{ U mL}^{-1}$ ) wurde an einem polymeren Träger (VA-Epoxy, Riedel-de Haën) immobilisiert. So konnte das Enzym mehrmals verwendet und die Enzyminkubationen unter vollständiger Abtrennung des Proteins definiert abgebrochen werden. Die Anbindung erfolgt durch Reaktion der Aminofunktionen des Proteins mit Epoxidgruppen des Trägermaterials<sup>[6]</sup>. Nach Gefriertrocknung des Immobilisats betrug die Aktivitätsausbeute 68 % ( $1.36 \text{ U pro g Träger}$ ). Sechstägiges Schütteln des Immobilisats bei  $26^\circ\text{C}$  im Inkubationspuffer führte zu einem Aktivitätsverlust von 24 %. Die Aktivitäten der Immobilisate sowie des freien Enzyms lassen sich durch Hydrolyse von *p*-Nitrophenyl-5-acetamido-3,5-dideoxy- $\alpha$ -D-glycero-D-galacto-2-nulonopyranosidonsäure **2** ( $\alpha\text{Neu5Ac-O(pNPh)}$ ) bestim-

men, wobei das gebildete *p*-Nitrophenolat bei 400 nm photometrisch quantifiziert wird (Abb. 1)<sup>[7]</sup>.

Die Acceptor-moleküle für die Sialylierungen sind ebenfalls chemoenzymatisch zugänglich. So ist die Galactosylierung von *N*-Acetyl-glucosamin mit Galactosyl-Transferase und UDP-Galactose eine bewährte Methode zur Darstellung von *N*-Acetyl-lactosamin **11**<sup>[8]</sup>. Der Donor **2** ist dagegen leicht nichtenzymatisch aus **1** in sechs Stufen erhältlich, wobei die Umsetzung des Glycosylchlorids mit *p*-Nitrophenolat der Schlüsselschritt ist<sup>[7]</sup>.

Umsetzungen nach dem Prinzip der reversen Hydrolyse werden bei relativ hohen Temperaturen, hohen Acceptor-konzentrationen und mit dem freien Zucker als Donor durchgeführt<sup>[4a]</sup>. Bei einer entsprechenden Umsetzung von **1** (aus wässriger Lösung lyophilisiert, nachdem der pH-Wert mit verdünnter NaOH auf 6.4 eingestellt worden ist) in einer 7.8 M Lösung von Methyl- $\beta$ -galactopyranosid **3** (Molverhältnis 1:13) mit Sialidase bei 44 °C wurden die Methyl-(5-acetamido-3,5-didesoxy- $\alpha$ -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonsäure)- $\beta$ -D-galactopyranoside **4a, b** ( $\alpha$ Neu5Ac- $\beta$ Gal-OCH<sub>3</sub>) in nur 1 % Ausbeute erhalten. Das Verhältnis von (2-3)- zu (2-6)-verknüpftem Isomer betrug laut <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum 1:10.

Gegenüber der reversen Hydrolyse werden Transglycosylierungen zumeist bei niedrigen Temperaturen durchgeführt und liefern im allgemeinen höhere Ausbeuten<sup>[4a]</sup>. Sie bedürfen allerdings Donoren, bei denen der zu übertragende Zucker in aktivierter Form, z. B. als Glycosid vorliegt. Zunächst wurden nach diesem Prinzip Inkubationen mit dem freien Enzym bei 26 °C durchgeführt, wobei **2** als Donor und **3** als Acceptor zum Einsatz kamen. Der Abbau von **2** ließ sich photometrisch bei 400 und 303 nm (Absorption von **2**) verfolgen. Um die Hydrolyse der Produkte einzudämmen, wurden die Inkubationen abgebrochen, sobald 65–75 % des Edukts umgesetzt waren. Durch Variation der Acceptor-konzentration konnte sowohl die Ausbeute als auch das Verhältnis der isomeren Produkte erheblich beeinflusst werden (Tabelle 1). In allen Fällen wurde aber hauptsächlich das

Tabelle 1. Transsialylierungen mit freier Sialidase. Donor:  $\alpha$ Neu5Ac-O(pNPh) **2**, Acceptor:  $\beta$ Gal-OCH<sub>3</sub> **3**.

Molverhältnis Donor: Acceptor	Acceptorkonzentration [mol L <sup>-1</sup> ]	Gesamtausbeute [%]	Molverhältnis <b>4a</b> : <b>4b</b>
1:4	0.67	1.8	1:1.6
1:7	2.37	9.5	1:5.8
1:15	3.37	5.4	1:9.0

(2-6)-Isomer erhalten, was vermutlich auf eine partielle hydrolytische Spaltung der Produkte zurückzuführen ist, da Sialidase aus *Vibrio cholerae* das (2-3)-Isomer schneller hydrolysiert als das (2-6)-Isomer<sup>[9]</sup>. Eine weitere Erhöhung der Ausbeuten kann durch den Einsatz der immobilisierten Sialidase erzielt werden. Der Grund hierfür ist noch ungeklärt.

Die Inkubationsbedingungen und Ergebnisse für die untersuchten Acceptoren sind in Tabelle 2 zusammengestellt. Die Verknüpfungsmuster der synthetisierten Di- und Trisaccharide sind <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopisch belegt (Tabelle 3). Die biologisch bedeutsamen (2-3)- und (2-6)-glycosidischen Bindungen von  $\alpha$ Neu5Ac an  $\beta$ -Galactose sind in den Produkten **4a, 4b, 10a, 10b, 12a** und **12b** (Tabelle 4) verwirklicht. Dabei gilt: je größer der Acceptor, desto geringer die Ausbeuten.

Der Acceptor **3** wurde nicht nur unter Standardbedingungen, sondern auch in Wasser mit 30 Vol.-% Dimethylsulfoxid (DMSO) umgesetzt. Um die gleiche Ausbeute zu erreichen, mußten Inkubationsdauer und Enzymkonzentration

Tabelle 2. Transsialylierungen mit immobilisierter Sialidase.

Acceptor	Rkts.-beding. [a]	t [h]	Produkt	Verhältnis von 3- zu 6-Isomer [b]	Gesamtausbeute [%]
<b>3</b>	a)	41	<b>4a, b</b>	1:2.9	20
<b>3</b>	b)	120	<b>4a, b</b>	1:2.0	20
<b>5</b>	a)	45	<b>6a, b</b>	1:6.0	24
<b>7</b>	a)	45	<b>8a, b</b>	1:3.2	16
<b>9</b>	a)	45	<b>10a, b</b>	1:2.0	16
<b>11</b>	a)	68.5	<b>12a, b</b>	1:2.8	14

[a] Siehe Arbeitsvorschriften. [b] Durch <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie und HPLC bestimmt.

Tabelle 3. Ausgewählte charakteristische <sup>1</sup>H-NMR-Daten der dargestellten Sialyloligosaccharide (400 MHz, D<sub>2</sub>O).

**4a**:  $\delta$  = 4.31 (d, 1H, H-1,  $J_{1,2}$  = 8.0 Hz), 3.57 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2.73 (dd, 1H, H-3' äq.,  $J_{3',4'} = 12.2$  Hz,  $J_{3',ax,4'} = 4.7$  Hz), 2.04 (s, 3H, NAc), 1.69 (dd, 1H, H-3'ax,  $J_{3'ax,4'} = 12.2$  Hz); **4b**:  $\delta$  = 4.39 (d, 1H,  $J_{1,2} = 8.0$  Hz), 4.08 (dd, 1H, H-3,  $J_{2,3} = 9.7$  Hz,  $J_{3,4} = 3.2$  Hz), 3.57 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2.75 (dd, 1H, H-3' äq.,  $J_{3',4'} = 12.0$  Hz,  $J_{3',ax,4'} = 4.6$  Hz), 2.04 (s, 3H, NAc), 1.78 (dd, 1H, H-3'ax,  $J_{3'ax,4'} = 12.0$  Hz); **6a**:  $\delta$  = 4.81 (d, 1H, H-1,  $J_{1,2} = 3.3$  Hz), 3.41 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2.73 (dd, 1H, H-3' äq.,  $J_{3',4'} = 12.3$  Hz),  $J_{3',ax,4'} = 4.6$  Hz), 2.04 (s, 3H, NAc), 1.68 (dd, 1H, H-3'ax,  $J_{3'ax,4'} = 12.3$  Hz); **6b**:  $\delta$  = 4.88 (d, 1H, H-1,  $J_{1,2} = 3.3$  Hz), 4.30 (dd, 1H, H-3,  $J_{2,3} = 10.0$  Hz,  $J_{3,4} = 2.6$  Hz), 3.41 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2.73 (dd, 1H, H-3' äq.,  $J_{3',4'} = 12.3$  Hz,  $J_{3',ax,4'} = 4.6$  Hz), 2.04 (s, 3H, NAc), 1.81 (dd, 1H, H-3'ax,  $J_{3'ax,4'} = 12.3$  Hz); **8a**:  $\delta$  = 4.38 (d, 1H, H-1,  $J_{1,2} = 8.0$  Hz), 3.57 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2.75 (dd, 1H, H-3' äq.,  $J_{3',4'} = 12.4$  Hz,  $J_{3',ax,4'} = 4.8$  Hz), 2.03 (s, 3H, NAc), 1.72 (dd, 1H, H-3'ax,  $J_{3'ax,4'} = 12.1$  Hz); **8b**:  $\delta$  = 4.51 (d, 1H, H-1,  $J_{1,2} = 8.0$  Hz), 4.12 (dd, 1H, H-3,  $J_{2,3} = 10.0$  Hz,  $J_{3,4} = 10.0$  Hz), 3.57 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2.71 (dd, 1H, H-3' äq.,  $J_{3',4'} = 12.4$  Hz,  $J_{3',ax,4'} = 4.8$  Hz), 2.04 (s, 3H, NAc), 1.77 (dd, 1H, H-3'ax,  $J_{3'ax,4'} = 12.4$  Hz); **10a**:  $\delta$  = 4.43 (d, 1H, H-1,  $J_{1,2} = 8.0$  Hz), 4.41 (d, 1H, H-1',  $J_{1',2'} = 8.0$  Hz), 3.58 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2.71 (dd, 1H, H-3' äq.,  $J_{3',4'} = 12.5$  Hz,  $J_{3',ax,4'} = 4.6$  Hz), 2.02 (s, 3H, NAc), 1.75 (dd, 1H, H-3'ax,  $J_{3'ax,4'} = 12.5$  Hz); **10b**:  $\delta$  = 4.52 (d, 1H, H-1,  $J_{1,2} = 7.9$  Hz), 4.39 (d, 1H, H-1,  $J_{1,2} = 8.1$  Hz), 4.11 (dd, 1H, H-3',  $J_{2',3'} = 10.0$  Hz), 3.58 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2.75 (dd, 1H, H-3' äq.,  $J_{3',4'} = 12.5$  Hz,  $J_{3',ax,4'} = 4.9$  Hz), 2.02 (s, 3H, NAc), 1.79 (dd, 1H, H-3'ax,  $J_{3'ax,4'} = 12.5$  Hz); **12a**:  $\delta$  = 5.18 (d, 1H, H-1 $\alpha$ ,  $J_{1,2} = 2.2$  Hz), 4.44 (d, 1H, H-1',  $J_{1',2'} = 8.0$  Hz), 2.67 (dd, 1H, H-3' äq.,  $J_{3',4'} = 12.4$  Hz,  $J_{3',ax,4'} = 4.5$  Hz), 2.07 (s, 3H, NAc ( $\beta$ GlcNAc)), 2.03 (s, 3H, NAc ( $\alpha$ Neu5Ac)), 1.71 (dd, 1H, H-3'ax,  $J_{3'ax,4'} = 12.4$  Hz); **12b**:  $\delta$  = 4.54 (d, 1H, H-1',  $J_{1',2'} = 8.0$  Hz), 4.11 (dd, 1H, H-3',  $J_{2',3'} = 9.1$  Hz,  $J_{3',4'} = 2.8$  Hz), 2.77 (dd, 1H, H-3' äq.,  $J_{3',4'} = 12.2$  Hz,  $J_{3',ax,4'} = 4.4$  Hz), 2.04 (s, 3H, NAc ( $\alpha$ Neu5Ac)), 2.05 (s, 3H, NAc ( $\beta$ GlcNAc)), 1.80 (dd, 1H, H-3'ax,  $J_{3'ax,4'} = 12.2$  Hz).

drastisch erhöht werden. Organische Cosolventien könnten aber zur effektiven Sialylierung weniger polarer Acceptoren von Interesse sein.

Die Saccharidstruktur von **10b** ist ein in Gangliosiden immer wiederkehrendes Fragment<sup>[1b]</sup>, wohingegen für das (2-6)-verknüpfte Analogon **10a** ebenso wie für **6a, 6b** und **8b** bisher keine biologische Relevanz nachgewiesen wurde. **12a** und **12b** sind universelle Bausteine vorrangig von *N*-glycosidischen Glycoproteinen, aber auch von Gangliosiden<sup>[11]</sup>. Die in **8a** realisierte Sialylierung von  $\beta$ -Glucose an der 6-Position ist in der Natur bisher nur vereinzelt in Gangliosiden<sup>[10a]</sup> und in Glycolipiden aus Seeigeln der Gattung *Strongylocentrotus intermedius*<sup>[10b]</sup> angetroffen worden.

Im Vergleich zu den übrigen Acceptoren ergibt die Umsetzung von Methyl- $\alpha$ -D-galactopyranosid **5** nicht nur die höchste Gesamtausbeute, sondern auch ein ungewöhnliches, zugunsten der (2-6)-Bindung verschobenes Isomerenverhältnis. Zur Interpretation kann eine spezifische Wechselwirkung mit dem Enzym herangezogen werden, die auf dem größeren Raumbedarf und der erhöhten Hydrophobie an der Molekülunterseite von **5** beruht.

Diese Synthesen von Sialyloligosacchariden zeigen gegenüber Sialyl-Transferase-katalysierten Reaktionen geringere Ausbeuten und eine weniger ausgeprägte Regioselektivität. Letzteres ermöglicht aber den unkomplizierten Zugang zu (2-3)-verknüpften Sialyloligosacchariden, deren Synthesen

Tabelle 4. Transsialylierungen mit immobilisierter Sialidase.

Acceptoren	(2-6)-Isomere	Produkte	(2-3)-Isomere
$\beta$ Gal-OCH <sub>3</sub> 3			
$\alpha$ Gal-OCH <sub>3</sub> 5			
$\beta$ Glc-OCH <sub>3</sub> 7			
$\beta$ Gal(1-4) $\beta$ Glc-OCH <sub>3</sub> 9			
$\beta$ Gal(1-4)GlcNAc-OH 11			

nicht nur mit klassisch-chemischen Methoden sondern auch mit der (2-3)-Sialyl-Transferase unbefriedigend sind, solange dieses Enzym noch nicht auf gentechnologischem Wege in ausreichendem Maße produziert wird. Auch die geringe Aglycon-Spezifität der Sialidasen erweist sich von Vorteil, da sie Sialylierungen unphysiologischer Acceptoren zuläßt. Sialidasen sind zudem vergleichsweise problemlos zu isolieren, leicht zu handhaben und begnügen sich mit relativ einfachen Ausgangsverbindungen.

#### Arbeitsvorschriften

Immobilisierung der Sialidase: In 1 mL Enzymlösung (1 U mL<sup>-1</sup>) und 4 mL 1 M Kaliumphosphat-Puffer (pH 7.5) werden 500 mg VA-Epoxy suspendiert und 3 d bei 20 °C geschüttelt. Danach wird das Immobilisat mehrmals mit 0.1 M Kaliumphosphat-Puffer gewaschen (pH 7.5) und anschließend mit 2 mL 5 proz. Mercaptoethanol-Lösung (pH 8.0) 3 d bei 20 °C unter Schütteln nachbehandelt. Nach nochmaligem Waschen betrug die Aktivitätsausbeute des lyophilisierten Präparats 68 % (1.36 U g<sup>-1</sup>).

Sialylierungen mit immobilisierter Sialidase: a) 25 µmol Donor 2, 175 µmol Acceptor und 40 mg (60 mU) Immobilisat werden in 130 µL entgastem Inkubationspuffer (0.1 M NaOAc, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.03 % NaN<sub>3</sub>, pH 5.5) angeteigt und bei 26 °C inkubiert (siehe Tabelle 2). Die Reaktionen werden durch Verdünnen mit bidestilliertem H<sub>2</sub>O und sofortigem Abzentrifugieren des Immobilisats abgebrochen. Die Aufarbeitung erfolgt durch Anionenaustauschchromatographie (Dowex 1 × 2, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-beladen) [3b]. Die sich anschließende gelchromatographische Entsalzung (Sephadex G15) der Produktfraktionen wird konduktometrisch überprüft. b) Dem Inkubationspuffer werden 30 Vol.-% DMSO zugesetzt, ansonsten gleiche Vorgehensweise wie unter a) beschrieben. Analytische HPLC zur Quantifizierung der Stellungsisomere [12] (siehe Tabelle 2): Säule: Lichrosorb-NH<sub>2</sub> (5 × 240 mm), Laufmittel: 15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Acetonitril 28 : 72, Flußrate: 1.2 mL min<sup>-1</sup>, Detektion bei 200 nm.

Eingegangen am 18. Juni 1991 [Z 4729]

- [1] a) R. Schauer, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 40 (1982) 131; b) *Sialic Acids Chemistry, Metabolism and Function* (Cell Biology Monographs Vol. 10) Springer, Wien 1982; c) *Biochem. Soc. Trans.* 11 (1983) 270; d) J. C. Paulson, G. N. Rogers, S. M. Carroll, H. H. Higa, T. Pritchett, G. Milks, S. Sabesan, *Pure Appl. Chem.* 56 (1984) 797; e) S. Hakomori, *Annu. Rev. Immunol.* 2 (1984) 103; f) M. H. Ravindranath, H. H. Higa, E. L. Cooper, J. C. Paulson, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 8850.  
[2] a) H. Paulsen, H. Tietz, *Carbohydr. Res.* 125 (1984) 47; b) T. Ogawa, M. Sugimoto, *ibid.* 135 (1985) C5; c) H. Paulsen, U. von Deessen, *ibid.* 146 (1986) 147; d) K. Okamoto, T. Goto, *Tetrahedron* 46 (1990) 5835.

- [3] a) J. Thiem, W. Treder, *Angew. Chem.* 98 (1986) 1100; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 25 (1986) 1096; b) S. Sabesan, J. C. Paulson, *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 2068; c) E. S. Simon, M. D. Bednarski, G. M. Whitesides, *ibid.* 110 (1988) 7159; d) E. J. Toone, E. S. Simon, M. D. Bednarski, G. M. Whitesides, *Tetrahedron* 45 (1989) 5365.  
[4] a) K. G. J. Nilsson, *Trends Biochem. Sci.* 6 (1988) 256; b) S. C. T. Svensson, J. Thiem, *Carbohydr. Res.* 200 (1990) 391.  
[5] Sialidase aus *Vibrio Cholerae* (EC 3.2.1.18) wurde dankenswerterweise von den Behringwerken AG, Marburg, zur Verfügung gestellt.  
[6] K. Burg, O. Mauz, S. Noetzel, K. Sauber, *Angew. Makromol. Chem.* 157 (1988) 105.  
[7] V. Eschenfelder, R. Brossmer, *Carbohydr. Res.* 162 (1987) 294.  
[8] a) S. L. Haynie, C.-H. Wong, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* 47 (1982) 5416; b) J. Thiem, T. Wiemann, *Angew. Chem.* 102 (1990) 78; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 29 (1990) 80.  
[9] A. P. Corfield, J.-C. Michalski, R. Schauer in G. Tetamanti, P. Durand, S. DiDonato (Hrsg.): *Sialidases and Sialidolases, Perspectives in Inherited Metabolic Diseases*, Vol. 4, Edition Ermes, Mailand 1981.  
[10] a) H. Wiegandt in L. Svennerholm, P. Mandel, H. Dreyfus, P. F. Urban (Hrsg.): *Structure and Function of Gangliosides*, Plenum Press, New York 1980; b) N. K. Kochetkov, I. G. Zhukova, G. P. Smirnova, I. S. Glukhoded, *Biochim. Biophys. Acta* 326 (1973) 74.  
[11] a) J. Montreuil, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 37 (1980) 158; b) A. Kobata, *Cell. Struct. Funct.* 4 (1979) 169; c) B. L. Slomiany, V. L. N. Murty, A. Slomiany, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 9719.  
[12] M. L. E. Bergh, P. Koppen, D. H. van den Eijnden, *Carbohydr. Res.* 94 (1981) 225.

#### Mikroporöse Siliciumdioxidfilme

Von Wilhelm F. Maier\*, Michael Wiedorn und Herbert O. Schramm

Dünne keramische Filme werden zunehmend als optische oder schützende Beschichtung in der Mikroelektronik eingesetzt. Mikroporöse Keramikmembranen mit Porendurch-

[\*] Prof. Dr. W. F. Maier, Dipl.-Chem. M. Wiedorn, Dipl.-Chem. H. O. Schramm  
Institut für Technische Chemie der Universität-Gesamthochschule Schützenbahn 70, W-4300 Essen 1

[\*\*] Diese Arbeit wurde vom Bundesministerium für Forschung und Technologie gefördert.