

Abschlussbericht

"Enzymatische Synthese fluoreszierender Glycosphingolipide"

Stand der Forschung

Glycosphingolipide sind essentielle Bestandteile eukaryotischer Zellmembranen. Ihre hydrophile Kohlenhydrat-Kopfgruppe ragt dabei in den extrazellulären Raum, wohingegen ihr Lipidteil in der Membran verankert ist. Die sogenannte "Raft-Hypothese" schlägt vor, dass es Bereiche (Domänen, Cluster) gibt, in denen die Konzentration an Glycolipiden stark erhöht ist.^[1] Diese Membrandomänen werden u.a. durch Lipid-Lipid-Wechselwirkungen hervorgerufen, allerdings darf dabei auch der Einfluss der Kopfgruppe nicht unterschätzt werden.^[2] Solche Bereiche sind von großem Interesse für die Anreicherung gewisser Membranproteine sowie für Signal- und Transportprozesse durch die Membran. Daher ist die Visualisierung von Glycosphingolipiden in Modellmembranen wie auch biologischen Systemen von fundamentaler Bedeutung, um u.a. Transportprozesse und Domänenbildung innerhalb der Membran zu verstehen. In welcher Weise die einzelnen Parameter – z.B. die Art und Größe der hydrophilen Kopfgruppe (des Kohlenhydrat-Teils) und die Art und Länge des hydrophoben Teils (des Lipids) – diese Prozesse beeinflussen, ist immer noch weitgehend ungeklärt. In Abbildung 1 ist ein Glycosphingolipid mit seinen charakteristischen Bestandteilen schematisch dargestellt.^[3]

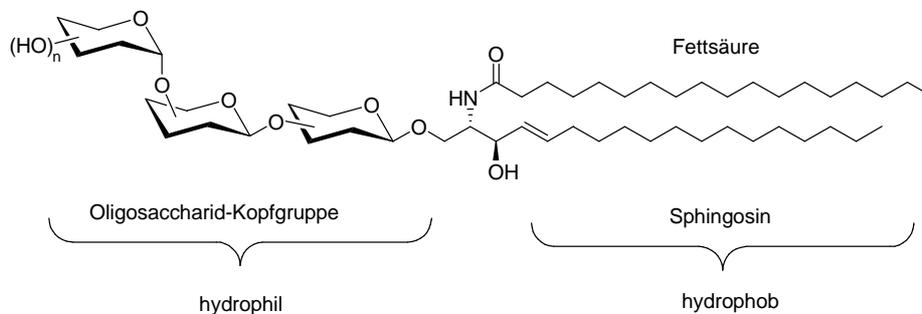


Abb. 1 Struktur eines Glycosphingolipids mit hydrophilem und hydrophobem Teil

Ein grundlegendes Problem bezüglich der Visualisierung von Glycosphingolipiden ist die Tatsache, dass in nativen Strukturen praktisch keine funktionellen Gruppen vorliegen, die im UV/VIS-Bereich des Spektrums absorbieren. Die Anbringung von Fluorophoren – üblicherweise große aromatische Systeme mit polaren Gruppen – verändert die Charakteristik der Glycosphingolipide stark. Artefakte in biophysikalischen bzw. biochemischen Messungen, die auf die unterschiedlichen sterischen und/oder elektronischen Eigenschaften dieser Gruppen zurückzuführen sind, lassen sich daher nicht ausschließen. Der Aufbau fluoreszierender Glycosphingolipide, die in ihrer Struktur den nativen Verbindungen äußerst ähnlich sind, ist daher äußerst reizvoll und zur Beantwortung für Fragen zur lateralen Organisation einer Membran von großer Bedeutung.

Fluoreszierende Fettsäuren als Substrate

Der Arbeitskreis Werz beschäftigt sich u.a. mit der Synthese komplexer Glycosphingolipide. In diesem Zusammenhang gelang es uns auch, eine Reihe von fluoreszierenden Fettsäuren herzustellen, die chemisch an Glycolipide angebracht wurden, indem eine Amid-Bindung aufgebaut wurde (z.B. **1a** und **1b**). Leider erwiesen sie sich als recht oxidationsanfällig und werden auch schnell unter basischen Bedingungen von Nucleophilen angegriffen. Deshalb haben wir auch Phenylpentaen-Fettsäuren des Typs **2** hergestellt (siehe Abb. 2), die nicht nur stabiler sind, sondern auch bessere Absorptionseigenschaften aufweisen (siehe Zwischenbericht).

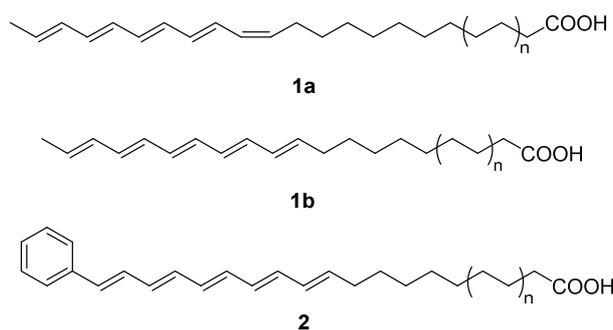


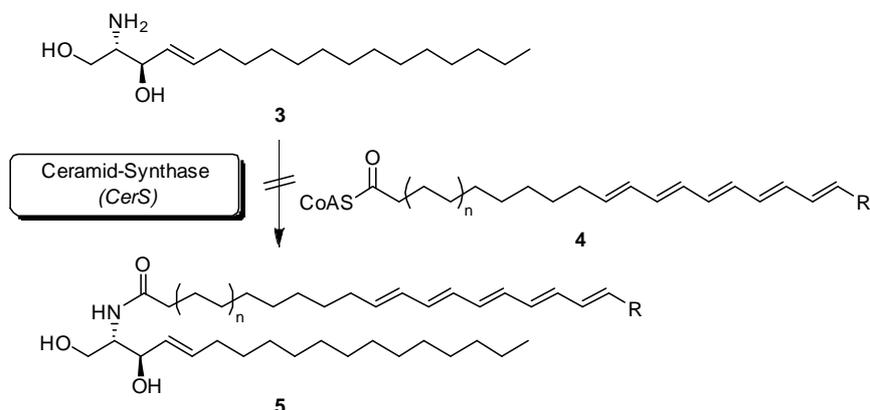
Abb. 2 Strukturen fluoreszierender Fettsäuren: Pentaen-Fettsäuren **1a** und **1b** sowie der Phenylpentaen-Fettsäuren des Typs **2**.

Enzymatische Studien und neuartige fluoreszierende Fettsäuren

Da die Fettsäuren **1** und **2** in der chemischen Synthese der Glycolipide leider erhebliche Probleme mit sich brachten, hatten wir große Hoffnungen in ein schonendes enzymatisches Verfahren gesetzt. Die chemischen Umsetzungen – vor allem beim Entschützen – hatten gezeigt, dass Nucleophile leicht angreifen sowie der Kontakt mit Sauerstoff langsam zur Zersetzung führt. Wir haben daher die Fettsäuren chemisch in eine aktivierte Form **4** überführt und in wässriger Lösung enzymatische Studien mit dem Enzym Ceramid-Synthase (*CerS*) durchgeführt (Schema 1). Ein möglicher Umsatz mit Sphingosin-Alkohol **3** zu Ceramid **5** wurde massenspektrometrisch mittels ESI-MS untersucht. Insgesamt wurden drei verschiedene Fettsäuren (jeweils mit $n = 2$) getestet. Allerdings konnte in keinem Experiment die gewünschte Masse des Ceramids festgestellt werden. Bei den beabsichtigten Umsetzungen scheint es zwei größere Probleme zu geben: Einerseits ist die Löslichkeit der aktivierten Fettsäure im wässrigen Medium stark begrenzt. Andererseits scheinen auch hier wieder die schon bei der chemischen Synthese zutage getretenen Probleme, die wahrscheinlich auf den leichten Angriff vieler Nucleophile zurückgehen, wieder aufzutreten. Da das Enzym eine ganze Reihe nucleophiler Stellen besitzt und auch die Anwesenheit von Sauerstoff nicht auszuschließen ist, ist davon auszugehen, dass es hier zu unerwünschten Nebenreaktionen kam, die uns dem anvisierten Ziel einer enzymatischen Synthese nicht näher kommen ließen.

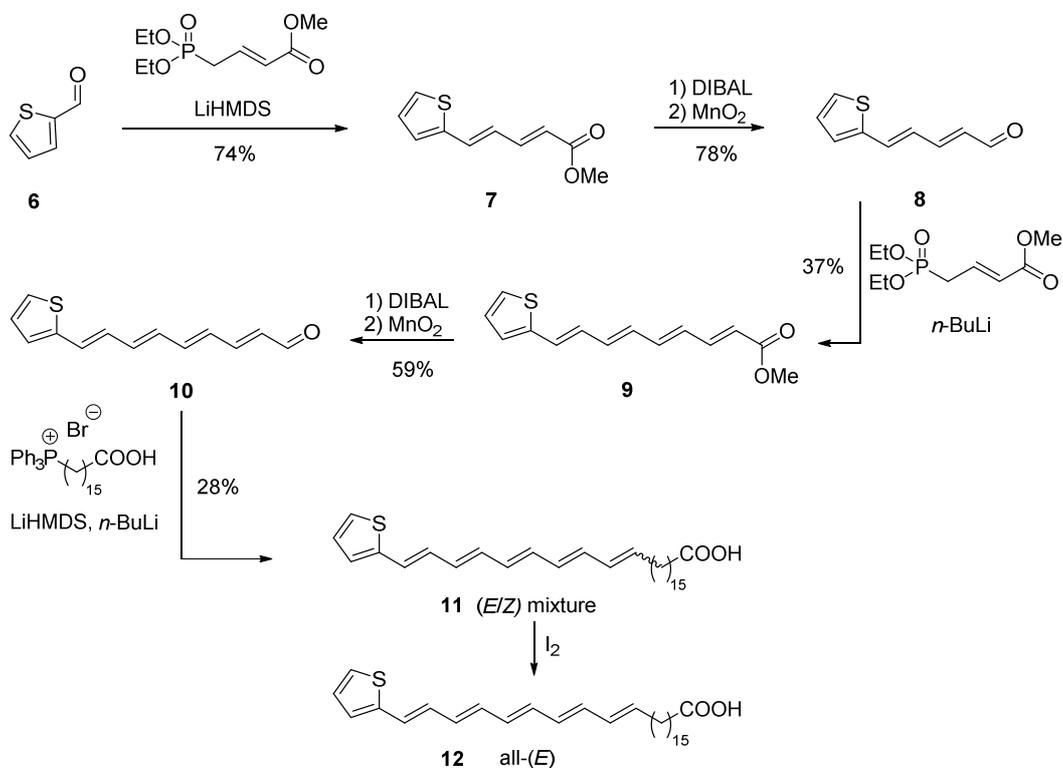
Aufgrund dieser Problematik wurde von der ursprünglich beabsichtigten, zweiten enzymatischen Reaktion, nämlich der Umsetzung eines UDP-Zuckers mit Ceramid-Galactosyltransferase und einem mit fluoreszierender Fettsäure versehenem Ceramid abgesehen und stattdessen vermehrt Augenmerk gelegt auf die chemische Synthese weiterer

fluoreszierender Fettsäuren, die chemisch an den Glycan-Part des Glycolipids angebracht werden. Von diesen ist bereits die Herstellung einer weiteren - auf Thiophen basierenden - fluoreszierenden Fettsäure abgeschlossen.



Schema 1 Versuchte enzymatische Ceramid-Synthese mit fluoreszierenden Fettsäuren vom Typ 4.

Ausgehend von kommerziell erhältlichem Thienylaldehyd **6** gelang uns mit Hilfe einer HWE-Reaktion die erste Kettenverlängerung zum Ester **7** (Schema 2). Eine Reduktions-Oxidations-Sequenz ergab den Aldehyd **8**, der in analoger Weise wiederum zum Ester **9** verlängert werden konnte. Eine Repetition der Sequenz lieferte das Thienylnonatetraenal **10**. Der gesättigte Part der Fettsäure wurde über eine abschließende Wittig-Reaktion eingeführt, die fast ausschließlich die (*Z*)-konfigurierte Doppelbindung liefert. Allerdings lässt sich die all-(*E*)-Verbindung einfach mit Hilfe katalytischer Mengen von Iod erhalten, die das Olefin-System zur Isomerisierung bringen.



Schema 2 Chemische Synthese der auf Thiophen-basierenden fluoreszierenden Fettsäure **12**.

Die Absorptions- und Emissionsspektren der Fettsäure **12** sind ähnlich denen der Phenylpentaenfettsäure, allerdings leicht zu höheren Wellenlängen verschoben, was für die Untersuchungen innerhalb einer Membran (mit entsprechender Laseranregung) förderlich ist. Die Stabilität scheint – verglichen mit Pentaen- und Phenylpentaenfettsäuren – etwas höher zu sein. Diese Fettsäure soll daher auch chemisch an entsprechende Glycane angebracht werden, um so geeignete Verbindungen bereitzustellen, das Phasenverhalten innerhalb einer Membran zu untersuchen.

In Bälde ist eine Publikation geplant, in der die Synthese einer Reihe von fluoreszierenden Fettsäuren (z.B. **12**), die auch im Rahmen dieses Projektes synthetisiert wurden, vorgestellt werden. Selbstverständlich wird der DECHEMA dabei für die Unterstützung gedankt werden.

Literatur:

- [1] K. Simons, K. E. Ikonen, *Nature* **1997**, 387, 569-572.
- [2] S. Sonnino, A. Prinetti, L. Mauri, V. Chigorno, G. Tettamanti, *Chem. Rev.* **2006**, 106, 2111-2125.
- [3] T. Wennekes, R. J. B. H. N. van den Berg, R. G. Boot, G. A. van der Marel, H. S. Overkleeft, J. M. F. G. Aerts, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 8848-8869.

Braunschweig, den 09.04.2014

