



Synthese und enzymatische Umsetzung
modifizierter Donorsubstrate
mit dem Enzym
 $\beta(1\rightarrow4)$ Galactosyltransferase

Dem Fachbereich Chemie der Universität Oldenburg
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
vorgelegte Dissertation

von

Jörg Dardemann

Geb. 27.04.1967

Oldenburg 2003

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1998 bis März 2003 unter Anleitung von Frau Prof. Dr. Sabine Köpper im Fachbereich Chemie der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg angefertigt.

Erstreferentin: Prof. Dr. Sabine Köpper

Korreferent: Prof. Dr. Peter Köll

Tag der Disputation: 6. Juni 2003



Meinen Eltern

Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. Sabine Köpper für die sehr interessante Themenstellung, die gute Betreuung und Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Peter Köll danke ich nicht nur für die freundliche Übernahme des Korreferats, sondern auch besonders für die Schaffung einer Arbeitsumgebung, ohne die ich diese Arbeit nicht zu Ende hätte führen können.

In diesem Zusammenhang möchte ich auch Frau Prof. Dr. Katharina Al-Shamery danken, die mir freundlicherweise auch Räumlichkeiten für die Durchführung dieser Arbeit zur Verfügung stellte.

Für die Durchführung der analytischen Arbeiten gilt mein Dank Herrn Dieter Neemeyer, Frau Marlies Rundshagen, Herrn Burkhard Stigge, Herrn Dipl.-Ing. Karl-Heinz Plate und Herrn Dipl.-Ing. Francesco Fabbretti.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Arne Lützen für die wertvolle und anregende Diskussion in der Schlussphase dieser Arbeit, Herrn Dr. Andreas Willecke für seine Zusammenarbeit, sowie allen Kolleginnen und Kollegen für das angenehme Arbeitsklima und die stete Hilfsbereitschaft.

Für die finanziellen Zuwendungen danke ich dem Land Niedersachsen und der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Ein ganz besonders herzlicher Dank gilt meiner Familie, sowie Frau Silke Grahlmann für die großartige und fortwährende Unterstützung wie auch die Geduld während der Anfertigung dieser Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	$\beta(1\rightarrow4)$ Galactosyltransferase	4
2.1	Vorkommen	7
2.2	Metallionenabhängigkeit	9
2.3	Reaktionssequenz	10
2.4	Substratmodifikationen	11
2.5	Fluorierte Zuckernucleotide	14
3.	Zielsetzung dieser Arbeit	16
4.	Synthese der fluormodifizierten Nucleoside und Nucleotide	17
4.1	Retrosynthetischer Ansatz	18
4.2	Fluorierte Nucleoside und Nucleotide	20
4.3	Synthese der fluormodifizierten Zuckernucleotide	31
5.	Enzymatische Umsetzung der modifizierten Donorsubstrate	48
5.1	Photometrische Verfolgung der enzymatischen Reaktion	51
5.2	Bestimmung der enzymkinetischen Parameter	53
5.3	Diskussion	57
6.	Zusammenfassung	64
7.	Experimenteller Teil	66
7.1	Allgemeine Angaben	66
7.2	Synthesevorschriften	68
7.3	Enzymatische Umsetzungen	86
7.3.1	Aktivitätsbestimmung der β -1,4-Galactosyltransferase	86
7.3.2	Bestimmung der enzymkinetischen Parameter der	87
7.3.3	Donorsubstrate	93
	Inhibitortest der Donorsubstrate	
8.	Literaturverzeichnis	94

Abkürzungen

2' dUDP-Gal	2'-Deoxyuridin-5'- <i>O</i> -diphospho- α -D-galactose
3' dUDP-Gal	3'-Deoxyuridin-5'- <i>O</i> -diphospho- α -D-galactose
β 4GalT	$\beta(1\rightarrow4)$ Galactosyltransferase
ADP	Adenosin-5'- <i>O</i> -diphosphat
ATP	Adenosin-5'- <i>O</i> -triphosphat
CDI	1,1'-Carbonyl-diimidazol
CMP-NeuAc	Cytidin-5'- <i>O</i> -monophospho- <i>N</i> -acetylneuraminsäure
DAST	<i>N,N</i> -Diethylaminoschwefeltrifluorid
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
GalT	Galactosyltransferase (allg.)
GDP	Guanosin-5'- <i>O</i> -diphosphat
GDP-Fuc	Guanosin-5'- <i>O</i> -diphospho- α -D-fucose
GDP-Man	Guanosin-5'- <i>O</i> -diphospho- α -D-mannose
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin
LacNAc	<i>N</i> -Acetyllactosamin
NAD ⁺	Nicotinamidadenosindinucleotid (red. Form)
NADH	Nicotinamidadenosindinucleotid
Neg.	negativ
PEP	Phosphoenolpyruvat
P _i	anorganisches Phosphat
PP _i	anorganisches Diphosphat
Pyr	Pyruvat
UDP	Uridin-5'- <i>O</i> -diphosphat
UDP-Gal	Uridin-5'- <i>O</i> -diphospho- α -D-galactose
UDP-GalNAc	Uridin-5'- <i>O</i> -diphospho- α -D-N-acetylgalactosamin
UDP-Glc	Uridin-5'- <i>O</i> -diphospho- α -D-glucose
UDP-GlcNAc	Uridin-5'- <i>O</i> -diphospho- α -D-N-acetylglucosamin
UDP-GlcUA	Uridin-5'- <i>O</i> -diphospho- α -D-glucuronsäure
UTP	Uridin-5'- <i>O</i> -triphosphat

1. Einleitung

Im allgemeinen werden Kohlenhydrate zwar als wichtige Bestandteile der Ernährung angesehen, ihre zentrale Bedeutung im stoffwechselphysiologischen Bereich wird jedoch ungleich weniger wahrgenommen, wie etwa ihre Funktion als Informationsträger auf molekularer Ebene. Obwohl sich Säugetiere normalerweise auf die Verwendung von nur sieben oder acht Monosaccharidbausteine beschränken, ist wegen der Multifunktionalität dieser Monomere der Aufbau einer schier unbegrenzten Zahl komplexer Strukturen möglich. Oligosaccharide sind daher in der Lage, effizient die riesigen Datenmengen zu kodieren, die für biologische Erkennungsprozesse benötigt werden. Eine tragende Rolle beim Aufbau dieser Saccharide kommt den Enzymen der Klasse der Glycosyltransferasen zu, die hoch regio- und stereoselektive glycosidische Bindungen zwischen einzelnen Saccharidbausteinen knüpfen.

In der Regel liegen Kohlenhydrate *in vivo* als Glycokonjugate vor und sind somit an Proteine, Lipide und Phospholipide gebunden. Sie sind Schlüsselemente in der interzellularen Signalgebung, der Zell-Zell-Kommunikation sowie der molekularen und zellularen Erkennung¹. Diese Vorgänge wiederum sind für das normale Wachstum und die Wiederherstellung von Gewebe, das Eindringen von Bakterien und Viren in Wirtsorganismen sowie für Beweglichkeit und Progression von Tumorzellen essentiell, um nur einige Vorgänge exemplarisch zu nennen. Die Kohlenhydratreste spielen auch eine wichtige Rolle als Substrate für die Erkennung durch Proteine. Als Beispiel sei hier die Wechselwirkung zwischen dem Glycoprotein E-Selectin und dem Tetrasaccharid Sialy-Lewis X (sLe^x) gezeigt, deren Aufklärung bis auf die molekulare Ebene die Entwicklung von Wirkstoffen zur Behandlung von entzündlichen Krankheiten und Tumoraktivitäten maßgeblich vorangetrieben hat². Die Erkennung beruht hier auf einer Vielzahl von komplexen Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen, die neutrale oder ionische Wasserstoffbrückenbindungen sein können, sowie auch hydrophobe Effekte beinhalten können. Koordination an Metallionen wie Ca²⁺ sind ebenfalls zentrale Motive bei den Erkennungsprozessen zwischen Protein und Kohlenhydrat (**Abb.1**).

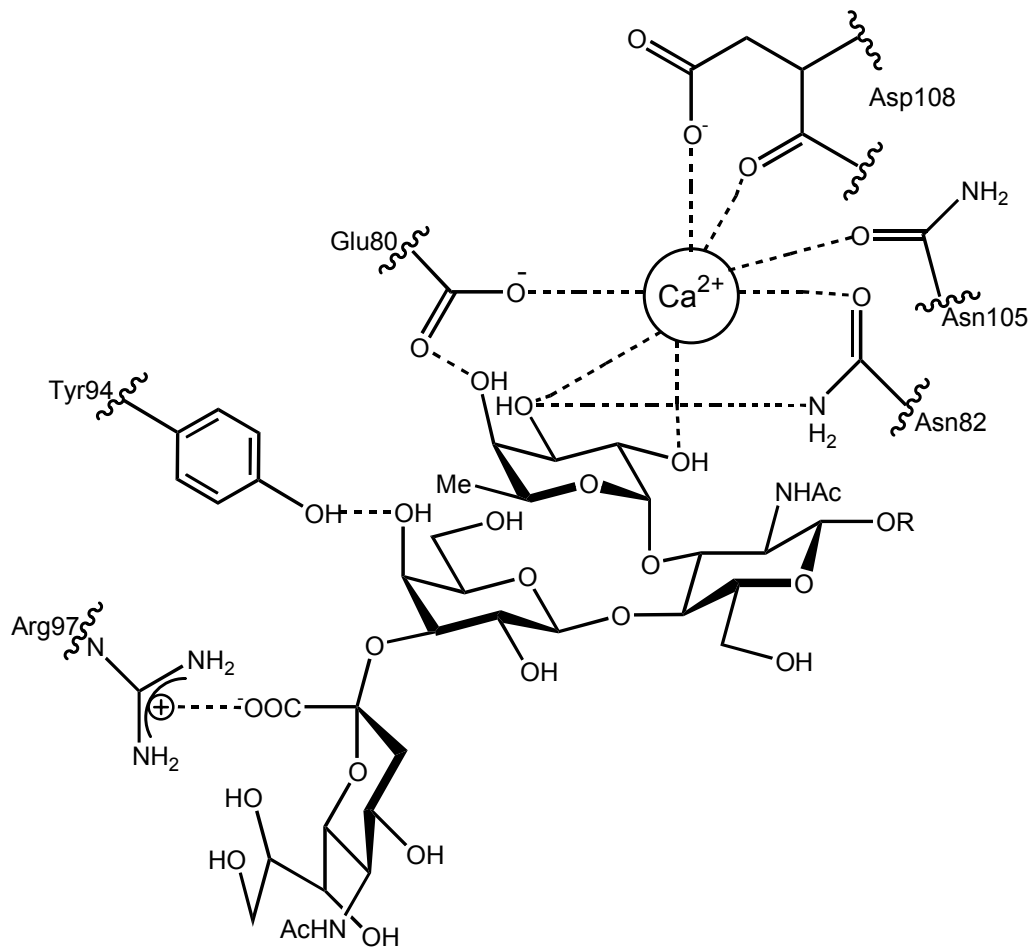


Abb.1: Angenommene Bindungsstelle des Tetrasaccharids Sialyl-Lewis X (sLe^x) an einem E-Selektin^{2c}.

Glycosyltransferasen sind selbst auch an der Zell-Zell-Erkennung beteiligt, wie das Beispiel einer zelloberflächengebundenen Galactosyltransferase bei Mäusespermien zeigt. Hier ist das Enzym für die Bindung der Spermien an die Oligosaccharidliganden auf der Eioberfläche verantwortlich³. Ähnliches wird auch bei der Entwicklung von Hühnerembryos beobachtet. Die an den Basalkörper der embryonalen Zelle gebundene Galactosyltransferase vermittelt hier durch Bindung an Glycosylliganden die Wanderung der Eizelle⁴.

Die biologische Bedeutung der von den Glycosyltransferasen erzeugten Glycosylierungsmuster wird sichtbar, wenn man ihren Einfluß auf die physikalischen Eigenschaften, die Aktivität und die Faltung gelöster Proteine betrachtet^{1,5}.

In der Synthese von Oligosacchariden werden neben Glycosyltransferasen auch Glycosidasen eingesetzt. Obwohl diese *in vivo* die Spaltung glycosidischer Bindungen katalysieren, läßt sich jedoch durch geeignete Reaktionsbedingungen das Hydrolysegleichgewicht zugunsten der Kondensationsprodukte verschieben⁶. Im Gegensatz zu den weniger spezifischen Glycosidasen sind Glycosyltransferasen hochselektiv im Hinblick auf Substrat- und Regio-spezifität. Letztere sind in zwei Gruppen unterteilt: Die Glycosyltransferasen des Leloir-Weges setzen als Glycosyldonoren Monosaccharide um, die als Nucleosidmono- oder Nucleosiddiphosphate aktiviert sind. Nicht-Leloir-Weg Transferasen verwenden Glycosylphosphate oder Sucrose als aktivierende Donoren^{7,8}.

Die Leloir-Weg Glycosyltransferasen beschränken sich im wesentlichen auf die acht Zuckernucleotide UDP-Glc, UDP-GlcNAc, UDP-Gal, UDP-GalNAc, GDP-Man, GDP-Fuc, UDP-GlcUA und CMP-NeuAc als Donorsubstrate. Bei der durch die Glycosyltransferase katalysierten Reaktion wird der Monosaccharidbaustein des Nucleotiddonors auf eine Hydroxylgruppe eines Akzeptors übertragen. Dabei kann es sich um das nicht-reduzierende Ende einer wachsenden Oligosaccharidkette, um ein Protein oder ein Lipid handeln⁹. Abhängig von der jeweiligen Glycosyltransferase kann dieser Prozess unter Inversion oder Retention der Konfiguration am anomeren Zentrum erfolgen¹⁰.

Glycosyltransferasen sind in Eukaryonten und Prokaryonten entweder membrangebunden oder in löslicher Form in Körperflüssigkeiten zu finden. Die Verwendung der Transferasen für *in vitro* Synthesen ist jedoch durch ihre geringe Verfügbarkeit und den daraus resultierenden hohen Kosten begrenzt, da sich die Enzyme aufgrund ihrer geringen Konzentrationen im Gewebe nur in kleinen Mengen gewinnen lassen. Im Zuge der rasanten Entwicklung im Bereich der Gentechnik lassen sich heute jedoch schon rekombinante Glycosyltransferasen in größerem Maßstab exprimieren¹¹.

1. $\beta(1\rightarrow4)$ Galactosyltransferase

Galactose wird mit Galactosyltransferasen (GalT) unter Ausbildung diverser glycosidischer Bindungen an Akzeptoren transferiert. In Prokaryonten ist Galactose hauptsächlich in Lipopolysacchariden wiederzufinden, während in eukaryontischen Systemen die Bildung verschiedener Glykokonjugate und die Lactosebiosynthese zu beobachten ist. Im menschlichen Organismus spielen GalT's neben ihrer generell glycosylierenden Funktion auch eine tragende Rolle in der Schleimbildung. So korreliert zum Beispiel die Menge der menschlichen Magenschleimhaut direkt mit der GalT-Aktivität¹². Eine einsetzende GalT-Aktivität wird bei Säugetieren erst nach der Geburt beobachtet¹³. Veränderte GalT-Aktivitäten werden auch mit verschiedenen Krankheiten in Verbindung gebracht. So ist bei einigen Krebsformen eine veränderte, unkontrollierte Glycosylierung zu beobachten¹⁴. Auch rheumatoide Arthritis steht im Verdacht, durch einen Defekt der GalT-Aktivität ausgelöst zu werden, da eine Oligosaccharidkette des Glycoproteins Immunglobulin IgG nicht mehr galactosyliert ist¹⁵. All dies macht die Galactosyltransferasen zu einem lohnenden und interessanten Forschungsgegenstand. Allerdings weist diese Klasse der Glycosyltransferasen eine sehr hohe Varianz auf, so dass in einigen Fällen identische Reaktionen katalysiert werden, bei prokaryontischen und eukaryontischen Galactosyltransferasen jedoch wenige strukturelle Gemeinsamkeiten anzutreffen sind. So sind allein in Säugetieren bis heute 19 verschiedene Galactosyltransferasen charakterisiert worden¹⁶, die den Transfer von Galactose auf einen Akzeptor über eine $\beta(1-4)$ -, $\beta(1-3)$ -, $\alpha(1-3)$ - und $\alpha(1-4)$ -glycosidische Bindung katalysieren.

UDP-Galactose: *N*-Acetyl-D-Glucosamin $\beta(1-4)$ Galactosyltransferase [$\beta 4$ GalT, EC 2.4.1.22] war die erste biochemisch charakterisierte säugetierstämmige Galactosyltransferase und auch die Erste, die geklont wurde¹⁷. Das Enzym hat zwei enzymatische Aktivitäten: Als Monomer katalysiert es den Transfer von Galactose auf endständige *N*-Acetyl-D-glucosamin-Einheiten in Glykokonjugaten, wobei eine $\beta(1-4)$ -glycosidische Bindung gebildet wird (**Abb.2**).

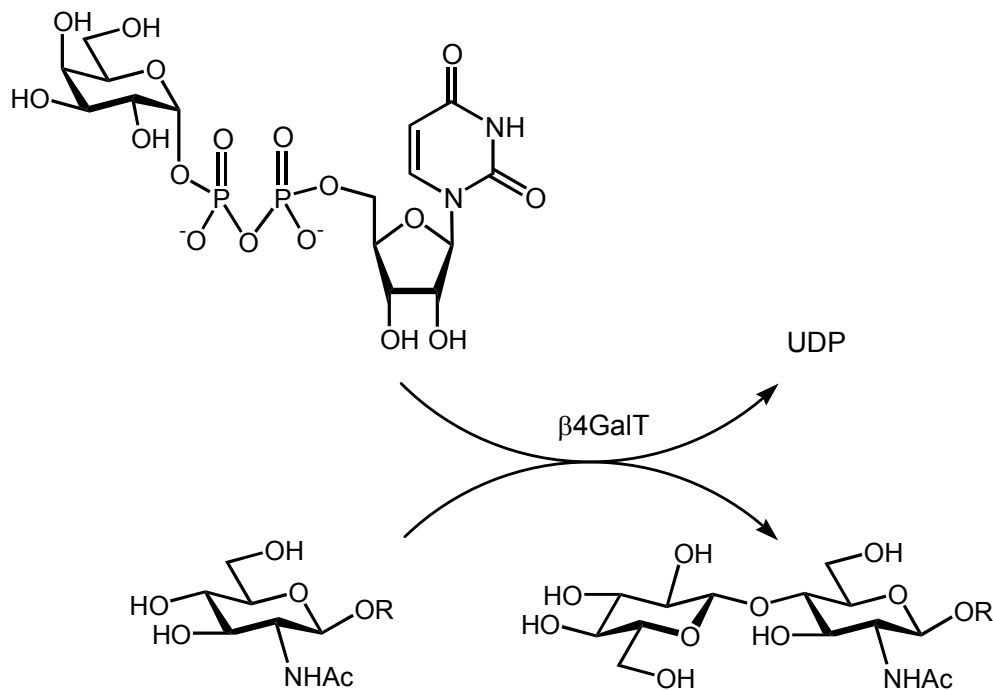


Abb.2: β 4GalT katalysierte Reaktion.

Bei Anwesenheit von α -Lactalbumin wechselt die β 4GalT bei gleichbleibendem Donor jedoch ihre Akzeptorsubstratspezifität. Dieses „specifier-protein“ bildet mit der β 4GalT zusammen den Lactose-Synthetase-Komplex, der mit dem neuen Akzeptor Glucose nun die Bildung von Lactose in der Muttermilch katalysiert¹⁸. Durch diese doppelte Substratspezifität ist die β 4GalT einzigartig unter den Glycosyltransferasen¹⁹ und stellt eine wichtige Ausnahme von der „one-enzyme-one-linkage“ Hypothese dar, nach der jede Glycosyltransferase die Synthese genau einer glycosidischen Bindung katalysiert.

Bei *in vitro* Glycosylierungen mit der β 4GalT bedient man sich eines Multienzymsystems, das nicht nur das Problem der Produktinhibierung²⁰, hervorgerufen durch äquimolar anfallendes UDP, eliminiert, sondern auch die Kosten für die verwendeten Zuckernucleotide reduziert. Bei dieser Imitierung des *in vivo* Kreislaufs wird UDP durch Pyruvatkinase zu UTP umgesetzt und mit einer Zuckernucleotid-Pyrophosphorylase wieder in ein neues Zuckernucleotid eingebaut. Eine Inhibierung kann somit vernachlässigt werden. In einem solchen erstmalig von *Whitesides et al.*²¹ eingesetzten und dann von anderen²² stetig weiterentwickelten Multi-enzymssystem werden Cofaktoren und Substrate in einem Eintopfverfahren unter Einsatz aller beteiligten Enzyme regeneriert (**Abb.3**).

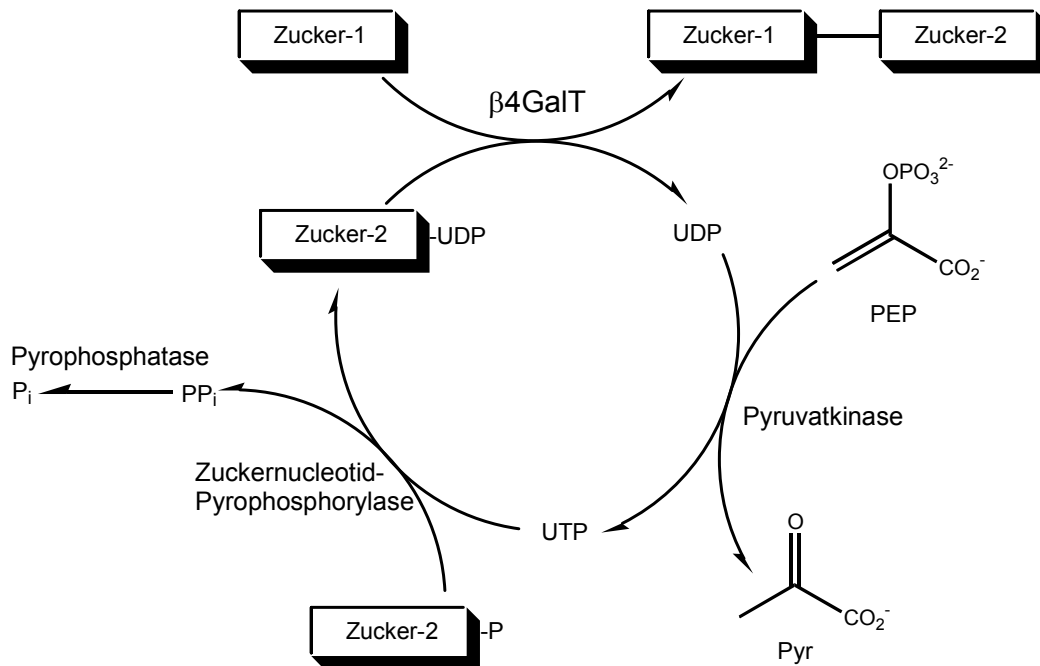


Abb.3: Multienzymsystem.

Alternativ läßt sich das Problem der Enzyminhibierung durch Nucleotiddiphosphate mit der Zugabe einer alkalischen Phosphatase lösen, die das UDP zerstört²³. Ebenfalls in der Festphasensynthese von polymer gebundenen Oligosacchariden findet die β 4GalT ihre Anwendung²⁴, wie auch bei der Herstellung von Kohlenhydrat-Arrays²⁵. Bei beiden Verfahren ist diesmal der Akzeptor immobilisiert und kann den ersten Fall betreffend, photochemisch vom Polymer gelöst werden. Als Festphasen eignen sich für die Oligosaccharidsynthese Polyacrylamide oder wasserlösliche Polyvinylalkohole. Die Kohlenhydrat-Arrays nutzen Goldbeschichtete Träger. Ein *in vitro* eingesetztes Multienzymsystem hat mehrere Vorteile, wenn immobilisierte Enzyme verwendet werden^{22a,26}. Die Immobilisierung ermöglicht eine einfache Isolierung und Wiederverwendung der Enzyme aus Reaktionsansätzen, stabilisiert diese und kann möglicherweise auch deren Kinetik verbessern. Derart kovalent an polymere Träger gebundene β 4GalT ist zum Beispiel in steigendem Maße in der Oligosaccharidsynthese anzutreffen²⁷.

2.1 Vorkommen

Die β 4GalT ist hauptsächlich membrangebunden in der *trans*-Cisternae des Golgi-Apparates in Säugetierzellen zu finden²⁸. Hier werden die Oligosaccharideinheiten der Glycoproteine verändert und vollendet. *O*-gebundene Zuckereinheiten werden neu angefügt und *N*-gebundene auf verschiedenen Wegen modifiziert. Auch auf Zelloberflächen^{3b} und in löslicher Form ist die β 4GalT anzutreffen. Die letzte Art wird durch Protolyse²⁹ an der Stelle der Aminosäure Arginin77 (Arg77)³⁰ im Bereich der unteren Stammsequenz gebildet und ist in Kolostrum, Milch und Serum³¹ nachgewiesen worden.

Die transmembrangebundene β 4GalT besteht aus etwa 400-450 Aminosäuren³² und ragt mit ihrem kurzen (5-30 Aminosäuren) *N*-terminalen Ende in den cytoplasmatischen Bereich. Einem kurzen die Transmembran durchdringenden Teil (10-20 Aminosäuren) folgt ein Stammbereich variabler Länge und eine einzige große Domäne (323 Aminosäuren)^{11b}, die den katalytischen Bereich bildet und mit dem *C*-terminalen Ende abschließt (**Abb.4**).

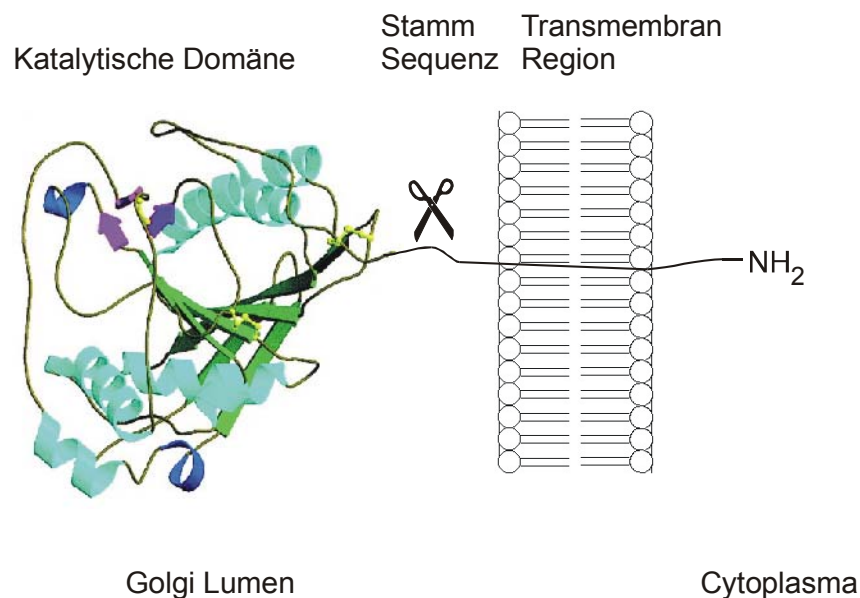


Abb.4: Schematische Topologie einer β 4GalT. Die Schere markiert die ungefähre Position, an der eine membrangebundene GalT durch Protolyse in eine lösliche Form überführt werden kann.

Mit der β 4GalT ist es als einer der ersten Galactosyltransferasen gelungen, mit Hilfe von Röntgenstrukturanalysen ein ungefähres Bild der dreidimensionalen Struktur des Enzyms zu gewinnen³³. Die Kristallstruktur des Enzymsubstratkomplex mit Wasserstoffbrückenbindungen deutet darauf hin, dass die katalytische Domäne schematisch mit einem Trichter zu vergleichen ist, der eine große geöffnete Tasche erkennen läßt. Mehrere Disulfidbrücken stabilisieren dabei die Tertiärstruktur des Proteins^{33a}.

Eine weitere Röntgenstrukturanalyse der β 4GalT im Komplex mit α -Lactalbumin zeigt³⁴, dass dieser Komplex Änderungen in der Struktur hervorruft, so dass die katalytische Domäne den Transfer von Galactose auf Glucose als Akzeptor ermöglicht.

Zum genaueren Verständnis der Substratbindungen im aktiven Zentrum bieten sich mutante Formen der β 4GalT an^{11b}, deren kinetischen Parameter quasi identisch mit denen des natürlichen Enzyms sind. Auch das Verfahren der ortsspezifische Mutagenese (site directed mutagenesis) liefert weitere Informationen über die an der Substraterkennung beteiligten Aminosäuren. So läßt sich feststellen, dass die Aminosäuren Tyrosin284 (Tyr284), Tyr309 und Tryptophan310 (Trp310) an der Bindung des *N*-Acetylglucosamin beteiligt sind. Durch photoaffinitive Kennzeichnung ist es gelungen, die Aminosäuren Asparaginsäure318 (Asp318) oder Glutaminsäure317 (Glu317) mit der Aktivierung des 4-OH Protons des *N*-Acetylglucosamin für den Glycosyltransfer in Verbindung zu bringen³⁵. Glu317 und Glycin315 (Gly315) könnten die 6-OH Gruppe fixieren, während Asp252 und Gly292 der 2-OH Gruppe sehr nahe sind^{33c}. Ebenso sind die Aminosäuren Trp310, Phenylalanin305 (Phe305), Prolin306 (Pro306), Asparagin307 (Asn307), Asn308 und Cystein340 (Cys340) in der Bindung von UDP-Gal oder den katalytischen Prozess involviert^{33a}. Der Uracilring wird durch Phe226 und Arg189 in Position gehalten, während die 3-OH Gruppe der Ribose Wasserstoffbrückenbindungen mit Asp252 und Valin253 (Val253) bildet. Die 2-OH Gruppe steht in engem Kontakt zu Pro187. Die Fixierung des Uracilrings und der Ribose werden zudem durch neuere Experimente mit der Sättigungstransfer-Differenz-NMR-Spektroskopie untermauert³⁶. Bei der Diphosphatbrücke wird die β -Einheit durch eine Wasserstoffbrückenbindung mit Lysin279 (Lys279) sowie einem Wassermolekül, das mit Asp254 wechselwirkt, stabilisiert. Die α -Phosphatgruppe ragt aus der Bindungstasche heraus. Die beiden Bindungsstellen für die essentiellen Mangan(II)ionen sind zum einen in der Nähe der Pyrophosphatgruppe des

Zuckernucleotids und zum anderen in relativer Nachbarschaft des Akzeptors zu finden³⁷(**Abb.5**).

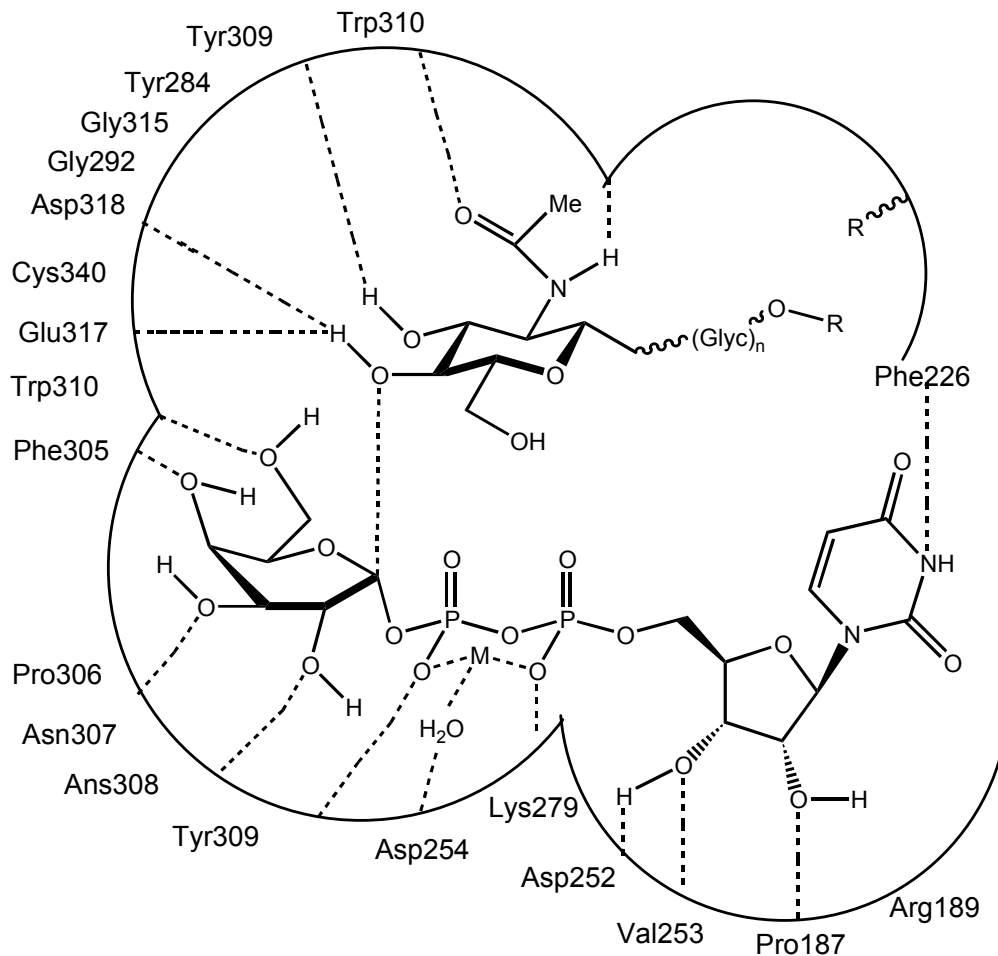


Abb.5: Literaturbekanntes zur Bindung der Substrate an $\beta 4\text{GalT}$; R, Peptide, hydrophobe Alkylketten; M, Mn^{2+} .

2.2 Metallionenabhängigkeit

Die Transferaseaktivität der $\beta 4\text{GalT}$ ist nur in Gegenwart zweiwertiger Metalle gegeben. Eine „high affinity“-Manganbindungsstelle I (K_M ca. $20 \mu\text{M}$ Mangan) ist als allosterische Bindungsstelle für die strukturelle Integrität des Proteins verantwortlich und wird zuerst

Die Bindung eines Substrates im aktiven Zentrum erfolgt über unterschiedliche Wechselwirkungen, die elektrostatischer, hydrophober oder kovalenter Natur sein können. Diese angetroffenen Wechselwirkungen ermöglichen es dem Enzym, die Energie zur Erniedrigung der Aktivierungsenergie zu gewinnen und eine Stabilisierung des Übergangszustands herbeizuführen. Gemäß Pauling ist die Struktur des aktiven Zentrums komplementär zu der des Übergangszustands, wonach dieser stärker gebunden wird und die Aktivierungsenergie um den Betrag der Bindungsenergie herabgesetzt wird. Bei der β 4GalT katalysierten Reaktion nimmt die sonst ausschließlich in der Sesselkonformation vorliegende Hexose des Zuckernucleotids vermutlich eine Halbsessel-Konformation ein, die durch einen Doppelbindungsanteil zwischen dem Ringsauerstoff und dem anomeren C-Atom stabilisiert wird.

Die oben aufgeführten Wechselwirkungen können als passive Bindungen bezeichnet werden, im Gegensatz zu den ebenfalls im Enzym-Substrat-Komplex vorhandenen dynamischen Bindungen⁴⁰. Letztere bezeichnen dabei die Wechselwirkungen zwischen Enzym und Substrat am aktiven Zentrum. Im Laufe der Katalyse ändern sich die Wechselwirkungen hier derart, dass die nicht-kovalenten Bindungen teilweise geöffnet und neu geknüpft werden.

2.4 Substratmodifikationen

Eine weitere Möglichkeit Informationen über die Topologie des aktiven Zentrums zu erhalten besteht darin, Studien mit Substratanaloga und Inhibitoren durchzuführen. Dazu bieten sich die Synthese und enzymatische Umsetzung von Akzeptor- und Donoranaloga, Übergangszustandmimetika sowie Bi- und Trisubstratanaloga an.

Untersuchungen zur Akzeptorsubstratspezifität sind schon in großem Umfang durchgeführt worden. Die Acetamidgruppe des *N*-Acetylglucosamin läßt sich bei unwesentlich reduzierter Transferaktivität durch eine Reihe von Amid⁴¹, Propionyl⁴² und Sulfonamidresten⁴³ ersetzen. Wird die Acetamidfunktion an die C-3 Stelle des Akzeptors verlegt, so lassen sich veränderte Regioselektivitäten feststellen⁴⁴. Statt der für die β 4GalT üblichen $\beta(1\rightarrow4)$ verknüpften Disaccharide werden $\beta,\beta(1\rightarrow1)$ glycosidisch verbundene Produkte gebildet, wonach die Acetamidgruppe damit den Ort des Glycosyltransfers festlegt. Auch die anderen funktionellen Gruppen des natürlichen Akzeptors sind auf unterschiedliche Art und Weise

substituiert worden, wobei im Falle der Veränderungen an OH-3 die Transfargeschwindigkeiten rapide abnehmen, während bei OH-6 die Substitutionen keinen Einfluß haben. Veränderungen an C-1 werden in jeglicher Form durch das Enzym toleriert. Die Bandbreite der Substituenten reicht hier von Desoxygenierungen über Peptide und Oligosaccharide bis hin zu polymer gebundenen Akzeptoren. Auch Nucleotiddiphosphat aktivierte Saccharide werden akzeptiert und umgesetzt⁴⁵. Dabei nimmt das Aglykon wahrscheinlich eine Position außerhalb der Akzeptorbindungsstelle, vielleicht sogar außerhalb des Enzyms ein. Wichtig für die Erkennung des Akzeptors durch das Enzym ist die äquatoriale Hydroxylgruppe an C-4⁴⁶ und eine W-ähnliche Orientierung zwischen der 2-Acetamidgruppe und der 4-OH Gruppe⁴⁷. Aufgrund dieser Erkenntnis ist kürzlich auch der Transfer auf einen acyclischen Akzeptor gelungen^{47b}. Die wichtigsten Akzeptormodifikationen sind in **Abb.7** zu erkennen.

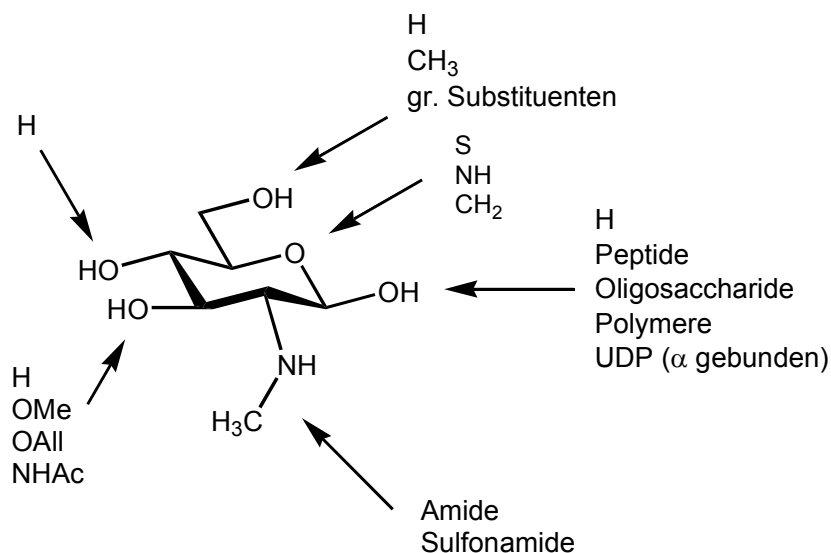


Abb.7: Akzeptormodifikationen.

Bei den Donorsubstratanaloga beziehen sich die Untersuchungen überwiegend auf den transferierten Zucker. Neben Galactose akzeptiert die β 4GalT auch noch 2-Desoxygalactose⁴⁸, Glucose⁴⁹, 4-Desoxyglucose⁵⁰, Arabinose⁴⁸, Glucosamin⁴⁷, Galactosamin⁵¹ und N-Acetyl-D-galactosamin⁴⁷. Desoxygenierungen in der Hexose sind an den Positionen 3⁵², 4⁴⁸ und 6⁵³ bekannt, ihre relativen Transfargeschwindigkeiten liegen jedoch im Bereich von 5%. Der Austausch des Ringsauerstoffs durch ein Schwefelatom⁵⁴ liefert eine

Transfargeschwindigkeit von nur noch 5%, während eine Methylengruppe⁵⁵ an derselben Stelle einen kompetitiven Inhibitor darstellt. Der Austausch der Base im Nucleosidteil liefert keine Donorsubstrate⁵⁶, während ein basenmodifiziertes Substrat sich als aktiv erwies⁵⁷. Im Riboseteil modifizierte Zuckernucleotide zeigen bei Desoxygenierungen an 2'-Position eine Aktivität von lediglich 4%, während es an 3' noch 57% sind⁵⁸. Diese beobachteten unterschiedlichen Aktivitäten können einerseits durch einen möglichen Wechsel der Konformation der Substrate entstanden sein, oder durch fehlende elektrostatische Wechselwirkungen. Aufklärung könnte für den letzteren Fall eine systematische Substitution der OH-Gruppen durch Fluor bringen.

Im Bereich der Pyrophosphatbrücke werden keine Veränderungen vom Enzym toleriert⁵⁹. Diese Diphosphatbrücke der UDP-Gal scheint mit einem Manganion einen sesselförmigen sechsgliedrigen Ringkomplex zu bilden⁶⁰, der für die Erkennung durch das Enzym unbedingt notwendig ist. Ein potentieller Inhibitor könnte ein Zuckernucleotidmimetikum sein, dessen intakte Pyrophosphatbrücke zwischen C-1 der Hexose und der α -Phosphatgruppe um eine Methyleneinheit verlängert worden ist⁶¹ (**Abb.8**).

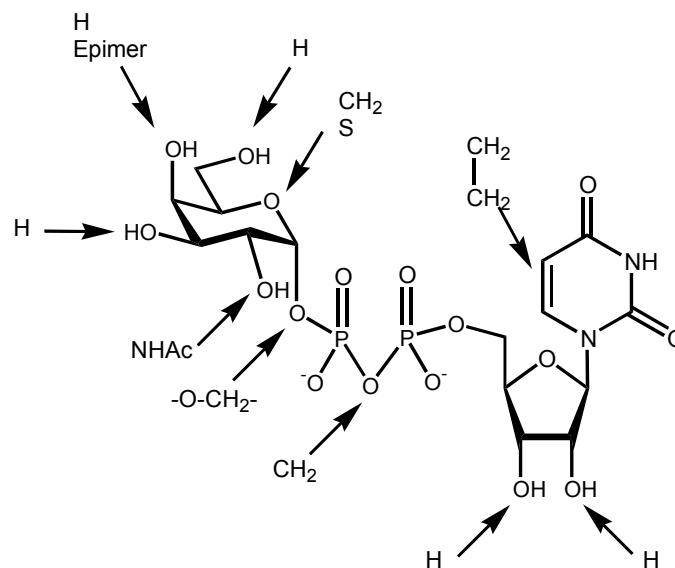


Abb.8: Donormodifikationen.

Übergangszustandsanaloga sind in der Regel gute Inhibitoren, so dass auch sie wertvolle Hinweise über den Verlauf des Katalysemechanismus liefern können. Ausgehend von einem möglichen Halbsessel-Übergangszustand^{62,10} ist ein Donor mit Glycalstruktur der Hexose synthetisiert worden, der sehr gute Inhibitoreigenschaften besitzt⁶³ (**Abb.9**).

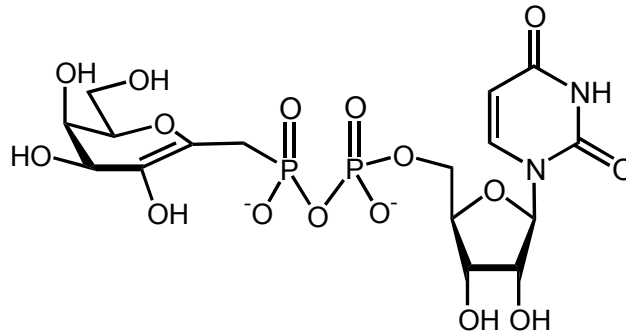


Abb.9: Mimetikum des Übergangszustandes.

2.5 Fluorierte Zuckernucleotide

Unter den vielen entwickelten Methoden zur Mechanismusaufklärung, ist die Fluorierung einzelner funktioneller Gruppen die am häufigsten genutzte. Während sich viele der bisher vorgestellten Substratanaloga als gute Inhibitoren herausgestellt haben, kann jedoch keines die Bedeutung der substituierten Gruppen im Katalysemechanismus eindeutig belegen. Der Austausch durch Fluor kann hier in vielerlei Hinsicht einen wertvollen Beitrag leisten.

Als elektonegativstes Element (4.0) kann Fluor als Substituent einer Hydroxylgruppe einige Eigenschaften des Sauerstoffatoms nachahmen. Es agiert dabei als Wasserstoffbrückenbindungsakzeptor, ohne aber selbst als Donor aufzutreten. Obwohl diese Funktion in der Literatur kontrovers diskutiert wird⁶⁴, hat sie für enzymatische Reaktionen durchaus ihre Berechtigung. In einer lösungsmittelfreien und organisierten Enzymtasche, in der das Fluor einem Wasserstoffdonor unausweichlich gegenüber gestellt wird, sind optimale Bedingungen für eine F...H Brückenbindung gegeben. Ein anderer Aspekt der Substitution einer Hydroxylgruppe an einer Ribose durch ein Fluoratom ist die zu erwartende Änderung der Konformation des Zuckers. Liegt normalerweise in der unsubstituierten Ribose des

Zuckernucleotides ein Gleichgewicht zwischen den beiden Twist-Konformeren C3'-endo und C2'-endo vor⁵⁷, so vermag der Fluorsubstituent dieses Gleichgewicht je nach Substitutionsort drastisch zu verschieben⁶⁵ (**Abb.10**).

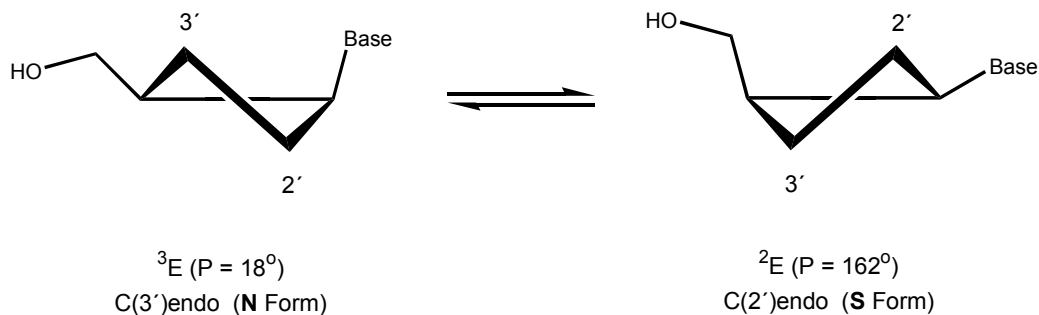


Abb.10: Konformerengleichgewicht der unsubstituierten Ribose des Uridins.

Die wenigen bisher synthetisierten und enzymatisch getesteten Zuckernucleotide beschränken sich auf Substitutionen einer Hydroxylgruppe durch Fluor am transferierten Zucker an den Positionen 2 und 6. Während UDP-(2-desoxy-2-fluor)- α -D-galactose⁶⁶ sich als guter Inhibitor herausstellt und somit einen Beweis für die Beteiligung der 2-OH Gruppe an der Bildung der Glycalstruktur des Halbsesselübergangszustand liefert, ist UDP-(6-desoxy-6-fluor)- α -D-galactose⁶⁷ weder Donor noch Inhibitor in der durch die β 4GalT katalysierten Reaktion (**Abb.11**).

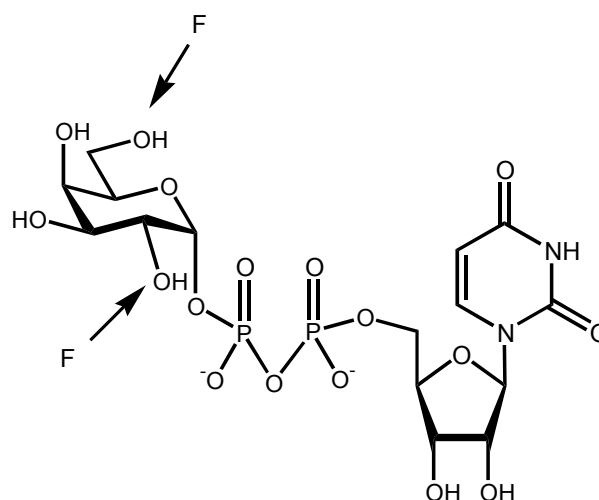


Abb.11: Fluorierte Donormodifikationen.

2. Zielsetzung dieser Arbeit

Im Bestreben die Enzym-Substrat Wechselwirkungen der β 4GalT zu verstehen, ist in vielen Arbeiten die Substratspezifität untersucht worden. Während sich die meisten hierfür notwendigen Modifikationen auf den Akzeptor beziehen, beschränken sich die wenigen gezielten Veränderungen des Donors überwiegend auf den transferierten Zucker und die Pyrophosphatgruppe. Die enzymatischen Umsetzungen dieser Verbindungen führen zu veränderten Produkten beziehungsweise zu Inhibitoren. Bei der Donorsubstratspezifität von im Riboseteil modifizierten UDP-Gal-Derivaten liegen bislang allerdings nur sehr wenige Informationen vor, die durch Synthese und enzymatischen Umsetzung neuer modifizierter Donorsubstrate ergänzt werden sollen.

Ziel dieser Arbeit sind Untersuchungen zur Struktur der Substratspezifität in den Donorsubstratmolekülen, wobei das besondere Interesse der Bedeutung der beiden Hydroxylgruppen der Ribose gilt. Erste Untersuchungen hierzu sind kürzlich veröffentlicht worden⁵⁸ und sollen erweitert werden. Dazu ist zunächst die Synthese entsprechend fluorierter Ribosederivate nötig. Die anschließende enzymatische Umsetzung der modifizierten Donorsubstrate sollte zu neuen Erkenntnissen über die Art der Enzym-Substrat-Wechselwirkungen und den Einfluss auf die katalytische Aktivität des Enzyms führen.

4. Synthesen der fluormodifizierten Nucleoside und Nucleotide

Modifizierte Nucleoside sind aufgrund der dramatischen Änderung in ihrer biologischen Aktivität von hohem Interesse. Neben der Möglichkeit Erkenntnisse über die intrazelluläre Nucleotidbildung zu bekommen, ist durch die Entdeckung der antiviralen Eigenschaften einiger synthetischer Nucleosidderivate die Aufmerksamkeit auf Vertreter dieser Verbindungsklasse noch gestiegen. Als wohl bedeutendstes cyclisches Derivat ist hier das 3'-Azido-3'-desoxy-thymidin (Zidovudin, AZT, **(1)**) zu nennen, das eigentlich als Therapeutikum zur Bekämpfung von Krebs entwickelt wurde, sich aber als exzellenter Inhibitor der HIV-1 Reversetransferase herausstellte. Es ist somit das erste Medikament, das zur Behandlung von AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) eingesetzt wurde⁶⁸ und stetig weiterentwickelt wird⁶⁹. Auch bei den Fluor substituierten Nucleosidderivaten sind frühe Vertreter in medikamentöser Anwendung. So ist 2'-Desoxy-5-fluor-uridin (**(2)**) als Antitumormittel bekannt und wird entweder einzeln oder in der Kombinationstherapie bei verschiedenen metastatischen Krebsarten erfolgreich appliziert⁷⁰. 2'-Desoxy-2'-fluor-cytidin (**(3)**) inhibiert effizient das Wachstum von verschiedenen menschlichen Lymphoblasten-Zelllinien⁷¹.

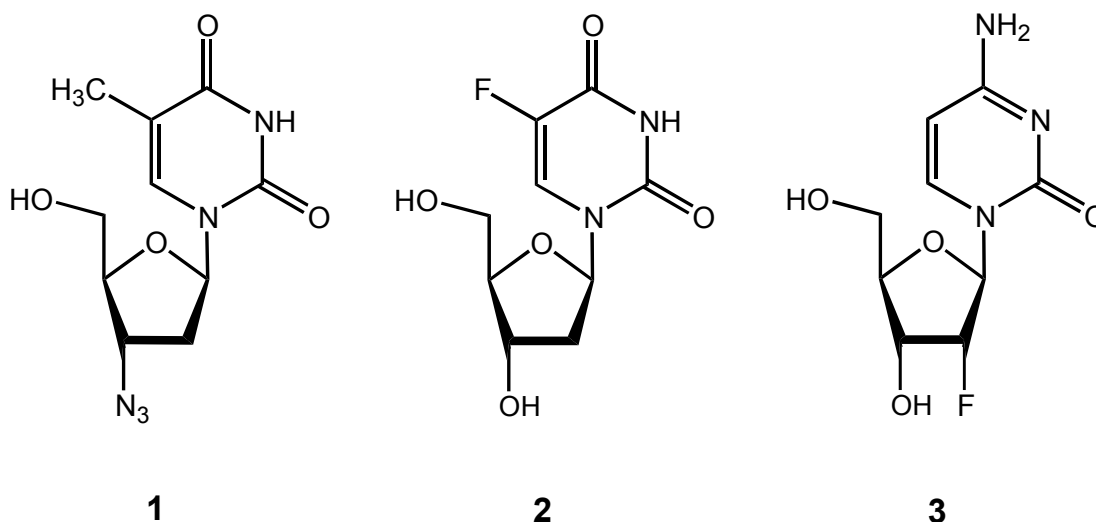
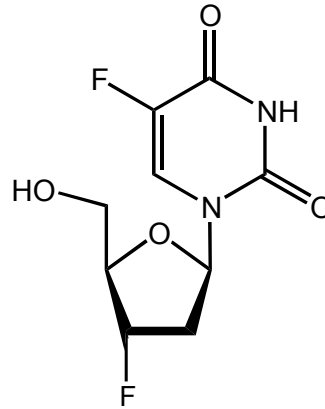


Abb.12: Medikamentös einsetzbare Nucleosidderivate.

Wird an Verbindung **2** die 3'-Hydroxyfunktion durch Fluor substituiert, so gelang man zu 2',3'-Dideoxy-3',5-difluor-uridin (**4**) (**Abb.13**), einem Alternativpräparat zu AZT (**1**). Obwohl **4** die HIV-1 Reversetranskriptase wesentlich effektiver inhibiert als **1**, ist die Toxizität leider ungleich größer⁷².



4

Abb.13: 2',3'-Dideoxy-3',5-difluor-uridin (**4**).

Häufig zeigen modifizierte Nucleoside allerdings keine biologische Aktivität und sind auch als 5'-*O*-Mono- oder 5'-*O*-Diphosphate inaktiv. Erst wenn sie in die jeweiligen 5'-*O*-Triphosphate überführt werden, zeigen sie ihr biologisches Potential⁷³.

4.1 Retrosynthetischer Ansatz

Der retrosynthetische Ansatz zum Erhalt der modifizierten Nucleoside bzw. Nucleotide bietet grundsätzlich drei verschiedene Möglichkeiten, um zu den Zielmolekülen zu gelangen (**Abb.14**). So ist es einer Route **A** folgend durchaus realisierbar, eine entsprechend geschützte und funktionalisierte freie Ribose zu fluorieren, um dann nach *N*-glycosidischer Bindung das Nucleosid zu erhalten⁷⁴. Diese insgesamt zwölfstufige Reaktionssequenz hat zwar den Vorteil, eine universelle Methode zur Synthese von 2'- und 3'-Desoxy-fluor-nucleosiden zu sein, zeigt jedoch in der niedrigen Gesamtausbeute und dem ausgeführten Syntheseaufwand eindeutige Nachteile. Ein zweiter Syntheseweg **B** nutzt das natürliche

Die zuletzt vorgestellte Synthesevariante soll im folgenden für die Synthese der 2' und 3' fluorierten Uridinderivate verwendet werden, da sie im Hinblick auf Aufwand, Ausbeute und Kosten die effizienteste zu sein scheint.

4.2 Fluorierte Nucleoside und Nucleotide

Die Synthese von im Riboseteil fluormodifiziertem Uridin gelingt nach unterschiedlichen Verfahren, die jedes für sich hinsichtlich Aufwand und Nutzen zu prüfen sind. Alle Reaktionen finden unter Inversion am Substitutionsort statt.

Mit der nucleophilen Öffnung eines Oxiranrings erhielten *Kowolik et al.*⁷⁵ bei der Reaktion von 5'-*O*-Benzoyl-2',3'-anhydro-*xylo*-uridin (**5**) mit flüssigem Fluorwasserstoff (10%) in Dioxan die beiden Isomere 5'-*O*-Benzoyl-3'-desoxy-3'-fluor-*arabino*-uridin (**6**) und 5'-*O*-Benzoyl-2'-desoxy-2'-fluor-*xylo*-uridin (**7**) in mäßigen Ausbeuten von 25 % bzw. 11%. Zwar werden hierbei in einem Syntheseschritt zwei Nucleoside mit Fluor an der richtigen Position in der Ribose und in der korrekten Konfiguration erhalten, eine Inversion der jeweils benachbarten Hydroxylgruppen zu den Uridinderivaten würde jedoch als weiterer Syntheseschritt noch folgen müssen. Somit würden dann die Gesamtausbeuten durch die mäßigen Ausbeuten von **6** und **7** noch weiter verringert, so dass dieser Weg nicht weiter verfolgt wurde. (**Abb.15**).

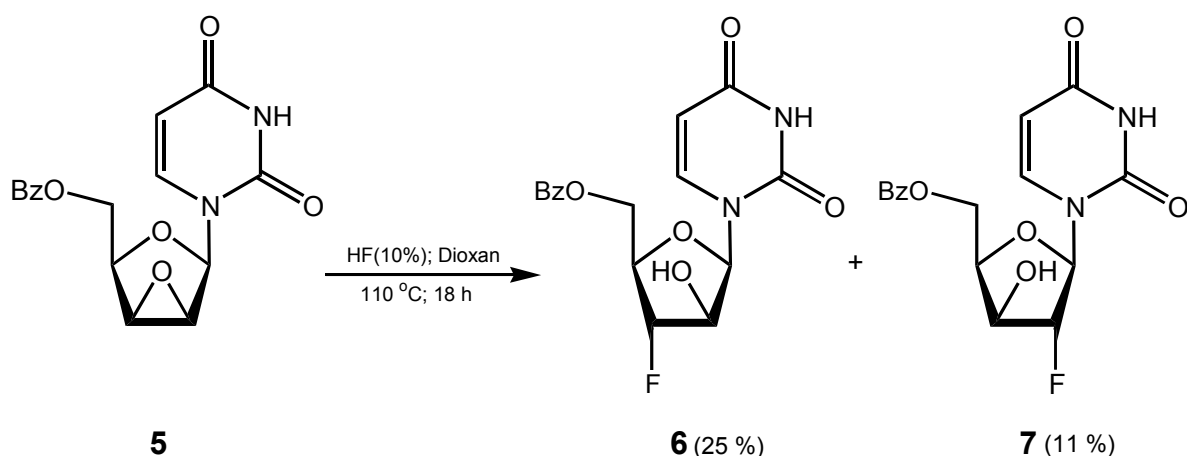


Abb.15: Nucleophile Öffnung eines Oxiranringes durch Fluoridionen (Bz = Benzoyl).

Misra *et al.*⁷⁶ verwendeten anstelle von **5** als Edukt das 5'-OH freie 2',3'-Anhydro-xylo-uridin (**8**) und erhielten unter gleichen Reaktionsbedingungen neben dem erwarteten 3'-Desoxy-3'-fluor-*arabino*-uridin (**9**) (13%) und Uracil auch noch 3'-Desoxy-3'-fluoro-uridin (**10**) (11%) (**Abb16**).

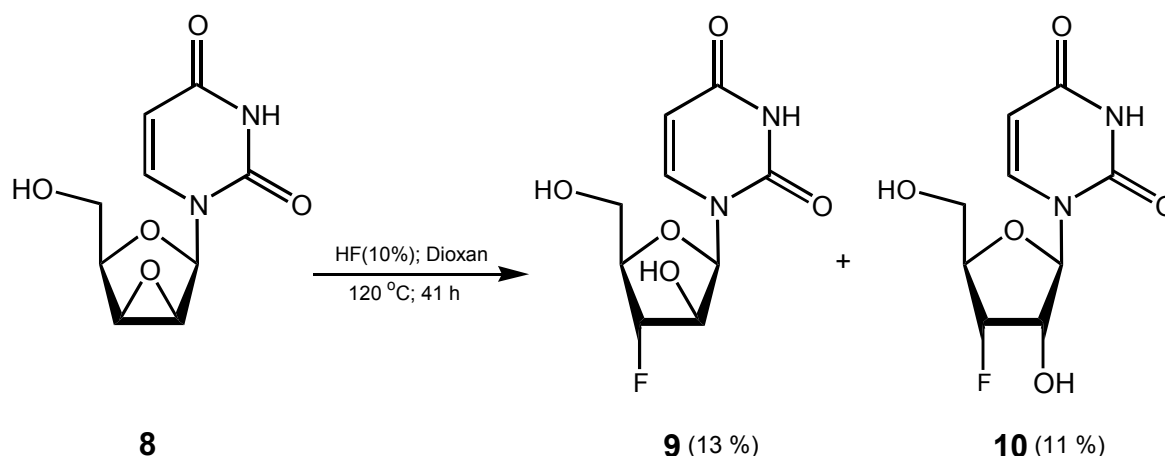


Abb.16: Nucleophile Öffnung eines Oxiranringes durch Fluoridionen ohne Schutzgruppen.

In letzter Zeit wird vermehrt die Reaktion einer freien Hydroxylgruppe mit *N,N*-Diethylaminoschwefeltrifluorid (DAST) für die Fluorierung von Nucleosiden erwähnt⁷⁷. Der Gebrauch von DAST bringt mehrere Vorteile im Hinblick auf Reaktionsführung und Verhalten gegenüber den eingesetzten Edukten. So erfolgt der Austausch der Hydroxylgruppe durch Fluor direkt, ohne dass diese zuvor aktiviert werden muß. Die Reaktionsbedingungen sind sehr milde und säurelabile Funktionen bleiben erhalten. Desweiteren können die Reaktionen in normalen Laborglas durchgeführt werden. 2'-Desoxy-2'-fluor-uridin ist in verschiedenen Arbeiten^{77,89} durch Fluorierung mit DAST hergestellt worden. Diese Synthesen erforderten jedoch stets den Einsatz von Schutzgruppen, sowie die vorherige Konfigurationsumkehr der zu fluorierenden Hydroxylgruppe. Die Gesamtausbeuten sind mäßig, so dass diese Synthesevariante hier nicht zum Einsatz kommen soll.

Die am häufigsten genutzte Methode Fluor in den Riboseteil eines Nucleosides einzuführen, ist der nucleophile Angriff eines Fluoridions auf 2,2'- oder 2,3'-Anhydrobrücken. Dieses Verfahren ist auf Pyrimidine begrenzt und soll im weiteren Verlauf der Synthesen die

Methode der Wahl sein, da sie sich gleichermaßen für Substitutionen an Position 2' wie auch 3' eignet, mit wenigen Syntheseschritten auskommt und hohe Ausbeuten liefert.

1961 gelang es Codington⁷⁸ und Mitarbeitern erstmals dieser Strategie folgend, ausgehend von 2,2'-Anhydro-*arabino*-uridin (**11**) 2'-Desoxy-2'-fluor-uridin (**12**) herzustellen. Sie setzten das Edukt **11** mit trockenem Fluorwasserstoff in Dioxan in einem rostfreien Stahlzylinder für 18 h bei 110 °C zum Produkt **12** mit einer Ausbeute von 40% um (**Abb.17**).

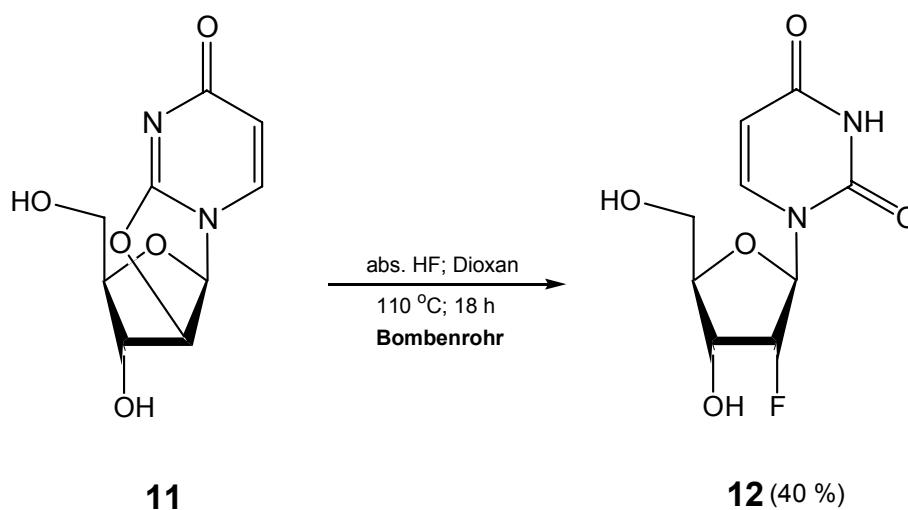


Abb.17: Darstellung von 2'-Desoxy-2'-fluor-uridin (**12**).

2,2'-Anhydro-*arabino*-uridins⁷⁹ (**11**) läßt sich leicht und in wenigen Stunden aus Uridin, Diphenylcarbonat, DMF und katalytischen Mengen Natriumhydrogencarbonat herstellen⁸⁰. *Miah et al.* berichteten von einem quantitativen Umsatz, während in eigenen Arbeiten nur eine maximale Ausbeute von 93% erzielt werden konnte. Im ¹H-NMR Spektrum ist die Bildung der Anhydrobrücke eindeutig an einer Kopplung der Basenprotonen H-5 und H-6 von 7.6 Hz zu erkennen, während diese in den offenkettigen Verbindungen durchgängig 8.2 Hz beträgt. Zudem ist ³J_{2',3'} sehr klein oder null.

Neben seiner Funktion als Edukt in dieser Arbeit wurde **11** auch wegen seiner starren Konformation an der *N*-glycosidischen Bindung als Modellsubstrat in Umsetzungen mit

Nucleosidphosphorylasen getestet⁸¹. Als Zuckernucleotidderivat wäre es auch im enzymatischen Transfer mit der β 4GlaT von Interesse und sollte daher zusätzlich zu den fluorierten Derivaten in dieser Arbeit synthetisiert und erprobt werden.

In früheren Arbeiten bediente man sich gerne wasserfreiem Fluorwasserstoffs als Fluorierungsreagenz. Obwohl sehr preiswert ist der apparative Syntheseaufwand aber stets etwas größer. So muß aufgrund des niedrigen Siedepunktes (19.6 °C) in rostfreien Stahlzylindern und unter Druck gearbeitet werden. Durch Arbeiten von *Olah et al.*⁸² ist es gelungen, mit dem Fluorwasserstoff-Pyridin-Komplex (70% Fluorwasserstoff/30% Pyridin; Olahs Reagenz) ein effizientes Fluorierungsreagenz nutzen zu können, das auf die übliche Hochdrucktechnik verzichten kann. Lediglich normale Reaktionsgefäße aus Glas müssen gegen solche aus Polypropylen oder Teflon ausgetauscht werden.

Die eigene Synthese des 2'-Desoxy-2'-fluor-uridin (**12**)⁷⁸ gelang aus **11** in Dioxan in Anlehnung an Arbeiten von Wittmann⁸³ jedoch mit Olahs Reagenz als Fluorierungsmittel in guter Ausbeute (**Abb.18**). Dabei erfolgte die stereoselektive *trans*-Öffnung der Anhydrobrücke im dipolaren aprotischen Lösungsmittel Dioxan regioselektiv.

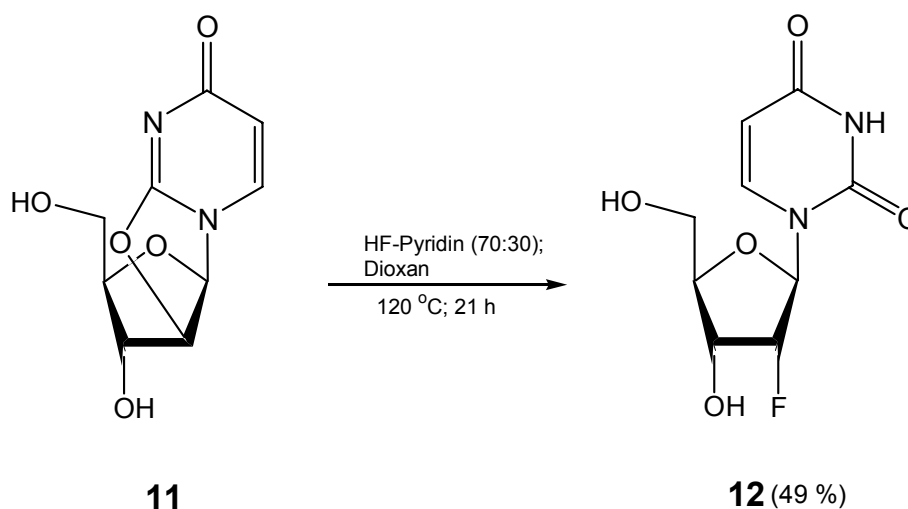


Abb.18: Darstellung von 2'-Desoxy-2'-fluor-uridin (**12**) mit Olahs Reagenz.

Die Einführung des Fluoratoms an der 2'-Position ist im $^1\text{H-NMR}$ klar an einem großen doppelten Dublett mit einer Proton-Fluor Kopplung von etwa 53 Hz zu erkennen. Auch die benachbarten Positionen 1' und 3' zeigen die erwartete große H,F-heteronucleare Kopplungen von 19 Hz bzw. 21 Hz.

Zu 3'-Desoxy-3'-fluor-uridin (**10**)⁸⁴ gelangt man durch Fluorierung von 2,3'-Anhydro-xylo-uridin (**13**). Bei der Reaktion von **13** mit 1% wasserfreiem Fluorwasserstoff in Dioxan mit Beteiligung von Aluminiumtrifluorid erhielten *Langen et al.* neben dem gewünschten Produkt **10** (31%) zu überwiegenden Teilen auch noch 2'-Desoxy-2'-fluor-uridin (**12**) (47%)⁸⁴. Die Bildung von **12** erklärten sie mit der Umlagerung des Edukts **13** in das thermodynamisch stabilere Edukt **11** im Verlauf der Reaktion (**Abb.19**).

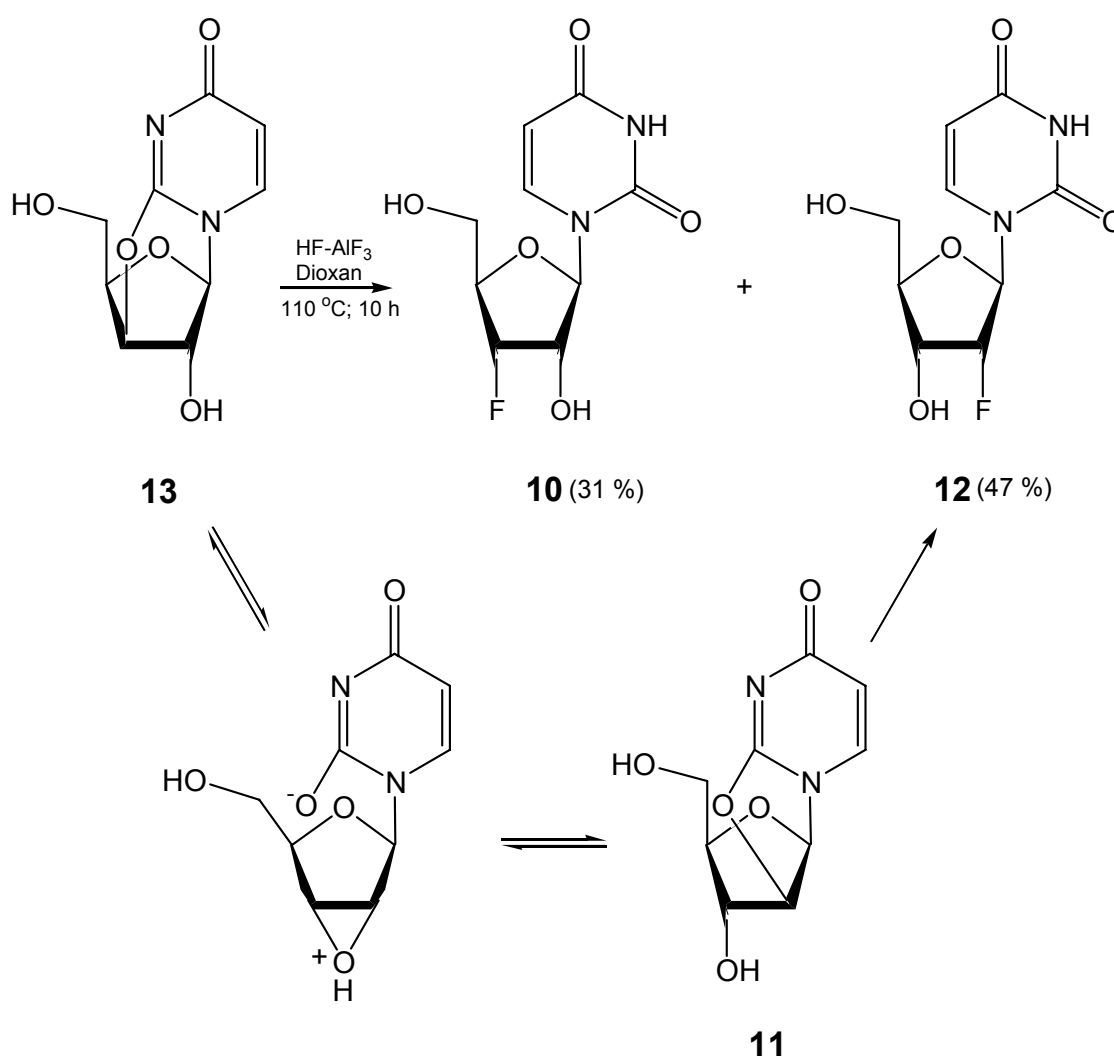


Abb.19: Mögliche Umlagerungen bei der Synthese von 3'-Desoxy-3'-fluor-uridin (**10**).

Die angegebenen Ausbeuten bestimmten sie anhand NMR-spektroskopischer Untersuchungen, da die beiden synthetisierten Nucleoside chromatographisch nicht zu trennen waren. Erst die Einführung einer Tritylschutzgruppe an 2'-Position durch *Misra et al.* verhinderte eine Umlagerung und führte ausschließlich zu Produkt **10**⁷⁶.

Um eine mögliche Umlagerung direkt auszuschließen, sollte auch in bei dem in dieser Arbeit gewählten Syntheseweg eine Schutzgruppe an der 2'-Position eingeführt werden. Als Edukt wurde daher das an den Positionen 2' und 5' Trityl-geschützte 2,3'-Anhydro-2',5'-*O*-ditrityl-*xylo*-uridin (**15**)^{79,85} gewählt, das aus 2',5'-Ditrityl-uridin⁸⁶ (**14**) synthetisiert wurde. Dabei wurde in eigenen Arbeiten die Synthese von **14** im Bereich der Produktisolierung dahingehend verändert, dass auf eine fraktionierende Kristallisation zur Reinigung verzichtet wurde und mittels Säulenchromatografie eine Ausbeutesteigerung erzielt werden konnte.

2,3'-Anhydropyrimidin-Nucleoside sind bis heute nach einer Vielzahl von Methoden^{87,86} hergestellt worden, wobei stets zuvor eine gute Abgangsgruppe an 3'-Position eingeführt werden mußte. Die am häufigsten genutzte Synthesevariante ist zweistufig. Nach der Einführung einer Mesylgruppe an der 3'-Position wird diese baseninduziert abgespalten und so die 2,3'-Anhydrobrücke im gewünschten Produkt **15** ausgebildet. Diese Methode ist jedoch sehr zeitaufwendig und benötigt hohe Reaktionstemperaturen. So erzielten *Fox et al.*⁸⁶ eine Gesamtausbeute über alle Stufen ausgehend vom 2',5'-*O*-Ditrityl geschützten Nucleosid von lediglich 53 %.

*Baker et al.*⁸⁷ beschrieben zum ersten Mal den Einsatz von *N,N*-Diethylaminoschwefeltrifluorid (DAST) zur Herstellung einer 2,3'-Anhydrobrücke bei mehreren 2'-Desoxynucleosiden. Obwohl DAST eigentlich als mildes Fluorierungsreagenz bekannt ist, erhielten sie in diesem Fall gezielt, schnell und sehr effizient 2,3'-Anhydro-pyrimidin-nucleoside ausgehend von 5'geschützten Edukten. Die Bildung des in dieser Arbeit benötigten 2,3'-Anhydro-2',5'-*O*-ditrityl-*xylo*-uridin (**15**) wurde bisher erst einmal von *Miyaska et al.*⁸⁸ beobachtet, als sie gezielt Pyrimidinnucleoside mit vicinalen Hydroxylgruppen mittels DAST fluorierten. Beim Umsatz von **14** mit zwei Äquivalenten DAST isolierten sie **15** in geringen Ausbeuten, während mit einem Äquivalent DAST ausschließlich **15** erhalten wurde.

In eigenen Arbeiten konnten die Beobachtungen von *Miyaska et al.* jedoch auch nach Variation der Reaktionsbedingungen nicht bestätigt werden. Erst in Anlehnung an die zuvor beschriebene Methode von *Baker et al.* ist in dieser Arbeit die Synthese von **15** in guten

weder die Bildung von 2'-Desoxy-2'-fluor-uridin (**12**) noch die von 5'-Desoxy-5'-fluor-uridin beobachtet wurde (**Abb.21**).

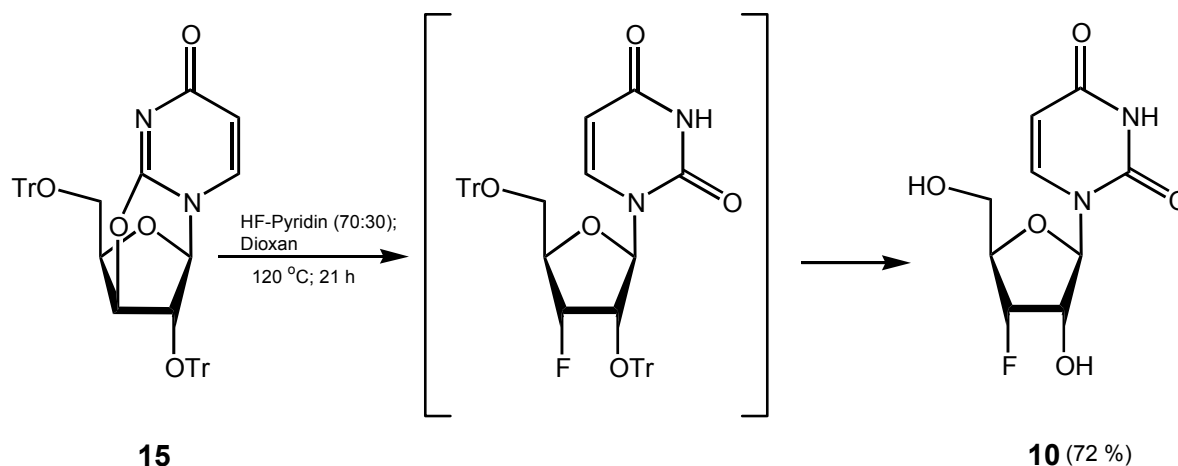


Abb.21: Darstellung von 3'-Desoxy-3'-fluor-uridin (**10**) (Tr = Tritylschutzgruppe).

Nach der erfolgreichen Synthese der fluorierten Nucleoside **10** und **12** war als nächstes die Phosphorylierung an der 5'-Position zu realisieren. Dies ist häufig ein sensibler Syntheseschritt, der mit schlechten Ausbeuten und aufwendigen Trennungen verbunden ist. Zur Herstellung phosphorylierter Nucleosidderivate kann man grundsätzlich mehrere Wege gehen.

So eignen sich als Phosphorylierungsreagenzien unter anderem Monochlorphosphorsäureester, wie z.B. Diphenylchlorophosphat⁸⁹ oder auch Phosphormorpholide⁹⁰. Für Nucleoside, die an der 5'-Position chloriert sind, bieten sich Umsetzungen mit Silbersalzen⁹¹ (z.B. Trisilberphosphat und Silber- diphenylphosphat) oder andere Salze der Phosphorsäure⁹² (z.B. Tri-*n*-pentylaminsalz) an. Während die Sensitivität der Phosphorylierungsreagenzien zwar ein Vorteil ist, gibt es durchaus Probleme bei der Abspaltung der im Reagenz vorhandenen Schutzgruppen. So ist bei dem Einsatz Phenyl-geschützter Phosphorylierungsreagenzien damit zu rechnen, dass die Schutzgruppen in der Hydrierung auch unter harschen Bedingungen nicht vollständig abgespalten werden⁹³. Die Abspaltung der zweiten Phenylgruppe gelingt oft erst nach Inkubation des Monophosphats mit einer Phosphoesterase. Ein weiterer unerwünscht auftretender Nebeneffekt ist eine partielle

Hydrierung der Base. Erst der Wechsel zu Benzylschutzgruppen verhindert die Basenhydrierung⁹⁴.

Hydroxylierte Nucleoside lassen sich selektiv mit Phosphorylchlorid in Trimethylphosphat zu den gewünschten Nucleotiden umsetzen⁹⁵. Diese Darstellung eignet sich besonders zur Phosphorylierung an primären Hydroxylgruppen, und wird zur Synthese von Uridin-5'-*O*-monophosphat (**17**) aus ungeschütztem Uridin (**16**) angewandt⁹⁶ (**Abb.22**).

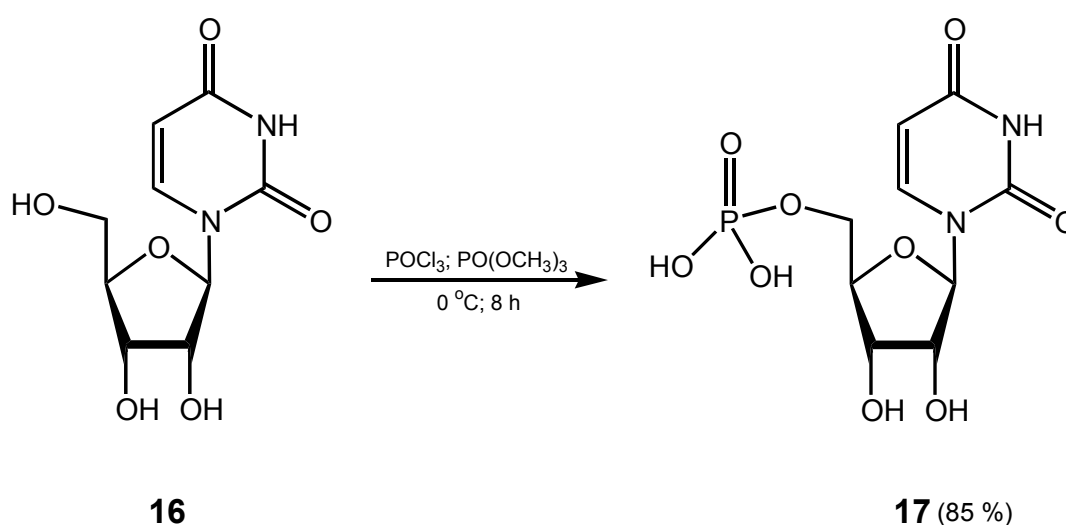


Abb.22: Darstellung von Uridin-5'-*O*-monophosphat (**17**).

Um die negativen Aspekte der oben erwähnten Phosphorylierungsreagenzien zu umgehen und auch einen Syntheseschritt einzusparen, bot es sich daher an, eine direkte Phosphorylierung der ungeschützten Fluoronucleoside (**10** und **12**) und des 2,2'-Anhydro-*arabino*-uridins (**11**) mit Phosphorylchlorid zu versuchen. Durch Zugabe einer Base beobachteten Sowa *et al.*⁹⁶ eine Selektivitätssteigerung, womit die Bildung höher phosphorylierter Nucleoside vermieden wird. Sie konnten feststellen, dass sich Pyridinhydrochlorid besonders gut als Base eignet, da ein ionischer Komplex aus dem Amin und Phosphorylchlorid gebildet wird, ohne dass es zu einer Reaktion zwischen dem Phosphorylierungsreagenz und der Base kommt.

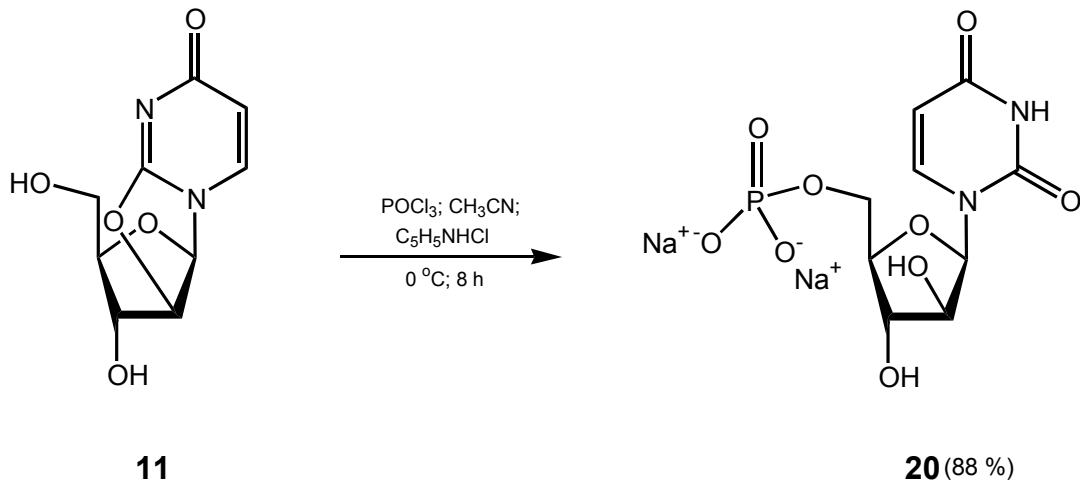


Abb.24: Darstellung von *arabino*-Uridin-5'-*O*-monophosphat (**20**) als Dinatriumsalz.

Da die 2,2'-Anhydrobrücke wahrscheinlich säurekatalysiert geöffnet wurde, wurde in einem weiteren Versuch während der Aufarbeitung auf eine Trennung an einem sauren Ionentauscher verzichtet. Die Reinigung mittels Reversed-Phase-HPLC lieferte schließlich das gewünschte Produkt **21** mit einer Ausbeute von 48% (**Abb.25**).

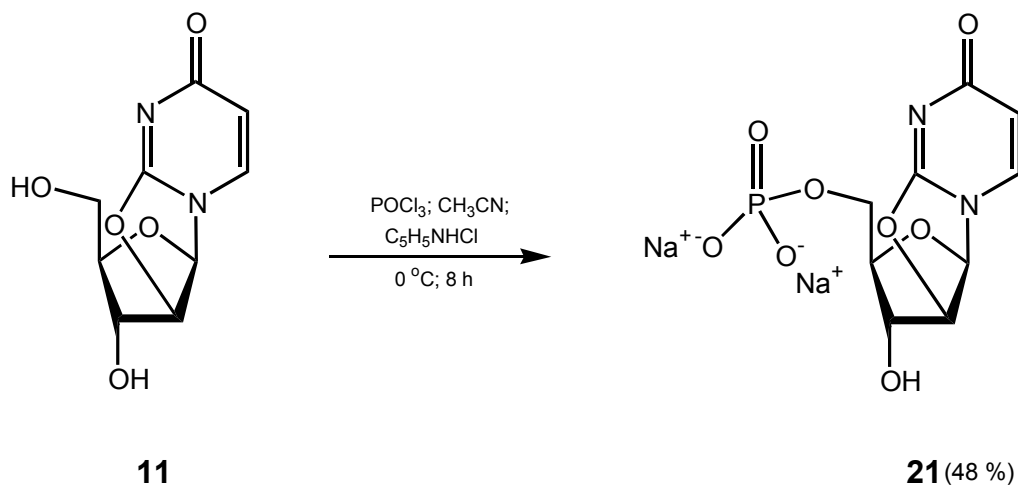


Abb.25: Darstellung von 2,2'-Anhydro-uridin-5'-*O*-monophosphat (**21**) als Dinatriumsalz.

4.3 Synthese der fluormodifizierten Zuckernucleotide

Um den konvergenten Syntheseweg mit der Darstellung der Zuckernucleotide zum Abschluß zu bringen, mußten die zuvor synthetisierten Nucleotide mit α -D-Galactose-1-Phosphat über eine Diphosphatkupplung verbunden werden.

Die Darstellung von Zuckernucleotiden erfolgt entweder rein enzymatisch, chemoenzymatisch oder rein chemisch, wobei die ersten beiden Synthesemöglichkeiten aufgrund ihrer oft hohen Regio- und Stereospezifität gerade für die Darstellung natürlicher Zuckernucleotide immer öfter eingesetzt werden. In der Biosynthese werden die von Glycosyltransferasen verwendeten Zuckernucleotide fast ausschließlich aus den entsprechenden Nucleosidtriphosphaten zusammengefügt. Dabei wird das Nucleosidtriphosphat mit Glycosylphosphat durch eine Zuckernucleotid-Pyrophosphorylase zum Zuckernucleotid umgesetzt. Analog kann auch aus α -D-Galactose-1-Phosphat (**22**) und UTP (**21**) durch UDP-Galactose-Pyrophosphorylase UDP-Galactose (**24**) *in vitro* synthetisiert werden⁹⁸ (**Abb.26**).

Es ist außerdem möglich, Uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose (**24**) durch Epimerisierung aus vergleichsweise preiswerter Uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-glucose mit UDP-Glc-4-Epimerase zu erhalten, wobei allerdings das Gleichgewicht dieser Reaktion auf der Seite der Uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-glucose liegt²¹. Trotz dieser Gleichgewichtsverschiebung wird diese Reaktion oft in enzymatischen Glycosylierungen eingesetzt, da sich das Epimerase-Gleichgewicht durch die sofortige Umsetzung zugunsten von Uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose (**24**) verschiebt.

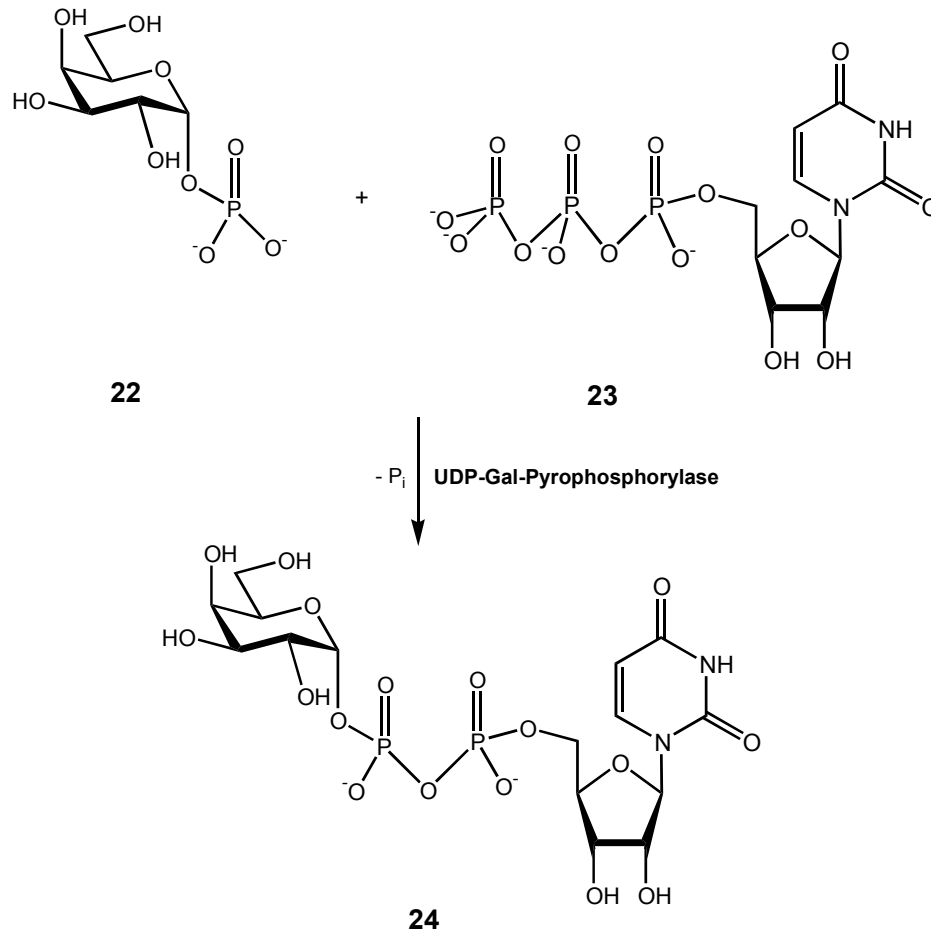
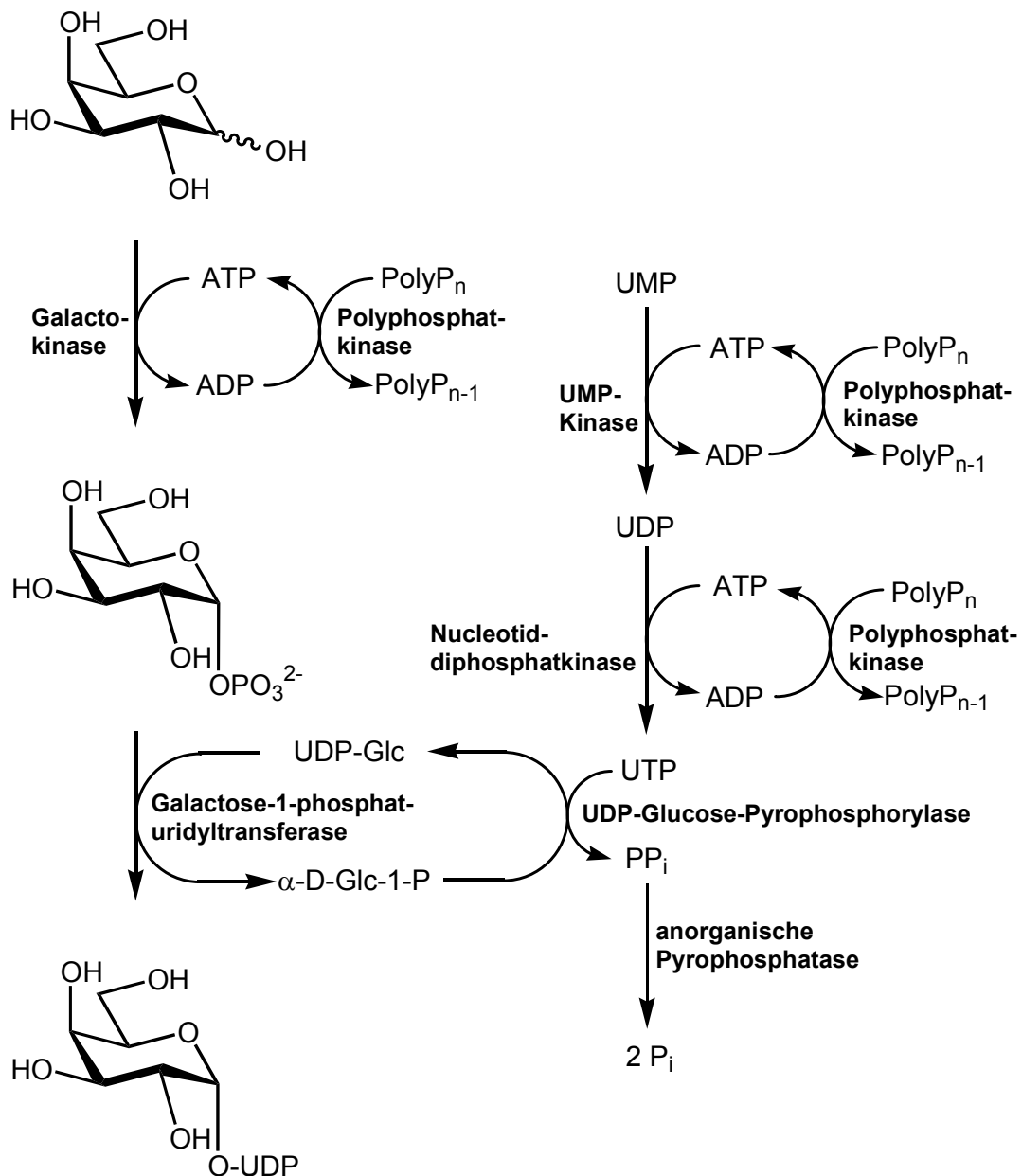


Abb.26: Darstellung von Uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose (**24**).

Vor kurzem ist es gelungen, Uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose (**24**) durch Adaption und Modifizierung des natürlichen biosynthetischen Syntheseweges mit den Vorteilen entsprechend immobilisierter Enzyme in großen Mengen und sehr kosteneffizient herzustellen²²⁹. Neben den Edukten UMP (**17**), Galactose und Polyphosphat werden in katalytischen Mengen nur noch ATP und α -D-Glucose-1-phosphat benötigt. Die Enzyme werden in kompetenten *E. Coli* Kulturen exprimiert, an Agarose immobilisiert und in einer Säule fixiert. Im Zyklus wird die Reaktionslösung dann mehrfach durch die Säule gepumpt. Die Gesamtkosten zur Herstellung von einem Gramm Uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose (**24**) summieren sich zu < 20 US\$ (100 mg Uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose kosten bei Sigma allerdings 439.20 US\$). Das Multienzymsystem ist in **Abb.27** dargestellt.



24

Abb.27: Multienzystem zur Herstellung von Uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose (24).

Auch auf chemo-enzymatischer Art und Weise sind sowohl natürliche wie auch modifizierte Zuckernucleotide hergestellt worden. Dabei wurden sowohl im Fall der natürlichen Zuckernucleotide⁹⁹ als auch bei den modifizierten Zuckernucleotiden wie zum Beispiel bei der Herstellung von UDP-(2-desoxy-2-fluor)- α -D-galactose aus 2-Desoxy-2-fluor- α -D-galactose

die Diphosphatkupplung enzymatisch durchgeführt^{66a}. Die chemisch modifizierte Galactose wurde enzymatisch phosphoryliert und abschließend mit Galactose-1-phosphat Uridyltransferase zum Zuckernucleotid umgesetzt. Auch UDP-2-desoxy- α -D-galactose wurde nach diesem Verfahren hergestellt¹⁰⁰. Der Nachteil dieser chemo-enzymatischen Synthesen ist jedoch bei den Kosten für die eingesetzten Enzyme im Vergleich zu den rein chemischen Synthesen zu sehen. Auch der Zeitaufwand ist mit den chemischen Synthesen vergleichbar. Zudem beziehen sich die vorgestellten chemo-enzymatischen Synthesen der modifizierten Zuckernucleotide auf Veränderungen im Bereich der Hexose und nicht wie in der vorliegenden Arbeit auf die Ribose des Nucleosids. Wegen der ungeklärten Frage nach der molekularen Erkennung durch die eingesetzten Enzyme kommt diese Methode für die eigenen Arbeiten nicht in Betracht.

Die am meisten genutzte Methode, um modifizierte wie auch natürliche Zuckernucleotide herzustellen, ist jedoch der rein chemische Syntheseweg. Dabei muß keine Rücksicht darauf genommen werden, inwieweit die entsprechenden Enzyme die modifizierten Edukte tolerieren. Es haben sich vor allem drei Methoden etabliert.

Die erste hier vorgestellte, chemische Methode wurde von *Hindsgaul et al.* entwickelt⁹⁴. So wurde zum Beispiel 2,3,4,6-Tetra-*O*-benzyl- α/β -D-galactopyranosyl-bromid (**25**) mit dem Tetra-*n*-butylammoniumsalz von UDP zu den entsprechenden Zuckernucleotiden **26** umgesetzt, die allerdings als Anomerengemische entstanden. Die benzylierten Produkte ließen sich danach ohne Zersetzung über eine Kieselgelsäule reinigen und anschließend durch katalytische Hydrierung entschützen, ohne dass die Doppelbindung in der Base des Nucleosids angegriffen wurde. Beim später folgenden enzymatischen Transfer durch das Enzym β 4GalT stellten die Autoren keine Inhibierung des Enzyms durch die Verwendung des α/β -Anomerengemisches fest. Ein Vorteil der Verwendung geschützter Hexosen liegt in der kurzen Reaktionsdauer von 2-5 Stunden und in den allgemein relativ hohen Ausbeuten. Da in der abschließenden enzymatischen Untersuchung jedoch anomereneine Zuckernucleotide eingesetzt werden sollten, wurde diese Methode nicht herangezogen (**Abb.28**).

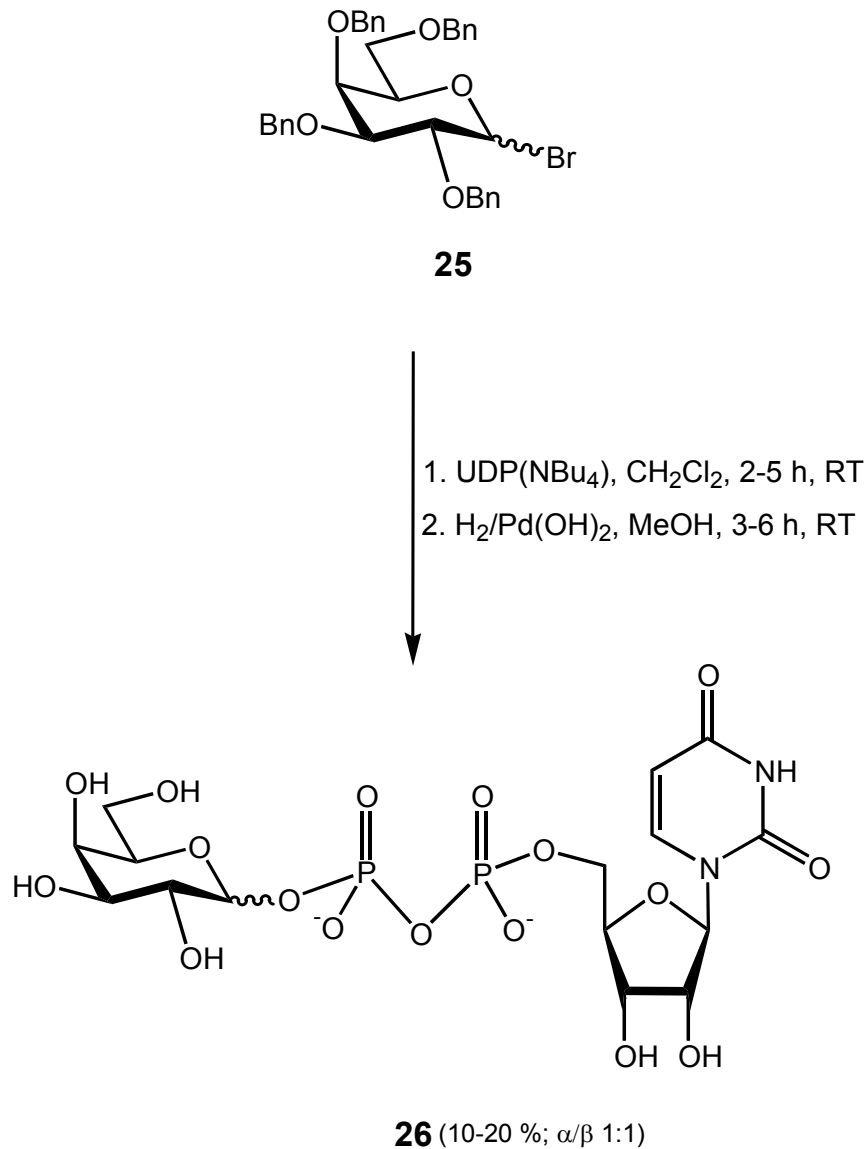


Abb.28: Darstellung des α/β -Anomerengemisches von Uridin-5'-*O*-diphosphat-D-galactose (**26**) nach Hindsgaul.

Die zweite und am häufigsten angewandte Variante, um Zuckernucleotide zu synthetisieren, ist die von *Moffatt et al.*¹⁰¹. Diese Synthese nutzt zur Aktivierung die morpholidierte Form des Nucleotids **27**, das im molaren Unterschuß (1:2) mit α -D-Galactose-1-phosphat (**22**) in Pyridin zu Uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose (**24**) umgesetzt wird. Dabei werden nach Reaktionszeiten von bis zu fünf Tagen die entsprechenden Zuckernucleotide in mäßigen Ausbeuten von bis zu 20 % gebildet (**Abb.29**).

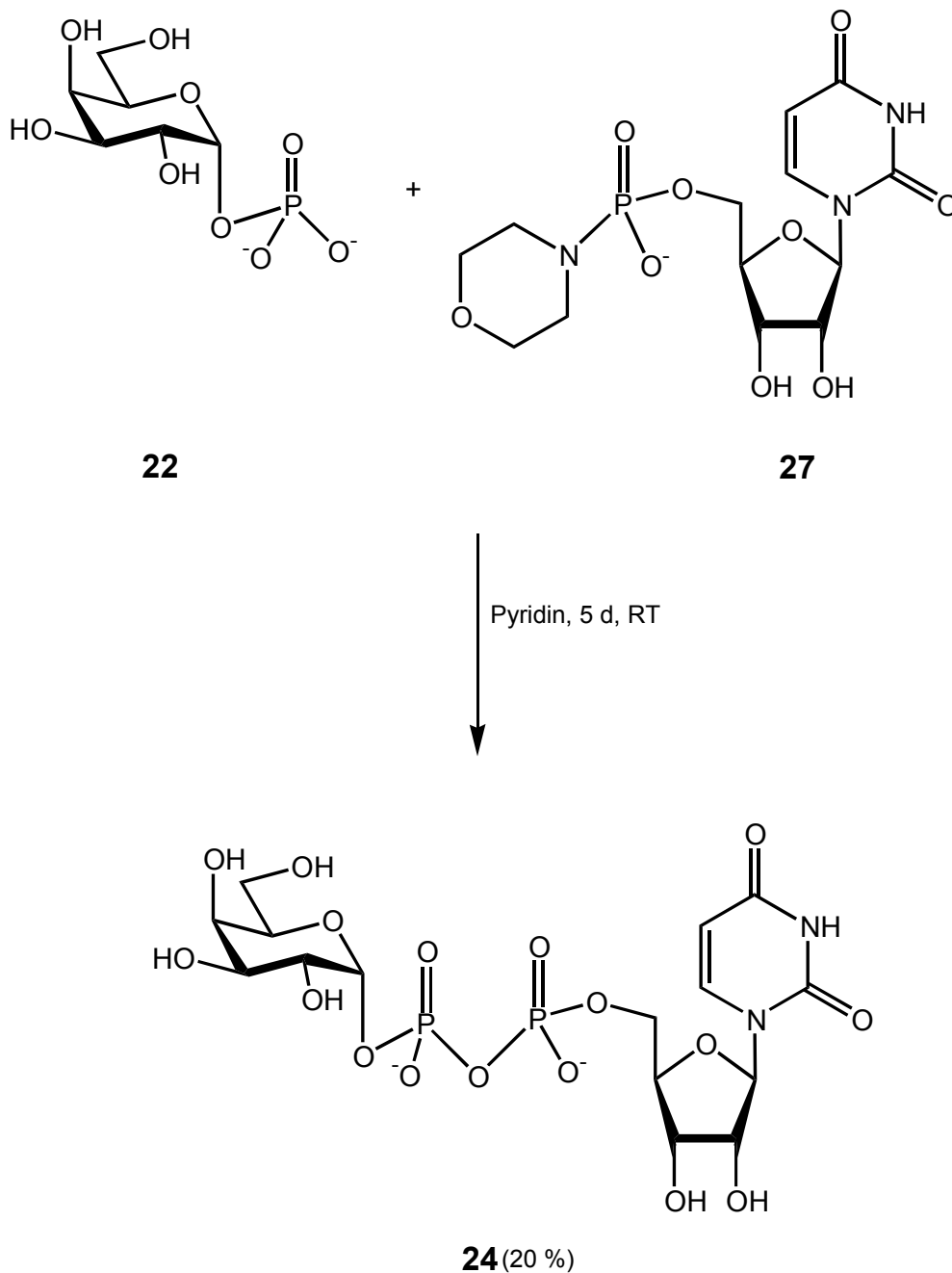


Abb.29: Darstellung von Uridin-5'-O-diphosphat- α -D-galactose (**24**) nach Moffatt¹⁰².

Eine dritte Möglichkeit zur Synthese von Zuckernucleotiden beschrieben *Kodama et al.*^{67a}. Dabei wird nicht wie bei der Moffatt-Methode das Nucleotid aktiviert, sondern die phosphorylierte Hexose. So wird 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-galactose-1-phosphat (**28**) mittels N,N'-Carbonyldiimidazol (CDI) als entsprechendes Imidazolid **29** in situ aktiviert und anschließend direkt im Verhältniss (1.3 : 1) mit Uridin-5'-O-monophosphat (**17**) zu Uridin-5'-

O-diphosphat- α -D-galactose (**24**) umgesetzt. Die Ausbeuten sind mit denen der Moffatt-Methode vergleichbar, der Vorteil liegt aber in den kürzeren Reaktionszeiten von zwei Tagen. Diese Methode ist zudem besonders geeignet, um empfindliche und/oder modifizierte Nucleotide umzusetzen, da hier das günstigere α -D-Galactose-1-phosphat aktiviert wird und nicht das Nucleotid (**Abb.30**).

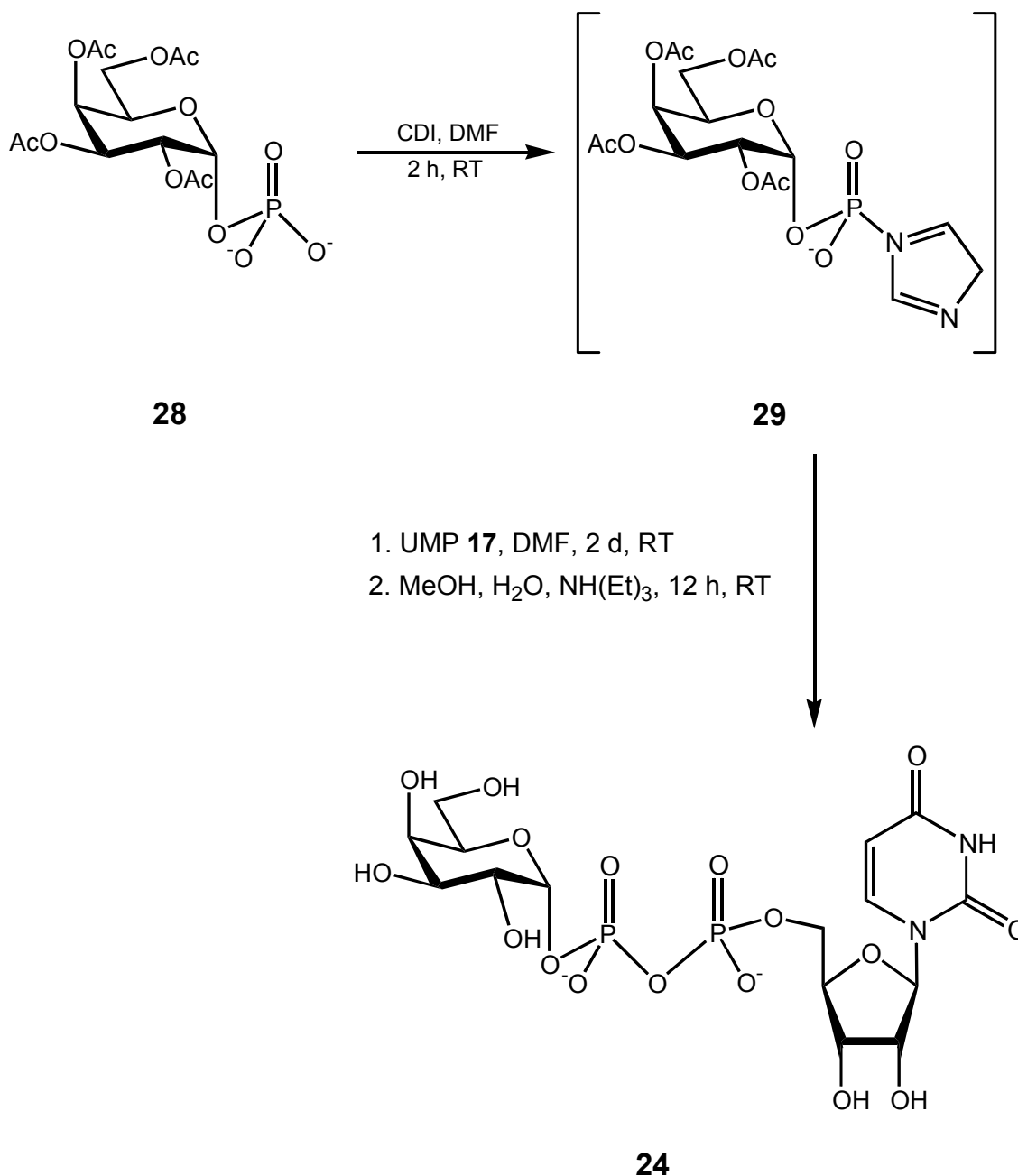


Abb.30: Darstellung von Uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose (**24**) nach der Kodama-Methode.

In dieser Arbeit geht es um die Synthese modifizierter Zuckernucleotide, so dass sowohl die Moffatt- wie auch die Kodama-Methode als die Methoden der Wahl erschienen.

So sollte zu Beginn die Synthese der Zuckernucleotide nach der Moffatt-Methode durchgeführt werden. Dazu war es notwendig, die modifizierten Nucleoside **18**, **19** und **21** in die entsprechenden Morpholidate¹⁰² zu überführen, da diese sich besonders gut für die anschließende Kupplung zum Zuckernucleotid eignen. Die morpholidinierten Nucleoside wurden als 4-Morpholin-*N,N'*-dicyclohexylcarboxamidinsalze hergestellt, da diese die Stabilität der jeweiligen Verbindung erhöhen⁵⁸. So wurden das 2'-Desoxy-2'-fluor-uridin-5'-*O*-monophosphatmorpholidat (**30**) und 3'-Desoxy-3'-fluor-uridin-5'-*O*-monophosphatmorpholidat (**31**) in Ausbeuten von 85 % bzw. 84 % erhalten (**Abb.31**).

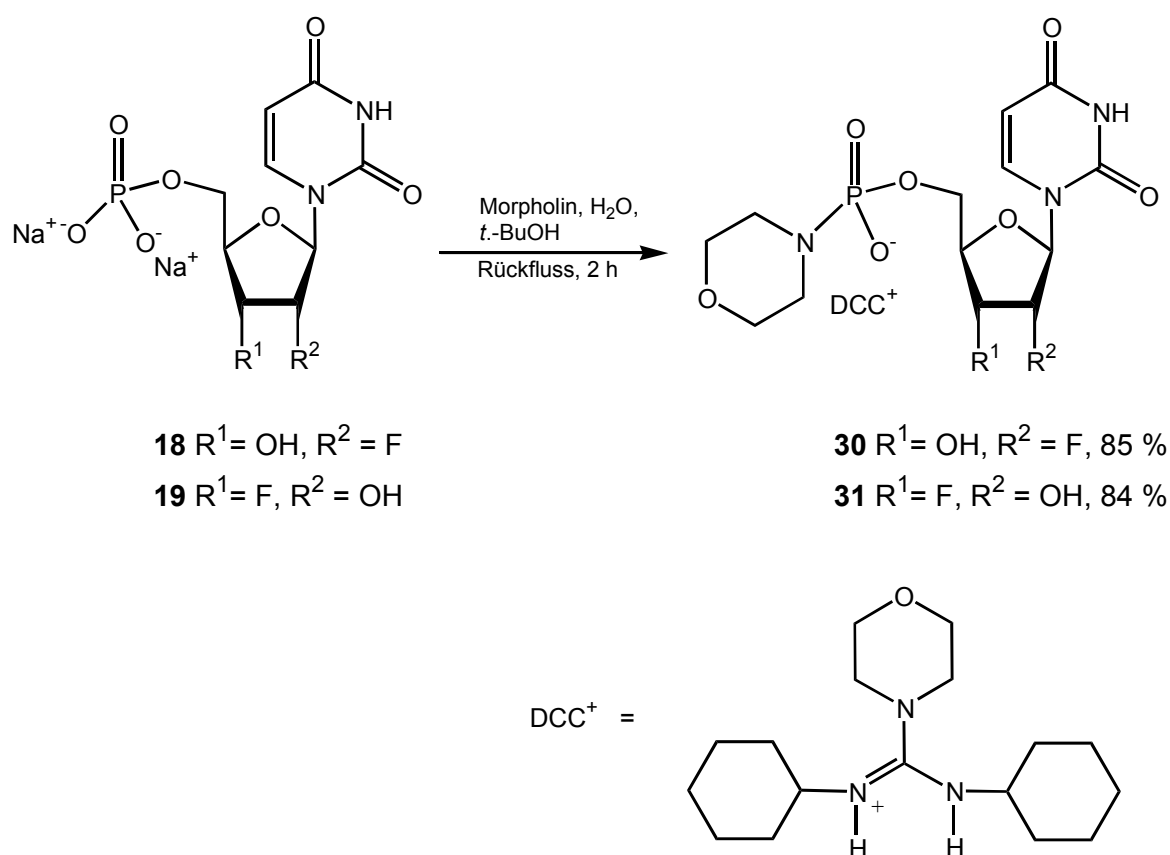


Abb.31: Darstellung der Morpholidate **30** und **31**.

Die Morpholinierung des 2,2'-Anhydro-uridin-5'-*O*-monophosphats (**21**) zum gewünschten Produkt **32** gelang mit einer akzeptablen Ausbeute von 55 %. Als Nebenprodukt wurde in geringen Mengen die Bildung von geöffneten *arabino*-Uridin-5'-*O*-monophosphat-morpholidats (**33**) beobachtet, das aufgrund einer Hydrolyse der Anhydrobrücke entstand (**Abb.32**).

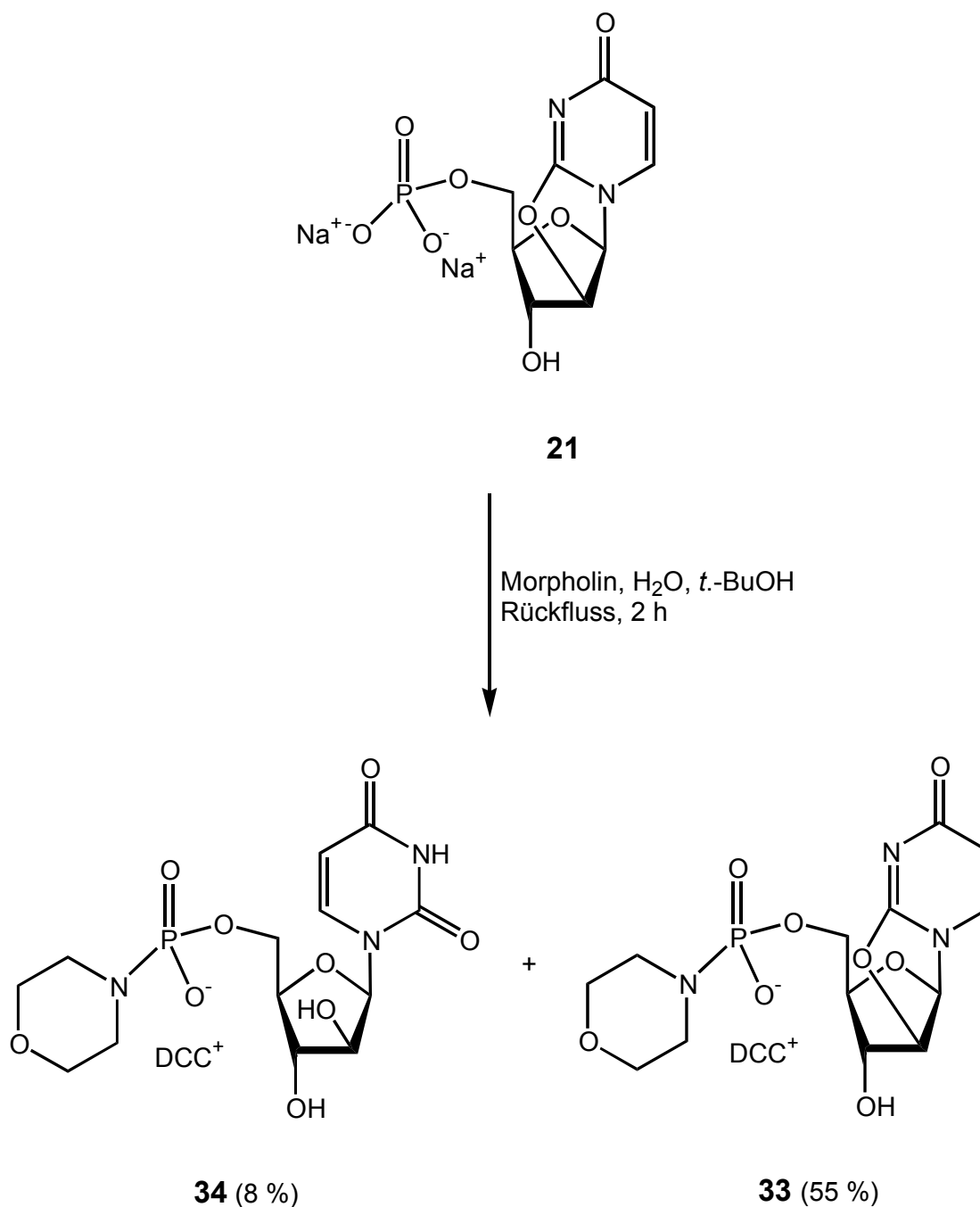


Abb.32: Darstellung von (**33**).

Das 2'-Fluor-morpholidat **30** ließ sich dann schließlich mit 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-galactose-1-phosphat Trioctylammoniumsalz (**28**) zu 2'-Desoxy-2'-fluor-uridin-diphosphat- α -D-galactose (**34**) umsetzen. Allerdings betrug die Ausbeute nur 8%.

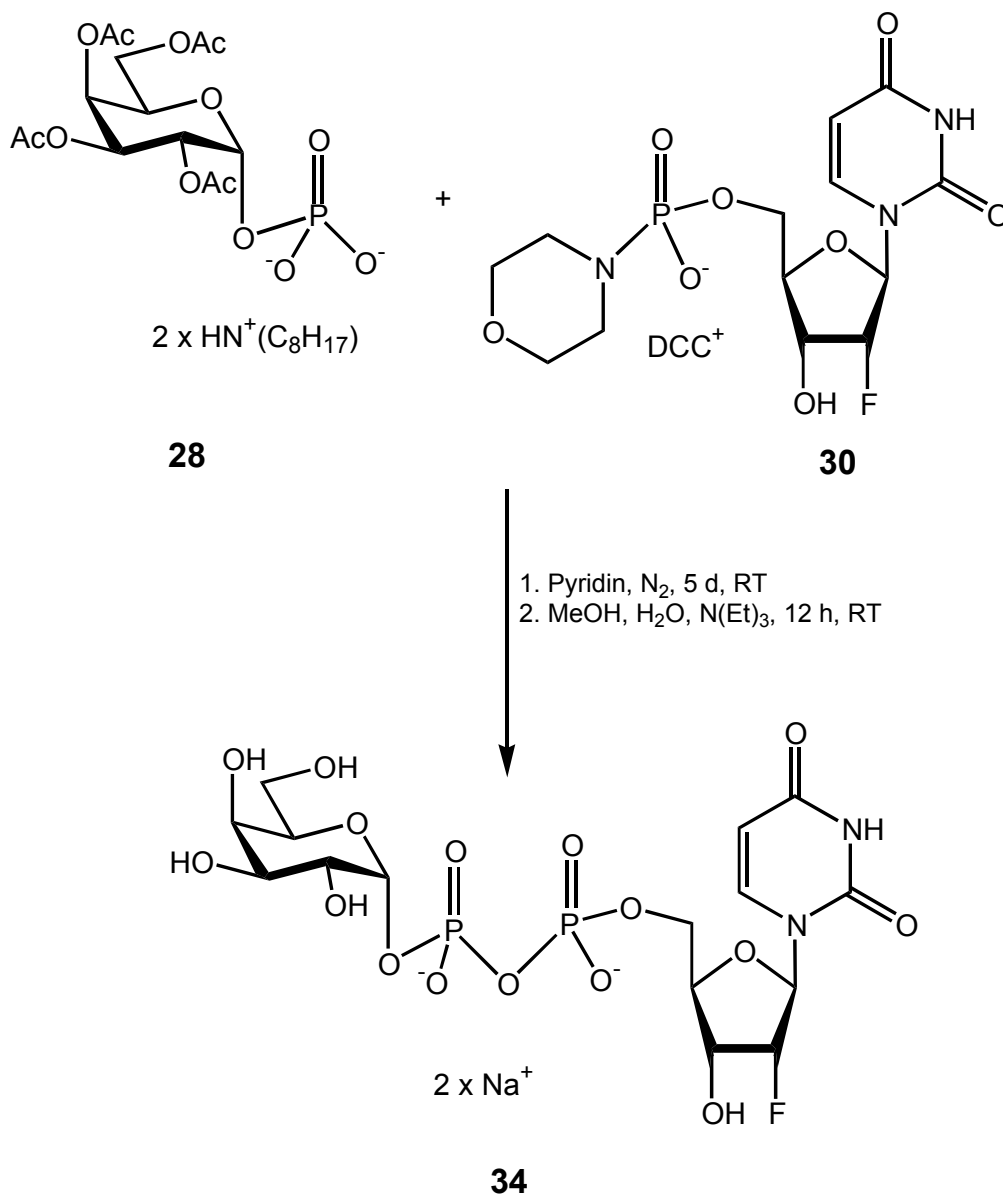
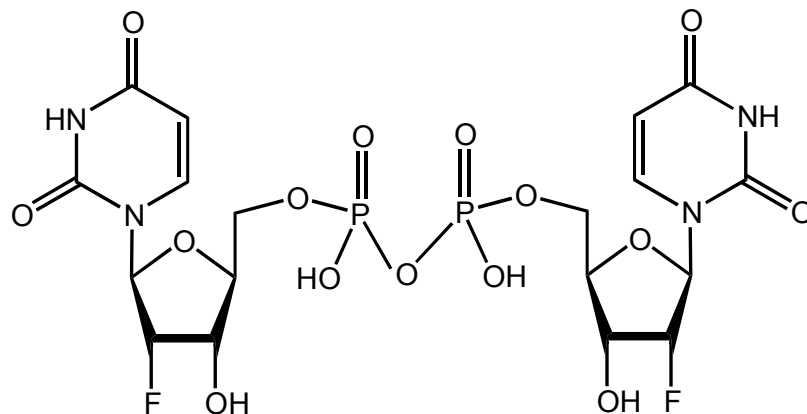


Abb.33: Darstellung von 2'-Desoxy-2'-fluor-uridin-diphosphat- α -D-galactose (**34**) nach der Moffatt-Methode.

Da die Pyrophosphatgruppe derartiger Zuckernucleotide nicht nur in leicht saurem Milieu instabil sind, sondern sich sogar schon in neutralen Lösungen hoher Ionenstärke

zersetzen¹⁰³, wurde **34** direkt in das Dinatriumsalz überführt. In dieser Form war es bei -30 °C längerfristig lagerbar.

Neben dem gewünschten Produkt **34** wurde in einer Nebenreaktion noch eine weitere Verbindung gebildet, bei der es sich vermutlich um das Homodimer **35** des Nucleotids handelt. Es wurde nicht isoliert, war aber im ³¹P-NMR-Spektrum des Rohprodukts zu identifizieren. Die Pyrophosphatbindung in **34** besitzt zwei Dubletts ($\delta = -11.41$ ppm, P_α und -9.98 ppm, P_β) mit einer charakteristischen $J_{P,P}$ -Kopplungskonstanten von ca. 20 Hz, während das homodimere Nebenprodukt **35** nur ein Singulett bei etwa -10.05 ppm hat. Diese Bildung von symmetrischen Pyrophosphaten wurde schon mehrfach bei ähnlichen Umsetzungen beobachtet¹⁰⁴ (**Abb.34**).



35

Abb.34: Symmetrisches Dimer 2'-Desoxy-2'-fluor-O-diphosphat (**35**).

Dabei verläuft die Bildung der Pyrophosphatbindung mechanistisch über die Protonierung des Morpholidatstickstoffatoms und einem anschließenden nucleophilen Angriff des Phosphoratoms durch das Phosphoresteranion¹⁰² (**Abb.35**).

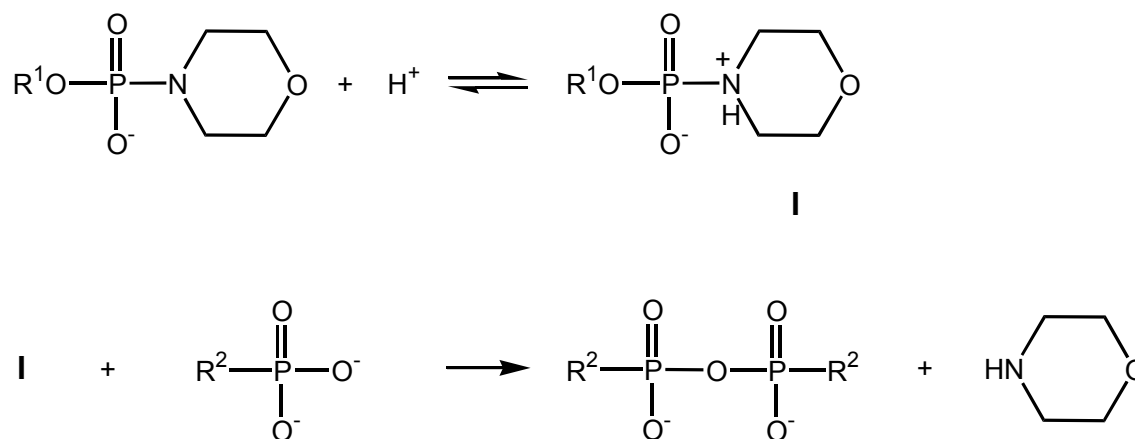


Abb.35: Pyrophosphatbildung.

Die P^1, P^2 -Dinucleosid-5'-*O*-pyrophosphate werden bei Reaktionen von Amidaten nach der Moffatt-Methode wahrscheinlich durch die Kupplung eines aktivierten Phosphats mit einem durch Hydrolyse entstandenen Monophosphat gebildet¹⁰⁵. So ist das beobachtete Dimer **35** vermutlich ähnlich aus dem Morpholidat **30** und dem freien Phosphat **18** entstanden, das während der Aufarbeitung in wässrigem Milieu gebildet wurde.

Das an 3'-fluorierte Derivat **36** der Uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose konnte nach der Moffatt-Methode aus dem Phosphormorpholidat **31** und per-*O*-acetyliertem α -Galactose-1-phosphat **28** in einer gleichermaßen bescheidenen Ausbeute von 7 % hergestellt werden. Wie schon bei der Synthese zu 2'-Desoxy-2'-fluor-uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose (**34**) wurde das acetylierte Rohprodukt nach Gefriertrocknung mit Triethylamin/Methanol/Wasser deacetyliert und mittels Reversed-Phase-HPLC gereinigt. Auch hier wurde das gewonnene Produkt zur Stabilisierung sofort in das Dinatriumsalz überführt (**Abb.36**).

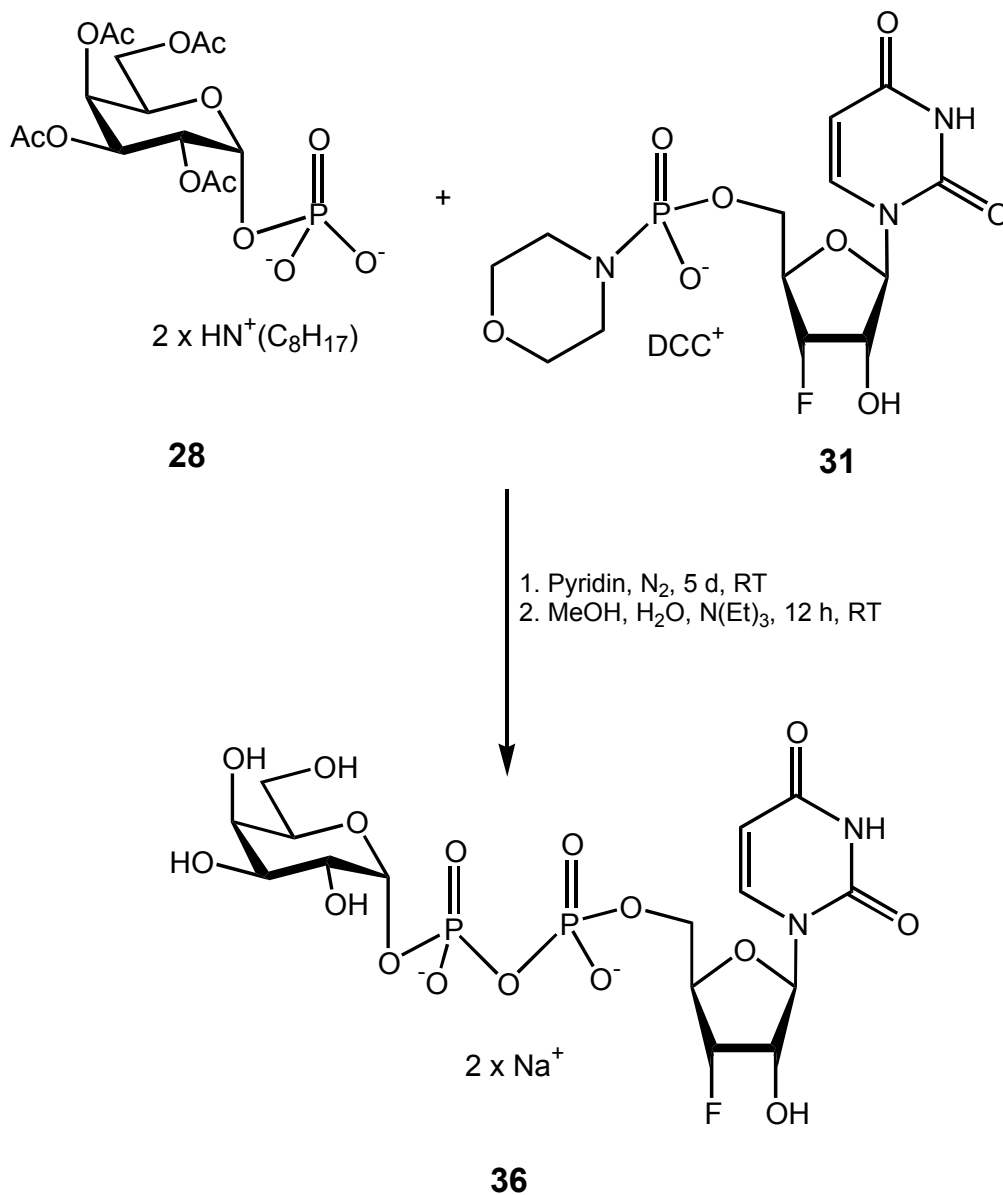
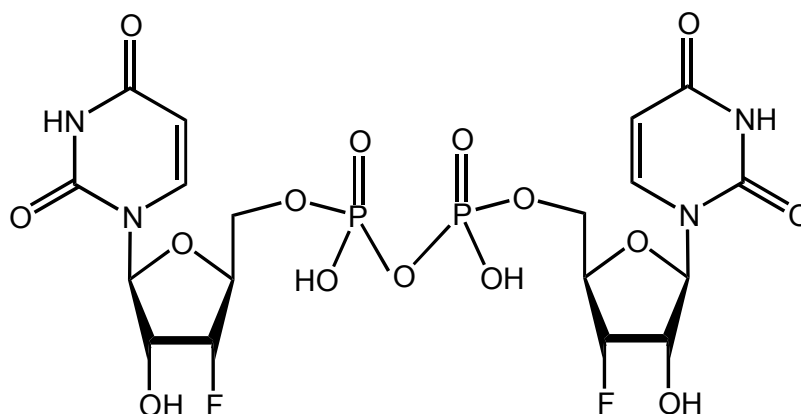


Abb.36: Darstellung von 3'-Desoxy-3'-fluor-uridindiphosphat- α -D-galactose (**36**) nach der Moffatt-Methode.

Auch hier konnte ^{31}P -NMR-spektroskopisch im Rohprodukt ebenfalls die Bildung einer homodimeren Verbindung **37** nachgewiesen werden, die allerdings auch in diesem Fall nicht isoliert wurde, jedoch in der Aufarbeitung vom eigentlichen Produkt abgetrennt wurde (**Abb.37**).



37

Abb.37: Symmetrisches Dimer 2'-Desoxy-2'-fluor-*O*-diphosphat (**37**).

Die Synthese des 2,2'-anhydroverbrückten Uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose Derivates **38** gelang nach der Moffatt-Methode nicht. Es wurde ein vollkommen uneinheitliches Produktgemisch erhalten, das keine Anzeichen auf das gewünschte Produkt aufwies.

Da die Kodama-Methode gegenüber der von Moffatt gerade beim Einsatz modifizierter Nucleotide einige Vorteile besitzt, wurde diese Variante ebenfalls untersucht. 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-galactose-1-phosphat (**28**) wurde mit *N,N'*-Carbonyldiimidazol (CDI) zum entsprechenden Imidazolid¹⁰⁶ **29** umgesetzt und ohne weitere Aufarbeitung mit 2'-Desoxy-2'-fluor-uridin-5'-*O*-monophosphat (**18**) in DMF zwei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Direkte Abspaltung⁵⁴ der Acetylschutzgruppen lieferte nach anschließender Reversed Phase-HPLC Reinigung die gewünschte 2'-Desoxy-2'-fluor-uridindiphosphat- α -D-galactose (**34**) in 19 % Ausbeute (**Abb.38**).

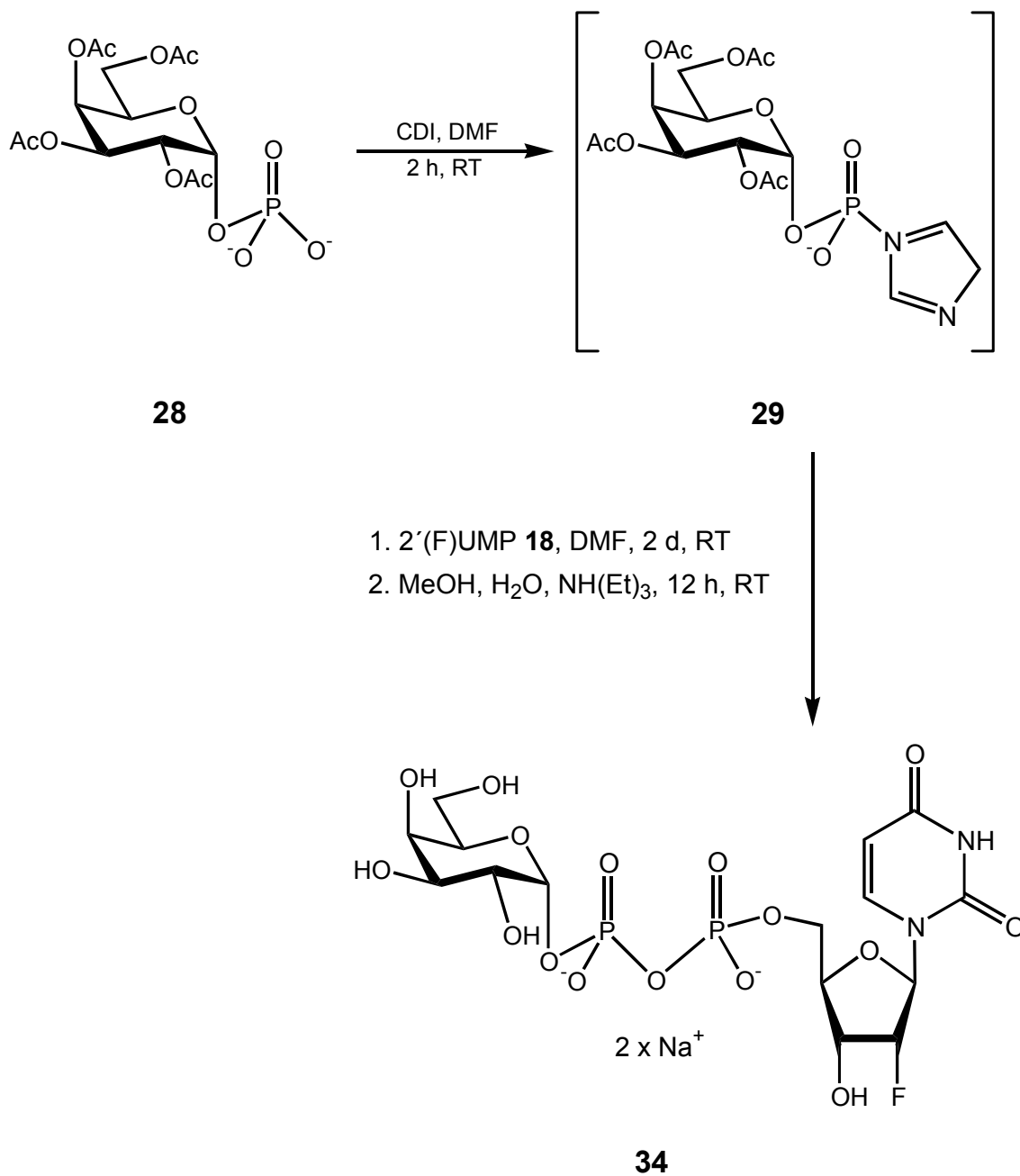


Abb.38: Darstellung von 2'-Desoxy-2'-fluor-uridin-diphosphat- α -D-galactose (**34**) nach der Kodama-Methode.

Aus Stabilitätsgründen wurde das Produkt sofort in das entsprechende Dinatriumsalz überführt.

Auf gleichem Syntheseweg ließ sich die 3'-Desoxy-3'-fluor-uridin-diphosphat- α -D-galactose (**36**) aus dem peracetylierten α -Galactose-1-phosphatimidazolid (**29**) und 3'-Desoxy-3'-fluor-uridin-5'-*O*-monophosphat (**19**) mit einer Ausbeute von 9 % herstellen (**Abb.39**).

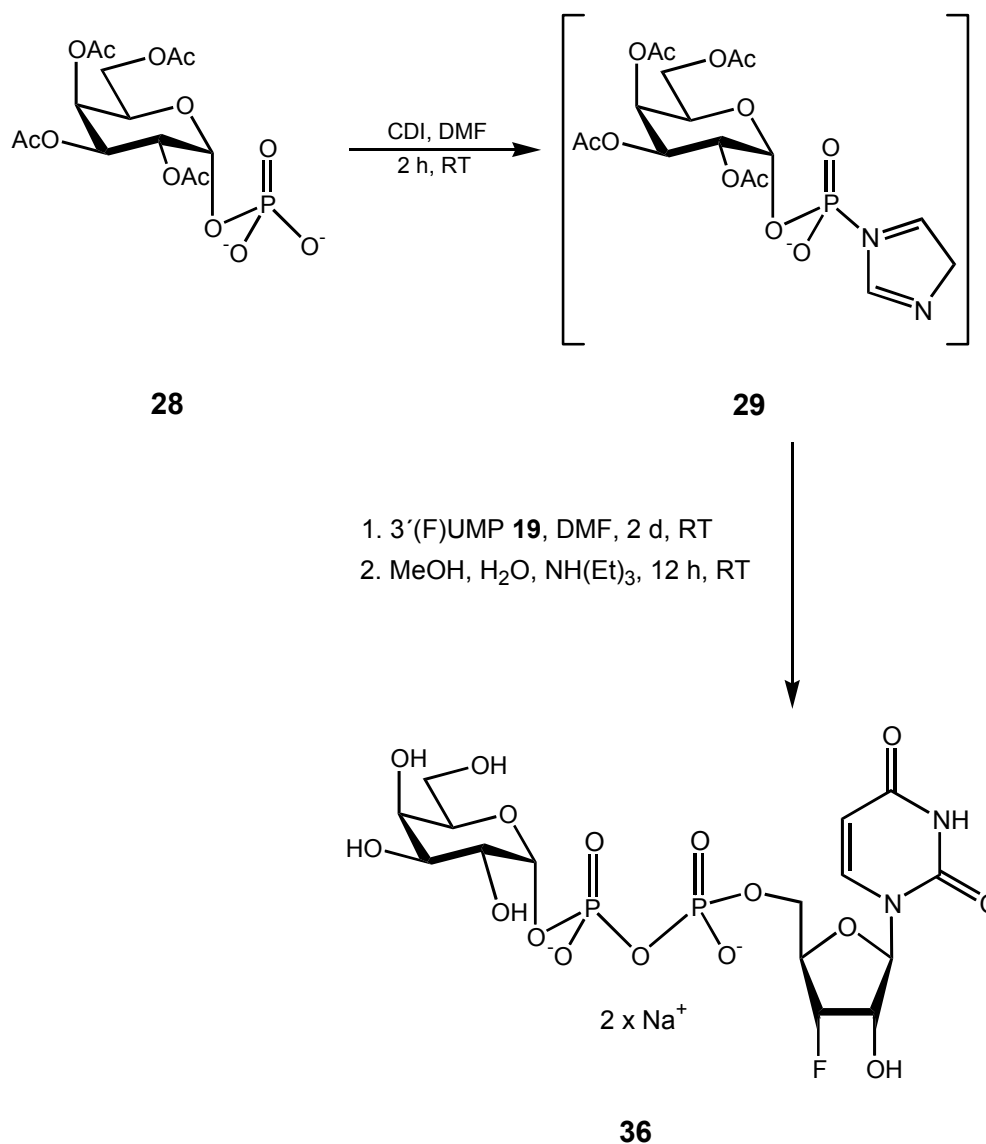


Abb.39: Darstellung von 3'-Desoxy-3'-fluor-uridin-diphosphat- α -D-galactose (**36**) nach der Kodama-Methode.

Die Synthese der 2,2'-Anhydro-uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose (**38**) gelang leider auch nach dieser Methode nicht, sondern es wurde ein Produktgemisch erhalten, das neben

nicht umgesetzten Imidazolid **29** auch die zu **28** hydrolysierte Verbindung und *arabino*-konfiguriertes Uridinmonophosphat **20** enthielt.

5. Enzymatische Umsetzung der modifizierten Donorsubstrate

Nach der gelungenen Synthese von 2'-Desoxy-2'-fluor-uridin-diphosphat- α -D-galactose (**34**) und 3'-Desoxy-3'-fluor-uridin-diphosphat- α -D-galactose (**36**) war es das nächste Ziel, diese Zuckernucleotide als Substrate der $\beta(1-4)$ Galactosyltransferase ($\beta 4$ GalT) zu testen. Damit sollten die Enzym/Substrat-Wechselwirkung untersucht bzw. die Bedeutung der Funktion der notwendigen funktionellen Gruppen im Nucleosidteil des Donormoleküls für das Enzym weiter aufgeklärt werden.

Es gibt verschiedene Methoden, die Kinetik biochemischer Reaktionen direkt zu verfolgen. Bei Szintillationsmessungen können mit radioaktiv markierten Substraten Abläufe im 10^{-12} molaren Bereich erfaßt werden. Hierzu ist es allerdings nötig, die modifizierten Substrate radioaktiv zu markieren und dies in der Syntheseplanung zu berücksichtigen. Weit verbreitet sind auch spektroskopische Methoden. Vor allem Fluoreszenz- und Absorptionsspektroskopie werden oft zur Bestimmung des Konzentrationsverlaufs enzymatischer Reaktionen eingesetzt. Bei der Fluoreszenzspektroskopie muß mindestens ein fluoreszierender Reaktand vorhanden sein, um ein Meßsignal aufnehmen zu können. Da die wenigsten Substanzen von vornherein fluoreszenzaktiv sind, ist auch hier in der Regel eine zusätzliche Modifikation notwendig.

Üblicherweise wird der Verlauf einer enzymatischen Reaktion, bzw. die enzymkinetischen Parameter oder auch die Aktivität eines Enzyms indirekt in einem Assay untersucht. Dieser muß für jedes Enzym oder die Enzymklasse eigens entwickelt werden und besteht in der Regel aus einer kurzen Kaskade enzymatischer Reaktionen, als deren Endpunkt ein leicht zu detektierendes Molekül freigesetzt, oder abgebaut wird. Aus den gewonnenen enzymkinetischen Daten der Substrate können Rückschlüsse auf die Effizienz ihrer Bindung an das Enzym gezogen werden. Die Michaelis-Menten-Konstante (K_M -Wert) gibt die kleinste Konzentration eines Substrates an, bei der noch eine tatsächliche Katalyse erfolgt. Bei niedrigeren Substratkonzentrationen bleibt im Gleichgewicht der Reaktion ein Teil der aktiven Zentren des Enzyms unbesetzt. Je kleiner der K_M -Wert eines Substrats, desto größer ist seine Affinität, sich mit dem Enzym zum Enzym-Substrat-Komplex zusammenzufinden, um so höher ist auch die Geschwindigkeit der Reaktion schon bei niedriger Substratkonzentration. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) liefert Erkenntnisse darüber, wie schnell ein Produkt bei einer gegebenen Enzymmenge unter idealen Bedingungen gebildet werden

kann. Im Vergleich der einzelnen Parameter können Hinweise auf die Beteiligung funktioneller Gruppen des Substrats bei der enzymatischen Erkennung und des Transfers gewonnen werden.

Eine Möglichkeit zur Bestimmung der enzymkinetischen Parameter bietet die $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie. Solange die Enzymreaktion hinreichend langsam ist kann dabei im Reaktionsverlauf sowohl Produktzunahme wie auch Substratabnahme bestimmt werden. Im Unterschied zur üblichen Enzymkinetik wird hier nicht die Geschwindigkeit für verschiedene Konzentrationen bestimmt, sondern die Produktzunahme während der Reaktion gemessen. Mit einem mathematischen Ansatz¹⁰⁷ können dann aus den NMR-spektroskopisch gemessenen Konzentration/Zeit-Kurven die enzymkinetischen Michaelis-Menten-Parameter ermittelt werden. Obwohl die $\beta 4\text{GalT}$ vermittelte Reaktion prinzipiell langsam genug wäre, um sie mittels des NMR-spektroskopischen Verfahrens zu verfolgen, sind die daraus mathematisch bestimmten K_M - und V_{\max} -Werte mit sehr großen Fehlern behaftet (für $K_M > 100 \%$, für $V_{\max} < 2 \%$)¹⁰⁸, so dass das Verfahren trotz Verbesserungen nicht geeignet erscheint¹⁰⁹.

Der bei der $\beta 4\text{GalT}$ -Reaktion am häufigsten eingesetzte Assay basiert auf der Umsetzung des natürlichen Donors Uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose (**24**) mit *N*-Acetyl-D-glucosamin als Akzeptor mit nachgeschaltetem Pyruvatkinase/Lactatdehydrogenase-System¹¹⁰. Bei diesem System wird das in der Glycosylierungsreaktion äquimolar zum *N*-Acetyl-D-lactosamin (LacNAc) gebildete UDP durch die Pyruvatkinase zu UTP phosphoryliert. Als Phosphatdonor dient dabei Phosphoenolpyruvat. Das Pyruvat wird mit einer Lactatdehydrogenase und NADH zu (*S*)-Lactat umgesetzt. Über die photometrisch zu verfolgende Abnahme des NADH läßt sich dann die Konzentration des Disaccharids berechnen und die relative Aktivität bestimmen. Wird in diesem Assay das natürliche Substrat Uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose (**24**) in der Transferasereaktion eingesetzt, so sind die kinetischen Parameter der nachfolgenden Pyruvatkinase-Reaktion und der Lactatdehydrogenase-Reaktion literaturbekannt und werden nicht durch die Reaktanden des Assays beeinflusst (**Abb.40**).

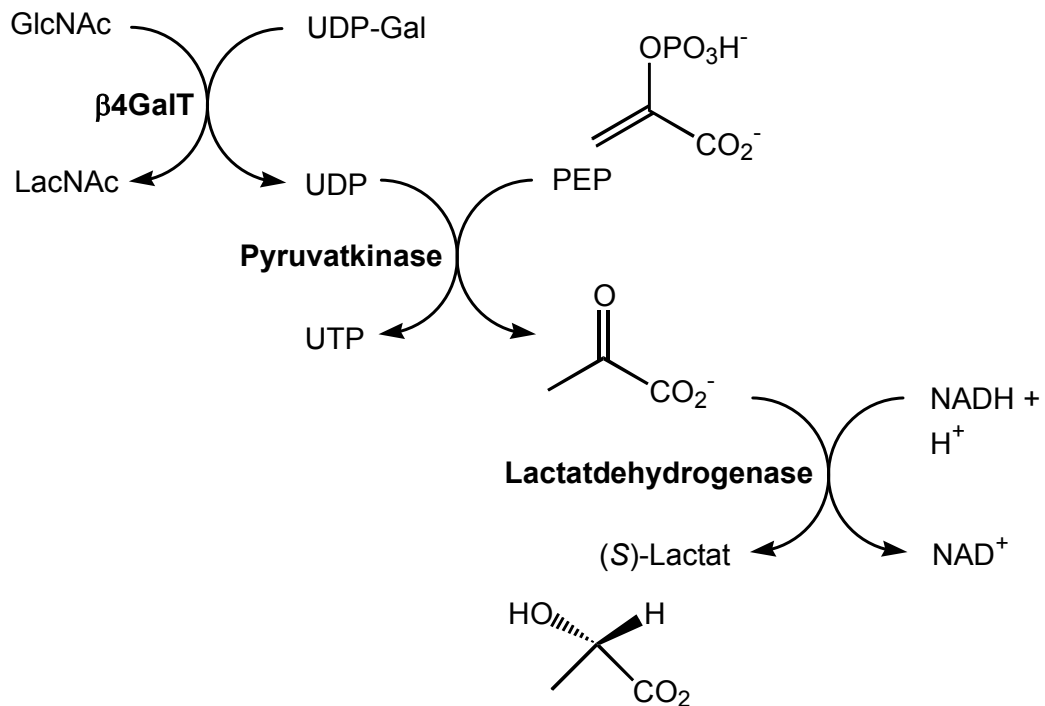
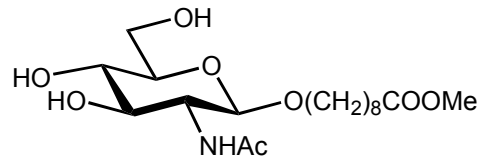


Abb.40: Pyruvatkinase/Lactatdehydrogenase-System.

Bei einigen modifizierten Zuckernucleotiden schien es längere Zeit jedoch sinnvoller, *N*-Acetyl-D-lactosamin als Reaktionsprodukt nachzuweisen, da das Verhalten der UDP-Analoga in der Pyruvatkinase-Reaktion nicht vollständig geklärt war. Eine schnelle Möglichkeit der Isolierung dieses Produkts wurde von Hindsgaul¹¹¹ und Mitarbeitern entwickelt. Anstelle von *N*-Acetyl-D-glucosamin verwenden sie das 8-Methoxycarbonyloctylderivat (**39**) als Akzeptor. Durch den hydrophoben C₈-Rest läßt sich das Produkt der enzymatischen Reaktion leicht durch Filtration über eine C-18-Cartridge abtrennen und mittels HPLC quantifizieren.

**39****Abb.41:** 8-Methoxycarbonyloctylderivat (**39**).

5.1 Photometrische Verfolgung der enzymatischen Reaktion

Bei der photometrischen Verfolgung der enzymatischen Reaktion wurde der sowohl einfache wie auch schnelle Pyruvatkinase-Lactatdehydrogenase-Assay eingesetzt und die photometrisch leicht zu verfolgende Abnahme des NADH-Konzentration beobachtet. Obwohl hier neben dem natürlichen Substrat Uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose (**24**) für die verwendete β 4GalT auch die modifizierten Substrate 2'-Desoxy-2'-fluor-uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose (**34**) und 3'-Desoxy-3'-fluor-uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose (**36**) eingesetzt wurden, wurde keine Beeinflussung der enzymatischen Kaskade durch die Reaktanden im Assay festgestellt.

Vor dem enzymatischen Umsatz der drei Substrate **24**, **34** und **36** wurde die Aktivität der eingesetzten β 4GalT, die käuflich erworben und aus Rindermilch isoliert wurde, mit dem Pyruvatkinase/Lactatdehydrogenase-Assay unter genau definierten Reaktionsbedingungen bestimmt.

Der Verlauf der enzymatischen Reaktion von Uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose (**24**) und den modifizierten Substraten 2'-Desoxy-2'-fluor-uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose (**34**) sowie 3'-Desoxy-3'-fluor-uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose (**36**) mit β 4GalT wurde dann mit dem der Pyruvatkinase/Lactatdehydrogenase-Assay unter identischen Reaktionsbedingungen für die Substrate untersucht. Die Ergebnisse sind in **Abb.42** grafisch dargestellt.

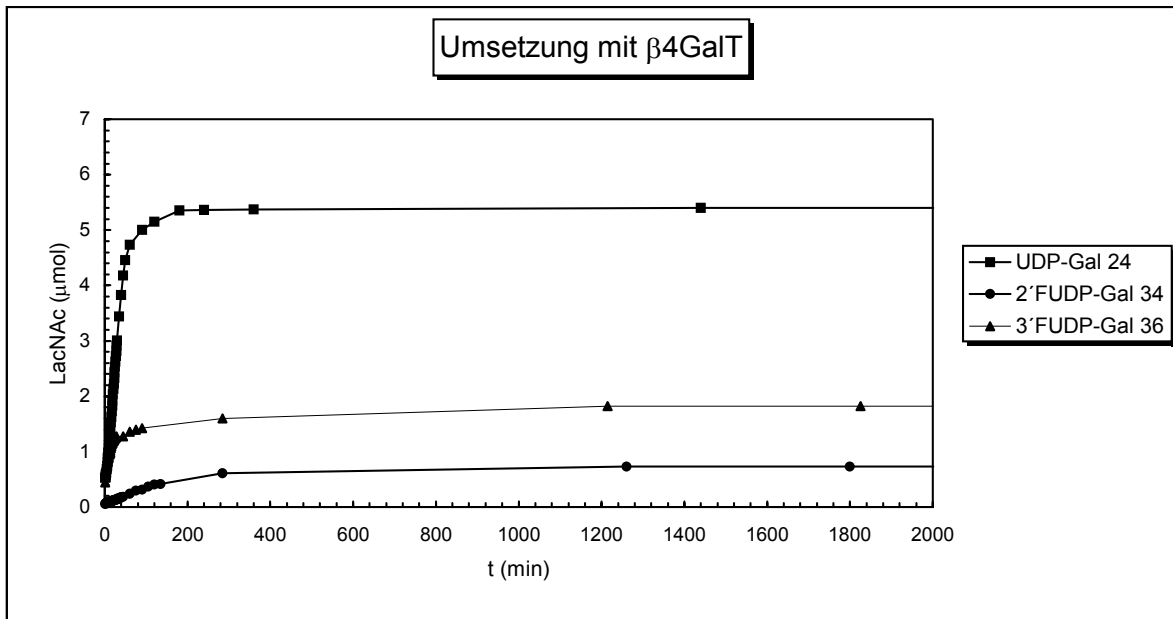


Abb.42: Reaktionsverlauf der β 4GalT-Reaktion mit den Substraten **24**, **34** und **36**.

Das natürliche Donorsubstrat Uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose (**24**) ist in dem Versuch nach ca. sechs Stunden (360 min) nahezu vollständig umgesetzt. Auch die 2'-Desoxy-2'-fluor-uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose (**34**) ist ein aktives Donorsubstrat. Die Reaktion mit β 4GalT war nach etwa 30 Stunden abgeschlossen, wobei eine relative Aktivität von 14.1 % für das eingesetzte Substrat beobachtet wurde. 3'-Desoxy-3'-fluor-uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose (**36**) zeigte ebenfalls Aktivität in dem untersuchten enzymatischen Transfer. Die Reaktion war nach etwa 21 Stunden beendet und erbrachte eine relative Aktivität von 33.7 % bezogen auf Uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose (**24**).

Tab.1: Relative Aktivitäten der modifizierten Donorsubstrate

modifizierter Donor	Relative Aktivität
UDP-Gal (24)	100 %
2'-(F)UDP-Gal (34)	14,1 %
3'-(F)UDP-Gal (36)	33.7 %

Obwohl die hier bestimmten relativen Aktivitäten stark reduziert sind, liegen sie im Vergleich zu anderen bisher untersuchten modifizierten Donorsubstraten überraschend hoch (**Tab.2**).

Tab.2: Relative Aktivitäten anderer Donorsubstrate

modifiziertes Donorsubstrat	Relative Aktivität
2'-dUDP-Gal ⁵⁸	4.2 %
3'-dUDP-Gal ⁵⁸	57.4 %
5,6-Dihydro-UDP-Gal ⁵⁸	16.6 %
UDP-Glc ⁴⁴	0.4 %
UDP-GlcNAc ⁴⁴	0.19 %
UDP-GlcNH ₂ ⁴⁴	0.09 %
6''-Deoxy-UDP-Gal ⁴⁸	1.3 %
6''-Deoxy-6''-fluoro-UDP-Gal ⁴⁸	0.2 %

5.2 Bestimmung der enzymkinetischen Parameter

Die exakten enzymkinetischen Parameter der modifizierten Donorsubstrate wurden mit einem β -Galactosidase/Galactosedehydrogenase-Assay bestimmt. Während der Reaktionsverlauf zuvor durch die Bildung des UDP und seiner Derivate verfolgt wurde, wird in diesem Assay das natürliche *N*-Acetyl-D-lactosamin als zweites Reaktionsprodukt herangezogen. Durch Umsetzung mit β -Galactosidase und anschließender Reaktion mit Galactosedehydrogenase von NAD^+ zu NADH läßt sich die Bildung von *N*-Acetyl-D-lactosamin nachweisen. In diesem Test sind sämtliche kinetischen Daten der beteiligten Folgesubstrate bekannt, da diese nicht modifiziert zum Einsatz kommen (**Abb.43**). Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde bei konstanter Konzentration des Akzeptors *N*-Acetyl-D-glucosamin in Abhängigkeit von unterschiedlichen Donorkonzentrationen bestimmt. Dieser so erhaltene K_M -Wert wird in der Regel als scheinbare Michaelis-Menten-Konstante (K_M apparent, K_M^{app}) bezeichnet¹¹². Da die Variation der Konzentration des Zuckernucleotids bei konstanter *N*-Acetyl-D-glucosamin Konzentration allerdings nur einen sehr geringen Einfluß auf die Größe des K_M -Wertes hat, lassen sich K_M und K_M^{app} gut miteinander vergleichen¹¹³.

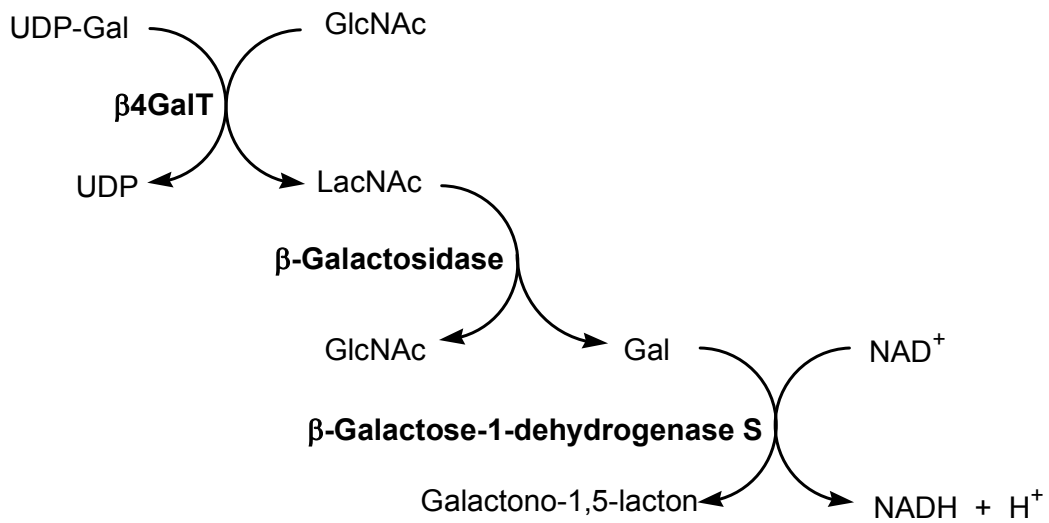


Abb.43: β -Galactosidase/ β -Galactose-1-dehydrogenase Assay.

So sind nachfolgend die K_M^{app} - und $V_{\text{max}}^{\text{app}}$ -Werte für die untersuchten Substrate **24**, **34** und **36** tabellarisch zusammengefaßt (**Tab.3**).

Tab.3: Enzymkinetische Parameter modifizierter Donorsubstrate

Modifizierte Substrate	K_M^{app} [mmol]	$V_{\text{max}}^{\text{app}}$ [$\mu\text{mol}/\text{min}$]
UDP-Gal (24)	0.303	5.8
2'-(F)UDP-Gal (34)	1.11	52
3'-(F)UDP-Gal (36)	0.125	4.7

Bei den untersuchten modifizierten Substraten 2'-Desoxy-2'-fluor-uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose (**34**) und 3'-Desoxy-3'-fluor-uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose (**36**) zeigte das 3'-substituierte Derivat gute enzymkinetische Werte im Vergleich mit dem natürlichen Substrat Uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose (**24**), während die des 2'-substituierten Derivats sich extrem verschlechterten.

Während der Umsetzung von 3'-Desoxy-3'-fluor-uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose (**36**) wurde ein Absinken der Reaktionsgeschwindigkeit bei hohen Substratkonzentrationen beobachtet. Dieses ist wahrscheinlich auf eine Hemmung durch einen Überschuß an Substrat zurückzuführen, wie es häufig bei *in vitro* Experimenten beobachtet wird¹¹⁴.

Zum Vergleich sind nachfolgend einige literaturbekannte enzymkinetische Werte von Uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose (**24**) und modifizierten Uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose-derivaten aufgeführt (**Tab.4**).

Tab4: K_M - und V_{max} - Werte anderer Donorsubstrate

Substrat	K_M [mmol]	V_{max} [μ mol/min]
2'-dUDP-Gal ⁵⁸	10	3.9
3'-dUDP-Gal ⁵⁸	0.19	2.3
UDP-Gal	0.303 ^a	[GlcNAc] = 0.024 mmol 6.0
UDP-Gal ⁵⁸	0,201 ^b	[GlcNAc] = 0.024 mmol 5.0
UDP-Gal ⁴⁸	0.044 ^b	[GlcNAc] = 0.92 mmol 5.5
UDP-Gal ¹¹²	0.13 ^b	[GlcNAc] = 10 mmol
2''-Deoxy-UDP-Gal ⁴⁸	0.051 ^b	[GlcNAc] = 0.92 mmol 4.5

^a eigene Arbeiten; Messung mit β 4GalT aus Rindermilch

^b Messung mit β 4GalT aus Rindermilch

Um vollständige Aussagen über die Wechselwirkung des Enzyms mit den Donorsubstrat machen zu können, ist neben der Aktivität bzw. Inaktivität auch die Beobachtung der inhibitorischen Eigenschaften ebenso wichtig. So können sogar die im Transfer inaktiv getesteten Substrate inhibierende und somit ebenfalls bindende Eigenschaften besitzen. Daher wurden Inhibitorstudien mit den beiden modifizierten Donorsubstraten 2'-Desoxy-2'-fluor-uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose (**34**) und 3'-Desoxy-3'-fluor-uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose (**36**) durchgeführt. Auf eine Bestimmung der Hemmkonstante K_i wurde allerdings verzichtet. Zum Test auf kompetitive Inhibierung wurde zu der K_M^{app} -Konzentration an Uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose (**24**) (303 μ M) eine bestimmte

Menge des potentiellen Inhibitors gegeben und mit der β 4GalT enzymatisch nach dem β -Galactosidase/ β -Galactose-1-dehydrogenase Assay umgesetzt. Bei 2'-Desoxy-2'-fluor-uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose (**34**) (1.1 mM) und 3'-Desoxy-3'-fluor-uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose (**36**) (125 μ M) wurden ebenfalls die Konzentrationen in der Höhe ihrer jeweiligen K_M -Werte gewählt.

Die eingesetzten Verbindungen **34** und **36** bewirken einen geringeren Transfer des natürlichen Substrates Uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose (**24**) und wirken inhibierend. Vergleicht man den relativen Transfer der modifizierten Donorsubstrate **34** und **36**, so inhibiert das 2'-substituierte Derivat (**34**) die Reaktion am stärksten. **Tab.5** zeigt den resultierenden relativen Transfer der in dieser Arbeit getesteten Substrate **34** und **36** im Vergleich mit weiteren Literaturbekanntem.

Tab.5: Relativer Transfer des UDP-Gal

modifiziertes Donorsubstrat	Relativer Transfer von UDP-Gal
UDP-Gal (24)	100 %
2'-(F)UDP-Gal (34)	4.1 %
3'-(F)UDP-Gal (36)	11.7 %
2'dUDP-Gal ⁵⁸	7 %
3'dUDP-Gal ⁵⁸	49 %
5,6-Dihydro-UDP-Gal ⁵⁸	58 %

5.3 Diskussion

Soll die Bindung eines Donorsubstrats an ein Enzym erfolgen, so wird neben deren Komplementarität in Gestalt und Eigenschaften auch eine gewisse Flexibilität erwartet, da beide Beteiligten für einen erfolgreichen Erkennungsprozess einander anpassen müssen (induced-fit-Prinzip). Erfolgt der Bindungsvorgang, so entledigt sich das Donormolekül seiner Hydrathülle und verdrängt Wassermoleküle aus der Bindungstasche des Enzyms, wobei etliche Wasserstoffbrückenbindungen gebrochen werden. Dieser Vorgang ermöglicht es dem Donorsubstrat, günstige Wechselwirkungen mit dem Enzym einzugehen und möglicherweise auch seine Konformation zu ändern.

Bei der enzymatischen Umsetzung werden als erstes sowohl Akzeptor- wie auch Donorsubstrat am Enzym gebunden, indem sich die Hydroxylgruppen in geeigneter sterischer Anordnung zueinander ausrichten. In der anschließenden eigentlichen Reaktion werden im aktiven Zentrum des Enzyms chemische Bindungen durch Wechselwirkungen mit den an den katalytischen Reaktionen direkt beteiligten funktionellen Gruppen und Cofaktoren gelöst und/oder neu geknüpft.

Im vorliegenden Fall hat die Substitution einer Hydroxylgruppe in der Ribose durch ein Fluoratom unterschiedliche Auswirkungen auf Wechselwirkungen mit Nachbarmolekülen vor allem aber auch auf die Konformation der Ribose selbst. Während eine OH-Gruppe als Wasserstoffbrückenakzeptor und Donor fungieren kann, vermag der stärker elektronegative Fluorsubstituent nur die Akzeptoreigenschaften der Hydroxylgruppe zu imitieren. Die bevorzugte Konformation des Furanoserings ist dabei stark von den Substituenten abhängig. In enger Korrelation mit der Elektronegativität eines Substituenten ist so ein vollständiger Konformationswechsel des Fünfrings möglich¹¹⁵.

Konformationsberechnungen¹¹⁶ und eigene NMR-Messungen für 3'-Desoxy-3'-fluor-uridin (**10**) haben ergeben, dass das Molekül in einer C(2')-endo Südkonformation vorliegt. Diese Konformation der Ribose ändert sich nicht durch die Phosphorylierung an der 5'-Position in der Verbindung **19** und auch nicht bei der modifizierten Verbindung 3'-Desoxy-3'-fluor-uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose (**36**), so dass auch hier die Ribose in der C(2')-endo Südkonformation vorliegt. Die Konformation des Riboserings im natürlichen Substrat Uridin-

5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose (**24**) wird in Lösung durch ein Gleichgewicht zwischen der Nord- und Südkonformation bestimmt¹¹⁷. Die Energiebarriere zwischen beiden Konformationen ist mit 16.7 kJ/mol recht klein, so dass Umwandlungen leicht möglich sind (**Abb.44**).

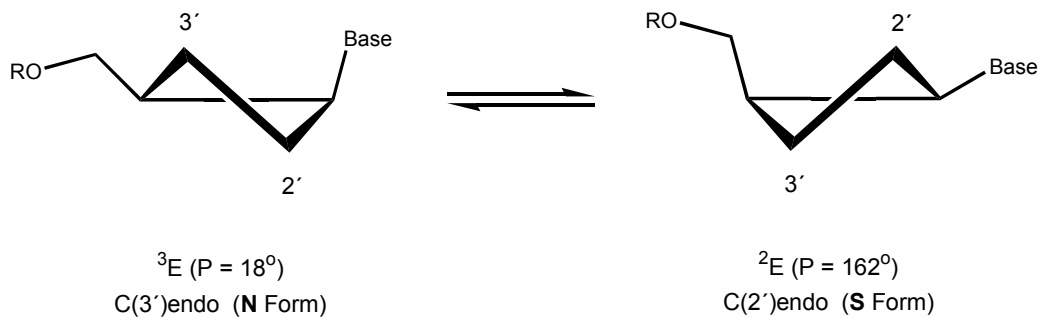


Abb.44: Vorzugskonformationen der Ribose in der Uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose (**24**).

Im kristallinen Zustand des natürlichen Substrats **24** wird überwiegend eine C(2')-endo Südkonformation der Ribose vorgefunden. Untersuchungen im Kristall des Enzym-Substrat-Komplex haben die gleiche Konformation für die Ribose gefunden, wobei sich allerdings später herausgestellt hat, dass es sich nicht um die katalytisch aktive Konformation des Enzyms gehandelt hat^{33a}.

Die mit dieser für das natürlichen Substrat **24** gefundenen identischen C(2')-endo Südkonformation des Substrats **36** wird wahrscheinlich keinen Beitrag zum erfolgreichen enzymatischen Umsatz liefern. Vermutlich werden mangelnde Bindungskräfte zwischen Substrat und Enzym der Hauptgrund für die niedrigen Reaktionsgeschwindigkeit sein.

Die aktiven Donoreigenschaften von 3'-Desoxy-3'-fluor-uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose (**36**) belegen, dass die Wasserstoffbrückenbindungs-Donoreigenschaften der 3'-Hydroxylgruppe des Uridins für die Bindung an die β 4GalT nicht unbedingt notwendig sind. Der K_M^{app} -Wert von 0.125 mmol des 3'-fluorierten Zuckernucleotids **36** ist kleiner als der des natürlichen Substrates Uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose (**24**) (0.303 mmol), was auf eine höhere Affinität des Enzyms für dieses Substrat schließen lässt. Die maximale

Reaktionsgeschwindigkeit ist für **36** mit 4.7 $\mu\text{mol}/\text{min}$ (**24**, 5.8 $\mu\text{mol}/\text{min}$) jedoch kleiner. Möglicherweise ist diese geringere Reaktionsgeschwindigkeit im stark verlangsamten Zerfall des Enzym-Produkt-Komplexes zu suchen, da dieser zu stark gebunden wird und das aktive Zentrum zu lange besetzt. Diese 3'-Hydroxylgruppe tritt im aktiven Zentrum wahrscheinlich durch überwiegend Akzeptoreigenschaften in starke Wechselwirkung mit dem Enzym. Das Fluoratom fungiert als Wasserstoffbrückenbindungsakzeptor, so dass durch die fehlende Donorfunktion eine korrekte Ausrichtung des modifizierten Substrats nicht gegeben ist und somit der Ausstoß verzögert würde. Die Ergebnisse des Inhibitortests der 3'-Desoxy-3'-fluor-uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose (**36**) stützen diese Erklärung. Die 3'-Hydroxylgruppe hat also weniger einen Einfluß auf die Bindung an das Enzym, wohl aber auf die Umsetzung des Substrates.

Werden die Ergebnisse mit denen vom desoxygenierten Analogon 3'dUDP-Gal⁵⁸ verglichen, so zeigt sich, dass die C(3')-endo Nordkonformation des 3dUDP-Gal nicht der des natürlichen Substrats Uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose (**24**) entspricht, obwohl dort die dem natürlichen Substrat **24** ähnlichen enzymkinetischen Parameter beobachtet werden. Der K_M^{app} -Wert der 3'-desoxygenierten Verbindung liegt mit 0.19 mmol sehr nahe bei dem des natürlichen Substrates (0.20 mmol für UDP-Gal)⁵⁸, während die maximale Reaktionsgeschwindigkeit mit $V_{\text{max}} = 2.3 \mu\text{mol}/\text{min}$ kleiner als die des natürlichen Substrates (UDP-Gal⁵⁸; $V_{\text{max}} = 4.8 \mu\text{mol}/\text{min}$) ist. Obwohl das modifizierte Substrat eine hohe Affinität zur β 4GalT hat, ist durch eine unzureichende Wechselwirkung mit dem Enzym eine falsche Orientierung des Substrats gegeben, und somit auch hier die Abgabe als Reaktionsprodukt verlangsamt.

Resultierend aus den Daten für das an der 3'-Position fluorierte Derivat **36** und denen des an 3'-desoxygenierten aus vorherigen Untersuchungen⁵⁸, lassen sich folgende Aussagen treffen. Da die Ribosekonformationen beider Substrate vollkommen entgegengesetzt sind, scheint es möglicherweise unter Berücksichtigung der ähnlichen Tendenzen der enzymkinetischen Parameter für die betrachteten modifizierten Substrate keine bevorzugte Konformation für die enzymatische Reaktion zu geben. Die Funktion der 3'-OH Gruppe als Wasserstoffbrückenbindungsakzeptor ist offensichtlich wichtig für die Bindung und richtige Orientierung des Substrats an das Enzym, während die Donorfunktion offensichtlich kaum einen Beitrag zu leisten vermag. Das Wasserstoffatom der 3'-Hydroxylgruppe könnte die Donorfunktion dieser Gruppe schwächen, indem es sie sterisch abschirmt. Somit stellen die

Eigenschaften der Hydroxylgruppe an der 3'-Position eine ideale Mischung aus guter Orientierung des Substrats für den Transfer und Ablösung des Produktes nach erfolgter Reaktion dar (**Abb.45**).

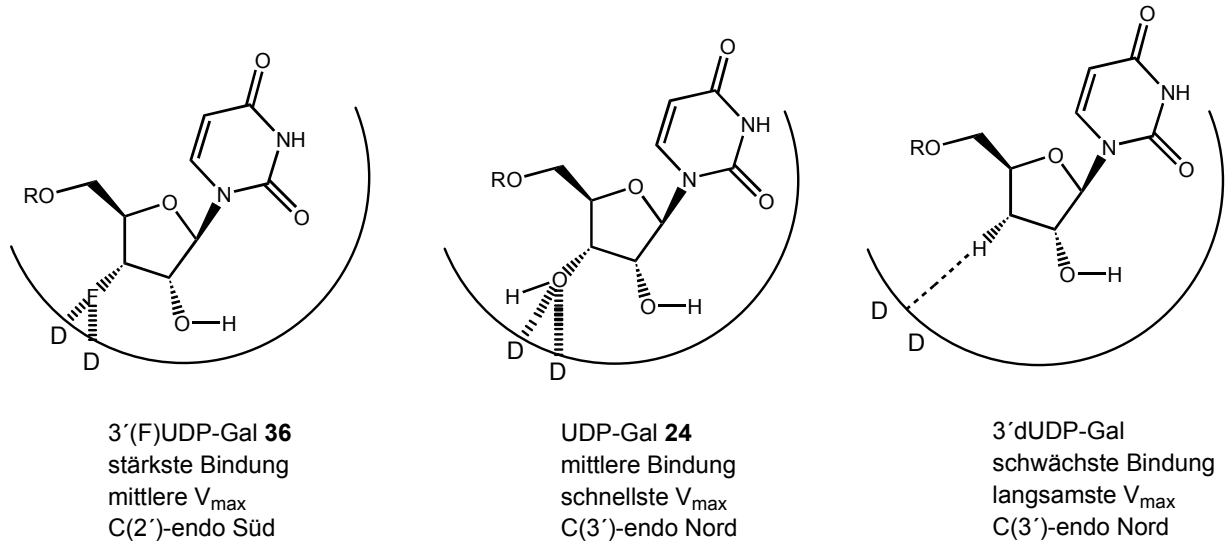


Abb.45: Eigenschaften von 3'(F)UDP-Gal (**36**), UDP-Gal (**24**) und 3'dUDP-Gal; D=Donor.

Das an der 2'-Position fluorierte UDP-Gal Derivat **34** erweist sich auch als Donorsubstrat. Berechnungen der Konformation von 2'-Desoxy-2'-fluor-uridin¹¹⁷ (**12**) und eigene NMR-Messungen haben dargelegt, dass die Ribose dieses fluormodifizierten Nucleosids bzw. auch das Nucleotids **18** in der C(3')-endo Nordkonformation vorzufinden ist. Ebenso liegt auch in der 2'-Desoxy-2'-fluor-uridin-5'-O-diphosphat- α -D-galactose (**34**) die Ribose in der für das 2'-fluorierte Nucleotid gefundenen C(3')-endo Nordkonformation vor. Zudem ist bekannt, dass die bevorzugte Orientierung diejenige ist, in der der kürzeste Abstand zwischen dem 3'-Proton und dem Fluoratom ausgebildet wird¹¹⁸. Der hohe K_M^{app} -Wert von 1.11 mmol (UDP-Gal (**24**); 0.303 mmol) deutet also darauf hin, dass der 2'-Hydroxylgruppe eine sehr große Rolle als Wasserstoffbrückenbindungsdonor und nicht als Akzeptor in der Erkennung durch das Enzym zukommt. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit von $V_{\max} = 52 \mu\text{mol}/\text{min}$ unterscheidet sich allerdings um einen Faktor 10 von der für UDP-Gal (**24**) mit $5.8 \mu\text{mol}/\text{min}$ ermittelten Wert. Das 2'-fluorierte Donorsubstrat **34** wird zwar nicht so stark vom Enzym gebunden, jedoch sehr schnell umgesetzt. Somit scheint der Zerfall des Enzym-

Produkt-Komplexes hier nur gering beeinflußt zu werden. Auch hat es bei der 2'-Hydroxylgruppe den Anschein, dass die Akzeptoreigenschaften des Fluoratoms für die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwar wichtig sind, die Donoreigenschaften jedoch stark überwiegen. So ist es möglich, dass die Hydroxylgruppe in 2'-Position einen größeren Einfluß auf die Erkennung durch das Enzym und die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes nimmt als auf die Produktbildung.

Im Vergleich mit dem 2'-desoxygenierten Derivat 2'dUDP-Gal⁵⁸ zeigt sich, dass das Fehlen der 2'-Hydroxylgruppe die Bindung durch das Enzym auch dort erschwert. Die Konformation ist bevorzugt C(2')-endo Süd, und somit zu der möglichen aktiven Konformation des natürlichen Substrates Uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose (**24**) identisch. Der extrem hohe K_M -Wert von 10 mmol (UDP-Gal⁵⁸, 0.20 mmol) zeigt die sehr schlechte Bindung an das Enzym, während die ermittelte maximale Reaktionsgeschwindigkeit mit $V_{max} = 4.0 \mu\text{mol}/\text{min}$ nahe der des natürlichen Substrats (UDP-Gal⁵⁸, 4.8 $\mu\text{mol}/\text{min}$) liegt. Wahrscheinlich ist die falsche Orientierung des Substrats für den langsamen enzymatischen Transfer verantwortlich.

Die Daten für das an der 2'-Position fluorierte Derivat **34** und denen des an 2'-desoxygenierten aus vorherigen Untersuchungen⁵⁸, lassen somit folgende Schlußfolgerungen zu. Auch hier gibt es möglicherweise unter Berücksichtigung der bestimmten enzymkinetischen Parameter keine bevorzugte Konformation, die eine zügige Erkennung des Substrates durch das Enzym ermöglicht. Eine intakte Hydroxylgruppe an der 2'-Position des Substrats ist jedoch für eine gute Erkennung durch die β 4GalT wichtig. Die Donorfunktion dieser Gruppe bei der Bindung an das Enzym ist sehr bedeutend, wobei auch die Akzeptorfunktion einen Beitrag leistet (**Abb.46**).

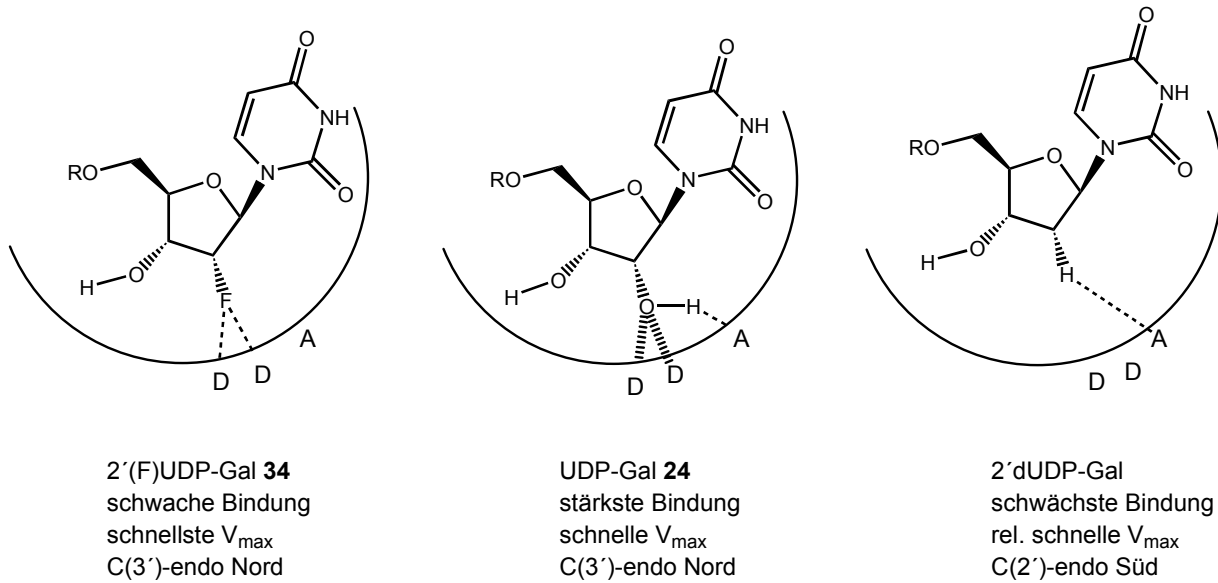


Abb.46: Eigenschaften von 2'(F)UDP-Gal (**34**), UDP-Gal (**24**) und 2'dUDP-Gal; A=Akzeptor; D=Donor.

Die Umsetzungen der modifizierten Substrate 2'-Desoxy-2'-fluor-uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose (**34**) und 3'-Desoxy-3'-fluor-uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose (**36**) sind ein Hinweis dafür, dass die Hydroxylgruppen durch das Enzym erkannt werden und wichtig sind. Das 3'-substituierte Derivat **36** besitzt im Vergleich zu 2'-Desoxy-2'-fluor-uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose (**34**) deutlich bessere Substrateigenschaften. Es überwiegen die Akzeptoreigenschaften der Hydroxylgruppe, während die Donoreigenschaften durch eine abschirmende Funktion des Wasserstoffatoms der 3'-Hydroxylgruppe möglicherweise geschwächt werden. Der Beitrag der 3'-Hydroxylgruppe ist für die Erkennung durch das Enzym nicht unbedingt notwendig, erleichtert allerdings den Enzym-Produkt-Zerfall. Die auftretenden Effekte sind kleiner als die bei der 2'-Hydroxylgruppe. Beim Umsatz der 2'-Desoxy-2'-fluor-uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose (**34**) zeigt sich der sehr starke Einfluss der Eigenschaften der 2'-Hydroxylgruppe auf die enzymatische Reaktion. Durch die Fluorierung an dieser Position verschlechtern sich die kinetischen Parameter im Vergleich zum natürlichen Substrat **24** und auch der Inhibitortest weist die größte hemmende Wirkung für diese Verbindung auf. Die Wechselwirkungen des Enzyms mit dem Substrat unter Ausnutzung der überwiegend vorherrschenden Wasserstoffbrückenbindungsdonoreigenschaften der Hydroxylgruppe in 2'-Position scheinen für eine erfolgreiche

Reaktionskatalyse von großer Bedeutung zu sein. Die 2'-Hydroxylgruppe erleichtert die Erkennung des Substrates und die Bildung des aktivierten Komplexes.

6. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Synthese von Zuckernucleotiden mit Fluor modifizierten Ribosekomponenten und deren Erprobung als Donorsubstrate für das Enzym $\beta(1\rightarrow4)$ Galactosyltransferase, um so mehr über die aktiven Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und seinem natürlichen Substrat herauszufinden.

Zunächst wurden modifizierte Nucleoside hergestellt, wobei 2,2'-Anhydro-*arabino*-uridin (**11**), 2'-Desoxy-2'-fluor-uridin (**12**) und 2',5'-*O*-Ditryl-uridin (**14**) nach weitestgehend bekannten Methoden synthetisiert wurden. Durch Modifizierungen der Bedingungen konnten die Ausbeuten allerdings gesteigert werden. Ausgehend vom 2',5'-*O*-Ditryl-uridin (**14**) gelang die Darstellung des 2,3'-Anhydro-2',5'-*O*-ditryl-*xylo*-uridin (**15**) erstmals gezielt mit *N,N*-Diethylaminoschwefeltrifluorid (DAST), das eigentlich als mildes und selektives Fluorierungsmittel bekannt ist. Dabei wurde **15** sehr schnell und in sehr guten Ausbeuten erhalten. In Anlehnung an die bekannte Synthese des 2'-Desoxy-2'-fluor-uridin (**12**) mit einem Fluorwasserstoff-Pyridin-Komplex (Olahs Reagenz) wurde 3'-Desoxy-3'-fluor-uridin (**10**) auch erstmals aus dem Edukt **15** synthetisiert. Bei dieser Reaktion wurden nach erfolgter Fluorierung die Tritylschutzgruppen direkt abgespalten. Die so gewonnenen modifizierten freien Nucleoside wurden mit Phosphoroxytrichlorid in Gegenwart der Base Pyridiniumchlorid in guten Ausbeuten und selektiv in die entsprechenden 5'-*O*-monophosphorylierten Nucleoside **18** und **19** überführt. Aufgrund der erhöhten Empfindlichkeit des 2,2'-Anhydro-*arabino*-uridin-5'-*O*-monophosphat (**21**) mußte dieses abweichend von den anderen Nucleotiden unter genau definierten Bedingungen mittels Reversed-Phase HPLC isoliert werden.

Die fluorierten Nucleotide **18** und **19** konnten nach der seit langem etablierten Moffatt-Methode in guten Ausbeuten in die entsprechenden Morpholidate überführt werden und schließlich zu den entsprechenden Zuckernucleotiden 2'-Desoxy-2'-fluor-uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose (**34**) und 3'-Desoxy-3'-fluor-uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose (**36**) umgesetzt werden, wobei die labilen Zuckernucleotide in den für diese Synthese leider allgemein üblichen mäßigen Ausbeuten von nur etwa 10 % isoliert wurden. Zum direkten Vergleich wurden die Zuckernucleotide **34** und **36** auch noch nach der Kodama-Methode hergestellt, bei der *N,N'*-Carbonyldiimidazol (CDI) als Aktivierungsreagenz für das eingesetzte geschützte Galactose-1-phosphat verwendet wird. Die nach dieser Methode erzielten Ausbeuten liegen über denen der Moffatt-Methode. Leider gelang es mit keiner der

beiden Methoden, die 2,2'-Anhydro-uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose (**38**) zu erzeugen.

Die modifizierten UDP-Galactose Derivate **34** und **36** wurden enzymatisch umgesetzt. Mit einem geeigneten Assay wurde die Umsetzung der synthetisierten Derivate verfolgt. Beide erwiesen sich als aktive Donorsubstrate mit relativen Aktivitäten von 14 % für 2'-Desoxy-2'-fluor-uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose (**34**) und 34 % für 3'-Desoxy-3'-fluor-uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose (**36**).

Die kinetischen Parameter der modifizierten Donorsubstrate wurden mit Hilfe eines weiteren, exakteren Assays ermittelt. In einem abschließenden Inhibitortest der beiden Donorsubstrate **34** und **36** erwies sich 2'-Desoxy-2'-fluor-uridin-5'-*O*-diphosphat- α -D-galactose (**34**) als stärkerer Inhibitor.

Die Substitution der Hydroxylgruppe an der 2'-Position der Ribose durch ein Fluoratom weist in den Ergebnissen auf einen starken Einfluß in der Wechselwirkung der 2'-Hydroxylgruppe an dieser Position mit dem Enzym hin. Diese funktionelle Gruppe scheint überwiegend Donoreigenschaften zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zum benachbarten Pro187^{33a} und in Übereinstimmung mit vorherigen Aussagen⁵⁸ einer weiteren noch nicht näher identifizierten Aminosäure zu haben.

Die 3'-Hydroxylgruppe der Ribose scheint für die Erkennung durch das Enzym und die Umsetzung nicht zwingend notwendig zu sein. Hier überwiegen die Akzeptoreigenschaften der Hydroxylgruppe, die eine ideale Komposition aus Bindung in guter Orientierung für die Reaktion und Ablösung des Produktes nach erfolgtem Transfer darstellt. Die hier beobachteten Effekte sind allerdings wesentlich geringer als der an der 2'-Hydroxylgruppe.

7. Experimenteller Teil

7.1 Allgemeine Angaben

Alle Reaktionen wurden dünnenschichtchromatographisch auf DC-Alufohlen Kieselgel 60 F₂₅₄ der Firma *Merck* verfolgt. Die Detektion erfolgte sowohl durch UV-Adsorption als auch durch Anfärben mit 10%iger Schwefelsäure in Ethanol und anschließender Wärmebehandlung im Heißluftstrom.

Säulenchromatographischen Trennungen erfolgten an Kieselgel 60 (70 – 230 mesh, *Merck*).

Bei den Trennungen mittels HPLC wurde eine *LiChrosorb* RP 18-Säule (250 mm x 25 mm x 7 µm, *Merck*) verwendet. Als Laufmittel für die RP 18-Säule wurde bidestilliertes Wasser verwendet, das vor Gebrauch entgast wurde.

Schmelzpunkte wurden mit einem Mikroskopheiztisch der Firma *Leitz* vom Typ *Laborlux 12* bestimmt und sind nicht korrigiert.

Die spezifischen Drehwerte wurden mit einem *Perkin Elmer Polarimeter 343* ermittelt.

Massenspektren wurden entweder mit einem *Finnigan MAT 212* oder mit einem *Thermo Finnigan MAT LCQ* aufgenommen.

Die Elementaranalysen wurden mit dem Analysegerät *EA 1108* der Firma *Fisons Instruments* durchgeführt.

Photometrische Messungen wurden mit einem Spektralphotometer *Shimadzu UV-120-02* in Quarzküvetten mit 1 cm Schichtdicke oder in Plastikkuvetten mit 1 cm Schichtdicke durchgeführt.

Alle verwendeten Lösungsmittel wurden destillativ gereinigt und gegebenenfalls nach gängigen Verfahren absolutiert¹¹⁹.

NMR-Spektren wurden auf einem *Avance 500* oder *Avance 300* der Firma *Bruker* aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen sind relativ zu Tetramethylsilan (TMS) angegeben und wurden für die Proben in D₂O auf externes Aceton (2.04 ppm für ¹H-NMR- und 30.5 ppm für ¹³C-NMR-Messungen) kalibriert. Die ¹⁹F-Messungen sind auf externes Trichlorfluormethan und die ³¹P-NMR-Messungen auf externe 80%ige Phosphorsäure bezogen.

β-Galactosidase (EC 3.2.1.23) aus *E. Coli* sowie UDP-Galactose:D-Glucose-β-Galactosyltransferase (EC 2.4.1.22) aus Rindermilch wurden von der Firma *Calbiochem*; β-Galactose-1-dehydrogenase S (EC 1.1.1.48) aus *E. Coli*, Lactatdehydrogenase (EC 1.1.1.27) und Pyruvatkinase (EC 2.7.1.40) aus Kaninchenmuskel wurden von der Firma *Sigma* käuflich erworben.

Die Aktivität der β-1,4-Galactosyltransferase wurde vor den Versuchen mit einem Assay¹⁰³ photometrisch bestimmt.

Die Thermostatisierung der enzymatischen Reaktionen erfolgte mit einem Automaten der Firma *Julabo SW*.

Für pH-Messungen wurde ein *Beckmann pHASAR-I* pH-Meter benutzt.

7.2 Synthesevorschriften

2,2'-Anhydro-*arabino*-uridin (11)^{74,75,76}

Uridin (1 g; 4.1 mmol), Diphenylcarbonat (943 mg; 4.4 mmol), Natriumhydrogencarbonat (17 mg; 0.2 mmol) und DMF (1 ml) wurden als milchig weiße Suspension 4 h bei 110 °C (Ölbadtemperatur) gerührt. Die nun mittlerweile beige Suspension wurde auf Raumtemperatur abgekühlt, auf Diethylether (20 ml) gegossen und weitere 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene beigefarbene Feststoff wurde abfiltriert und mit Diethylether gewaschen. Nach Trocknen des Rohprodukts im Vakuum wurde aus Methanol umkristallisiert. Das Produkt wurde als weißer Feststoff isoliert.

Ausbeute: 863 mg (93 %)
C₉H₁₀N₂O₅ 226.18 g · mol⁻¹
Smp: 237 °C (Lit.⁷⁶ 238-244 °C)

Die spektroskopischen Daten entsprechen den Literaturangaben.

2,2'-Anhydro-*arabino*-uridin-5'-*O*-monophosphat (21) als Dinatriumsalz

2,2'-Anhydro-*arabino*-uridin (**11**; 400 mg; 1.77 mmol) wurde in Acetonitril (5 ml) gelöst, mit Pyridinhydrochlorid (700 mg; 6.054 mmol) versetzt und auf – 10 °C abgekühlt. Nachdem langsam frisch destilliertes Phosphoroxytrichlorid (0,4 ml; 4.21 mmol) zugetropft wurde, wurde der Reaktionsansatz 4 h bei -10 °C gerührt. Daraufhin wurde mit Wasser (40 ml) gequench und einmal mit Diethylether (120 ml) gewaschen. Die wässrige Phase wurde zu einem gelblich viskosen Sirup eingengt und in Wasser (1 ml) aufgenommen. Nach Reversed-Phase-HPLC an einer RP 18 Säule wurde das Produkt als weißes Pulver abgetrennt und durch Ionentausch (DOWEX 50 WX 2, Na⁺-Form) in das Natriumsalz überführt.

Ausbeute: 256 mg (48 %)
C₉H₉N₂Na₂O₈P, 350.13 g · mol⁻¹

MS (ESI, neg. Modus):

m/z: 304 [C₉H₁₀N₂O₈P⁺]

¹H-NMR (500.14 MHz; D₂O)

$\delta =$ 3.508 (ddd, ³J_{5'a,4'} = 4.4 Hz, ²J_{5'a,5'b} = 12.6 Hz, ³J_{5'a,p} = 3.3 Hz, 1 H, 5'-H)
 3.551 (ddd, ³J_{5'b,4'} = 3.8 Hz, ²J_{5'b,5'a} = 12.6 Hz, ³J_{5'b,p} = 3.3 Hz, 1 H, 5'-H)
 4.352 (ddd, ³J_{4',5'a} = 4.4 Hz, ³J_{4',5'b} = 3.8 Hz, ³J_{4',3'} = 1.7 Hz, 1 H, 4'-H)
 4.624 (dd, ³J_{3',4'} = 1.7 Hz, ³J_{3',2'} = 0.6 Hz, 1 H, 3'-H)
 5.430 (dd, ³J_{2',3'} = 0.6 Hz, ³J_{2',1'} = 5.5 Hz, 1 H, 2'-H)
 6.155 (d, ³J_{5,6} = 7.1 Hz, 1 H, 5-H)
 6.501 (d, ³J_{1',2'} = 5.5 Hz, 1 H, 1'-H)
 7.882 (d, ³J_{6,5} = 7.1 Hz, 1 H, 6-H) ppm

¹³C-NMR (125.78 MHz; D₂O)

$\delta =$ 61.30 (C-5'), 75.89 (C-3'), 89.99 (C-2'), 90.25 (C-4'), 91.36 (C-1'), 109.15 (C-5), 138.82 (C-6), 161.64 (C-2), 176.08 (C-4) ppm

³¹P-NMR (202.76 MHz; D₂O)

$\delta =$ 1.590 ppm.

2,2'-Anhydro-arabino-uridin-5'-O-phosphormorpholidat (32) als 4-Morpholin-*N,N'*-dicyclohexylcarboxamidinsalz

Eine wässrige Lösung (2.5 ml) des Dinatriumsalzes 2,2'-Anhydro-arabino-uridin-5'-O-monophosphat (**21**; 202 mg; 0.48 mmol) wurde mit *tert*-Butanol (2.5 ml) und frisch destilliertem Morpholin (0.1 ml; 1.32 mmol) unter Rückfluss erhitzt. Zu dieser Lösung wurde nun *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) (240 mg; 1.21 mmol) in *tert*-Butanol (2.5 ml) über einen Zeitraum von 2 h getropft. Nachdem auf Raumtemperatur abgekühlt wurde, wurde der sich bildende Niederschlag abfiltriert. Der Rückstand wurde mit *tert*-Butanol gewaschen. Die organischen Lösungsmittel wurden im Vakuum entfernt und die verbleibende wässrige Phase mit Diethylether (3 x 1 ml) gewaschen. Gefriertrocknung lieferte das Produkt **33** als weißen Feststoff.

Ausbeute: 161 mg (55 %)

$C_{30}H_{49}N_6O_9P$, 668.72 g · mol⁻¹

$[\alpha]_D^{20}$: +2.38 (c = 0.3 in H₂O)

MS (ESI, neg. Modus)

m/z: 375 [$C_{13}H_{17}N_3O_8P^-$]

¹H-NMR (500.14 MHz; D₂O)

δ = 1.099 (m, 2 H, 1 x -CH₂)
 1.211 - 1.322 (m, 8 H, 4 x -CH₂)
 1.564 (d, 2 H, 1 x -CH₂)
 1.681 - 1.725 (m, 4 H, 2 x -CH₂)
 1.878 - 1.921 (m, 4 H, 2 x -CH₂)
 2.807 - 1.835 (m, 4 H, -CH₂OCH₂-)
 3.278 (m, 2 H, 2 x -CH)
 3.391 - 3.422 (m, 4 H, -CH₂NCH₂-)
 3.680 - 3.697 (m, 4 H, -CH₂NCH₂-)
 3.735 - 3.751 (m, 4 H, -CH₂OCH₂-)
 3.774 (ddd, ³J_{5a',4'} = 6.0 Hz, ²J_{5'a,5'b} = 12.6 Hz, ³J_{5'a,p} = 3.3 Hz, 1 H, 5'-a-H)
 3.855 (ddd, ³J_{5'b,4} = 3.3 Hz, ²J_{5'b,5'a} = 12.6 Hz, ³J_{5'b,p} = 3.4 Hz, 1 H, 5'-b-H)
 3.924 (ddd, ³J_{4',5'a} = 6.0 Hz, ³J_{4',5'b} = 3.3 Hz, ³J_{4',3'} = 1.7 Hz, 1 H, 4'-H)
 4.067 (dd, ³J_{3',4'} = 1.7 Hz, ³J_{3',2'} = 0.6 Hz, 1 H, 3'-H)
 4.337 (dd, ³J_{2',3'} = 0.6 Hz, ³J_{2',1'} = 4.9 Hz, 1 H, 2'-H)
 5.766 (d, ³J_{5,6} = 7.7 Hz, 1 H, 5-H)
 6.144 (d, ³J_{1',2'} = 4.9 Hz, 1 H, 1'-H)
 7.693 (d, J_{6,5} = 7.7 Hz, 1 H, 6-H) ppm

¹³C-NMR (125.78 MHz; D₂O)

δ = 25.04, 33.28 (10 x -CH₂), 44.89 (-CH₂OCH₂-), 48.40 (-CH₂NCH₂-), 54.86 (2 x -CH), 61.07 (C-5'), 66.35 (d, J_{p,H} = 7.5 Hz, -CH₂NCH₂-), 67.15 (-CH₂NCH₂-), 75.98 (C-3'), 83.23 (C-2'), 85.83 (C-4'), 101.83 (C-5), 142.57 (C-6), 156.42 (C-2), 158.22 (-CN), 172.94 (C-4) ppm

³¹P-NMR (202.76 MHz; D₂O)

δ = 8.800 ppm.

2'-Desoxy-2'-fluor-uridin (12)⁹⁹

In einem Polypropylengefäß mit aufgesetzter Teflonmanschette und Rückflusskühler wurde eine Mischung aus 2,2'-Anhydro-*arabino*-uridin (**11**; 550 mg; 2.43 mmol), Dioxan (60 ml) und HF-Pyridin Komplex (6 ml) für 21 h auf 115 °C (Ölbadtemperatur) erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Mischung mit Wasser (15 ml) versetzt und portionsweise mit Calciumcarbonat neutralisiert. Überschüssiges Calciumcarbonat wurde abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Das Filtrat wurde im Vakuum eingeeengt und der verbliebene braune, schmierige Feststoff in wenig Methanol aufgenommen. Säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel mit Chloroform-Methanol (3:1) als Laufmittel lieferte das Produkt als farblosen Schaum.

Ausbeute: 295 mg (49 %)

$C_9H_{11}FN_2O_5$, 246.19 g · mol⁻¹

Smp: 148 °C (Lit.⁹⁹ 150 °C)

$[\alpha]_D^{20}$: +52 (c = 0.3 in H₂O)

MS (CI, Isobutan)

m/z: 247 [$C_9H_{12}FN_2O_5^+$]

¹H-NMR (500.14 MHz; D₂O)

δ = 3.774 (dd, ²J_{5'a,5'b} = 13.2 Hz, ³J_{5'a,4'} = 4.4 Hz, 1 H, 5'a-H)
 3.955 (dd, ²J_{5'b,5'a} = 13.2 Hz, ³J_{5'b,4'} = 2.8 Hz, 1 H, 5'b-H)
 4.082 (ddd, ³J_{4',5'a} = 4.4 Hz, ³J_{4',5'b} = 2.8 Hz, ³J_{4',3'} = 8.8 Hz, 1 H, 4'-H)
 4.337 (ddd, ³J_{3',4'} = 8.8 Hz, ³J_{3',2'} = 4.9 Hz, ³J_{3',F} = 21.4 Hz, 1 H, 3'-H)
 5.172 (ddd, ³J_{2',3'} = 4.9 Hz, ³J_{2',1'} = 1.6 Hz, ²J_{2',F} = 52.7 Hz, 1 H, 2'-H)
 5.825 (d, ³J_{5,6} = 8.2 Hz, 1 H, 5-H)
 5.952 (dd, ³J_{1',2'} = 1.6 Hz, ³J_{1',F} = 19.76 Hz, 1 H, 1'-H)
 7.778 (d, ³J_{6,5} = 8.2 Hz, 1 H, 6-H) ppm

¹³C-NMR (125.78 MHz; D₂O)

δ = 60.25 (C-5'), 68.34 (²J_{C3',F} = 16.6 Hz, C-3'), 82.85 (C-4'), 89.92 (²J_{C1',F} = 35.3 Hz, C-1'), 93.68 (¹J_{C2',F} = 184.8 Hz, C-2'), 102.45 (C-5), 142.85 (C-6), 151.60 (C-2), 166.66 (C-4) ppm

^{19}F -NMR (282.35 MHz; D_2O)

$\delta = -200.9$ ppm.

2'-Desoxy-2'-fluor-uridin-5'-O-monophosphat (18) als Dinatriumsalz

2'-Desoxy-2'-fluor-uridin (**12**; 201 mg; 0.82 mmol) wurde in Acetonitril (2.5 ml) gelöst, mit Pyridinhydrochlorid (310 mg; 2.68 mmol) versetzt und 30 min im Eis/Kochsalzbad auf 0 °C gekühlt. Nachdem langsam frisch destilliertes Phosphoroxyltrichlorid (0.2 ml; 2.1 mmol) zugegeben wurde, wurde die Reaktionsmischung 6 h bei 0 °C gerührt. Es wurde mit Wasser (60 ml) gequench und mit Diethylether (120 ml) gewaschen. Die wässrige Phase wurde zu einem gelblich viskosen Sirup eingeengt und in Wasser (1 ml) aufgenommen. Nach Ionenaustauschchromatographie an DOWEX 50 WX (H^+ -Form) und anschließend an DOWEX 50 WX2 (Na^+ -Form) wurde das Di-Natriumsalz als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 260 mg (86 %)

$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{FN}_2\text{Na}_2\text{O}_8\text{P}$, 370.14 g · mol⁻¹

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: +5.61 (c = 0.3 in H_2O)

MS (ESI, neg. Modus)

m/z: 324 [$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{FN}_2\text{O}_8\text{P}^-$]

^1H -NMR (500.14 MHz; D_2O)

$\delta = 4.081$ (dd, $^2\text{J}_{5'a,5'b} = 12.1$ Hz, $^3\text{J}_{5'a,4'} = 3.8$ Hz, 1 H, 5'-a-H)

4.210 (m, 1 H, 4'-H)

4.256 (dd, $^2\text{J}_{5'b,5'a} = 12.1$ Hz, $^3\text{J}_{5'b,4'} = 4.4$ Hz, 1 H, 5'-b-H)

4.387 (ddd, $^3\text{J}_{3',4'} = 7.7$ Hz, $^3\text{J}_{3',2'} = 3.8$ Hz, $^3\text{J}_{3',\text{F}} = 20.9$ Hz, 1 H, 3'-H)

5.125 (dd, $^3\text{J}_{2',3'} = 3.8$ Hz, $^3\text{J}_{2',1'} = 1.1$ Hz, $^2\text{J}_{2',\text{F}} = 52.2$ Hz, 1 H, 2'-H)

5.822 (d, $^3\text{J}_{5,6} = 8.2$ Hz, 1 H, 5-H)

5.980 (dd, $^3\text{J}_{1',2'} = 1.1$ Hz, $^3\text{J}_{1',\text{F}} = 18.1$ Hz, 1 H, 1'-H)

7.799 (d, $^3\text{J}_{6,5} = 8.2$ Hz, 1 H, 6-H) ppm

^{13}C -NMR (125.78 MHz; D_2O)

$\delta =$ 63.73 (C-5'), 68.06 ($^2J_{\text{C}3',\text{F}} = 16.61$ Hz, C-3'), 81.63 (C-4'), 89.01 ($^2J_{\text{C}1',\text{F}} = 35.29$ Hz, C-1'), 93.55 ($^1J_{\text{C}2',\text{F}} = 185.8$ Hz, C-2'), 102.55 (C-5), 142.29 (C-6), 151.64 (C-2), 166.64 (C-4) ppm

^{19}F -NMR (282.35 MHz; D_2O)

$\delta =$ - 202.63 ppm

^{31}P -NMR (202.46 MHz; D_2O)

$\delta =$ 1.131 ppm.

2'-Desoxy-2'-fluor-uridin-5'-O-phosphormorpholidat (30) als 4-Morpholin-*N,N'*-dicyclohexylcarboxamidinsalz

Eine wässrige Lösung des Dinatriumsalzes 2'-Desoxy-2'-fluor-uridin-5'-O-monophosphat (**18**; 180 mg; 0.48 mmol) wurde über eine Ionentauschersäule (DOWEX W 50, H^+ -Form) gegeben. Das Eluat wurde im Vakuum auf 2.5 ml eingengt, mit *tert.*-Butanol (2.5 ml) und frisch destilliertem Morpholin (0.1 ml; 1.32 mmol) unter Rückfluss erhitzt. Eine Lösung von *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (260 mg; 1.32 mmol) in *tert.*-Butanol (2.5 ml) wurde über einen Zeitraum von 2 h zur Reaktionslösung getropft. Nachdem auf Raumtemperatur abgekühlt wurde, wurden der ausgefallene Niederschlag abfiltriert und mit *tert.*-Butanol gewaschen. Das organische Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und die verbleibende wässrige Phase mit Diethylether (3 x 1 ml) gewaschen. Gefriertrocknung der wässrigen Phase lieferte das Produkt als weißen pulvrigen Feststoff.

Ausbeute: 192 mg (85 %)

$\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{FN}_6\text{O}_9\text{P}$; 688.73 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: +6.3 ($c = 0.8$ in H_2O)

MS (ESI, neg. Modus)

m/z : 395 [$\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{FN}_3\text{O}_8\text{P}^-$]

$^1\text{H-NMR}$ (500.14 MHz; D_2O)

$\delta =$	1.098	(m, 2 H, 1 x $-\text{CH}_2$)
	1.263 - 1.321	(m, 8 H, 4 x $-\text{CH}_2$)
	1.566	(d, 2 H, 1 x $-\text{CH}_2$)
	1.683 - 1.712	(m, 4 H, 2 x $-\text{CH}_2$)
	1.865 - 1.913	(m, 4 H, 2 x $-\text{CH}_2$)
	2.938 - 2.951	(m, 4 H, $-\text{CH}_2\text{OCH}_2-$)
	3.004	(m, 2 H, 2 x $-\text{CH}$)
	3.268 - 3.302	(m, 4 H, $-\text{CH}_2\text{NCH}_2-$)
	3.393 - 3.411	(m, 4 H, $-\text{CH}_2\text{NCH}_2-$)
	3.618 - 3.645	(m, 4 H, $-\text{CH}_2\text{OCH}_2-$)
	3.993	(dd, $^2\text{J}_{5'a,5'b} = 13.7$ Hz, $^3\text{J}_{5'a,4'} = 3.3$ Hz, $^3\text{J}_{5a',p} = 1.1$ Hz, 1 H, 5' a-H)
	4.165	(dd, $^2\text{J}_{5'b,5'a} = 13.7$ Hz, $^4\text{J}_{5'b,4'} = 4.4$ Hz, $^3\text{J}_{5a',p} = 1.1$ Hz, 1 H, 5' b-H)
	4.139	(na., 1 H, 4' -H)
	4.411	(ddd, $^3\text{J}_{3',4'} = 8.2$ Hz, $^3\text{J}_{3',2'} = 4.9$ Hz, $^3\text{J}_{3',F} = 21.4$ Hz, 1 H, 3' -H)
	5.131	(dd, $^3\text{J}_{2',3'} = 4.9$ Hz, $^3\text{J}_{2',1'} = 1.6$ Hz, $^2\text{J}_{2',F} = 52.7$ Hz, 1 H, 2' -H)
	5.828	(d, $^3\text{J}_{5,6} = 8.2$ Hz, 1 H, 5-H)
	6.015	(dd, $^3\text{J}_{1',2'} = 1.6$ Hz, $^3\text{J}_{1',F} = 19.7$ Hz, 1 H, 1' H)
	7.779	(d, $^3\text{J}_{6,5} = 8.23$ Hz, 1 H, 6-H) ppm

 $^{13}\text{C-NMR}$ (125.78 MHz; D_2O)

$\delta =$	25.05, 33.28	(10 x $-\text{CH}_2$), 44.50 ($-\text{CH}_2\text{OCH}_2-$), 48.40 ($-\text{CH}_2\text{NCH}_2-$), 54.86 (2 x $-\text{CH}$), 62.89 (C-5'), 66.35 (d, $^3\text{J}_{p,H} = 7.5$ Hz, $-\text{CH}_2\text{NCH}_2-$), 67.15 ($-\text{CH}_2\text{NCH}_2-$), 68.06 ($^2\text{J}_{C3',F} = 16.61$ Hz, C-3'), 81.63 (C'4), 89.35 ($^2\text{J}_{C1',F} = 35.29$ Hz, C-1'), 93.55 ($^1\text{J}_{C2',F} = 185.6$ Hz, C-2'), 102.84 (C-5), 141.95 (C-6), 154.30 (C-2), 158.22 (C-4) ppm
------------	--------------	---

 $^{19}\text{F-NMR}$ (282.35 MHz; D_2O)

$\delta =$	-203.15 ppm
------------	-------------

 $^{31}\text{P-NMR}$ (202.46 MHz; D_2O)

$\delta =$	8.759 ppm.
------------	------------

2'-Desoxy-2'-fluor-uridin-5'-O-diphospho- α -D-galactopyranosid (34) als Dinatriumsalz

a) Kodama-Methode

2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-galactopyranosyl-1-phosphat als Diammoniumsalz (158 mg; 0.338 mmol) wurden in DMF (1 ml) gelöst und mit *N,N'*-Carbonyldiimidazol (165 mg; 1.016 mmol) versetzt. Nach 2 h Rühren bei Raumtemperatur wurden 6 Tropfen absolutes Methanol zugegeben und weitere 30 min bei Raumtemperatur um überschüssige *N,N'*-Carbonyldiimidazol zu vernichten. Die Reaktionsmischung wurde vollständig eingeeengt und mit wenigen Millilitern trockenem Ethanol (3 ml) und Toluol (5 ml) codestilliert. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Aufarbeitung in der nachfolgenden Kupplungsreaktion eingesetzt. Dazu wurde 2'-Desoxy-2'-fluor-uridin-5'-*O*-monophosphat (**18**; 135 mg; 0.414 mmol) in DMF (1 ml) gelöst und zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde dann unter Argon bei Raumtemperatur 48 h gerührt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde Toluol (5 ml) zugegeben und vollständig eingeeengt. Der Rückstand wurde in Diethylether (5 ml) aufgenommen, mit Wasser (3 x 10 ml, dem ein Tropfen einer 1 M Triethylammoniumhydrogencarbonatlösung zugefügt wurde) extrahiert und anschließend die wässrige Phase lyophilisiert. Das Rohprodukt wurde in einer Lösung von Triethylamin (0.68 ml), Methanol (5 ml) und Wasser (2 ml) gelöst und über Nacht gerührt. Nach Gefriertrocknung wurde **34** durch Reversed-Phase-HPLC an einer RP 18 Säule vom Reaktionsgemisch abgetrennt und durch Ionentausch (DOWEX 50 WX 2, Na⁺-Form) in das Natriumsalz überführt. Nach Gefriertrocknung wurde eine weißer pulveriger Feststoff erhalten.

Ausbeute: 38 mg (19 %)

$C_{15}H_{21}FN_2Na_2O_{16}P_2$; 612.32 g · mol⁻¹

$[\alpha]_D^{20}$: +29.11 (c = 0.3 in H₂O)

MS (ESI, neg. Modus)

m/z: 566 [$C_{15}H_{22}FN_2O_{16}P_2$]⁻

¹H-NMR (500.14 MHz; D₂O)

δ = 3.699 (dd, ²J_{6''a,6''b} = 11.7 Hz, ³J_{6''a,5''} = 5.2 Hz, 1 H, 6''a-H)
 3.703 (dd, ²J_{6''b,6''a} = 11.7 Hz, ³J_{6''b,5''} = 6.7 Hz, 1 H, 6''b-H)
 3.872 (ddd, ³J_{2'',3''} = 10.3 Hz, ³J_{2'',1''} = 3.4 Hz, ³J_{2'',p} = 3.2 Hz, 1 H, 2''-H)
 3.961 (dd, ³J_{3'',4''} = 2.8 Hz, ³J_{3'',2''} = 10.3 Hz, 1 H, 3''-H)

4.005 (d, $J_{4'',3''} = 2.8$ Hz, 1 H, 4''-H)
 4.106 (dd, ${}^2J_{5'a,5'b} = 13.6$ Hz, ${}^3J_{5'a,4'} = 3.3$ Hz, 1 H, 5'a-H)
 4.211 (dd, ${}^2J_{5'b,5'a} = 13.6$ Hz, ${}^3J_{5'b,4'} = 4.4$ Hz, 1 H, 5'b-H)
 4.235 (m, 1 H, 5''-H)
 4.341 (ddd, ${}^3J_{4',5'a} = 3.3$ Hz, ${}^3J_{4',5'b} = 4.4$ Hz, ${}^3J_{4',3'} = 8.8$ Hz, 1 H, 4'-H)
 4.457 (ddd, ${}^3J_{3',4'} = 8.8$ Hz, ${}^3J_{3',2'} = 4.9$ Hz, ${}^3J_{3',F} = 21.6$ Hz, 1 H, 3'-H)
 5.182 (ddd, ${}^3J_{2',3'} = 4.9$ Hz, ${}^3J_{2',1'} = 1.6$ Hz, ${}^2J_{2',F} = 52.7$ Hz, 1 H, 2'-H)
 5.614 (dd, ${}^3J_{1',2''} = 3.4$ Hz, ${}^2J_{1'',P} = 6.8$ Hz, 1 H, 1''-H)
 5.915 (d, ${}^3J_{5,6} = 8.2$ Hz, 1 H, 5-H)
 6.044 (dd, ${}^3J_{1',2'} = 1.6$ Hz, ${}^3J_{1',F} = 19.7$ Hz, 1 H, 1'-H)
 7.879 (d, ${}^3J_{6,5} = 8.2$ Hz, 1 H, 6-H) ppm

${}^{13}\text{C-NMR}$ (125.78 MHz; D_2O)

$\delta =$ 61.28 (C-6'), 63.73 (C-5'), 68.12 (${}^2J_{\text{C}3',\text{F}} = 16.6$ Hz, C-3'), 68.67 (${}^2J_{\text{C}2'',\text{P}\beta} = 8.2$ Hz, C-2''), 69.39 (C-4'), 72.16 (C-5''), 81.63 (C'-4), 89.01 (${}^2J_{\text{C}1',\text{F}} = 35.27$ Hz, C-1'), 93.55 (${}^1J_{\text{C}2',\text{F}} = 185.8$ Hz, C-2'), 96.24 (${}^1J_{\text{C}1'',\text{P}\beta} = 6.5$ Hz, C-1''), 102.55 (C-5), 142.29 (C-6), 151.64 (C-2), 166.64 (C-4) ppm

${}^{19}\text{F-NMR}$ (282.35 MHz; D_2O)

$\delta =$ -203.70 ppm

${}^{31}\text{P-NMR}$ (202.46 MHz; D_2O)

$\delta =$ -11.41 (d, ${}^1J_{\text{P},\text{P}} = 20.45$ Hz, P_α), -9.98 (d, P_β) ppm.

b) Moffatt-Methode

2'-Desoxy-2'-fluor-uridin-5'-*O*-phosphormorpholidat 4-Morpholin-*N,N'*-dicyclohexylcarboxamidinsalz (**30**; 175 mg; 2.302 mmol) wurde in trockenem Pyridin (5 ml) gelöst und zur Trockene eingengt. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, wobei die Apparatur jedes Mal mit Argon belüftet wurde. Parallel wurde eine wässrige Lösung von 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-galactopyranosyl-1-phosphat Diammoniumsalz (180 mg; 0.535 mmol) langsam über eine Ionentauschersäule (DOWEX W 50, H^+ -Form) gegeben. Das Eluat wurde mit Pyridin alkalisch gemacht, auf etwa 1 ml eingengt und mit Tri-*n*-octylamin (0.25 ml) versetzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und die Substanz dreimal mit

trockenem Pyridin (3 ml) versetzt und eingengt. Der Rückstand wurde in trockenem Pyridin (3 ml) aufgenommen und mit dem zuvor getrockneten **30** unter Argon zusammengegeben. Nach 5 d Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt und einmal mit Toluol (5 ml) versetzt und vollständig eingengt. Der Rückstand wurde in Diethylether (5 ml) aufgenommen, mit Wasser (3 x 10 ml, dem ein Tropfen einer 1 M Triethylammoniumhydrogencarbonatlösung zugefügt wurde) extrahiert und anschließend die wässrige Phase lyophilisiert. Das Rohprodukt wurde in einer Lösung von Triethylamin (0.68 ml), Methanol (5 ml) und Wasser (2 ml) gelöst und über Nacht gerührt. Nach Gefriertrocknung wurde **34** durch Reversed-Phase-HPLC an einer RP 18 Säule isoliert und durch Ionentausch (DOWEX 50 WX2, Na⁺-Form) in das Natriumsalz überführt. Nach Gefriertrocknung wurde das Produkt als weißer, pulveriger Feststoff erhalten. Die analytischen Daten stimmten mit denen von **34**, das nach Variante a) erhalten wurde, überein.

Ausbeute: 17 mg (8 %)

2',5'-O-Ditryl-uridin (14)^{76,86,123}

Uridin (5 g; 20.475 mmol) wurde in trockenem Pyridin (50 ml) gelöst, mit einem dreifachem Überschuss an Triphenylmethylchlorid (17.12 g; 61.425) versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Zur Reaktionsvervollständigung wurde die klare gelbe Lösung abschließend 4 h bei 110 °C gerührt. Nach dem Abkühlen wurde vollständig eingengt, dreimal mit Toluol (100 ml) aufgenommen und bis zur Trockene eingengt. Der sirupöse, gelb-braune Feststoff wurde in Chloroform (50 ml) aufgenommen und mit Wasser (3 x 50 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, vollständig eingengt und in wenig warmen Toluol (20 ml) aufgenommen. Es wurde gerade soviel Diethylether zugegeben, bis eine leichte Trübung zu erkennen war. Das Rohprodukt wurde nach 2 d bei +4 °C abfiltriert, im Vakuum getrocknet und in wenig Chloroform (5 ml) aufgenommen. Säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel mit Chloroform-Essigsäureethylester (4:1) als Laufmittel lieferte ein weißes, pulveriges Produkt.

Ausbeute: 5.25 g (35 %)

C₄₇H₄₀N₂O₆; 728.29 g · mol⁻¹

Smp: 226 °C (Lit.¹²⁰ 224-225 °C)

$[\alpha]_D^{20}$: +91 (c = 0.5 in Aceton)

MS (CI, Isobutan)

m/z: 729 $[C_{47}H_{41}N_2O_6]^+$

1H -NMR (500.14 MHz; $CDCl_3$)

δ = 3.714 (dd, $^2J_{5'a,5'b} = 12.6$ Hz, $^3J_{5'a,4'} = 2.7$ Hz, 1 H, 5' a-H)
 3.844 (dd, $^2J_{5'b,5'a} = 12.6$ Hz, $^3J_{5'b,4'} = 2.7$ Hz, 1 H, 5' b-H)
 4.012 (ddd, $^3J_{4',5'a} = 2.7$ Hz, $^3J_{4',5'b} = 2.7$ Hz, 1 H, 5' b-H)
 4.149 (m, 2 H, 3' -H, 2' -H)
 5.667 (d, $^3J_{5,6} = 8.2$ Hz, 1 H, 5-H)
 5.816 (d, $^3J_{1',2'} = 3.8$ Hz, 1 H, 1' -H)
 7.271 - 7.283 (m, 30 H, aromat. H)
 7.922 (d, $^3J_{6,5} = 8.2$ Hz, 1 H, 6-H) ppm

^{13}C -NMR (125.78 MHz; $CDCl_3$)

δ = 61.42 (C-5'), 70.18 (C-3'), 75.03 (C-2'), 85.45 (C-4'), 90.51 (C-1'), 102.36 (C-5), 127.35 (C aromat.), 128.14 (C aromat.), 129.11 (C aromat.), 141.82 (C-6), 144.36 (C Trityl), 152.43 (C-2), 165.14 (C-4) ppm.

2,3'-Anhydro-2',5'-O-Ditrityl-xylo-uridin (15)¹²³

2',5'-O-Ditrityl-uridin (**14**; 1.46 g; 2 mmol) wurde unter Argon in Dichlormethan (60 ml) gelöst und bei Raumtemperatur rasch tropfenweise mit DAST (0.54 ml; 4 mmol) versetzt. Nach 5 min wurde die Reaktionslösung solange mit eiskalter gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung versetzt, bis eine Trübung einsetzte und keine Gasentwicklung mehr beobachtet wurde. Es wurde weitere 30 min bei Raumtemperatur gerührt, die organische Phase abgetrennt, mit Wasser (50 ml) gewaschen und abschließend über Natriumsulfat getrocknet. Nachdem das Lösungsmittel im Vakuum entfernt worden war, wurde in Chloroform (2 ml) aufgenommen. Säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel mit Chloroform-Essigsäureethylester (4:1) als Laufmittel lieferte einen weißen, amorphen Feststoff.

Ausbeute: 1.065 g (75 %)

$C_{47}H_{38}N_2O_5$; 712.29 g · mol⁻¹

Smp: 236 °C (Lit.¹²⁰ 237 °C)

$[\alpha]_D^{20}$: +75 (c = 1.0 in Aceton)

MS (CI, Isobutan)

m/z: 713 [$C_{47}H_{39}N_2O_5^+$]

¹H-NMR (500.14 MHz; CDCl₃)

δ = 3.685 (m, 3 H, 5' a-H, 5' b-H, 4'-H)
3.907 (dd, $^3J_{3',4'} = 1.8$ Hz, 1 H, 3'-H)
4.165 (dd, $^3J_{2',1'} = 2.2$ Hz, 1 H, 2'-H)
5.557 (d, $^3J_{5,6} = 7.7$ Hz, 1 H, 5-H)
6.355 (d, $^3J_{1',2'} = 2.2$ Hz, 1 H, 1'-H)
7.085 (d, $^3J_{1',2'} = 7.7$ Hz, 1 H, 1'-H)
7.123 - 7.245 (m, 30 H, aromat. H) ppm

¹³C-NMR (125.78 MHz; CDCl₃)

δ = 62.61 (C-5'), 71.08 (C-3'), 76.73 (C-2'), 86.55 (C-4'), 91.11 (C-1'), 102.63 (C-5), 127.35 (C aromat.), 128.84 (C aromat.), 129.11 (C aromat.), 142.73 (C-6), 143.76 (C Trityl), 152.43 (C-2), 165.14 (C-4) ppm.

3'-Desoxy-3'-fluor-uridin (**10**)⁷⁴

2,3'-Anhydro-2',5'-*O*-Ditryl-*xylo*-uridin (**15**; 734 mg; 1.03 mmol) wurde in einem Polypropylengefäß mit aufgesetzter Teflonmanschette und Rückflusskühler in Acetonitril (30 ml) gelöst, mit HF-Pyridin Komplex (6 ml) versetzt und für 21 h auf 115 °C (Ölbadtemperatur) erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Mischung mit Wasser (45 ml) versetzt und portionsweise mit Calciumcarbonat neutralisiert. Überschüssiges Calciumcarbonat wurde abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Das Filtrat wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und der ausgefallene Feststoff abfiltriert. Das Filtrat wurde im Vakuum eingengt und der verbliebene beige, schmierige Feststoff in wenig Methanol aufgenommen. Säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel mit Chloroform-Methanol (3:1) als Laufmittel lieferte ein Produkt als farblosen, glasartigen Feststoff.

Ausbeute: 182 mg (72 %)
 $C_9H_{11}FN_2O_5$, 246.19 g · mol⁻¹
 Smp: 194 °C (Lit.⁷⁴ 195-196 °C)
 $[\alpha]_D^{20}$: +63 (c = 1.0 in H₂O)

MS (CI, Isobutan)

m/z: 247 [$C_9H_{12}FN_2O_5^+$]

¹H-NMR (500.14 MHz; D₂O)

δ = 3.953 (dd, ²J_{5'a,5'b} = 12.1 Hz, ³J_{5'a,4'} = 6.6 Hz, 1 H, 5'a-H)
 4.199 (dd, ²J_{5'b,5'a} = 12.1 Hz, ³J_{5'b,4'} = 4.9 Hz, 1 H, 5'b-H)
 4.461 (ddd, ³J_{4',5'a} = 6.6 Hz, ³J_{4',5'b} = 4.9 Hz, ³J_{4',3'} = 1.1 Hz, ³J_{4',F} = 34 Hz,
 1 H, 4'-H)
 4.513 (ddd, ³J_{2',F} = 13.7 Hz, ³J_{2',3'} = 4.4 Hz, ³J_{2',1'} = 7.2 Hz, 1 H, 2'-H)
 5.078 (ddd, ²J_{3',F} = 50.5 Hz, ³J_{3',4'} = 1.1 Hz, ³J_{3',2'} = 4.4 Hz, 1 H, 3'-H)
 5.802 (d, ³J_{5,6} = 8.2 Hz, 1 H, 5-H)
 5.837 (dd, ⁴J_{1',F} = 1.7 Hz, ³J_{1',2'} = 7.2 Hz, 1 H, 1'-H)
 7.698 (d, ³J_{6,5} = 8.2 Hz, 1 H, 6-H) ppm

¹³C-NMR (125.78 MHz; D₂O)

δ = 58.69 (C-5'), 78.42 (²J_{C2',F} = 28.03 Hz, C-2'), 83.05 (C-1'), 90.72 (²J_{C4',F} =
 10.38 Hz, C-4'), 95.18 (¹J_{C3',F} = 181.66 Hz, C-3'), 102.09 (C-5), 141.67 (C-6),
 151.85 (C-2), 166.69 (C-4) ppm

¹⁹F-NMR (282.35 MHz; D₂O)

δ = -201.97 ppm.

3'-Desoxy-3'-fluor-uridin-5'-O-monophosphat (**19**) als Dinatriumsalz

3'-Desoxy-3'-fluor-uridin (**10**; 200 mg; 0.81 mmol) wurde in Acetonitril (2.5 ml) gelöst, mit Pyridinhydrochlorid (350 mg; 3.027 mmol) versetzt und 30 min im Eis/Kochsalzbad auf 0 °C gekühlt. Nachdem langsam frisch destilliertes Phosphoroxotrichlorid (0,2 ml; 2.1 mmol) zugetropft worden war, wurde die Reaktionsmischung 6 h bei 0 °C gerührt. Daraufhin wurde mit Wasser (60 ml) gequench und mit Diethylether (120 ml) gewaschen. Die wässrige Phase

wurde zu einem gelblich viskosen Sirup eingengt und in Wasser (1 ml) aufgenommen. Nach Ionenauschromatographie an DOWEX W 50 (H⁺-Form) und anschließend an DOWEX 50 WX 2 (Na⁺-Form) wurde das Di-Natriumsalz als milchigen, wachsartigen Feststoff erhalten.

Ausbeute: 276 mg (92 %)

C₉H₁₀FN₂Na₂O₈P, 370.14 g · mol⁻¹

[α]_D²⁰: +7.11 (c = 0.5 in H₂O)

MS (ESI, neg. Modus)

m/z: 324 [C₉H₁₁FN₂O₈P⁺]

¹H-NMR (500.14 MHz; D₂O)

δ = 4.179 (dd, ²J_{5'a,5'b} = 12.2 Hz, ³J_{5'a,4'} = 6.4 Hz, 1 H, 5'a-H)
 4.213 (dd, ²J_{5'b,5'a} = 12.2 Hz, ³J_{5'b,4'} = 4.9 Hz, 1 H, 5'b-H)
 4.445 (ddd, ³J_{4',5'a} = 6.4 Hz, ³J_{4',5'b} = 4.9 Hz, ³J_{4',3'} = 1.1 Hz, ³J_{4',F} = 34 Hz,
 1 H, 4'-H)
 4.548 (ddd, ³J_{2',F} = 13.9 Hz, ³J_{2',3'} = 4.4 Hz, ³J_{2',1'} = 7.1 Hz, 1 H, 2'-H)
 5.045 (ddd, ²J_{3',F} = 50.5 Hz, ³J_{3',4'} = 1.1 Hz, ³J_{3',2'} = 4.4 Hz, 1 H, 3'-H)
 5.731 (d, ³J_{5,6} = 8.2 Hz, 1 H, 5-H)
 5.769 (dd, ⁴J_{1',F} = 1.6 Hz, ³J_{1',2'} = 7.1 Hz, 1 H, 1'-H)
 7.638 (d, ³J_{6,5} = 8.2 Hz, 1 H, 6-H) ppm

¹³C-NMR (125.78 MHz; D₂O)

δ = 66.88 (C-5'), 79.56 (²J_{C2',F} = 28.03 Hz, C-2'), 84.16 (C-1'), 91.55 (²J_{C4',F} =
 10.42 Hz, C-4'), 94.15 (¹J_{C3',F} = 181.66 Hz, C-3'), 102.10 (C-5), 141.42 (C-6),
 151.77 (C-2), 166.66 (C-4) ppm

¹⁹F-NMR (282.35 MHz; D₂O)

δ = -202.17 ppm

³¹P-NMR (202.46 MHz; D₂O)

δ = 1.136 ppm.

3'-Desoxy-3'-fluor-uridin-5'-O-phosphormorpholidat (31) als 4-Morpholin-*N,N'*-dicyclohexylcarboxamidinsalz

Eine wässrige Lösung des Dinatriumsalzes 3'-Desoxy-3'-fluor-uridin-5'-O-monophosphat (**19**; 160 mg; 0.432 mmol) wurde über eine Ionentauschersäule (DOWEX W 50, H⁺-Form) gegeben. Das Eluat wurde im Vakuum auf 2.5 ml eingengt, mit *tert.*-Butanol (2.5 ml) und frisch destilliertem Morpholin (0.1 ml; 1.32 mmol) unter Rückfluss erhitzt. Eine Lösung von *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (260 mg; 1.32 mmol) in *tert.*-Butanol (2.5 ml) wurde über einen Zeitraum von 2 h zur Reaktionslösung getropft. Nachdem auf Raumtemperatur abgekühlt wurde, wurde der ausfallende Niederschlag abfiltriert und mit *tert.*-Butanol gewaschen. Das organische Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und die verbleibende wässrige Phase mit Diethylether (3 x 1 ml) gewaschen. Gefriertrocknung der wässrigen Phase lieferte das Produkt **31** als weißen, pulverigen Feststoff.

Ausbeute: 168 mg (84 %)

C₃₀H₅₀FN₆O₉P; 688.73 g · mol⁻¹

[α]_D²⁰: +9.8 (c = 0.7 in H₂O)

MS (ESI, neg. Modus)

m/z: 395 [C₁₃H₁₈FN₃O₈P⁻]

¹H-NMR (500.14 MHz; D₂O)

δ =	1.091	(m, 2 H, 1 x -CH ₂)
	1.221 - 1.305	(m, 8 H, 4 x -CH ₂)
	1.576	(d, 2 H, 1 x -CH ₂)
	1.692 - 1.733	(m, 4 H, 2 x -CH ₂)
	1.853 - 1.899	(m, 4 H, 2 x -CH ₂)
	2.988 - 2.997	(m, 4 H, -CH ₂ OCH ₂ -)
	3.004	(m, 2 H, 2 x -CH)
	3.188 - 3.223	(m, 4 H, -CH ₂ NCH ₂ -)
	3.392 - 3.421	(m, 4 H, -CH ₂ NCH ₂ -)
	3.727 - 3.757	(m, 4 H, -CH ₂ OCH ₂ -)
	3.993	(dd, ² J _{5'a,5'b} = 12.9 Hz, ³ J _{5'a,4'} = 3.3 Hz, ³ J _{5a',P} = 1.1 Hz, 1 H, 5'a-H)
	4.165	(dd, ² J _{5'b,5'a} = 12.9 Hz, ³ J _{5'b,4'} = 4.4 Hz, ³ J _{5b',P} = 1.1 Hz, 1 H, 5'b-H)
	4.139	(m, 1 H, 4'-H)

4.411 (ddd, ${}^3J_{3',4'} = 1.2$ Hz, ${}^3J_{3',2'} = 4.4$ Hz, ${}^2J_{3',F} = 21.4$ Hz, 1 H, 3'-H)
 5.131 (dd, ${}^3J_{2',3'} = 4.4$ Hz, ${}^3J_{2',1'} = 7.2$ Hz, ${}^3J_{2',F} = 52.7$ Hz, 1 H, 2'-H)
 5.828 (d, ${}^3J_{5,6} = 8.2$ Hz, 1 H, 5-H)
 6.015 (dd, ${}^3J_{1',2'} = 7.2$ Hz, ${}^4J_{1',F} = 19.6$ Hz, 1 H, 1'-H)
 7.729 (d, ${}^3J_{6,5} = 8.2$ Hz, 1 H, 6-H) ppm

${}^{13}\text{C-NMR}$ (125.78 MHz; D_2O)

$\delta =$ 25.15, 33.56 (10 x $-\text{CH}_2$), 44.56 ($-\text{CH}_2\text{OCH}_2-$), 48.77 ($-\text{CH}_2\text{NCH}_2-$), 55.01 (2 x $-\text{CH}$), 62.81(C-5'), 66.35 ($-\text{CH}_2\text{NCH}_2-$), 67.15 ($-\text{CH}_2\text{NCH}_2-$), 68.06 (${}^1J_{\text{C}4',F} = 16.61$ Hz, C-4'), 80.22 (C'1), 89.62 (${}^3J_{\text{C}2',F} = 35.29$ Hz, C-2'), 92.56 (${}^2J_{\text{C}3',F} = 185.6$ Hz, C-3'), 102.15 (C-5), 141.44 (C-6), 151.05 (C-2), 166.10 (C-4) ppm

${}^{19}\text{F-NMR}$ (282.35 MHz; D_2O)

$\delta =$ -202.01 ppm.

${}^{31}\text{P-NMR}$ (202.46 MHz; D_2O)

$\delta =$ 8.894 ppm.

3'-Desoxy-3'-fluor-uridin-5'-O-diphospho- α -D-galactopyranosid (36) als
 Dinatriumsalz

a) Kodama-Methode

2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-galactopyranosyl-1-phosphat Diammoniumsalz (463 mg; 0.991 mmol) wurde in DMF (2 ml) gelöst und mit *N,N'*-Carbonyl-diimidazol (485 mg; 2.854 mmol) versetzt. Nach 2 h Rühren bei Raumtemperatur wurden 10 Tropfen absolutes Methanol zugegeben und weitere 30 min bei Raumtemperatur um überschüssiges *N,N'*-Carbonyl-diimidazol zu vernichten. Die Reaktionsmischung wurde vollständig eingeeengt und mit wenigen Millilitern trockenem Ethanol (5 ml) und Toluol (7 ml) zur Trockene eingeeengt. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Aufarbeitung in der nachfolgende Kupplungsreaktion eingesetzt. Dazu wurde 3'-Desoxy-3'-fluor-uridin-5'-O-monophosphat (**19**; 376 mg; 1.015 mmol) in DMF (1 ml) gelöst und zugegeben. Es wurde unter Argon bei Raumtemperatur 48 h gerührt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde Toluol (7 ml) zugegeben und abermals eingeeengt. Der Rückstand wurde in Diethylether (7 ml) aufgenommen, mit Wasser (3 x 10 ml, dem ein Tropfen einer 1 M Triethylammonium-

hydrogencarbonatlösung zugefügt wurde) extrahiert und die wässrige Phase anschließend lyophilisiert. Das Rohprodukt wurde in einer Lösung von Triethylamin (0.68 ml), Methanol (5 ml) und Wasser (2 ml) gelöst und über Nacht gerührt. Nach Gefriertrocknung wurde **36** durch Reversed-Phase-HPLC an einer RP 18 Säule vom Reaktionsgemisch abgetrennt und durch Ionentausch (DOWEX 50 WX 2, Na⁺-Form) in das Natriumsalz überführt. Nach Gefriertrocknung wurde das Produkt als weißer, pulveriger Feststoff erhalten.

Ausbeute: 48 mg (9 %)

C₁₅H₂₁FN₂Na₂O₁₆P₂; 612.32 g · mol⁻¹

[α]_D²⁰: +28.59 (c = 0.55 in H₂O)

MS (CI, Isobutan)

m/z: 566 [C₁₅H₂₂FN₂O₁₆P₂⁻]

¹H-NMR (500.14 MHz; D₂O)

δ = 3.555 (dd, ²J_{6''a,6''b} = 10.3 Hz, ³J_{6''a,5''} = 5.0 Hz, 1 H, 6''a-H)
 3.625 (dd, ²J_{6''b,6''a} = 10.3 Hz, ³J_{6''b,5''} = 6.9 Hz, 1 H, 6''b-H)
 3.712 (ddd, ³J_{2'',3''} = 10.3 Hz, ³J_{2'',1''} = 3.4 Hz, ³J_{2'',p} = 3.2 Hz, 1 H, 2''-H)
 3.801 (dd, ³J_{3'',4''} = 2.8 Hz, ³J_{3'',2''} = 10.3 Hz, 1 H, 3''-H)
 3.931 (d, ³J_{4'',5''} = 2.8 Hz, 1 H, 4''-H)
 4.045 (dd, ²J_{5'a,5'b} = 13.6 Hz, ³J_{5'a,4'} = 3.3 Hz, 1 H, 5'a-H)
 4.112 (dd; ²J_{5'b,5'a} = 13.6 Hz, ³J_{5'b,4'} = 4.4 Hz, 1 H, 5'b-H)
 4.205 (d, ³J_{5'',4''} = 3.3 Hz, 1 H, 5''-H)
 4.339 (ddd, ³J_{4',5'a} = 3.3 Hz, ³J_{4',5'b} = 4.4 Hz, ³J_{4',3'} = 1.1 Hz, 1 H, 4'-H)
 4.757 (ddd, ³J_{3',4'} = 1.1 Hz, ³J_{3',2'} = 4.9 Hz, ²J_{3',F} = 21.6 Hz, 1 H, 3'-H)
 5.188 (ddd, ³J_{2',3'} = 4.9 Hz, ³J_{2',1'} = 7.2 Hz, ³J_{2',F} = 52.7 Hz, 1 H, 2'-H)
 5.432 (dd, ³J_{1'',2''} = 3.4 Hz, ²J_{1'',p} = 6.8 Hz, 1 H, 1''-H)
 5.955 (d, ³J_{5,6} = 8.2 Hz, 1 H, 5-H)
 6.044 (dd, ³J_{1',2'} = 7.2 Hz, ⁴J_{1',F} = 19.7 Hz, 1 H, 1'-H)
 7.679 (d, ³J_{6,5} = 8.2 Hz, 1 H, 6-H) ppm

¹³C-NMR (125.78 MHz; D₂O)

δ = 57.81 (C-6'), 61.36 (C-5'), 68.55 (¹J_{C4',F} = 16.17 Hz, C-4'), 68.62 (²J_{C2'',PB} = 7.9 Hz, C-2''), 69.48 (C-4'), 72.05 (C-5'), 81.71 (C-1'), 88.69 (³J_{C2',F} =

35.16 Hz, C-2'), 95.49 ($^2J_{C3',F} = 186.11$ Hz, C-3'), 96.81 ($^1J_{C1',PB} = 6.5$ Hz, C-1'), 103.62 (C-5), 145.09 (C-6), 151.87 (C-2), 177.11 (C-4) ppm

^{19}F -NMR (282.35 MHz; D_2O)

$\delta = -201.38$ ppm

^{31}P -NMR (202.46 MHz; D_2O)

$\delta = -11.42$ (d, $^1J_{P,P} = 21.05$ Hz, P_α), -9.90 (d, P_β) ppm.

b) Moffatt-Methode

3'-Desoxy-3'-fluor-uridin-5'-*O*-phosphormorpholidat als 4-Morpholin-*N,N'*-dicyclohexyl-carboxamidinsalz (**31**; 160 mg; 0.21 mmol) wurde in trockenem Pyridin (5 ml) gelöst und zur Trockene eingengt. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, wobei die Apparatur jedes Mal mit Argon belüftet wurde. Parallel wurde eine wässrige Lösung von 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-galactopyranosyl-1-phosphat Diammoniumsalz (175 mg; 0.523 mmol) langsam über eine Ionentauschersäule (DOWEX W 50, H^+ -Form) gegeben. Das Eluat wurde mit Pyridin alkalisch gemacht, auf etwa 1 ml eingengt und mit Tri-*n*-octylamin (0.25 ml) versetzt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und die Substanz dreimal mit trockenem Pyridin (3 ml) nachdestilliert. Der Rückstand wurde in trockenem Pyridin (3 ml) aufgenommen und mit dem zuvor getrockneten **31** unter Argon zusammengegeben. Nach 5 d Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt und einmal mit Toluol (5 ml) versetzt und vollständig eingengt. Der Rückstand wurde in Diethylether (5 ml) aufgenommen, mit Wasser (3 x 10 ml, dem ein Tropfen einer 1 M Triethylammoniumhydrogencarbonatlösung zugefügt wurde) extrahiert und die wässrige Phase anschließend lyophilisiert. Das Rohprodukt wurde in einer Lösung von Triethylamin (0.68 ml), Methanol (5 ml) und Wasser (2 ml) gelöst und über Nacht gerührt. Nach Gefriertrocknung wurde **36** durch Reversed-Phase-HPLC an einer RP 18 Säule isoliert und durch Ionentausch (DOWEX 50 WX2, Na^+ -Form) in das Natriumsalz überführt. Nach Gefriertrocknung wurde das Produkt als Di-Natriumsalz in Form eines weißen, pulverigen Feststoffs erhalten. Die analytischen Daten stimmten mit denen von **36** überein, das nach Variante a) erhalten wurde.

Ausbeute: 16 mg (7 %)

7.3 Enzymatische Umsetzungen

7.3.1 Aktivitätsbestimmung der $\beta(1,4)$ -Galactosyltransferase¹⁰⁰

Reagenzien:

1. Glycin-Puffer (125 mM): 938 mg Glycin wurden in Reinstwasser gelöst und mit wenigen Tropfen 2 N NaOH auf pH 8,4 eingestellt. Abschließend wurde mit Reinstwasser aufgefüllt.
2. Manganchlorid Lösung (50 mM): 49,5 mg Manganchlorid Tetrahydrat wurden in 5 ml Reinstwasser gelöst.
3. NADH Lösung (15 mM): 51 mg wurden in 5 ml Reinstwasser gelöst.
4. *N*-Acetyl-glucosamin Lösung (0,5 M): 553 mg *N*-Acetyl-glucosamin sind in 5 ml Reinstwasser gelöst worden.
5. UDP-Gal Lösung (10 mM): 6.1 mg UDP-Gal wurden in 1 ml Glycinpuffer gelöst.
6. Pyruvatkinase/Lactatdehydrogenase Lösung: 0.001 ml wurden der fertigen Lösung entnommen.
7. Phosphoenolpyruvat Lösung (32 mM): 6,6 mg sind in 1 ml Glycin Puffer gelöst worden.
8. $\beta(1,4)$ -Galactosyltransferase Lösung: unmittelbar vor dem Aktivitätstest wurde mit kaltem Glycinpuffer auf eine theoretische Aktivität von 0.05 U/ml verdünnt. Die tatsächliche Aktivität wurde dann mit folgendem Test bestimmt.

Pipettierschema:

Glycinpuffer	0.812 ml
NADH	0.017 ml
PEP	0.051 ml
UDP-Gal	0.020 ml
GlcNAc	0.040 ml
PK/LDH	0.010 ml
Gal-T	0.050 ml

Die Lösungen wurden in der angegebenen Reihenfolge in eine Quarzküvette pipettieren. Vor der Zugabe der $\beta(1,4)$ -Galactosyltransferase Lösung wurde eine konstante Absorption abgewartet. Aus der zeitlichen Abnahme der Extinktion bei 340 nm ließ sich mit Hilfe von

$$A = \frac{E \cdot V_t \cdot 1000}{t \cdot V_E \cdot \varepsilon \cdot d} [U/l]$$

die tatsächliche Aktivität der $\beta(1,4)$ -Galactosyltransferase berechnen. Hierbei ist:

E:	gemessene Extinktionsdifferenz
V_t :	Totalvolumen (1 ml)
t:	gemessene Zeitdifferenz (min)
V_E :	Volumen der $\beta 4$ GalT-Lösung
ε :	Molarer Extinktionskoeffizient von NADH ($\varepsilon_{340} = 340 \text{ l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
d:	Schichtdicke (1 cm)

Ermittelte tatsächliche Aktivität: 0.045 U/ml.

7.3.2 Bestimmung der enzymkinetischen Parameter der Donorsubstrate

Die Donorsubstrate (0.04 – 2 mmol) wurden mit N-Acetyl-glucosamin (5.5 mg; 0.024 mmol), $\beta(1,4)$ -Galactosyltransferase (0,45 U) und MnCl_2 (0.36 mg; 2.5 mmol) in Glycin-NaOH-Puffer (125 mM; pH 8.4) 30 min bei 37 °C inkubiert, anschließend 3 min auf 100 °C erhitzt, um das Enzym zu zerstören, und auf Raumtemperatur abgekühlt. Zu jeder Probe wurde β -Galactosidase (0.005 ml; 7.5 U) gegeben und die Lösungen 16 h bei 37 °C inkubiert. Nachdem im Anschluss 5 min bei 6000 Umdrehungen pro min zentrifugiert worden war, wurden zu 0.900 ml des abgenommenen Überstandes 0.050 ml NAD-Lösung hinzugefügt und die Extinktion bei 340 nm gegen Reinstwasser bestimmt. Es erfolgte die Zugabe von β -Galactose Dehydrogenase S (0.0025 ml) zu jeder Probe, sowie 50 min Inkubation bei Raumtemperatur. Im Anschluss daran wurde die Extinktion bei 340 nm gegen Reinstwasser gemessen.

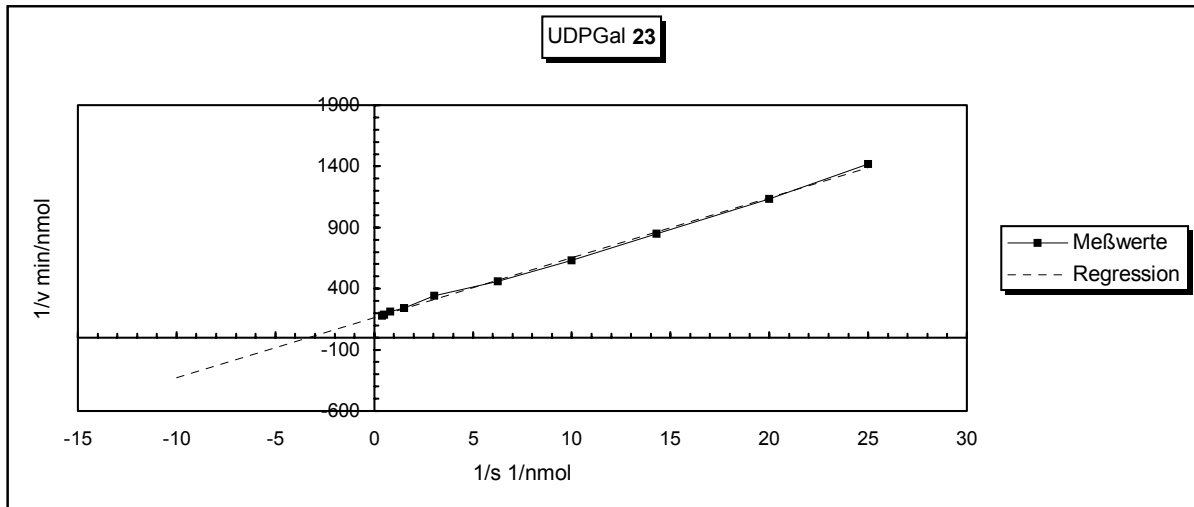
K_M Werte für UDP-Gal (24)

Pipettiertabelle

Nr	GlcNAc [ml]	UDP-Gal [ml]	MnCl ₂ [ml]	Gal-T [ml]	Puffer [ml]	E ₁	E ₂
Leer (1)	0.050	0.004	0.050	0	0.896	1.182	1.184
Leer (2)	0.050	0.005	0.050	0	0.895	1.191	1.193
Leer (3)	0.050	0.007	0.050	0	0.893	1.185	1.188
Leer (4)	0.050	0.016	0.050	0	0.884	1.181	1.187
Leer (5)	0.050	0.033	0.050	0	0.867	1.180	1.188
Leer (6)	0.050	0.066	0.050	0	0.834	1.185	1.194
Leer (7)	0.050	0.208	0.050	0	0.692	1.183	1.194
1	0.050	0.004	0.050	0.050	0.846	1.187	1.193
2	0.050	0.005	0.050	0.050	0.845	1.189	1.195
3	0.050	0.007	0.050	0.050	0.843	1.187	1.194
4	0.050	0.010	0.050	0.050	0.840	1.187	1.195
5	0.050	0.016	0.050	0.050	0.834	1.199	1.207
6	0.050	0.033	0.050	0.050	0.817	1.198	1.208
7	0.050	0.066	0.050	0.050	0.784	1.196	1.208
8	0.050	0.125	0.050	0.050	0.725	1.196	1.209
9	0.050	0.208	0.050	0.050	0.642	1.196	1.210
10	0.050	0.250	0.050	0.050	0.600	1.197	1.211

Messwerte

Nr	Konz. UDP-Gal [μmol/l]	Reaktionsgeschwindigkeit [nmol/min]
1	40	7.05 x 10 ⁻⁴
2	50	8.82 x 10 ⁻⁴
3	70	1.17 x 10 ⁻³
4	100	1.58 x 10 ⁻³
5	160	2.17 x 10 ⁻³
6	330	2.93 x 10 ⁻³
7	660	4.11 x 10 ⁻³
8	1250	4.70 x 10 ⁻³
9	2009	5.29 x 10 ⁻³
10	2500	5.58 x 10 ⁻³



K_M^{app} : 0.303 mmol

V_{max} : 5.8 $\mu\text{mol}/\text{min}$

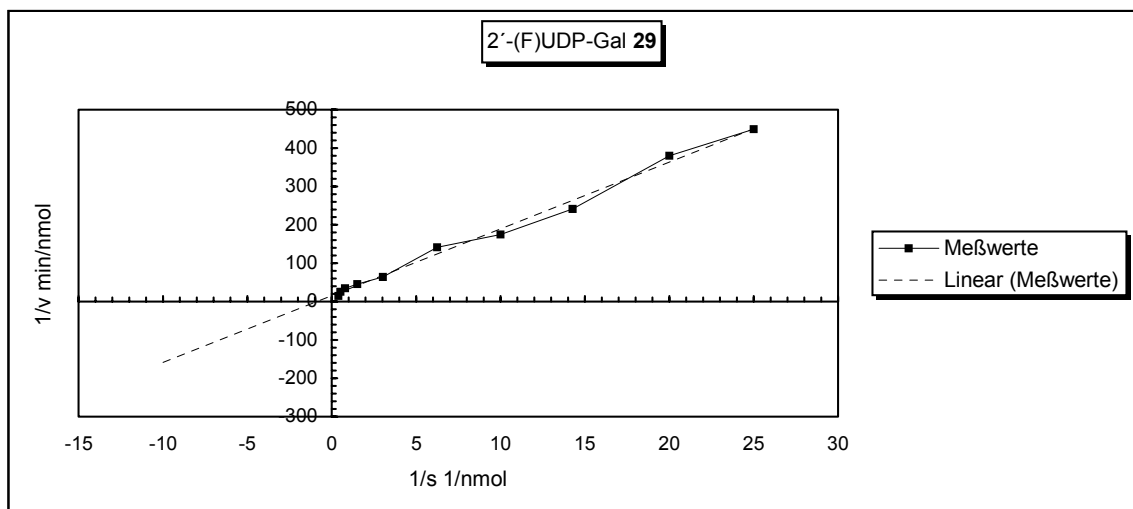
K_M Werte für 2'(F)UDP-Gal (34)

Pipettiertabelle

Nr	GlcNAc [ml]	2'(F)UDP -Gal [ml]	MnCl ₂ [ml]	Gal-T [ml]	Puffer [ml]	E ₁	E ₂
Leer (1)	0.050	0.004	0.050	0	0.896	1.190	1.193
Leer (2)	0.050	0.005	0.050	0	0.895	1.188	1.199
Leer (3)	0.050	0.007	0.050	0	0.893	1.191	1.194
Leer (4)	0.050	0.016	0.050	0	0.884	1.184	1.199
Leer (5)	0.050	0.033	0.050	0	0.867	1.190	1.193
Leer (6)	0.050	0.066	0.050	0	0.834	1.195	1.196
Leer (7)	0.050	0.208	0.050	0	0.692	1.190	1.192
1	0.050	0.004	0.050	0.050	0.846	1.192	1.205
2	0.050	0.005	0.050	0.050	0.845	1.192	1.206
3	0.050	0.007	0.050	0.050	0.843	1.191	1.207
4	0.050	0.010	0.050	0.050	0.840	1.188	1.206
5	0.050	0.016	0.050	0.050	0.834	1.179	1.199
6	0.050	0.033	0.050	0.050	0.817	1.180	1.203
7	0.050	0.066	0.050	0.050	0.784	1.179	1.200
8	0.050	0.125	0.050	0.050	0.725	1.188	1.202
9	0.050	0.208	0.050	0.050	0.642	1.196	1.206
10	0.050	0.250	0.050	0.050	0.600	1.193	1.203

Messwerte

Nr	Konz. 2'-(F)UDP-Gal [$\mu\text{mol/l}$]	Reaktionsgeschwindigkeit [nmol/min]
1	40	2.23×10^{-3}
2	50	2.63×10^{-3}
3	70	4.14×10^{-3}
4	100	5.71×10^{-3}
5	160	7.09×10^{-3}
6	330	1.56×10^{-2}
7	660	2.23×10^{-2}
8	1250	2.86×10^{-2}
9	2009	3.99×10^{-2}
10	2500	6.64×10^{-2}



K_M^{app} : 1.11 mmol

V_{max} : 52 $\mu\text{mol/min}$

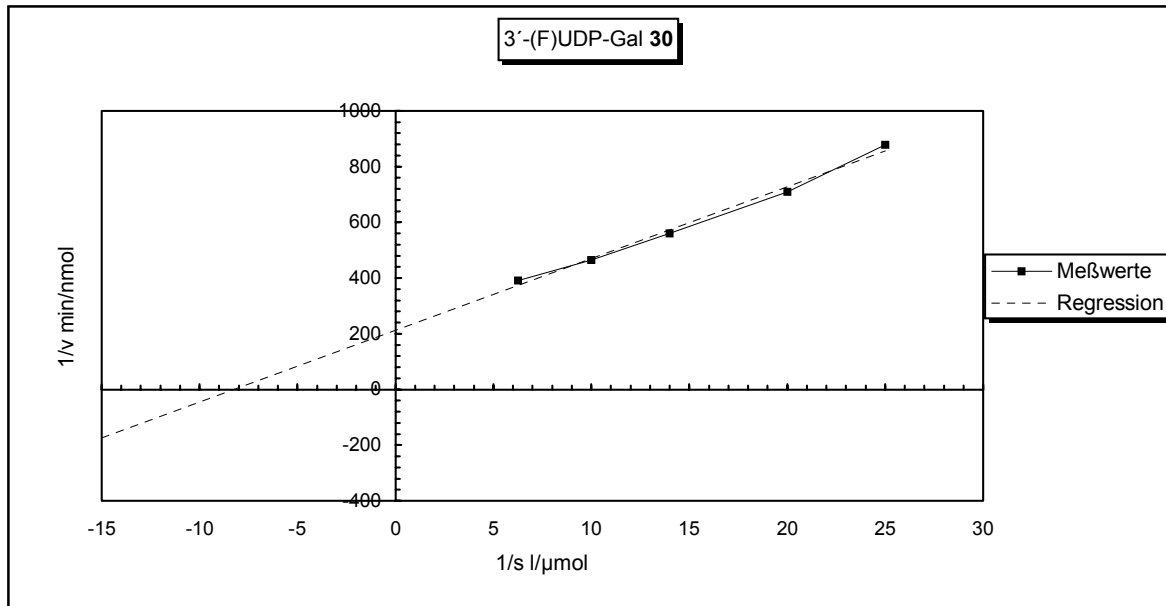
K_M Werte für 3´(F)UDP-Gal (36)

Pipettiertabelle

Nr	GlcNAc [ml]	3´(F)UDP -Gal [ml]	MnCl ₂ [ml]	Gal-T [ml]	Puffer [ml]	E ₁	E ₂
Leer (1)	0.050	0.004	0.050	0	0.896	1.191	1.193
Leer (2)	0.050	0.005	0.050	0	0.895	1.188	1.191
Leer (3)	0.050	0.007	0.050	0	0.893	1.184	1.192
Leer (4)	0.050	0.016	0.050	0	0.884	1.193	1.195
Leer (5)	0.050	0.033	0.050	0	0.867	1.188	1.191
Leer (6)	0.050	0.066	0.050	0	0.834	1.191	1.195
Leer (7)	0.050	0.208	0.050	0	0.692	1.190	1.193
1	0.050	0.004	0.050	0.050	0.846	1.192	1.199
2	0.050	0.005	0.050	0.050	0.845	1.193	1.202
3	0.050	0.007	0.050	0.050	0.843	1.189	1.199
4	0.050	0.010	0.050	0.050	0.840	1.204	1.215
5	0.050	0.016	0.050	0.050	0.834	1.189	1.202
6	0.050	0.033	0.050	0.050	0.817	1.189	1.196
7	0.050	0.066	0.050	0.050	0.784	1.188	1.197
8	0.050	0.125	0.050	0.050	0.725	1.192	1.198
9	0.050	0.208	0.050	0.050	0.642	1.178	1.194
10	0.050	0.250	0.050	0.050	0.600	1.202	1.208

Messwerte

Nr	Konz. 3´(F)UDP-Gal [µmol/l]	Reaktionsgeschwindigkeit [nmol/min]
1	40	2.64 x 10 ⁻³
2	50	3.23 x 10 ⁻³
3	70	3.82 x 10 ⁻³
4	100	4.87 x 10 ⁻³
5	160	6.08 x 10 ⁻³
6	330	5.92 x 10 ⁻³
7	660	5.01 x 10 ⁻³
8	1250	4.17 x 10 ⁻³
9	2009	3.32 x 10 ⁻³
10	2500	2.56 x 10 ⁻³



K_M^{app} : 0.125 mmol

V_{max} : 4.7 μmol/min

7.3.3 Inhibitortest der Donorsubstrate

Das natürliche Substrat UDP-Gal (**24**; 0.147 mg; 303 μmol) wurde mit dem modifizierten Donorsubstrat (x μmol) entsprechend dem oben beschriebenen Test umgesetzt.

(A) = UDP-Gal (**24**; 303 μmol); (B) = 2'(F)UDP-Gal (**34**; 1.1 mmol); (C) = 3'(F)UDP-Gal (**36**; 125 μmol)

Messwerte

Nr	E ₁	E ₂	ΔE	$\Delta E - \Delta E_{(\text{Leer})}$	v ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
Leer(1), A	1.213	1.224	0.011	-	-
Leer(2), B	1.212	1.223	0.011	-	-
Leer(3), C	1.223	1.225	0.002	-	-
1,A	0.197	1.594	1.397	1.386	0.815
2,B	1.210	1.277	0.067	0.056	0.033
3,C	1.231	1.395	0.164	0.162	0.095

Die Reaktionsgeschwindigkeit von UDP-Gal (**24**) betrug 0.815 $\mu\text{mol}/\text{min}$.

8. Literaturverzeichnis

- [1] a) H. Lis und N. Sharon, *Eur. J. Biochem.* **1993**, *218*, 1-27;
b) P. Sears und C.H. Wong, *Cell. Mol. Life Sci.* **1998**, *54*, 223-252;
c) N. O. L. Seto und S. V. Evans, *Curr. Org. Chem.* **2000**, *4*, 411-427;
d) R. C. Hughes, *Glycoconjugate J.* **2000**, *17*, 567-575 ;
e) T. Muramatsu, *Glycoconjugate J.* **2000**, *17*, 577-595.
- [2] a) M. L. Phillips, E. Nudelman, F. C. A. Gaeta, M. Perez, A. K. Singhal, S.-J- Hakomori und J. C. Paulsen, *Science* **1990**, *250*, 1130-1132;
b) G. Waltz, A. Arufo, W. Kalanus, M. Bevilacqua und B. Seed, *Science* **1990**, *250*, 1132-1135;
c) E. E. Simanek, G. J. McGarvey, J. A. Jablonowski und C.-H. Wong, *Rev. Chem.* **1998**, *98*, 833-862.
- [3] a) L. C. Lopez, E. M. Bayna, D. Litoff, N. L. Shaper, und B. D. Shur, *J. Cell Biol.* **1985**, *101*, 1501-1510;
b) B. D. Shur, S. Evans und Q. Lu, *Glycoconjugate J.* **1998**, *15*, 537-548.
- [4] D. J. Eckstein und B. D. Shur, *J. Cell Biol.* **1989**, *108*, 2507-2517.
- [5] M. Mathai, S.-K. Choi und G. M. Whitesides, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2908-2953.
- [6] K. G. I. Nilson, *Trends Biotechnol.* **1988**, *6*, 256-264.
- [7] L. F. Leloir, *Science* **1971**, *172*, 1299-1303.
- [8] a) R. Kornfeld und S.Kornfeld, *Annu. Rev. Biochem.* **1985**, *54*, 631-639;
b) C.-H. Wong, R. L. Halcomb, Y. Ichikawa und T. Kajimoto, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 453-474; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 412-433;
c) C.-H. Wong, R. L. Halcomb, Y. Ichikawa und T. Kajimoto, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 569-593; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 521-545.
- [9] J. C. Paulson und K. J. Colley, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 17615-17619.
- [10] M. L. Sinnott, *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 1171-1202.
- [11] a) K. Nakazawa, T. Ando, T. Kimura und H. Narimatsu, *J. Biochem.* **1988**, *104*, 165-168;
b) D. Aoki, H. E. Appert, D. Johnson, S. S. Wong und M. N. Fukuda, *EMBO J.* **1990**, *9*, 3171-3178;
c) N. O. L. Seto, M. M. Palic, C. A. Compston, H. Li, D. R. Bundle und S. A. Narang, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 14133-14138.
- [12] T. Maga, M. Mizuno, S. Tanaka, F. Yoshinaga, Y. Mikami, Y. Kihara, T. Kiso, J. Tomada, J. Okada und T. Tsuji, *Digestion* **1997**, *4*, 389-395.

- [13] D. Lenoir, S. Gréco, P. Louisot und M.-C. Biol, *Metabolism* **2000**, *49*, 526-531.
- [14] a) A. Kobata, *Pigment Cell Res.* **1989**, *2*, 304-308;
b) P. J. Delves, *Autoimmunity* **1998**, *27*, 239-253;
c) Y. Udagawa, D. Akoi, K. Ito, T. Uejima, M. Uemura und S. Nozawa, *Eur. J. Cancer* **1998**, *34*, 489-495;
d) K. Kubushiro, J. Ma, T. Fukuchi, K. Banno, Y. Muramatsu, K. Tsukasaki und S. Nozawa, *Gynecol. Obstet. Invest.* **1999**, *48*, 211-214.
- [15] a) B. R. Parekh, R. A. Dwek und T. W. Rademacher, *Br. J. Rheumatol.* **1988**, *27*, 162-169;
b) P. A. Jeddi, K. B. Bodman-Smith, T. Lund, P. M. Lydyard, L. Mengle-Gaw, D. A. Isenberg, P. Youinou und P. J. Delves, *Immunology* **1996**, *86*, 654-659.
- [16] T. Hennet, *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, *59*, 1081-1095.
- [17] a) N. L. Shaper, J. H. Shaper, J. L. Meuth, J. L. Fox, H. Chang, I. R. Kirsch und G. F. Hollis, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **1986**, *83*, 1573-1577;
b) H. Narimatsu, S. Sinha, K. Brew, H. Okayama und P. K. Qasba, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **1986**, *83*, 4720-4024;
c) M. Malissard, S. Zeng und E. G. Berger, *Glycoconjugate J.* **1999**, *16*, 125-139.
- [18] a) R. L. Hill und K. Brew, *Adv. Enzymol.* **1975**, *43*, 411-490;
b) U. Gambert und J. Thiem, *Topics Curr. Chem.* **1997**, *186*, 21-43.
- [19] T. A. Beyer, J.-E. Sadler, J. I. Rearick, J. C. Paulson und L. Hill, *Adv. Enzymol.* **1981**, *52*, 24-162.
- [20] Y. Ichikawa, R. Wang und C.-H. Wong, *Methods Enzymol.* **1994**, *247*, 107-127.
- [21] C.-H. Wong, S. L. Haynie und G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 5416-5418.
- [22] a) J. Thiem und W. Treder, *Angew. Chem.*, **1996**, *98*, 1100-1101;
b) C. Augé, S. David, C. Mathieu und C. Gautheron, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 1467-1470;
c) C. Augé, C. Mathieu und C. Mérienne, *Carbohydr. Res.* **1986**, *151*, 147-156;
d) Y. Ichikawa, J. C. Paulson und C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9283-9298;
e) C.-H. Wong, R. Wang und Y. Ichikawa, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 4343-4344;
f) T. Bülter und L. Elling, *Glycoconjugate J.* **1999**, *16*, 147-159;
g) Z. Liu, J. Zhang, X. Chen und P. G. Wang, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 348-355.
- [23] C. Unverzagt, H. Kunz und J. C. Paulson, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9308-9309.
- [24] a) U. Zehavi und A. Patchornik, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 5673-5674;

- b) U. Zehavi, S. Sadeh und M. Herchman, *Carbohydr. Res.* **1986**, *151*, 371-378.
- [25] K. R. Love und P. H. Seeberger, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3733-3736.
- [26] a) L. Bülow, *Eur. J. Biochem.* **1987**, *163*, 443-448;
b) L. Bülow und K. Mosbach, *Trends Biotechnol.* **1991**, *9*, 226-231.
- [27] S. Nishiguchi, K. Yamada, Y. Fuji, S. Shibatani, A. Toda und S.-I. Nishimura, *Chem. Commun.* **2001**, 1944-1945.
- [28] a) E. G. Berger, T. Mandel und U. Schilt, *J. Histochem. Cytochem.* **1981**, *29*, 364-370;
b) J. Roth und E. Berger, *J. Cell. Biol.* **1982**, *93*, 223-229.
- [29] a) G. J. Strous, *CRC Crit. Rev. Biochem.* **1986**, *21*, 119-151;
b) K. J. Colley, E. U. Lee, B. Adler, J. K. Browne und J. C. Paulson, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 17619-17622.
- [30] K. A. Masri, H. E. Appert und M. N. Fukuda, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *157*, 657-663.
- [31] H. E. Appert, T. J. Rutherford, G. E. Tarr, N. R. Thomford und D. J. McCorquodale, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1986**, *138*, 224-229.
- [32] N. L. Gastinel, *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, **2001**, *13*, 131-145.
- [33] a) L. N. Gastinel, C. Cambillau und Y. Bourne, *EMBO J.* **1999**, *18*, 3546-3557;
b) B. Ramakrishnan, P. S. Shah und P. K. Qasba, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 37665-37671;
c) B. Ramakrishnan, P. V. Balaji und P. K. Qasba, *J. Mol. Biol.* **2002**, *318*, 491-502.
- [34] B. Ramakrishnan und P. K. Qasba, *J. Mol. Biol.* **2001**, *310*, 205-218.
- [35] Y. Hatanaka, M. Ishiguro, M. Hashimoto, L. N. Gastinel und K. Nakagomi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 411-413.
- [36] T. Biet und T. Peters, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 4320-4323.
- [37] E. E. Boeggeman, P. V. Balaji und P. K. Qasba, *Glycoconjugate J.* **1995**, *12*, 865-878.
- [38] a) J. T. Powell und K. Brew, *J. Biol. Chem.* **1976**, *251*, 3645-3652;
b) E. T. O'Keeffe, R. L. Hill und J. E. Bell, *Biochemistry* **1980**, *19*, 4954-4962.
- [39] J. S. Gulbinsky und W. W. Cleland, *Biochemistry* **1968**, *7*, 566-575.
- [40] A. J. Kirby, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 771-790.
- [41] R. Öhrlein, B. Ernst und E. G. Berger, *Carbohydr. Res.* **1992**, *236*, 335-338.
- [42] L. J. Berliner, M. E. Davies, K. E. Ebener, T. A. Beyer und J. E. Bell, *Mol. Cell. Biochem.* **1984**, *62*, 37-42.
- [43] G. Baisch, R. Öhrlein und B. Ernst, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 749-754.

- [44] a) Y. Nishida, T. Wiemann und J. Thiem, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 8043-8046;
b) Y. Nishida, T. Wiemann und J. Thiem, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 2905-2906;
c) Y. Nishida, T. Wiemann, V. Sinnwell und J. Thiem, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 2536-2537.
- [45] L. Elling, A. Zervosen, R. G. Gallego, V. Nieder, M. Malissard, E. G. Berger, J. F. G. Vliegthard und J. P. Kamerling, *Glycoconjugate J.* **1999**, *16*, 327-336.
- [46] Y. Kajihara, H. Hashimoto und H. Kodama, *Carbohydr. Res.* **1992**, *229*, C5-C9.
- [47] a) Y. Kajihara, H. Kodama, T. Endo und H. Hashimoto, *Carbohydr. Res.* **1998**, *306*, 361-378;
b) Y. Nishida, H. Tamakoshi, K. Kobayashi und J. Thiem, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1-3.
- [48] G. Srivastava, O. Hindsgaul und M. M. Palic, *Carbohydr. Res.* **1993**, *245*, 137-144.
- [49] M. M. Palic und O. Hindsgaul, *Glycobiology* **1991**, *1*, 205-209.
- [50] L. J. Berliner R. D. Robinson, *Biochemistry* **1982**, *21*, 6340-6343.
- [51] C.-H. Wong, R. Wang und Y. Ichikawa, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 4343-4344.
- [52] O. Hindsgaul, K. J. Kaur, U. B. Gokhale, G. Srivastava, und M. M. Palic, *ACS Symp. Ser.* **1991**, *466*, 38-50.
- [53] a) H. Kodama, Y. Kajihara, T. Endo und H. Hashimoto, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 6419-6422;
b) Y. Kajihara, T. Endo, H. Ogasawara, H. Kodama und H. Hashimoto, *Carbohydr. Res.* **1995**, *269*, 273-294.
- [54] H. Yuasa, M. M. Palic und O. Hindsgaul, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 5891-5892.
- [55] H. Yuasa, M. M. Palic und O. Hindsgaul, *Can. J. Chem.* **1995**, *73*, 2190-2195.
- [56] H. Babad und W. Z. Hassid, *J. Biol. Chem.* **1966**, *214*, 2672-2678.
- [57] P. Vagedes, Diplomarbeit, Oldenburg, **1997**.
- [58] S. Hüsken, Dissertation, Oldenburg, **2001**.
- [59] a) M. M. Vaghefi, R. J. Bernacki, W. J. Hennen und R. K. Robins, *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 1391-1399;
b) M. M. Vaghefi, R. J. Bernacki, N. K. Dalley, B. E. Wilson und R. K. Robins, *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 1383-1391.
- [60] a) R. Wang, D. H. Steensma, Y. Takaoka, J. W. Jun, T. Kajimoto und C.-H. Wong, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 661-672;
b) S. Takajama, S. C. Chung, Y. Igarashi, Y. Ichikawa, A. Sepp, R. I. Lechler, J. Wu, T. Hayashi, G. Siuzdak und C.-H. Wong, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 401-409.
- [61] A. Schäfer und J. Thiem, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 24-29.

- [62] L. M. Sinnott in I. M. Page und A. Williams (Hersg.), *Enzyme Mechanisms*, The Royal Society of Chemistry, London **1987**, 259-297.
- [63] R. R. Schmidt und K. Frische, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 1747-1750.
- [64] a) D. O'Hagan und H. S. Rzepa, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1997**, 645-652;
b) A. Mele, B. Vergani, F. Viani, S. V. Meille, A. Farina und P. Bravo, *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 187-196.
- [65] D. E. Bergstrom und D. J. Swartling in J. F. Liebman, A. Greenberg und W.R. Dolbier (Hersg.), *Fluorine-Containing Molecules*, VCH Weinheim **1995**, 259-308.
- [66] a) T. Hayashi, B. W. Murray, R. Wang und C.-H. Wong, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 497-500;
b) S. Takayama, S. J. Chung, Y. Igarashi, Y. Ichikawa, A. Sepp, R. I. Lechler, J. Wu, T. Hayashi, G. Siuzdak und C.-H. Wong, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 401-409;
c) M. Burkart, S. P. Vincent, A. Düffels, B. W. Murray, S. V. Ley und C.-H. Wong, *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1937-1946.
- [67] a) H. Kodama, Y. Kajihara, T. Endo und H. Hashimoto, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 6419-6422;
b) C.-L. Schengrund und P. Kovác, *Carbohydr. Res.* **1999**, *319*, 24-28.
- [68] a) H. Mitsuya, K. J. Weinhold, P. A. Furman, M. H. St. Clair, S. Nusinoff-Lehrman, R. C. Gallo, D. Bolognesi, D. W. Barry und S. Border, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1985**, *82*, 7096-7100;
b) M. A. Fischl, D. D. Richman, M. H. Grieco, M. S. Gottlieb, P. A. Volberding, O. L. Laskin, J. M. Leedom, J. E. Groopman, D. Mildvan, R. T. Schooley, G. G. Jackson, D. T. Durack und D. King, *N. Engl. J. Med.* **1987**, *317*, 185-191.
- [69] T. Mavromoustakos, T. Calgeropoulou, M. Koufaki, A. Kolocouris, I. Daliani, C. Demetzos, Z. Meng, A. Makriyannis, J. Balzarini und E. De Clercq, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1702-1709.
- [70] a) P. V. Danenberg, *Biochim. Biophys. Acta* **1977**, *473*, 73-92;
b) T. Haertle, F. Wohlrab und W. Gushlbauer, *Eur. J. Biochem.* **1979**, *102*, 223-230.
- [71] K. Biggadike, A. D. Borthwick, D. Evans, A. M. Exall, B. E. Kith, S. M. Roberts, L. Stephenson, P. Youds, A. M. Z. Slawin und D. J. Williams, *J. Chem. Soc. Commun.* **1987**, 251-256.
- [72] a) P. Herdewijn, J. Balzarini, M. Baba, R. Pauwels, A. Van Aerschot, G. Janssen und E. De Clercq, *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 2040-2048;

- b) E. Matthes, C. Lehmann, D. Scholz, H. A. Rosenthal und P. Langen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1988**, *153*, 825-831.
- [73] a) M. S. Chen, J. Walker und W. H. Prusoff, *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 747-753;
b) M. A. Ator, J. Stubbe und T. Spector, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 3595-3599;
c) G. Harris, G. W. Ashley, M. J. Robins, R. L. Tolman und J. Stubbe, *Biochemistry* **1987**, *26*, 1895-1902.
- [74] I. A. Mikhailopulo, N. E. Poopeiko, T. I. Pricota, G. G. Sivets, E. I. Kvasyuk, J. Balzarini und E. De Clercq, *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 2195-2202.
- [75] G. Kowollik und P. Langen, *Z. Chem.* **1975**, *15*, 147-151.
- [76] H. K. Misra, W. P. Gati, E. E. Knaus, L. I. Wiebe, *J. Heterocyclic Chem.* **1984**, *21*, 773-775.
- [77] a) A. Van Aerschot und P. Herdewijn, *Bull. Soc. Chim. Belg.* **1989**, *98*, 937-941;
b) Y. Sato, K. Utsumi, T. Maruyama, T. Kimura, I. Yamamoto und D. D. Richman, *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, *42*, 595-598.
- [78] J. F. Codington, I. Doerr, D. Praag, A. Bendich und J. J. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 5030-5031.
- [79] M. D. Brown, A. K. Todd und S. Varadarajan, *J. Chem. Soc.* **1956**, 2388-2393.
- [80] A. Miah, C. B. Reese, Q. Song, Z. Sturdy, S. Neidle, I. J. Simpson, M. Read und E. Rayner, *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1* **1998**, 3277-3283.
- [81] a) F. Moris und V. Gotor, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 10089-10098;
b) Z. Veres, A. Neszmélyi, A. Szabolcs und G. Dénes, *Eur. J. Biochem.* **1988**, *178*, 173-181.
- [82] G. A. Olah, J. T. Welch, Y. D. Vankar, M. Nojima, I. Kerekes und J. A. Olah, *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 3872-3881.
- [83] a) A. M. Kawasaki, M. D. Casper, S. M. Freier, E. A. Lesnik, M. C. Zounes, L. L. Cummins, C. Gonzalez und P. Dan Cook, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 831-841;
b) V. Wittmann, schriftliche Mitteilung.
- [84] G. Kowollik, K. Gaertner und P. Langen, *J. Carbohydr. Nucl. Nucl.* **1975**, *2*, 191-195.
- [85] N. C. Yung und J. J. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 3060-3066.
- [86] a) J. J. Fox und N. C. Miller, *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 936-941;
b) G. Kowollik und P. Langen, *Chem. Ber.* **1968**, *101*, 235-239;
c) J. P. H. Verheyden und J. G. Moffatt, *J. Org. Chem.* **1970**, *35*, 2868-2877;
d) K. W. Pankiewicz und K. A. Watanabe, *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, *35*, 4498-4502.

- [87] K. Agyei-Aye, S. Yan, A. K. Hebbler und D. C. Baker, *Nucleosides and Nucleotides* **1989**, *8*, 327-337.
- [88] H. Hayakawa, F. Takai, H. Tanaka, T. Miyasaka und K. Yamaguchi, *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, *38*, 1136-1139.
- [89] F. C. Hartman und R. Barker, *Biochemistry* **1965**, *4*, 1068-1075.
- [90] J. H. Van Boom, R. Crea, W. C. Luyten und A. B. Vink, *Tetrahedron Lett.* **1975**, *32*, 2779-2782.
- [91] T. Posternak, *Meth. Enzymol.* **1957**, *3*, 129-137.
- [92] H. C. Pontis und H. G. Fletcher, *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 1262-1265.
- [93] M. M. Vigdorichik, M. N. Preobrazhenskaya und N. N. Suvorov, *Tetrahedron Lett.* **1968**, *44*, 4645-4648.
- [94] M. Arlt und O. Hindsgaul, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 14-15.
- [95] M. Yoshikawa, T. Kato und T. Takenishi, *Tetrahedron Lett.* **1967**, *50*, 5065-5068.
- [96] T. Sowa und S. Ouchi, *Bull. Chem. Soc. Jap.*, **1975**, *48*, 2084-2090.
- [97] J. F. Codington, I. L. Doerr, J. J. Fox, *J. Org. Chem.* **1963**, *29*, 558-564.
- [98] U. Korf und J. Thiem, *Synlett* **1991**, 313-314.
- [99] T. Bülter, C. Wandrey und L. Elling, *Carbohydr. Res.* **305**, **1997**, 469-473.
- [100] T. Wiemann, Dissertation, Hamburg **1992**.
- [101] J. G. Moffatt und H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 3756-3761.
- [102] J. G. Moffatt und H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 649-658.
- [103] U. B. Gokhale, O. Hindsgaul und M. M. Palcic, *Can. J. Chem.* **1990**, *68*, 1063-1071.
- [104] a) S. M. H. Christie, D. T. Elmore, G. W. Kenner. A. R. Todd und F. J. Weymouth, *J. Chem. Soc.* **1953**, 2947-2953;
b) H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 3517-3522.
- [105] D. E. Hoard und D. G. Ott, *J. Am. Chem. Soc.* **87**, **1965**, 1785-1788.
- [106] Y. Zhao und J. S. Thorson, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 7568-7572.
- [107] K. Bock und B. W. Sigurshjold, *Eur. J. Biochem.* **1989**, *178*, 711-720.
- [108] K. Bock und K. Adelhorst, *Carbohydr. Res.* **1990**, *202*, 131-149.
- [109] R. G. Duggleby, *Methods in Enzymology* **1995**, *249*, 61-90.
- [110] U. Brodbeck und K. E. Ebner, *J. Biol. Chem.* **1966**, *241*, 762-765.
- [111] M. M. Palcic, L. D. Heerze, M. Pierce und O. Hindsgaul, *Glycoconjugate* **1988**, *5*, 49-63.
- [112] K. Wallenfels und G. Kurz, *Biochemische Zeitschrift* **1962**, *335*, 559-572.
- [113] J. F. Morrison und K. E. Ebner, *J. Biol. Chem.* **1971**, *246*, 3977-3984.

- [114] G. Michal (Hrsg.), *Biochemical Pathways*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg **1999**.
- [115] W. Guschlbauer und K. Jankowski, *Nucleic Acids Res.* **1980**, *8*, 1421-1433.
- [116] A. Joecks, H. Koppel, K. D. Schleinitz und D. Cech, *J. prakt. Chem.* **1983**, *325*, 881-892.
- [117] A. Willecke, Dissertation, Oldenburg, **2002**.
- [118] B. Lesying, C. Marck und W. Guschlbauer, *Int. J. Quantum Chem.* **1985**, *28*, 517-523.
- [119] W. L. F. Amarego, D. D. Perrin *Purification of Laboratory Chemicals*, 4. Auflage, Butterworth-Heinemann, Oxford, **1996**.
- [120] N. C. Yung, J. J. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 3060-3066.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich diese Arbeit
Selbstständig verfaßt und keine anderen als
Die hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel
Benutzt habe.

Oldenburg, im März 2003

Lebenslauf

Jörg Dardemann, geboren am 27. April 1967 in Würselen Kreis Aachen

Schulbildung

1977-1987 Grundschule und Gymnasium in Aachen

Wehrdienst

1987-1988 Luftwaffe in Budel/NL und Geilenkirchen

Hochschulbildung

10/1988-08/1997 Studiengang Diplom Chemie, RWTH Aachen
seit 01/1998 Beginn der vorliegenden Dissertation an der Carl-von-Ossietzky
Universität in Oldenburg

Berufstätigkeit

09/1997-12/1997 Wissenschaftliche Hilfskraft, Institut für Biotechnologie RWTH
Aachen, Arbeitskreis Prof. Dr. Hartmeier

01/1998-09/1998 Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Universität Oldenburg

11/1998-11/2000 Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Universität Oldenburg

Oldenburg, März 2003