

Synthesis of Modified Oligosaccharides of *N*-Glycoproteins Intended for Substrate Specificity Studies of *N*-Acetylglucosaminyltransferases II-V

Hans Paulsen* und Ernst Meinjohanns

Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg, Martin-Luther-King-Platz 6, D-2000 Hamburg 13, Germany

Abstract: Effective synthesis of the tetrasaccharide 1, substrate for GlcNAc-T II, the pentasaccharide 9, substrate for GlcNAc-T III-V, and the modified analogues 2-8 and 10-14 are developed by linking the corresponding building blocks using the trichloroacetimidate method. The specific modified substrate analogues 2-8 and 10-14 can be applied to studies of the substrate specificity of GlcNAc-T II and GlcNAc T III-V, respectively. The modified tetrasaccharide 8 and the pentasaccharide 14 can be used also as potential specific substrate for GlcNAc-T IV and GlcNAc-T V, respectively.

Bei der Biosynthese der *N*-Glycoproteine erfolgt der spezifische Aufbau der Kohlenhydratketten innerhalb des Trimming Prozesses in den Zisternen des Golgi-Apparates unter Mitwirkung von mindestens sechs hochspezifischen *N*-Acetylglucosaminyltransferasen (GlcNAc-T I-VI)^{1,2}. Als aktiviertes Substrat zur Übertragung der β -D-GlcNAc-Einheit auf die "Core-Region" der *N*-Glycoproteine (Abb.1) benutzen die GlcNAc-Transferasen I-VI UDP-GlcNAc.

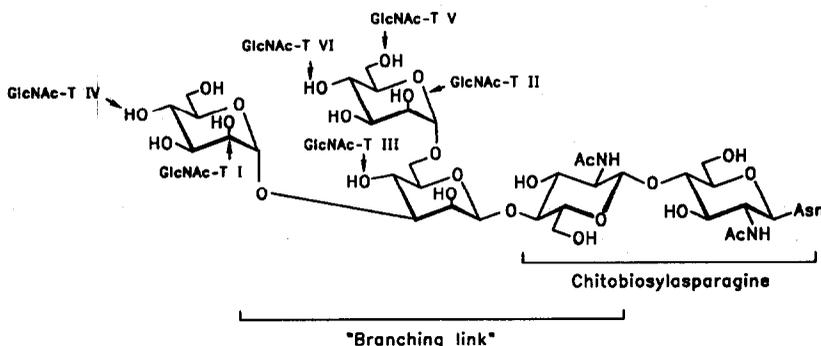


Abb.1: Unterschiedliche Verzweigungen der "Core Region" durch die GlcNAc-Transferasen I-VI

Die große Spezifität der GlcNAc-Transferasen beruht auf der speziellen Struktur des Oligosaccharid-Akzeptors und dessen Wechselwirkungen mit dem Enzym. Spezifische Modifikationen der Oligosaccharid-Akzeptoren geben Informationen über die Bindungsspezifität der GlcNAc-Transferasen, die dann eine sinnvolle Entwicklung spezifischer Inhibitoren der GlcNAc-Transferasen erleichtern.

Eine große Vereinfachung bei der Synthese von Substrat-Analoga stellt die Tatsache dar, daß die Chitobiosylasparagin-Einheit am reduzierenden Ende der "Core Region" der *N*-Glycoproteine durch einen hydrophoben Spacer ersetzt werden kann, ohne daß die Oligosaccharide dabei ihre Substrateigenschaften verlieren³.

Die vorliegende Untersuchung beschreibt die Synthese der modifizierten Substrat-Analoga 1-8 und 9-14, die zur Bestimmung der Substratspezifität der GlcNAc-T II bzw. der GlcNAc-T III-V dienen sollen. Das modifizierte Tetrasaccharid 8 und das Pentasaccharid 14 können zusätzlich als potentielle spezifische Substrate für die GlcNAc-T IV bzw. V eine Anwendung finden.

Die Synthese der modifizierten Substrat-Analoga 1-14 erfolgte durch Verknüpfung der entsprechend modifizierten Syntheseblöcke mittels der Trichloracetimidat-Methode in einer kombinatorischen Synthesestrategie (s.h. Abb.2). Diese Glycosylierungsmethode führte auch bei Verwendung der desoxygenierten D-Mannose-Imidate 16 und 17 bzw. der desoxygenierten Disaccharidimide 22-24 zu sehr guten Ergebnissen. Zur Synthese der modifizierten Oligosaccharide 1-14 wurden zwei verschiedene Synthesewege beschritten. Für die Synthesen wurde ein D-Mannose-Akzeptor benutzt, der wie in 19⁴ an 3-OH oder wie in 20⁵ und 21⁵ an 3-OH und 6-OH nicht substituiert ist. Spezifische Modifikationen an C-4 sind in 20 und 21 vorgenommen worden.

Der erste Syntheseweg beruhte auf unseren Erfahrungen, daß die 3-OH Gruppe der D-Mannose bei Glycosidierungen wenig reaktiv ist, wenn die 6-OH Gruppe durch einen Saccharid-Rest und die 4-OH Gruppe durch eine Acetylgruppe substituiert ist. Wir wählten daher einen Syntheseweg bei dem primär die Glycosidierung der 3-OH und sekundär die der 6-OH Gruppe erfolgt. Hierfür ist der D-Mannose-Akzeptor 19 gut geeignet. Primär erfolgt die Glycosidierung der 3-OH Gruppe durch Umsetzung von 19 mit dem Disaccharidimidat 18⁶ zu dem α -(1→3) verknüpften Trisaccharid in Gegenwart von TMS-Triflat bei 0°C in CH₂Cl₂ (85%). Die jeweils an C-3, C-4 und C-6 nach der Barton-McCombie Methode⁷ desoxygenierten Disaccharide konnten analog in Form ihrer Imidate 22,23 und 24 mit dem Aglycon 19 zu den entsprechenden Trisacchariden (69%, 85% und 72%) umgesetzt werden. Nach saurer Abspaltung der Isopropyliden-Gruppe erhielt man quantitativ die entsprechenden 4-OH und 6-OH freien Trisaccharid-Akzeptoren. Jetzt erfolgte eine regioselektive Glycosidierung der 6-OH Gruppe, die aufgrund der unterschiedlichen Reaktivität gegenüber der 4-OH Gruppe möglich ist. Durch Umsetzung der Trisaccharid-Akzeptoren mit äquimolarer Menge des Imidates 15 unter BF₃-Etherat Katalyse bei -20° wurden somit die zunächst blockierten Tetrasaccharide von 1 (72%), 6 (77%) und 7 (55%) erhalten. In analoger Reaktionsführung gelingt die Umsetzung mit dem 4-Desoxy- und dem 6-Desoxy-Imidat 16 und 17 zu den entsprechenden, zunächst noch blockierten Tetrasacchariden von 2 (82%) und 3 (73%). Bei dieser regioselektiven α -(1→6) Glycosidierung ist anzumerken, daß bei Verwendung der peracetylierten D-Mannose-Imidate 15, 16 und 17 die Glycosidierung jeweils über eine intermediäre Orthoester-Bildung verläuft. Die entsprechenden Orthoester konnten chromatographisch isoliert und ¹H-NMR-spektroskopisch charakterisiert werden. Die Umlagerung des Orthoesters in das Glycosid wird durch längere Reaktionszeiten und weitere Zugabe an BF₃-Etherat erreicht.

Alle bei der obigen Reaktionsfolge als Zwischenprodukte auftretenden Trisaccharid-Akzeptoren konnten ebenfalls mit dem Disaccharid-Imidat 18 in Gegenwart katalytischer Mengen an TMS-Triflat bei 0° zu den blockierten Pentasacchariden von 9 (77%), 12 (58%) und 13 (66%) umgesetzt werden.

Zur vollständigen Entblockierung der so erhaltenen Tetra- und Pentasaccharide wurden jeweils die Benzylether hydrogenolytisch an Pd/C und die Acetate mittels Kaliumcarbonat in Methanol entfernt. Abschließende Reinigung der entblockierten modifizierten Oligosaccharide 1,2,3,6,7,9,12 und 13 erfolgte gelchromatographisch an Sephadex LH 20 mit Chloroform/Methanol 1:1 als Laufmittel.

Zur Darstellung der an C-4 der zentralen D-Mannose modifizierten Oligosaccharide wurde ein alternativer Syntheseweg eingeschlagen. Unsere Erfahrungen zeigten, daß eine 4-O-Methyl bzw. eine 4-Desoxy-Gruppierung an den D-Mannose-Akzeptoren 20 und 21 zu einer signifikanten Aktivierung der 3-OH Gruppe bei Glycosidierungen führt⁵. Aus diesem Grund wurde die Glycosidierungsfolge vertauscht. Bei diesem Syntheseweg wird primär die 6-OH Gruppe und sekundär die 3-OH Gruppe glycosidiert.

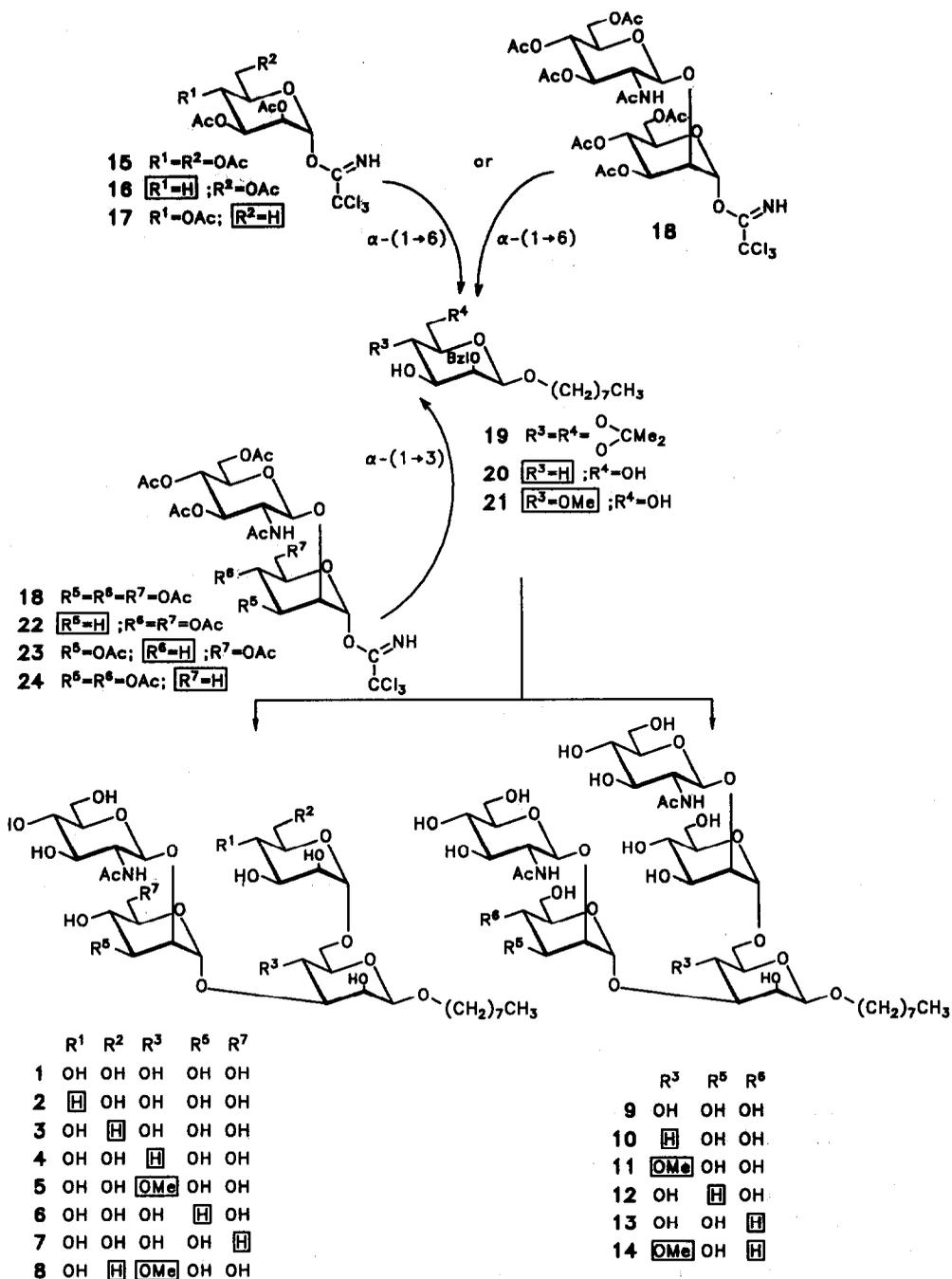


Abb.2: Schema der Synthesewege zur Darstellung der modifizierten Oligosaccharide 1-14

So erfolgte die Umsetzung der an 3-OH und 6-OH unsubstituierten β -D-Mannose-Akzeptoren **20** und **21** mit einer äquimolaren Menge an dem Imidat **15** unter TMS-Triflat Katalyse bei -40° bzw. -20° regioselektiv zu den α -(1 \rightarrow 6) verknüpften Disacchariden in einer Ausbeute von 55 bzw. 87% Prozent. Es ist wichtig, daß die Verknüpfung bei tiefer Temperatur mit nur einem Äquivalent des Imidates **15** durchgeführt wird, da die 3-OH-Gruppe durch die benachbarte Desoxy- bzw. O-Methylgruppierung aktiviert ist und somit leicht zum Trisaccharid weiterreagieren kann. Diese Glycosidierungen verliefen ebenfalls jeweils über einen Orthoester, der sich als Zwischenprodukt nachweisen läßt und der zum Glycosid umgelagert wird. Durch eine anschließende Glycosidierung der 3-OH Gruppe der Disaccharid-Akzeptoren mit dem Disaccharidimidat **18** unter TMS-Triflat-Katalyse bei Raumtemperatur konnten die an C-4 modifizierten, blockierten Tetrasaccharide von **4** und **5** in ausgezeichneten Ausbeuten von 70 bzw. 90% erhalten werden.

Zur Synthese des blockierten Tetrasaccharids von **8** wurde zunächst die 6-OH Gruppe des Akzeptors **21** mit dem an C-6 desoxygenierten Imidat **17** unter TMS-Triflat Katalyse bei -20° in CH_2Cl_2 regioselektiv zum α -(1 \rightarrow 6) verknüpften Disaccharid umgesetzt (65%). Dann erfolgte die Glycosidierung der 3-OH Gruppe mit dem Disaccharidimidat **18** unter TMS-Triflat Katalyse bei Raumtemperatur (76%).

Die Darstellung des geschützten Pentasaccharids von **14** erforderte ebenfalls zunächst eine regioselektive α -(1 \rightarrow 6) Glycosidierung des Akzeptors **21** mit dem Imidat **18** unter TMS-Triflat Katalyse bei -20° (78%). Durch Umsetzung des so erhaltenen Trisaccharid-Akzeptors mit dem an C-4 desoxygenierten Disaccharidimidat **23** unter TMS-Triflat Katalyse bei Raumtemperatur wurde das blockierte Pentasaccharid von **14** in einer ausgezeichneten Ausbeute von 78% erhalten.

Zur Darstellung der an C-4 modifizierten, blockierten Pentasaccharide von **10** und **11** konnten die Akzeptoren **20** und **21** jeweils in einem Schritt an 3-OH und 6-OH mit 2.2 Äquivalenten des Disaccharidimidates **18** unter TMS-Triflat Katalyse bei 0° in CH_2Cl_2 in Ausbeuten von 79 und 91 % umgesetzt werden.

Zur abschließenden Entblockierung wurden wiederum die Benzylether hydrogenolytisch an Pd/C und die Acetate mittels Kaliumcarbonat in Methanol abgespalten. Reinigung der Oligosaccharide **4,5,8,10,11** und **14** erfolgte dann gelchromatographisch an Sephadex LH 20 mit Chloroform/Methanol 1:1 als Laufmittel.

Mittels dieser zwei Synthesewege konnten die 14 modifizierten Substrat-Analoga **1-14** jeweils in nur 4-5 Syntheseschritten erhalten werden. Die Oligosaccharide stehen somit in entblockierter Form für enzymatische Studien der GlcNAc-Transferasen II-V zur Verfügung.

Literatur und Anmerkungen

- 1) H.Schachter, *Biochem.Cell Biol.* **1986**, *64*, 163-181
- 2) I.Brockhausen, E.Hull, O.Hindsgaul, H.Schachter, R.N.Shah, S.W.Michnick, J.P.Carver, *J.Biol.Chem.* **1989**, 11211-11221
- 3) K.J. Kaur, G.Alton, O.Hindsgaul, *Carbohydr.Res.* **1991**, *210*, 145-153
- 4) H.Paulsen, F.Reck, I.Brockhausen, *Carbohydr.Res.* **1992** in press
- 5) H.Paulsen, J.A.L.M.van Dorst, F.Reck, E.Meinjohnans, *Liebigs Ann.Chem.* **1992**, 513-531
- 6) H.Paulsen, B.Helpap, *Carbohydr. Res.* **1991**, *216*, 289-313
- 7) D.H.R. Barton, S.W.McCombie, *J.Chem. Soc.,Perkin Trans I*, **1975**, 1574-1585
- 8) Alle spektroskopischen Daten stimmen mit den angegebenen Strukturen überein