

Die enzymatische Verlängerung des LEC14-Antigens erzeugt eine zusätzliche β -1,2-Verzweigung bei *N*-Glycanen**

Ingo Prah und Carlo Unverzagt*

Professor Hans Paulsen zum 80. Geburtstag gewidmet

Bei höheren Organismen sind nahezu alle Proteine des Blutserums und der Zelloberflächen glycosyliert.^[1,2] Auf diesen Glycoproteinen befinden sich viele Asparagin-verknüpfte Oligosaccharide (*N*-Glycane) mit einander ähnelnden Strukturen. Alle *N*-Glycane enthalten das Core-Pentasaccharid Man₃GlcNAc₂. Bei den biologisch relevanten komplexen *N*-Glycanen ist dieses Pentasaccharid mit bis zu fünf Antennen versehen und kann darüber hinaus durch einzelne Zuckerreste, z.B. Core-Fucose oder einen „bisecting“ GlcNAc-Rest, modifiziert werden. In einer mutierten CHO-Zelllinie (CHO = Ovarien chinesischer Hamster), die als LEC14 bezeichnet wird, wurden *N*-Glycane mit einem neuartigen Glycosylierungsmotiv des Core-Pentasaccharids beschrieben.^[3] Gemäß der Strukturanalyse sollte ein zusätzlicher GlcNAc-Rest vorhanden sein, der mit dem β -Mannosid des Core-Trisaccharids β -1,2-verknüpft ist. Die betreffende Glycosyltransferase wurde charakterisiert und als GlcNAc-TVII bezeichnet.^[4] Um den Strukturvorschlag zu verifizieren und Derivate für biologische Untersuchungen bereitstellen zu können, haben wir das mit einem Spacer funktionalisierte LEC14-Nonasaccharid synthetisiert. Die NMR-spektroskopischen Daten konnten den Strukturvorschlag bestätigen. Überraschenderweise wurde bei der Zielverbindung der einzelne GlcNAc-Rest des LEC14-Motivs durch die Galactosyltransferase erkannt, was zu einer bisher unbekannten Verlängerung führte. Das Auftreten dieser Antenne (β -1,2-Verzweigung) führt zur Bildung eines dritten Asts am zentralen β -Mannosid. Dies erweitert die Strukturmotive der Core-Region von *N*-Glycanen und ermöglicht damit eine noch größere Vielfalt.

Das LEC14-Nonasaccharid **1** wurde in geschützter Form durch Verwendung einer modularen Bausteinstrategie^[5] erhalten, die auf regio- und stereoselektiven Glycosylierungen basiert.^[6] Die Synthese des LEC14-*N*-Glycans wurde so geplant, dass sowohl ein Vergleich mit der isolierten natürlichen Verbindung möglich ist als auch eine anschließende Umsetzung zu Neoglycokonjugaten für Untersuchungen der biologischen Aktivitäten dieses ungewöhnlichen *N*-Glycans.^[7] Weiterhin sollte das synthetisierte LEC14-*N*-Glycan unter Verwendung von Glycosyltransferasen verlängert werden, um vollständige *N*-Glycane mit biologisch relevanten Endgruppen zu erhalten.

Zur Überführung des geschützten Nonasaccharids **1** in Neoglycokonjugate wurden mehrere Syntheseschritte benötigt einschließlich der Kupplung des Saccharids an einen Spacer, der selektiv für die spätere Anknüpfung an das Trägermolekül aktiviert werden kann.^[8] Vor der Kupplung des Spacers mussten alle Schutzgruppen mit Ausnahme der drei Benzylgruppen und des anomeren Azids nacheinander entfernt werden.

Zunächst wurden die drei *p*-Methoxybenzylgruppen (Mpm) des Fucoserests von **1** mit Cerammoniumnitrat (CAN) in Acetonitril/Wasser oxidativ gespalten. Die Phthalimidogruppen von **2** wurden in einer Eintopfreaktion entfernt. Diese verläuft über drei Stufen, die speziell für *N*-Glycane entwickelt wurden und anomere Azidgruppen nicht angreifen. Die Verwendung von Ethylendiamin in *n*-Butanol^[9] bei 80°C lieferte eine intermediäre Pentaaminverbindung. Nach der Acetylierung und O-Deacetylierung wurde das wasserlösliche Nonasaccharid **3** durch Festphasenextraktion in einer Gesamtausbeute von 96% isoliert. Die anschließende Reduktion der Azidgruppe mit einem Überschuss an Propandithiol in Methanol/Triethylamin^[10] führte nach der Entfernung der flüchtigen Komponenten zu dem entsprechenden Glycosylamin. Das Amin wurde sofort mit einem Überschuss an *N*-Benzyloxycarbonyl-6-aminohexansäure unter Verwendung von *O*-(Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborat/Hydroxybenzotriazol (TBTU/HOBt) in *N*-Methyl-2-pyrrolidon (NMP) acyliert. Unter diesen Bedingungen wurde eine O-Acylierung beobachtet, die durch Zugabe von wässrigem Methylamin zur Reaktionsmischung vor der Aufarbeitung rückgängig gemacht werden konnte. Nach der Reinigung durch Umkehrphasen(RP)-HPLC wurde **5** in 31% Ausbeute erhalten. Die katalytische Hydrierung durch Palladiumhydroxid lieferte das mit einem Aminohexanoylspacer versehene Nonasaccharid **6** in 95% Ausbeute nach Größenausschlusschromatographie (Schema 1).

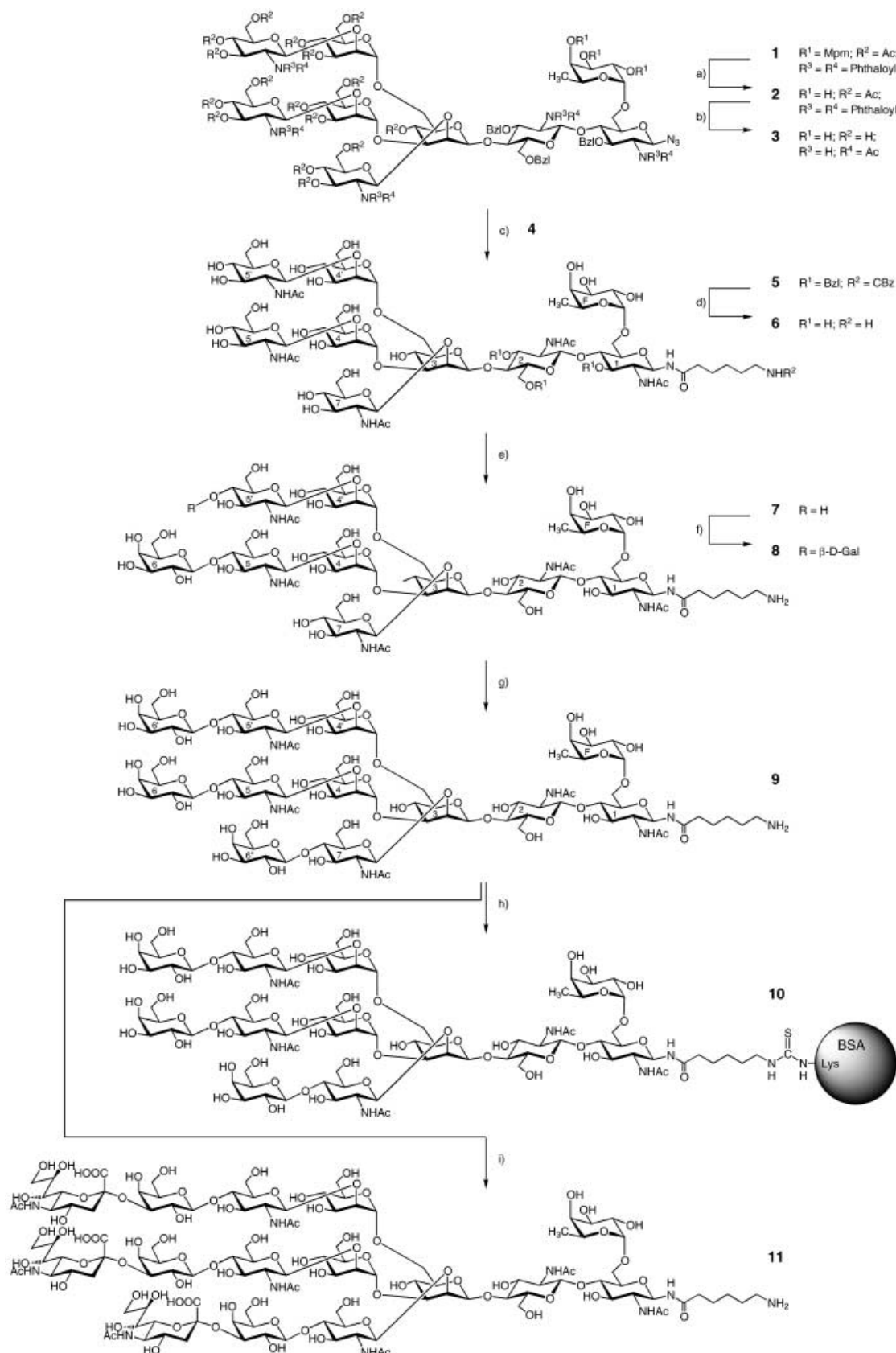
Die Struktur von **6** wurde durch Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)^[11] und eine Reihe von zweidimensionalen NMR-Experimenten (COSY, TOCSY, HMQC, HMQC-COSY, NOESY)^[12] bestätigt. Verbindung **6**^[13] und das isolierte LEC14-Nonasaccharid^[3] unterscheiden sich nur in ihrem Aglycon, entweder Aminohexansäure in **6** oder Asparagin im isolierten LEC14. Trotz dieser unterschiedlichen Aglycone weisen beide Verbindungen nahezu identische Protonenresonanzen auf (Tabelle 1).

Aus dem hohen Grad an Übereinstimmung im anomeren „Fingerprint“-Bereich^[14] schlussfolgerten wir, dass die Strukturzuordnung^[3] korrekt ist, die aus den Analysen der geringen Mengen an isoliertem LEC14-Nonasaccharid-Asparagin abgeleitet wurde. Auch die β -1,2-Verknüpfung des GlcNAc-Rests mit dem zentralen β -Mannosid (LEC14-Motiv) wurde somit durch Totalsynthese des gesamten *N*-Glycans bestätigt.

Anschließend wurde die Überführung von **6** in ein Neoglycoprotein vorbereitet. Zum Aufbau der biologisch relevanten Galactoseendgruppen bei *N*-Glycanen sind enzymatische Methoden hervorragend geeignet.^[15] Verbindung **6** trägt zwei terminale *N*-Acetylglucosaminreste, 5 und 5' (Schema 1), die bekanntlich leicht durch Galactosyltransferase (EC 2.4.1.22) verlängert werden können. Eine unter

[*] Prof. C. Unverzagt, I. Prah
Bioorganische Chemie, Gebäude NW1
Universität Bayreuth, 95440 Bayreuth (Deutschland)
Fax: (+49)921-555365
E-mail: carlo.unverzagt@uni-bayreuth.de

[**] Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Fonds der Deutschen Chemischen Industrie sowie Aventis Research and Technology für finanzielle Unterstützung. Weiterhin danken wir Roche Diagnostics für Chemikalien.



Schema 1. Synthese von LEC14-Konjugaten: a) $[(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6]$ (CAN), $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, 80°C (71 %); b) 1. Ethylendiamin, $n\text{BuOH}$, 80°C ; 2. Ac_2O , Pyridin; 3. MeNH_2 (41 %) in H_2O (96 % für Stufen 1–3); c) 1. Propandithiol, NEt_3 , MeOH ; 2. CBZ-Aminohexansäure **4**, TBUTU, HOBT, *N*-Methylpyrrolidon (31 % für Stufen 1–2 nach RP-HPLC); d) $\text{PdO}/\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2$, MeOH/AcOH (95 %); e, f, g) UDP-Galactose (1 Äquiv.), Galactosyltransferase, alkalische Phosphatase (80 %, 84 % bzw. 88 %); h) 1. Thiophosgen, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$, NaHCO_3 ; 2. BSA, H_2O , NaHCO_3 ; i) CMP-*N*-Acetylneuraminsäure (CMP-Neu5Ac), α -2,3-Sialyltransferase, alkalische Phosphatase (Ausbeute nicht bestimmt). Mpm = *p*-Methoxybenzyl, Ac = Acetyl, Bzl = Benzyl, CBz = Carbobenzyloxy.

Tabelle 1. Vergleich der ^1H -NMR-Daten von **6** mit denen von isoliertem LEC14. Die Spektren wurden in D_2O mit DMSO (**6**) oder Aceton (isoliertes LEC14) als internem Standard aufgenommen. H-6^F von Verbindung **6** wurde zum besseren Vergleich auf H-6^F des isolierten LEC14 geeicht.

Verb.	1 ¹	1 ²	1 ³	1 ⁴	1 ^{4'}	1 ⁵	1 ^{5'}	1 ⁷	1 ^F	6 ^F
6	5.03	4.71	4.77	5.11	4.89	4.49	4.53	4.69	4.87	1.20
LEC14 ^[3]	5.07	4.57	(4.75)	5.11	4.88	4.54	4.54	4.68	4.86	1.20

[a] Ringbezeichnung laut Schema 1.

Verwendung von Galactosyltransferase, alkalischer Phosphatase^[16] und einem Überschuss an Uridin-5'-diphospho(UDP)-Galactose durchgeführte Reaktion unter für *N*-Glycane optimierten Bedingungen ergab jedoch überraschenderweise nicht nur das erwartete Undecasaccharid **8**, sondern auch das Dodecasaccharid **9**.

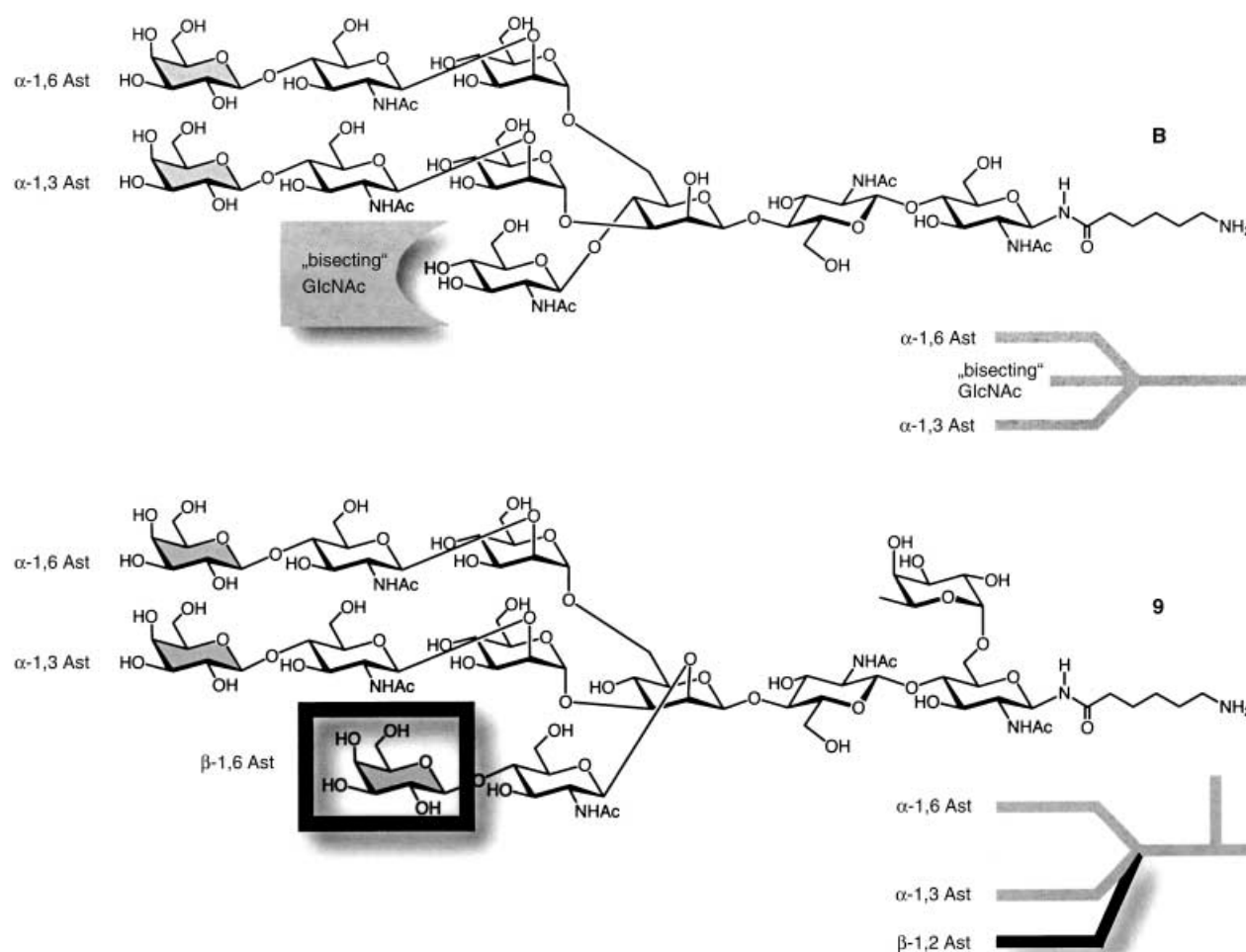
Beide Strukturen wurden später durch ESI-MS und zweidimensionale Hochfeld-NMR-Spektroskopie bestätigt. **9** trägt einen zusätzlichen Galactoserest am β -1,2-verknüpften GlcNAc-Rest. Das Auftreten dieser neuartigen enzymatischen Verlängerung war sehr ungewöhnlich, da eine enzymatische Galactosylierung des homologen β -1,4-verknüpften einzelnen *N*-Acetylglucosaminrests in *N*-Glycanen vom „Bisecting“-Typ (Verbindung **B**; Schema 2) nicht beschrieben wird.^[17,18] Da allerdings das isolierte LEC14-Asparagin durch

eine Reihe von Glycosidase-Reaktionen erhalten wurde, ist es möglich, dass die ungewöhnliche Verlängerung während der Isolierung verloren gegangen ist.

Um die Regioselektivität der unerwarteten enzymatischen Verlängerung von **6** genauer zu untersuchen, wurde nur ein Äquivalent UDP-Galactose bei der Galactosyltransferase-

reaktion verwendet. Nach der Größenausschlusschromatographie wurde das Decasaccharid **7** in 80 % Ausbeute erhalten. Die Galactosylierung von **6** zeigte eine hohe Selektivität für den α -1,3-Ast (α -1,3-Ast/ α -1,6-Ast > 3.8:1). Dies stimmt mit der bekannten Präferenz von Glycosyltransferasen für den α -1,3-Ast von *N*-Glycanen überein.^[19] Die nachfolgende Galactosylierung von **7** mit einem Äquivalent UDP-Galactose ergab das Undecasaccharid **8**. Während dieses Schritts wurde das Dodecasaccharid **9** gebildet (**8/9** ungefähr 4:1). Die Verbindungen **8** und **9** konnten nicht durch Größenausschlusschromatographie getrennt werden.

In einer letzten Reaktion wurde **8** mit einem Überschuss an UDP-Galactose zur mehrfach (per-) galactosylierten Verbindung **9** mit 88 % Ausbeute umgesetzt. Die Galactosylierung



Schema 2. Enzymatische Bildung des β -1,2-Asts als neuartiges Verzweigungsmotiv, das den β -1,2-verknüpften GlcNAc-Rest des LEC14-Konjugats **9** verlängert. Im Gegensatz dazu tritt am „bisecting“ GlcNAc-Rest der homologen biantennären Verbindung **B** keine enzymatische Verlängerung auf.

der verschiedenen GlcNAc-Reste findet in folgender Reihenfolge statt (durch NMR-Spektroskopie ermittelt): α -1,3-Ast > α -1,6-Ast > β -1,2-verknüpftes GlcNAc. Die geringe Zugänglichkeit des ungewöhnlichen β -1,2-verknüpften GlcNAc-Rests scheint sich mit der geringsten Reaktivität gegenüber Galactosyltransferase zu decken.

Da eine Pergalactosylierung leicht erzielt werden konnte, wurde auch die enzymatische Persialylierung untersucht. Die Sialylierung erfolgte durch Inkubation von **9** mit α -2,3-Sialyltransferase (E.C. 2.4.99.6), alkalischer Phosphatase^[16] und einem Überschuss an Cytidin-5'-monophospho(CMP)-*N*-Acetylneuraminsäure als Donorsubstrat. Nach zwei Stunden konnten durch ESI-MS ein-, zwei- und eine kleine Menge dreifach sialylierte Verbindungen nachgewiesen werden. Nach zwei Tagen war die persialylierte Verbindung **11** gemäß ESI-MS das Hauptprodukt.

Um die Ligandeigenschaften des galactosylierten LEC14-*N*-Glycans **9** zu untersuchen und mit denen von Core-fucosylierten,^[7] „bisecting“^[18] oder unsubstituierten^[7,20] *N*-Glycanen vergleichen zu können, wurde das Neoglycokonjugat **10** synthetisiert. Zunächst wurde die freie Aminogruppe von **9** in ein Isothiocyanat überführt,^[21] das danach an kohlenhydratfreies Rinderserumalbumin (BSA) gekuppelt wurde. Auf dem gereinigten Neoglycokonjugat **10** wurde eine Ligandenbelegung von durchschnittlich 3.2 *N*-Glycanen pro Trägerprotein durch einen kolorimetrischen Test^[22] ermittelt. Dieser Belegungsgrad konnte auch durch MALDI-TOF-Spektrometrie bestätigt werden. **10** kann nun zur Untersuchung der bisher unbekannten biologischen Eigenschaften des galactosylierten LEC14-*N*-Glycans eingesetzt werden.^[20]

Wir konnten durch die Totalsynthese zeigen, dass die Struktur des LEC14-Motivs korrekt ist und dass der einzelne GlcNAc-Rest am zentralen β -Mannosid enzymatisch zu einem dritten Ast aufgebaut werden kann. Das Auftreten dieses verlängerten β -1,2-Asts in vitro legt die Vermutung nahe, dass dieser zusätzliche Zweig auch im Zellsystem erzeugt wird, was die strukturelle Variabilität von *N*-Glycanen deutlich erweitert.

Eingegangen am 31. Mai 2002 [Z19414]

4.84 (d, $J_{1,2} = 9.7$ Hz, 1 H, H-1¹), 4.70 (d, $J_{1,2} < 1.0$ Hz, 1 H, H-1⁴), 4.68 (d, $J_{1,2} = 3.2$ Hz, 1 H, H-1^F), 4.58 (d, $J_{1,2} < 1.0$ Hz, 1 H, H-1³), 4.52 (d, $J_{1,2} = 8.4$ Hz, 1 H, H-1²), 4.50 (d, $J_{1,2} = 8.4$ Hz, 1 H, H-1⁷), 4.34 (d, $J_{1,2} = 8.4$ Hz, 1 H, H-1⁵), 4.30 (d, $J_{1,2} = 8.4$ Hz, 1 H, H-1⁵), 4.18 (m, 1 H, H-2³), 3.97–3.91 (m, 2 H, H-2⁴, H-5^F), 3.87 (m, 1 H, H-2⁴), 3.79–3.19 (m, 47 H, H-5⁴, H-6a⁴, H-6a⁵, H-6a⁶, H-6a⁷, H-3⁴, H-6a⁴, H-6a², H-3^F, H-3², H-2¹, H-3⁴, H-6a³, H-3³, H-6b³, H-2^F, H-4^F, H-6b³, H-6b⁵, H-6b⁷, H-3¹, H-4¹, H-2², H-6b², H-5¹, H-6b¹, H-2⁵, H-2⁷, H-2⁵, H-5², H-4³, H-6b⁴, H-5³, H-6b⁴, H-4², H-3⁵, H-3⁷, H-3⁵, H-5⁴, H-4⁴, H-4⁵, H-4⁷, H-5⁵, H-4⁵, H-5⁵), 3.13 (m, 1 H, H-5⁷), 2.70 (t, $J_{\delta,\epsilon} = 7.1$ Hz, 2 H, ϵ -CH₂), 2.08 (t, $J_{\alpha,\beta} = 7.1$ Hz, 2 H, α -CH₂), 1.89, 1.85, 1.84, 1.83, 1.80 (5s, 15 H, NAc), 1.46–1.36 (m, 4 H, δ -CH₂, β -CH₂), 1.14 (m, 2 H, γ -CH₂), 1.01 ppm (d, $J_{5,6} = 6.5$ Hz, 3 H, H-6^F). ¹³C-NMR (125 MHz, D₂O, [D₆]DMSO als interner Standard; chemische Verschiebungen wurden durch eine HMQC-Analyse ermittelt): $\delta = 178.35, 175.70, 175.65, 175.59, 175.52, 174.91$ (C=O), 102.74 (C-1³), 102.36 (C-1⁷), 102.04 (C-1²), 101.02 (C-1⁵), 100.94 (C-1⁵), 100.70 (C-1⁵), 100.32 (C-1⁴), 98.29 (C-1⁴), 82.72 (C-4²), 80.23 (C-4¹), 79.63 (C-1¹), 78.61 (C-3³), 77.86 (C-2⁴, C-2⁴), 77.28 (C-5⁷), 77.16 (C-5⁵, C-5⁵), 76.42 (C-5¹), 76.28 (C-2³), 75.68 (C-5³), 75.47 (C-5²), 74.70 (C-5⁴), 74.55 (C-3⁵), 74.52 (C-3⁷), 74.49 (C-3⁵), 74.23 (C-5⁴), 73.86 (C-3¹), 73.19 (C-3²), 73.09 (C-4^F), 71.20 (C-4⁷), 71.18 (C-4², C-4⁵), 70.82 (C-3^F), 70.74 (C-3⁴), 70.61 (C-3⁴), 69.45 (C-2^F), 68.64 (C-4⁴), 68.55 (C-4⁴), 68.09 (C-6³), 68.04 (C-6¹), 67.96 (C-5^F), 67.88 (C-4³), 62.92 (C-6⁴), 62.72 (C-6⁴), 61.87 (C-6⁵), 61.83 (C-6⁵), 61.68 (C-6⁷), 61.37 (C-6²), 56.96 (C-2⁷), 56.70 (C-2⁵), 56.64 (C-2⁵), 56.34 (C-2²), 55.12 (C-2¹), 40.69 (C-6 AH), 36.77 (C-2 AH), 28.75 (C-5 AH), 26.36 (C-4 AH), 25.85 (C-3 AH), 23.87, 23.71, 23.38 (NAc), 16.80 ppm (C-6^F).

- [14] L. Dorland, H. van Halbeek, J. F. Vliegthart, R. Schauer, H. Wiegandt, *Carbohydr. Res.* **1986**, *151*, 233–245.
- [15] C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2507–2510; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2350–2353.
- [16] C. Unverzagt, H. Kunz, J. C. Paulson, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9308–9309.
- [17] S. Narasimhan, J. C. Freed, H. Schachter, *Biochemistry* **1985**, *24*, 1694–1700.
- [18] C. Unverzagt, J. Seifert, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*(23), 4549–4553.
- [19] D. H. Joziassie, W. E. Schiphorst, D. H. Van den Eijnden, J. A. Van-Kuik, H. Van Halbeek, J. F. Vliegthart, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 2025–2033.
- [20] S. André, C. Unverzagt, S. Kojima, X. Dong, C. Fink, K. Kayser, H. J. Gabius, *Bioconjugate Chem.* **1997**, *8*, 845–855.
- [21] C. R. McBroom, C. H. Samanen, I. J. Goldstein, *Methods Enzymol.* **1972**, *28*, 212–219.
- [22] M. Monsigny, C. Petit, A.-C. Roche, *Analyt. Biochem.* **1988**, *175*, 525–530.

- [1] W. Tanner, *Glyco- and Cellbiology*, Springer, Heidelberg, **1994**, S. 81–89.
- [2] B. Lowe, A. Varki, *Essent. Glycobiol.* **1999**, 253–266.
- [3] T. S. Raju, P. Stanley, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 7484–7493.
- [4] T. S. Raju, P. Stanley, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 14090–14098.
- [5] C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2078–2081; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1989–1992.
- [6] I. Prahl, C. Unverzagt, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 10189–10193.
- [7] C. Unverzagt, S. André, J. Seifert, S. Kojima, C. Fink, G. Srikrishna, H. Freeze, K. Kayser, H. J. Gabius, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 478–491.
- [8] J. Seifert, C. Unverzagt, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 7857–7860.
- [9] O. Kanie, S. C. Crawley, M. M. Palcic, O. Hindsgaul, *Carbohydr. Res.* **1993**, *243*, 139–164.
- [10] A. Bayley, D. N. Standring, J. R. Knowles, *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19*, 3633–3634.
- [11] ESI-MS (Methanol) von **6**: $M_{\text{ber}} = 1777.72$; $M_{\text{gef}} = 1778.8$ [$M+H$]⁺, 1800.8 [$M+Na$]⁺.
- [12] a) H. Kessler, M. Gehrke, C. Griesinger, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 507–554; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 490–536; b) H. Kessler, P. Schmieder, M. Kurz, *J. Magn. Reson.* **1989**, *65*, 400–405.
- [13] Verbindung **6**: $[\alpha]_D^{25} = -18.6^\circ$ (1.1, H₂O); ¹H-NMR (500 MHz, D₂O, [D₆]DMSO als interner Standard): $\delta = 4.92$ (d, $J_{1,2} < 1.0$ Hz, 1 H, H-1⁴),