

**Synthese von immobilisierter CMP-Sialinsäure und ihre enzymatische Übertragung durch Sialyltransferase\*\***

Yasuhiro Kajihara,\* Takashi Ebata und Hisashi Kodama

Die enzymatische Synthese von Oligosacchariden und ihren Analoga mit Glycosyltransferasen (GTasen) hat bemerkenswerte Fortschritte gemacht, seit es möglich ist, die zugehörigen Donorsubstrate zu synthetisieren.<sup>[1]</sup> Sialyltransferase(STase)-<sup>[2]</sup> und Fucosyltransferase-Reaktionen<sup>[3]</sup> wurden auch zur Untersuchung der Struktur und Funktion der Oligosaccharide von Glycoproteinen und von Oligosacchariden auf Zelloberflächen verwendet, wobei Zucker-modifizierte Nucleotide eingesetzt wurden. Wir haben einen kurzen Syntheseweg für CMP-Sialinsäure (CMP-N-Acetylneuraminsäure, CMP-NeuAc; CMP = Cytidinmonophosphat) und ihre Analoga entwickelt.<sup>[4]</sup> Im Anschluß daran haben wir begonnen, unter Verwendung synthetischer CMP-NeuAc-Analoga mögliche Anwendungen für STase-Reaktionen zu untersuchen (Abb. 1).

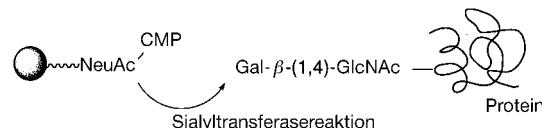


Abb. 1. Schematische Darstellung der neuen Immobilisierungsmethode für Glycoproteine.

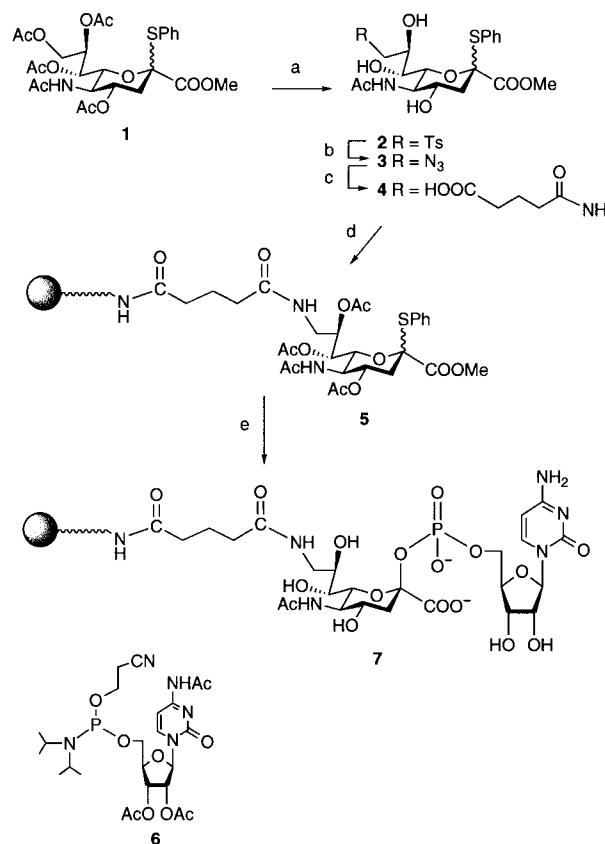
Viele Enzyme und Lectine sind Glycoproteine mit N- oder O-verknüpften Oligosacchariden. Enthalten diese Proteine mehrere Oligosaccharide auf ihrer Oberfläche, so weist diese Oligosaccharidschicht eine dynamische Fluktuation auf.<sup>[5]</sup> Wird die Zahl der Oligosaccharidketten erhöht, vergrößert sich folglich auch der Anteil der bedeckten Oberfläche. Bei den meisten Immobilisierungsmethoden,<sup>[6]</sup> die für solche Glycoproteine verwendet werden, verhindert diese Kohlenhydratschicht den Zugang zu den Amino- oder Carboxyfunktionen auf der Proteinoberfläche. Das immobilisierte Enzym kann auch seine Aktivität verlieren, wenn das Reagens an Aminosäuren bindet, die nahe am katalytischen Zentrum lokalisiert sind. Deshalb beabsichtigten wir, ein über die 9''-Position an die Festphase gebundenes CMP-NeuAc-Derivat

[\*] Dr. Y. Kajihara  
Department of System Function  
Faculty of Science, Yokohama City University  
22-2, Seto, Kanazawa-ku, Yokohama, 236-0027 (Japan)  
Fax: (+81)45-787-2370  
E-mail: kajihara@yokohama-cu.ac.jp  
Weitere Adresse: Dr. Y. Kajihara, Dr. T. Ebata, Dr. H. Kodama  
Life Science Research Laboratory  
Japan Tobacco Inc.  
6-2 Umegaoka, Aoba-ku, Yokohama 227-0052 (Japan)

[\*\*] Wir danken Dr. James C. Paulson (Cytel Corporation) für die großzügig bereitgestellte  $\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 3)-Sialyltransferase sowie Dr. Hajime Matsushita und Dr. Koshi Koseki (Life Science Research Laboratory, Japan Tobacco Inc.) für hilfreiche Diskussionen und Anregungen. Weiterhin danken wir Masayosi Kusama (Japan Tobacco Inc.) für die massenspektrometrischen Analysen.

zu synthetisieren und dessen Sialyltransferaseaktivität als Teil einer neuen Immobilisierungsmethode zu untersuchen. Am nichtreduzierenden Ende von Oligosacchariden befinden sich häufig Galactoside, die in der STase-Reaktion als Aczeptoren fungieren. Wenn die STase die Übertragung immobilisierter NeuAc an diese terminalen Galactoside erfolgreich katalysiert, so wäre dies eine neue und milde Immobilisierungs methode. Solch eine Methode hätte zwei Vorteile: 1. Da die STase-Reaktion üblicherweise an den vom Protein am weitesten entfernten Galactosidresten erfolgt, sollte die Immobilisierungsreaktion glatt in einer Region verlaufen, in der die sterische Hinderung durch die Kohlenhydratschicht umgangen wird. 2. Da die Sialylierung von Galactosiden am nichtreduzierenden Ende bioaktiver Glycoproteine oder Enzyme unabhängig von deren In-vitro-Aktivität ist,<sup>[7]</sup> können Sialoside als neuartiger Linker-Typ zwischen bioaktiven Glycoproteinen und einer Festphase verwendet werden.

Wir beschreiben hier die Festphasensynthese von CMP-NeuAc und die Übertragungsreaktion sowohl auf einen entsprechenden Oligosaccharid-Acceptor als auch auf ein nichtsialyliertes Glycoprotein (Asialoglycoprotein). Die chemische Synthese immobilisierter CMP-NeuAc ist in Schema 1



Schema 1. a) 1. NaOMe, MeOH, 25°C; 2. TsCl, Py, 25°C, 48% (zwei Stufen); b) NaN<sub>3</sub>, DMF, 80°C, 92%; c) 1. H<sub>2</sub>S, Py/Triethylamin/H<sub>2</sub>O (5/1/2), 25°C; 2. Glutarsäureanhydrid, MeOH, 25°C, 83% (zwei Stufen); d) 1. CPG, 1-Ethyl-3-(3-diaminopropyl)carbodiimid (HCl-Salz), Triethylamin, DMF, 25°C; 2. Ac<sub>2</sub>O, Py, DMAP, 25°C, 3–5% (nach der Periodat/Resorcin-Methode bestimmt); e) 1. NBS, Aceton/H<sub>2</sub>O (10/1), 25°C; 2. **6**, 1H-Tetrazol, MeCN, 25°C; 3. *t*BuOOH, MeCN, 25°C; 4. DBU, THF, 25°C; 5. NaOMe, MeOH/H<sub>2</sub>O (2/1), 25°C. Ts = *p*-Toluolsulfonyl; Py = Pyridin; DMAP = 4-Dimethylaminopyridin; NBS = *N*-Bromsuccinimid; DBU = 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en.

dargestellt. Die an Position 9 modifizierte NeuAc **4**<sup>[8]</sup> wurde auf konventionelle Weise aus **1**<sup>[9]</sup> hergestellt und an CPG (long chain alkylamino controlled pore glass, Sigma) gekuppelt.<sup>[10]</sup> Die restlichen Aminogruppen am CPG wurden dann durch Acetylierung geschützt. Die quantitative Bestimmung nach der Periodat/Resorcin-Methode<sup>[11]</sup> lieferte nach O-Desacetylierung und Verseifung von **5** einen Wert von 576 nmol immobilisiertes NeuAc-Derivat pro 1 g CPG. Nach unserer kürzlich entwickelten Methode<sup>[4]</sup> wurde **5** in immobilisierte CMP-NeuAc **7** überführt, die durch Vergleich ihres <sup>31</sup>P-NMR-Spektrums<sup>[12]</sup> mit dem der CMP-NeuAc identifiziert wurde (Abb. 2).

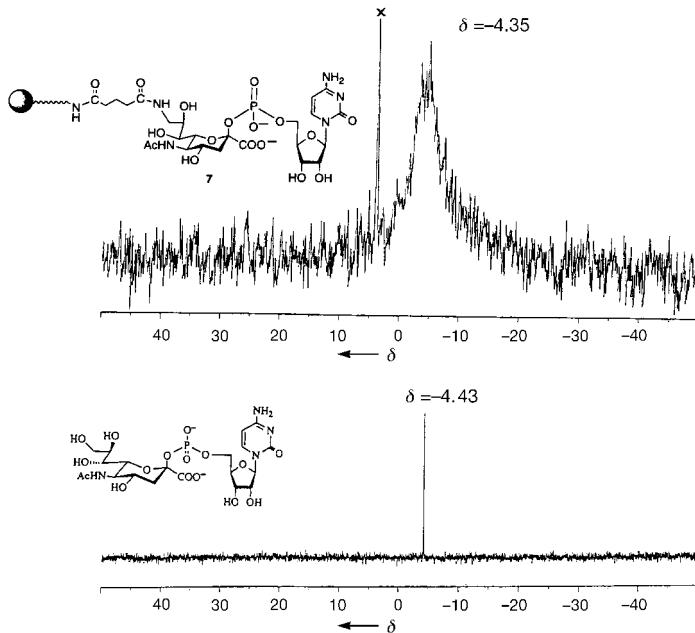


Abb. 2. <sup>31</sup>P-NMR-Spektren von **7** (oben) und CMP-NeuAc (unten). X: Verunreinigung.

Die Übertragungsreaktion<sup>[13]</sup> wurde in HEPES-Puffer durchgeführt, der **7**, [<sup>14</sup>C]Gal- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-GlcNAc $\beta$ -OMe ([<sup>14</sup>C]LacNAc<sup>[14]</sup>), BSA (Rinderserumalbumin) und STase enthielt.<sup>[21]</sup> Wenn die immobilisierte NeuAc auf [<sup>14</sup>C]LacNAc übertragen wurde, dann hat sich Sialyl-[<sup>14</sup>C]LacNAc auf der CPG-Oberfläche gebildet. Nach Inkubation bei 37 °C wurden die Isotopenzerfälle am CPG mit einem Flüssigkeits-Szintillationszähler gemessen.<sup>[15]</sup> Für die Übertragungsreaktion verwendeten wir die beiden Enzyme  $\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 3)-STase (3STase, EC 2.4.99.6, Cytel) und  $\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 6)-STase (6STase, EC 2.4.99.1, Boehringer Mannheim). Die Ergebnisse sind in Abbildung 3 und Tabelle 1 zusammengefaßt. Aus Diagramm A (3STase) wird erkennbar, daß die Übertragungsaktivität von NeuAc in Form immobilisierter CMP-NeuAc **7** mit steigender Enzymkonzentration zunahm. Die Übertragungsaktivitäten erhöhten sich ebenfalls mit zunehmender Acceptor-Konzentration oder längeren Inkubationszeiten (3STase, Diagramme B und C). Im Falle der 6STase (D–F) sind die Reaktionsdynamiken ähnlich. Wurde die STase zunächst 5 min unter Rückfluß erhitzt und dann zur Reaktionsmischung gegeben, ließ sich keine Übertragungsaktivität feststellen (G). Diese Befunde belegen, daß die immobilisierte CMP-NeuAc **7** als Sialin-

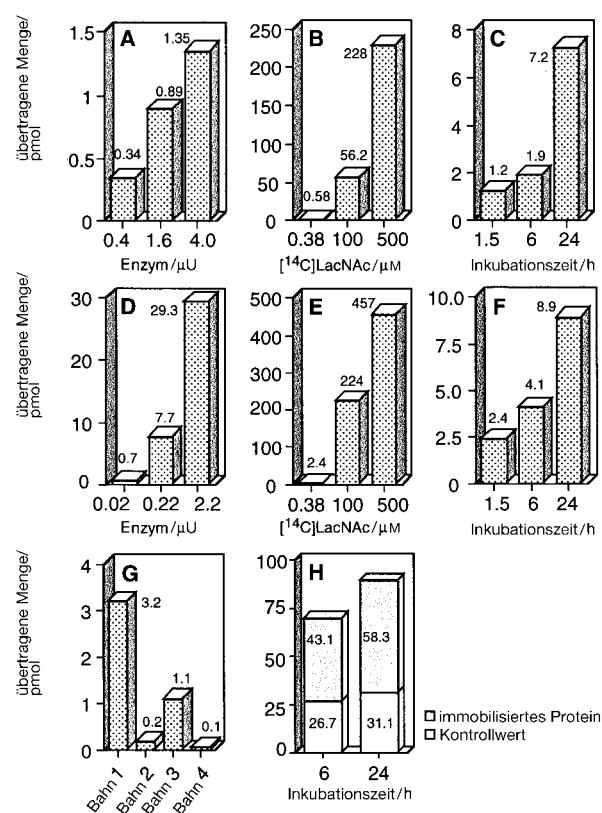


Abb. 3. Durch  $\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 3)- und  $\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 6)-Sialyltransferasen übertragene Mengen [pmol] an **7**. Die Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 1 angegeben.

Tabelle 1. Reaktionsbedingungen für die Versuchsreihen A–H in Abbildung 3.<sup>[a]</sup>

Diagramm	<b>7</b> [mg]	<sup>14</sup> C>-LacNAc [ $\mu$ g]	STase [ $\mu$ U]		Volumen [ $\mu$ L]	Inkubationszeit [h]
			2,3	2,6		
A	2	0.4	[b]	–	32	5
B	1	[b]	0.8	–	32	3
C	1	1.0	0.8	–	35	[b]
D	2	3.8	–	[b]	32	4
E	1	[b]	–	2.2	32	3
F	1	1.0	–	2.0	34	[b]
G	2	0.7	[c]	[c]	34	3
H	1	[d]	0.8	–	27 <sup>[e]</sup>	[b]

[a] Übertragungs-Assays mit CMP-NeuAc **7** wurden bei 37 °C in 1.5-mL-Eppendorf-Hütchen durchgeführt, die Methyl-N-acetyl-[1'-6'-<sup>14</sup>C]lactosaminid (<sup>14</sup>C)LacNAc, ca. 1.15 KBq pro 100 pmol bis zu 1.15 KBq pro 16 nmol durch Verdünnung mit LacNAc, STase, HEPES-Puffer (0.1m, pH 7.0) und BSA (1 mg pro 1 mL Reaktionsgemisch) enthielten. Alle Assays (außer in G) wurden ohne Enzymsystem als Kontrollexperiment durchgeführt. [b] Verschiedene Werte. [c] Enzymmengen: Bahn 1: 6.6  $\mu$ U 6STase; Bahn 2: 6.6  $\mu$ U erhitze 6STase; Bahn 3: 2.0  $\mu$ U 3STase; Bahn 4: 2.0  $\mu$ U erhitze 3STase. [d] [<sup>14</sup>C]Asialoglycoprotein; ca. 1.0 nmol. [e] Die Pufferlösung enthält 0.1 % Nonidet-P-40 und MnCl<sub>2</sub> (5 mM).

säure-Donor fungieren kann. Wurde die Inkubationszeit auf 24 h ausgedehnt (B), so stieg bei 500  $\mu$ M [<sup>14</sup>C]LacNAc die übertragene Menge auf 721 pmol. Dieser Wert weist darauf hin, daß mehr als 721 pmol CMP-NeuAc auf 1 mg CPG immobilisiert sind. Weiterhin haben wir die relativen Übertragungsgeschwindigkeiten von CMP-NeuAc und **7** ver-

glichen, wobei der Wert für **7** näherungsweise 3 % des Wertes für CMP-NeuAc betrug.<sup>[16]</sup>

Wir untersuchten auch, ob **7** unter Verwendung von 3STase gegenüber einem Asialoglycoprotein-Acceptor ([U-<sup>14</sup>C]Gal<sup>[18]</sup> enthaltendes, saures  $\alpha_1$ -Asialoglycoprotein) aktiv ist. Wie in Diagramm H abgebildet, erhöhte sich die Zahl der Isotopenzerfälle für das immobilisierte Asialoglycoprotein bei Verlängerung der Inkubationszeit. Die im Kontrollversuch (ohne Enzym) gemessene radioaktive Strahlung ließ jedoch nur einen halb so hohen Wert für das tatsächlich immobilisierte Glycoprotein vermuten. Wurde [<sup>14</sup>C]LacNAc (A–F) verwendet, so betragen die Kontrollwerte weniger als 5 % der für tatsächlich immobilisierte [<sup>14</sup>C]LacNAc gemessenen Werte. Die Höhe der Kontrollwerte in Diagramm H lässt sich auf eine unspezifische Bindung des Asialoglycoproteins an CPG zurückführen. Deshalb unterscheiden sich die Kontrollwerte nach Inkubationszeiten von 6 h und 24 h nur um 4.4 pmol. Dagegen beträgt der Unterschied beim immobilisierten Asialoglycoprotein 15.2 pmol. Der Wert für das immobilisierte Protein steigt unabhängig vom Kontrollwert durch einfache Verlängerung der Inkubationszeit; somit belegen die Daten in Diagramm H, dass **7** das Asialoglycoprotein aktiv immobilisiert. Außerdem ist diese Übertragungsaktivität über mehrere Experimente hinweg reproduzierbar. Da 58 pmol saures  $\alpha_1$ -Asialoglycoprotein an das CPG gekuppelt wurden, sind ca. 10 % CMP-NeuAc während der Immobilisierung verbraucht worden. Weiterhin lassen diese Daten darauf schließen, dass ungefähr 2.5 mg Glycoprotein an 1 g CPG immobilisiert werden können. Da das in diesem Experiment eingesetzte saure  $\alpha_1$ -Asialoglycoprotein auf seiner Oberfläche ein Äquivalent [U-<sup>14</sup>C]Galactosid enthält,<sup>[18]</sup> kann es nur ein schwacher Sialinsäure-Acceptor sein. Dagegen dürfte ein Glycoprotein mit mehreren Galactosiden wegen des Multivalenzeffektes ein guter Sialinsäure-Acceptor sein, und als Resultat könnte dann eine brauchbare Menge an Glycoprotein immobilisiert werden.

Unsere Methode beschränkt sich gegenwärtig auf die Immobilisierung von Glycoproteinen, die am nichtreduzierenden Ende Galactoside enthalten. Andere Glycoproteine, die vollständig sialylierte oder Mannose-reiche Oligosaccharide enthalten, lassen sich schwieriger immobilisieren. Im ersten Fall kann man die Immobilisierung nach Sialidase-Behandlung durchführen. Wie aus Diagramm H erkennbar, sind Effizienz<sup>[19]</sup> und Ausbeute<sup>[20]</sup> der Immobilisierung noch nicht zufriedenstellend. Wir arbeiten derzeit an der Lösung der oben genannten Probleme, um eine effizientere Immobilisierung zu ermöglichen. Wir haben beschrieben, dass immobilisierte CMP-NeuAc mit Sialyltransferasen reagiert. Dieses Sialosid kann als neuartiger Linker eingesetzt werden, um ein labiles Biomolekül kovalent an eine Festphase zu binden.

Eingegangen am 6. April 1998 [Z11690]

**Stichwörter:** Enzyme • Festphasensynthesen • Glycoproteine • Immobilisierung • Sialinsäuren

- [3] G. Srivastava, K. J. Kaur, O. Hindsgaul, M. M. Palcic, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 22356–22361.
- [4] Y. Kajihara, T. Ebata, K. Koseki, H. Kodama, H. Matsushita, H. Hashimoto, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 5732–5735.
- [5] R. A. Dwek, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683–720.
- [6] K. Mosbach, *Methods in Enzymology XLIV*, Academic Press, New York, **1976**, 134–148.
- [7] A. Varki, *Glycobiology* **1993**, *3*, 97–130.
- [8]  $\beta$ -Isomer: <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD; HOD:  $\delta$  = 4.81):  $\delta$  = 7.49–7.24 (m, 5 H; Ph), 5.28–5.21 (m, 2 H; H-4,8), 4.60 (dd,  $J$  = 2.3, 10.3 Hz; H-7), 3.92 (dd,  $J$  = 10.4, 10.4 Hz, 1 H; H-5), 3.61 (dd,  $J$  = 3.2, 14.5 Hz, 1 H; H-9a), 3.51 (s, 3 H; Me), 3.08 (dd,  $J$  = 7.1, 14.5 Hz, 1 H; H-9b), 2.51 (dd,  $J$  = 4.8, 13.8 Hz, 1 H; H-3 eq), 1.90, 1.88, 1.80, 1.77 (jeweils s, 3 H; Me); HR-FAB-MS: ber. für C<sub>29</sub>H<sub>38</sub>N<sub>2</sub>O<sub>13</sub>SNa [M+Na<sup>+</sup>]: 677.1993; gef.: 677.1997.
- [9] A. Marra, P. Sinaÿ, *Carbohydr. Res.* **1989**, *187*, 35–42.
- [10] CPG wurde zur Festphasensynthese von Glycopeptiden verwendet: M. Schuster, P. Wang, J. C. Paulson, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1135–1136.
- [11] G. W. Jourdian, L. Dean, S. Roseman, *J. Biol. Chem.* **1971**, *246*, 430–435.
- [12] **7** wurde in 0.5 mL D<sub>2</sub>O suspendiert und das <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum in üblicher Weise aufgenommen: W. L. Fitch, G. Detre, C. P. Holmes, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 7955–7956.
- [13] Vor den Tests wurde **7** mit einer BSA-Lösung (2 mg BSA in 1 mL HEPES-Puffer) in 1.5 mL-Eppendorf-Hütchen gewaschen, um die unspezifische Absorption der STase oder des Glycoprotein-Acceptors an CPG zu verhindern. Nach Zentrifugieren wurde der Überstand entfernt. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, und anschließend wurde **7** mit Wasser gewaschen. Nach Lyophilisierung wurde **7** in den Versuchen eingesetzt.
- [14] S. Sabesan, S. Neira, F. Davidson, J. Ø. Duus, K. Bock, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1616–1634.
- [15] Nach der Inkubation (A–H) wurde das Gemisch filtriert und der CPG-Rückstand zweimal mit Wasser gewaschen (3 mL). Filterpapier und CPG wurden in ein Gefäß für die Szintillationszählung eingeführt. Die Radioaktivität am CPG wurde mit einem Flüssigkeits-Szintillationszähler gemessen und die Menge der an CPG gebundenen [<sup>14</sup>C]LacNAc bestimmt. Die Ergebnisse nach Abzug der Kontrollwerte sind in Abbildung 3 (A–F) zusammengefasst. Die angegebenen Daten (A–H) sind Mittelwerte.
- [16] Die Übertragungs-Assays wurden nach einer der beiden folgenden Methoden durchgeführt: Versuche mit CMP-NeuAc verliefen bei 37 °C in einer HEPES-Pufferlösung (insgesamt 35  $\mu$ L), die CMP-[U-<sup>14</sup>C]NeuAc (12.1 kBq nmol<sup>-1</sup>, 20  $\mu$ M), LacNAc (1  $\mu$ M), BSA und 3STase (0.8  $\mu$ U) enthielt. Die übertragenen Mengen wurden nach den üblichen Methoden bestimmt.<sup>[17]</sup> Für die Versuche mit immobilisierter CMP-NeuAc **7** wurde der HEPES-Puffer (insgesamt 35  $\mu$ L) mit **7** (1 mg; die Konzentration an CMP-NeuAc entspricht 20  $\mu$ M, basierend auf dem Wert von 721 pmol CMP-NeuAc an 1 mg CPG), [<sup>14</sup>C]LacNAc (1  $\mu$ M), BSA und 3STase (0.8  $\mu$ U) versetzt und bei 37 °C inkubiert. Die übertragenen Mengen wurden nach der oben beschriebenen Methode bestimmt.<sup>[15]</sup>
- [17] Y. Kajihara, H. Kodama, T. Wakabayashi, K.-I. Sato, H. Hashimoto, *Carbohydr. Res.* **1993**, *247*, 179–193.
- [18] Saures  $\alpha_1$ -Asialoglycoprotein mit [U-<sup>14</sup>C]Galactosid wurde aus saurem  $\alpha_1$ -Asialoagalactoglycoprotein und UDP-[U-<sup>14</sup>C]Galactose mit  $\beta$ -(1 → 4)-Galactosyltransferase hergestellt: Y. Kajihara, T. Endo, H. Ogasawara, H. Kodama, H. Hashimoto, *Carbohydr. Res.* **1995**, *269*, 273–294.
- [19] Die Immobilisierung von STase als Nebenreaktion dieser Methode konnte in mehreren Selbstimmobilisierungs-Tests mit STase nicht registriert werden.
- [20] Die Immobilisierung ausbeuten wurden im Falle von LacNAc und Asialoglycoprotein auf 4.5 % bzw. 5.8 % geschätzt, bezogen auf die zugesetzten Sialyl-Acceptoren.

[U-<sup>14</sup>C] bedeutet, dass alle Kohlenstoffatome der betreffenden Verbindung in gleichem Ausmaß <sup>14</sup>C-markiert sind (u = uniform).

[1] C. H. Wong, G. M. Whitesides, *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*, Pergamon, Oxford, **1994**.

[2] H. J. Gross, R. Brossmer, *Eur. J. Biochem.* **1988**, *177*, 583–589.