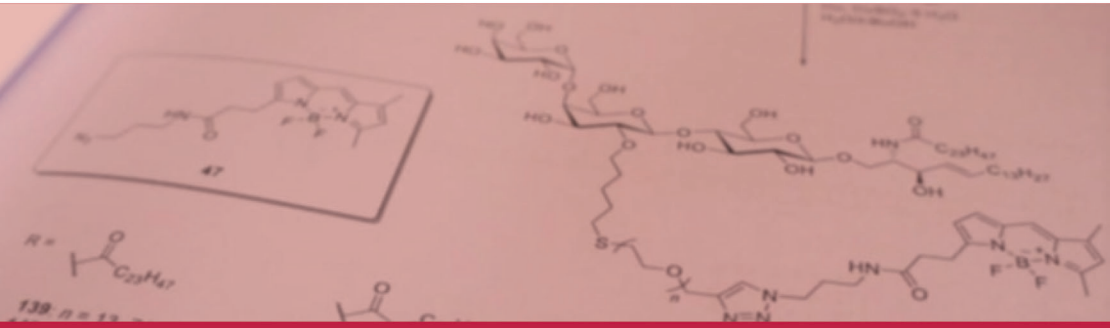
Technische Universität Braunschweig



Julia Katharina Kettelhoit

Synthese fluoreszierender Glycosphingolipide für biophysikalische Untersuchungen

Cuvillier Verlag Göttingen
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag

Synthese fluoreszierender Glycosphingolipide

für biophysikalische Untersuchungen

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Synthese fluoreszierender Glycosphingolipide für biophysikalische Untersuchungen

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften

der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades

einer Doktorin der Naturwissenschaften (Dr.rer.nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Julia Katharina Kettelhoit

aus Hamburg

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliographische Daten sind im Internet über http://dnb.d-nb.de abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen: Cuvillier, 2019

Zugl.: (TU) Braunschweig, Univ., Diss., 2019

1. Referent:	Prof. Dr. Daniel. B. Werz
2. Referent:	Prof. Dr. Stefan Schulz
eingereicht am:	21.01.2019
mündliche Prüfung (Disputation) am:	01.04.2019

Druckjahr 2019
Dissertation an der Technischen Universiät Braunschweig,
Fakultät für Lebenswissenschaften

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2019

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2019

Gedruckt auf umweltfreundlichem, säurefreiem Papier aus nachhaltiger Forstwirtschaft.

ISBN 978-3-7369-7028-1

eISBN 978-3-7369-6028-2

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

1. K. Kettelhoit, D. B. Werz, *Synthesis of Stigmasteryl (β1→4)-Oligoglucosides, J. Carbohydr. Chem.* **2016**, *35*, 24–39.

2. K. Kettelhoit, A. Sasmal, X. Liu, P. Gritsch, D. B. Werz, *Simple Preparation of Dimethyldioxirane and its Use as Epoxidation Agent for the Transformation of Glycals to Glycosyl Phosphates* in *"Carbohydrate Chemistry: Proven Synthetic Methods, Vol 4 (Ed.: P. Murphy, C. Vogel),* CRC Press, Taylor & Francis Group, Milton, **2017**.

Posterbeiträge

1. *Synthesis of Fluorescently Labeled Glycosphingolipids for Biophysical Investigations*, 6. Jungchemiker-Tagung, Braunschweig (Deutschland) **2015**.

2. *Synthesis of Fluorescently Labeled Glycosphingolipids for Biophysical Investigations*, 19th European Symposium of Organic Chemistry, Lissabon (Portugal), **2015**.

3. *Synthesis of Fluorescently Labeled Glycosphingolipids for Biophysical Investigations*, 7. Jungchemiker-Tagung, Braunschweig (Deutschland), **2016**.

4. *Synthesis of Fluorescently Labeled Glycosphingolipids for Biophysical Investigations*, ORCHEM, Weimar (Deutschland), **2016**.

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Kohlenhydrate 1

1.2 Plasmamembranen 9

1.2.1 Glycosphingolipide 14

1.2.2 *Shiga*-Toxin und Gb_3 21

1.3 Fluoreszierende Glycosphingolipide 23

2 Aufgabenstellung 31

2.1 Synthese fluoreszierender Glycosphingolipide 31

2.2 Synthese von Stigmasteryloligoglucosiden 33

2.3 Synthese von azidsubstituierten Glucosphingolipiden 34

3 Ergebnisse 37

3.1 Synthese fluoreszierender Glycosphingolipide 37

3.1.1 Retrosynthetische Überlegungen und Planung 37

3.1.2 Synthese der modifizierten Globotriose-Bausteine 43

3.1.3 Synthese von D-*erythro*-Azidosphingosin 61

3.1.4 Glycosphingolipid-Synthese 69

3.2 Synthese von Stigmasteryloligoglucosiden 77

3.3 Synthese von azidsubstituierten Glucosphingolipiden 81

4 Zusammenfassung und Ausblick 89

5 Experimentalteil 97

5.1 Allgemeine Methoden 97

5.1.1 Präparative Methoden 97

5.1.2 Chromatographische Methoden 97

5.1.3 Instrumentelle Analytik 98

5.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften 99

5.3 Synthese fluoreszierender Glycosphingolipide 101

5.4 Synthese von Stigmasteryloligoglucosiden 153

5.5 Synthese von azidsubstituierten Glucosphingolipiden 167

6 Literaturverzeichnis 181

7 Abkürzungsverzeichnis 191

Anhang 195

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

1 Einleitung

1.1 Kohlenhydrate

Kohlenhydrate bilden die am häufigsten vorkommende Stoffklasse unter den Biomolekülen. Durch die Photosynthese der Pflanzen werden sie jährlich im Maßstab von circa 200 Milliarden Tonnen produziert.[1,2] In Form von Cellulose (**1**) und Chitin verleihen sie als Strukturpolysaccharide Zellen und Organismen mechanische Stabilität. Wasserbindende Polysaccharide wie Hyaluronsäure und Agarose verhindern das Austrocknen von Zellen und aus den Reservepolysacchariden Stärke (**2**) und Glycogen lassen sich kürzere Bruchstücke zur Energiegewinnung freisetzen.[3]

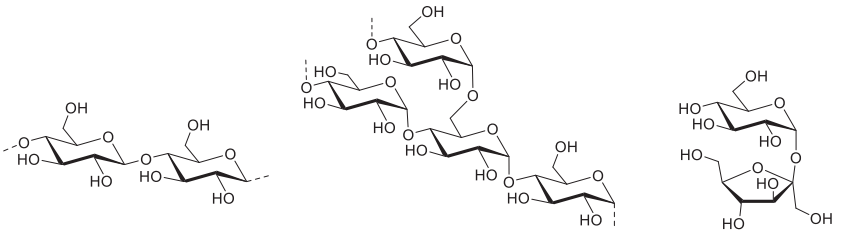


Abbildung 1.1-1: Ausschnitte aus der Struktur von Cellulose (**1**) und Amylopektin (Stärke) (**2**) und die Struktur von Saccharose (**3**) zeigen die strukturelle Vielfalt von Oligosacchariden.

Darüber hinaus sind komplexe Oligosaccharide wichtige Informationsträger. Als Glycolipide und Glycoproteine, die man unter dem Oberbegriff Glycokonjugate zusammenfasst, fungieren sie an der Oberfläche von Zellen bzw. Zellorganellen als Rezeptorstellen für Enzyme, Hormone, Antikörper, Toxine und weitere kohlenhydratbindende Proteine. Derartige Protein-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen sind dabei an vielen grundlegenden biologischen Prozessen beteiligt. Sie ermöglichen beispielsweise die Kommunikation zwischen Zellen und ihrer Umgebung, sie markieren Proteine für den Transport oder für die Weiterverarbeitung und sie sind Erkennungsstellen für extrazelluläre Signalmoleküle. Das Gebiet der Glycobiologie widmet sich der Erforschung dieser Wechselwirkungen. Ein Zucker-Code zur Speicherung und Weitergabe von Informationen bildet ein wichtiges „biochemisches Alphabet“. Durch die Anzahl von Verknüpfungs- und Verzweigungsmöglichkeiten, unterschiedlichen Ringgrößen und anomeren Konfigurationen in jedem einzelnen Monosaccharid, wie aus den Strukturen von Amylopektin (**2**) aus Stärke, Cellulose (**1**) und Saccharose (**3**) deutlich wird (Abbildung

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

1.1-1), ist die Zahl möglicher Oligomere, die aus gleicher Anzahl Monomere gebildet werden können, jedoch deutlich größer als bei Aminosäuren und Nukleinsäuren. Aus Zuckern lassen sich daher Strukturen mit einzigartig hoher Informationsdichte bilden.[4,5]

Schutzgruppen und Glycosylierungsmethoden

Um die Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen, von denen die meisten noch nicht vollends aufgeklärt sind, erforschen zu können, werden die jeweiligen Kohlenhydratstrukturen in hoher Reinheit benötigt. Während für die Synthese von langkettigen Peptiden und Nukleinsäuren etablierte automatisierte Verfahren existieren, fehlen vergleichbar einfache Methoden für den Aufbau komplexer Kohlenhydratstrukturen. Material, das aus biologischen Systemen isoliert wird, ist oft nicht homogen in seiner Zusammensetzung, da das Glycosylierungsmuster von Zellen des gleichen Typs natürlichen Schwankungen (Mikroheterogenität) unterliegt. Außerdem liegen die isolierten Substanzen meist nicht in ausreichender Menge für nähere Untersuchungen vor. Hierin begründet sich die Wichtigkeit der chemischen Synthese. Sie ermöglicht den Zugang zu komplexen Oligosacchariden und Glycokonjugaten. Außerdem können durch chemische Synthese gezielt Modifikationen der natürlich vorkommenden Verbindungen dargestellt und ihre Eigenschaften im biologischen Kontext erprobt werden.

Die größte Herausforderung besteht dabei stets aus der regio- und stereoselektiven Knüpfung der glycosidischen Bindung und der selektiven Manipulation einzelner funktioneller Gruppen. Um die bis zu fünf verschiedenen Hydroxygruppen eines Monosaccharids unterscheiden zu können, bedient man sich verschiedenster Schutzgruppen. Eine ideale Schutzgruppe erfüllt dabei folgende Kriterien: i) Sie lässt sich unter milden Reaktionsbedingungen selektiv in hoher Ausbeute einführen. ii) Sie muss unter allen weiteren verwendeten Reaktionsbedingungen und während aller Aufreinigungsschritte stabil sein. iii) Sie muss, gegebenenfalls in Gegenwart anderer Schutzgruppen, selektiv und in hohen Ausbeuten wieder abgespalten werden können. Bei mehreren zu schützenden Gruppen in komplexen Verbindungen ist es zudem sinnvoll, das Schutzgruppenmuster möglichst früh in der Synthese zu vereinheitlichen, damit am Ende der Synthese eine globale Entschützung in möglichst wenigen Schritten möglich ist. Die Schutzgruppenstrategie einer Synthese kann auf der Verwendung von orthogonalen Schutzgruppen oder auf dem Prinzip abgestufter Labilität beruhen. Orthogonale Schutzgruppen werden unter unterschiedlichen Bedingungen entfernt und lassen sich daher

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

zu jedem Zeitpunkt der Synthese in beliebiger Reihenfolge abspalten, ohne dass die anderen Schutzgruppen beeinflusst werden. Schutzgruppen abgestufter Labilität weisen eine gemeinsame, aber unterschiedlich ausgeprägte Empfindlichkeit gegenüber den gleichen Reaktionsbedingungen auf. Permanente Schutzgruppen sind solche, die bis zum Ende der Synthese im Molekül erhalten bleiben, während temporäre Schutzgruppen lediglich die selektive Durchführung einzelner Schritte einer ganzen Synthese ermöglichen.[6,7]

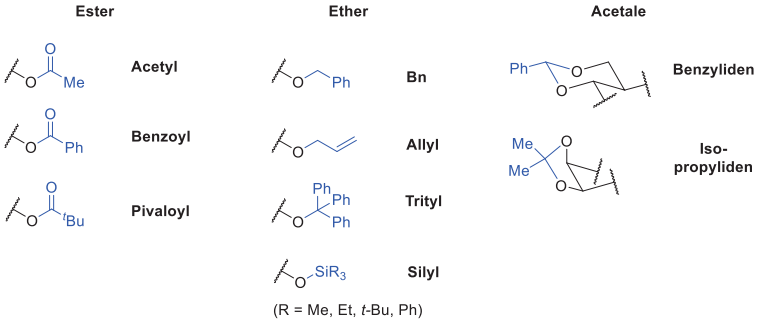


Abbildung 1.1-2: Typische Schutzgruppen für die Hydroxygruppen von Kohlenhydraten sind Ester, Ether und Acetale.

Im Bereich der Kohlenhydratchemie kommen üblicherweise Ester, Ether, darunter auch Silylether, und Acetale als Schutzgruppen zum Einsatz (Abbildung 1.1-2). Acylschutzgruppen werden in der Regel mit dem entsprechenden Säureanhydrid oder -chlorid eingeführt und unter basischen Bedingungen wieder entfernt. Mit zunehmendem sterischem Anspruch des Säurerests steigt die Stabilität des Esters. Insbesondere Acetylgruppen weisen die Tendenz auf, intra- oder intermolekular die Position zu wechseln. Eine solche Migration wird vor allem von sekundären auf primäre Hydroxygruppen, auf die Hydroxygruppe des anomeren Zentrums und auf Aminogruppen in Aminozuckern beobachtet. Die sterisch anspruchsvollere Pivaloylgruppe ist hier oft eine gute Alternative. Der *tert*-Butylrest unterdrückt zudem die Bildung unerwünschter Orthoester. Substituierte Derivate wie Chloracetyl- und Bromacetylgruppen sind orthogonal zu Acetylgruppen und können selektiv mit Thioharnstoff oder Hydrazin entfernt werden. In Molekülen mit mehreren Acylschutzgruppen ist es möglich, die anomere Position selektiv zu entschützen. Dies wird häufig genutzt, um aus vollständig geschützten Derivaten für Glycosylierungsreaktionen aktivierte Trichloracetimidatdonoren herzustellen.

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

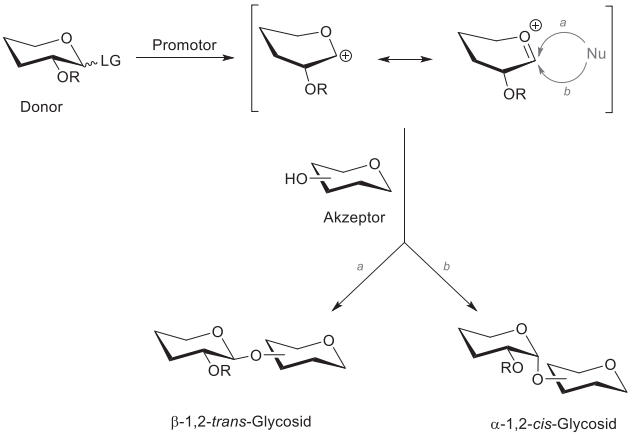
Alkylether sind besonders verlässliche Schutzgruppen für Kohlenhydrate. Sie halten stark basischen sowie den sauren Bedingungen der Glycosylierungsreaktion stand. Methylether sind derart stabil, dass sie nur zu Analysezwecken eingesetzt werden, sich für die Synthese komplexer Oligosaccharide hingegen eher weniger gut eignen. Typischerweise kommen Benzyl- und Allylether zum Einsatz. Benzylether können mittels Hydrogenolyse entfernt werden, während Allylether nach Isomerisierung zum Vinylether instabil werden und dann leicht abgespalten werden können. In der Regel werden Etherschutzgruppen über eine *Williamson*-Ethersynthese eingeführt. Liegt die anomere Hydroxygruppe ungeschützt vor, können die basischen Reaktionsbedingungen allerdings zu Problemen führen. In Zuckern mit mehreren ungeschützten Hydroxygruppen können Benzylgruppen selektiv eingeführt werden, indem zunächst die entsprechenden Zinnether bzw. -acetale dargestellt werden. Der substituierte *para*-Methoxybenzylether verhält sich orthogonal zur Benzylschutzgruppe, da er unter oxidativen Bedingungen gespalten werden kann. Die Tritylgruppe ist mit ihren drei sterisch anspruchsvollen Phenylsubstituenten eine wichtige Schutzgruppe für primäre Hydroxygruppen. Silylether sind ein weiterer wichtiger Schutzgruppentyp in der Kohlenhydratchemie. Sie lassen sich leicht aus den Silylchloriden darstellen und können unter sauren Bedingungen oder mit Fluorid wieder entfernt werden. Je größer die Substituenten am Silicium sind, desto stabiler ist der resultierende Silylether normalerweise.
Zwei benachbarte Hydroxygruppen im Ring können als cyclisches Acetal geschützt werden. Die Umsetzung mit Aceton oder Benzaldehyd in Gegenwart katalytischer Mengen Säure liefert das Isopropyliden- bzw. Benzylidenacetal. Insbesondere Benzylidenacetale haben für die Oligosaccharidsynthese einen besonders großen Wert. Sie können unter sauren Bedingungen oder durch Hydrogenolyse vollständig entfernt werden. Es ist aber auch möglich, das Acetal reduktiv zu öffnen, was zu einem Benzylether und einer freien Hydroxygruppe führt. Die Selektivität der Öffnung lässt sich über die Reaktionsbedingungen steuern (*vide infra*).[2,7,8]

In einer Glycosylierungsreaktion reagiert ein Zuckerbaustein, der in anomerer Position eine Abgangsgruppe trägt, der sogenannte Glycosyldonor, unter Einwirken eines Promotors mit einem Nukleophil, dem Glycosylakzeptor (Schema 1.1-1). Dabei kann der nukleophile Angriff des Akzeptors von zwei Seiten erfolgen, wodurch prinzipiell in einer Glycosylierungsreaktion zwei Diastereomere gebildet werden können. Die Diastereoselektivität der Reaktion hängt dabei von vielen Faktoren wie beispielsweise der Art der Abgangsgruppe, den Schutzgruppen, der Konfiguration des Donors, der Struktur des Akzeptors und vom Lösungsmittel ab. Daher

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

stellt jede Glycosylierung zwischen zwei Substraten ein individuelles Problem dar, für das geeignete Bedingungen gefunden werden müssen.

Um sich den Verlauf der Reaktion zu veranschaulichen, wird meist ein Oxacarbeniumion als Resultat der Aktivierung des Donors durch den Promotor formuliert. Allerdings konnte ein derartiges kationisches Intermediat experimentell bisher lediglich in supersauren Lösungen (HF/SbF_5) nachgewiesen werden.[9] Richtigerweise ist der Mechanismus der Glycosylierungsreaktion eher als ein Kontinuum zwischen S_N1- und S_N2-Mechanismus zu betrachten und verläuft je nach Reaktionsbedingungen mal eher S_N1-artig und mal S_N2-artig.

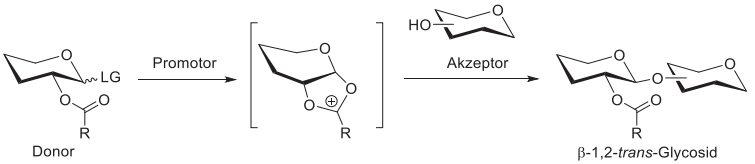


Schema 1.1-1: Allgemeiner Mechanismus einer Glycosylierung ohne Beteiligung der Schutzgruppe R in 2-Position (LG = Abgangsgruppe, Nu = Nukleophil).

Um die gewünschte Regioselektivität zu erreichen, werden bei der chemischen Glycosylierung entsprechend mit Schutzgruppen versehene Blockbausteine (*building blocks*) verwendet, wobei die Wahl der Schutzgruppen einen großen Einfluss auf Reaktivität und Selektivität haben kann. Eine besondere Bedeutung kommt dabei der Schutzgruppe in 2-Position des Glycosyldonors zu. Handelt es sich dabei um eine Schutzgruppe mit Acylfunktionalität, wie beispielsweise bei der Acetyl- oder Benzoylschutzgruppe, kann diese das intermediär auftretende Kation stabilisieren (Schema 1.1-2). Dadurch ist der Angriff des Nukleophils nur noch aus einer Richtung möglich und es kommt zu einer selektiven Bildung des 1,2-*trans*-Glycosids. In einigen Fällen kann aus dem Acyloxoniumion durch einen Angriff des Nukleophils am Carbonylkohlenstoff jedoch auch der unerwünschte Orthoester entstehen.

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Schutzgruppen, die die Diastereoselektivität einer Glycosylierungsreaktion auf diese Art und Weise steuern, werden als partizipierende Gruppen bezeichnet.[8]



Schema 1.1-2: Allgemeiner Mechanismus einer Glycosylierung mit Beteiligung einer Acylgruppe in 2-Position (LG = Abgangsgruppe, R = bspw. Me, Ph, ^{t}Bu).

Befindet sich keine partizipierende Gruppe in 2-Position, kann die Diastereoselektivität der Glycosylierung in gewissem Maße durch das Lösungsmittel beeinflusst werden. Wird der Reaktion beispielsweise Diethylether zugesetzt, kann dieser das Oxacarbeniumion stabilisieren. Aus sterischen Gründen erfolgt die Koordination des Ethers an den Zucker vornehmlich aus äquatorialer Richtung, wodurch das Nukleophil aus axialer Richtung angreift. Zu einer gegenteiligen Selektivität führt die Verwendung von Acetonitril als Lösungsmittel. Nachfolgend sollen einige ausgewählte Glycosylierungsmethoden kurz vorgestellt werden. Die entsprechenden Glycosyldonoren sind in Abbildung 1.1-3 dargestellt.

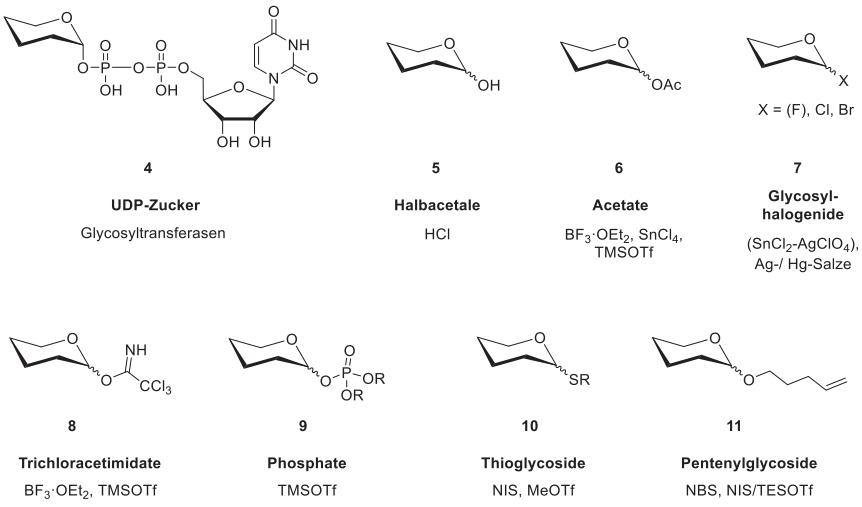


Abbildung 1.1-3: Ausgewählte Glycosyldonoren mit ihren typischen Promotoren. Die geschützten bzw. ungeschützten Hydroxygruppen wurden der Einfachheit halber weggelassen (R = Alkyl).[8]

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Die Natur nutzt zur Synthese von Oligo- und Polysacchariden sowie zur Glycosylierung von Lipiden und Proteinen aktivierte Nukleotidzucker wie den in Abbildung 1.1-3 gezeigten Uridindiphosphat-Zucker **4**, welcher enzymatisch, beispielsweise durch Glycosyltransferasen, mit dem Akzeptor zur Reaktion gebracht wird. Für die chemische Glycosylierung sind Zucker mit freier Hydroxygruppe in anomerer Position die einfachsten denkbaren Glycosyldonoren. *Fischer* berichtete 1893 von der säurekatalysierten Synthese von *O*- oder *S*-Glycosiden einfacher Alkohole ausgehend von solchen reduzierenden Zuckern **5** als Donoren. Da starke Säuren benötigt werden und der Alkohol meist als Lösungsmittel verwendet wird, eignet sich die *Fischer*-Glycosylierung nicht zum Aufbau komplexer Zucker.[10] Anomere Acetate **6** sind leicht zugängliche Substrate. Sie können mit *Lewis*-Säuren wie Bortrifluorid oder Trimethylsilyltrifluormethansulfonat (TMSOTf) aktiviert und mit verschiedensten Alkoholen umgesetzt werden. Jedoch kann die Übertragung der Acetatgruppe auf die freie Hydroxygruppe des Glycosylakzeptors als Nebenreaktion problematisch werden. Analog werden 1-*O*-Alkylphosphate **9** aktiviert. Eine weitere klassische Glycosylierungsmethode ist die *Koenigs-Knorr*-Glycosylierung aus dem Jahr 1901.[11] Bei dieser weit verbreiteten Methode werden Glycosylchloride und -bromide **7** als Glycosyldonoren verwendet, die mit vornehmlich Silber-, aber auch Quecksilbersalzen aktiviert werden. Die Donoren können leicht aus peracetylierten Vorläufern erhalten werden. Allerdings hat die *Koenigs-Knorr*-Methode durch die Instabilität der verwendeten Glycosylhalogenide und die Verwendung stöchiometrischer Mengen der Schwermetallsalze zwei entscheidende Nachteile. Eine gute Alternative stellen Glycosylfluoride dar, da sie deutlich stabiler sind als die Bromide und Chloride. Als Promotor werden *Lewis*-Säuren in stöchiometrischen oder katalytischen Mengen eingesetzt.[12] Setzt man reduzierende Zucker in Gegenwart von Base mit Trichloracetonitril um, erhält man α- und β-konfigurierte Trichloracetimidate **8**. *Schmidt* war 1980 der erste, der diese Verbindungen in Glycosylierungsreaktionen einsetzte, weswegen sie auch als *Schmidt*-Donoren bezeichnet werden.[13] Die Donoren werden mit katalytischen Mengen *Lewis*-Säure, wie beispielsweise Bortrifluorid oder TMSOTf, aktiviert. Da sich bei dieser Methode sehr reaktive Donoren unter relativ milden Bedingungen aktivieren lassen, ist die Trichloracetimidat-Methode eine der verbreitetsten Glycosylierungsreaktionen. Im Vergleich zu den Glycosylhalogeniden sind Glycosyltrichloracetimidate relativ stabil. So lassen sie sich sogar säulenchromatographisch aufreinigen. Die Reaktivität bzw. Stabilität hängt stark von den übrigen Schutzgruppen im Molekül ab. Trichloracetimidatdonoren mit elektronenziehenden Schutzgruppen, wie

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

beispielsweise Acetyl- oder Benzoylgruppen, sind weniger reaktiv, also stabiler, als solche, in denen die Hydroxygruppen als Ether geschützt sind.[2] In Reaktionen von sehr reaktiven Donoren mit unreaktiven Akzeptoren kann es zu einer Umlagerung des Trichloracetimidats zum Glycosyltrichloracetamid kommen, welches sich unter Umständen nur recht mühsam von den Reaktionsprodukten abtrennen lässt. In solchen Fällen muss die Reaktion hinsichtlich der Abfolge der Schritte, der Wahl des Promotors oder der Temperatur angepasst werden. Des Weiteren stellen Thioglycoside **10** in der Kohlenhydratchemie vielseitig einsetzbare Substrate dar. Sie können aus den anomeren Acetaten und dem entsprechenden Thiol, meist Thiophenol oder Thioethanol, unter Einwirken von *Lewis*-Säure oder durch Substitution anomerer Bromide durch Thiolate dargestellt werden. Thioglycoside sind chemisch relativ stabil, beispielsweise ist eine basische Deacetylierung in Gegenwart des anomeren Thioethers möglich. Andererseits lassen sich Thioglycoside mit thiophilen Elektrophilen, wie *N*-Iodsuccinimid oder Methyltriflat, als intermediäre Sulfoniumionen aktivieren, was sie zu wertvollen Glycosyldonoren macht. Auch ihre Umwandlung in andere Glycosyldonoren ist leicht möglich.[2,8] Ebenfalls durch ihre Stabilität bestechen *n*-Pentenylglycoside **11**. Sie lassen sich über die klassischen *Fischer*- oder *Koenigs-Knorr*-Glycosylierungen darstellen. Die Aktivierung dieser Donoren beruht auf der elektrophilen Addition von Halogenen an die Doppelbindung der *n*-Pentenyleinheit. Typischerweise kommen *N*-Iodsuccinimid oder *N*-Bromsuccinimid zum Einsatz. Der intramolekulare Angriff des anomeren Sauerstoffs am Haloniumion, welches aus der Addition resultiert, führt zu einem cyclischen Oxoniumion, welches mit einem Glycosylakzeptor abgefangen werden kann. Als Nebenprodukt bildet sich 2-Halomethyltetrahydrofuran.[2,8] Darüber hinaus existieren diverse weitere Methoden mit verschiedensten Glycosyldonoren, auf die an dieser Stelle nicht eingegangen werden kann.[14] *Paulsen* bemerkte 1982 in einem Übersichtsartikel: *„Man hat […] gelernt, auch Oligosaccharide aufzubauen; es sei aber betont, daß jede Synthese eines Oligosaccharids ein eigenständiges Problem bleiben wird, zu dessen Lösung erhebliche systematische Studien und ein gutes Stück Know-how notwendig sind. Universelle Reaktionsbedingungen wird es für derartige Synthesen kaum geben.“* Zwar sind seitdem viele Jahre vergangen, in denen eine Vielzahl neuer Glycosylierungsmethoden entwickelt wurde, aber seine Feststellung gilt auch heute noch. Für jede Glycosylierungsreaktion muss eine eigene Synthesestrategie entwickelt werden, bei der die Suche nach passenden Blockbausteinen und der optimalen Glycosylierungsmethode ein aufwendiges Unterfangen darstellen kann.

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

1.2 Plasmamembranen

Plasmamembranen legen die äußere Grenze der Zelle fest und regulieren den Stofftransport in und aus der Zelle. Innerhalb der Zelle werden durch Plasmamembranen unterschiedliche Kompartimente geschaffen, die verschiedene Zellbestandteile definieren und biochemische Prozesse räumlich voneinander abgrenzen. Zellmembranen sind semipermeabel. Sie sind durchlässig für lipophile Substanzen, während sie für die meisten polaren oder geladenen Stoffe eine Barriere darstellen. Dadurch werden viele komplexe chemische Reaktionsfolgen ermöglicht und elektrochemische Gradienten zwischen den beiden Seiten einer Membran können entstehen und aufrechterhalten werden.

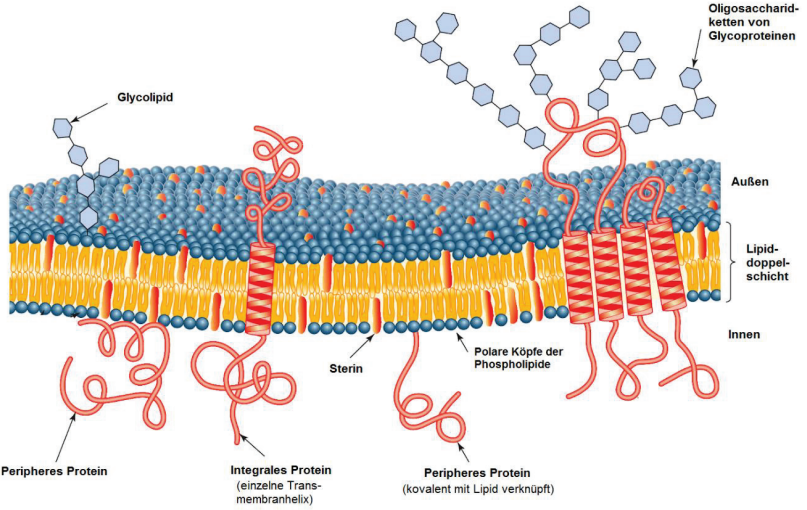


Abbildung 1.2-1: Membranen bestehen aus Lipiden, Proteinen und Kohlenhydraten in Form von Glycolipiden und Glycoproteinen.[15]

Neben Proteinen und Kohlenhydraten stellen Lipide die grundlegenden Bausteine von Plasmamembranen dar. Obwohl Lipide per Definition hydrophob sind, haben die meisten biologisch relevanten Lipide amphiphilen Charakter, da ihr hydrophober Teil an eine polare Kopfgruppe gebunden ist. In wässriger Lösung lagern sich solche amphiphilen Moleküle zu Aggregaten zusammen, in denen die unpolaren Kohlenwasserstoffreste keinen Kontakt zur wässrigen Phase haben, sich ihrerseits aber durch intermolekulare *van-der-Waals*-Wechselwirkungen stabilisieren. Die polaren Kopfgruppen hingegen sind durch das Lösungsmittel solvatisiert. Abhängig von der Art der Lipide bilden sich Cluster verschiedener Form, wie Micellen,

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Liposomen oder Lipiddoppelschichten. Die durch die Aggregation bewirkte Verringerung der hydrophoben Fläche, die mit Wasser in Berührung kommt, wird als hydrophober Effekt bezeichnet und ist vor allem entropisch getrieben.[16,17]

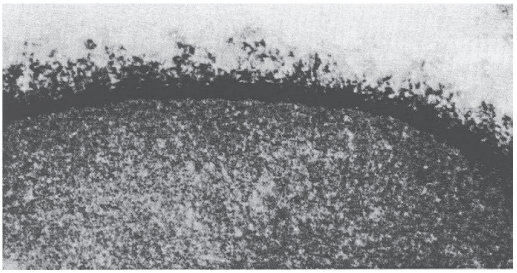


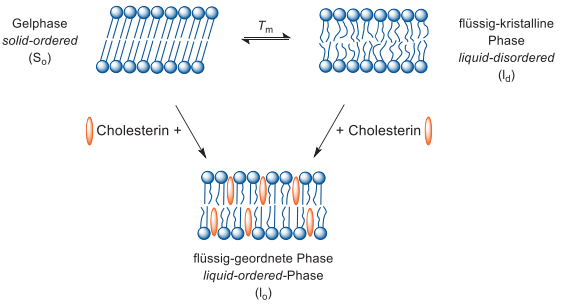
Abbildung 1.2-2: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Glycocalix (ca. 50 nm dick, angefärbt) einer Lymphozytenmembran.[18]

Die Lipide der Plasmamembran sind hauptsächlich Phospholipide, Glycolipide und Sterine. Sie bilden eine Lipiddoppelschicht mit einer Dicke von 5−8 nm, in die integrale Membranproteine und lipidgebundene Proteine eingebettet sind. An die Membranoberfläche sind außerdem durch nicht-kovalente Wechselwirkungen periphere Membranproteine gebunden (Abbildung 1.2-1).[15] Die Beweglichkeit der Lipide in der Doppelschicht hängt von der Temperatur ab. Prinzipiell ist die Lateraldiffusion, also der paarweise Austausch zweier Lipide innerhalb derselben Lage der Doppelschicht, bei physiologischen Temperaturen schnell, weswegen bei Lipiddoppelschichten auch von einer zweidimensionalen Flüssigkeit gesprochen wird. Der unkatalysierte Übergang eines Lipids von einer Lage der Lipiddoppelschicht in die andere, Transversaldiffusion oder *flip flop* genannt, ist hingegen sehr langsam. Auf der Annahme, dass die membrangebundenen Proteine ebenfalls frei innerhalb der Membran diffundieren können, beruht das von *Singer* und *Nicolson* postulierte Flüssig-Mosaik-Modell zur Beschreibung der Organisation von Membranen.[19] Die laterale Mobilität der Membranbestandteile ermöglicht die Wechselwirkung zwischen unterschiedlichen Proteinen oder Proteinen und Lipiden innerhalb einer Lage der Membran, um temporär Domänen zu bilden. Diese Fähigkeit ist entscheidend für viele Funktionen der Membran.[3,20]

Die beiden Lagen der Doppelschicht unterscheiden sich signifikant in ihrer Lipidzusammensetzung und Funktion. So sind beispielsweise Glycolipide und Membranglycoproteine immer so orientiert, dass der Kohlenhydratteil in den extrazellulären Raum ragt. Die Gesamtheit der Kohlenhydratreste, die die äußere Membranschicht bedecken, wird als

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Glycocalix bezeichnet (Abbildung 1.2-2). Der Erhalt bzw. die enzymatische Steuerung der Asymmetrie der Lipiddoppelschicht ist für die Zelle von entscheidender Bedeutung. Die Umverteilung des Lipids Phosphatidylserin von der inneren Lage der Doppelschicht in die exoplasmatische Schicht führt beispielsweise zum programmierten Zelltod, der Apoptose.[21]



Schema 1.2-1: Die Membranfluidität hängt von der Temperatur und der Lipidzusammensetzung ab.

Das Fließvermögen der Membran, Membranfluidität genannt, ist temperaturabhängig (Schema 1.2-1). Unter einer bestimmten Temperatur T_m nimmt die Fluidität und damit die laterale Beweglichkeit der Lipide einer Lipiddoppelschicht stark ab. Es bildet sich ein gelartiger Feststoff, weswegen dieser Zustand Gelphase genannt wird. Die Alkylketten der Lipide sind dicht gepackt und liegen in einer gestreckten *all-trans*-Konformation mit maximalen *van-der-Waals*-Kontakten zwischen den Ketten vor. Daher ist die Lipiddoppelschicht im Gel-Zustand dicker als oberhalb der Phasenübergangstemperatur. In der flüssig-kristallinen Phase, auch *liquid-disordered*-Phase (l_d), hingegen ist die laterale Mobilität der Lipide groß und die Fettsäureketten sind in ständiger Bewegung. Infolge des Phasenübergangs nimmt die Dicke der Membran ab. In Lipiddoppelschichten aus nur einem Lipidtyp findet dieser Phasenübergang bei einer definierten Temperatur statt. Der Wert steigt mit zunehmender Kettenlänge und dem Sättigungsgrad der Fettsäuren. In heterogen zusammengesetzten Membranen erstreckt sich der Phasenübergang über einen Temperaturbereich. In Gegenwart von Cholesterin kann sich eine *liquid-ordered*-Phase (l_o) bilden. Die Lipide sind dichter gepackt als in der flüssig-kristallinen Phase. Im Gegensatz zur Gelphase ist die laterale Mobilität jedoch weiterhin gegeben.[17,22] In ternären Lipidmischungen bestimmter Zusammensetzung können l_o- und l_d-Phase nebeneinander vorliegen.[23]

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Im Jahr 1997 stellten *Simons* und *Ikonen* die Hypothese auf, dass die Lipide der Plasmamembran lebender Zellen auch in lateraler Ebene nicht homogen verteilt sind. Vielmehr bilden Sphingolipide, Cholesterin und bestimmte Membranproteine Mikrodomänen höherer Ordnung aus (Abbildung 1.2-3).[24] In diesen sogenannten *lipid rafts* lagern sich die vornehmlich gesättigten Fettsäurereste der Sphingolipide und das starre Cholesterin-Gerüst dicht zusammen. Im Widerspruch zum Flüssig-Mosaik-Modell stellen die Membranlipide nach der *lipid-raft*-Hypothese nicht nur ein Lösungsmittel für die darin vorkommenden Proteine dar. Sie sind vielmehr an der lateralen Organisation der Zellmembran beteiligt. Dies würde eine Erklärung für die große Vielfalt der Membranlipide, die in eukaryotischen Zellen gefunden werden, liefern.

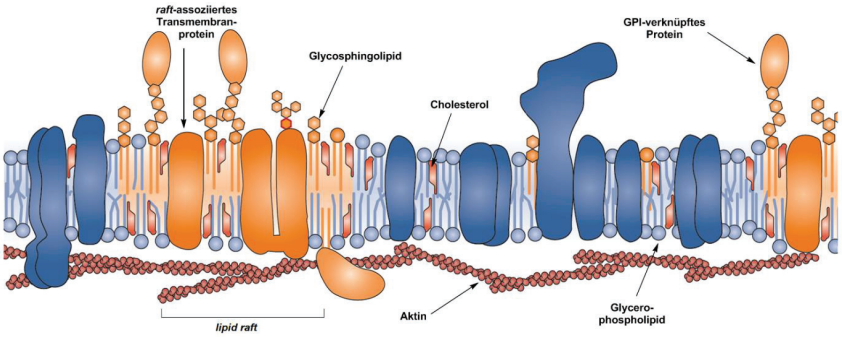


Abbildung 1.2-3: Ansammlungen von Sphingolipiden und Cholesterin bilden Mikodomänen (*lipid rafts*).[25]

Die Domänen, die sich durch spezielle Lipid-Lipid- und Lipid-Protein-Wechselwirkungen bilden, sind sowohl hinsichtlich ihrer lateralen Beweglichkeit in der Membran als auch hinsichtlich ihrer Assoziation und Dissoziation dynamisch. Mit ihrer Größe von 10−200 nm liegen sie unter dem Auflösungsvermögen optischer Mikroskope.[25] Ihre physiologische Funktion besteht aus der Möglichkeit Elemente der Membran voneinander zu trennen oder sie zusammenzubringen. Die Interaktion zwischen bestimmten Membranbestandteilen kann so gesteuert und ihre Aktivität dadurch kontrolliert werden. Auch ist es denkbar, dass die Wechselwirkung von Membranproteinen mit den speziellen Lipiden der *lipid rafts* die Struktur der Proteine verändern kann. Die erhöhte Konzentration spezieller Verbindungen in den Domänen könnte im Fall von Enzymen ihre katalytische Aktivität erhöhen. Viele Pathogene binden außerdem selektiv an Rezeptoren, die typischerweise in derartigen Mikrodomänen vorkommen. Das Gangliosid G_{M1} (**15**), welches in Modellsystemen als Marker für die l_o-Phase

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.