

**UNIVERSITÄT
BAYREUTH**

**Chemoenzymatische Synthese unsymmetrischer
N-Glycanazide**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. Nat.)

der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften

der Universität Bayreuth

vorgelegt von

Carolina Fiona Spies

aus Bayreuth

Bayreuth 2023

Für Isabel

Teile der Dissertation wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

A. Cabanettes, L. Perkams, C. Spies, C. Unverzagt, A. Varrot, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 10178–10181.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2016 bis Februar 2023 in Bayreuth am Lehrstuhl Bioorganische Chemie unter der Betreuung von Prof. Dr. Carlo Unverzagt angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Art der Dissertation: Monographie

Dissertation eingereicht am: 16.02.2023

Zulassung durch die Promotionskommission: 08.03.2023

Wissenschaftliches Kolloquium: 14.11.2023

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Cyrus Samimi

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Carlo Unverzagt	(Gutachter)
Prof. Dr. Frank Hahn	(Gutachter)
Prof. Dr. Matthias Ullmann	(Vorsitz)
Prof. Dr. Andreas Greiner	

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einführung.....	1
1.1. <i>N</i> -Glycane: Aufbau und Bedeutung	1
1.2. Ansätze zur Synthese unsymmetrischer <i>N</i> -Glycane	2
2. Themenstellung.....	9
3. Synthese symmetrischer <i>N</i> -Glycane	10
3.1. Synthese symmetrischer <i>core</i> -fucosylierter <i>N</i> -Glycane.....	10
3.2. Synthese β -1,3-galactosylierter <i>N</i> -Glycane	17
4. Synthese unsymmetrischer <i>N</i> -Glycane	20
4.1. Synthese monogalactosylierter <i>N</i> -Glycane durch Degalactosylierung	20
4.2. Synthese monoglucosylierter <i>N</i> -Glycane.....	23
4.3. Synthese monosialylierter <i>N</i> -Glycane.....	26
4.4. Degalactosylierung monosialylierter <i>N</i> -Glycane	35
4.5. Synthese monogalactosylierter <i>N</i> -Glycane über Monosialylierung.....	39
5. Synthese unsymmetrischer <i>core</i> -fucosylierter <i>N</i> -Glycane.....	42
5.1. Synthese monosialylierter fucosylierter <i>N</i> -Glycane.....	42
5.2. Degalactosylierung monosialylierter fucosylierter <i>N</i> -Glycane.....	47
5.3. Synthese monogalactosylierter fucosylierter <i>N</i> -Glycane	51
6. Synthese unsymmetrischer triantennärer <i>N</i> -Glycane	54
6.1. Einführung einer dritten Antenne.....	55
6.2. Synthese monosialylierter triantennärer <i>N</i> -Glycane	67
7. Zusammenfassung.....	70
8. Summary	72
9. Experimenteller Teil.....	74
9.1. Allgemeine Arbeitstechniken und Methoden.....	74
9.2. Verwendete Enzyme	75

9.3.	Versuche zu Kapitel 3.1.....	77
9.4.	Versuche zu Kapitel 3.2.....	81
9.5.	Versuche zu Kapitel 4.1.....	82
9.6.	Versuche zu Kapitel 4.2.....	83
9.7.	Versuche zu Kapitel 4.3.....	84
9.8.	Versuche zu Kapitel 4.4.....	92
9.9.	Versuche zu Kapitel 4.5.....	97
9.10.	Versuche zu Kapitel 5.1.....	100
9.11.	Versuche zu Kapitel 5.2.....	107
9.12.	Versuche zu Kapitel 5.3.....	113
9.13.	Versuche zu Kapitel 6.1.....	116
9.14.	Versuche zu Kapitel 6.2.....	126
10.	Literatur.....	130
11.	Danksagung.....	135
Anhang		136

Abkürzungsverzeichnis

$[\alpha]_D^T$	spezifischer Drehwert bei 589 nm und Temperatur T
Ac	Acetyl
Alloc	Allyloxycarbonyl
Arg	L-Arginin
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
Bn	Benzyl
Cbz	Benzyloxycarbonyl
CFG	<i>Consortion for Functional Glycomics</i>
CIAP	<i>calf intestinal alkaline phosphatase</i>
CMP	Cytidinmonophosphat
COSY	<i>correlated spectroscopy</i>
CV	Säulenvolumen
d	Dublett (NMR)
dd	Dublett vom Dublett (NMR)
δ	chemische Verschiebung
DMC	2-Chlor-1,3-dimethylimidazoliumchlorid
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
eq	Äquivalent(e)
ESI	<i>electrospray ionisation</i>
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
Fuc	L-Fucose
FucT6	α -1,6-Fucosyltransferase
Gal	D-Galactose
GalF	Galactosylfluorid
GalT1	β -1,4-Galactosyltransferase I
GDP	Guanosindiphosphat
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin
GnT	<i>N</i> -Acetylglucosaminyltransferase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HPLC-MS	<i>high performance liquid chromatography mass spectrometry</i>

HR-MS	<i>high resolution mass spectrometry</i>
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
iso	isokratisch
<i>J</i>	skalare Kopplung (NMR)
JMOD	<i>J-modulation experiment</i>
LacNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-Lactosamin
Lev	Levulinoyl
m	Multipllett (NMR)
M	molar
Man	D-Mannose
M_{ber}	berechnete Masse
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)-ethansulfonsäure
M_{gef}	gefundenene Masse
NANA	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure
NAP	Naphthylether
NeuAc	5- <i>N</i> -Acetylneuraminsäure
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NOESY	<i>nuclear overhauser effect spectroscopy</i>
p.a.	<i>pro analysis</i>
PNGase F	Peptid- <i>N</i> -Glycosidase F
ppm	<i>parts per million</i>
rel. Abs.	relative Absorption
R_f	Retentionsfaktor
RP	<i>reversed phase</i>
RT	Zimmertemperatur
s	Singulett (NMR)
SGP	Sialoglycopeptid
ST	Sialyltransferase
TOCSY	<i>total correlation spectroscopy</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TsOH	<i>p</i> -Toluolsulfonsäure
UDP	Uridindiphosphat
Xaa	beliebige Aminosäure außer Prolin

1. Einführung

1.1. N-Glycane: Aufbau und Bedeutung

Glycosylierungen gehören zu den häufigen posttranslationalen Modifikationen von Proteinen. Sie verbessern die Faltung und die Stabilität des Proteins.^[1-3] Glycane beeinflussen die biologische Funktion von Glycoproteinen.^[4,5] Glycane sind bei vielen Erkrankungen relevant, unter anderem bei Krebserkrankungen^[6-10], bakteriellen Infektionen^[11,12], viralen Infektionen wie z.B. Influenza^[11,13], Herz-Kreislauf-Erkrankungen^[14,15] und Alzheimer^[16-18]. Auch in Impfstoffen gegen bakterielle Erreger sind Glycane von zentraler Bedeutung.^[19] Dadurch spielen Glycoproteine eine wichtige Rolle in der Medizin.^[20-25]

Bei Glycoproteinen wird zwischen *O*- und *N*-Glycanen unterschieden. *O*-Glycane sind über eine Hydroxylgruppe von Serin oder Threonin mit dem Protein verknüpft, *N*-Glycane dagegen an einem Asparagin der Konsensussequenz Asn-Xaa-Ser/Thr. Xaa steht hierbei für eine beliebige Aminosäure außer Prolin.^[26-29] Alle *N*-Glycane besitzen ein gemeinsames *core*-Pentasaccharid (Abbildung 1, rot), bestehend aus zwei β -*N*-Acetylglucosaminen, einer β -Mannose und zwei α -Mannosen.^[30,31]

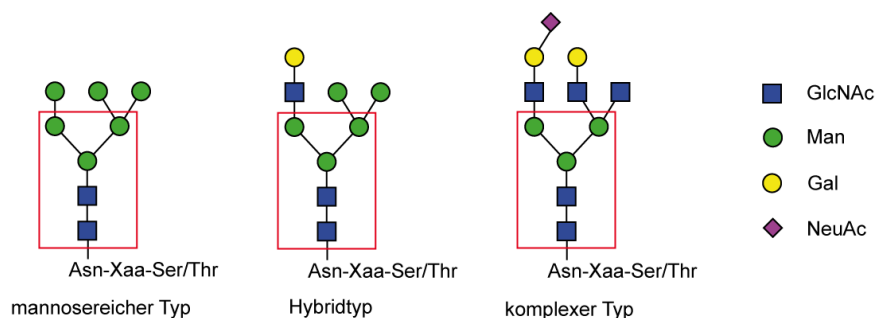


Abbildung 1: Schematischer Aufbau von *N*-Glycanen mit *core*-Pentasaccharid (rot).

An diesem Pentasaccharid sind neben optionalen Modifikationen wie einem *bisecting*-GlcNAc oder einer *core*-Fucose zumeist mehrere Antennen verknüpft.^[32] Je nach Anzahl der Antennen wird das *N*-Glycan als bi-, tri- oder tetraantennär bezeichnet.^[5] Bestehen die Antennen nur aus Mannosen, spricht man vom mannosereichen Typ. Bei komplexen *N*-Glycanen bestehen die Antennen aus *N*-Acetylglucosamin, Mannose, Galactose und Sialinsäure. Sind Antennen der beiden Typen kombiniert, so spricht man vom Hybridtyp (Abbildung 2).^[28]

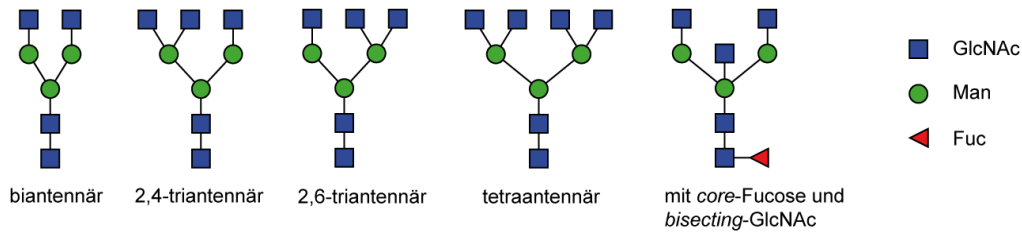


Abbildung 2: Schematische Darstellung diverser komplexer N-Glycangrundstrukturen.

Bei einem symmetrischen N-Glycan sind alle Antennen gleich aufgebaut. Weisen sie intern variierende Saccharidstrukturen oder -verknüpfungen auf, spricht man von einem unsymmetrischen N-Glycan.

Um die Funktionen und Interaktionen von Glycanen untersuchen zu können, sind diese in Reinform nötig.^[33] Sie lassen sich jedoch aufgrund der Mikroheterogenität von Glycoproteinen nur schwer aus natürlichen Quellen isolieren.^[34,35] Daher muss entweder eine aufwändige chemische Synthese durchgeführt^[36-42] oder das gewünschte Glycan aus natürlichen Quellen gewonnen und gegebenenfalls modifiziert werden.^[43]

1.2. Ansätze zur Synthese unsymmetrischer N-Glycane

Da in der Natur in hohem Maße unsymmetrische N-Glycane vorkommen und deren Funktion wenig verstanden ist, gibt es in letzter Zeit vermehrt Ansätze, unsymmetrische N-Glycane zu synthetisieren. *Seeberger* verfolgte einen synthetischen Ansatz, bei dem mit Hilfe von AGA (*automated glycan assembly*) eine Vielzahl verschiedener Glycane chemisch aufgebaut werden kann. Dazu wurden speziell geschützte Monosaccharide als Bausteine eingesetzt, die in einer automatisierten Synthese chemisch verknüpft werden können. Durch die Zusammenführung unterschiedlicher linearer Oligosaccharide konnten so auch unsymmetrische komplexe N-Glycane aufgebaut werden.^[44] Auch *Wang* ging von chemisch synthetisierten Bausteinen aus.^[45,46] Aus diesen wurden verschiedene *core*-Strukturen erhalten, die enzymatisch verlängert werden konnten. Die Asymmetrie wurde über einen selektiv peracetylierten Baustein eingeführt (Abbildung 3). Dieser Arm wird von den verwendeten Enzymen nicht erkannt, sodass nur der andere Arm modifiziert wird.

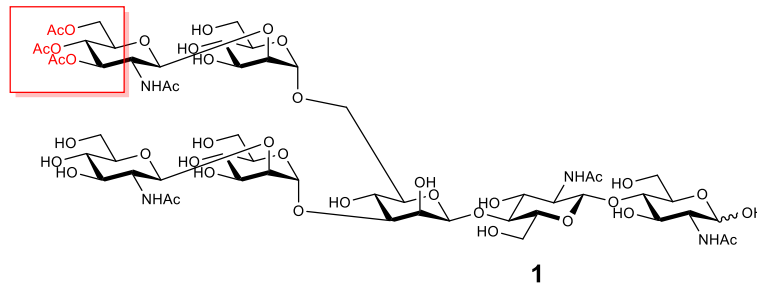


Abbildung 3: Acetyliertes Heptasaccharidazid **1**.

Anstelle von selektiven Modifikationen durch unterschiedliche Schutzgruppen in den Antennen nutzte Reichardt Benzylschutzgruppen am *core*-Pentasaccharid, die nach der chemischen Synthese nicht wie üblich entfernt, sondern zunächst behalten wurden. Diese haben einen günstigen Einfluss auf die Selektivität bei Enzymreaktionen und die HPLC-Trennung der entstehenden Mischungen der Glycane (Abbildung 4).^[47,48] Ein Nachteil dieser Methode ist die Notwendigkeit, auch die Endverbindungen zu entschützen, was zu Ausbeuteverlusten führt.

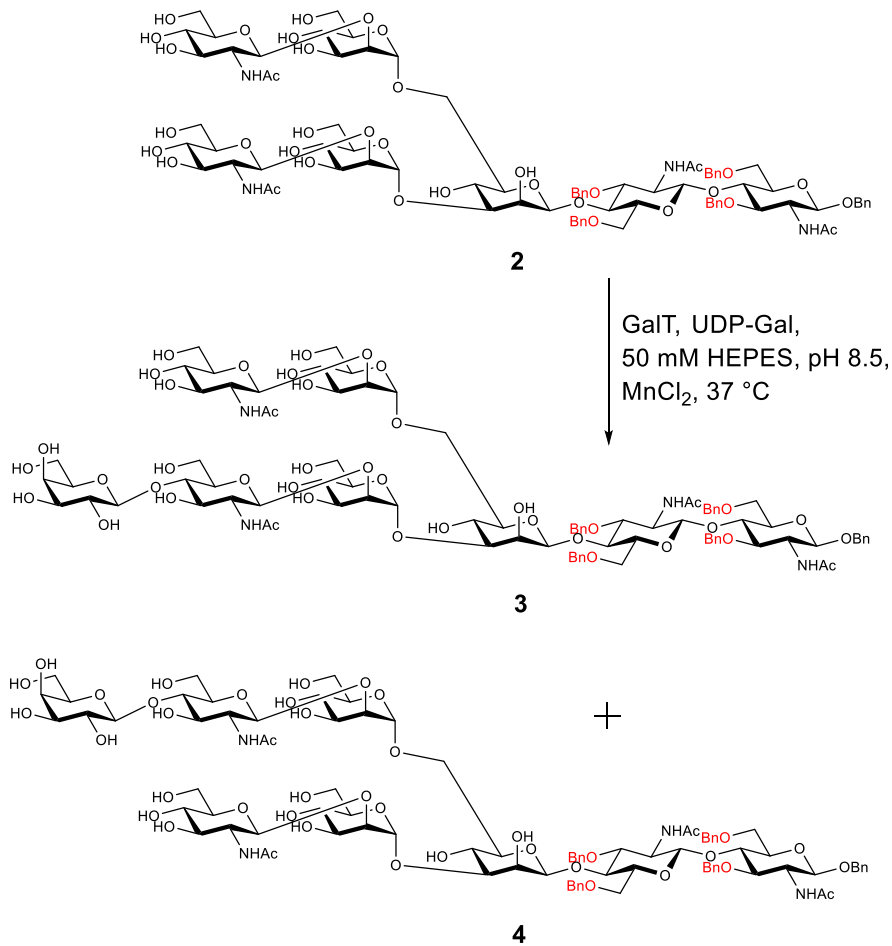


Abbildung 4: Statistische Galactosylierung des Heptasaccharids **2**.

Neben der Verwendung synthetisch aufgebauter *N*-Glycane besteht die Möglichkeit der Isolierung von Glycanderivaten aus natürlichen Quellen. Häufig wird ein Sialoglycopeptid (SGP) **5** genutzt, das sich aus Hühnereigelb gewinnen lässt (Abbildung 5). *Seko* konnte das Sialoglycopeptid **5** mit einer Phenol/Wasser-Mischung aus Eigelb extrahieren und anschließend über Gelpermeations und Ionenaustauschchromatographie reinigen.^[49] *Sun* konnte die Extraktion des SGP **5** durch die Verwendung einer 40 %igen Aceton/Wasser-Mischung verbessern.^[50] Eine weitere Möglichkeit der Extraktion wurde von *Liu* vorgeschlagen. Hierbei erfolgt die Extraktion mit 40 % Ethanol in Wasser.^[51]

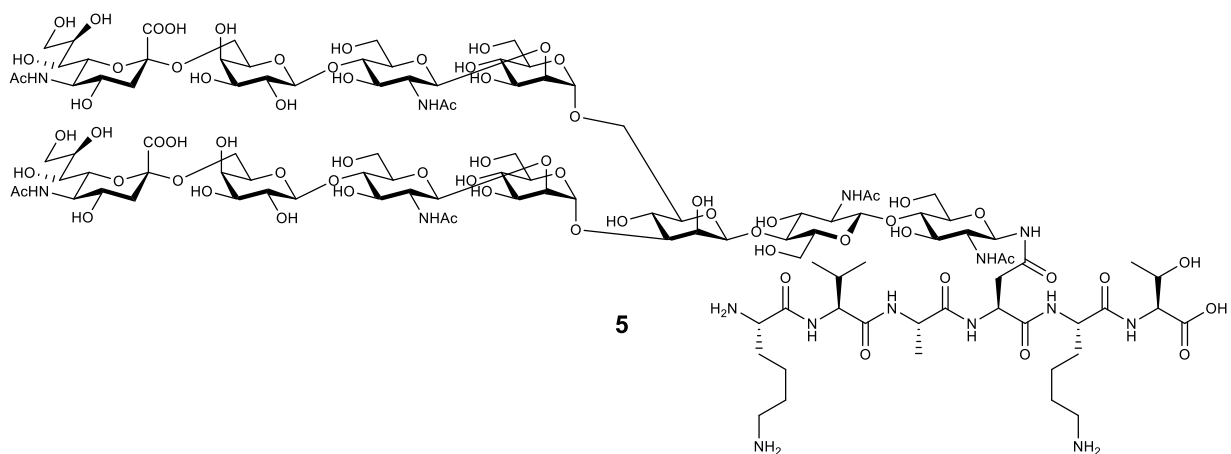


Abbildung 5: Sialoglycopeptid **5**.

Aus diesem Glycopeptid kann durch Spaltung mit der Amidase PNGase F das freie Undecasaccharid-Halbacetal gewonnen werden, das mit Glycosidasen, Glycosyltransferasen sowie chemischen Methoden modifiziert werden kann.^[52] *Kajihara* konnte ein aus **5** dargestelltes Nonasaccharid-Asparagin an den terminalen Galactosen und den α -Mannosen mit einem Benzylidenacetal schützen. Diese Schutzgruppen wurden anschließend durch milde saure Bedingungen (60 %ige Essigsäure) hydrolysiert, wodurch auch unsymmetrisch geschützte Glycane entstanden.^[53] Neben einem Benzylidenacetal können auch andere Schutzgruppen verwendet werden. *Kajihara* konnte, wie in Abbildung 6 dargestellt, durch die statistische Isopropylidenierung nur eine der terminalen Galactosen des komplexen *N*-Glycans **6** die unsymmetrischen Derivate **7** und **8** erzeugen.^[54] Konzeptionell einfacher als die Einführung von Schutzgruppen ist die Möglichkeit, terminale Sialinsäuren unselektiv durch saure Hydrolyse zu entfernen (Abbildung 7).^[55-57] Nach chromatographischer Trennung der monosialylierten Produkte **10** und **11** sind antennenspezifische Modifikationen möglich.

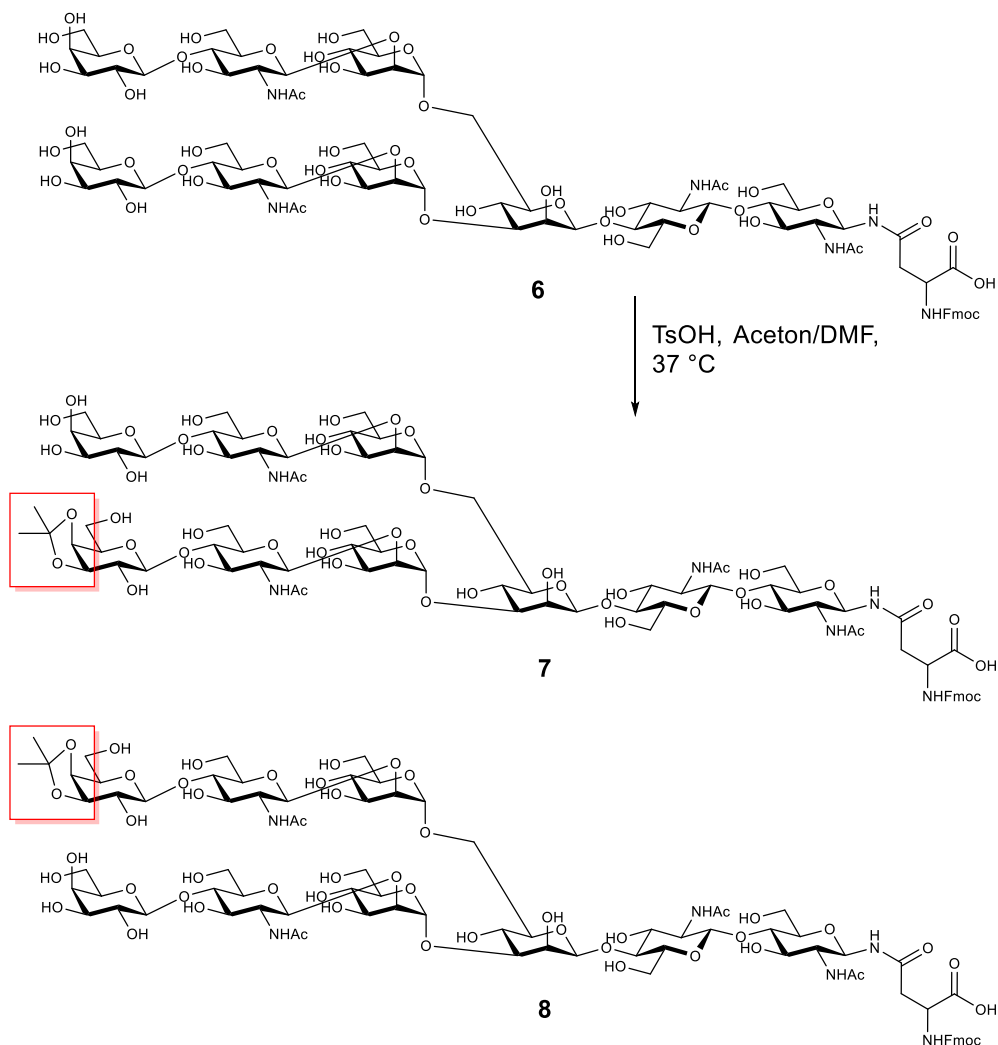


Abbildung 6: Statistische Isopropylidenierung der terminalen Galactosen des Nonasaccharids **6**.

Auch durch die Verwendung von Enzymen, die eine Antenne deutlich bevorzugen (β -Galactosidase LacZ oder spezifische Mannosidasen) können asymmetrische Strukturen erzeugt werden.^[58–60] Weiterhin kann die *humane* Fucosyltransferase FUT8 verwendet werden, um unsymmetrische Glycane effektiver zu trennen. FUT8 toleriert eine Galactose am 1,6-Arm, jedoch nicht am 1,3-Arm.^[61–63] Dies kann genutzt werden, um z. B. in einer Mischung unsymmetrisch galactosylierter *N*-Glycane die am 1,6-Arm galactosylierte Verbindung zu fucosylieren und somit einen deutlichen Retentionszeitunterschied bei der Reinigung durch RP-HPLC zu erreichen.

Ein umfassender chemoenzymatischer Ansatz zur Synthese unsymmetrischer *N*-Glycane stammt von *Boons et al.* Zunächst wurde mittels chemischer Synthese das Pentasaccharid 12 mit unterschiedlichen Schutzgruppen an vier orthogonal modifizierbaren Positionen (rot in Abbildung 8) hergestellt.

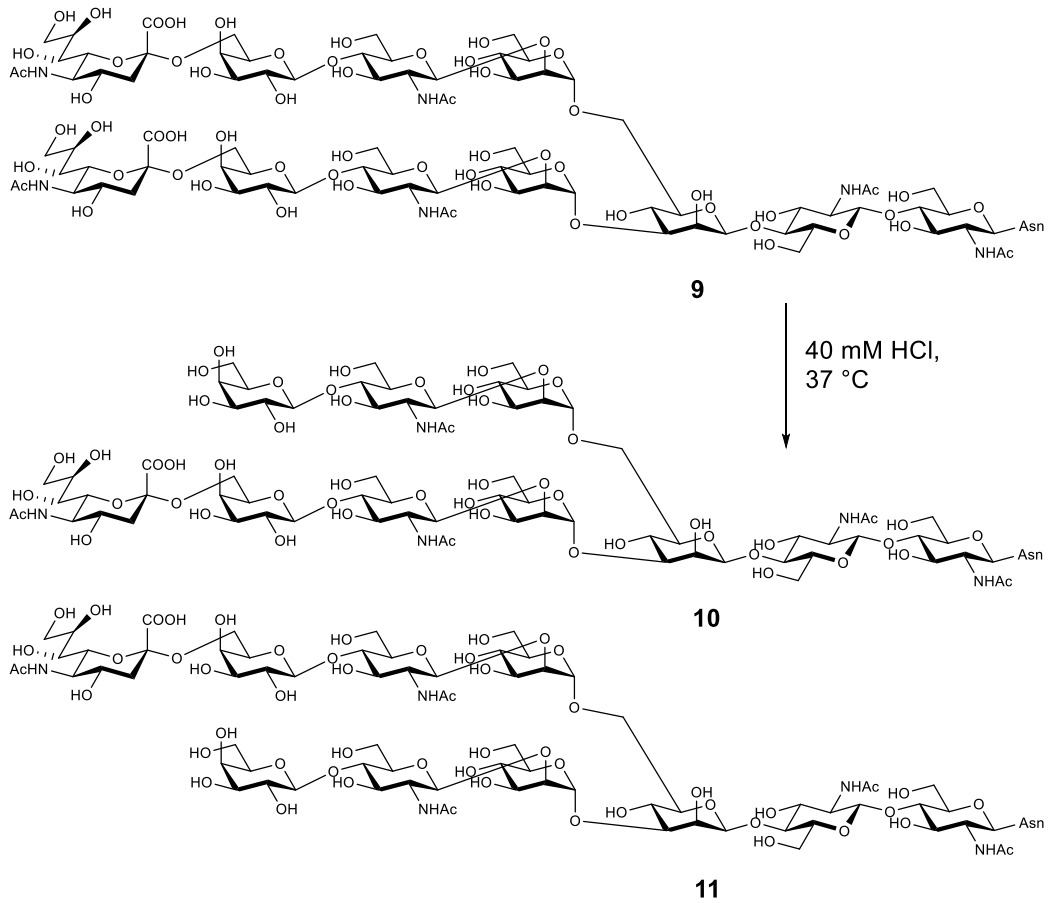


Abbildung 7: Unselektive Desialylierung mit Säure.

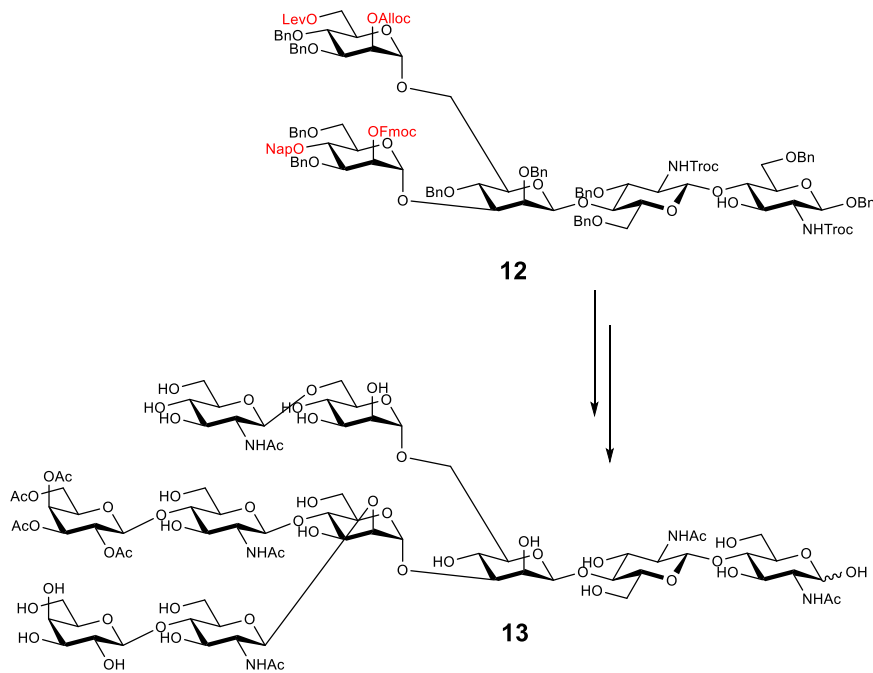


Abbildung 8: Darstellung des triantennären unsymmetrischen Precursors 13.

Diese wurden durch chemische Glycosylierung selektiv modifiziert. Dadurch entstand der Precursor **13**, der antennenspezifisch durch Glycosyltransferasen verlängert werden kann und Zugang zu einer Bibliothek unsymmetrischer *N*-Glycane bietet.^[64,65]

Weiterhin wurde ein *core*-fucosylierter Precursor entwickelt, der ebenfalls enzymatisch verlängert werden kann. Hierbei konnte die *core*-Fucose am Ende der Synthese wieder entfernt werden, ohne Fucosen in den Antennen abzuspalten.^[66] *Boons* entwickelte schließlich den unnatürlich substituierten Precursor **14**, aus dem zahlreiche bi-, tri- und tetraantennären *N*-Glycane dargestellt werden konnten (Abbildung 9).^[67]

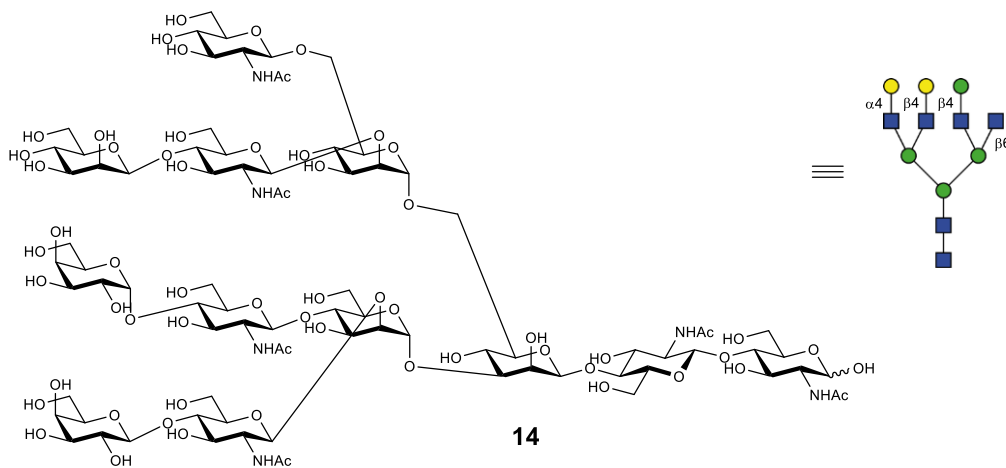


Abbildung 9: Tetraantennärer unsymmetrischer Precursor **14**.

Die Termini der Antennen sind GlcNAc, β -Gal sowie die unnatürlichen Reste α -1,4-Gal und β -Man. Bi- und triantennäre *N*-Glycane konnten durch Abspalten von Antennen erhalten werden. Dieser Ansatz bietet zwar einen Zugang zu diversen unsymmetrischen *N*-Glycanen, jedoch ist der Aufwand insbesondere für die Synthese biantennärer Verbindungen unverhältnismäßig hoch. Daher entwickelten *Boons et al.* eine Methode, um aus SGP **5** über mehrere enzymatische Schritte das beantennäre *N*-Glycan **15** darzustellen.^[68] Die unsymmetrischen Vorläufer **16** und **17** wurden durch eine unvollständige enzymatische Sialylierung bzw. Degalactosylierung (Abbildung 10) erzeugt. Ähnliche Konzepte sollen in dieser Arbeit entwickelt und auf bi- und triantennäre *N*-Glycane angewendet werden.

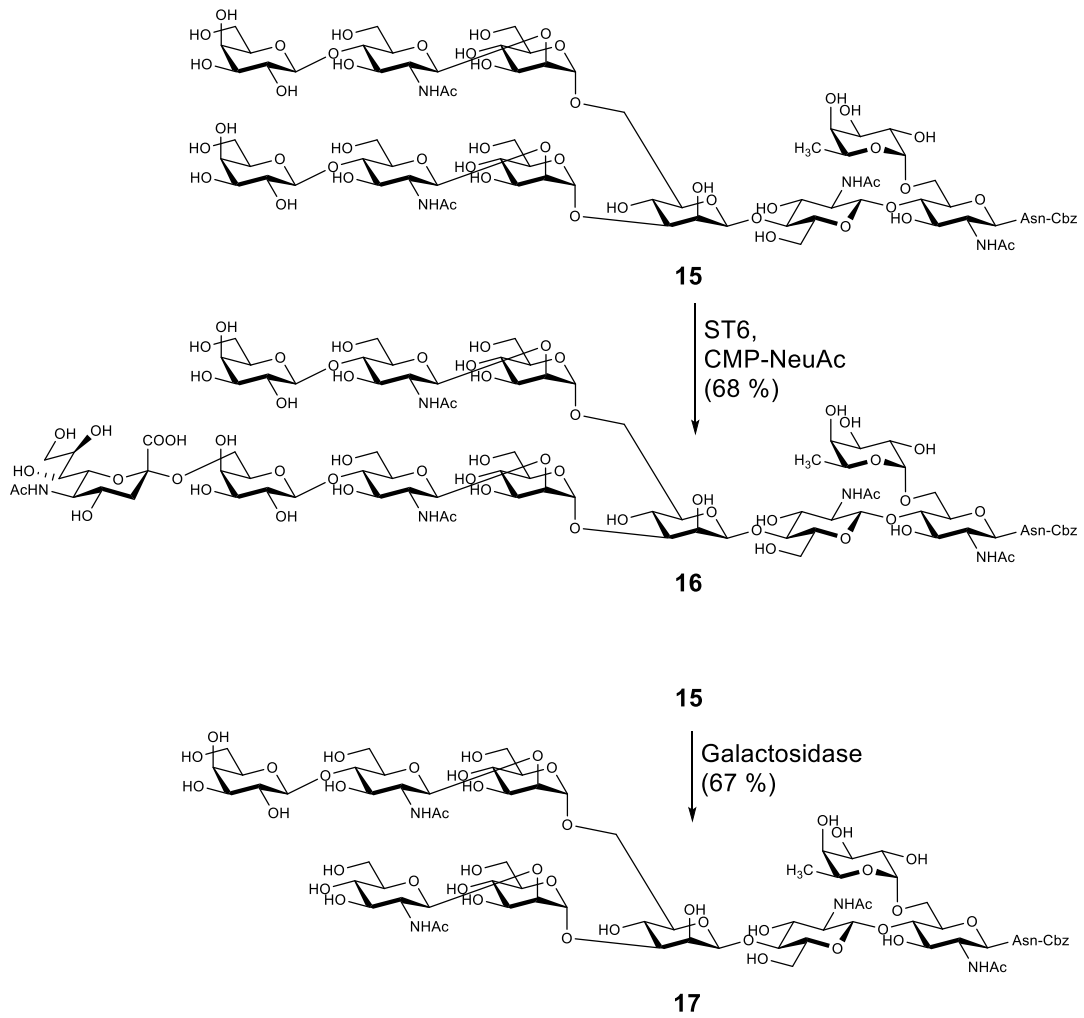


Abbildung 10: Unvollständige enzymatische Sialylierung bzw. Degalactosylierung des Decasaccharids 15.

2. Themenstellung

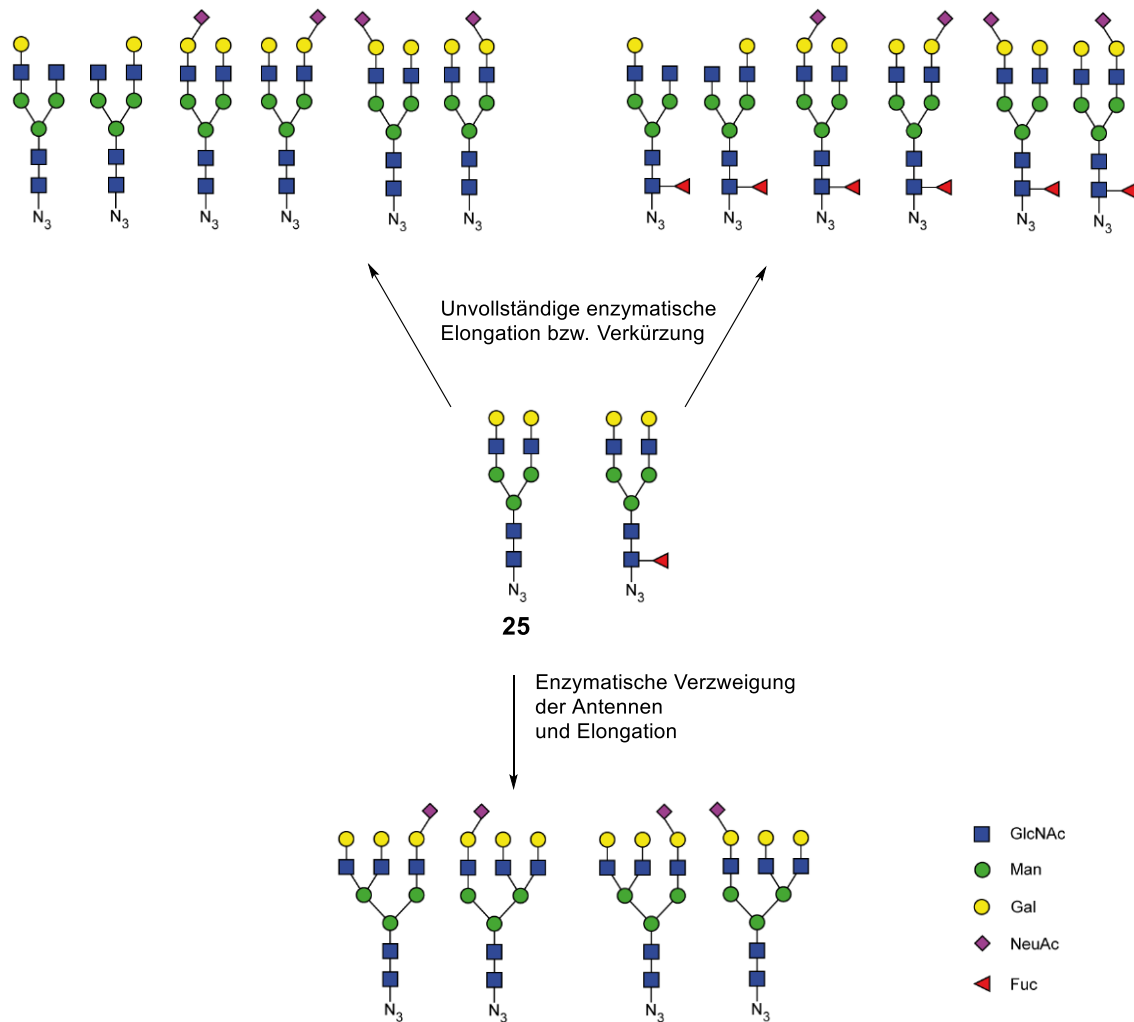


Abbildung 11: Aufbau und Modifikation unsymmetrischer *N*-Glycane.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten unsymmetrische *N*-Glycane chemoenzymatisch aufgebaut und deren chromatographische Trennung untersucht werden. Dafür sollte von dem aus Eigelb zugänglichen Nonasaccharidazid **25** ausgegangen werden und dieses durch unterschiedliche enzymatische Modifikationen zu den in Abbildung 11 dargestellten monogalactosylierten und monosialylierten *N*-Glycanen umgesetzt werden. Dabei sollten sowohl *core*-fucosylierte als auch unfucosylierte Verbindungen zugänglich gemacht werden. Des Weiteren sollte versucht werden, unsymmetrische triantennäre *N*-Glycane darzustellen.

3. Synthese symmetrischer *N*-Glycane

3.1. Synthese symmetrischer *core*-fucosylierter *N*-Glycane

Für Lectin-Bindungsassays werden sowohl symmetrische als auch unsymmetrische *N*-Glycane in Reinform benötigt. *Boos* konnte aus SGP **5** ein Nonasaccharidhalbacetal herstellen und anschließend nach *Tanaka* zu **25** azidieren.^[69] Das Nonasaccharid **25** kann nicht direkt fucosyliert werden, da die α -1,6-Fucosyltransferase AgFucT6 aus *Anopheles gambiae* keine terminalen Galactosen toleriert.^[62,63] Daher wurde **25** mit β -Galactosidase zum Heptasaccharidazid **18** umgesetzt^[70] und anschließend nach den von *Perkams* etablierten Bedingungen mit GDP-Fucose und AgFucT6 fucosyliert (Abbildung 12).

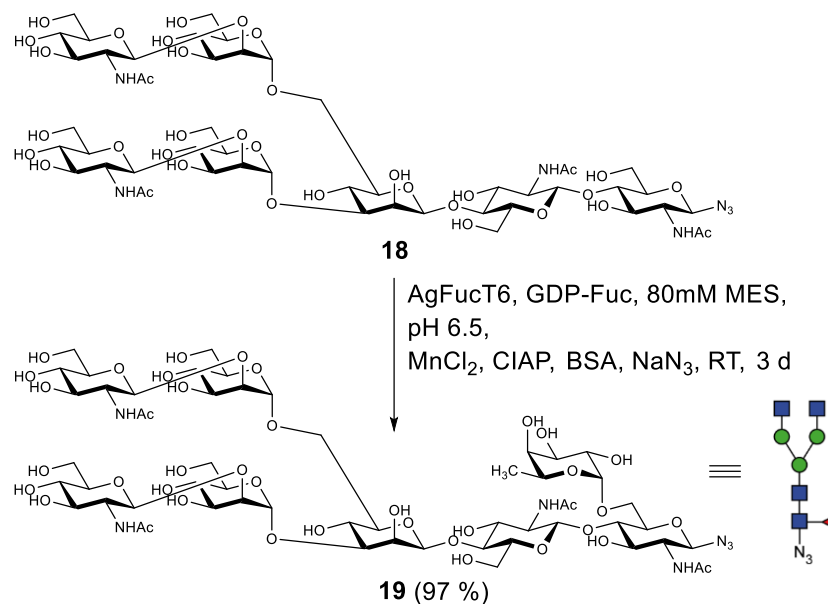


Abbildung 12: Synthese des fucosylierten Octasaccharidazids **19**.

Nach 3 d bei Raumtemperatur war die Reaktion vollständig. Das Glycan wurde durch Gelfiltration (Highload Superdex 30) gereinigt und in einer Ausbeute von 97 % erhalten. Damit konnte die Ausbeute von *Perkams* (92 %) reproduziert werden.^[70]

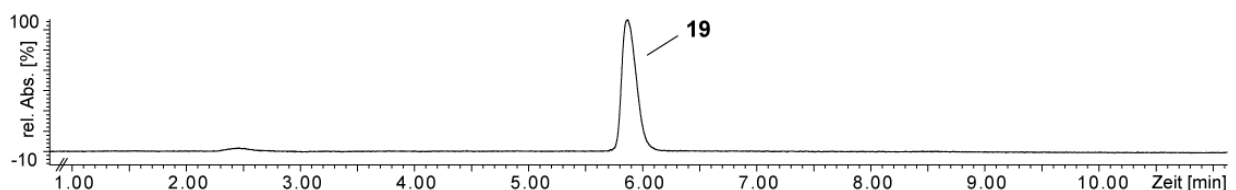


Abbildung 13: UV-Chromatogramm (LC-MS; 200 nm) des gereinigten Octasaccharidazids **19** (Hydrosphere C18, 0-10 %).

Die Reinheit der Zielverbindung **19** wurde durch HPLC-MS bestätigt (Abbildung 13). Im Anschluss wurde das Octasaccharid **19** galactosyliert (Abbildung 14). Dazu wurde **19** mit der β -1,4-Galactosyltransferase GalT1 aus *Sus scrofa* umgesetzt. Diese katalysiert die Verknüpfung von β -Galactose mit terminalen *N*-Acetylglucosamin-Einheiten. Um eine vollständige Umsetzung zu erreichen, wurden 1.5 Äquivalente UDP-Galactose pro Antenne eingesetzt. Manganchlorid wurde als Cofaktor zugesetzt.^[71-73] Die Alkalische Phosphatase (CIAP) baut den bei der Reaktion entstehenden Inhibitor UDP ab.^[74]

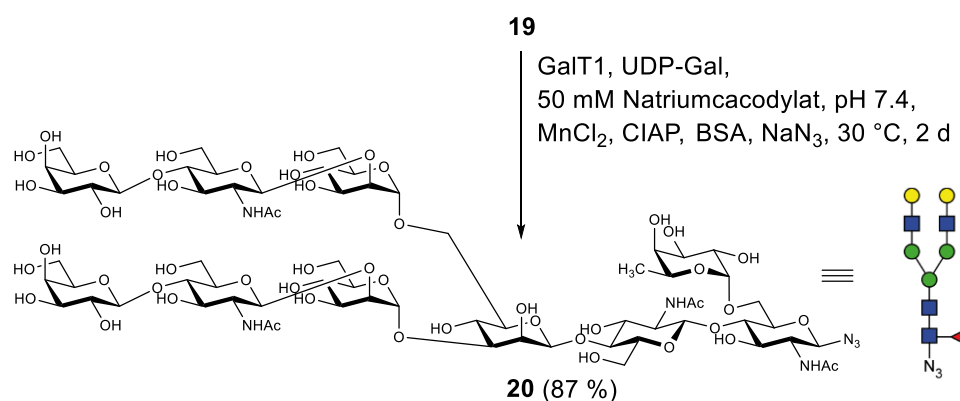


Abbildung 14: Enzymatische Galactosylierung des Octasaccharidazids **19**.

Die Reaktion war nach 2 d bei 30 °C vollständig und wurde per RP-HPLC gereinigt. Die Zielverbindung **20** wurde in einer Ausbeute von 87 % erhalten. Durch HPLC-MS (Abbildung 15) und NMR (Abbildung 16) konnte die Reinheit und die Struktur von **20** bestätigt werden.

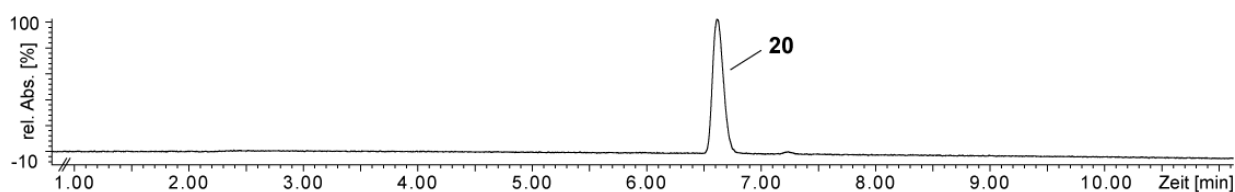


Abbildung 15: UV-Chromatogramm (LC-MS; 200 nm) des gereinigten Decasaccharidazids **20** (HyperCarb, 5-25 %).

Da *Perkams* die Degalactosylierung von **25** und die Fucosylierung des entstehenden Heptasaccharids **18** im Eintopfverfahren durchführte, sollte versucht werden, die Fucosylierung und Regalactosylierung im Eintopfverfahren zu verbinden (Abbildung 17). Dabei wurde das Heptasaccharid **18** für die Fucosylierung in einer Konzentration von 3 mM in MES-Puffer eingesetzt.

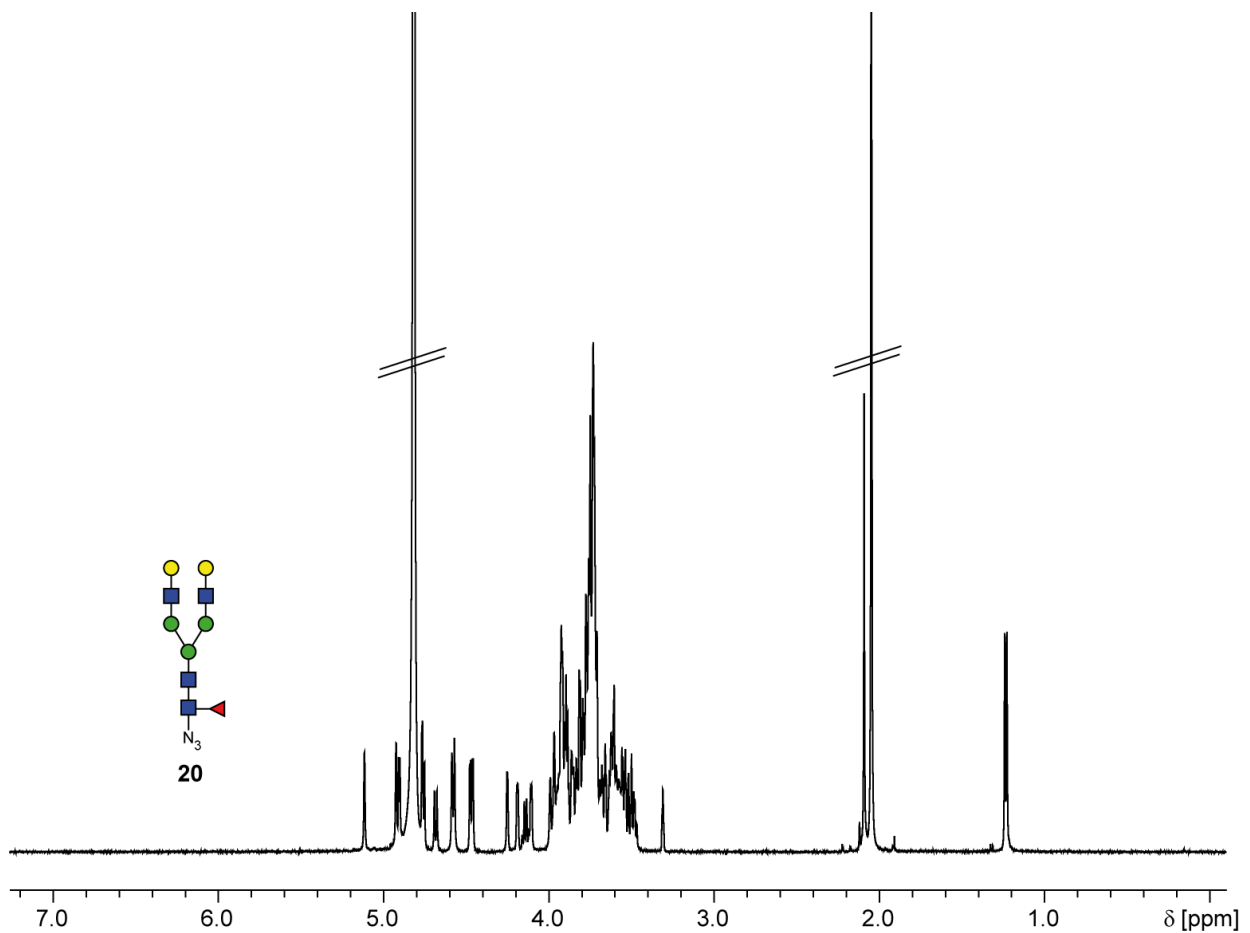


Abbildung 16: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **20**.

Die Konzentration wurde für die Galactosylierung auf 2 mM verringert. Die Zielverbindung **20** wurde durch Gelfiltration (Highload Superdex 30) gereinigt und wurde in einer Ausbeute von 51 % erhalten.

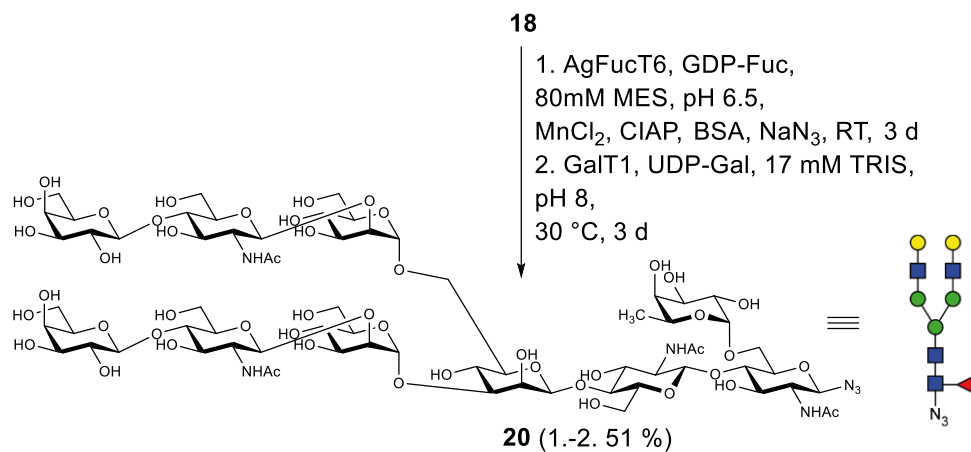


Abbildung 17: Enzymatische Fucosylierung und Galactosylierung des Heptasaccharidazids **18** ohne Zwischenreinigung.

Im Rahmen eines Kooperationsprojekts sollten zwei unterschiedlich sialylierte *core*-fucosylierte Glycane dargestellt werden. Verwendet wurde hierfür zunächst die rekombinant hergestellte α -2,6-Sialyltransferase (PdST6) aus *Photobacterium damsela* (Abbildung 18). Um eine vollständige Sialylierung zu erreichen, wurden 3.5 Äquivalente CMP-Neuraminsäure eingesetzt. Da die Transferase im Basischen aktiver ist, wurde ein pH-Wert von 9 gewählt. Die Reaktionsmischung wurde 3 Stunden bei 30 °C belassen. Da die 2,6-Sialyltransferase jedoch keine nennenswerte Sialidase-Aktivität besitzt, kann die Reaktion bei Bedarf auch länger inkubiert werden.

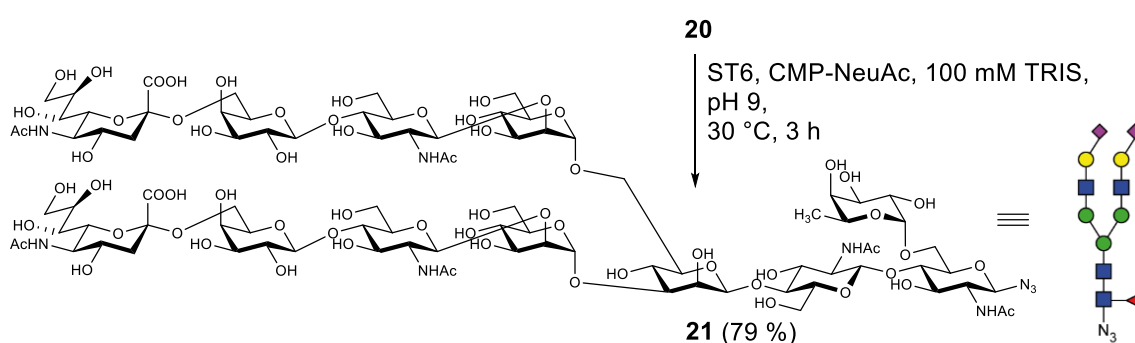


Abbildung 18: Enzymatische 2,6-Sialylierung des Decasaccharidazids **20**.

Die 2,6-sialylierte Zielverbindung **21** wurde nach RP-HPLC in einer Ausbeute von 79 % erhalten. Durch HPLC-MS (Abbildung 19) und NMR (Abbildung 20) wurde die Reinheit und die Struktur von **21** bestätigt.

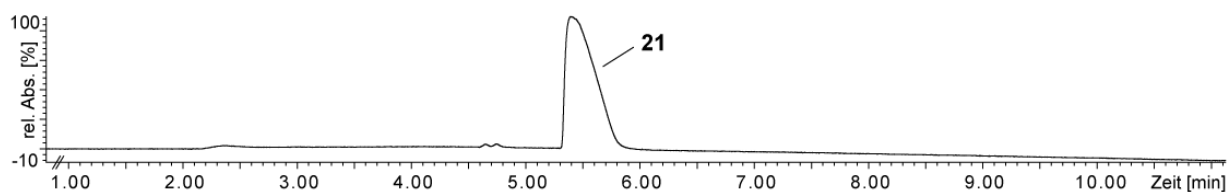


Abbildung 19: UV-Chromatogramm (LC-MS; 200 nm) des gereinigten Dodecasaccharidazids **21** (Hydrosphere C18, 0-30 %).

Neben der 2,6-Sialylierung sollte das Decasaccharid **20** auch 2,3-sialyliert werden. *Perkams* zeigte, dass sich *N*-Glycane mit der rekombinant in *E. coli* exprimierten α -2,3-Sialyltransferase ST3 aus *Vibrio species* sialylieren lassen.^[70] Diese Bedingungen wurden auf das Decasaccharid **20** übertragen (Abbildung 21). Dazu wurden 4 Äquivalente CMP-Neuraminsäure eingesetzt. Die Reaktion wurde bei pH 7.1 durchgeführt und nach einer Stunde abgebrochen.

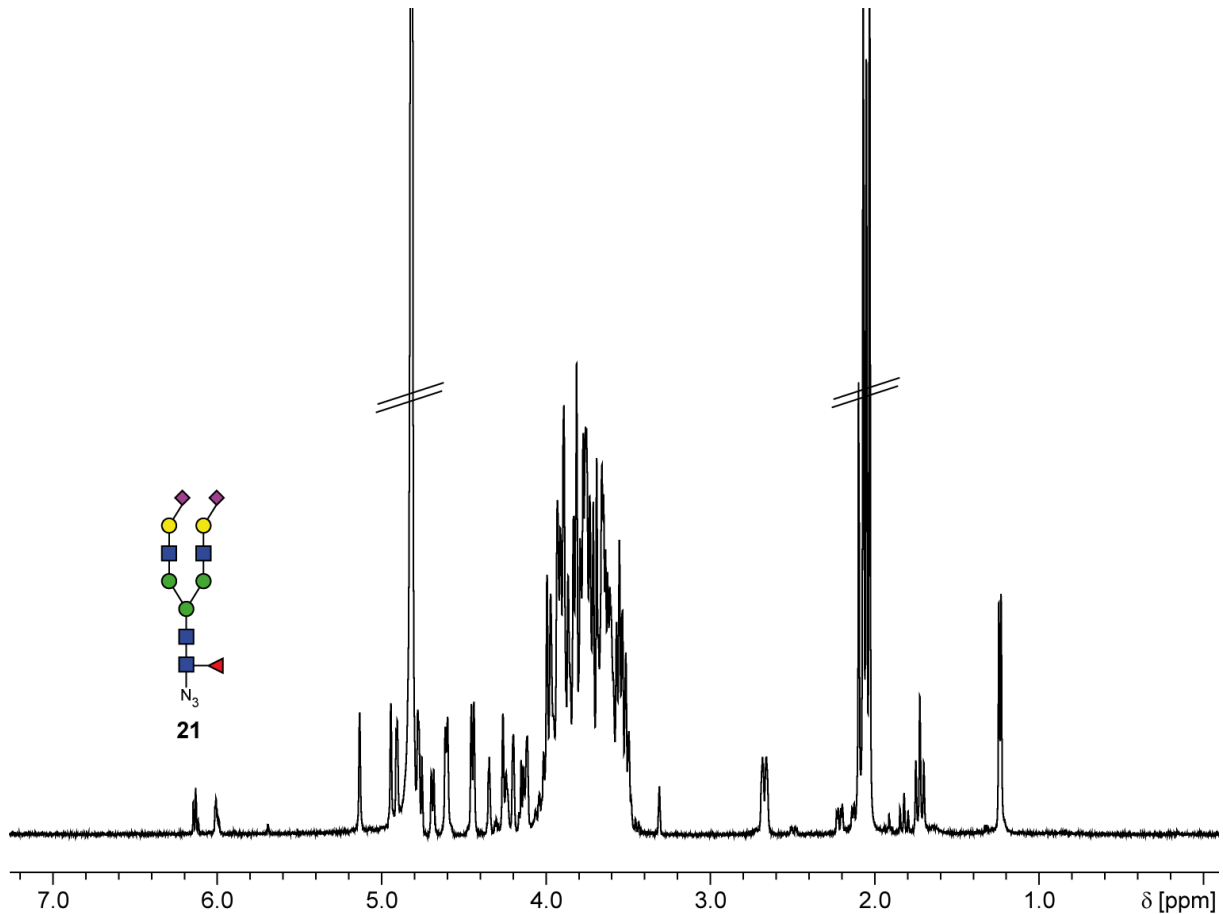


Abbildung 20: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **21**.

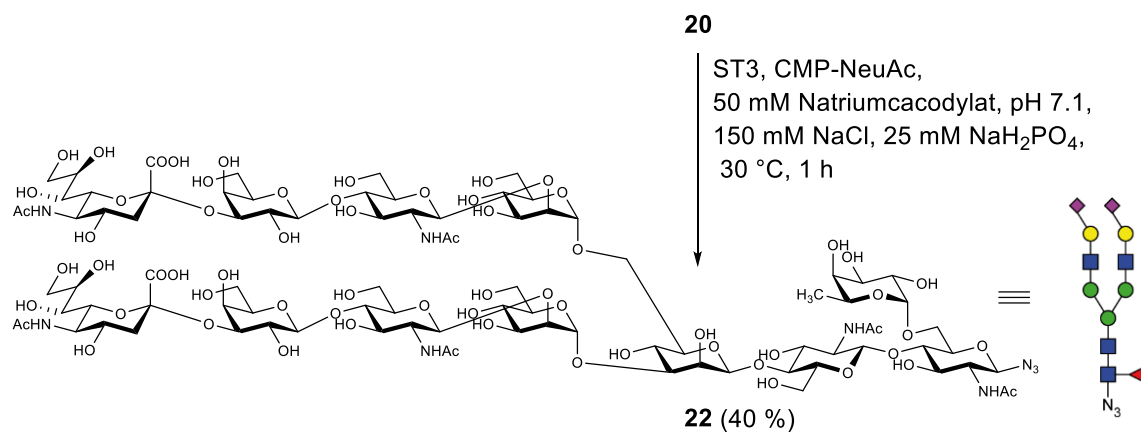


Abbildung 21: Enzymatische 2,3-Sialylierung des Decasaccharidazids **20**.

Weidler und Perkams beobachteten, dass ST3 aus *Vibrio species* eine Sialidase-Aktivität besitzt.^[75] Daher wurde die Reaktionszeit relativ kurz gewählt (Abbildung 22). Dennoch wurde nach RP-HPLC nur eine Ausbeute von 40 % erhalten.

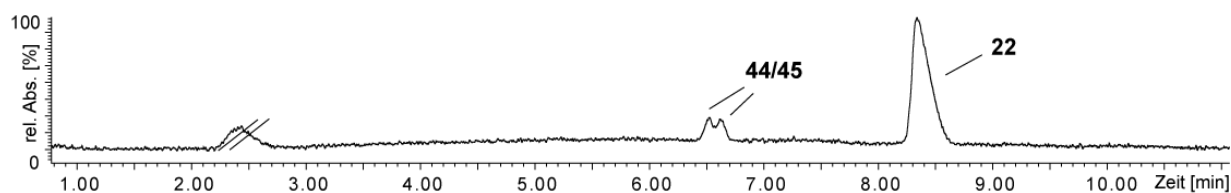


Abbildung 22: UV-Chromatogramm (LC-MS; 200 nm) der enzymatischen 2,3-Sialylierung des Decasaccharidazids **20** (Hydrosphere C18, 0-15 %).

Durch HPLC-MS (Abbildung 23) und NMR (Abbildung 24) konnte die Reinheit und die Struktur von **22** bestätigt werden.

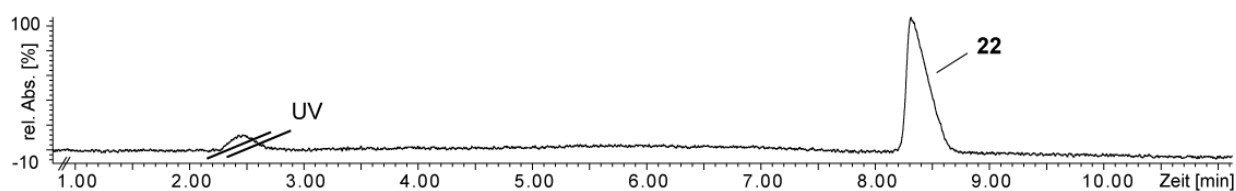


Abbildung 23: UV-Chromatogramm (LC-MS; 200nm) des gereinigten Dodecasaccharidazids **22** (HyperCarb, 15-40 %).

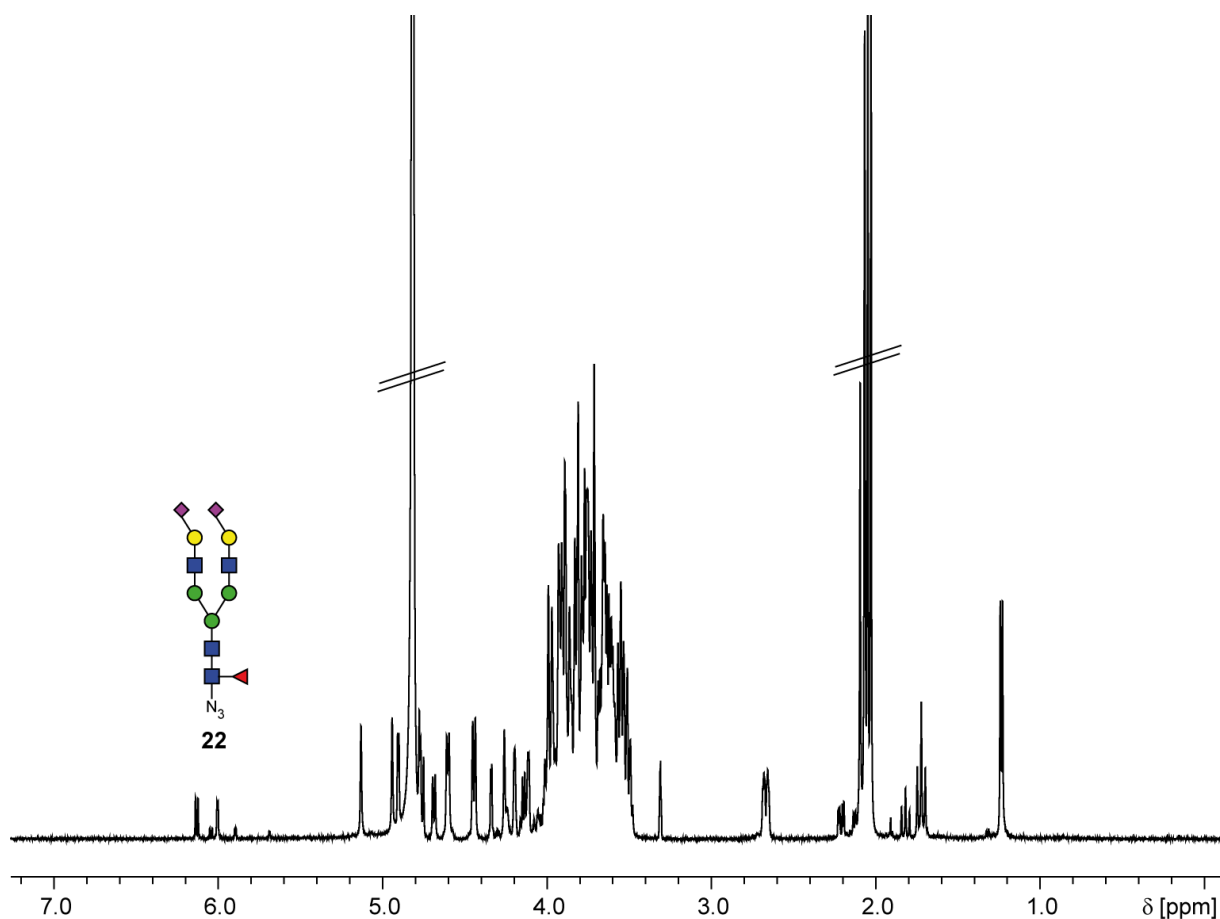


Abbildung 24: ^1H -NMR-Spektrum von **22**.

Die Glycane **19**, **20** und **21** wurden an der Universität Grenoble mit dem Mini-Lectin rPhoSL cokrystallisiert und der resultierende Komplex strukturell charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass der starre α -1,3-Arm nicht vom Protein gebunden wird, während der flexible α -1,6-Arm fest im Komplex verankert ist. Allgemein erkennt rPhoSL spezifisch *core*-fucosylierte *N*-Glycane, die auch sialyliert sein können. PhosSL bildet aus drei kurzen Peptid-Monomeren (ca. 40 Aminosäuren) ein neuartig gefaltetes Trimer. Die Bindungsstellen für Glycane liegen zwischen den Monomereinheiten. rPhoSL ist damit der erste voll charakterisierte Repräsentant einer neuen Lectin-Familie.^[76]

3.2. Synthese β -1,3-galactosylierter *N*-Glycane

Neben den häufigsten Verknüpfungen lassen sich auch Glycane mit selteneren Verknüpfungen enzymatisch aufbauen. Diese können auf Glycanarrays aufgebracht und auf Interaktion mit verschiedenen Biomolekülen getestet werden. In diesem Fall sollte für ein kristallographisches Projekt an der Universität Marburg das 1,3-galactosylierte Nonasaccharid **24** hergestellt werden (Abbildung 25). Dazu wurde die Galactosynthase BgaC Glu233Gly aus *Bacillus circulans* verwendet, die eine β -1,3-verknüpfte Galactose auf terminale *N*-Acetylglucosamine überträgt. Hierbei handelt es sich um eine Mutante der β -Galactosidase BgaC.^[77] Als Donor verwendet BgaC α -Galactosylfluorid **23**.^[78] Die Reaktion findet bei einem pH-Wert von 6.6 statt.

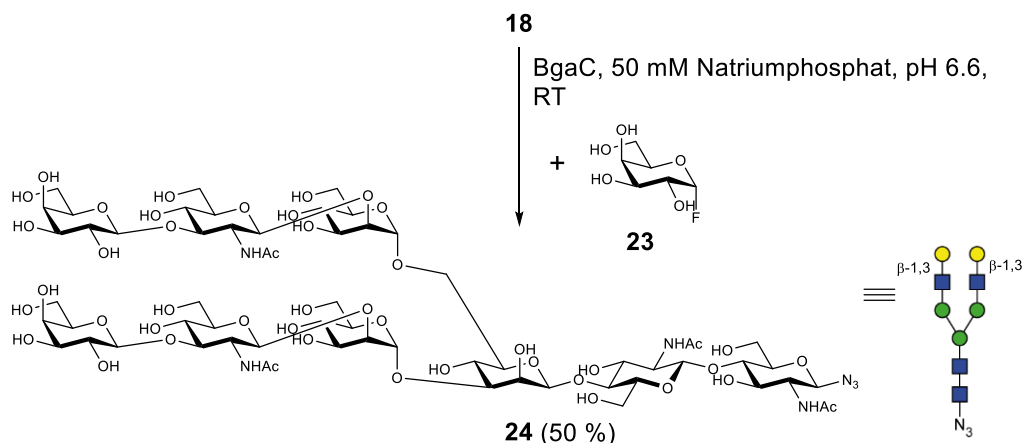
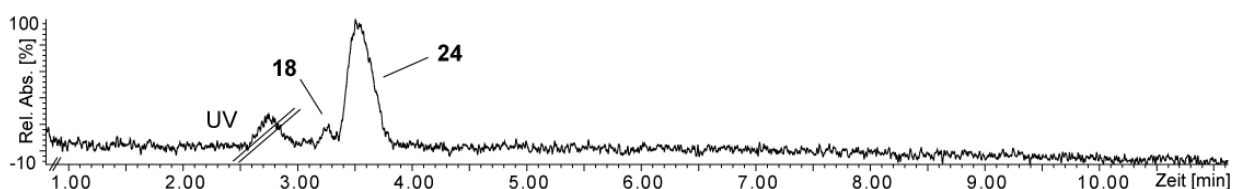


Abbildung 25: Enzymatische 1,3-Galactosylierung des Heptasaccharidazids **18**.

Zunächst wurden 4 Äquivalente α -Galactosylfluorid **23** und eine Enzymkonzentration von 50 μ M eingesetzt. Die Reaktion wurde bei 4 °C inkubiert. Da nach 3 Tagen nur ein geringer Umsatz vorlag, wurde die Temperatur auf RT bzw. 30 °C erhöht (Abbildung 26). Es zeigte sich, dass die Reaktion bei höheren Temperaturen zwar deutlich schneller ablief, das Enzym jedoch bereits nach wenigen Stunden präzipitierte. Daraufhin wurde die Enzymkonzentration auf 150 μ M erhöht und die Reaktion bei Raumtemperatur und bei 30 °C getestet.

a)



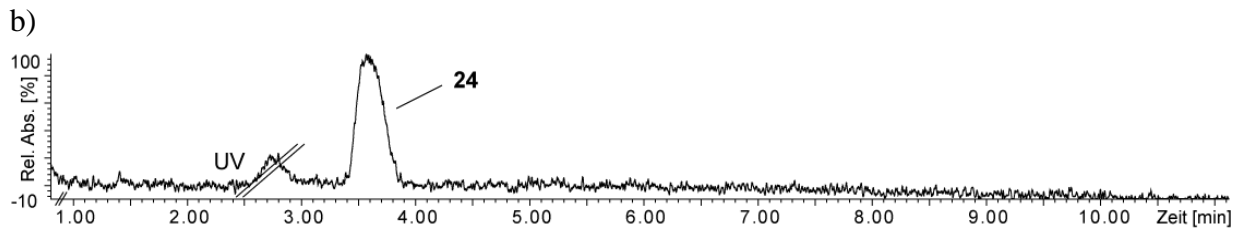


Abbildung 26: UV- Chromatogramme (LC-MS; 200 nm) der 1,3-Galactosylierung des Heptasaccharidazids **18** für 24 h bei a) RT und b) 30 °C (Hydrosphere C18, 0-8 %).

Bei 30 °C war bereits nach einem Tag der Umsatz vollständig, während der Umsatz bei Zimmertemperatur ca. 90 % betrug. Jedoch fiel das Enzym auch bei Raumtemperatur nach wenigen Stunden aus. Die Galactosylierung wurde in größerem Maßstab mit 150 μ M BgaC bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Reaktion war deutlich langsamer als in der analytischen Testreaktion. Um das Ausfallen des Enzyms und die Hydrolyse des Fluorids auszugleichen, wurden nach einem, drei und vier Tagen BgaC und α -Galactosylfluorid nachgegeben. Nach drei Tagen betrug der Umsatz zum Nonasaccharid **24** ca. 50 %. Um den Umsatz zu erhöhen, wurde die Reaktion insgesamt 13 Tage inkubiert. Es zeigte sich, dass die Reaktion langsam weiterlief, sich jedoch nach 13 Tagen auch ein Decasaccharid mit einer zusätzlichen Galactose (**24+Gal**) bildete (Abbildung 27).

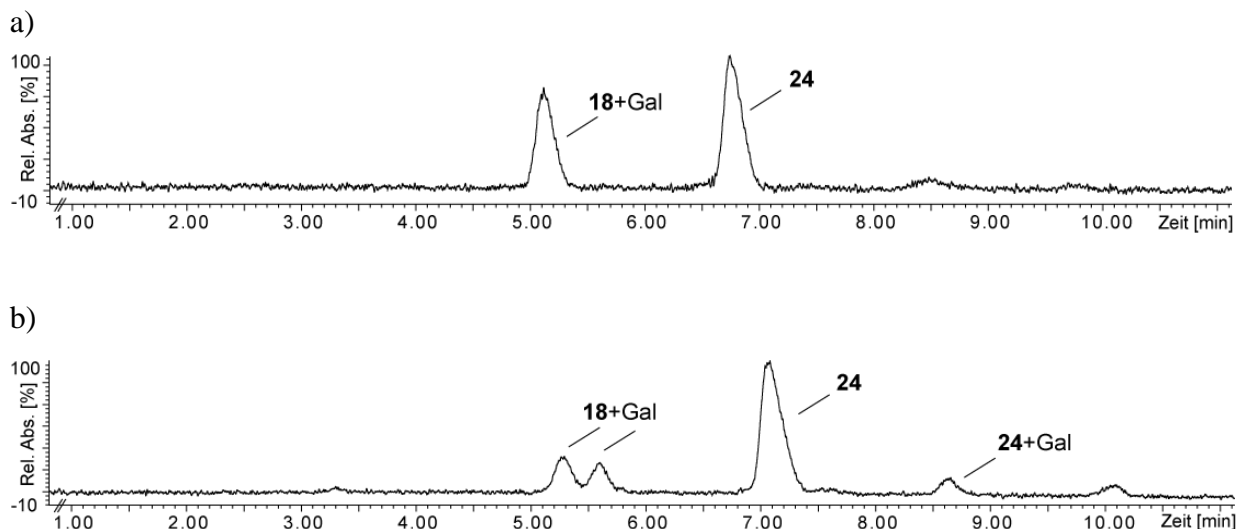


Abbildung 27: UV- Chromatogramme (LC-MS; 200 nm) der 1,3-Galactosylierung des Heptasaccharidazids **18** nach 3 d (a) und 13 d (b) (HyperCarb, 10-15 %).

Nach einer Reinigung der Produkte durch Gelfiltration (Superdex 30) und RP-HPLC (Hypercarb) konnte das Nonasaccharid **24** in guter Reinheit (Abbildung 28, Abbildung 29) und in einer Ausbeute von 50 % erhalten werden.

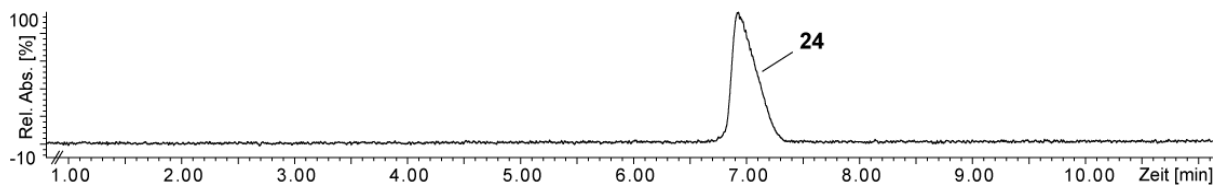


Abbildung 28: UV-Chromatogramm (LC-MS; 200 nm) des gereinigten Nonasaccharidazids **24** (HyperCarb, 10-15 %).

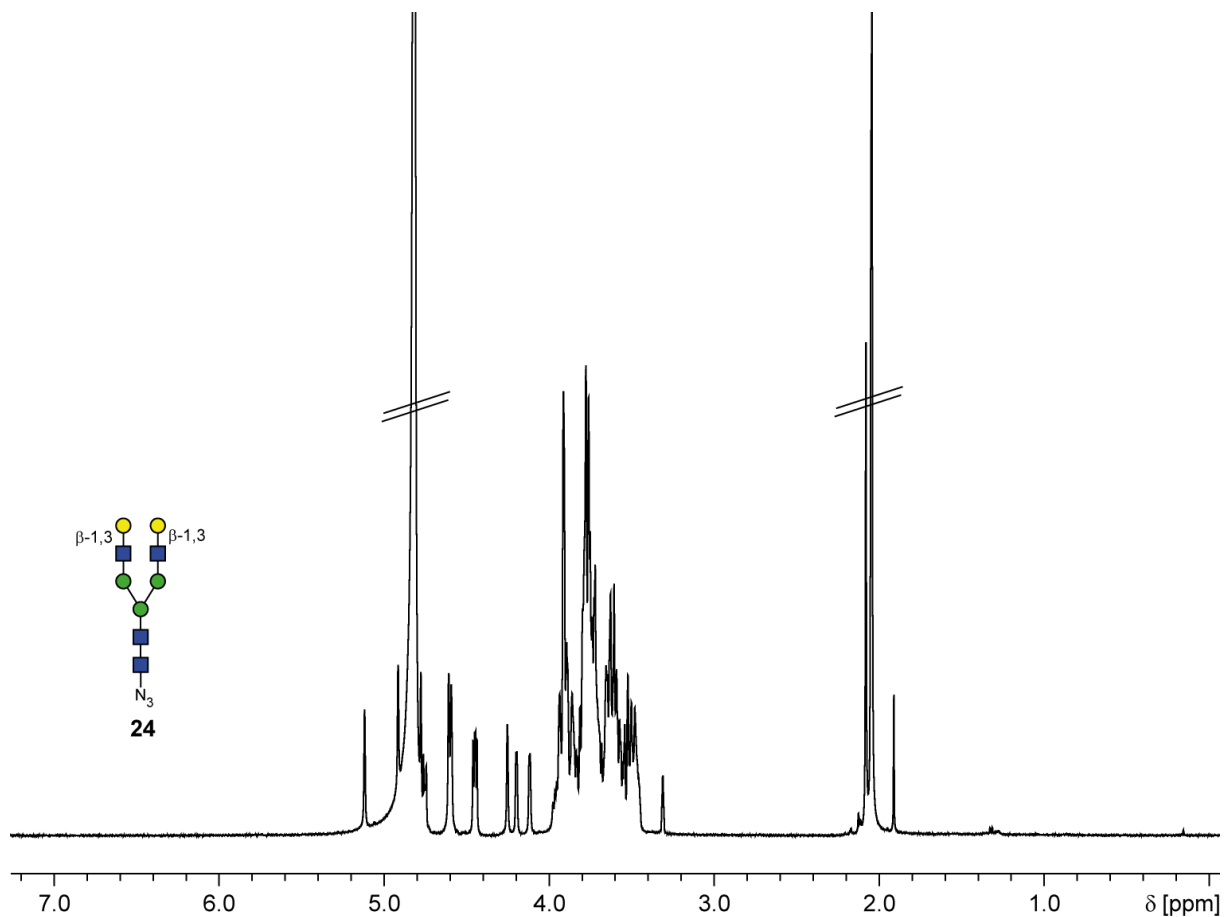


Abbildung 29: ^1H -NMR-Spektrum von **24**.

4. Synthese unsymmetrischer *N*-Glycane

4.1. Synthese monogalactosylierter *N*-Glycane durch Degalactosylierung

Zum Aufbau einer möglichst diversen Glycanbibliothek ist es sinnvoll, neben symmetrischen auch unsymmetrische *N*-Glycane zugänglich zu machen. Letztere sollten durch unvollständige Enzymreaktionen erzeugt werden. Die einfachsten unsymmetrischen *N*-Glycane, die durch einen Abbau des Nonasaccharids **25** zugänglich sind, sind die beiden monogalactosylierten Glycane **26** und **27**. Das an der 1,3-Antenne galactosylierte Octasaccharid **27** konnte bereits von *Perkams* als Nebenprodukt der Extraktion und Modifikation des Sialoglycopeptids **5** identifiziert werden.^[70] Es sollte versucht werden beide Octasaccharide durch unvollständigen Abbau von **25** mit β -Galactosidase zu synthetisieren (Abbildung 30).

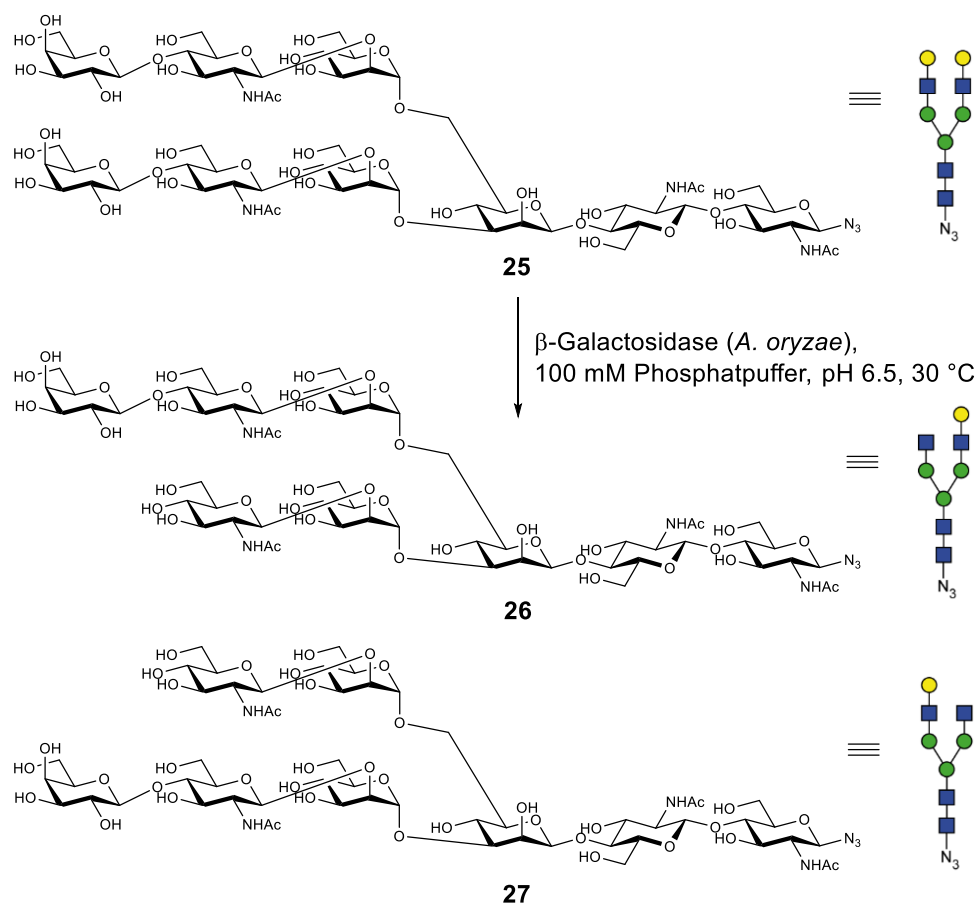


Abbildung 30: Unvollständige enzymatische Degalactosylierung des Nonasaccharidazids **25**.

Um einen unvollständigen Umsatz zu gewährleisten, wurde die Reaktionszeit auf 2 Stunden verkürzt. Außerdem wurde der pH-Wert des Phosphatpuffers vom pH-Optimum der

β -Galactosidase (pH 5) auf pH 6.5 erhöht, um die Reaktionsgeschwindigkeit zu verringern. Ziel war es, einen möglichst hohen Anteil an den Octasacchariden **26** und **27** zu erhalten. Die Überprüfung der Reaktion durch HPLC-MS ergab ein gutes Verhältnis der Produkte (Abbildung 31).

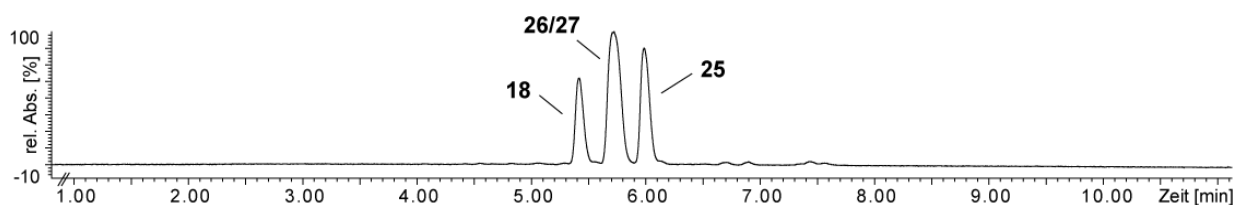


Abbildung 31: UV-Chromatogramm (LC-MS; 200 nm) der unvollständigen Degalactosylierung von **25** (HyperCarb, 5-25 %).

Im Anschluss wurde versucht die Produkte per HPLC zu trennen. Hierbei konnten mit einer C-18 RP-Säule (YMC Hydrosphere[®] C18) das Edukt **25** und das Heptasaccharid **18** von den Octasacchariden **26** und **27** abgetrennt werden. Das Verhältnis der beiden Zielverbindungen **26** und **27** zueinander betrug jedoch ca. 1:4 (Abbildung 32), da die β -Galactosidase aus *Aspergillus oryzae* bevorzugt die Galactose des 1,6-Arms abspaltet.

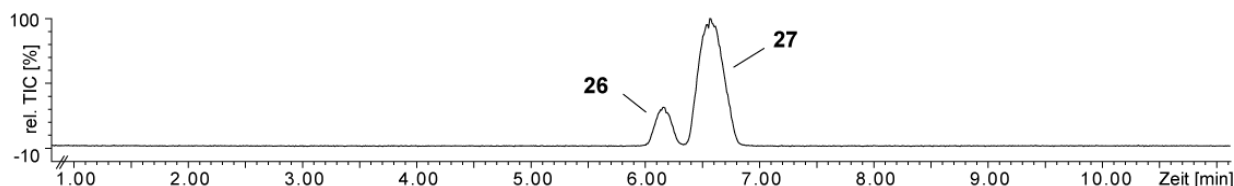


Abbildung 32: TIC-Chromatogramm (LC-MS; 200 nm) der vorgereinigten Octasaccharide **26** und **27** (HyperCarb, 9-14 %).

Um ein ausgeglicheneres Verhältnis von **26** und **27** zu erreichen, wurde versucht das Heptasaccharid **18** unvollständig zu galactosylieren (Abbildung 33). Hierzu wurde die Menge an UDP-Galactose auf 1.5 Äquivalente reduziert. Dadurch war eine vollständige Reaktion ausgeschlossen und die Reaktionszeit musste nicht angepasst werden. Die Reaktion wurde durch Gelfiltration (Sephadex G25) vorgereinigt und mit HPLC-MS analysiert (Abbildung 34). Es zeigte sich, dass auch auf diesem Weg fast nur **27** entstanden war, da die Galactosyltransferase GalT1 den 1,3-Arm bevorzugt galactosyliert.^[79] Es wurde anschließend versucht die Octasaccharide **26** und **27** präparativ zu trennen.

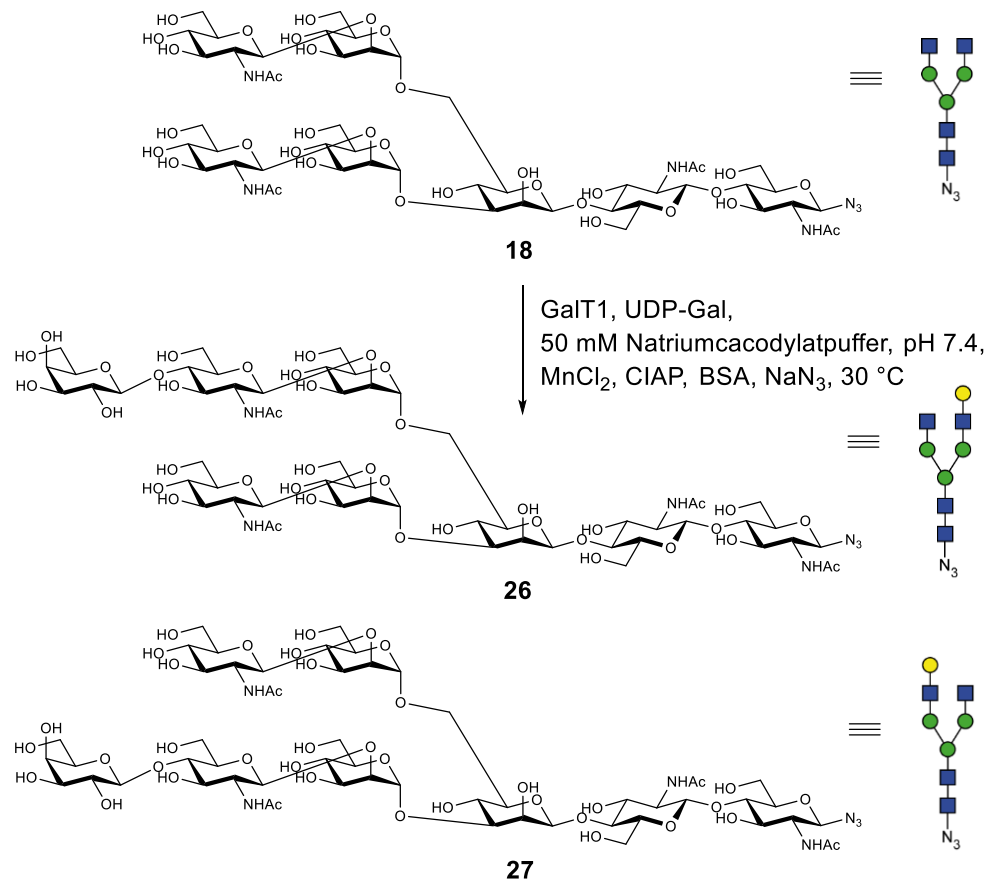


Abbildung 33: Unvollständige Galactosylierung des Heptasaccharidazids **18**.

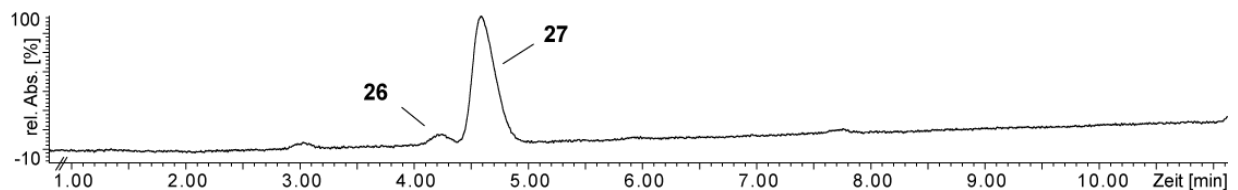


Abbildung 34: UV-Chromatogramm (LC-MS; 200 nm) der vorgereinigten Octasaccharidazide **26** und **27** (HyperCarb, 10-14 %).

Diese konnten jedoch auch unter Verwendung einer für freie Glycane besonders geeigneten graphitbasierten Hypercarb-Säule (Thermo Scientific, 4.6x150 mm) nur bei sehr geringen Auftragungsmengen (ca. 0.5 mg) vollständig getrennt werden. Aufgrund der schwierigen Trennung der beiden Regioisomere wurde ein anderer Weg gesucht, um die Verbindungen **26** und **27** in größeren zu erhalten.

4.2. Synthese monoglucoylierter N-Glycane

Da Galactose und Glucose ähnlich sind und bekannt ist, dass manche Galactosyltransferasen auch UDP-Glucose als Substrat akzeptieren, wurde versucht eine Monoglucoylierung mit Galactosyltransferase (GalT1) durchzuführen. Hierzu wurde das Heptasaccharid **18** mit UDP-Glucose und den Galactosyltransferasen aus *Bos taurus* und *Sus scrofa* getestet (Abbildung 35).

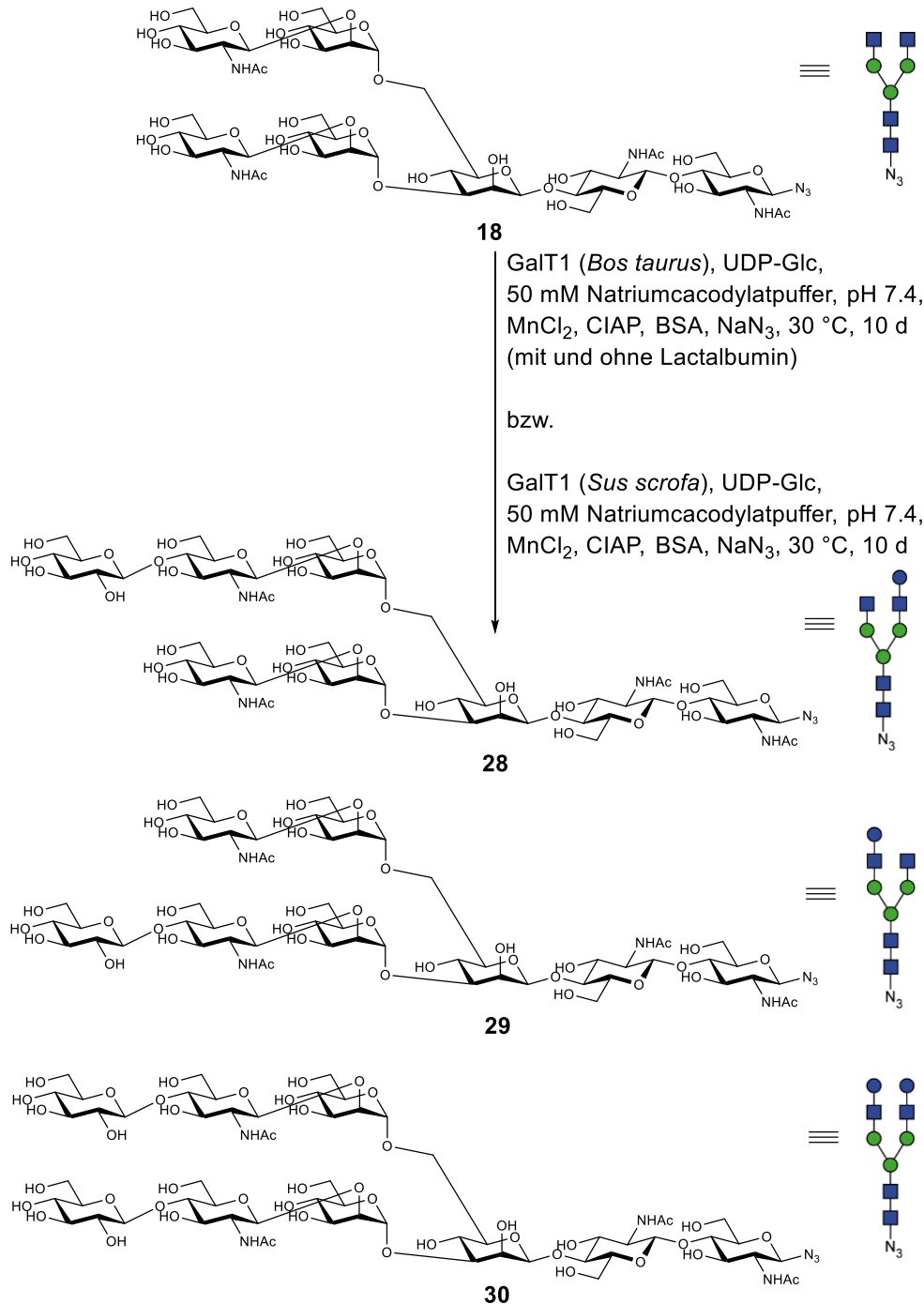


Abbildung 35: Unvollständige enzymatische Glucosylierung des Heptasaccharidazids **18**.

Bei der Reaktion mit GalT1 aus *Bos taurus* wurde untersucht, ob eine Zugabe von Lactalbumin aus *Bos taurus* die Reaktion verbessert^[73]. Die Reaktion wurde nach 10 Tagen mittels LC-MS überprüft (Abbildung 36).

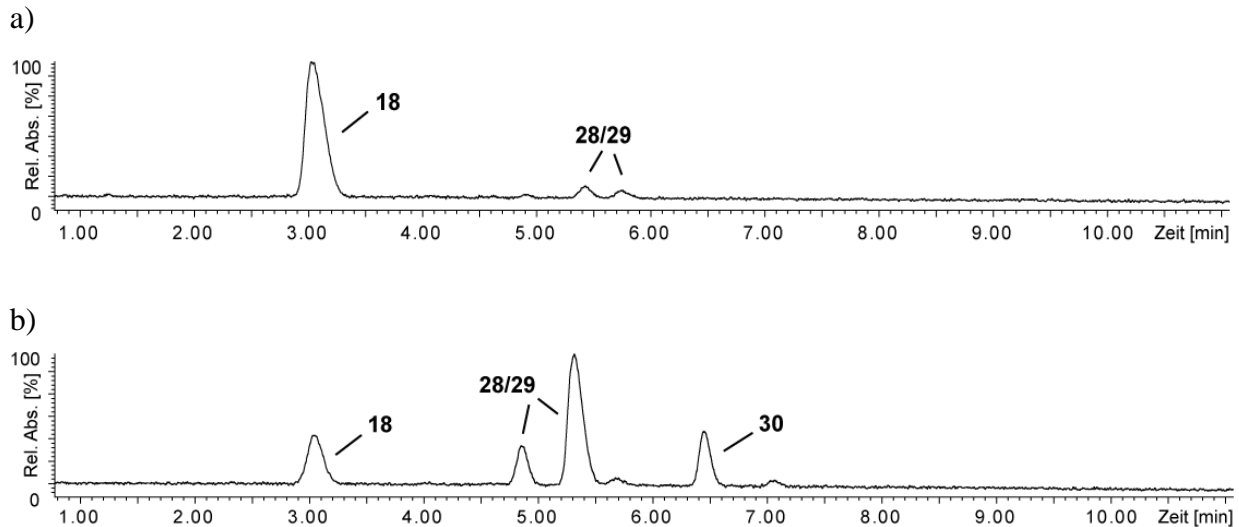


Abbildung 36: UV-Chromatogramm (LC-MS; 200 nm) der unvollständigen Glucosylierung (*Bos taurus*) von **18** mit (a) und ohne (b) Lactalbumin (*HyperCarb*, 10-20 %).

Es zeigte sich, dass das zusätzliche Lactalbumin die Reaktion hemmt. Daher wurde bei der Reaktion mit Galactosyltransferase aus *Sus scrofa* auf Lactalbumin verzichtet. Hierbei wurde nach 10 Tagen ein guter Umsatz erreicht (Abbildung 37).

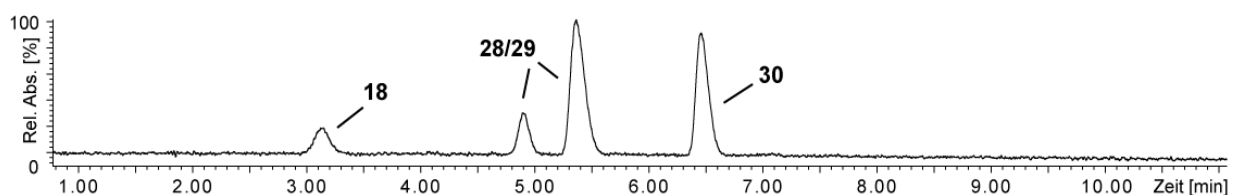


Abbildung 37: Reaktionskontrolle (LC-MS; 200 nm) der unvollständigen Glucosylierung (*Sus scrofa*) von **18** (*HyperCarb*, 10-20 %).

Es zeigte sich, dass beide Galactosyltransferasen auch UDP-Glucose als Substrat akzeptieren, die Galactosyltransferase aus *Sus scrofa* jedoch schneller den gewünschten Umsatz liefert. Erwartungsgemäß verläuft die Reaktion wesentlich langsamer als mit UDP-Galactose, jedoch gelingt die Trennung der beiden monoglucosylierten Produkte **28** und **29** besser als die der monogalactosylierten Glycane **26** und **27**. Da Glucose an dieser Stelle nicht in *N*-Glycanen auftritt, wurde eine Mischung der monoglucosylierten Glycane **28** und **29** (3mM) mit UDP-Galactose und Galactosyltransferase umgesetzt (Abbildung 38).

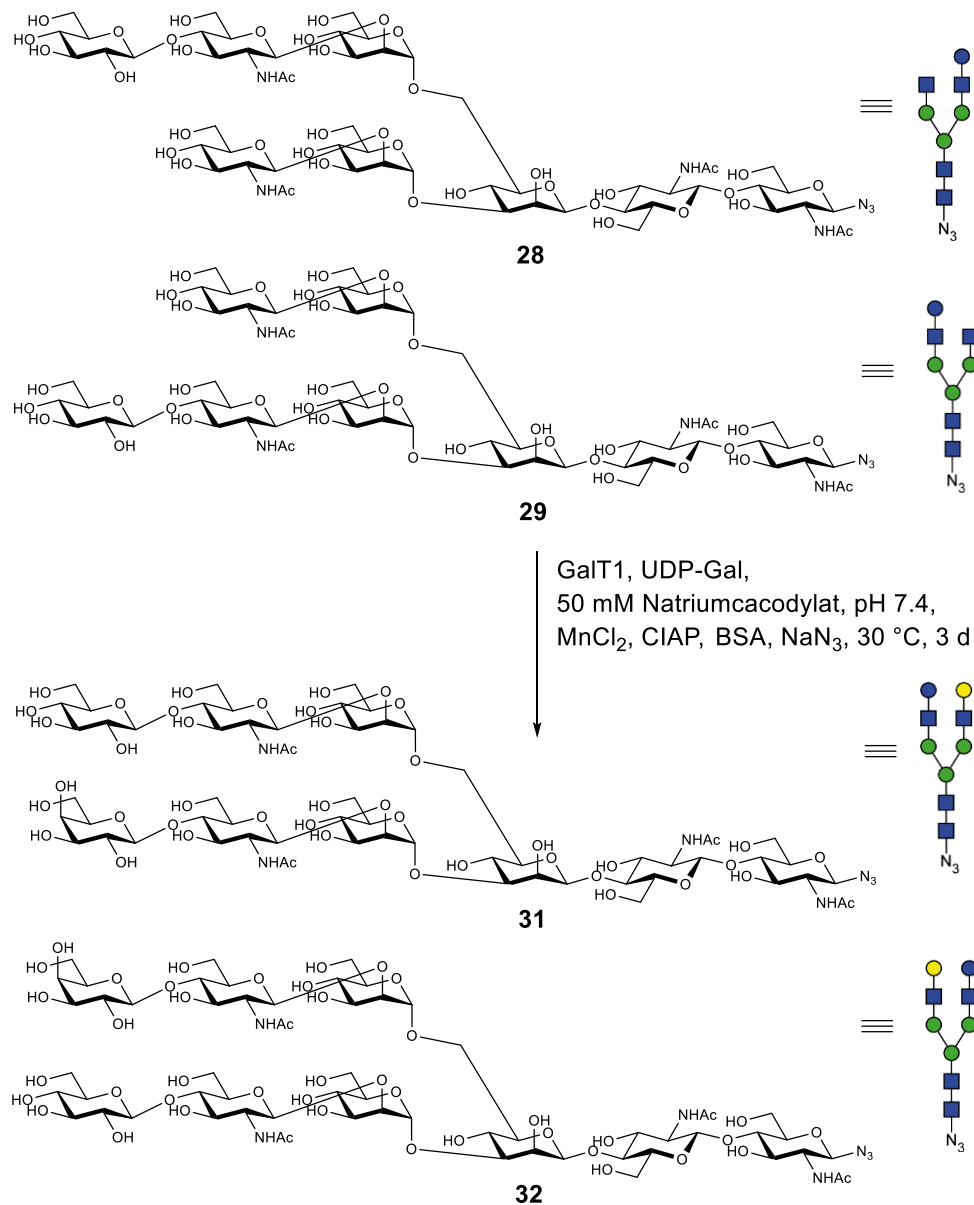


Abbildung 38: Enzymatische Galactosylierung der glucosylierten Octasaccharidazide **28** und **29**.

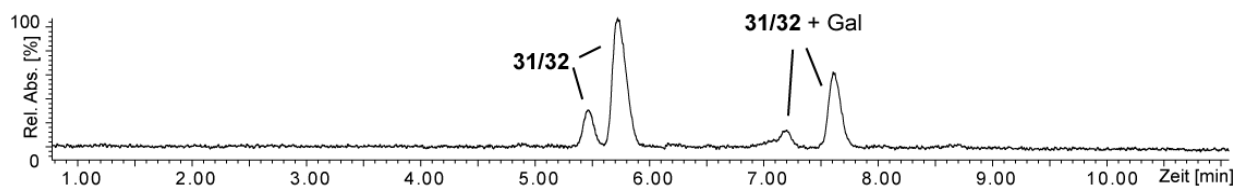


Abbildung 39: UV-Chromatogramm (LC-MS; 200 nm) der Galactosylierung von **28** und **29** (HyperCarb, 10-20 %).

Nach 3 Tagen wurde die Reaktion durch LC-MS überprüft (Abbildung 39). Neben der Übertragung einer Galactose auf das terminale GlcNAc, fand jedoch eine Überreaktion statt, bei der eine zusätzliche Galactose wahrscheinlich auf die terminale Glucose übertragen wird. Des Weiteren konnte keine Glucosidase gefunden werden, die keine zusätzliche Galactosidase-

Aktivität besitzt. Daher ist die Monoglycosylierung keine geeignete Methode, um die monogalactosylierten Glycane **26** und **27** herzustellen.

4.3.Synthese monosialylierter N-Glycane

Da bekannt ist, dass sialylierte Verbindungen auf RP-HPLC-Säulen stärker retardieren als nicht sialylierte, sollte getestet werden, ob dies auch die Trennung unsymmetrischer Glycane verbessern kann. Hierzu wurden die beiden monosialylierten N-Glycane **35** und **36** hergestellt (Abbildung 40).

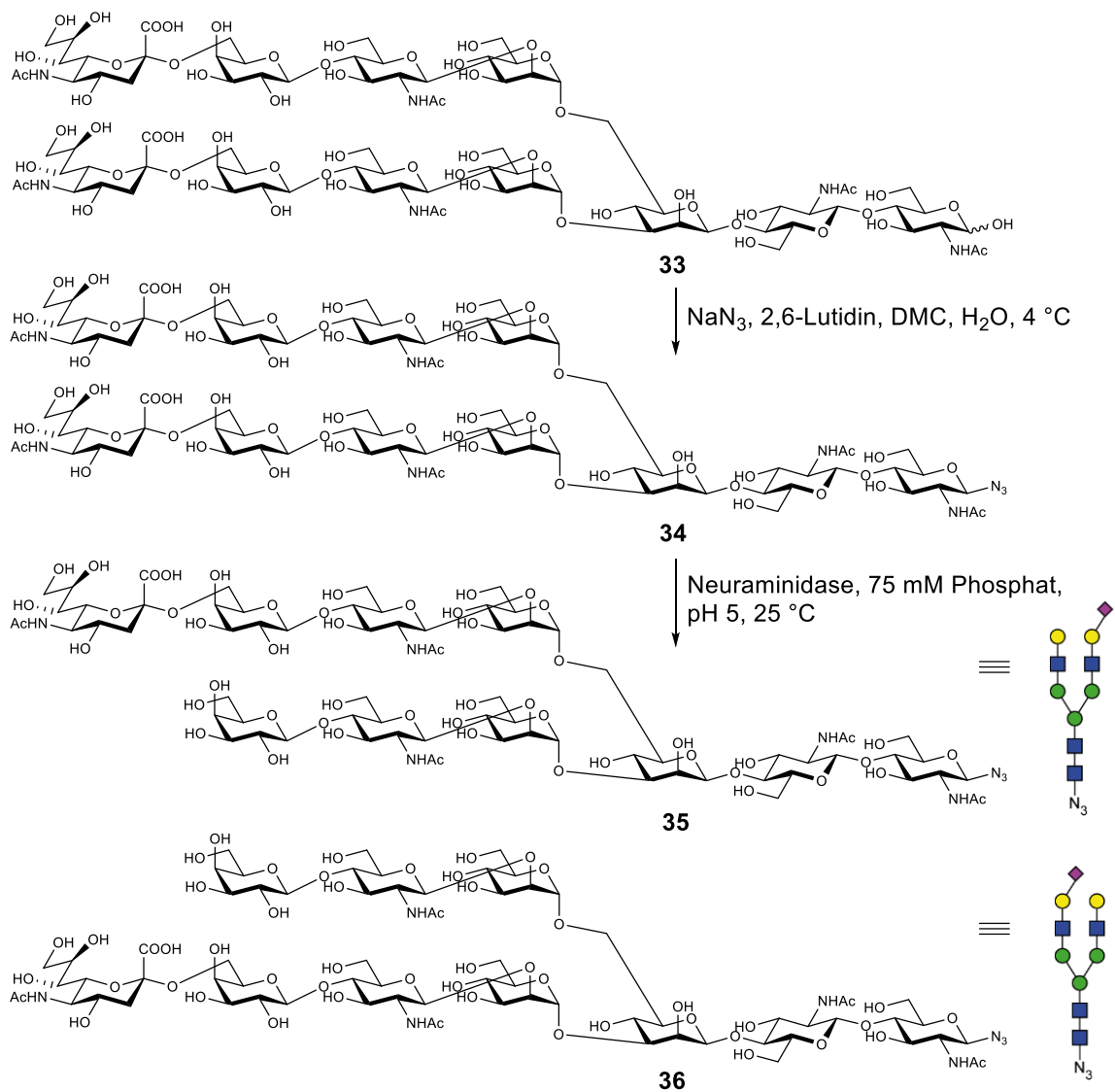


Abbildung 40: Synthese und enzymatische Desialylierung des Undecasaccharidazids **34**.

Perkams konnte diese Verbindungen erhalten, indem das Halbacetal **33** azidiert und anschließend die Sialinsäuren unvollständig durch Neuraminidase entfernt wurden.^[80]

Alternativ sollte getestet werden, ob die unsymmetrischen Decasaccharide **35** und **36** auch durch unvollständige Sialylierung des Nonasaccharids **25** hergestellt werden können (Abbildung 41). Dies hätte den Vorteil, dass **25** als Ausgangsverbindung weiterer unsymmetrischer Glycane dienen könnte. Weiterhin ist **25** leichter per RP-HPLC zu reinigen als das Undecasaccharidazid **34**. Das Nonasaccharid **25** wurde bei pH 9 mit der 2,6-Sialyltransferase ST6 aus *Photobacterium damsela*e umgesetzt. Um eine Monosialylierung zu erreichen, wurden 1.2 Äquivalente CMP-Neuraminsäure eingesetzt.

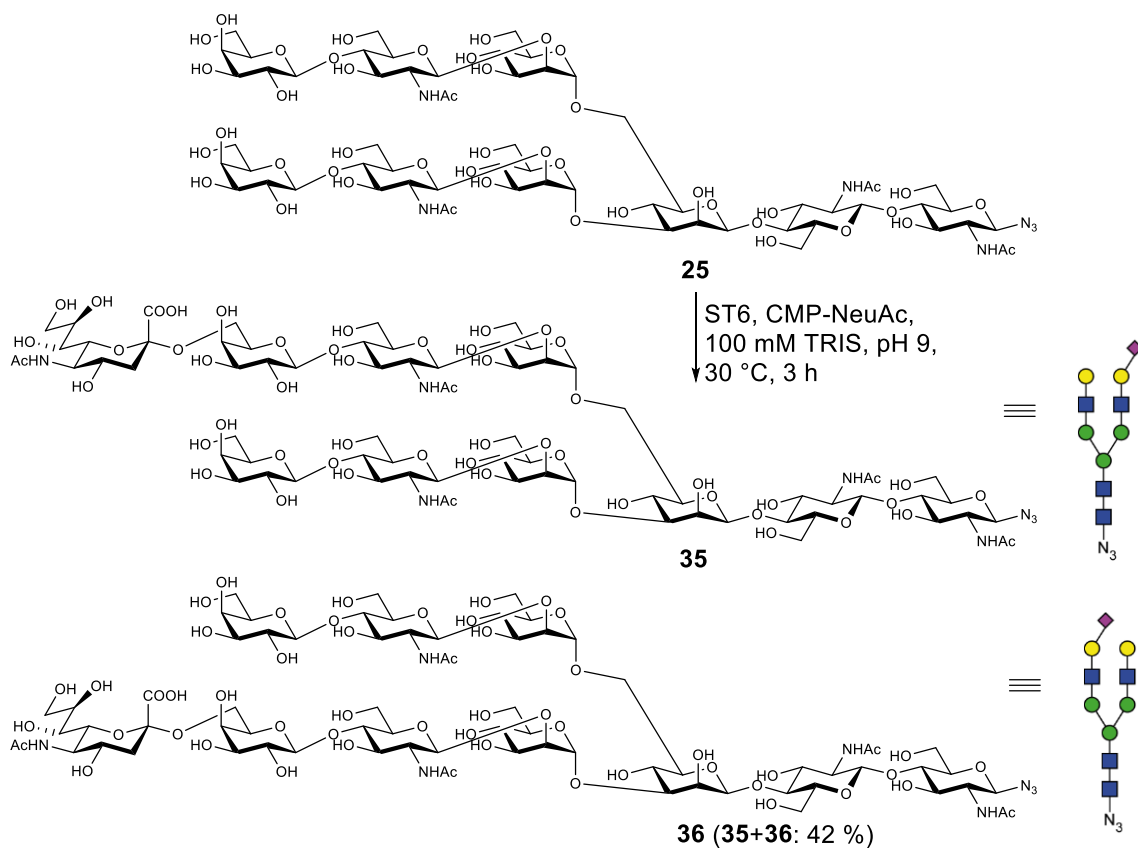


Abbildung 41: Unvollständige enzymatische 2,6-Sialylierung des Nonasaccharidazids **25**.

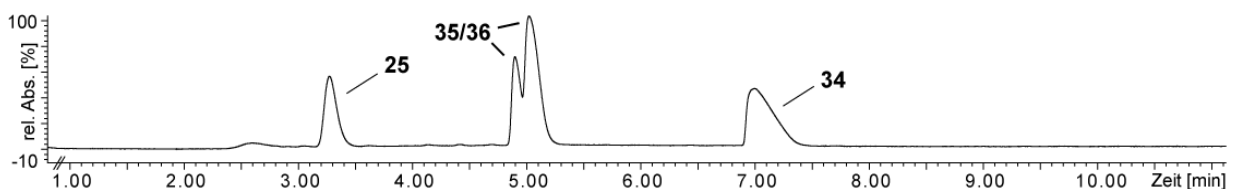


Abbildung 42: UV-Chromatogramm (LC-MS; 200 nm) der unvollständigen 2,6-Sialylierung von **25** (Hydrosphere C18, 0-15 %).

Nach 3 h Reaktionszeit wurde die Reaktion beendet und durch HPLC gereinigt (Abbildung 42). Dabei konnten die beiden monosialylierten Zielverbindungen **35** und **36** als Mischung in einer

Ausbeute von 42 % erhalten werden. Ein Großteil dieser Mischung konnte über eine C-18 RP-Säule (YMC Hydrosphere[®] C18) aufgetrennt werden. Die Fraktionen mit den sialylierten Verbindungen wurden mit NH₄HCO₃ neutralisiert, um eine saure Hydrolyse der Sialoside zu verhindern. Der Salzanteil wurde durch anschließende Gelfiltration über eine Sephadex G25-Säule entfernt. Da bei der Trennung immer eine Mischfraktion entstand, wurde nur eine gemeinsame Ausbeute von **35** und **36** angegeben. Die beiden unsymmetrischen Verbindungen konnten in guter Reinheit erhalten werden. Durch HPLC-MS (Abbildung 43) und NMR (Abbildung 44) konnte die Reinheit und die Struktur von **35** und **36** bestätigt werden.

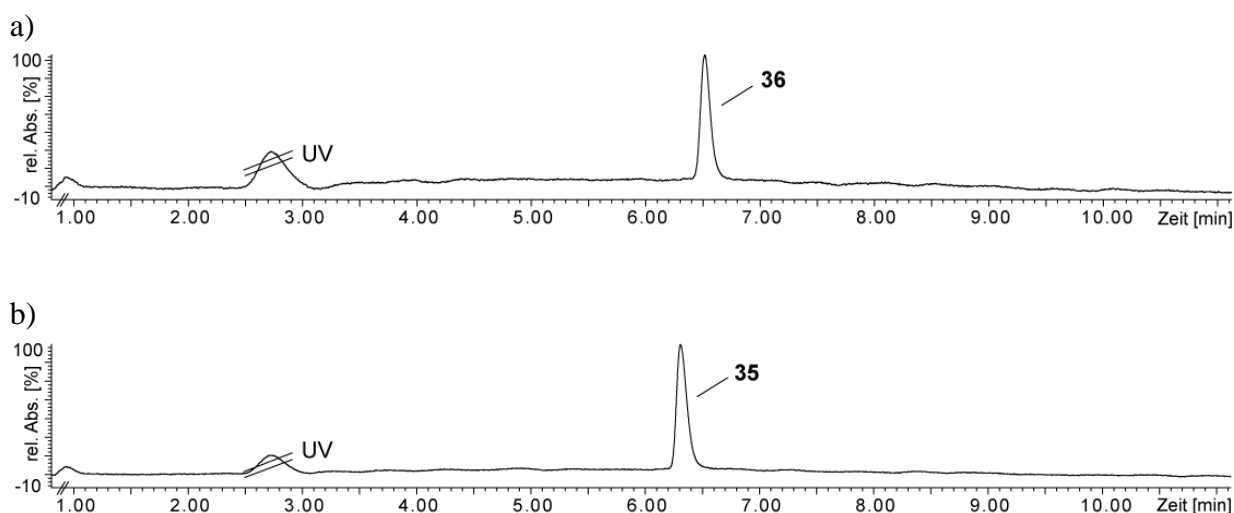


Abbildung 43: UV-Chromatogramme (LC-MS; 200 nm) der gereinigten Decasaccharidazide **36** (a) und **35** (b) (Hydrosphere C18, 0-10 %).

Während die Unterscheidung der terminalen Zucker in den Antennen symmetrischer Glycane bisweilen nur über Umwege, wie zum Beispiel der Messung von *pseudo-contact-shifts* nach Komplexierung paramagnetischer Lanthanoid-Ionen möglich ist,^[81,82] gelingt dies bei unsymmetrischen Glycanen oft bereits im ¹H-NMR-Spektrum. Beim genauen Vergleich der anomeren Signale der α -1,3-verknüpften (H-1⁴) und der α -1,6-verknüpften Mannose (H-1^{4'}) wird eine Verschiebung im Vergleich zu den entsprechenden Signalen der Referenzverbindung **25** (in schwarz dargestellt) beobachtet. Bei der in blau dargestellten Verbindung verschiebt sich das Signal von H-1⁴. Daher sollte die zusätzliche Sialinsäure an der 1,3-Antenne vorliegen. Im Gegensatz dazu verschiebt sich bei der in rot dargestellten Verbindung das Signal von H-1^{4'}, die Sialinsäure sollte sich in dem 1,6-Arm befinden.

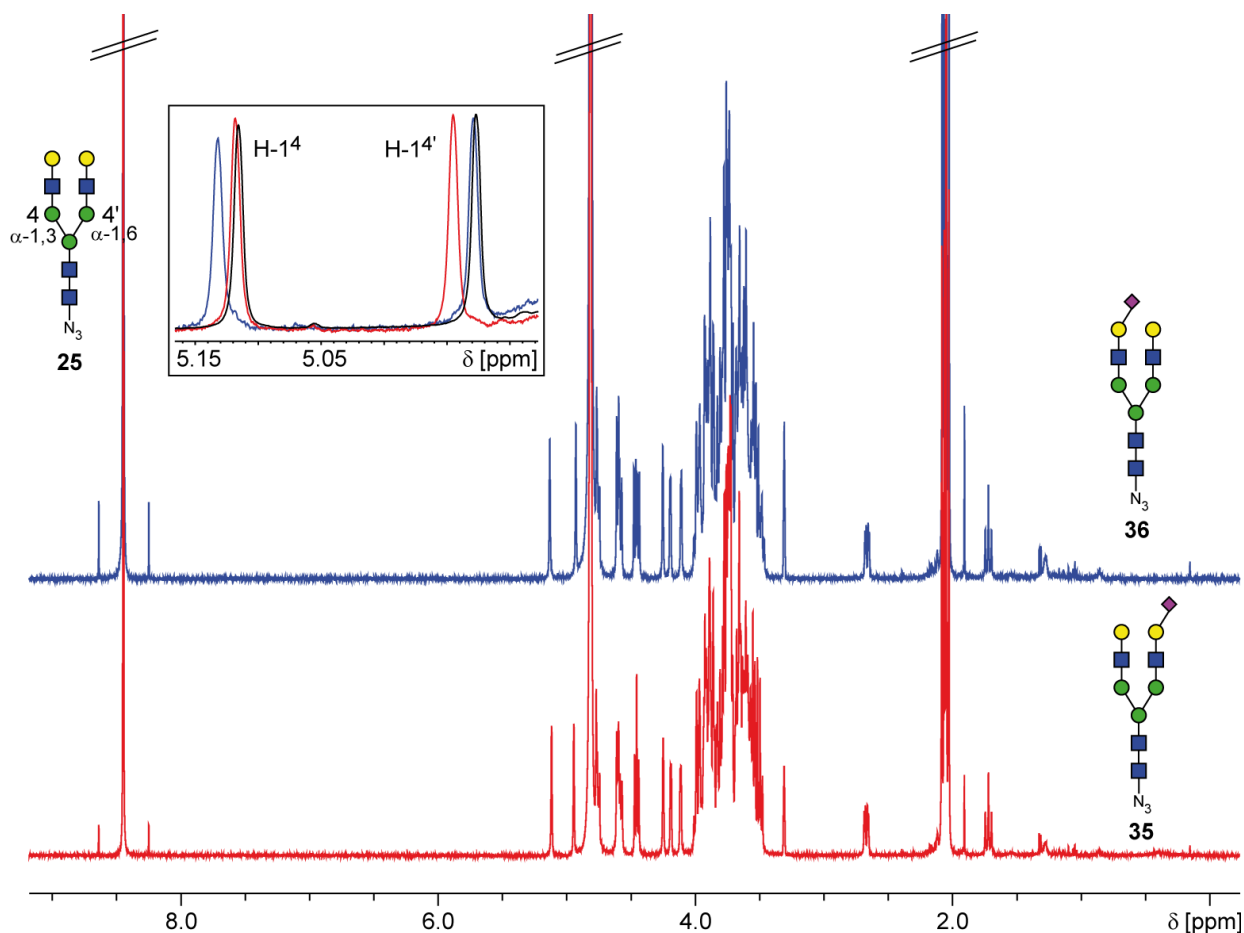


Abbildung 44: ¹H-NMR-Spektren von **36** (blau) und **35** (rot) mit **25** als Referenz (schwarz).

Da für ¹H-Spektren nur eine relativ geringe Substanzmenge nötig ist, kann hier bereits bei kleinen Mengen eine relativ verlässliche erste Zuordnung erfolgen. Für eine genaue Zuordnung der einzelnen Monosaccharide zu den beiden Armen werden zweidimensionale NMR-Spektren, vor allem NOESY-Experimente herangezogen.^[83] In Abbildung 45 ist ein Ausschnitt der NOESY-Spektren von **35** und **36** dargestellt.

Die wesentlichen Unterschiede der NOESY-Spektren von **35** und **36** liegen in den Crosspeaks der *N*-Acetylglucosamine (H-1⁵ und H-1^{5'}) mit der 1,3- bzw. 1,6-verknüpften Mannose (H-1⁴ und H-1^{4'}). Im NOESY-Spektrum von Decasaccharid **35** ist zu erkennen, dass die *N*-Acetylglucosamin-Signale H-1⁵ und H-1^{5'} unterscheidbar sind. Bei Verbindung **36** ist zu erkennen, dass H-1⁵ und H-1^{5'} ihren Platz tauschen. Abgesehen von diesen Zuordnungen lassen sich aus den NOESY-Spektren keine weiteren Rückschlüsse ziehen. Die Zuordnung der Verbindungen **35** und **36** über das ¹H-NMR-Spektrum zeigte eine Selektivität der Sialyltransferase.

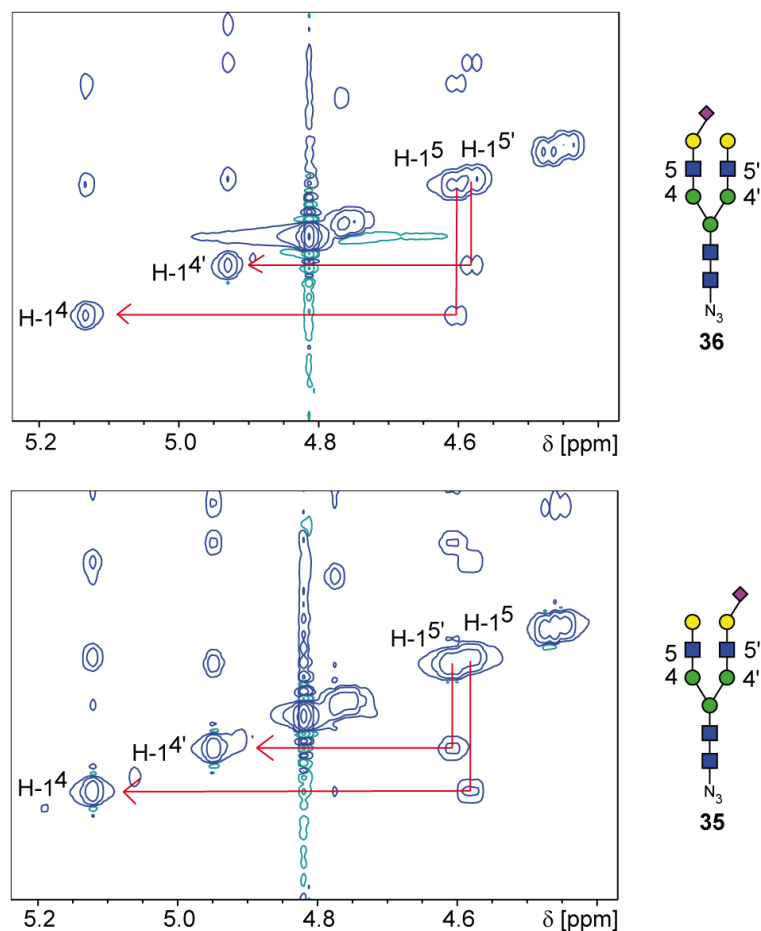


Abbildung 45: Ausschnitte der NOESY-NMR-Spektren von **35** (unten) und **36** (oben).

Da die 2,6-Sialyltransferase besser am 1,3-Arm angreifen kann, da dieser weniger flexibel ist, ist davon auszugehen, dass das bevorzugt gebildete Glycan **36** auf der verwendeten C-18 RP-HPLC-Säule (YMC Hydrosphere[®] C18) nach **35** eluiert.^[84] Diese Annahme wurde durch ¹H-NMR-Spektren bestätigt.

Da das Verhältnis der beiden monosialylierten Verbindungen **35** und **36** (1:3) durch die Bevorzugung des 1,3-Arms nicht optimal ist, wurde versucht das Nonasaccharid **25** zunächst vollständig zu sialylieren und anschließend durch Behandlung mit Neuraminidase die unsymmetrischen Verbindungen zu erhalten (Abbildung 46). Hierzu wurde **25** mit 3 eq CMP-Neuraminsäure und ST6 aus *Photobacterium damsela* umgesetzt. Nach 2 Stunden Inkubation wurde die Zielverbindung durch RP-HPLC gereinigt. In diesem Fall wurde trotz der im Laufmittel vorhandenen Ameisensäure kein Neutralisierungs- und Gelfiltrationsschritt durchgeführt, da die Sialinsäuren im nächsten Schritt ohnehin abgespalten wurden.

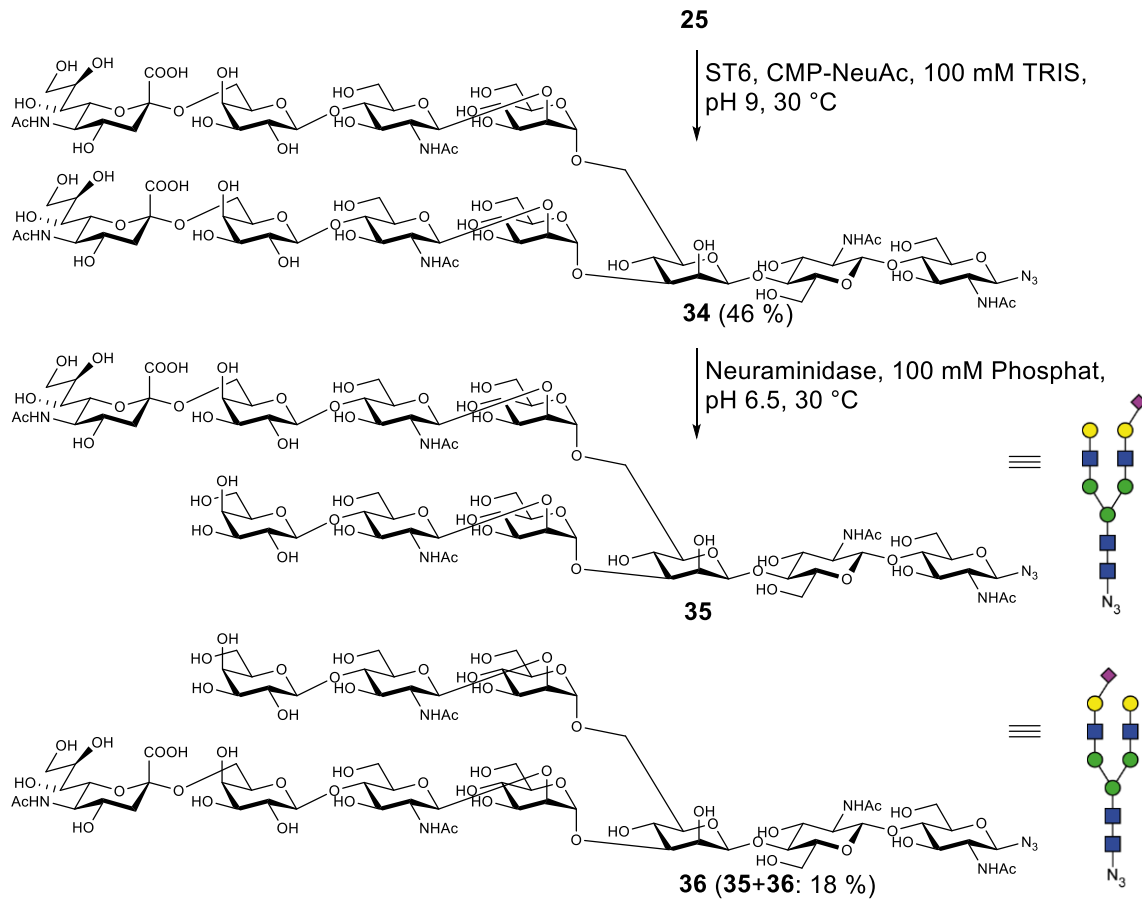


Abbildung 46: Enzymatische vollständige Sialylierung und anschließende unvollständige Desialylierung des Nonasaccharidazids **25**.

Das gereinigte Undecasaccharid **34** wurde im Anschluss bei pH 6.5 mit Neuraminidase aus *Clostridium perfringens* umgesetzt. Die Reaktionszeit (75 Minuten) wurde relativ kurz gewählt, um eine Überreaktion zu verhindern. Unter diesen Bedingungen konnte ein fast ausgeglichenes Verhältnis der beiden Decasaccharide **35** und **36** erhalten werden (Abbildung 47).

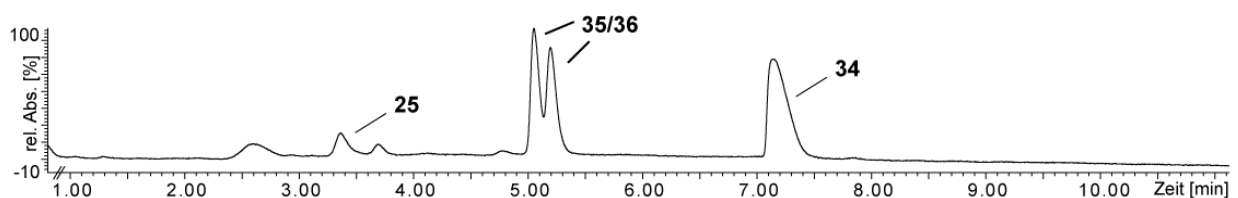


Abbildung 47: UV-Chromatogramm (LC-MS; 200 nm) der unvollständigen Desialylierung von **34** (Hydrosphere C18, 0-15 %).

Daher wurde zur Darstellung unsymmetrischer 2,6-sialylierter Verbindungen dieser Weg bevorzugt. Aufgrund der unvollständigen Trennung durch RP-HPLC ergab sich eine Ausbeute von 18 % der Mischung aus **35** und **36**. Die Ausbeute kann erhöht werden, indem das

wiedergewonnene Undecasaccharid **34** nach der HPLC-Trennung mit Neuraminidase umgesetzt wird. Als Alternative zum Neuraminidase-Verdau wurde eine unvollständige Desialylierung mit Propionsäure versucht (Abbildung 48).

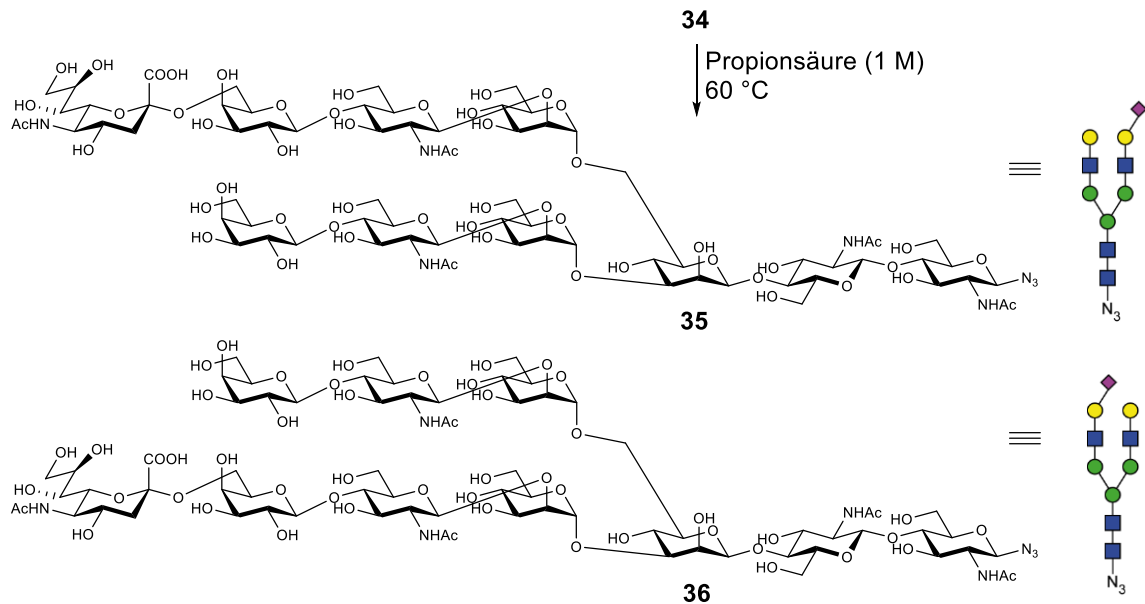


Abbildung 48: Unvollständige Desialylierung des Undecasaccharidazids **34** mit Propionsäure.

Dazu wurde **34** in 1 M Propionsäure (pH 4) gelöst und bei 60 °C inkubiert. Nach 90 Minuten wurde die Mischung mit 1 M Natriumcarbonat neutralisiert und die Reaktion durch HPLC-MS kontrolliert (Abbildung 49).

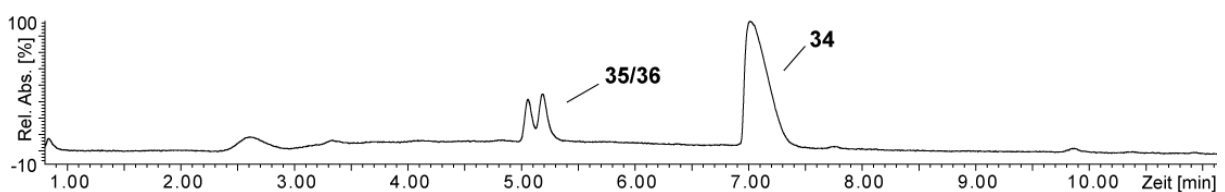


Abbildung 49: UV-Chromatogramm (LC-MS; 200 nm) der unvollständigen Desialylierung von **34** mit Propionsäure (Hydrosphere C18, 0-15 %).

Auch bei dieser Variante entstanden die beiden unsymmetrischen Zielprodukte **35** und **36** im Verhältnis von ca. 1:1. Die Produkte wurden nach weiteren 30 Minuten Inkubation per HPLC getrennt. Jedoch erschwerte das durch die Neutralisation entstandene Salz die erste HPLC-Trennung. Es sollte getestet werden, ob sich auch unsymmetrische 2,3-sialylierte Verbindungen durch unvollständige Sialylierung herstellen lassen und ob deren Trennung gelingt (Abbildung 50). Hierzu wurde das Nonasaccharid **25** bei pH 7.1 mit CMP-Neuraminsäure (1.5 eq) und ST3 aus *vibrio species* umgesetzt.

Als Reaktionszeit wurden 45 Minuten gewählt, da ST3 Sialidase-Aktivität besitzt.^[70] Bei längerer Reaktionszeit können Sialinsäuren abgespalten werden und das Edukt **25** bildet sich zurück. Die Reaktion wurde mittels HPLC-MS kontrolliert.

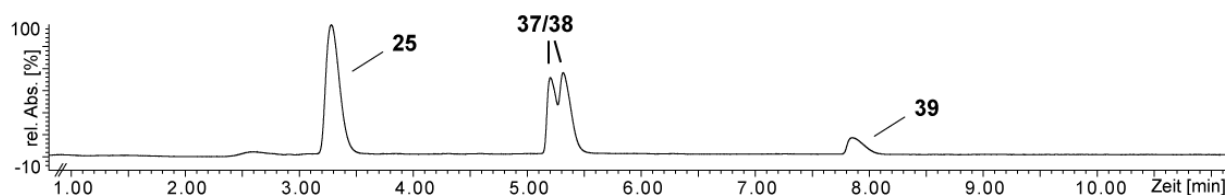


Abbildung 50: UV-Chromatogramm (LC-MS; 200 nm) der unvollständigen 2,3-Sialylierung von **25** (Hydrosphere C18, 0-15 %).

Nach 45 Minuten konnte ein gutes Verhältnis der beiden gebildeten unsymmetrischen *N*-Glycane **37** und **38** (ca. 1:1) gegenüber dem Edukt **25** und dem disialylierten Glycan **39** beobachtet werden (Abbildung 50). Dadurch war die unvollständige Desialylierung von **39** nicht notwendig. Wie bei den 2,6-sialylierten Verbindungen **35** und **36** wurde auch hier nur eine gemeinsame Ausbeute von 27 % bestimmt.

Die Reaktionsmischung wurde per Gelfiltration vorgereinigt und anschließend durch HPLC getrennt. Dabei war der Retentionszeitunterschied der beiden einfach 2,3-sialylierten *N*-Glycane etwas geringer als der der 2,6-sialylierten Analoga. Trotzdem konnte die Mischung getrennt werden und die beiden unsymmetrischen Verbindungen **37** und **38** wurden in hoher Reinheit erhalten. Die Produkte wurden durch HPLC-MS (Abbildung 51) und NMR charakterisiert. (Abbildung 52)

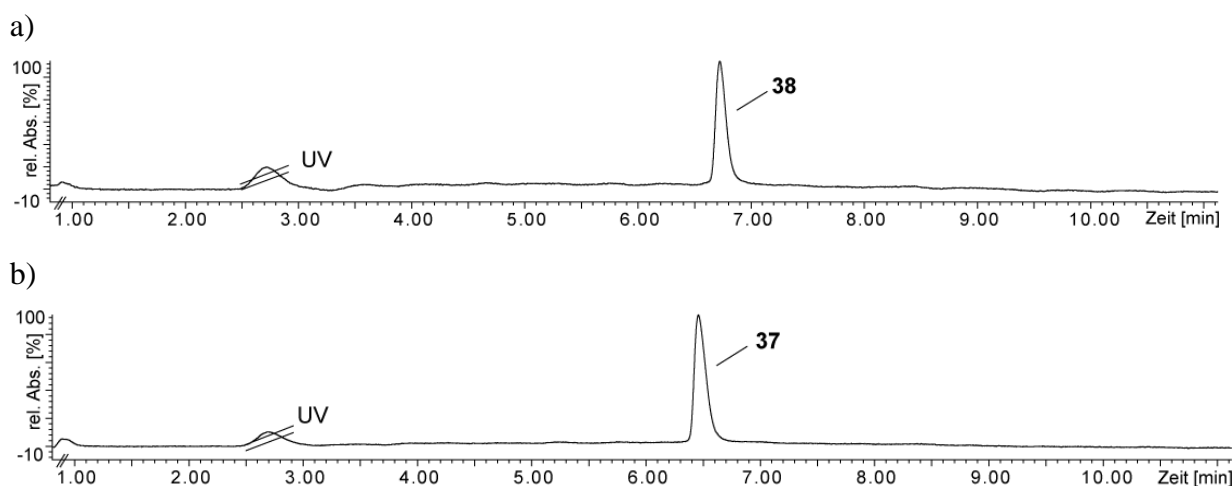


Abbildung 51: UV-Chromatogramme (LC-MS; 200 nm) der gereinigten Decasaccharidazide **38** (a) und **37** (b) (Hydrosphere C18, 0-10 %).

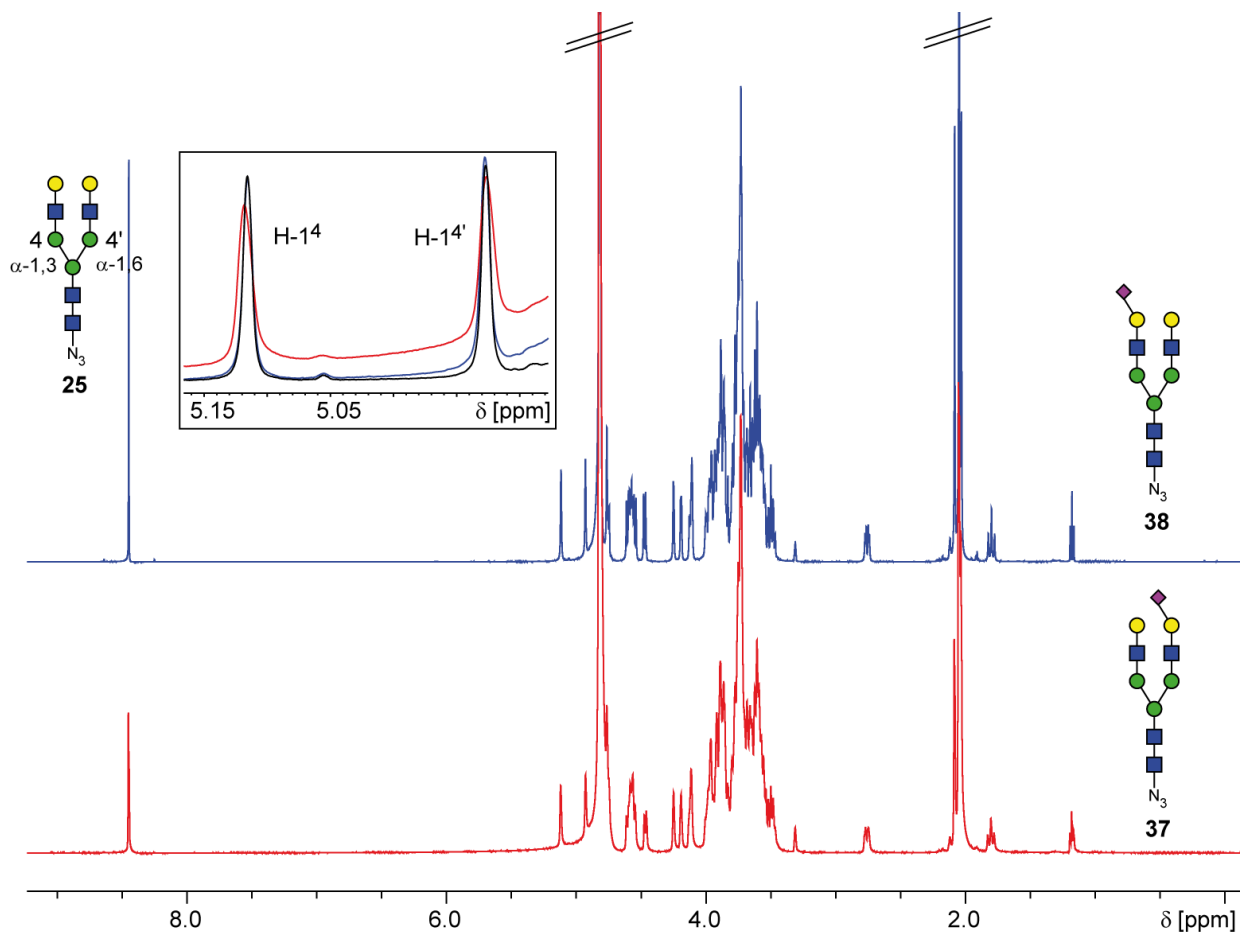


Abbildung 52: ¹H-NMR-Spektren von **38** (blau) und **37** (rot) mit **25** als Referenz (schwarz).

Während sich die anomeren α -Mannose-Signale bei den einfach 2,6-sialylierten Glycanen **35** und **36** leicht verschoben, war bei den 2,3-sialylierten Analoga keine Verschiebung erkennbar. Auch durch NOESY-Spektren konnten nur die H-1⁵ und H-1^{5'}-Resonanzen den Signalen von H-1⁴ und H-1^{4'} zugeordnet werden. Eine sichere Zuordnung konnte erst nach weiteren Reaktionsschritten rückwirkend getroffen werden.

4.4. Degalactosylierung monosialylierter *N*-Glycane

Da die Trennung der biantennären monosialylierten *N*-Glycane schwierig war, wurde versucht die monosialylierten Glycane **35** und **36** mit β -Galactosidase zu verkürzen und die Derivate durch RP-HPLC zu trennen (Abbildung 53).

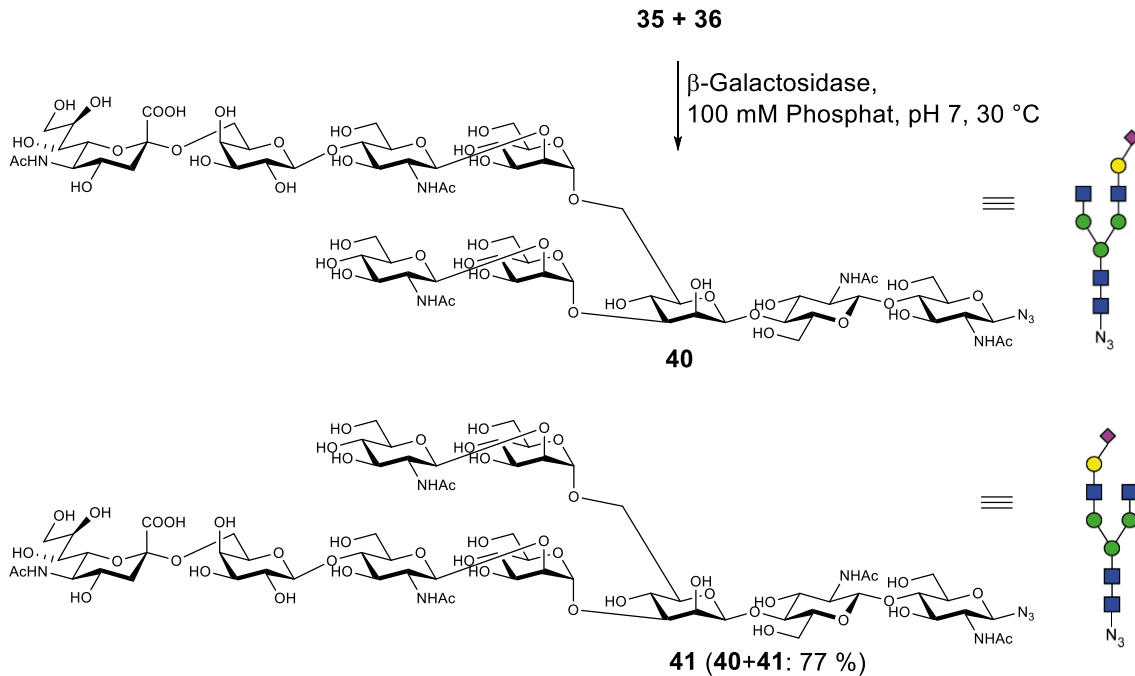


Abbildung 53: Enzymatische Degalactosylierung der Decasaccharidazide **35** und **36**.

Nach 3 Tagen Inkubation wurde die Mischung per RP-HPLC getrennt. Die beiden Zielverbindungen **40** und **41** konnten in guter Reinheit und mit Ausbeuten von 36 % und 41 % erhalten werden. Die Reinheit konnte durch HPLC-MS (Abbildung 54) und NMR (Abbildung 55) bestätigt werden.

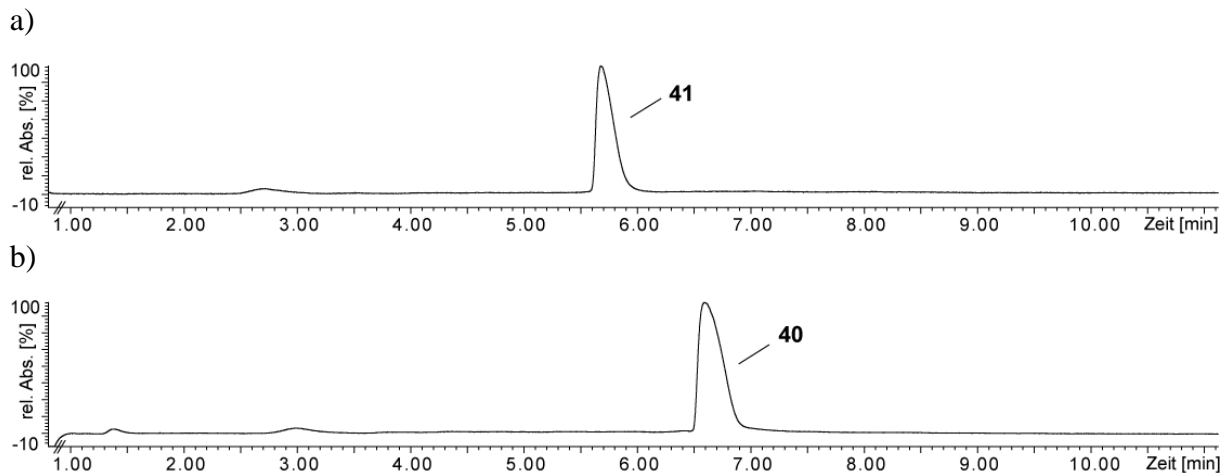


Abbildung 54: UV-Chromatogramme (LC-MS; 200 nm) der gereinigten Nonasaccharidazide **41** (a) und **40** (b) (Hydrosphere C18, 0-10 %).

Wie bei den 2,6-monosialylierten Glycanen **35** und **36** war auch hier eine deutliche Verschiebung der Signale der anomeren α -Mannose-Protonen durch die Sialylierung zu beobachten. Als Referenz wurde bei den degalactosylierten Verbindungen **40** und **41** das Heptasaccharid **18** verwendet. Die auf einer Hydrosphere C18-Säule zuerst eluierende Verbindung (blau) wies im $^1\text{H-NMR}$ eine Verschiebung des H-1^4 auf. Galactose und Sialinsäure befinden sich folglich mit großer Wahrscheinlichkeit am 1,3-Arm (**41**). Bei der später eluierenden Verbindung (rot) ist eine deutliche Verschiebung des $\text{H-1}^{4'}$ zu beobachten. Es handelt sich hierbei um das am 1,6-Arm galactosylierte und sialylierte Glycan **40**.

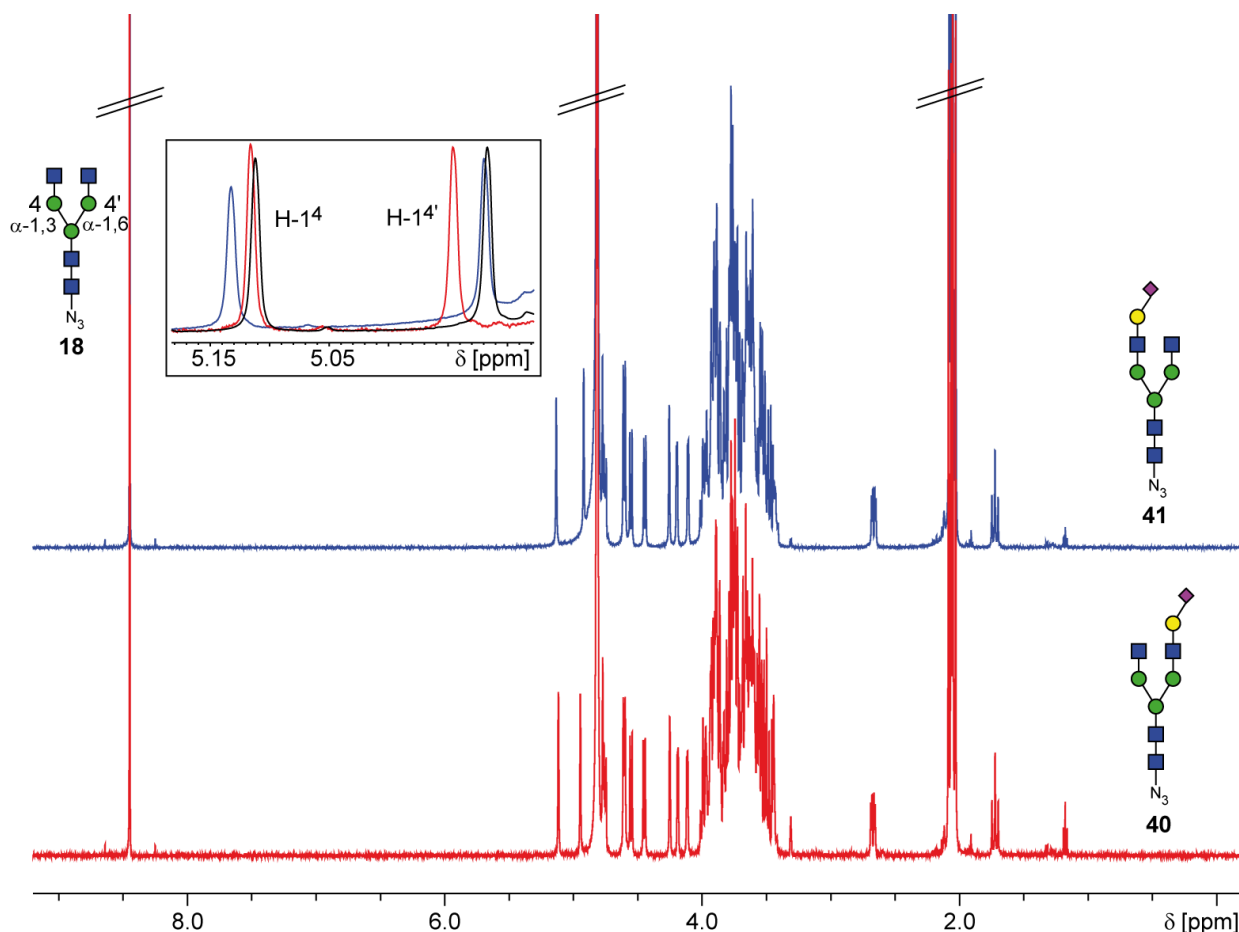


Abbildung 55: $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von **41** (blau) und **40** (rot) und **18** als Referenz (schwarz).

Da eine Degalactosylierung die Trennbarkeit der einfach 2,6-sialylierten N -Glycane verbesserte, sollte diese auch für die entsprechenden 2,3-sialylierten Verbindungen getestet werden. Hierzu wurde eine Mischung der monosialylierten Glycane **37** und **38** mit β -Galactosidase bei $\text{pH}^{\circ}7$ umgesetzt (Abbildung 56). In Abbildung 57 sind die Reaktionskontrollen der 2,3-sialylierten Verbindungen **42** und **43** und der 2,6-sialylierten Verbindungen **40** und **41** vergleichend dargestellt wobei eine etwas bessere analytische Trennung der 2,6-sialylierten Analoga beobachtet wurde.

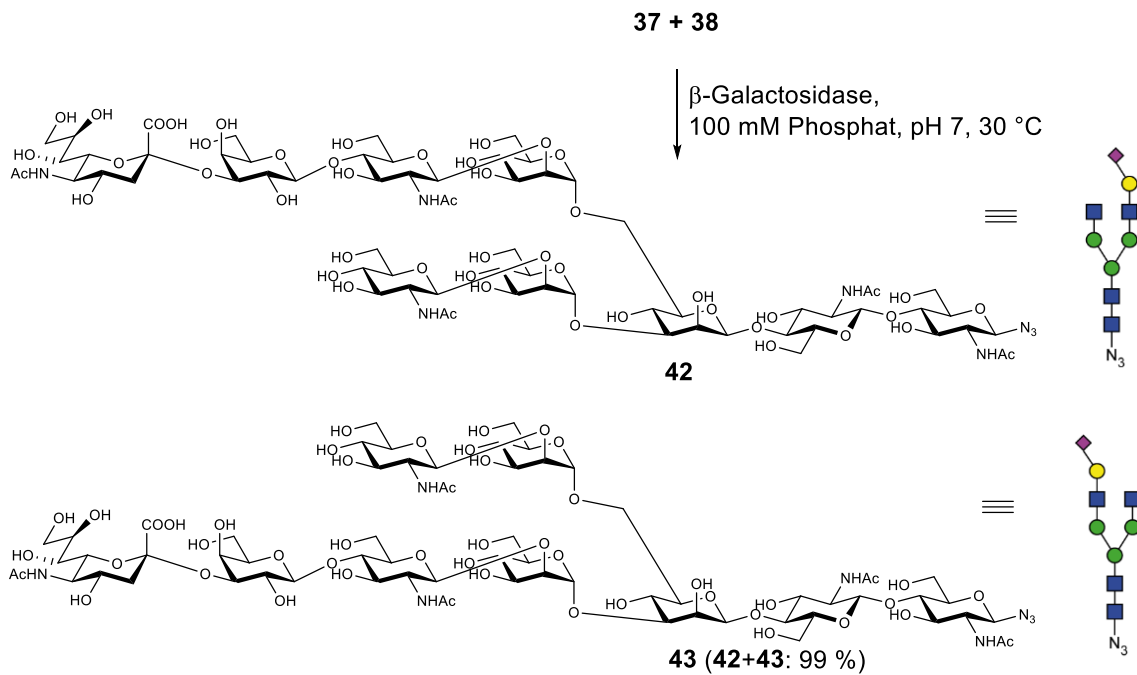


Abbildung 56: Enzymatische Degalactosylierung der Decasaccharidazide **37** und **38**.

Nach 3 Tagen wurde die Reaktion durch RP-HPLC gereinigt, wobei gegenüber den Ausgangsverbindungen eine deutlich verbesserte Trennung beobachtet wurde.

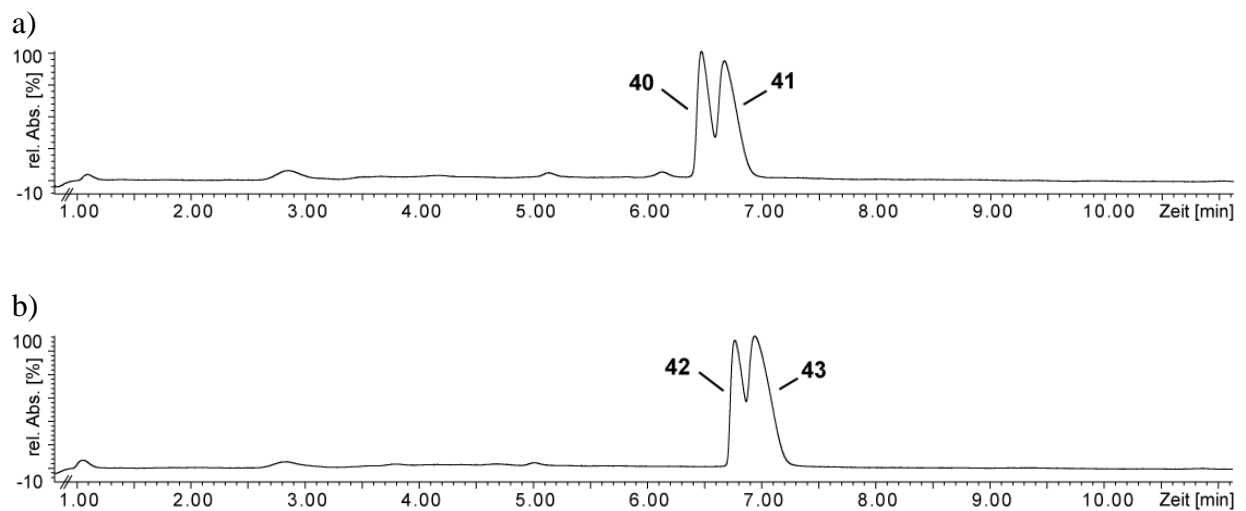
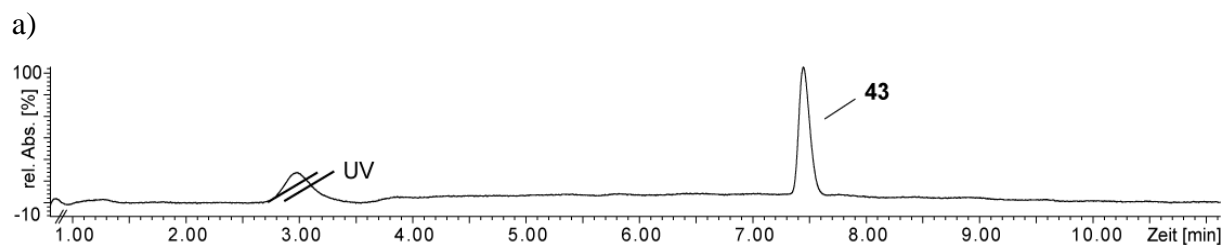


Abbildung 57: UV-Chromatogramme (LC-MS; 200 nm) der Mischungen **40** und **41** (a) bzw. **42** und **43** (b) (Hydrosphere C18, 0-10 %).



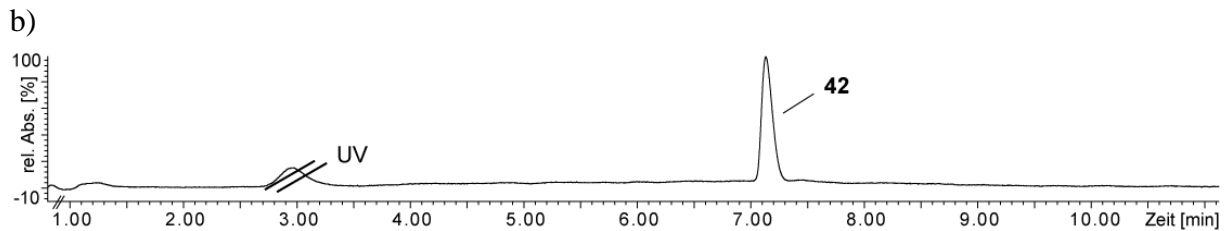


Abbildung 58: UV-Chromatogramme (LC-MS; 200 nm) der gereinigten Nonasaccharidazide **43** (a) und **42** (b) (Hydrosphere C18, 0-10 %).

Die Zielverbindungen **42** und **43** konnten in Ausbeuten von 41 % und 58 % erhalten und deren Reinheit mit HPLC-MS (Abbildung 58) und NMR (Abbildung 59) bestätigt werden.

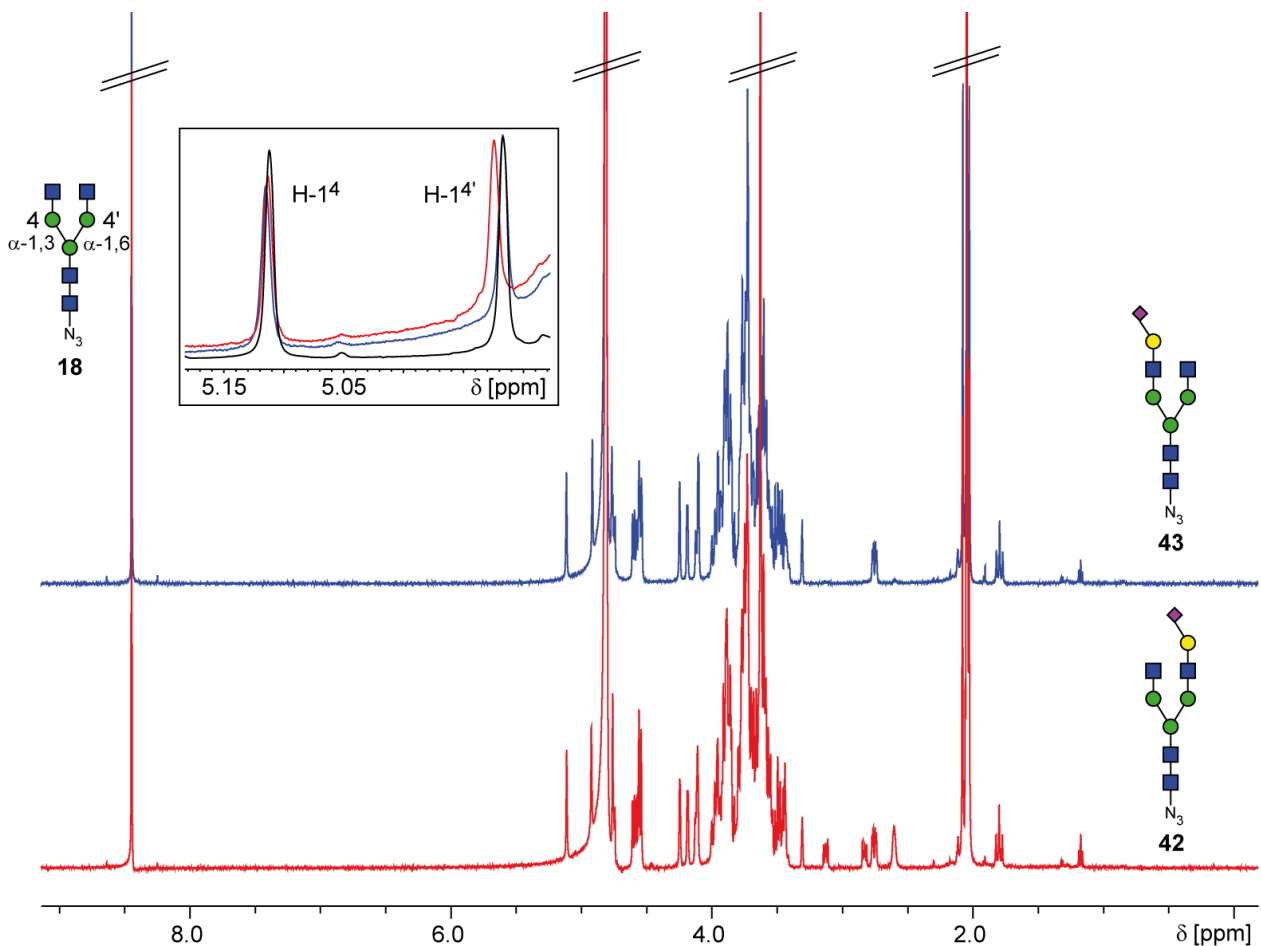


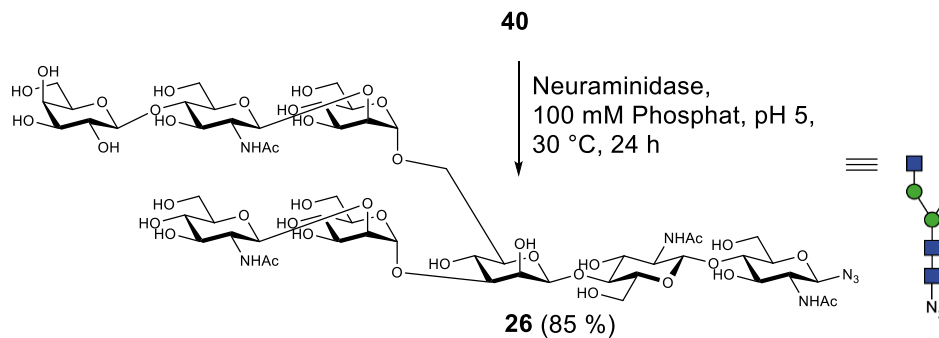
Abbildung 59: ^1H -NMR-Spektren von **43** (blau) und **42** (rot) mit **18** als Referenz (schwarz).

Wie bei den einfach 2,3-sialylierten Glycanen **37** und **38** war auch hier nur eine geringe Verschiebung der Signale zu erkennen. Bei der in rot dargestellten Verbindung war eine Verschiebung des H-1^{4'}-Signals zu beobachten, was auf eine Galactosylierung und Sialylierung an der 1,6-Antenne schließen lässt. Hierdurch konnten rückwirkend die Verbindungen **37** und **38** strukturell zugeordnet werden.

4.5. Synthese monogalactosylierter *N*-Glycane über Monosialylierung

Da mit der Monosialylierung in Kombination mit einer Degalactosylierung ein Weg gefunden wurde, um unsymmetrische Glycane besser voneinander zu trennen, sollte versucht werden die schwierig zu trennenden monogalactosylierten *N*-Glycane **26** und **27** durch Desialylierung von **40** und **41** herzustellen (Abbildung 60). Zur enzymatischen Entfernung der Sialinsäuren wurde das pH-Optimum der Neuraminidase (pH 5) verwendet und eine Reaktionszeit von 24 Stunden gewählt.

a)



b)

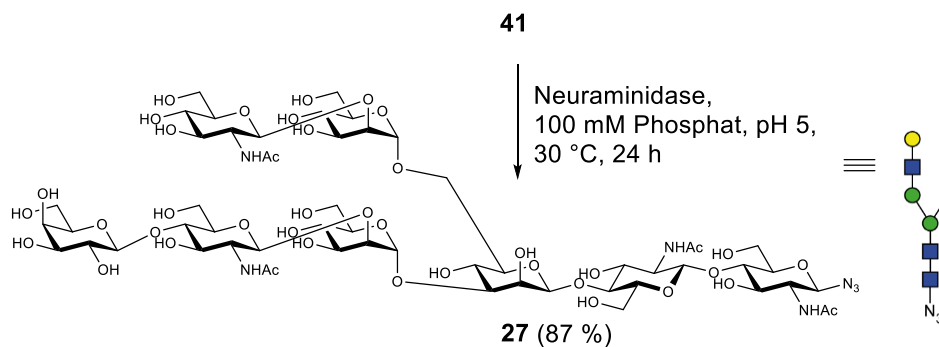
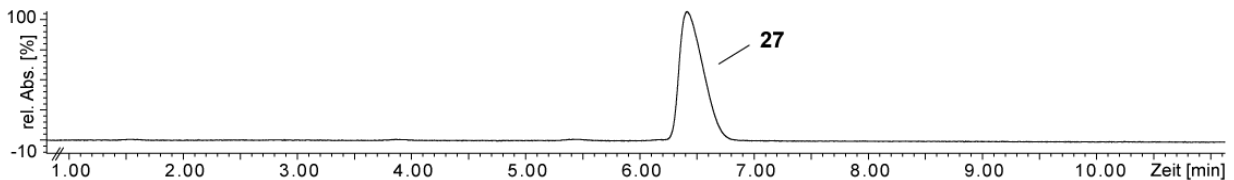


Abbildung 60: Enzymatische Desialylierung der Nonasaccharidazide **40** (a) und **41** (b).

a)



b)

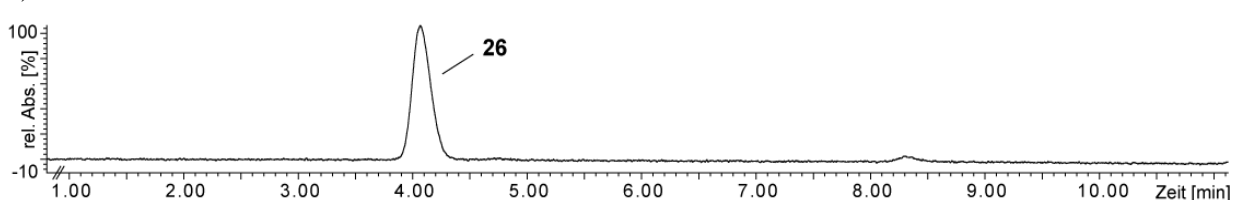


Abbildung 61: UV-Chromatogramme (LC-MS; 200 nm) der gereinigten Octasaccharidazide **27** (a, HyperCarb, 9-14 %) und **26** (b, HyperCarb, 10-15 %).

Die Reaktionen waren jeweils nach einem Tag vollständig und wurde per RP-HPLC gereinigt. Die beiden monogalactosylierten Zielverbindungen **26** und **27** wurden in guter Reinheit (Abbildung 61) und Ausbeuten von 85 % bzw. 87 % erhalten. Die Charakterisierung erfolgte über NMR-Spektren (Abbildung 62).

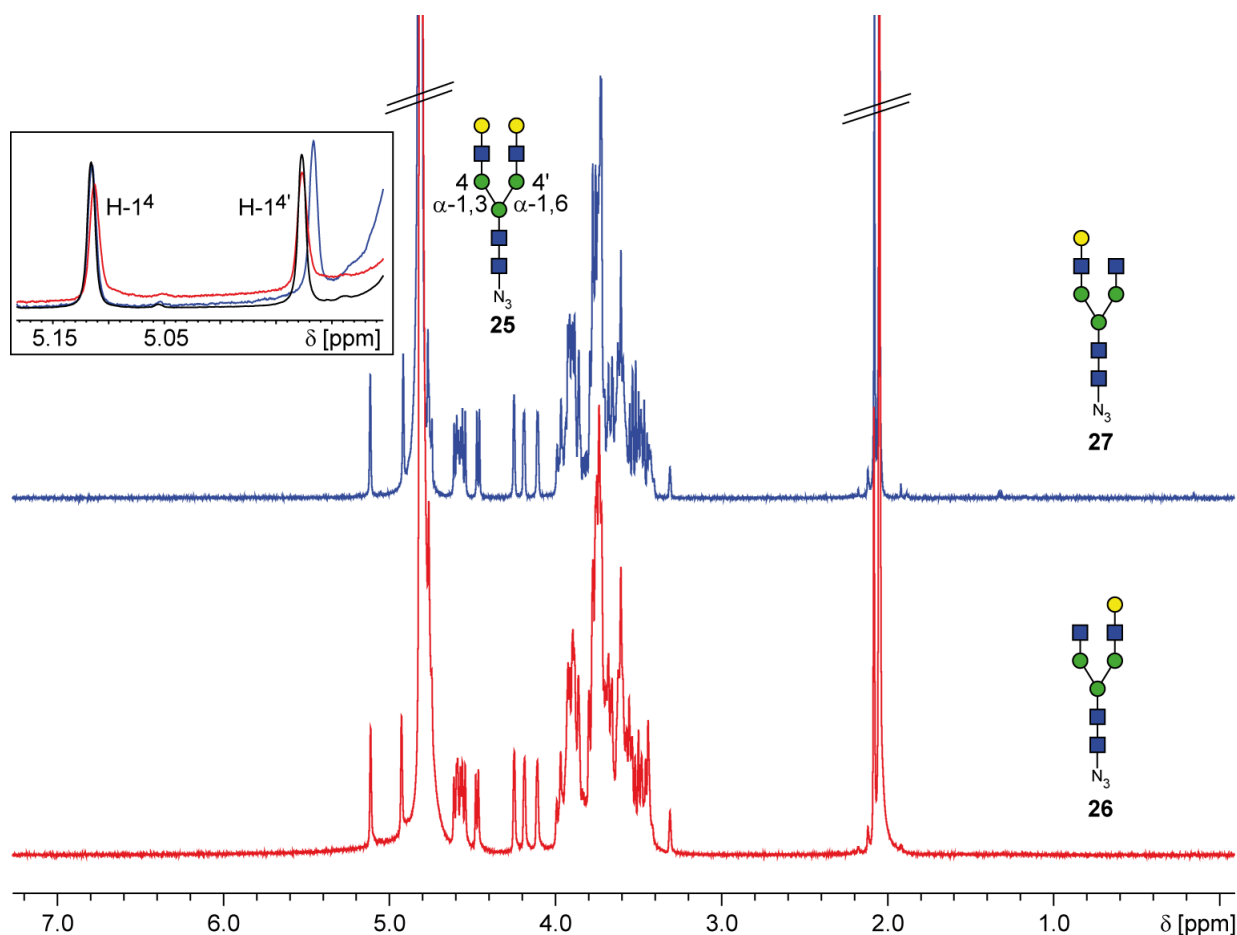


Abbildung 62: ^1H -NMR-Spektren von **27** (blau) und **26** (rot) mit **25** als Referenz (schwarz).

Als Referenzverbindung wurde in diesem Fall das Nonasaccharid **25** verwendet. Während die in rot dargestellte Verbindung keine Verschiebung gegenüber **25** aufwies, wurde bei der in blau dargestellten Verbindung eine Verschiebung des $\text{H-1}^{4'}$ -Signals beobachtet. Es handelt sich hierbei um das am 1,3-Arm galactosylierte Glycan **27**. Die Verschiebung gegenüber dem Signal von **25** indiziert hier das Fehlen der Galactose am entsprechenden Arm. Die ^1H -NMR-Spektren wurden auch mit dem Heptasaccharid **18** verglichen (Abbildung 63). Hierbei war eine Verschiebung des $\text{H-1}^{4'}$ -Signals der in rot dargestellten Verbindung, also des Octasaccharids **26** zu beobachten, was eine am 1,6-Arm verknüpfte Galactose bestätigte. Damit wurde rückwirkend auch die Zuordnung der Edukte **40** bzw. **41** bestätigt.

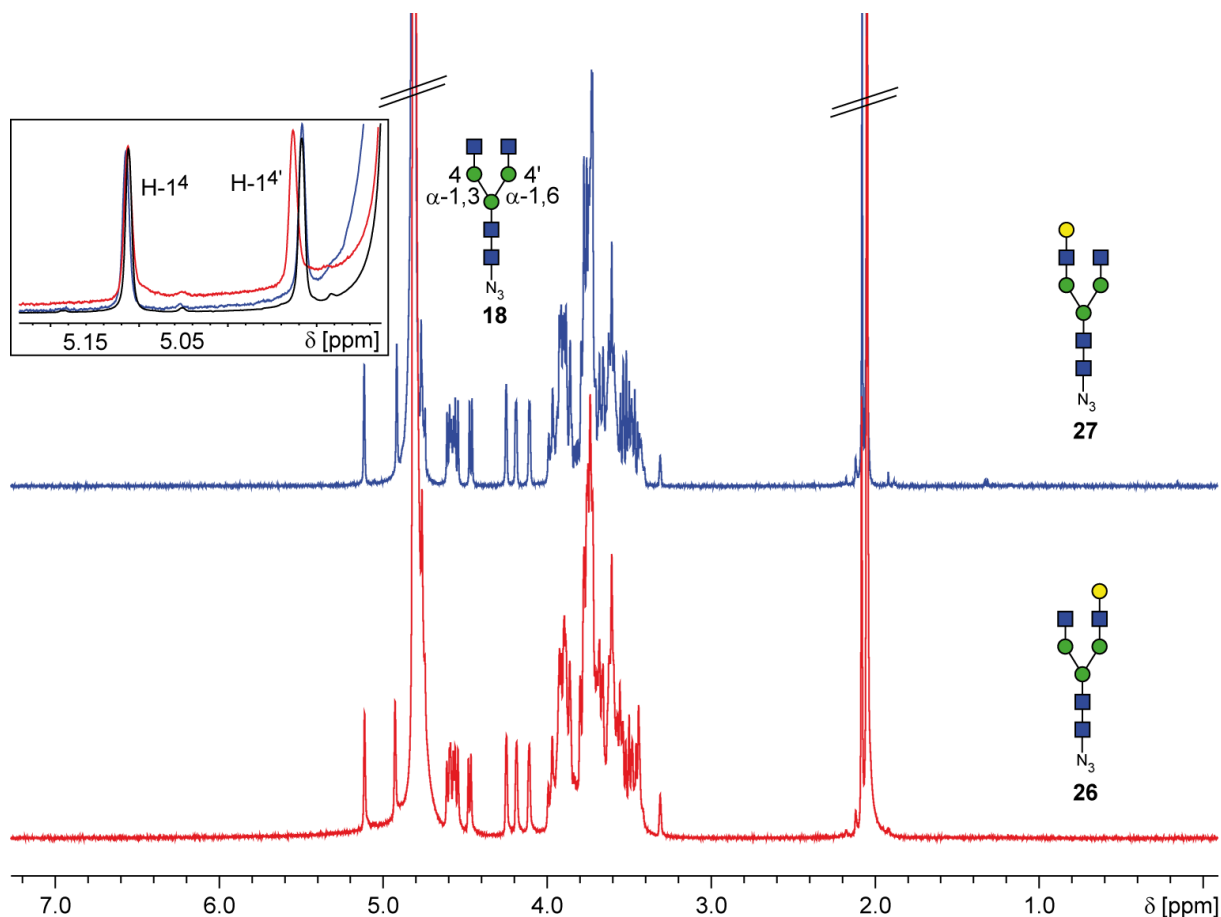


Abbildung 63: ¹H-NMR-Spektren von 27 (blau) und 26 (rot) mit 18 als Referenz (schwarz).

Mit den hier beschriebenen Reaktionen und chromatographischen Trennungen wurden zehn unsymmetrische *N*-Glycanazide erhalten. Die HPLC-Trennungen wurden optimiert, konnten jedoch meist nur in Substanzmengen bis ca. 1 mg durchgeführt werden. Daher sollte nach Verbindungen gesucht werden, deren Retentionszeiten sich so weit unterscheiden, dass auch größere Substanzmengen (ca. 2-3 mg) problemlos trennbar sind. Es ist bereits durch Arbeiten von *Perkams*^[70], *Lott*^[84] und *Weidler*^[85] bekannt, dass Verbindungen, die eine 1,6-verknüpfte *core*-Fucose tragen, eine stärkere Retention auf RP-HPCL-Säulen als die unfucosylierten Verbindungen aufweisen.^[86] Da bei den zuvor synthetisierten unsymmetrischen Verbindungen eine höhere Retention zu einer besseren Trennung führte, sollten auch die analogen *core*-fucosylierten unsymmetrischen *N*-Glycane aufgebaut werden.

5. Synthese unsymmetrischer *core*-fucosylierter *N*-Glycane

5.1. Synthese monosialylierter fucosylierter *N*-Glycane

Zur Herstellung unsymmetrischer *core*-fucosylierter *N*-Glycane sollten die bisherigen Erkenntnisse aus der Synthese der unsymmetrischen *N*-Glycanazide genutzt werden. Es wurden zunächst monosialylierte Verbindungen aufgebaut. Als Edukt für die Sialylierungen diente das *core*-fucosylierte Decasaccharid **20**, das zuvor aus dem Nonasaccharid **25** hergestellt wurde (siehe Kapitel 3.1.).^[87,70] Zunächst wurde eine unvollständige 2,6-Sialylierung getestet (Abbildung 64).

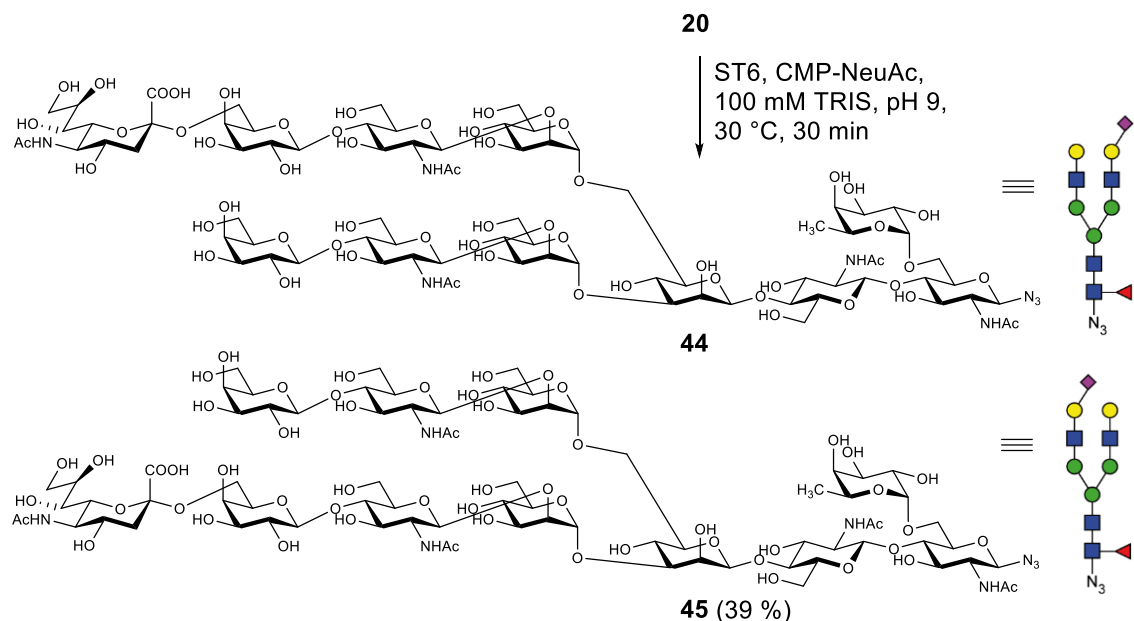


Abbildung 64: Unvollständige enzymatische 2,6-Sialylierung des Decasaccharidazids **20**.

Hierbei wurde ein Verhältnis der monosialylierten Zielverbindungen **45** und **44** von ca. 1:2 beobachtet (Abbildung 65).

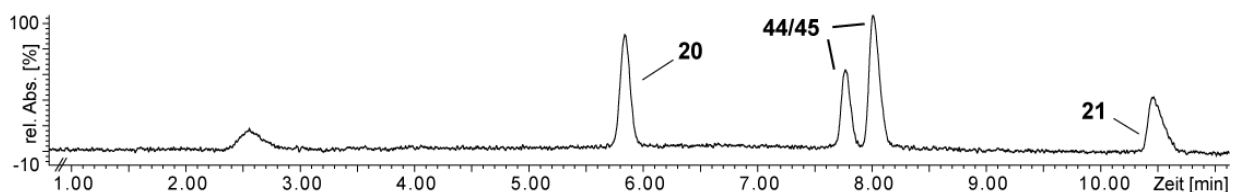


Abbildung 65: UV-Chromatogramm (LC-MS; 200 nm) der unvollständigen 2,6-Sialylierung von **20** (Hydrosphere C18, 0-10 %).

Aufgrund der ungleichmäßigen Verteilung wurde auch für die fucosylierten Glycane die unvollständige Desialylierung untersucht. Das Decasaccharid **20** wurde bei pH 9 mit

3 Äquivalenten CMP-Neuraminsäure und ST6 aus *Photobacterium damsela* zunächst vollständig sialyliert (siehe Kapitel 3.1) und nach der Reinigung direkt mit Neuraminidase 90 Minuten inkubiert (Abbildung 66).

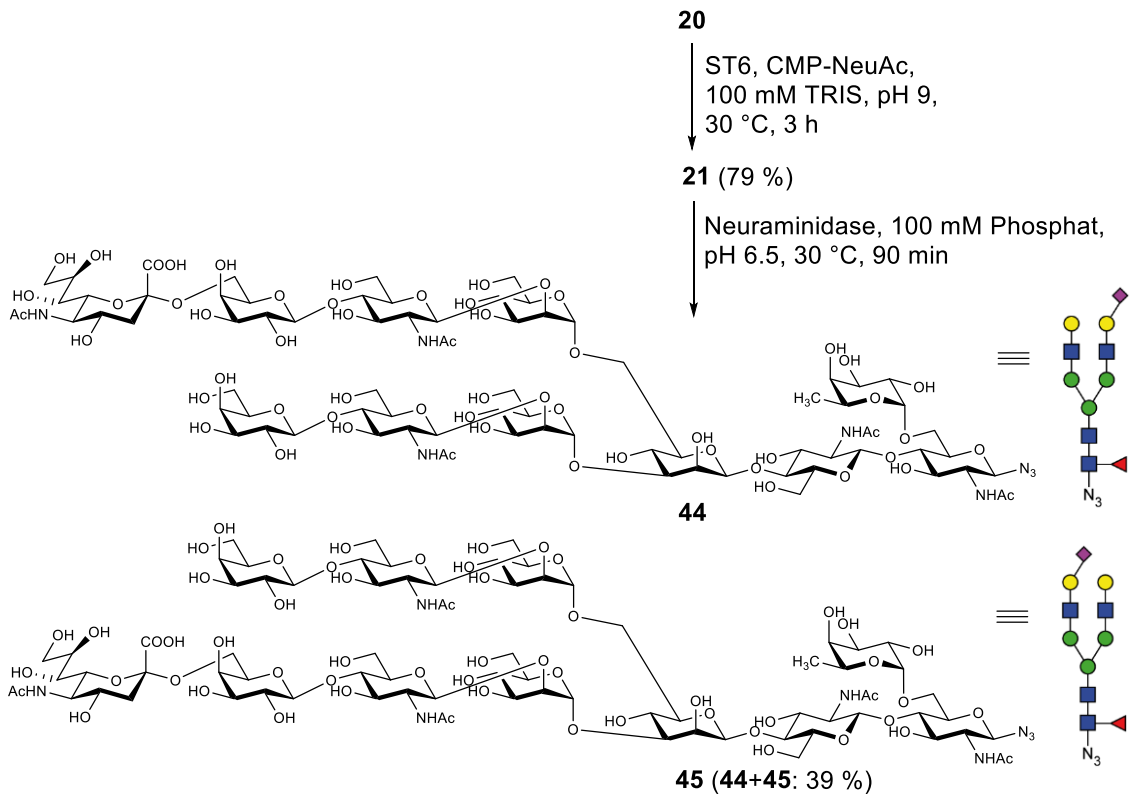


Abbildung 66: Enzymatische Sialylierung und unvollständige Desialylierung des Decasaccharidazids **20**.

Hierbei wurde ein 1:1-Verhältnis der Regioisomere und Ausbeuten von 20 % (**45**) und 19 % (**44**) erhalten werden. Die beiden unsymmetrischen Zielverbindungen **45** und **44** wurden in guter Reinheit erhalten (Abbildung 67). Die Zuordnung erfolgte per NMR (Abbildung 68).

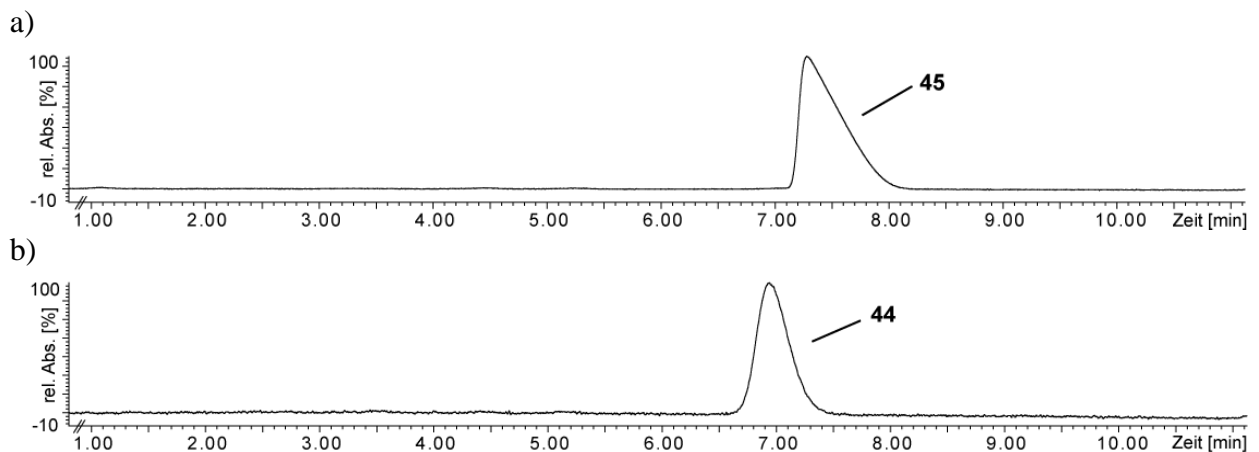


Abbildung 67: UV-Chromatogramme (LC-MS; 200 nm) der gereinigten Undecasaccharidazide **45** (a) und **44** (b) (HyperCarb, 12-17 %).

Für die monosialylierten *core*-fucosylierten Glycane diente Verbindung **20** als NMR-Referenz. Es wurde eine deutliche Signalverschiebung von H-1⁴ der in blau dargestellten und von H-1^{4'} der in rot dargestellten Verbindung beobachtet. Dadurch waren die Glycane **45** (blau) und **44** (rot) gut zuzuordnen. Eine Verschiebung des Fucose-H-1-Signals war nicht zu erkennen.

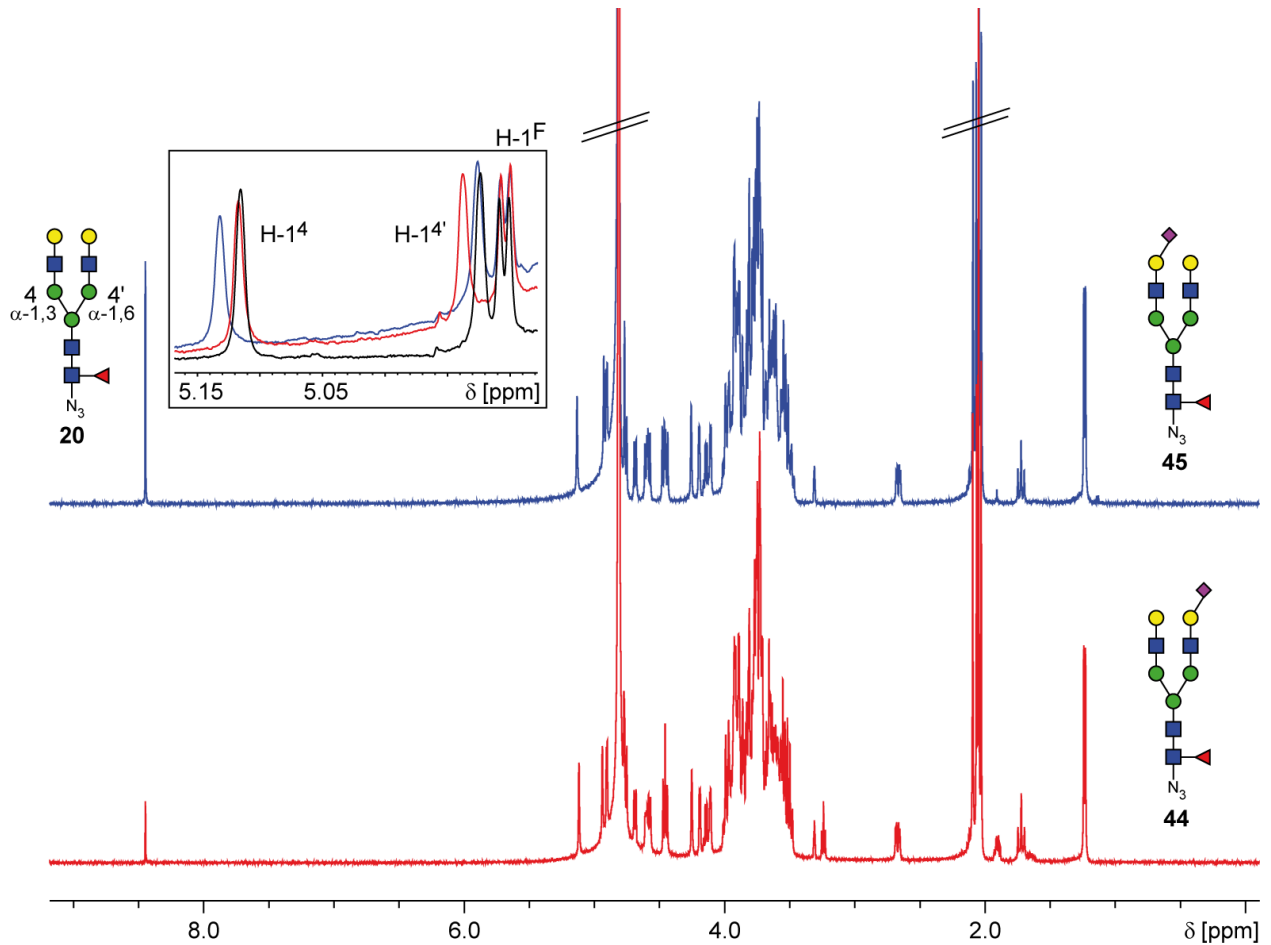


Abbildung 68: ¹H-NMR-Spektren von **45** (blau) und **44** (rot) mit **20** als Referenz (schwarz).

Die 2,3-sialylierten *N*-Glycane **46** und **47** wurden aus dem Decasaccharid **20** mit 1.5 Äquivalenten CMP-Neuraminsäure bei pH 7.1 mit ST3 aus *Vibrio species* aufgebaut (Abbildung 70).

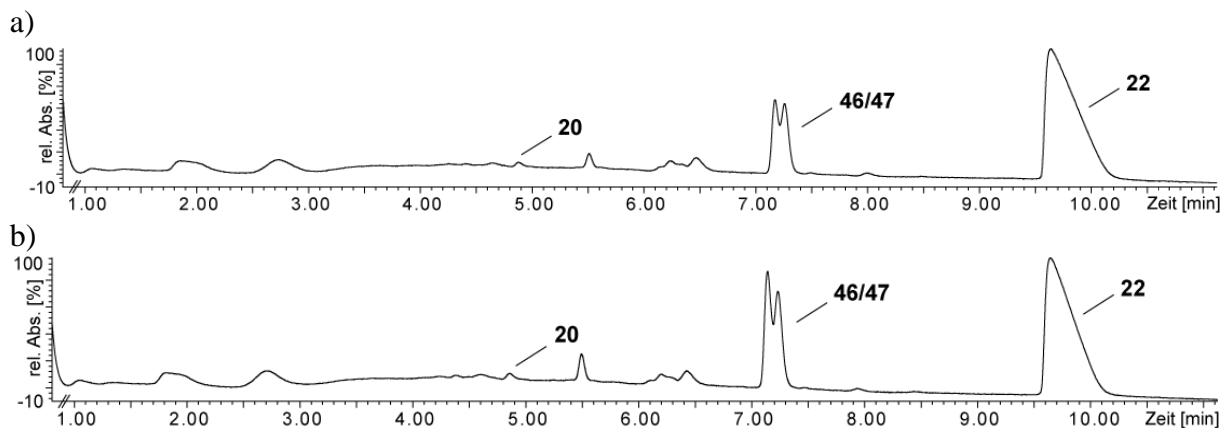


Abbildung 69: UV-Chromatogramme (LC-MS; 200 nm) der 2,3-Sialylierung von **20** nach 1 h (a) und 2 h (b) (Hydrosphere C18, 0-20 %).

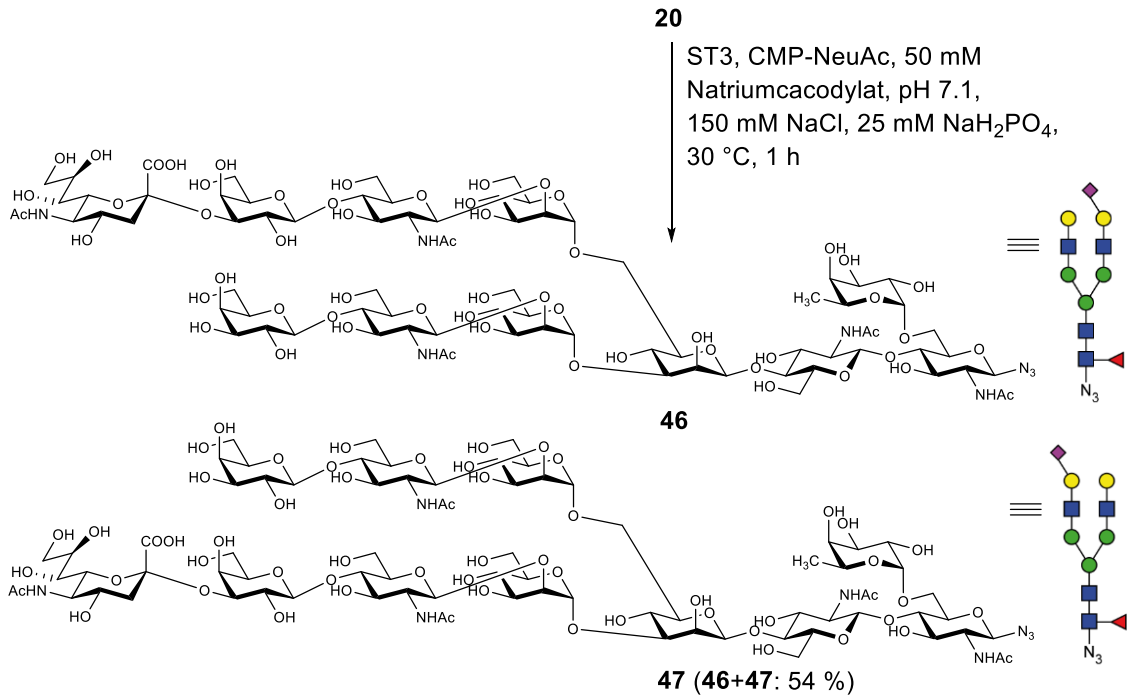


Abbildung 70: Unvollständige enzymatische 2,3-Sialylierung des Decasaccharidazids **20**.

Dabei wurden Reaktionszeiten von 1 und 2 Stunden verglichen (Abbildung 69). In diesem Fall war die Sialidase-Aktivität der 2,3-Sialyltransferase gut zu beobachten, da sich nach einer Stunde bereits ein hoher Anteil an vollständig sialyliertem Glycan **22** gebildet hatte, der sich nach einer weiteren Stunde reduzierte. Das Verhältnis von **46** zu **47** veränderte sich ebenfalls. Bei der präparativen Synthese wurde die Reaktion nach einer Stunde abgebrochen. Es zeigte sich, dass die Reaktion im analytischen Maßstab (bis zu 1 mg) wesentlich schneller ablief als im semipräparativen Maßstab (15-20 mg). Nach einer Reinigung über RP-HPLC wurden die unsymmetrischen Zielverbindungen in guter Reinheit in einer Ausbeute von 54 % erhalten (Abbildung 71, Abbildung 72).

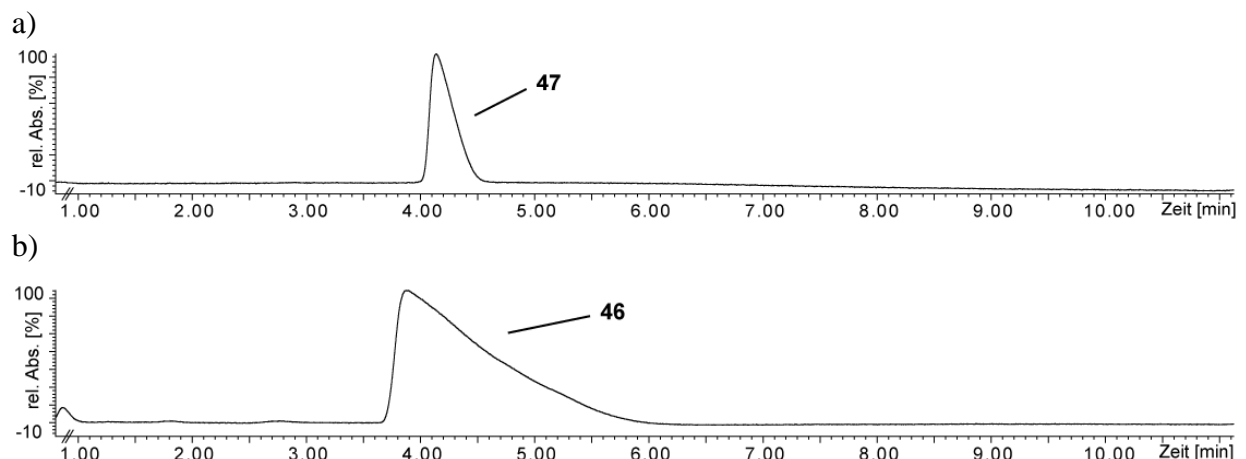


Abbildung 71: UV-Chromatogramme (LC-MS; 200 nm) der gereinigten Undecasaccharidazide **47** (a, HyperCarb, 15-25 %) und **46** (b, HyperCarb, 15-20 %).

Wie bei den unfucosylierten 2,3-sialylierten Verbindungen **37** und **38** war keine nennenswerte Verschiebung in den Protonen-Signalen zu beobachten. Auch mittels NOESY-Spektren konnten nur H-1⁵ und H-1^{5'} den entsprechenden Resonanzen für H-1⁴ und H-1^{4'} zugeordnet werden. Eine sichere Zuordnung konnte erst nach weiteren Reaktionsschritten rückwirkend getroffen werden. Generell konnte sowohl bei der 2,6-, als auch bei der 2,3-Sialylierung eine deutliche Verbesserung der Trennbarkeit gegenüber den unfucosylierten Verbindungen beobachtet werden.

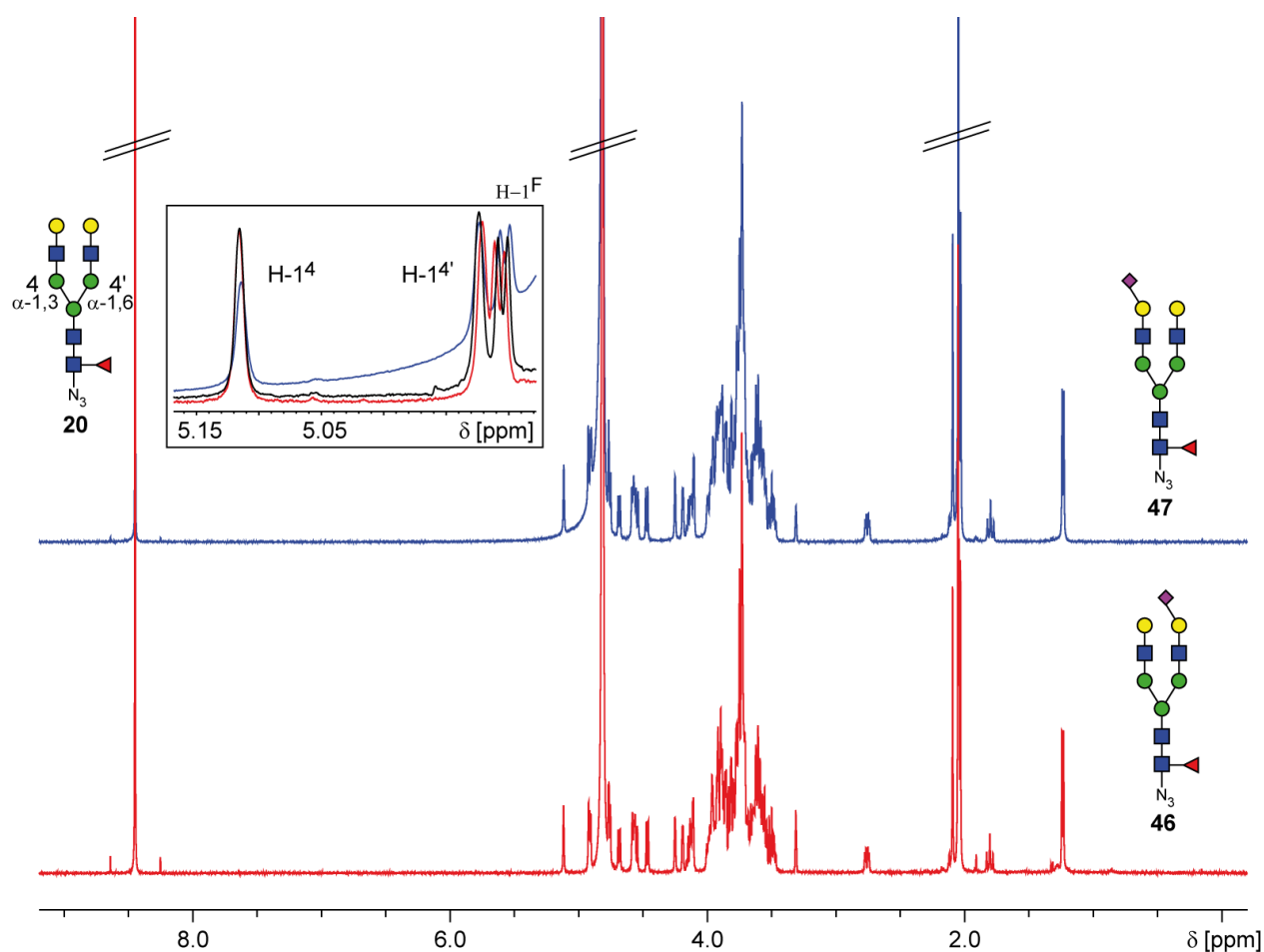
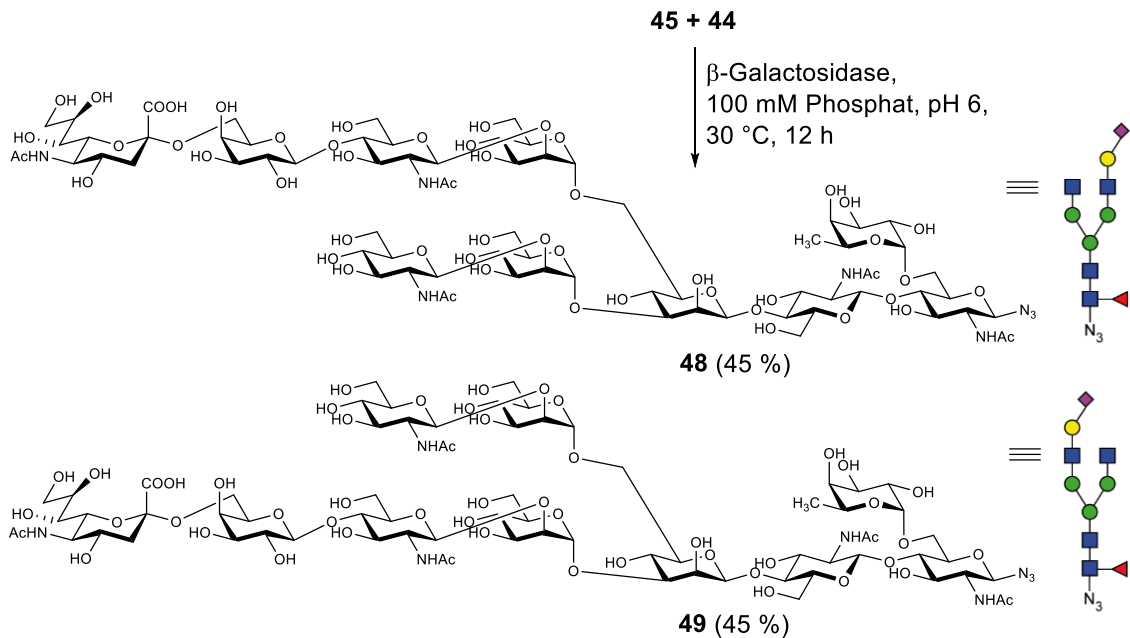


Abbildung 72: ¹H-NMR-Spektren von **47** (blau) und **46** (rot) mit **20** als Referenz (schwarz).

5.2. Degalactosylierung monosialylierter fucosylierter N-Glycane

Analog zu den nicht fucosylierten N-Glycanen wurden die *core*-fucosylierten monosialylierten Verbindungen **45**, **44**, **46** und **47** degalactosyliert, um die Trennbarkeit zu verbessern (Abbildung 73). Dazu wurden die beiden Mischungen bei pH 6 mit β -Galactosidase aus *Aspergillus oryzae* umgesetzt.

a)



b)

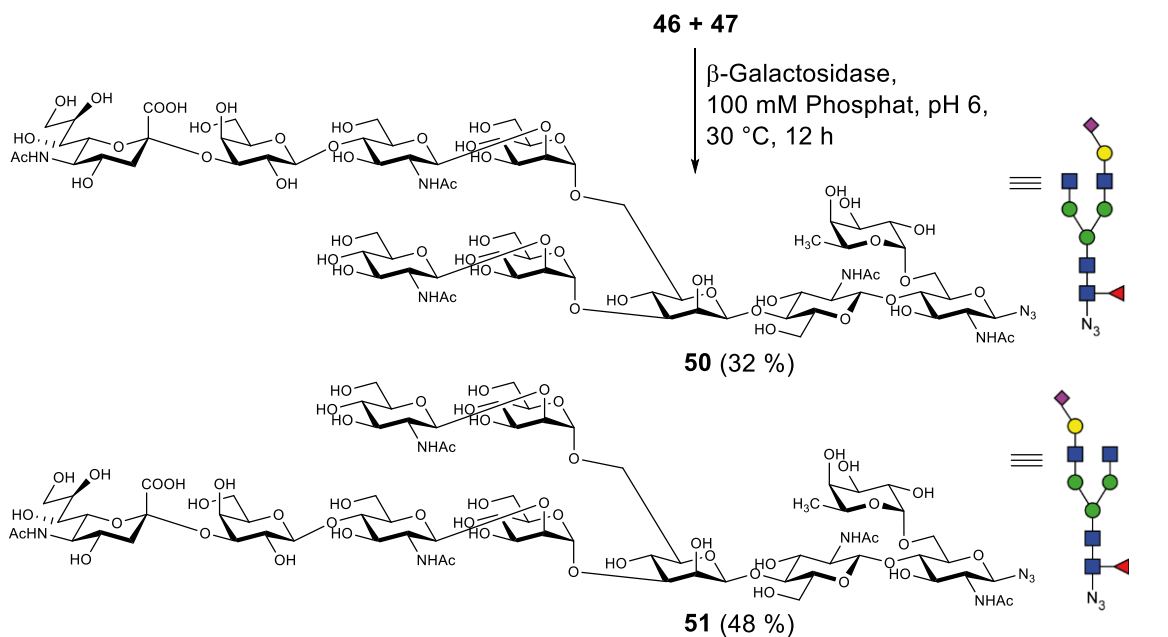


Abbildung 73: Enzymatische Degalactosylierung der Undecasaccharidazide **45** und **44** (a), sowie **46** und **47** (b).

Die Degalactosylierungen waren nach 12 Stunden vollständig und wurde durch HPLC gereinigt (Abbildung 74). Die Mischungen der monosialylierten Verbindungen ließen sich gut trennen.

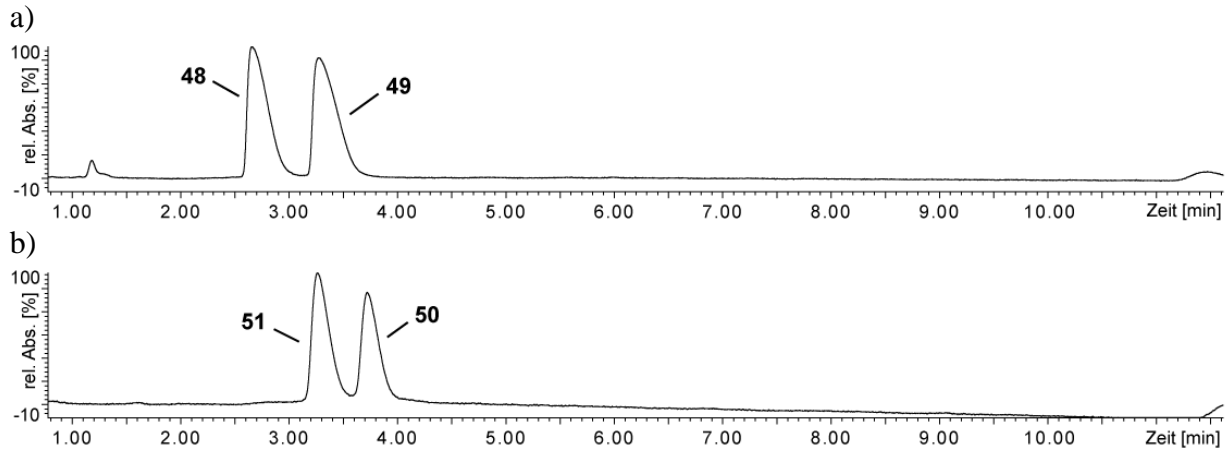


Abbildung 74: UV-Chromatogramme (LC-MS; 200 nm) der Degalactosylierung von **45** und **44** (a, Hydrosphere C18, 5-15 %) und **46** und **47** (b, Hydrosphere C18, 5-20 %).

Die vier Zielverbindungen **48** – **51** konnten in hoher Reinheit und Ausbeuten von 32 - 48 % erhalten werden (Abbildung 75, Abbildung 76, Abbildung 77).

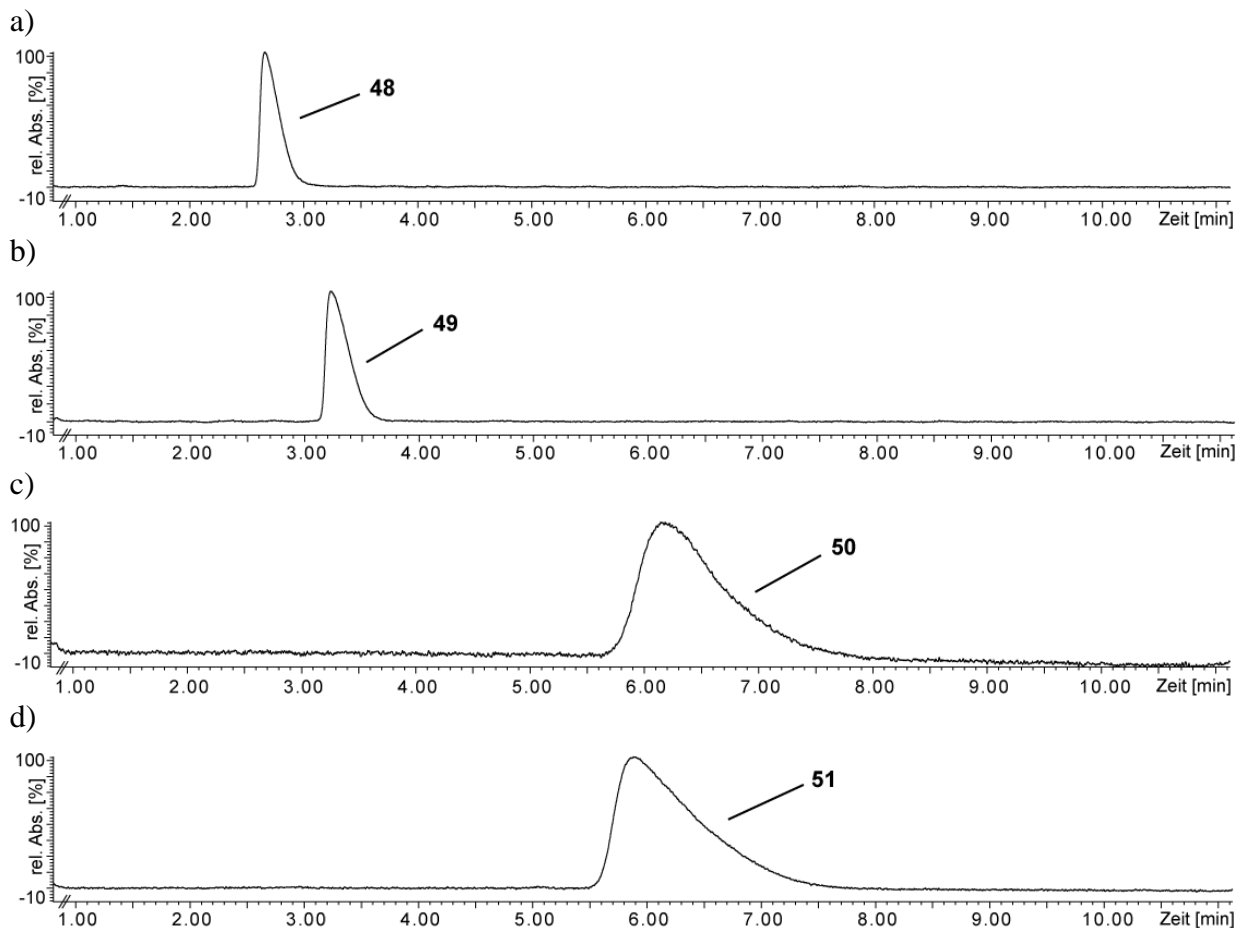


Abbildung 75: UV-Chromatogramme (LC-MS; 200 nm) der gereinigten Decasaccharidazide **48** (a, Hydrosphere C18, 0-10 %), **49** (b, Hydrosphere C18, 0-10 %), **50** (c, HyperCarb, 10-20 %) und **51** (d, HyperCarb, 10-20 %).

Für die NMR-Spektren der degalactosylierten, sialylierten Glycane mit *core*-Fucose wurde das Octasaccharid **19** als Referenz verwendet. Bei der blau dargestellten Verbindung war eine Verschiebung des H-1⁴-Signals zu beobachten, es handelt sich folglich um das Decasaccharid **49**. Entsprechend war bei der rot dargestellten Verbindung das H-1⁴-Signal verschoben. Damit konnte die vorläufige Zuordnung aufgrund der Elutionsreihenfolge bestätigt werden.

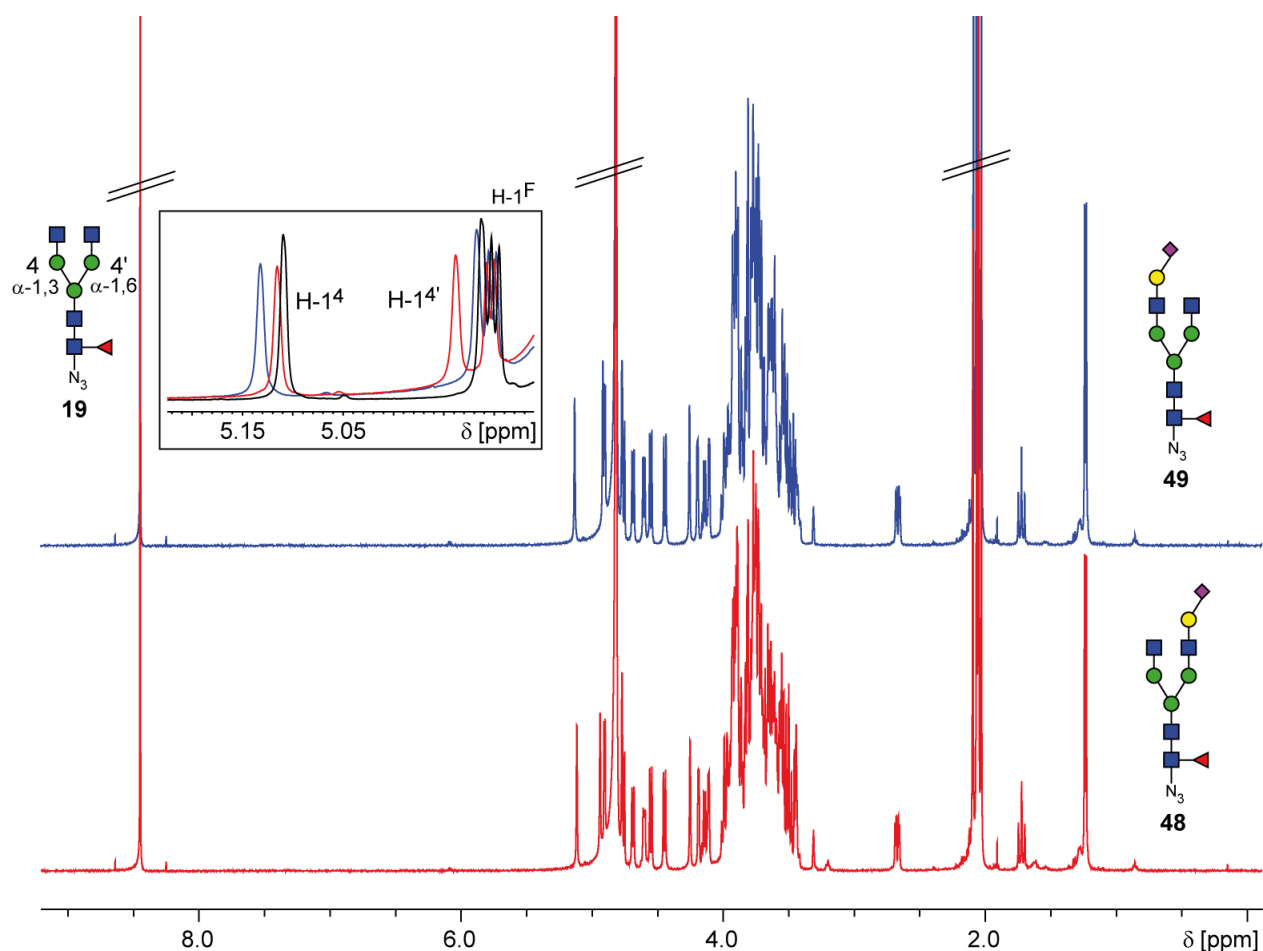


Abbildung 76: ¹H-NMR-Spektren von **49** (blau) und **48** (rot) mit **19** als Referenz (schwarz).

Eine Verschiebung des Fucose-H-1-Signals war nur in geringem Maß zu beobachten. Signalverschiebungen der α -Mannosen waren bei den 2,3-sialylierten *core*-fucosylierten Verbindungen wie zuvor bei den analogen 2,3-sialylierten Glycanen kaum zu erkennen. Die einzige deutliche Verschiebung war bei der rot dargestellten Verbindung zu erkennen. Hier waren das H-1⁴-Signal und das Fucose-H-1-Signal verschoben. Es kann angenommen werden, dass es sich bei dieser Verbindung um das Decasaccharid **50** handelt. Die *core*-Fucose ist weit von den Antennen entfernt. Jedoch ist die 1,6-verknüpfte Antenne durch eine zusätzliche CH₂-Gruppe deutlich flexibler als der 1,3-Arm. Dadurch kann sich der 1,6-Arm besser zur *core*-Fucose hinbewegen (backfolding) und somit deren Umgebung stärker beeinflussen als der 1,3-Arm.^[88] Dies lässt auch Rückschlüsse auf die Zuordnung der Verbindungen **46** und **47** zu.

Die *core*-fucosylierten Verbindungen **48-51** mit einer verkürzten Antenne erlaubten eine deutlich verbesserte Trennung. Trotzdem ließen sich nur Mengen von ca. 1-2 mg Mischung pro HPLC-Lauf isokratisch (Hydrosphere C18) reinigen.

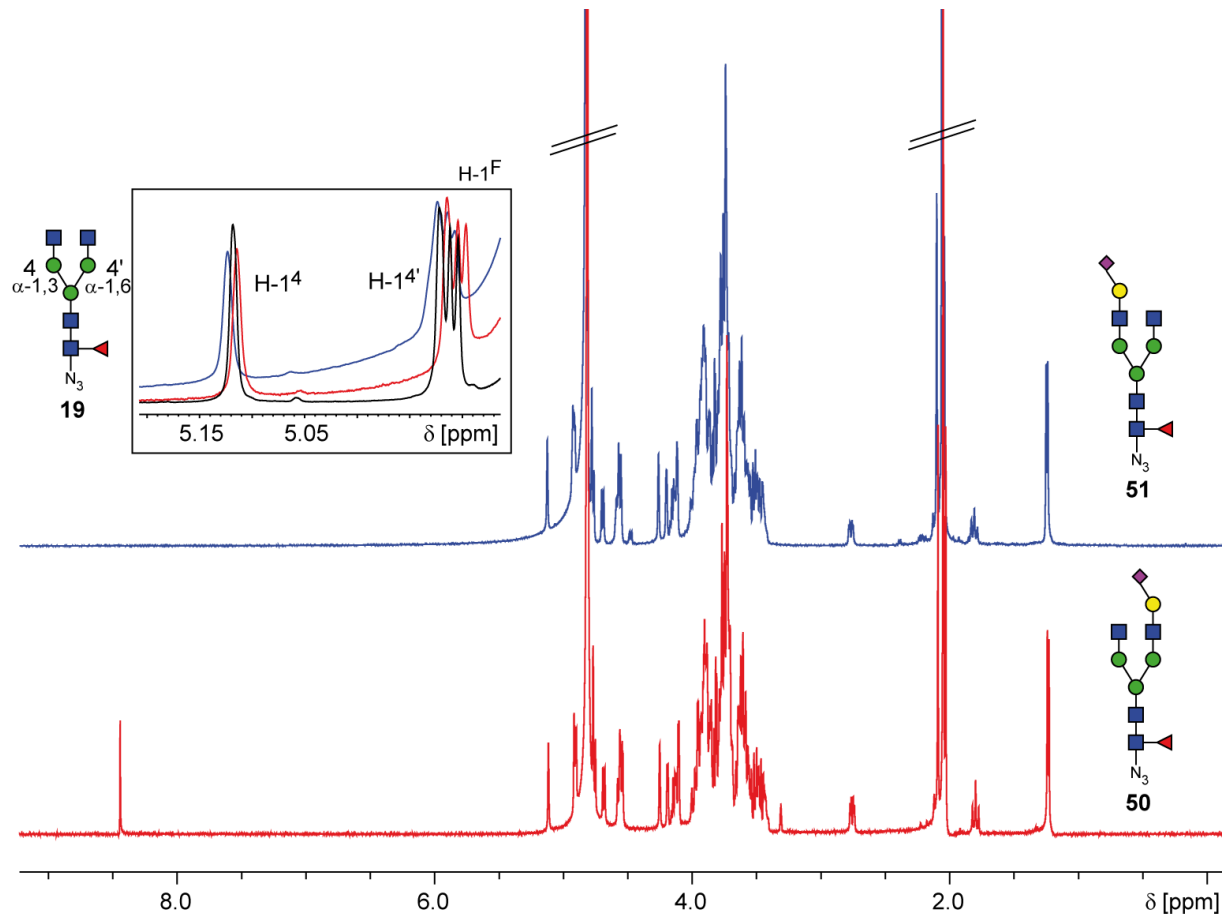


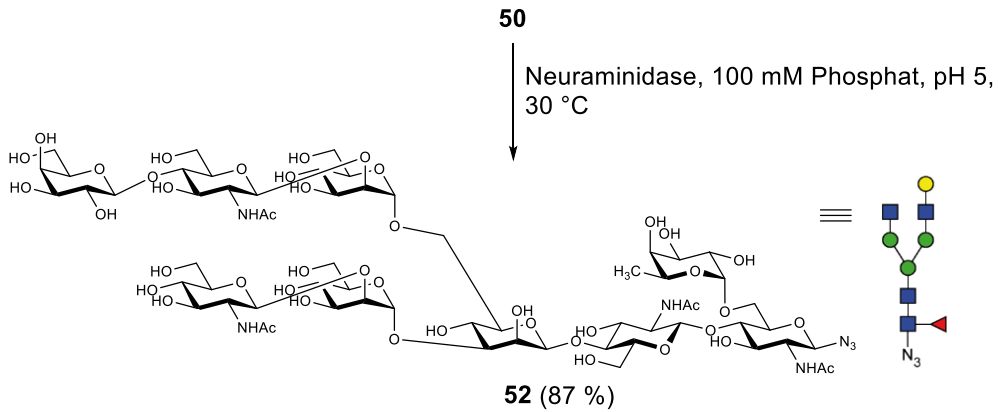
Abbildung 77: ¹H-NMR-Spektren von **51** (blau) und **50** (rot) mit **19** als Referenz (schwarz).

Generell ließen sich die 2,6-sialylierten Verbindungen einfacher als die 2,3-sialylierten Analoga trennen.

5.3. Synthese monogalactosylierter fucosylierter N-Glycane

Um die Bibliothek unsymmetrischer biantennärer N-Glycane zu erweitern, wurden die sialylierten Verbindungen **50** und **51** (Abbildung 78) bei pH 5 mit Neuraminidase umgesetzt.

a)



b)

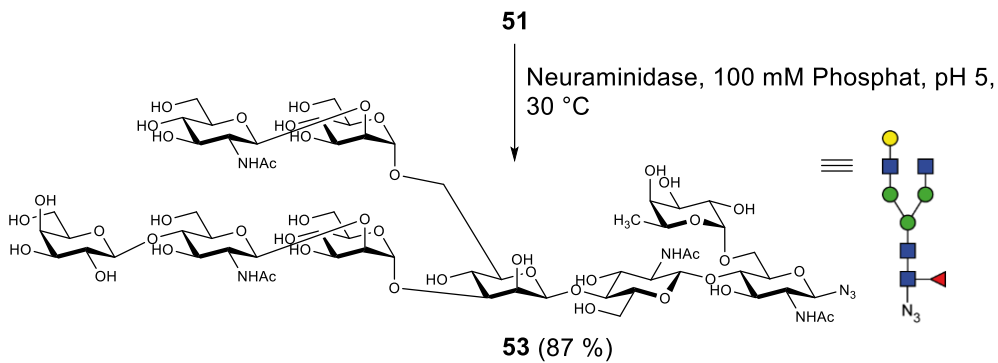
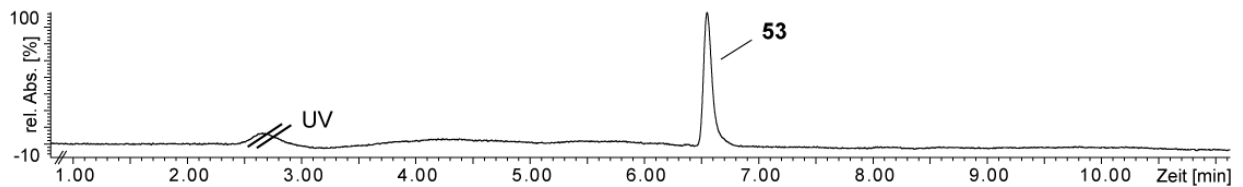


Abbildung 78: Enzymatische Desialylierung der Decasaccharidazide **50** (a) und **51** (b).

Nach 24 Stunden Reaktionszeit wurden die monogalactosylierten Produkte **52** und **53** per HPLC (YMC Hydrosphere® C18) gereinigt und in einer Ausbeute von je 87 % erhalten (Abbildung 79, Abbildung 80).

a)



b)

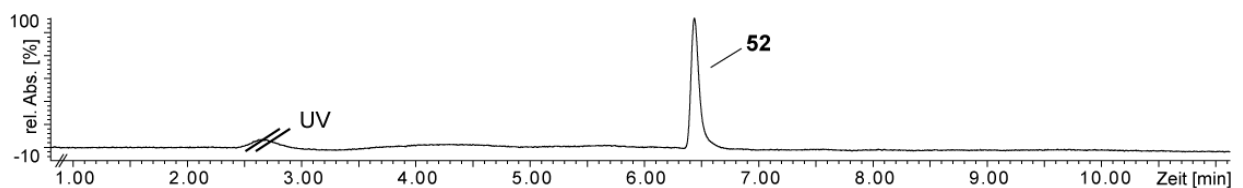


Abbildung 79: UV-Chromatogramme (LC-MS; 200 nm) der gereinigten Nonasaccharidazide **53** (a) und **52** (b) (Hydrosphere C18, 0-10 %).

Zur Zuordnung der monogalactosylierten fucosylierten Glycane wurde das NMR-Spektrum des Decasaccharids **20** als Referenz verwendet. Hier konnte nur die Verschiebung eines Signals beobachtet werden. Die Verschiebung von H-1^{4'} der blau dargestellten Verbindung weist auf das Nonasaccharid **53** hin, da dort die entsprechende Galactose fehlt. Hiermit wurde auch die Zuordnung der Verbindungen **46**, **47**, **50** und **51** bestätigt.

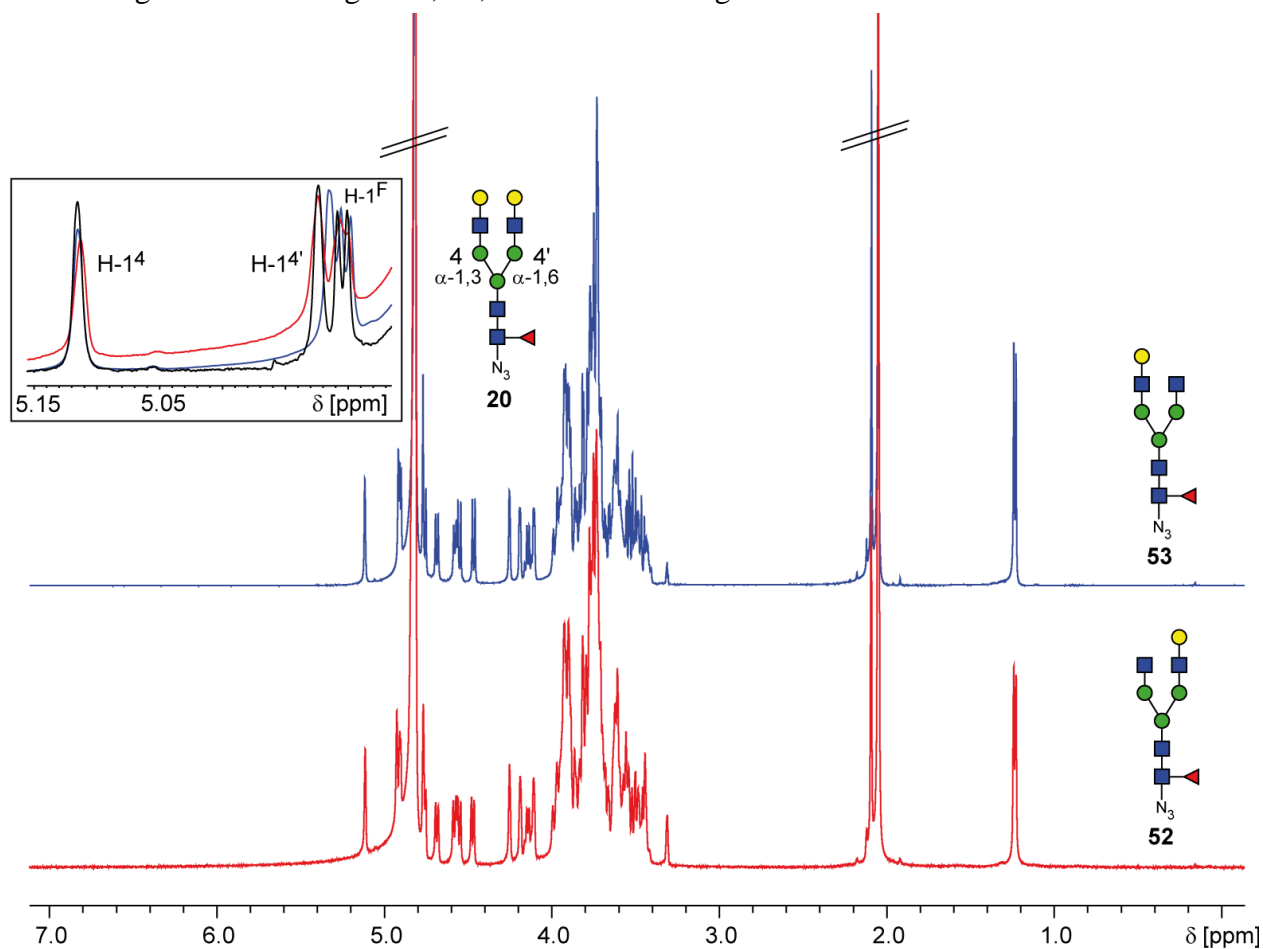


Abbildung 80: ¹H-NMR-Spektren von **53** (blau) und **52** (rot) mit **20** als Referenz (schwarz).

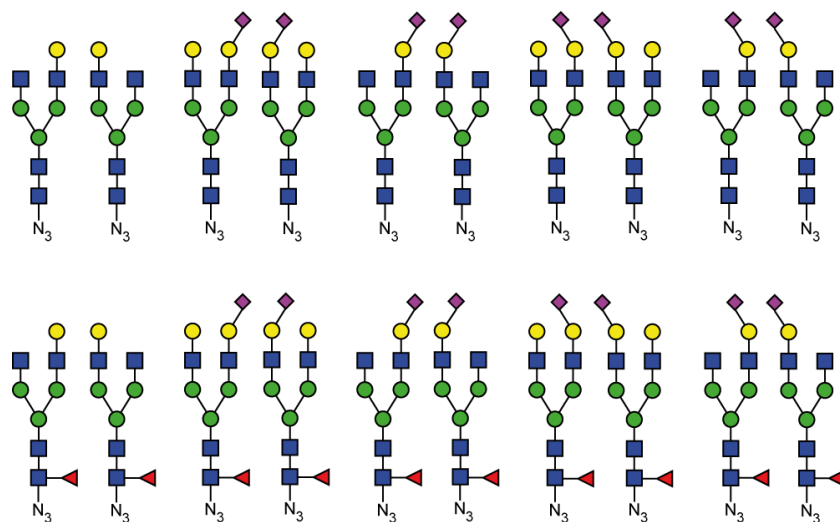


Abbildung 81: Übersicht der synthetisierten unsymmetrischen biantennären N-Glycane.

Damit konnte eine Bibliothek unsymmetrischer biantennärer *N*-Glycanazide mit optionaler Sialylierung und *core*-Fucosylierung hergestellt werden (Abbildung 81). Diese könnten nach der Verknüpfung mit einem Aminospacer auf Glycanarrays aufgebracht werden.

6. Synthese unsymmetrischer triantennärer N-Glycane

Um die Synthese unsymmetrischer N-Glycane auf triantennäre Verbindungen zu übertragen, wurden Umsetzungen mit verschiedenen GlcNAc-Transferasen untersucht. *Lott* und *Perkams* gelang es mit den N-Acetylglucosamin-Transferasen GnT IVa und GnT V ausgehend vom Heptasaccharid **18** die beiden triantennären Octasaccharide **54** und **55** zu synthetisieren (Abbildung 82). [70,84]

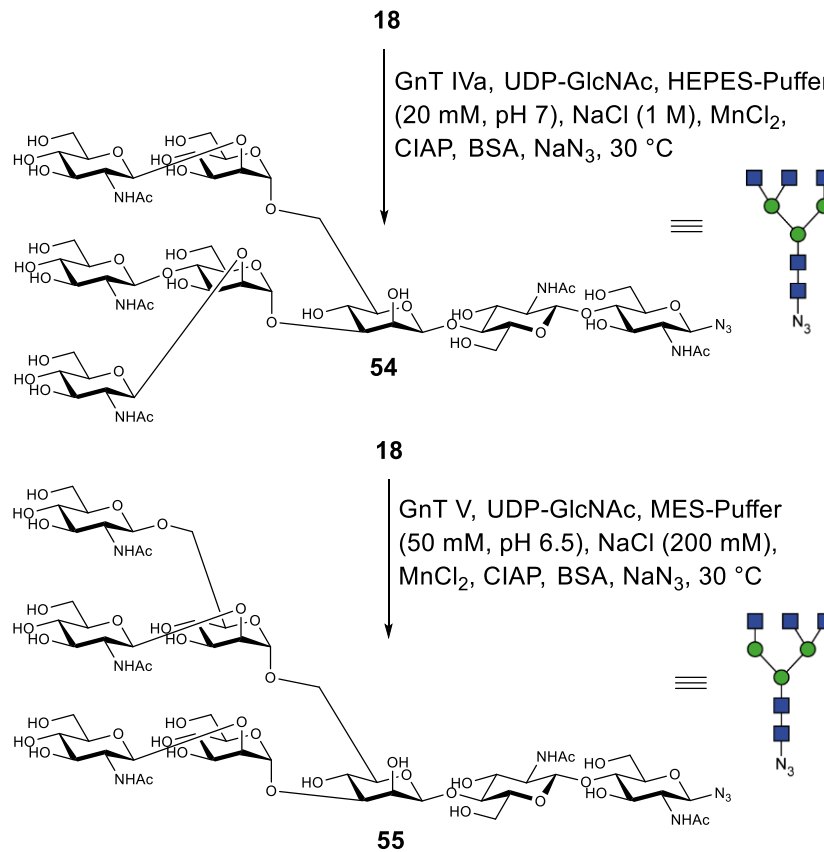


Abbildung 82: Einführung einer dritten Antenne an das Heptasaccharidazid **18** mit GnT IVa bzw. GnT V.

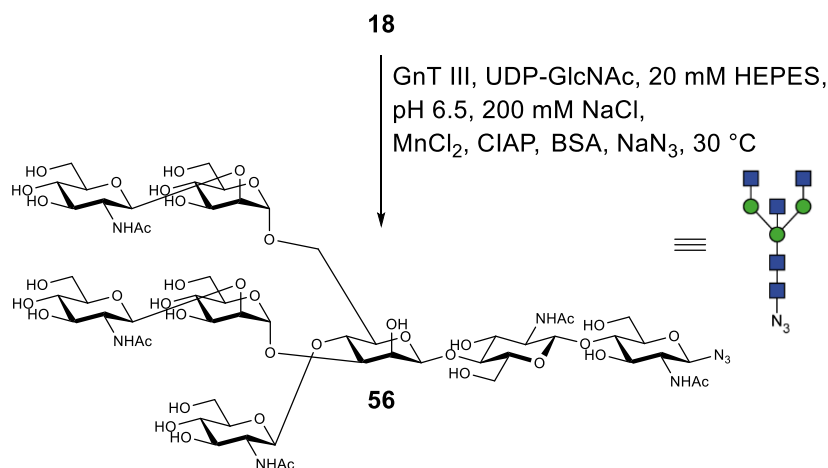


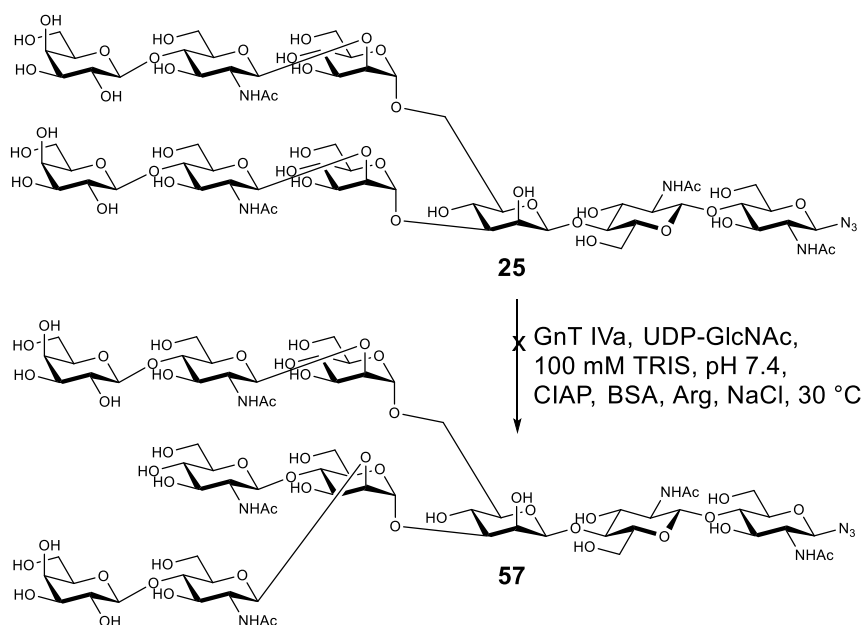
Abbildung 83: Enzymatische Einführung eines bisecting-GlcNAc-Rests an das Heptasaccharidazid **18**.

Des Weiteren stellte *Lott* ein Octasaccharid mit *bisecting*-GlcNAc her (Abbildung 83).^[84] Hierzu wurde **18** mit der *N*-Acetylglucosamin-Transferase GnT III umgesetzt. Mit Hilfe der verfügbaren GlcNAc-Transferasen sollte versucht werden unsymmetrische triantennäre Verbindungen herzustellen.

6.1. Einführung einer dritten Antenne

Der naheliegendste Ansatz zum Aufbau unsymmetrisch galactosylierter triantennärer *N*-Glycane ist eine statistische Verlängerung von GlcNAc-Termini durch unvollständige Galactosylierung.

a)



b)

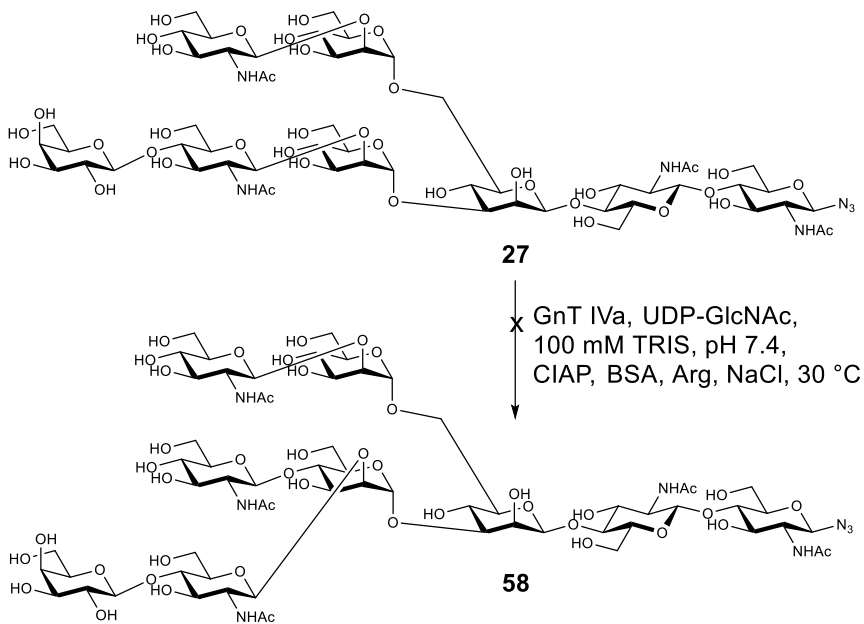


Abbildung 84: Umsetzung der Glycanazide **25** (a) und **27** (b) mit GnT IVa.

Durch die Vielzahl möglicher Produkte (drei monogalactosylierte, drei digalactosylierte und ein trigalactosyliertes Produkt) stellt die Trennung von solchen Mischungen aber eine große Herausforderung dar. Daher wurde versucht, die Galactosen bereits vor Einführung der dritten Antenne einzubauen. *Perkams* zeigte, dass mit GnT IVa an den mono- bzw. digalactosylierten Glycanen **27** und **25** keine Reaktion stattfindet (Abbildung 84).^[70]

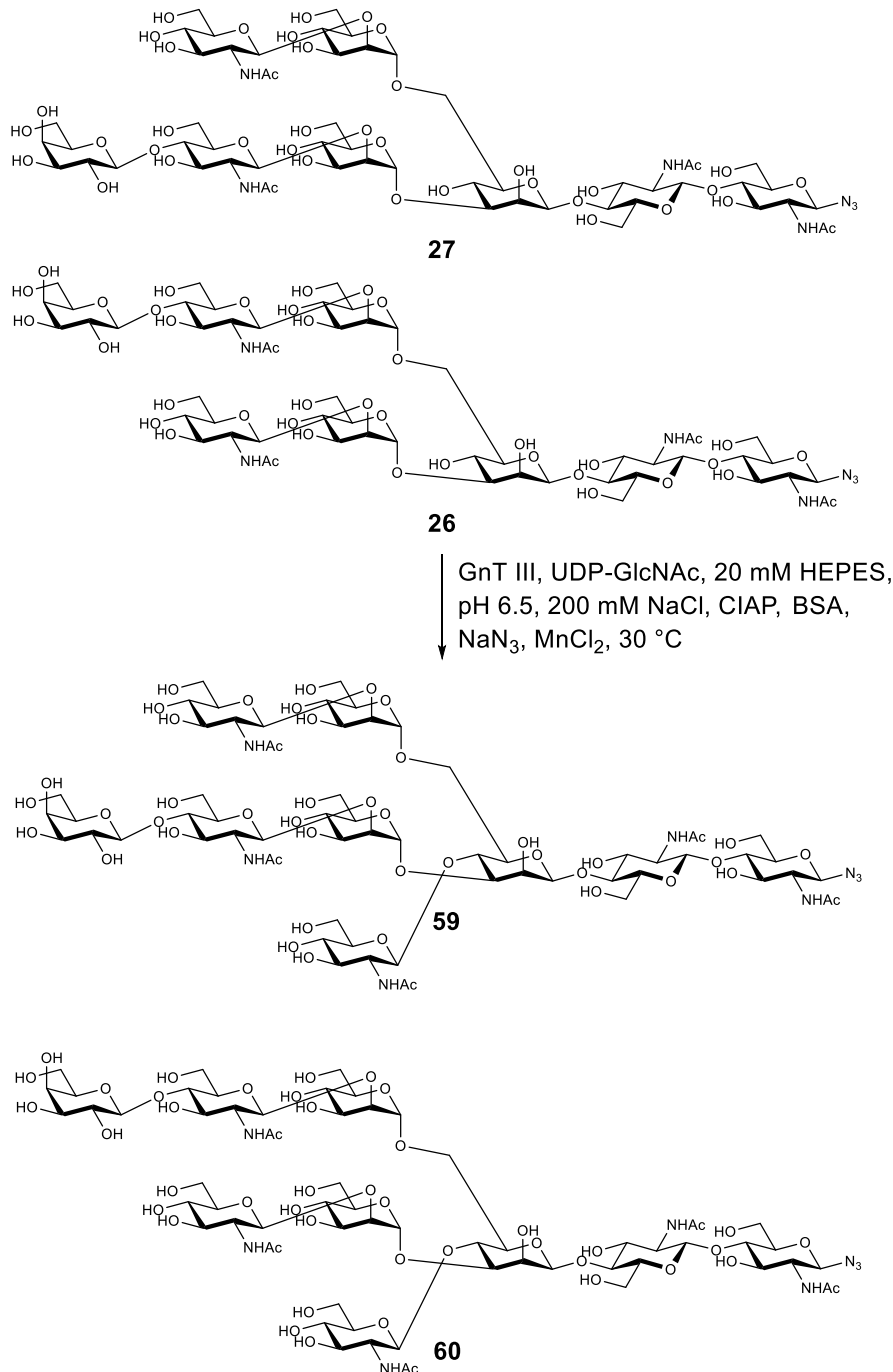


Abbildung 85: Enzymatische Einführung eines bisecting-GlcNAc der Octasaccharidazide **26** und **27**.

Um herauszufinden, ob eine Galactose nur am Akzeptorarm inhibierende Wirkung hat, wurde eine Mischung der beiden Octasaccharide **26** und **27** (Verhältnis ca. 50/50) jeweils mit GnT III, GnT IVa und GnT V umgesetzt.^[89] Es ist bekannt, dass terminale Galactosen an beiden Antennen eine Reaktion mit GnT III komplett inhibieren.^[90] Daher wurde untersucht, ob eine Galactose möglicherweise toleriert wird. Es konnte nach mehreren Tagen Reaktionszeit mit GnT III ein geringer Umsatz beobachtet werden (Abbildung 86, Abbildung 85).

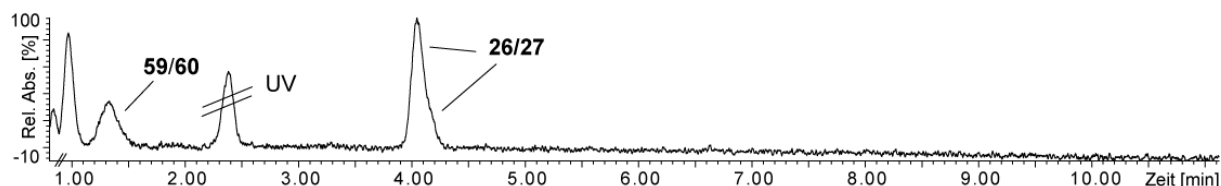


Abbildung 86: UV-Chromatogramm (LC-MS; 200 nm) der Umsetzung von **26** und **27** mit GnT III (HyperCarb, 10-20 %).

Aufgrund der fehlenden Referenzverbindungen ist unklar, ob es sich bei den entstandenen Produkten um die Verbindungen **59** oder **60** oder um eine Mischung handelt. Anschließend wurden die Transferasen GnT IVa und GnT V mit der Mischung der Octasaccharide **26** und **27** und angepassten Reaktionsbedingungen nach *Lott* getestet (Abbildung 87, Abbildung 88).

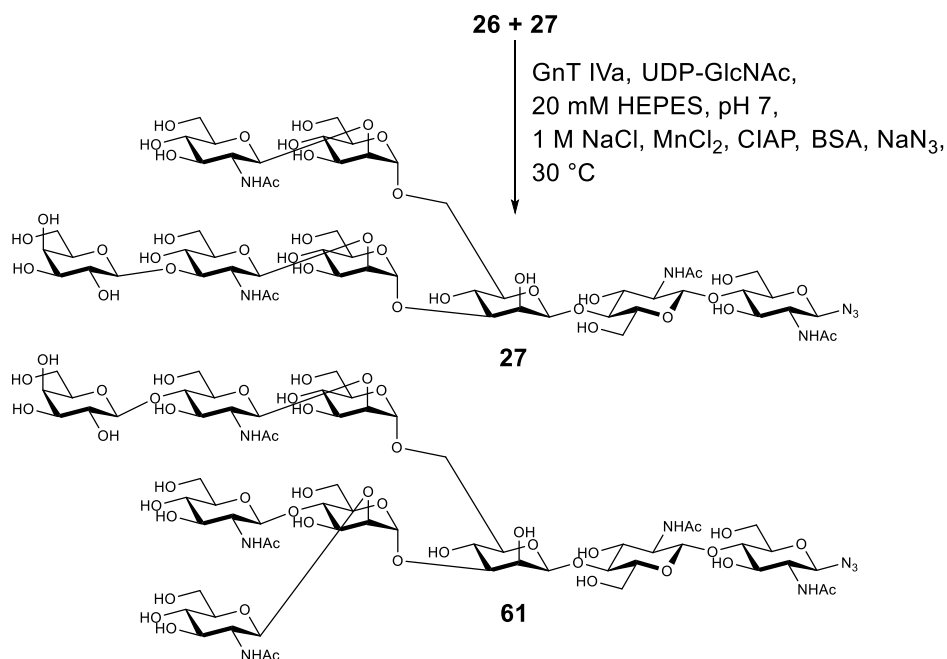


Abbildung 87: Umsetzung der Octasaccharidazide **26** und **27** mit GnT IVa.

Die Reaktionen wurden per LC-MS kontrolliert. Mit beiden GlcNAc-Transferasen war die Bildung nur eines triantennären Produkts zu erkennen, wobei jeweils eine der galactosylierten Verbindungen **26/27** nicht umgesetzt wurde (Abbildung 89).

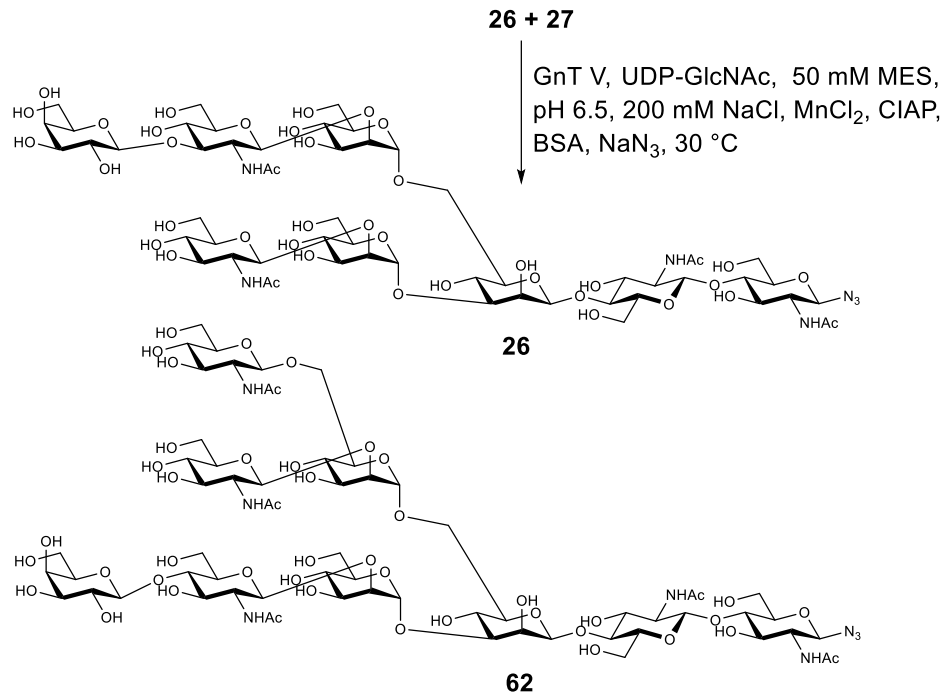


Abbildung 88: Umsetzung der Octasacchariazide **26** und **27** mit GnT V.

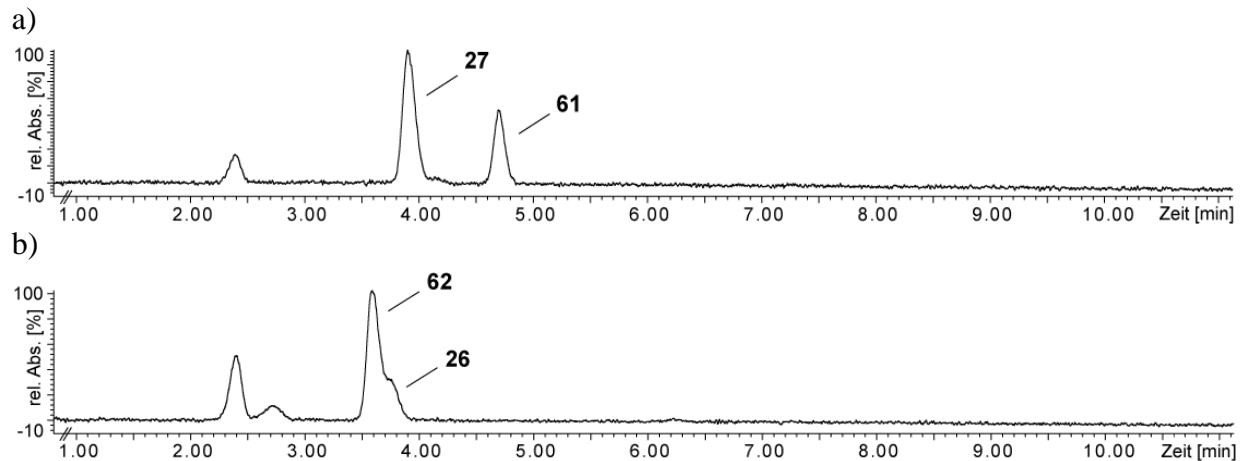
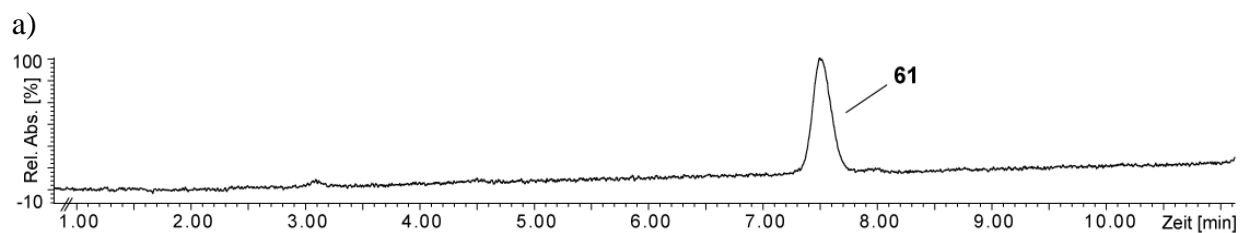


Abbildung 89: UV-Chromatogramme (LC-MS; 200 nm) der Umsetzung von **26** und **27** mit GnT IVa (a) und GnT V (b) (HyperCarb, 10-20 %).

Die triantennären Nonasaccharide **61** und **62** konnten nach HPLC in Ausbeuten von 40 % bzw. 71 % und in guter Reinheit erhalten werden (Abbildung 90).



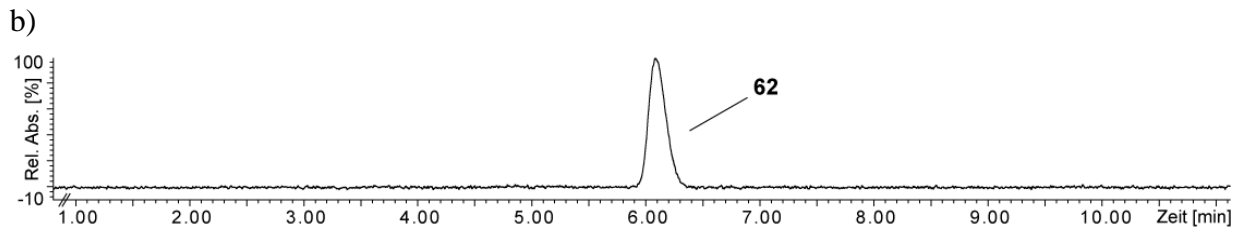


Abbildung 90: UV-Chromatogramme (LC-MS; 200 nm) der gereinigten Nonasaccharidazide **61** (a) und **62** (b) (HyperCarb, 9-14 %).

Dies bestätigt die Vermutung, dass eine Galactose am reagierenden Arm die Reaktion blockiert, eine Galactose am nicht reagierenden Arm jedoch gut toleriert wird. Da die beiden Octasaccharide **26** und **27** jedoch aufgrund ihrer unzureichenden Trennbarkeit nicht gut in reiner Form zugänglich waren, wurde getestet, ob die beiden GlcNAc-Transferasen zusätzlich zur Galactose auch eine Sialinsäure am nicht reagierenden Arm tolerieren. Hierzu wurde das am 1,6-Arm sialylierte Nonasaccharid **40** mit GnT IVa und das am 1,3-Arm sialylierte Nonasaccharid **41** mit GnT V im analytischen Maßstab umgesetzt (Abbildung 92, Abbildung 91).

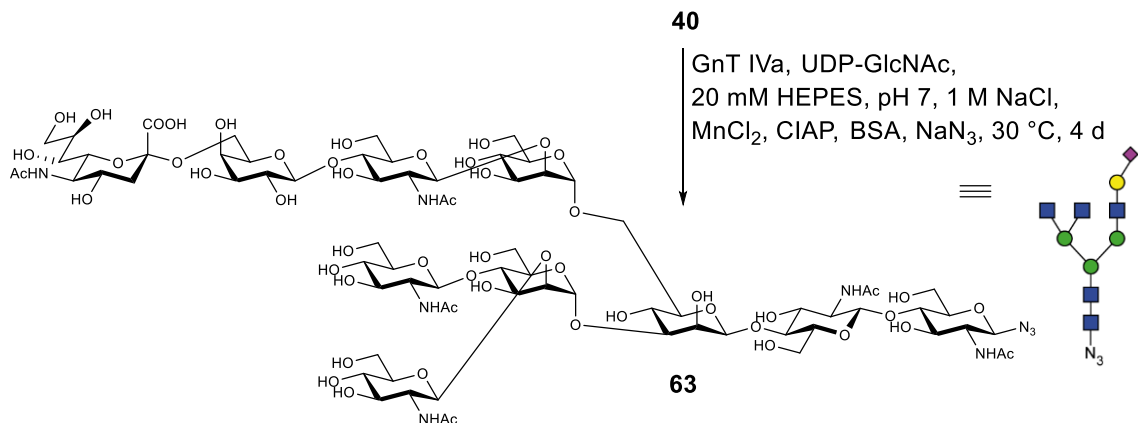


Abbildung 92: Analytische Umsetzung des Nonasaccharidazids **40** mit GnT IVa.

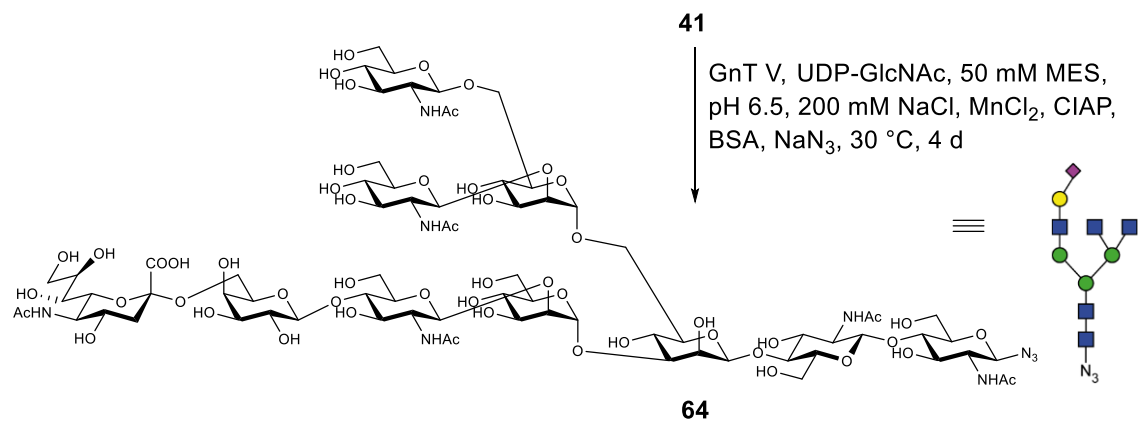


Abbildung 91: Analytische Umsetzung des Nonasaccharidazids **41** mit GnT V.

Nach 4 Tagen wurde bei der Reaktion von **40** mit GnT IVa ein Umsatz von ca. 75 % erreicht, während die Reaktion von **41** mit GnT V bereits einen vollständigen Umsatz zeigte (Abbildung 93, Abbildung 94).

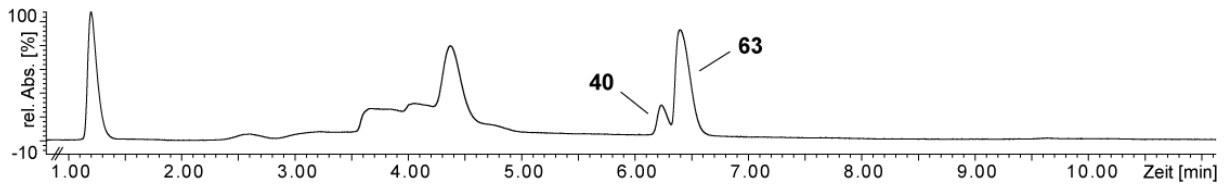


Abbildung 93: UV-Chromatogramm (LC-MS; 200 nm) der Umsetzung des Nonasaccharidazids **40** mit GnT IVa (Hydrosphere C18, 0-10 %).

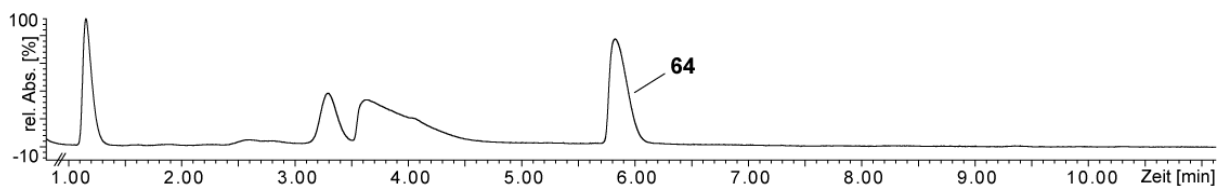
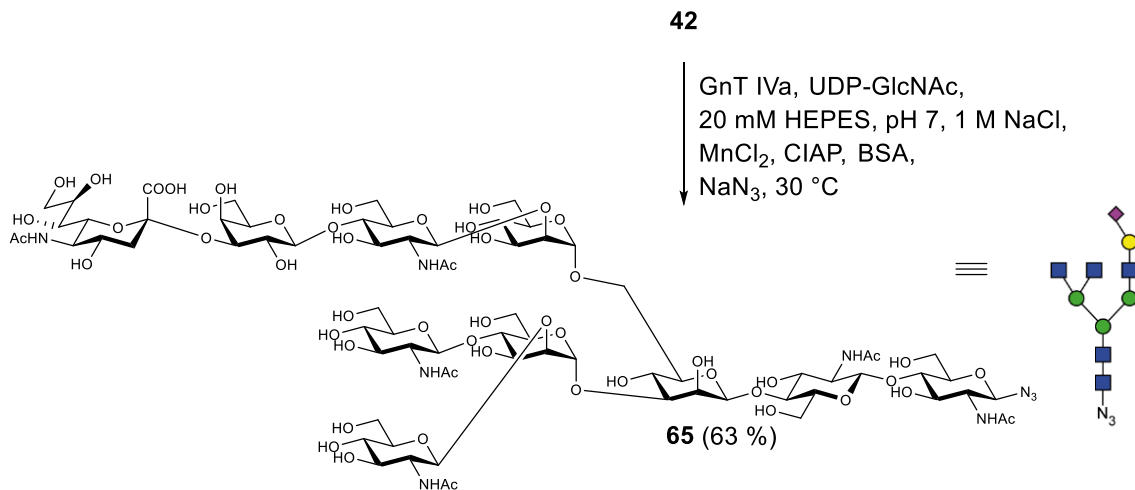


Abbildung 94: UV-Chromatogramm (LC-MS; 200 nm) der Umsetzung des Nonasaccharidazids **41** mit GnT V (Hydrosphere C18, 0-10 %).

Da GnT IVa und V sowohl eine Galactose als auch eine Sialinsäure am nicht reagierenden Arm tolerieren, können auf diesem Weg unsymmetrische triantennäre *N*-Glycane hergestellt werden. Die Reaktionen wurden in größerem Maßstab wiederholt. Die Enzymmenge wurde erhöht, da die Edukte mit Galactose und Sialinsäure keine guten Substrate sind und die Enzymreaktionen deshalb deutlich langsamer ablaufen als mit Substraten ohne Galactosen. Es wurden sowohl die 2,6-sialylierten Glycane **41** und **40** als auch die 2,3-sialylierten Glycane **43** und **42** mit GnT IVa bzw. GnT V umgesetzt (Abbildung 95).

a)



b)

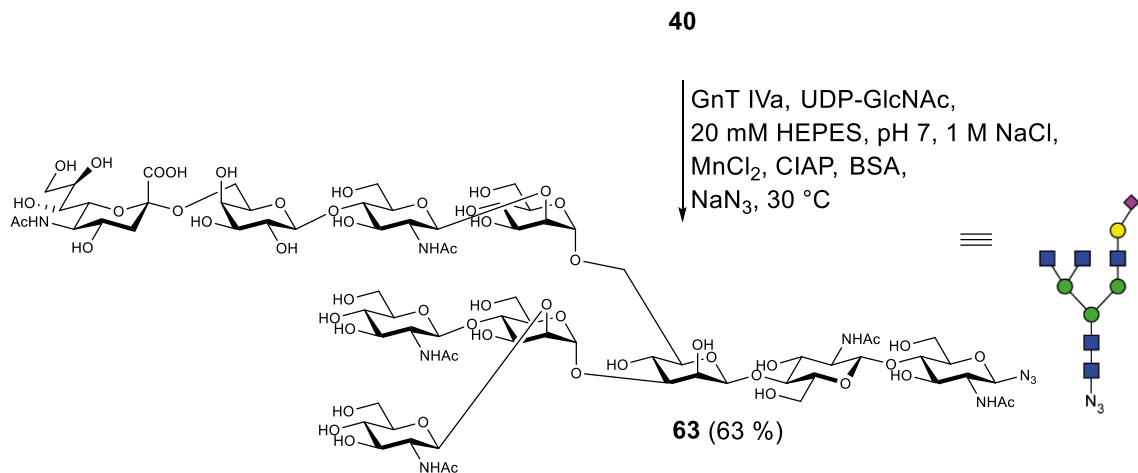
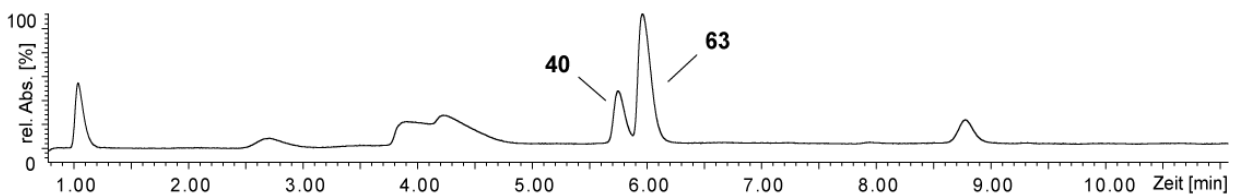


Abbildung 95: Umsetzung der Nonasaccharidazide **42** (a) und **40** (b) mit GnT IVa.

Die Glycane **40** und **42** wurden in einer Konzentration von 10 mM bei pH 7 mit GnT IVa (*Bos taurus*) umgesetzt. Um eine möglichst vollständige Reaktion zu erreichen, wurden 1.5 Äquivalente UDP-GlcNAc eingesetzt (Abbildung 96). Die Reaktionen wurden nach 6 Tagen abgebrochen und die Produkte über HPLC gereinigt. In beiden Fällen ließen sich Reste der Edukte gut abtrennen (Abbildung 97).

a)



b)

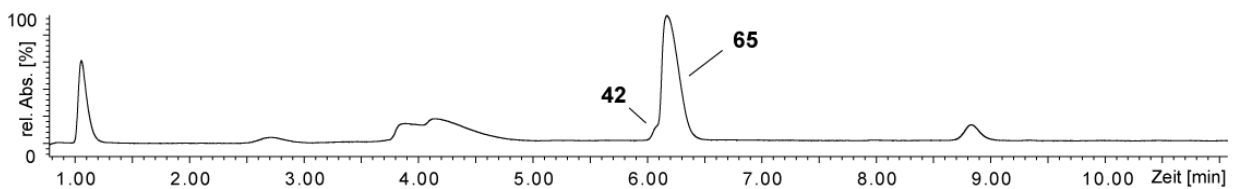
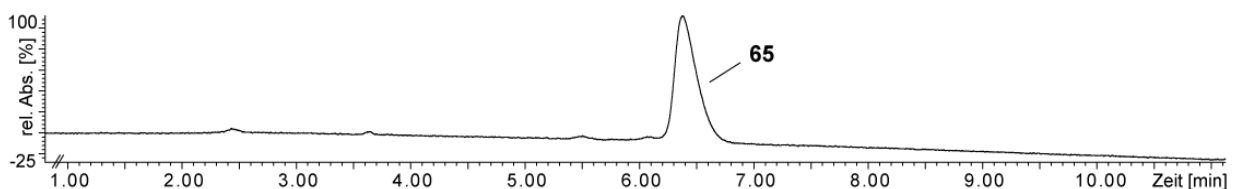


Abbildung 96: UV-Chromatogramme (LC-MS; 200 nm) der Umsetzung der Nonasaccharidazide **40** (a) und **42** (b) (Hydrosphere C18, 0-10 %).

a)



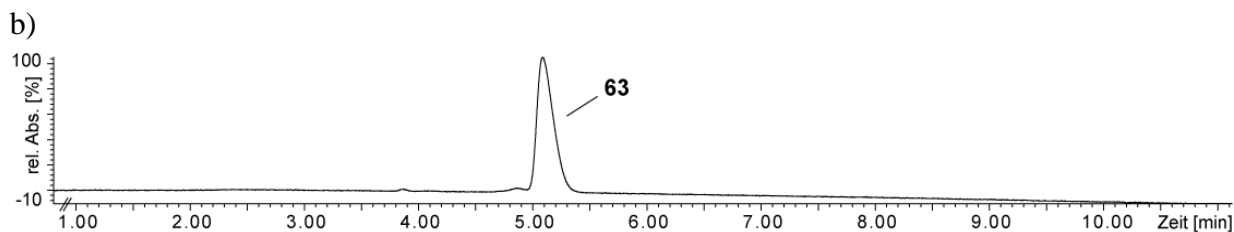


Abbildung 97: UV-Chromatogramme (LC-MS; 200 nm) der gereinigten Decasaccharidazide **65** (a) und **63** (b) (HyperCarb, 10-30 %).

Die Zielverbindungen **63** und **65** konnten im kleinen Maßstab (bis 2 mg Akzeptor) in guter Reinheit und einer Ausbeute von je 63 % erhalten werden (Abbildung 98). Bei Verwendung von 7 mg Akzeptor waren die Ausbeuten jedoch deutlich niedriger. Hier wären für einen vollständigen Umsatz eine höhere Enzymmenge und eine längere Reaktionszeit nötig.

Zur Einführung einer β -1,6-Verzweigung am 1,6-Arm wurden die Glycane **41** und **43** (10 mM) bei pH 6.5 mit GnT V (*Mus musculus*) umgesetzt (Abbildung 99).

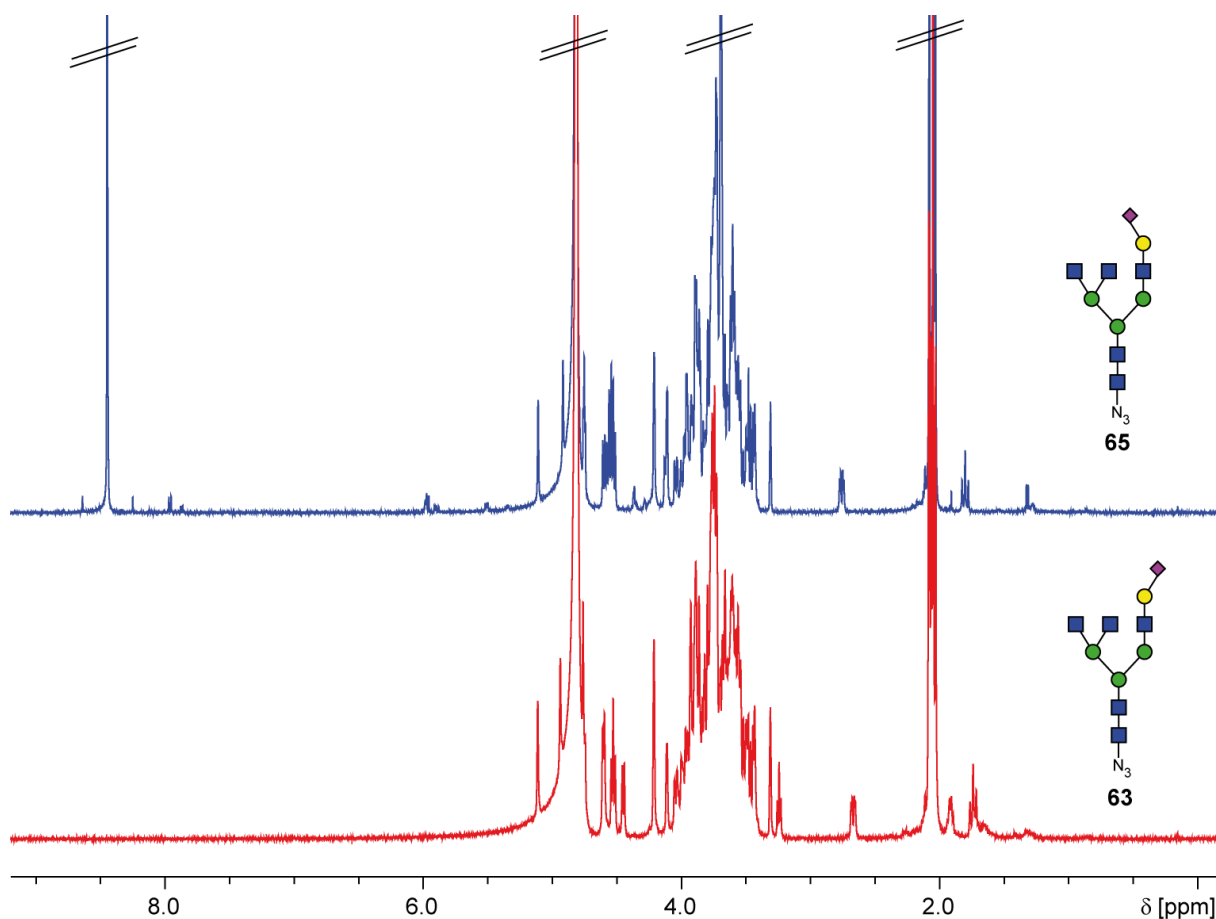


Abbildung 98: ¹H-NMR-Spektren von **65** (blau) und **63** (rot).

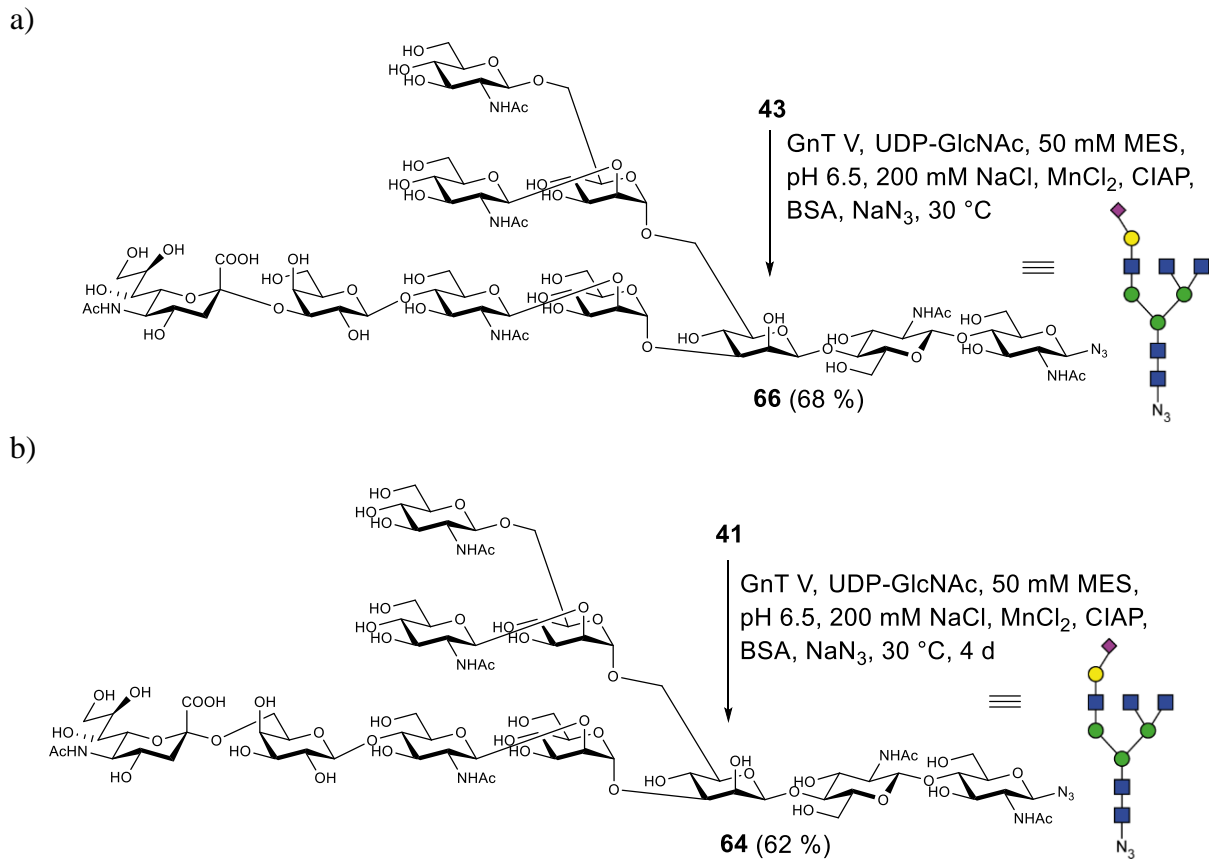


Abbildung 99: Umsetzung der Nonasaccharidazide **41** (a) und **43** (b) mit GnT V.

Die Enzymmenge wurde im Vergleich zu den üblichen Reaktionsbedingungen stark erhöht. Auch hier wurden 1.5 Äquivalente UDP-GlcNAc eingesetzt. Nach 7 Tagen wurden die Reaktionen durch LC-MS kontrolliert. Die Umsetzung von **41** zu **64** war bereits vollständig, während der Umsatz von **43** zu **66** ca. 75 % betrug (Abbildung 100).

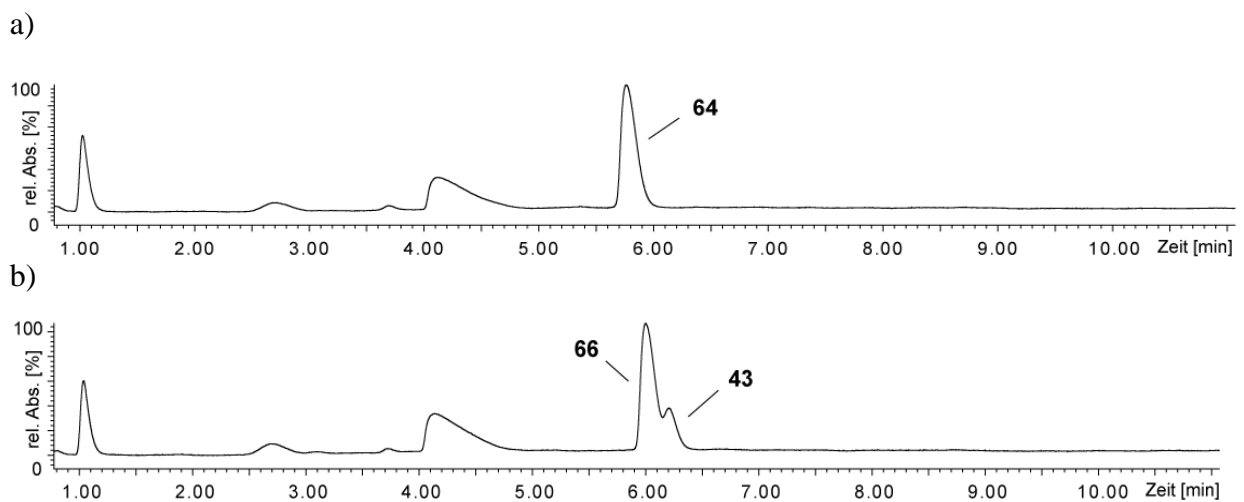


Abbildung 100: UV-Chromatogramme (LC-MS; 200 nm) der Umsetzung der Nonasaccharidazide **41** (a) und **43** (b) mit GnT V (Hydrosphere C18, 0-10 %)

Die Reaktionen wurden nach 7 bzw. 18 Tagen Reaktionszeit gereinigt. Der Umsatz war in beiden Fällen höher als bei den GnT IVa-Reaktionen. Jedoch ließen sich hier die Edukte nicht gut von den Produkten abtrennen, da sich die Retentionszeiten nur gering unterschieden. Die beiden triantennären Zielverbindungen **64** und **66** wurden in guter Reinheit in Ausbeuten von 62 % bzw. 68 % erhalten (Abbildung 101, Abbildung 102).

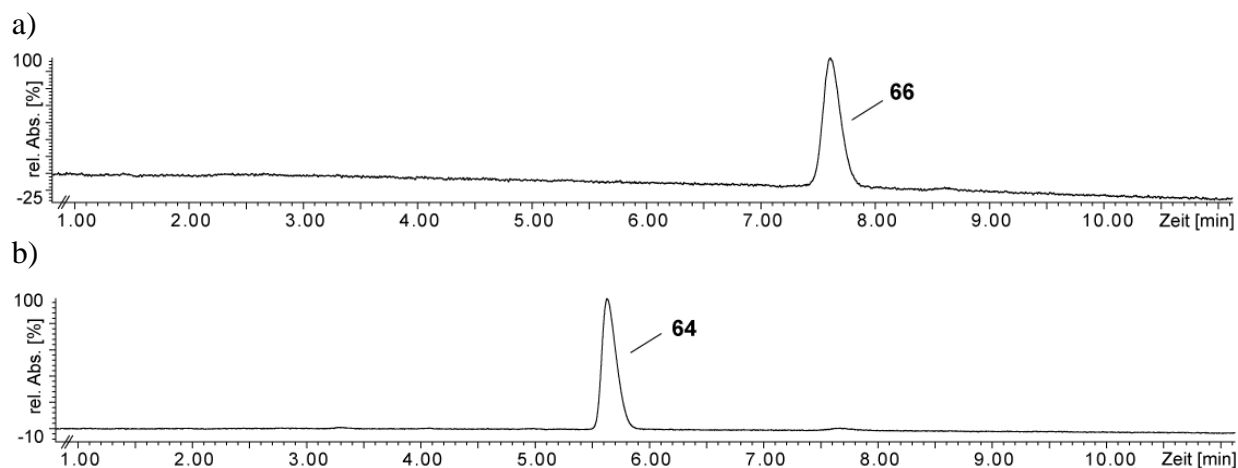


Abbildung 102: UV-Chromatogramme (LC-MS; 200 nm) der gereinigten Decasaccharidazide **66** (a) und **64** (b) (HyperCarb, 10-20 %).

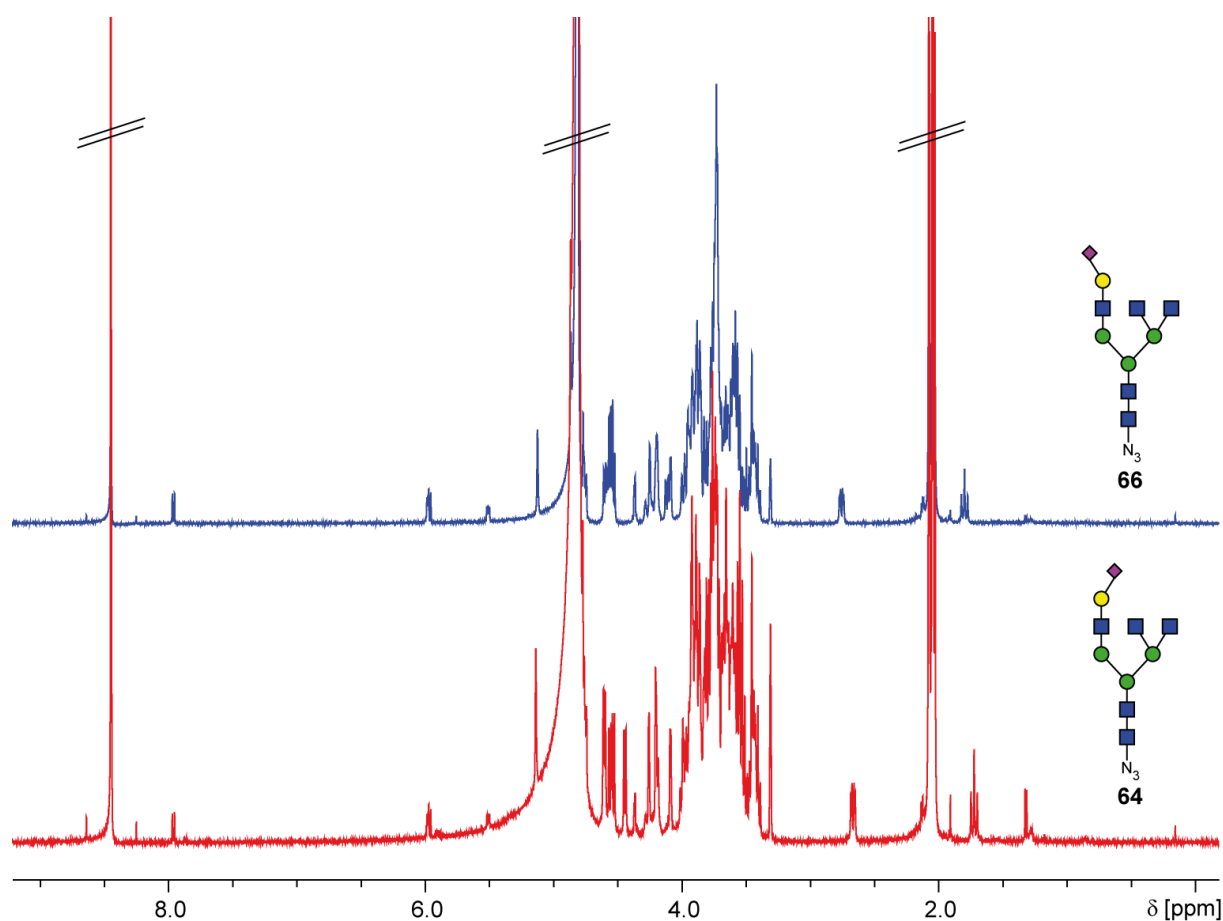


Abbildung 101: $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von **66** (blau) und **64** (rot).

Durch die Einführung einer zusätzlichen Antenne wurden insgesamt vier unsymmetrische triantennäre *N*-Glycanazide erhalten. Des Weiteren wurde getestet, ob die *N*-Acetylglucosaminyl-Transferasen auch eine *core*-Fucose tolerieren. Dafür wurde im analytischen Maßstab eine Mischung der biantennären fucosylierten Glycane **49** und **53** mit GnT V, sowie **48** und **52** mit GnT IVa umgesetzt (Abbildung 104, Abbildung 105).

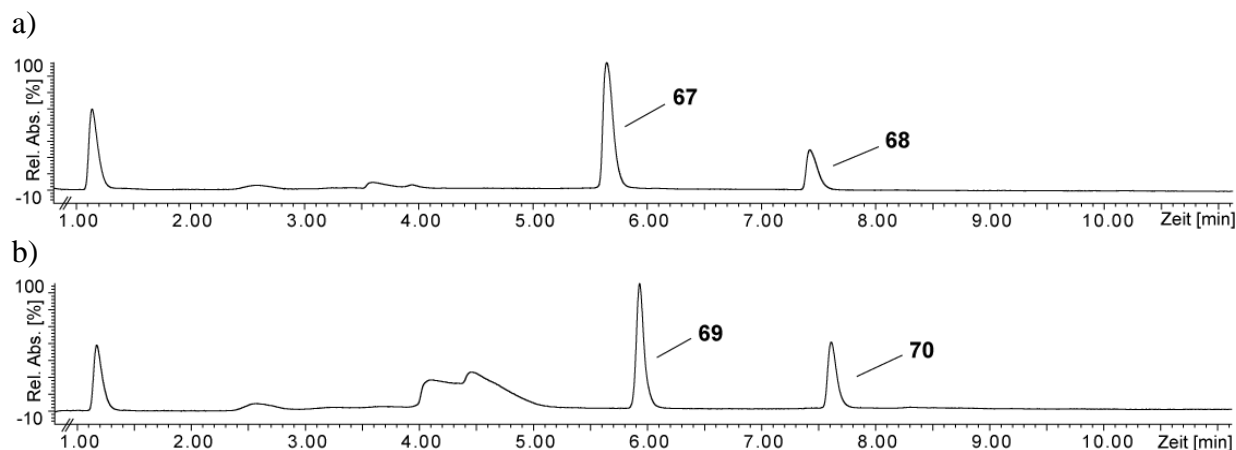


Abbildung 103: UV-Chromatogramme (LC-MS; 200 nm) der Umsetzung von **52** und **48** mit GnT IVa (a) bzw. von **53** und **49** mit GnT V (b) (Hydrosphere C18, 0-15 %).

Nach 5 Tagen war die Umsetzung mit GnT V vollständig, während die Reaktion mit GnT IVa erst nach 8 Tagen vollständigen Umsatz zeigte (Abbildung 103).

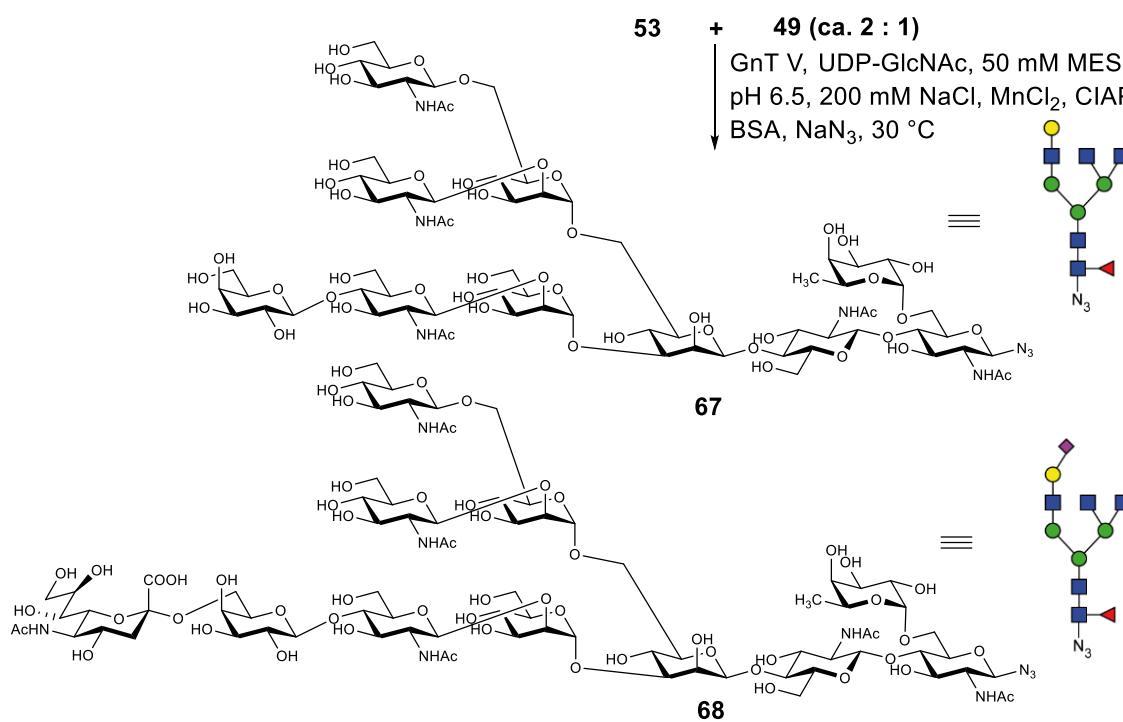


Abbildung 104: Umsetzung der Mischung aus **53** und **49** mit GnT V.

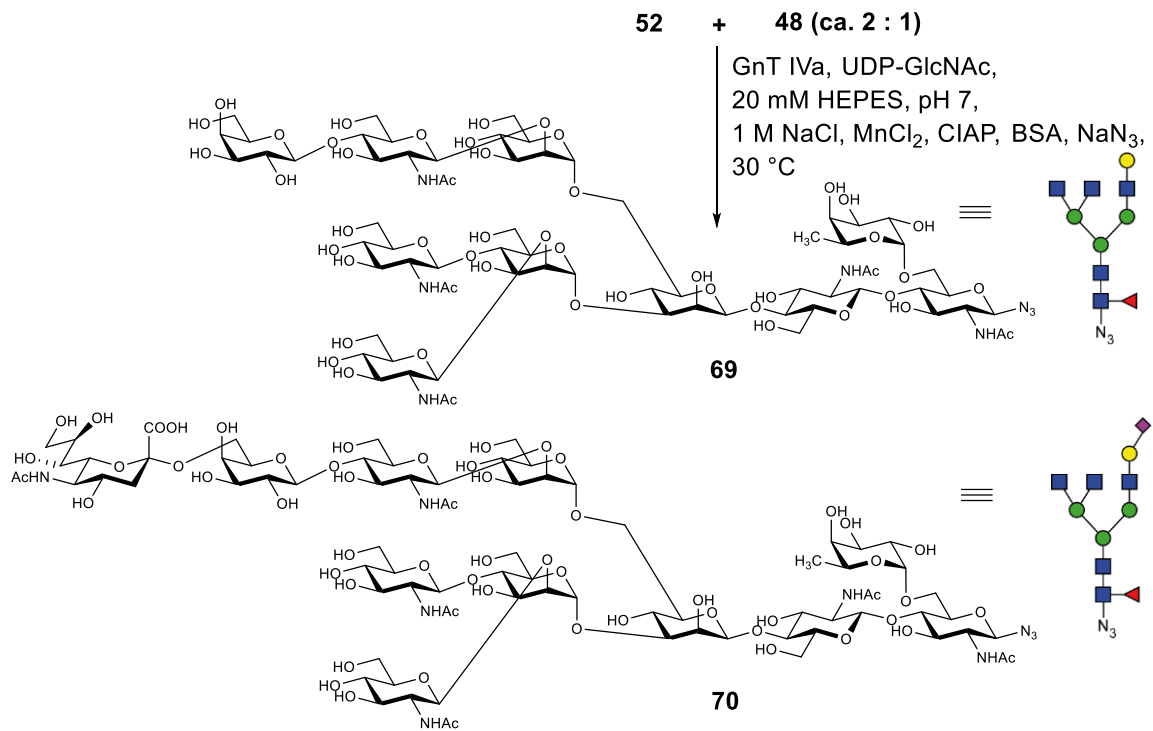


Abbildung 105: Umsetzung der Mischung aus 52 und 48 mit GnT IVa.

Es wurde gefunden, dass sowohl GnT IVa als auch GnT V neben einer Galactose und einer Sialinsäure am nicht reagierenden Arm auch eine *core*-Fucose tolerieren.

6.2. Synthese monosialylierter triantennärer N-Glycane

Abschließend wurde versucht die triantennären monosialylierten Glycane **63**, **64**, **65** und **66** an den freien GlcNAc-Termini unvollständig zu galactosylieren. Die Monogalactosylierung wurde zunächst an dem triantennären Glycan **66** getestet (Abbildung 106).

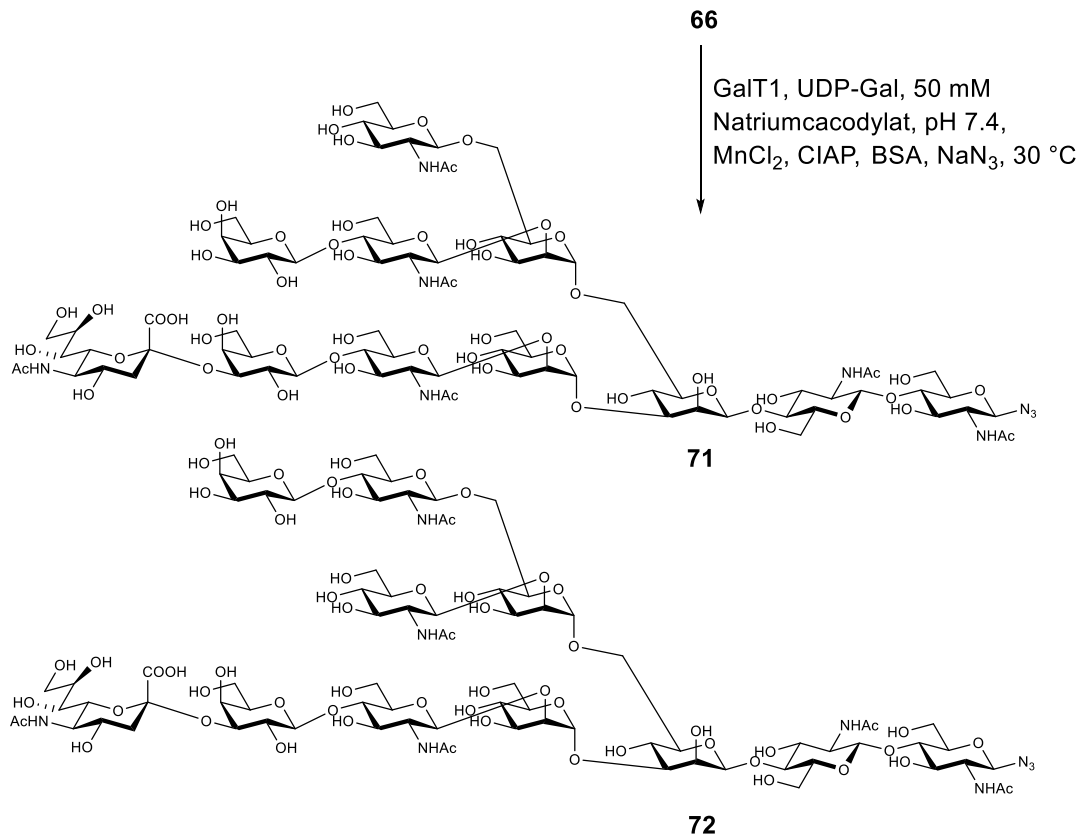


Abbildung 106: Unvollständige enzymatische Galactosylierung des Decasaccharidazids **66**.

Dazu wurden eine Eduktkonzentration von 4 mM und 1.3 eq UDP-Galactose eingesetzt. Die Reaktion wurde nach 10 min durch LC-MS überprüft (Abbildung 107).

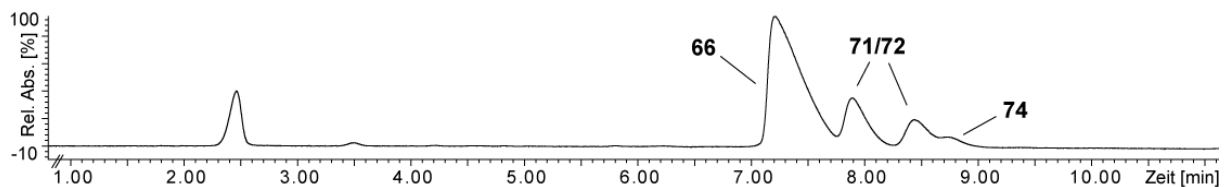


Abbildung 107: UV-Chromatogramm (LC-MS; 200 nm) der Reaktionskontrolle der Galactosylierung von **66** nach 10 Minuten (HyperCarb, 10-20 %).

Neben der unvollständigen Umsetzung zeigte sich, dass die Trennung der vier Produkte anspruchsvoll ist. Da die Verfügbarkeit der Edukte einen limitierenden Faktor darstellte, wurde die unvollständige Galactosylierung nicht weiter verfolgt und stattdessen eine vollständige Galactosylierung durchgeführt.

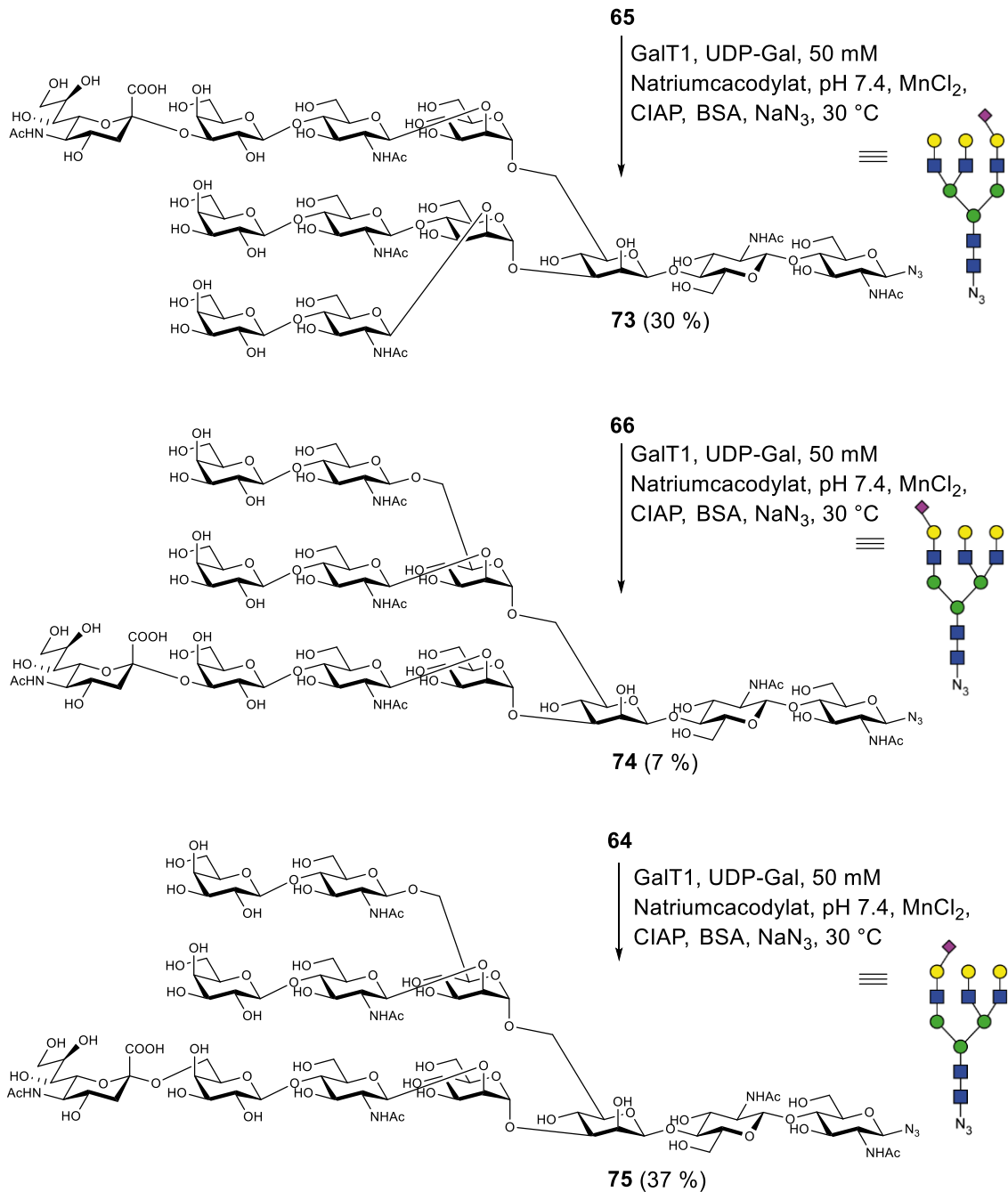
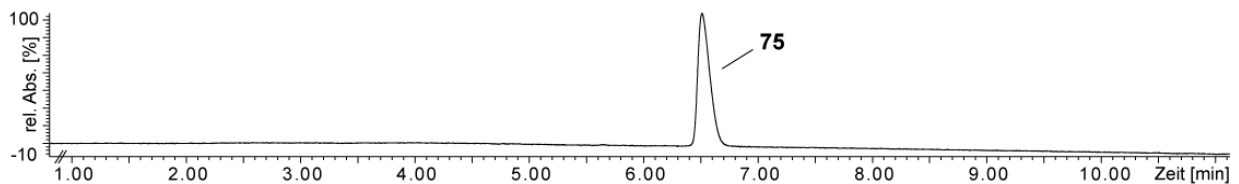


Abbildung 108: Enzymatische Galactosylierung der Decasaccharidazide **64-66**.

Hierzu wurden die drei Glycane **64**, **65** und **66** mit 3 Äquivalenten UDP-Galactose bei pH 7.4 mit GalT1 (*Bos taurus*) umgesetzt (Abbildung 108). Nach 24 Stunden wurde die Reaktion beendet und die Produkte wurden durch HPLC gereinigt.

a)



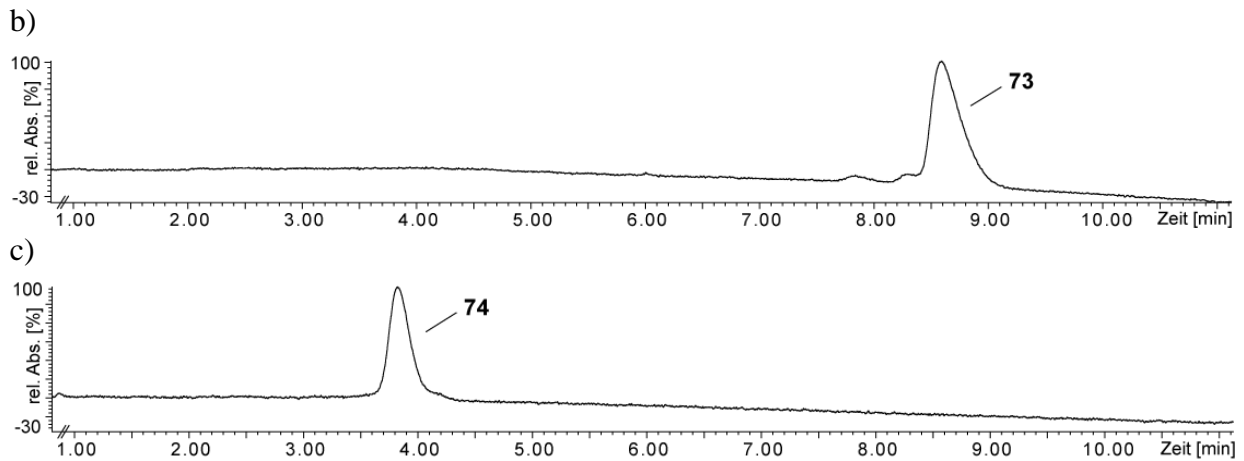


Abbildung 109: UV-Chromatogramme (LC-MS; 200 nm) der gereinigten Dodecasaccharidazide **75** (a, HyperCarb, 5-30 %), **73** (b, HyperCarb, 5-30 %) und **74** (c, HyperCarb, 5-25 %).

Die drei Zielverbindungen **73**, **74** und **75** konnten in guter Reinheit in Ausbeuten von 7-37 % erhalten werden (Abbildung 109). Die relativ geringen Ausbeuten resultieren aus den wiederholten HPLC-Reinigungen, die nötig waren, um die sialylierten Produkte in der gewünschten Reinheit zu erhalten. Hierbei stellt vor allem das Tailing der sialylierten Verbindungen ein Problem dar, das sich auch bei steileren Gradienten nicht vermeiden ließ. Insgesamt konnten damit im Rahmen dieser Arbeit 27 bi- und triantennäre unsymmetrische *N*-Glycanazide hergestellt und gereinigt werden. Diese wurden über unterschiedliche Strategien durch enzymatischen Auf- oder Abbau aus symmetrischen *N*-Glycanvorläufern gewonnen. In allen Fällen konnte die Trennung der entstandenen Produkte durch HPLC optimiert und dadurch reine Glycane erhalten werden.

7. Zusammenfassung

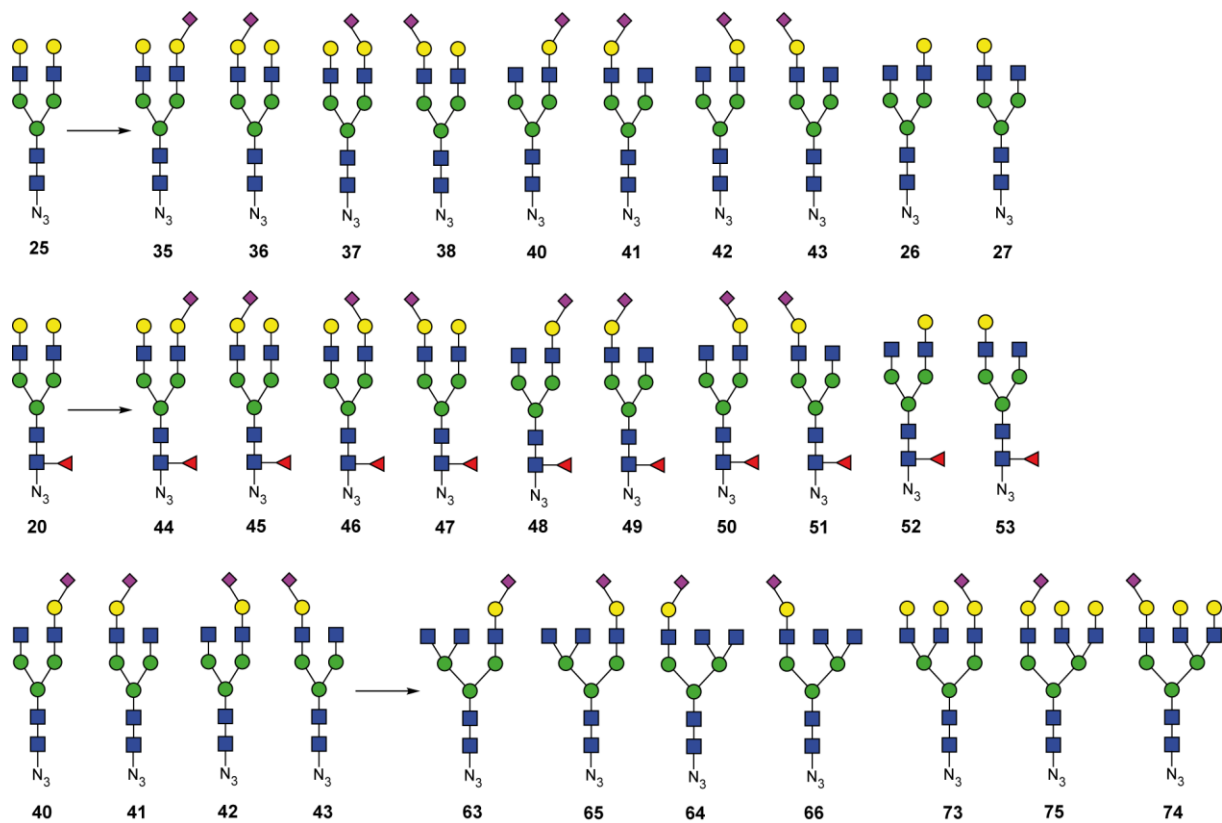
Glycosylierungen gehören zu den wichtigsten posttranslationalen Modifikationen von Proteinen und tragen maßgeblich zu deren Eigenschaften und Stabilität bei. Für die Analyse der Funktion von Glycanen auf Glycoproteinen ist es essentiell Zugang zu reinen Glycanen zu haben. Die Mikroheterogenität der *N*-Glycane erschwert zwar deren Isolation aus natürlichen Quellen, jedoch kann das Sialoglycopeptid **5** in guten Ausbeuten aus Hühnereigelb extrahiert werden. Dieses kann wiederum durch chemische und enzymatische Modifikationen zu dem Nonasaccharid **25** umgesetzt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Methoden etabliert, um ausgehend von dem Nonasaccharid **25** eine Bibliothek unterschiedlicher unsymmetrischer *N*-Glycane darzustellen. **25** konnte durch unvollständige Sialylierungen mit einer α -2,6-Sialyltransferase aus *Photobacterium damsela* und einer α -2,3-Sialyltransferase aus *Vibrio species* zu den monosialylierten *N*-Glycanen **35**, **36**, **37** und **38** umgesetzt werden. Die Ausbeuten der Monosialylierungen lagen nach HPLC-Reinigung bei 27 bis 42 %. Die monosialylierten Glycane wurden im Anschluss mit einer β -Galactosidase aus *Aspergillus oryzae* zu den Glycanen **40**, **41**, **42** und **43** umgesetzt. Hierbei konnten nach Reinigung über RP-HPLC Ausbeuten von 77 bis 99 % erreicht werden. Die beiden monogalactosylierten *N*-Glycane **26** und **27** wurden aus **40** und **41** durch Behandlung mit Neuraminidase aus *Clostridium perfringens* gewonnen.

Zusätzlich zu diesen unsymmetrischen *N*-Glycanen konnten auch deren *core*-fucosylierte Analoga dargestellt werden. Als Ausgangsverbindung hierfür wurde das aus **25** zugängliche Decasaccharid **20** verwendet. Die Glycane **44**, **45**, **46** und **47** wurden durch unvollständige Sialylierung in Ausbeuten von 39 bis 54 % erhalten. Eine Behandlung mit β -Galactosidase ergab die Glycane **48**, **49**, **50** und **51** in Ausbeuten von 80 bis 90 %. Die monogalactosylierten Glycane **52** und **53** wurden in Ausbeuten von je 87 % erhalten.

Aus biantennären unsymmetrischen *N*-Glycanen konnten triantennären Glycane erhalten werden. Dies gelang durch Umsetzung der monosialylierten Glycane **40** und **42** mit der *N*-Acetylglucosamintransferase GnT IVa. Die beiden triantennären Glycane **63** und **65** wurden

in Ausbeuten von je 63 % erhalten. Durch Umsetzung von **41** und **43** mit GnT V wurden **64** und **66** in Ausbeuten von 62 bis 68 % erhalten. Weiterhin wurden drei der triantennären *N*-Glycane mit β -1,4-Galactosyltransferase (GalT1) galactosyliert. So konnten die selektiv monosialylierten Glycane **73**, **75** und **74** in Ausbeuten von 7 bis 37 % erhalten werden. Somit gelang es im Rahmen dieser Arbeit eine umfangreiche Bibliothek unsymmetrischer bi- und triantennärer *N*-Glycane aufzubauen und deren Darstellung und Reinigung zu optimieren. Diese steht nun für weitere Modifikationen und Verwendung auf Glycanarrays zur Verfügung.



8. Summary

Glycosylation is one of the most important posttranslational modifications of proteins and contributes significantly to their properties and stability. It is essential for the analysis of the function of glycoproteins to have access to pure glycans. The microheterogeneity of *N*-glycans complicates direct isolation of glycans from natural sources, however the sialoglycopeptide **5** can be extracted from egg yolk in high yields. This can be converted to the nonasaccharide **25** by enzymatic modifications.

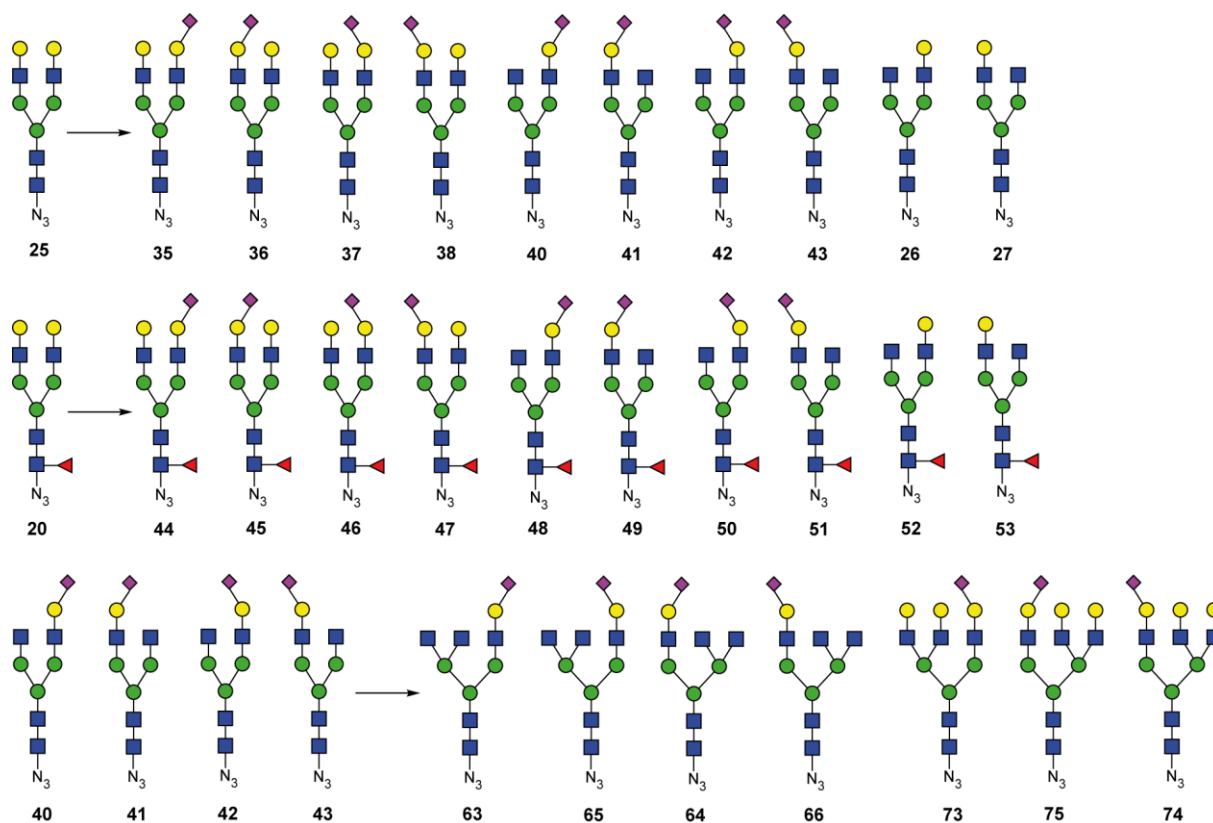
In this thesis, methods to synthesize a library of different asymmetric *N*-glycans from nonasaccharide **25** were established. Nona could be converted to the monosialylated glycans **35**, **36**, **37** and **38** by monosialylation with a α -2,6-sialyltransferase from *Photobacterium damsela*e and a α -2,3-sialyltransferase from *Vibrio species*. Yields of the monosialylation after purification by HPLC ranged between 27 and 42 %. The monosialylated glycans could be converted to the glycans **40**, **41**, **42** and **43** using a β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. After HPLC yields between 77 and 99 % could be obtained. Then the two monogalactosylated *N*-glycans **26** and **27** could be obtained from **40** and **41** by treatment with neuraminidase from *Clostridium perfringens*. After HPLC the yields ranged between 85 and 87 %.

In addition to these asymmetric *N*-glycans their *core*-fucosylated analogues could be synthesized. Starting material was the deca-saccharide **20**, which is accessible from **25**. The glycans **44**, **45**, **46** and **47** could be obtained by incomplete sialylation in yields between 39 and 54 %. By treatment with β -galactosidase, the glycans **48**, **49**, **50** and **51** could be obtained in yields between 80 and 90 %. The monogalactosylated glycans **52** and **53** could be obtained in a yield of 87 %.

In addition to the biantennary asymmetric *N*-glycans a series of triantennary glycans could be synthesized. Therefore, the monogalactosylated and monosialylated glycans **40** and **42** were elongated by the *N*-acetylglucosamintransferase GnT IVa. After HPLC the triantennary glycans **63** and **65** could be obtained in a yield of 63 %. **64** and **66** could be obtained by reaction with

GnT V in a yield between 62 to 68 %. Finally, three of the triantennary *N*-glycans were galactosylated completely by a β -1,4-galactosyltransferase (GalT1). Thus, the glycans **73**, **75** and **74** could be obtained in yields between 7 and 37 %.

Therefore, in this thesis, an extensive library of asymmetric bi- and triantennary *N*-glycans was successfully synthesized and their purification was optimized. These glycans are now available for further modification and use in glycan arrays.



9. Experimenteller Teil

9.1. Allgemeine Arbeitstechniken und Methoden

Für Reaktionen im Wässrigen wurde Wasser in HPLC-Qualität verwendet. Für die Dünnschichtchromatographie wurden Aluminiumfertigfolien „Alugram[®] Sil G/UV₂₅₄“ der Firma Macherey-Nagel verwendet. Zur Detektion wurde die DC-Platte mit einem kohlenhydratspezifischen Anfärbereagenz benetzt und im Heißluftstrom entwickelt. Das Reagenz enthielt eine 1:1-Mischung aus 2 N Schwefelsäure und 0.2 %iger ethanolischer Resorcinmonomethyletherlösung.

Zur Größenausschlusschromatographie wurde eine Amersham Pharmacia Äkta-Purifizierungsanlage mit einem Pharmacia Biotech UV-900 Detektor und einer Pharmacia Biotech P-900 Gradientenpumpe verwendet. Die Detektion erfolgte bei 214 nm, 254 nm und 280 nm. Es wurden folgende Säulen verwendet: Hi Load Superdex[®] 30 (16x600 mm und 26x600 mm) und Sephadex G25 (15x200 mm, 25x660 mm und 25x155 mm).

Für die HPLC-Reinigungen kam eine Agilent 1200-Anlage mit einem Agilent 1100 Detektor zum Einsatz. Die Detektion erfolgte bei 200 nm, 214 nm, 254 nm und 280 nm. Folgende Säulen wurden verwendet: YMC Hydrosphere[®] C18 120 Å, S-5 µm (Säulengröße 10x150 mm), YMC Hydrosphere[®] C18, 120 Å, S-5 µm (Säulengröße 20x50 mm), Hydrosphere[®] C18, 120 Å, 3 µm (Säulengröße 50x2.1 mm) und eine Thermo Scientific Hypercarb[®], 250 Å, S-3 µm (Säulengröße 4.6x150 mm). Die Elution erfolgte durch einen Gradienten aus Eluent A (Wasser mit 0.1 % Ameisensäure) und Eluent B (Acetonitril mit 0.1 % Ameisensäure).

Zur Messung der spezifischen Drehwerte wurde ein Perkin-Elmer Polarimeter 241 verwendet. Dieses wurde bei Zimmertemperatur mit einer 1 mL Küvette mit einer Länge von 10 cm verwendet. Es kam dabei eine Natriumlampe mit einer Wellenlänge von 589 nm zum Einsatz. HPLC-MS-Läufe wurden mit einer Waters Acquity UPLC H-Class-Anlage mit Diodenarray-Detektor vermessen. Dabei wurden folgende HPLC-Säulen verwendet: YMC-UltraHT Hydrosphere[®] C18, 120 Å, S-2 µm (2.0x30 mm) und Thermo Scientific Hypercarb[®], 250 Å, S-3 µm (2.1x30 mm). Die Elution erfolgte durch einen Gradienten aus Eluent A (Wasser mit 0.1 % Ameisensäure) und Eluent B (Acetonitril mit 0.1 % Ameisensäure). Die Dauer des Gradienten betrug 9 min bei einer Flussrate von 0.5 mL/min.

Für hochaufgelöste ESI-Massenspektren wurde ein Thermo Q Exactive Orbitrap-Spektrometer mit einer Dionex Ultimate 3000-Anlage verwendet. Alle Proben wurden als Direkteinlass direkt ins Spektrometer eingespritzt. Die Flussrate betrug 0.5 mL/min.

Zur Messung der NMR-Spektren kam ein Bruker Avance III HD 500 Spektrometer zum Einsatz. Die chemischen Verschiebungen beziehen sich auf Tetramethylsilan ($\delta = 0$ ppm). Bei allen Messungen wurden 5 μ L [D₄]-Methanol (δ (¹H) = 3.34 ppm, δ (¹³C) = 49.5 ppm) als Standard zugegeben.^[91] Chemische Verschiebungen sind in ppm, Kopplungskonstanten in Hertz angegeben. Die Zuordnung der Signale erfolgte über Spektrensätze bestehend aus ¹H, ¹³C (JMOD), HH-COSY, HSQC (gekoppelt und entkoppelt), HH-TOCSY und NOESY-Experimente. Die Verknüpfung der Monosaccharide wurde durch NOESY-Experimente zugeordnet. Die Konfiguration der anomeren Zentren konnten durch gekoppelte HSQC-Spektren bestimmt werden. Die Zuordnung der Signale erfolgte nach folgendem Schema (Abbildung 110):

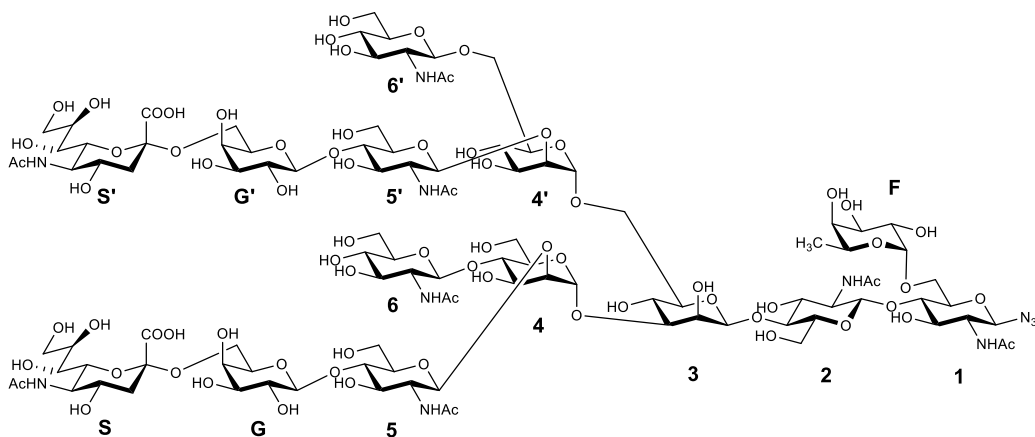


Abbildung 110: NMR-Zuordnung für komplexe N-Glycane.

9.2. Verwendete Enzyme

AgFucT6: α -1,6-Fucosyltransferase aus *Anopheles gambiae* (EC 2.4.1.68)
4.5 mg/mL in 25 mM TRIS, 150 mM NaCl, 0.1 % NaN₃, pH 7.0
(recombinant aus *Pichia pastoris*).

BgaC Glu233Gly: Galactosidase aus *Bacillus circulans* 33.5 mg/mL in 25 mM HEPES,
200 mM NaCl, pH 7.2.

- GalT1: β -1,4-Galactosyltransferase aus *Bos taurus* (EC 2.4.1.38) (Sigma Aldrich) 10 mU/ μ L und β -1,4-Galactosyltransferase aus *Sus scrofa* (EC 2.4.1.38) 1 mg/mL in 0.1 M TRIS, 0.15 M NaCl, 0.5 M L-Arg, pH 7.4 (recombinant aus *E. coli*).^[92]
- ST3: α -2,3-Sialyltransferase aus *Vibrio species* (EC 2.4.99.4) 3 mg/mL in 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 0.1 % NaN₃, pH 7.0 (recombinant aus *E. coli*).
- ST6: α -2,6-Sialyltransferase aus *Photobacterium damsela* (EC 2.4.99.1) 2.9 mg/mL in 25 mM TRIS, 150 mM NaCl, 0.1 % NaN₃, pH 7.0 (recombinant aus *E. coli*).
- Neuraminidase: Sialidase aus *Clostridium perfringens* (EC 3.2.1.18) 25 U/ μ L.
- β -Galactosidase: β -D-Galactosidase aus *Aspergillus oryzae* (EC 3.2.1.23) (Sigma Aldrich) 5 U/mg.
- GnT III: β -1,4-N-Acetylglucosamintransferase aus *Homo sapiens*, in 20 mM HEPES, 200 mM NaCl, pH 7 (recombinant aus *E. coli*).
- GnT IVa: β -1,4-N-Acetylglucosamintransferase aus *Bos taurus*, 1.05 mg/mL in 20 mM HEPES, 1 M NaCl, pH 7.0 (recombinant aus *E. coli*).
- GnT V: β -1,6-N-Acetylglucosamintransferase aus *Mus musculus* in 20 mM HEPES, 200 mM NaCl, pH 7.0 (recombinant aus *E. coli*).
- CIAP: alkalische Phosphatase aus *Bos taurus* (EC 3.1.3.1) (Roche) 1U/ μ L.

9.3. Versuche zu Kapitel 3.1.

O-(2-Acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-[*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-azid **18**

β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,3-[β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,6]- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4- β -GlcNAc-N₃

50 mg (30 μ mol, 1 eq) Nonasaccharid **25** und 2.4 mg *Aspergillus oryzae* β -Galactosidase (5 U/mg) werden in Puffer (100 mM Natriumphosphat, pH 5) gelöst. Es werden 1.4 μ L Natriumazid (1 M) zugegeben. Die Reaktion wird bei 30 °C inkubiert. Nach 3 d werden die Proteine durch Gelpermeationschromatographie (Hi Load Superdex[®] 30, 16x600 mm, 0.1 M Ammoniumbicarbonat; Flussrate: 1 mL/min) abgetrennt und die Hauptfraktion (Elution nach 82 min) lyophilisiert.

Ausbeute: 37.56 mg (28.0 μ mol, 93.3 %),
C₅₀H₈₃N₇O₃₅ (1341.5).

O-(2-Acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-[*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[*O*-(α -L-fucosyl)-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-azid **19**

β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,3-[β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,6]- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4-[α -Fuc-1,6]- β -GlcNAc-N₃

10 mg (7.54 μ mol, 1 eq) Heptasaccharid **18** und 5.66 mg (8.94 μ mol, 1.2 eq) GDP-Fucose werden in 1.33 mL Wasser und 992 μ L Puffer (200 mM MES, pH 6.5) gelöst. Es werden 24.8 μ L Mangan(II)-chlorid (100 mM), 0.1 μ L alkalische Phosphatase (1 U/ μ L), 124 μ L BSA

(20 mg/mL) und 5.0 μ L AgFucT6 (4.5 mg/mL) zugegeben. Die Reaktion wird bei RT inkubiert. Nach 3 d werden die Proteine durch Gelpermeationschromatographie (Hi Load Superdex[®] 30, 16x600 mm, 0.1 M Ammoniumbicarbonat; Flussrate: 1 mL/min) abgetrennt und die Hauptfraktion (Elution nach 83 min) lyophilisiert.

Ausbeute: 10.78 mg (7.25 μ mol, 97.3 %),
C₅₆H₉₃N₇O₃₉ (1487.6),
R_f = 0.41 (Isopropanol/1 M Ammoniumacetat 2:1).

O-(β -D-Galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-[*O*-(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[*O*-(α -L-fucosyl-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-azid **20**

β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,3-[β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,6]- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4-[α -Fuc-1,6]- β -GlcNAc-N₃

106.07 mg (71.3 μ mol, 1 eq) Octasaccharid **19** und 121.1 mg (213.9 μ mol, 3 eq) UDP-Gal werden in 15.7 mL Wasser und 1.18 mL Puffer (1 M Natriumcacodylat, pH 7.4) gelöst. Es werden 237.7 μ L Mangan(II)-chlorid (100 mM), 237.7 μ L alkalische Phosphatase (1 U/ μ L), 237.7 μ L Natriumazid (100 mM), 1.18 mL BSA (20 mg/mL) und 5 mL *Sus scrofa* GalT1 (1 mg/mL) zugegeben. Die Reaktion wird bei 30 °C inkubiert. Nach 2 d wird die Reaktion durch Erhitzen (5 min, 95 °C) beendet, die Proteinbestandteile werden abzentrifugiert und die Produkte durch HPLC (Hydrosphere C18, 20x50 mm, 0 \rightarrow 10 % in 16 CV, Acetonitril/Wasser +0.1 % Ameisensäure, Flussrate 4 mL/min) gereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 112.04 mg (61.8 μ mol, 87.0 %),
C₆₈H₁₁₃N₇O₄₉ (1811.7),
R_f = 0.31 (Isopropanol/1 M Ammoniumacetat 2:1),
[α]_D²⁰ = -24.0 (0.10, Wasser);

HR-MS (100 % Wasser): M_{ber} = 1812.6638 (M+H)⁺, M_{gef} = 1812.6641 (M+H)⁺.

Fucosylierung und Galactosylierung als Eintopfreaktion

24.10 mg (16.2 μmol , 1 eq) Heptasaccharid **18** und 12.31 mg (19.4 μmol , 1.2 eq) GDP-Fucose werden in 2.82 mL Wasser und 2.12 mL Puffer (200 mM MES, pH 6.5) gelöst. Es werden 54.0 μL Mangan(II)-chlorid (100 mM), 108.0 μL alkalische Phosphatase (1 U/ μL), 270.0 μL BSA (20 mg/mL) und 25.0 μL FucT (4.5 mg/mL) zugegeben. Die Reaktion wird bei RT inkubiert. Nach 3 d werden 29.66 mg (47.7 μmol , 3 eq) UDP-Galactose, 100 μL Wasser, 256.6 μL Puffer (500 mM TRIS, pH 8) und 1.6 mL *Sus scrofa* GalT1 (1 mg/mL) zugegeben und die Reaktion wird weitere 3 d inkubiert. Die Reaktion wird durch Gelfiltration (Hi Load Superdex 30, 16x600 mm, 0.1 M Ammoniumbicarbonat, Flussrate: 1 mL/min) gereinigt und das Produkt lyophilisiert.

Ausbeute: 15.0 mg (8.30 μmol , 51.1 %).

O-(5-Acetamido-3,5-didesoxy-*D*-glycero- α -*D*-galacto-non-2-ulopyranosylsäure)-(2 \rightarrow 6)-*O*-(β -*D*-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -*D*-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-[*O*-(5-acetamido-3,5-didesoxy-*D*-glycero- α -*D*-galacto-non-2-ulopyranosylsäure)-(2 \rightarrow 6)-*O*-(β -*D*-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -*D*-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(β -*D*-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[*O*-(α -*L*-fucosyl-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-azid **21**

α -Neu5Ac-2,6- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,3-[α -Neu5Ac-2,6- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,6]- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4-[α -Fuc-1,6]- β -GlcNAc- N_3

11.40 mg (6.3 μmol , 1 eq) Decasaccharid **20** und 14.0 mg (22.0 μmol , 3.5 eq) CMP-NANA werden in 1.10 mL Wasser und 0.27 mL Puffer (500 mM TRIS, pH 9) gelöst. Es werden 210.0 μL *Photobacterium damsela* ST6 (2.9 mg/mL) zugegeben. Die Reaktion wird bei 30 °C inkubiert. Nach 3 h wird die Reaktion durch Erwärmen (5 min, 95 °C) beendet, die Proteinbestandteile werden abzentrifugiert und die Produkte durch HPLC (Hydrosphere C18, 10x150 mm, 5 \rightarrow 30 % in 10 CV, Acetonitril/Wasser +0.1 % Ameisensäure, Flussrate: 2 mL/min) gereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 12.0 mg (5.0 μmol , 79.0 %),
 $\text{C}_{90}\text{H}_{147}\text{N}_9\text{O}_{65}$ (2395.2),
 $R_f = 0.09$ (Isopropanol/1 M Ammoniumacetat 2:1);

HR-MS (100 % Wasser): $M_{\text{ber}} = 798.9564$ ($M+3\text{H}$)³⁺, $M_{\text{gef}} = 798.9554$ ($M+3\text{H}$)³⁺.

O-(5-Acetamido-3,5-didesoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosylsäure)-(2 \rightarrow 3)-*O*-
(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-
(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-[*O*-(5-acetamido-3,5-didesoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-
2-ulopyranosylsäure)-(2 \rightarrow 3)-*O*-(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-
 β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(β -D-mannopyranosyl)-
(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[*O*-(α -L-fucosyl-(1 \rightarrow 6)]-*O*-
(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-azid **22**

α -Neu5Ac-2,3- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,3-[α -Neu5Ac-2,3- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-
1,2- α -Man-1,6]- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4-[α -Fuc-1,6]- β -GlcNAc-N₃

3.00 mg (1.7 μmol , 1 eq) Decasaccharid **20** und 4.23 mg (6.6 μmol , 4 eq) CMP-NANA werden
in 415 μL Puffer (50 mM Natriumcacodylat, 150 mM Natriumchlorid, 25 mM Natriumphosphat,
pH 7.1) gelöst. Es werden 14.7 μL *Vibrio species* ST3 (3 mg/mL) zugegeben. Die Reaktion
wird bei 30 °C inkubiert. Nach 1 h wird die Reaktion durch Erhitzen (5 min, 95 °C) beendet,
die Proteinbestandteile werden abzentrifugiert und die Produkte durch HPLC (Hydrosphere
C18, 10x150 mm, 0 \rightarrow 30 % in 10 CV, Acetonitril/Wasser +0.1 % Ameisensäure, Flussrate:
2 mL/min) gereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 1.60 mg (0.67 μmol , 40.0 %),
 $\text{C}_{90}\text{H}_{147}\text{N}_9\text{O}_{65}$ (2395.2),
 $R_f = 0.29$ (Isopropanol/1 M Ammoniumacetat 2:1).

9.4. Versuche zu Kapitel 3.2.

O-(β -D-Galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-[*O*-(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-azid **24**

β -Gal-1,3- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,3-[β -Gal-1,3- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,6]- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4- β -GlcNAc-N₃

3.33 mg (2.48 μ mol, 1 eq) Heptasaccharid **18** und 1.80 mg (9.92 μ mol, 4 eq) α -Galactosylfluorid werden in 354.4 μ L Puffer (50 mM Natriumphosphat, pH 6.6) gelöst. Es werden 141.6 μ L *Bacillus circulans* BgaC (33.5 mg/mL) zugegeben und die Reaktion bei RT inkubiert. Nach 1 d, 3 d und 4 d werden je 0.45 mg (1 eq) α -Galactosylfluorid und 70 μ L BgaC zugegeben. Nach 13 d wird die Reaktion durch Erhitzen (5 min, 95 °C) beendet, die Proteinbestandteile werden abzentrifugiert und die Produkte durch Gelfiltration (Hi Load Superdex 30, 16x600 mm, 0.1 M Ammoniumbicarbonat, Flussrate: 1 mL/min) vorgereinigt. Die Produktfraktionen werden durch HPLC (Hypercarb, 15 \rightarrow 20 % in 24 CV, Acetonitril/Wasser +0.1 % Ameisensäure, Flussrate: 1 mL/min) gereinigt.

Ausbeute: 2.07 mg (1.24 μ mol, 50.0 %),

C₆₂H₁₀₃N₇O₄₅ (1666.5),

R_f = 0.53 (Isopropanol/1 M Ammoniumacetat 2:1),

[α]_D²³ = -21 (0.1, H₂O);

HR-MS (100 % Wasser): M_{ber.} = 1688.5879 (M+Na)⁺, M_{gef.} = 1688.5810 (M+Na)⁺;

¹H-NMR (500 MHz, D₂O mit [D₄]-Methanol als internem Standard): δ = 5.12 (d, $J_{1,2}$ < 0.1 Hz, 1H, H-1⁴), 4.92 (d, $J_{1,2}$ < 0.1 Hz, 1H, H-1^{4'}), 4.78 (d, $J_{1,2}$ < 0.1 Hz, 1H, H-1³), 4.76-4.74 (m, 1 H, H-1¹), 4.61 (d, $J_{1,2}$ < 0.1 Hz, 1H, H-1²), 4.59 (d, $J_{1,2}$ < 0.1 Hz, 2H, H-1⁵, H-1^{5'}), 4.46-4.44

(m, 2H, H-1^G, H-1^{G'}), 4.25 (m, 1H, H-2³), 4.21-4.19 (m, 1H, H-2⁴), 4.13-4.10 (m, 1H, H-2^{4'}), 4.00-3.82 (m, 13H, H-2¹, H-6a², H-6a⁵, H-6a^{5'}, H-6a¹, H-6a⁴, H-6a^{4'}, H-6a³, H-3^G, H-3^{G'}, H-3⁴, H-3^{4'}, H-4²), 3.82-3.69 (m, 20H, H-2², H-2⁵, H-2^{5'}, H-6b², H-6b⁵, H-6b^{5'}, H-6a^G, H-6b^G, H-6a^{G'}, H-6b^{G'}, H-6b³, H-3², H-5¹, H-3⁵, H-3^{5'}, H-5⁴, H-4³, H-3³, H-4⁵, H-4^{5'}), 3.69-3.44 (m, 18H, H-6b¹, H-6b⁴, H-6b^{4'}, H-4⁴, H-4^{4'}, H-2^G, H-2^{G'}, H-5³, H-4^G, H-4^{G'}, H-5^{4'}, H-5², H-5⁵, H-5^{5'}, H-5^G, H-5^{G'}, H-3¹, H-4¹), 2.10-2.00 (m, 12H, NAc).

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O mit [D₄]-Methanol als internem Standard): δ = 175.9, 175.8, 175.7 (C=O), 104.2 (C-1^Gβ, ¹J_{C-1, H-1} = 162.0 Hz), 104.2 (C-1^{G'}β, ¹J_{C-1, H-1} = 162.0 Hz), 102.2 (C-1²β, ¹J_{C-1, H-1} = 166.4 Hz), 101.3 (C-1³β, ¹J_{C-1, H-1} = 159.7 Hz), 100.4 (C-4^α, ¹J_{C-1, H-1} = 172.4 Hz), 100.1 (C-1⁵β, ¹J_{C-1, H-1} = 162.0 Hz), 100.1 (C-1^{5'}β, ¹J_{C-1, H-1} = 162.0 Hz), 97.7 (C-1⁴α, ¹J_{C-1, H-1} = 170.9 Hz), 89.4 (C-1¹β, ¹J_{C-1, H-1} = 161.2 Hz), 82.6 (C-4⁵), 82.6 (C-4^{5'}), 82.5 (C-4²), 81.2 (C-3³), 79.4 (C-4¹), 77.3 (C-5^G), 77.3 (C-5^{G'}), 77.3 (C-3¹), 77.2 (C-2⁴), 77.0 (C-2^{4'}), 76.0 (C-5⁵), 76.0 (C-5^{5'}), 75.1 (C-5²), 74.4 (C-5⁴), 74.4 (C-4³), 73.6 (C-5^{4'}), 73.2 (C-4^G), 73.2 (C-4^{G'}), 73.2 (C-5³), 73.0 (C-3⁵), 73.0 (C-3^{5'}), 73.0 (C-5¹), 72.8 (C-3²), 71.4 (C-2^G), 71.4 (C-2^{G'}), 71.0 (C-2³), 70.2 (C-3⁴), 70.1 (C-3^{4'}), 69.3 (C-3^G), 69.3 (C-3^{G'}), 68.1 (C-4⁴), 68.1 (C-4^{4'}), 66.8 (C-6³), 62.5 (C-6⁴), 62.5 (C-6^{4'}), 61.9 (C-6^G), 61.9 (C-6^{G'}), 61.4 (C-6²), 60.7 (C-6⁵), 60.7 (C-6^{5'}), 60.7 (C-6¹), 55.7 (C-2²), 55.3 (C-2¹), 55.3 (C-2⁵), 55.3 (C-2^{5'}), 23.2, 23.0, 22.9 (NAc).

9.5. Versuche zu Kapitel 4.1.

β-Galactosidase-Verdau

10.61 mg (6.4 μmol) Nonasaccharid **25** und 0.41 mg *Aspergillus oryzae* β-Galactosidase werden in 0.42 mL Puffer (100 mM Phosphat, pH 6.5) gelöst. Die Reaktion wird bei 30 °C inkubiert. Nach 120 min wird die Reaktion durch Erhitzen (5 min, 95 °C) beendet, die Proteinbestandteile werden abzentrifugiert und die Produkte durch HPLC (Hydrosphere C18, 10x150 mm, verschiedene Gradienten, Acetonitril/Wasser +0.1 % Ameisensäure, Flussrate: 2 mL/min) gereinigt.

25: Ausbeute: 3.1 mg (1.9 μmol, 30.0 %),

18: Ausbeute: 1.0 mg (0.7 μmol, 11.0 %),

26/27: Ausbeute: 4.6 mg (3.0 μmol, 47.0 %).

Monogalactosylierung

2.5 mg (1.8 μmol , 1 eq) Heptasaccharid **18** und 1.71 mg (2.8 μmol , 1.5 eq) UDP-Galactose werden in 62.0 μL Puffer (500 mM Natriumcacodylat, pH 7.4) und 514.0 μL Wasser gelöst. Es werden 31 μL BSA (20 mg/mL), 6.2 μL Mangan(II)-chlorid (100 mM), 0.6 μL Natriumazid (1 M), 6.2 μL alkalische Phosphatase (1 U/ μL) und 330 μL *Sus scrofa* GalT1 (1 mg/mL) zugegeben. Die Reaktion wird bei 30 °C inkubiert. Nach 4 d werden die Proteine durch Gelpermeationschromatographie (Sephadex G25, 25x155 mm, 5 % Ethanol in Wasser, Flussrate: 5 mL/min) abgetrennt und die Hauptfraktion (Elution nach 38 min) lyophilisiert. Die Produkte werden durch HPLC (Hydrosphere C18, 10x150 mm, 0→5 %, Acetonitril/Wasser +0.1 % Ameisensäure, Flussrate: 2 mL/min, dann Hypercarb, 4.6x150 mm, verschiedene Gradienten, Acetonitril/Wasser +0.1 % Ameisensäure, Flussrate: 1 mL/min) gereinigt.

9.6. Versuche zu Kapitel 4.2

Glucosylierung mit Galactosyltransferase aus Bos taurus

1.0 mg (1.8 μmol , 1 eq) Heptasaccharid **18** und 0.85 mg (1.5 μmol , 2 eq) UDP-Glucose werden in 135 μL Puffer (50 mM Natriumcacodylat, pH 7.4) gelöst. Es werden 7.5 μL BSA (20 mg/mL), 1.5 μL Mangan(II)-chlorid (100 mM), 1.5 μL Natriumazid (1 M), 1.5 μL alkalische Phosphatase (1 U/ μL) und 3.0 μL *Bos taurus* GalT1 (10 mU/ μL) zugegeben. Die Reaktion wird bei 30 °C inkubiert. Nach 10 d wird die Reaktion durch Erhitzen (5 min, 95 °C) beendet, die Proteinbestandteile werden abzentrifugiert und die Produkte durch HPLC-MS (HyperCarb, 2.1x30 mm, 10-20 %, Acetonitril/Wasser + 0.1 % Ameisensäure, 0.5 mL/min) analysiert.

Die Reaktion wird unter den gleichen Bedingungen mit einer Zugabe von 2 mg *Bos taurus* Lactalbumin durchgeführt.

Glucosylierung mit Galactosyltransferase aus Sus scrofa

1.0 mg (1.8 μmol , 1 eq) Heptasaccharid **18** und 0.85 mg (1.5 μmol , 2 eq) UDP-Glucose werden in 104 μL Puffer (50 mM Natriumcacodylat, pH 7.4) gelöst. Es werden 7.5 μL BSA (20 mg/mL), 1.5 μL Mangan(II)-chlorid (100 mM), 1.5 μL Natriumazid (1 M), 1.5 μL alkalische Phosphatase (1 U/ μL) und 3.0 μL *Sus scrofa* GalT1 (10 mU/ μL) zugegeben. Die Reaktion wird bei 30 °C inkubiert. Nach 10 d wird die Reaktion durch Erhitzen (5 min, 95 °C)

beendet, die Proteinbestandteile werden abzentrifugiert und die Produkte durch HPLC-MS (HyperCarb, 2.1x30 mm, 10-20 %, Acetonitril/Wasser + 0.1 % Ameisensäure, 0.5 mL/min) analysiert.

Galactosylierung von 28 und 29

0.2 mg (0.13 μ mol, 1 eq) Mischung der Octasaccharide **28** und **29** und 0.22 mg (0.4 μ mol, 3 eq) UDP-Galactose werden in 20.2 μ L Puffer (50 mM Natriumcacodylat, pH 7.4) gelöst. Es werden 2.2 μ L BSA (20 mg/mL), 0.4 μ L Mangan(II)-chlorid (100 mM), 0.4 μ L Natriumazid (1 M), 0.4 μ L alkalische Phosphatase (1 U/ μ L) und 0.6 μ L *Bos taurus* GalT1 (10 mU/ μ L) zugegeben. Die Reaktion wird bei 30 °C inkubiert. Nach 3 d wird die Reaktion durch Erhitzen (5 min, 95 °C) beendet, die Proteinbestandteile werden abzentrifugiert und die Produkte durch HPLC-MS (HyperCarb, 2.1x30 mm, 10-20 %, Acetonitril/Wasser + 0.1 % Ameisensäure, 0.5 mL/min) analysiert.

9.7. Versuche zu Kapitel 4.3.

O-(5-Acetamido-3,5-didesoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosylsäure)-(2 \rightarrow 6)-*O*-(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-[*O*-(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-azid **36**

α -Neu5Ac-2,6- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,3-[β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,6]- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4- β -GlcNAc-N₃

O-(β -D-Galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-[*O*-(5-acetamido-3,5-didesoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosylsäure)-(2 \rightarrow 6)-*O*-(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(β -D-mannopyranosyl)-

(1→4)-O-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-O-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-azid 35

β-Gal-1,4-β-GlcNAc-1,2-α-Man-1,3-[α-Neu5Ac-2,6-β-Gal-1,4-β-GlcNAc-1,2-α-Man-1,6]-β-Man-1,4-β-GlcNAc-1,4-β-GlcNAc-N₃

20.00 mg (12 μmol, 1 eq) Nonasaccharid **25** und 9.20 mg (14.45 μmol, 1.2 eq) CMP-NANA werden in 1.71 mL Wasser und 0.60 mL Puffer (500 mM TRIS, pH 9) gelöst. Es werden 690.0 μL *Photobacterium damsela* ST6 (2.9 mg/mL) zugegeben. Die Reaktion wird bei 30 °C inkubiert. Nach 200 min werden die Proteine durch Gelpermeationschromatographie (Hi Load Superdex[®] 30, 16x600 mm, 0.1 M Ammoniumbicarbonat; Flussrate: 1 mL/min) abgetrennt und die Hauptfraktion (Elution nach 78 min) lyophilisiert. Die Produkte werden durch HPLC (Hydrosphere C18, 20x50 mm, 0→20 % in 16 CV, Acetonitril/Wasser +0.1 % Ameisensäure, Flussrate: 4 mL/min) gereinigt. Die Produktlösung wird mit 1 M Natriumcarbonat-Lösung neutralisiert (pH 8-9) und anschließend lyophilisiert. Das Salz wird durch Gelpermeationschromatographie (Sephadex G25, 25x155 mm, 5 % Ethanol in Wasser, Flussrate: 2 mL/min) abgetrennt.

25: Ausbeute: 4.6 mg (2.76 μmol, 23.0 %),

34: Ausbeute: 3.4 mg (1.51 μmol, 12.6 %),

35/36: Ausbeute: 9.77 mg (4.99 μmol, 41.6 %);

36:

C₇₃H₁₂₀N₈O₅₃ (1956.69),

[α]_D²⁰ = -4.0 (0.10, Wasser);

HR-MS (100 % Wasser): M_{ber} = 1957.7013 (M+H)⁺, M_{gef} = 1957.7010 (M+H)⁺;

¹H-NMR (500 MHz, D₂O mit [D₄]-Methanol als internem Standard): δ = 5.13 (d, J_{1,2} < 0.1 Hz, 1H, H-1⁴), 4.93 (d, J_{1,2} < 0.1 Hz, 1H, H-1^{4'}), 4.77 (d, J_{1,2} = 2.0 Hz, 1H, H-1³), 4.75 (d, J_{1,2} = 4.9 Hz, 1H, H-1¹), 4.61 (d, J_{1,2} = 8.1 Hz, 2H, H-1², H-1⁵), 4.58 (d, J_{1,2} = 7.4 Hz, 1H, H-1^{5'}), 4.47 (d, J_{1,2} = 8.2 Hz, 1H, H-1^{G'}), 4.44 (d, J_{1,2} = 8.1 Hz, 1H, H-1^G), 4.25 (dd,

$J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1$ Hz, 1H, H-2³), 4.20 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1$ Hz, 1H, H-2⁴), 4.11 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1$ Hz, 1H, H-2^{4'}), 4.02-3.84 (m, 14H, H-6a⁵, H-6a^{G'}, H-6a^G, H-6a³, H-6a⁴, H-4^G, H-6a², H-6a^{4'}, H-3⁴, H-9a^S, H-4^{G'}, H-3^{4'}, H-7^S, H-6a¹), 3.84-3.70 (m, 20H, H-5^S, H-2², H-5⁴, H-2⁵, H-6b², H-6b⁵, H-6a^{5'}, H-6b^{5'}, H-4³, H-6b³, H-3², H-3³, H-2¹, H-2^{5'}, H-3⁵, H-3¹, H-5^{G'}, H-5^G, H-4^{5'}, H-4²), 3.70-3.45 (m, 24H, H-6b¹, H-3^{G'}, H-3^G, H-6^S, H-6b⁴, H-9b^S, H-4^S, H-3^{5'}, H-5³, H-4¹, H-4⁵, H-6b^{4'}, H-5^{4'}, H-5², H-5¹, H-6b^{G'}, H-6b^G, H-8^S, H-2^{G'}, H-5⁵, H-5^{5'}, H-4⁴, H-4^{4'}, H-2^G), 2.66 (dd, $J_{3,3} = 13.2$ Hz, $J_{3,4} = 5.7$ Hz, 1H, H-3a^S), 2.10-2.00 (m, 15H, Ac), 1.72 (dd, $J_{3,3} = 12.3$ Hz, $J_{3,4} < 0.1$ Hz, 1H, H-3b^S),

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O mit [D₄]-Methanol als internem Standard): $\delta = 175.7, 175.6, 175.5, 174.4$ (C=O), 104.4 (C-1^{G'} β , $^1J_{C-1, H-1} = 162.9$ Hz), 103.8 (C-1^G β , $^1J_{C-1, H-1} = 161.4$ Hz), 102.1 (C-1² β , $^1J_{C-1, H-1} = 161.9$ Hz), 101.2 (C-1³ β , $^1J_{C-1, H-1} = 165.8$ Hz), 101.9 (C-2^S α), 100.4 (C-1⁴ α , $^1J_{C-1, H-1} = 170.3$ Hz), 100.2 (C-1^{5'} β , $^1J_{C-1, H-1} = 163.4$ Hz), 100.1 (C-1⁵ β , $^1J_{C-1, H-1} = 162.4$ Hz), 97.8 (C-1^{4'} α , $^1J_{C-1, H-1} = 171.8$ Hz), 89.3 (C-1¹ β , $^1J_{C-1, H-1} = 162.4$ Hz), 81.6 (C-4⁵), 81.2 (C-3³), 80.3 (C-4²), 79.5 (C-4¹), 79.3 (C-4^{5'}), 77.3 (C-5¹), 77.2 (C-2⁴), 77.1 (C-2^{4'}), 76.1 (C-5^{G'}), 75.5 (C-5^{5'}), 75.3 (C-5⁵), 75.2 (C-5²), 75.1 (C-5³), 74.5 (C-5⁴), 74.4 (C-5^G), 73.6 (C-5^{5'}), 73.6 (C-3^{5'}), 73.3 (C-6^S), 73.2 (C-3^G), 73.1 (C-3^{G'}), 73.0 (C-3¹), 72.9 (C-3⁵), 72.8 (C-3²), 72.5 (C-7^S), 71.7 (C-2^G), 71.5 (C-2^{G'}), 71.0 (C-2³), 70.2 (C-3⁴), 70.1 (C-3^{4'}), 69.3 (C-4^G), 69.2 (C-4^{G'}), 69.1 (C-8^S), 69.0 (C-4^S), 68.1 (C-4⁴), 68.0 (C-4^{4'}), 66.5 (C-6³), 66.5 (C-4³), 64.2 (C-6^G), 64.1 (C-6^{G'}), 63.4 (C-9^S), 62.5 (C-6⁴), 62.4 (C-6^{4'}), 61.8 (C-6^{5'}), 60.7 (C-6⁵), 60.7 (C-6¹), 60.7 (C-6²), 55.7 (C-2^{5'}), 55.6 (C-2⁵), 55.4 (C-2²), 55.3 (C-2¹), 52.6 (C-5^S), 40.9 (C-3^S), 23.2, 23.1, 23.0, 22.9, 22.8 (NAc).

35:

C₇₃H₁₂₀N₈O₅₃ (1956.69),

$[\alpha]_D^{20} = +2.5$ (0.10, Wasser);

HR-MS (100 % Wasser): $M_{\text{ber}} = 1957.7013$ (M+H)⁺, $M_{\text{gef}} = 1957.6997$ (M+H)⁺;

¹H-NMR (500 MHz, D₂O mit [D₄]-Methanol als internem Standard): δ = 5.12 (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1⁴), 4.95 (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1^{4'}), 4.77 (d, $J_{1,2} = 4.3$ Hz, 1H, H-1³), 4.75 (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1¹), 4.61 (d, $J_{1,2} = 7.3$ Hz, 2H, H-1², H-1^{5'}), 4.58 (d, $J_{1,2} = 8.1$ Hz, 1H, H-1⁵), 4.46 (d, $J_{1,2} = 6.0$ Hz, 1H, H-1^G), 4.45 (d, $J_{1,2} = 6.0$ Hz, 1H, H-1^{G'}), 4.25 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1$ Hz, 1H, H-2³), 4.19 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1$ Hz, 1H, H-2⁴), 4.12 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1$ Hz, 1H, H-2^{4'}), 4.02-3.84 (m, 13H, H-6a^{5'}, H-6a^{G'}, H-6a^G, H-6a³, H-6a⁴, H-4^G, H-6a², H-6a^{4'}, H-3⁴, H-9a^{S'}, H-4^{G'}, H-3^{4'}, H-7^{S'}), 3.84-3.70 (m, 21H, H-5^{S'}, H-2², H-6a¹, H-5⁴, H-2^{5'}, H-6b², H-6b^{5'}, H-6a⁵, H-6b⁵, H-4³, H-6b³, H-3², H-3³, H-2¹, H-2⁵, H-3^{5'}, H-3¹, H-5^{G'}, H-5^G, H-4⁵, H-4²), 3.70-3.47 (m, 24H, H-6b¹, H-3^{G'}, H-3^G, H-6^{S'}, H-6b⁴, H-9b^{S'}, H-4^{S'}, H-3⁵, H-5³, H-4¹, H-4^{5'}, H-6b^{4'}, H-5^{4'}, H-5², H-5¹, H-6b^{G'}, H-6b^G, H-8^{S'}, H-2^{G'}, H-5^{5'}, H-5⁵, H-4⁴, H-4^{4'}, H-2^G), 2.67 (dd, $J_{3,3} = 12.5$ Hz, $J_{3,4} = 5.4$ Hz, 1H, H-3a^{S'}), 2.11-2.01 (m, 15H, Ac), 1.72 (dd, $J_{3,3} = 12.5$ Hz, $J_{3,4} < 0.1$ Hz, 1H, H-3b^{S'}),

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O mit [D₄]-Methanol als internem Standard): δ = 175.8, 175.7, 175.6, 174.5 (C=O), 104.4 (C-1^{G'} β , $^1J_{C-1, H-1} = 161.1$ Hz), 103.8 (C-1^G β , $^1J_{C-1, H-1} = 163.0$ Hz), 102.1 (C-1² β , $^1J_{C-1, H-1} = 162.9$ Hz), 101.3 (C-1³ β , $^1J_{C-1, H-1} = 161.0$ Hz), 101.0 (C-2^{S'} α), 100.4 (C-1⁴ α , $^1J_{C-1, H-1} = 170.6$ Hz), 100.3 (C-1⁵ β , $^1J_{C-1, H-1} = 161.0$ Hz), 100.2 (C-1^{5'} β , $^1J_{C-1, H-1} = 162.9$ Hz), 97.8 (C-1^{4'} α , $^1J_{C-1, H-1} = 171.0$ Hz), 89.4 (C-1¹ β , $^1J_{C-1, H-1} = 160.1$ Hz), 81.5 (C-4^{5'}), 81.2 (C-3³), 80.5 (C-4²), 79.5 (C-4¹), 79.3 (C-4⁵), 77.3 (C-5¹), 77.3 (C-2⁴), 77.1 (C-2^{4'}), 76.2 (C-5^G), 75.6 (C-5⁵), 75.3 (C-5^{5'}), 75.2 (C-5²), 75.2 (C-5³), 74.5 (C-5⁴), 74.4 (C-5^{G'}), 73.7 (C-5⁵), 73.4 (C-3⁵), 73.3 (C-6^{S'}), 73.2 (C-3^G), 73.1 (C-3^{G'}), 73.0 (C-3¹), 72.8 (C-3^{5'}), 72.8 (C-3²), 72.6 (C-7^{S'}), 71.8 (C-2^G), 71.6 (C-2^{G'}), 71.0 (C-2³), 70.3 (C-3⁴), 70.2 (C-3^{4'}), 69.4 (C-4^G), 69.2 (C-4^{G'}), 69.2 (C-8^{S'}), 69.0 (C-4^{S'}), 68.1 (C-4⁴), 68.1 (C-4^{4'}), 66.7 (C-6³), 66.5 (C-4³), 64.2 (C-6^G), 64.2 (C-6^{G'}), 63.5 (C-9^{S'}), 62.5 (C-6⁴), 62.5 (C-6^{4'}), 61.9 (C-6⁵), 61.1 (C-6^{5'}), 60.8 (C-6¹), 60.7 (C-6²), 55.7 (C-2⁵), 55.7 (C-2^{5'}), 55.5 (C-2²), 55.3 (C-2¹), 52.7 (C-5^{S'}), 40.9 (C-3^{S'}), 23.2, 23.1, 23.0, 22.9, 22.8 (NAc).

Synthese von 35/36 über Sialylierung / Sialidase

43.60 mg (26.2 μ mol, 1 eq) Nonasaccharid **25** und 50 mg (78.6 μ mol, 3 eq) CMP-NANA werden in 6.55 mL Puffer (100 mM TRIS, pH 9) gelöst. Es werden 1.0 mL *Photobacterium damsela* ST6 (2.9 μ g/ μ L) zugegeben und die Reaktion bei 30 °C inkubiert. Nach 2 d wird die Reaktion durch Erhitzen (5 min, 95 °C) beendet, die Proteinbestandteile werden abzentrifugiert

und die Produkte durch HPLC (Hydrosphere C18, 20x50 mm, 0→20 % in 16 CV, Acetonitril/Wasser +0.1 % Ameisensäure, Flussrate: 4 mL/min) gereinigt.

Ausbeute: 27 mg (12.0 μ mol, 45.8 %);

27.00 mg (12.0 μ mol) Undecasaccharid **34** werden in 1.18 mL Puffer (100 mM Natriumphosphat, pH 6.5) gelöst. Es werden 22.6 μ L *Clostridium perfringens* Neuraminidase (25 U/ μ L) zugegeben und die Reaktion bei 30 °C inkubiert. Nach 75 min wird die Reaktion durch Erhitzen (5 min, 95 °C) beendet, die Proteinbestandteile abzentrifugiert und die Produkte durch HPLC (Hydrosphere C18, 20x50 mm, 0→20 % in 16 CV, Acetonitril/Wasser +0.1 % Ameisensäure, Flussrate: 4 mL/min) gereinigt.

25: Ausbeute: 0.54 mg (0.32 μ mol, 2.7 %),

34: Ausbeute: 18.0 mg (8.0 μ mol, 66.6 %),

35/36: Ausbeute: 4.1 mg (2.1 μ mol, 17.5 %);

Synthese von 35/36 durch Hydrolyse mit Propionsäure

8.90 mg (4.0 μ mol) Undecasaccharid **34** werden in 1.30 mL 1 M Propionsäure gelöst. Die Reaktion wird bei 60 °C inkubiert. Nach 120 min wird die Reaktionslösung mit 1 M Natriumcarbonat-Lösung neutralisiert (pH 7). Das Salz wird durch Gelpermeationschromatographie (Sephadex G25, 25x155 mm, 5 % Ethanol in Wasser, Flussrate: 2 mL/min) abgetrennt. Die Produkte werden durch HPLC (Hydrosphere C18, 10x150 mm, 5→30 % in 5 CV, dann 5→7 % in 5 CV, Acetonitril/Wasser +0.1 % Ameisensäure, Flussrate: 2 mL/min) gereinigt. Die Produktlösung wird mit 1 M Natriumcarbonat-Lösung neutralisiert (pH 8-9) und anschließend lyophilisiert. Das Salz wird durch Gelpermeationschromatographie (Sephadex G25, 25x155 mm, 5 % Ethanol in Wasser, Flussrate: 2 mL/min) abgetrennt.

35: Ausbeute: 3.46 mg (1.77 μ mol, 44.3 %),

36: Ausbeute: 2.91 mg (1.49 μ mol, 37.3 %);

O-(5-Acetamido-3,5-didesoxy-*D*-glycero- α -*D*-galacto-non-2-ulopyranosylsäure)-(2→3)-*O*-
(β -*D*-galactopyranosyl)-(1→4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-(1→2)-*O*-

(α-D-mannopyranosyl)-(1→3)-[O-(β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-O-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-O-(α-D-mannopyranosyl)-(1→6)]-O-(β-D-mannopyranosyl)-(1→4)-O-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-O-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-azid 38

α -Neu5Ac-2,3- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,3-[β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,6]- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4- β -GlcNAc-N₃

O-(β-D-Galactopyranosyl)-(1→4)-O-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-O-(α-D-mannopyranosyl)-(1→3)-[O-(5-acetamido-3,5-didesoxy-D-glycero-α-D-galacto-non-2-ulopyranosylsäure)-(2→3)-O-(β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-O-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-O-(α-D-mannopyranosyl)-(1→6)]-O-(β-D-mannopyranosyl)-(1→4)-O-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-O-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-azid 37

β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,3-[α -Neu5Ac-2,3- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,6]- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4- β -GlcNAc-N₃

35.00 mg (21 μ mol, 1 eq) Nonasaccharid **25** und 20.00 mg (31.5 μ mol, 1.5 eq) CMP-NANA werden in 2.51 mL Wasser und 2.63 mL Puffer (200 mM Natriumcacodylat, 300 mM Natriumchlorid, 50 mM Natriumphosphat, pH 7.1) gelöst. Es werden 116.6 μ L *Vibrio species* ST3 (3 mg/mL) zugegeben. Die Reaktion wird bei 30 °C inkubiert. Nach 45 min werden die Proteine durch Gelpermeationschromatographie (Hi Load Superdex[®] 30, 16x600 mm, 0.1 M Ammoniumbicarbonat, Flussrate: 1 mL/min) abgetrennt und die Hauptfraktion (Elution nach 77 min) lyophilisiert. Die Produkte werden durch HPLC (Hydrosphere C18, 20x50 mm, 0→20 % in 16 CV, Acetonitril/Wasser +0.1 % Ameisensäure, Flussrate: 4 mL/min) gereinigt. Die Produktlösung wird mit 1 M Natriumcarbonat-Lösung neutralisiert (pH 8-9) und anschließend lyophilisiert. Das Salz wird durch Gelpermeationschromatographie (Sephadex G25, 25x155 mm, 5 % Ethanol in Wasser, Flussrate: 2 mL/min) abgetrennt.

25: Ausbeute: 13.11 mg (7.87 μ mol, 37.5 %),

39: Ausbeute: 5.40 mg (2.4 μ mol, 11.4 %),

37/38: Ausbeute: 11.23 mg (5.74 μmol , 27.3 %);

38:

$\text{C}_{73}\text{H}_{120}\text{N}_8\text{O}_{53}$ (1956.69),

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -7.0$ (0.10, Wasser);

HR-MS (100 % Wasser): $M_{\text{ber}} = 1957.7013$ (M+H) $^+$, $M_{\text{gef}} = 1957.7006$ (M+H) $^+$;

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O mit $[\text{D}_4]$ -Methanol als internem Standard): $\delta = 5.12$ (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1 4), 4.93 (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1 $^{4'}$), 4.76 (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1 3), 4.75 (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1 1), 4.63-4.53 (m, 4H, H-1 2 , H-1 $^{5'}$, H-1 5 , H-1 $^{\text{G}}$), 4.47 (d, $J_{1,2} = 8.5$ Hz, 1H, H-1 $^{\text{G}'}$), 4.25 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1$ Hz, 1H, H-2 3), 4.19 (dd, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, $J_{2,3} = 2.5$ Hz, 1H, H-2 4), 4.14-4.09 (m, 2H, H-3 $^{\text{G}}$, H-2 $^{4'}$), 4.02-3.82 (m, 14H, H-6a $^{\text{G}}$, H-6a $^{\text{G}'}$, H-6a 3 , H-4 $^{\text{G}}$, H-6a 4 , H-4 $^{\text{G}'}$, H-6a 4 , H-3 4 , H-6a 2 , H-9a $^{\text{S}}$, H-3 $^{4'}$, H-7 $^{\text{S}}$, H-5 $^{\text{S}}$, H-6a 1), 3.82-3.66 (m, 28H, H-2 2 , H-2 $^{5'}$, H-2 5 , H-6b 2 , H-6a 5 , H-6a $^{5'}$, H-4 3 , H-6b 3 , H-3 2 , H-3 3 , H-2 1 , H-6b $^{\text{G}}$, H-6b $^{\text{G}'}$, H-6b 5 , H-6b $^{5'}$, H-3 5 , H-3 $^{5'}$, H-5 4 , H-5 $^{\text{G}}$, H-4 5 , H-4 $^{5'}$, H-4 2 , H-6b 1 , H-4 $^{\text{S}}$, H-3 1 , H-3 $^{\text{G}'}$, H-5 $^{\text{G}'}$, H-4 1), 3.66-3.46 (m, 15H, H-9b $^{\text{S}}$; H-6 $^{\text{S}}$, H-6b 4 , H-6b $^{4'}$, H-5 $^{4'}$, H-5 2 , H-5 3 , H-8 $^{\text{S}}$, H-5 1 , H-2 $^{\text{G}}$, H-2 $^{\text{G}'}$, H-5 $^{5'}$, H-5 $^{5'}$, H-4 4 , H-4 $^{4'}$), 2.76 (dd, $J_{3,3} = 12.1$ Hz, $J_{3,4} = 4.8$ Hz, 1H, H-3a $^{\text{S}}$), 2.11-2.00 (m, 15H, Ac), 1.80 (dd, $J_{3,3} = 12.9$ Hz, $J_{3,4} < 0.1$ Hz, 1H, H-3b $^{\text{S}}$),

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D_2O mit $[\text{D}_4]$ -Methanol als internem Standard): $\delta = 176.0$, 175.8, 175.7, 175.6, 174.8 (C=O), 103.9 (C-1 $^{\text{G}'\beta}$, $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 160.6$ Hz), 103.5 (C-1 $^{\text{G}\beta}$, $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 162.5$ Hz), 102.3 (C-1 $^2\beta$, $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 162.5$ Hz), 101.4 (C-1 $^3\beta$, $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 162.9$ Hz), 100.8 (C-2 $^{\text{S}\alpha}$), 100.5 (C-1 $^4\alpha$, $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 172.1$ Hz), 100.5 (C-1 $^{5\beta}$, $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 161.5$ Hz), 100.3 (C-1 $^{5'\beta}$, $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 161.5$ Hz), 98.0 (C-1 $^{4'\alpha}$, $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 170.3$ Hz), 89.5 (C-1 $^1\beta$, $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 163.4$ Hz), 81.4 (C-3 3), 80.4 (C-4 2), 79.7 (C-4 1), 79.4 (C-4 5), 79.2 (C-4 $^{5'}$), 77.4 (C-5 1), 77.4 (C-2 4), 77.2 (C-2 $^{4'}$), 76.4 (C-3 $^{\text{G}}$), 76.3 (C-5 $^{\text{G}}$), 76.2 (C-5 $^{\text{G}'}$), 75.7 (C-5 5), 75.7 (C-5 $^{5'}$), 75.4 (C-5 3), 75.4 (C-5 2), 74.5 (C-5 4), 73.9 (C-5 $^{5'}$), 73.8 (C-6 $^{\text{S}}$), 73.5 (C-3 $^{\text{G}'}$), 73.2 (C-3 1), 73.0 (C-3 5), 72.9 (C-3 $^{5'}$), 72.9 (C-3 2), 72.7 (C-7 $^{\text{S}}$), 71.9 (C-2 $^{\text{G}'}$), 71.1 (C-2 3), 70.4 (C-2 $^{\text{G}}$), 70.3 (C-3 4), 70.3 (C-3 $^{4'}$), 69.5 (C-4 $^{\text{G}'}$), 69.3 (C-4 $^{\text{S}}$), 69.0 (C-8 $^{\text{S}}$), 68.4 (C-4 $^{\text{G}}$), 68.3 (C-4 4), 68.2 (C-4 $^{4'}$), 66.8 (C-6 3), 66.6 (C-4 3), 63.5 (C-9 $^{\text{S}}$), 62.7 (C-6 4), 62.6 (C-6 $^{4'}$), 62.0 (C-6 5), 62.0 (C-6 $^{5'}$), 60.9 (C-6 1), 60.9 (C-6 $^{\text{G}}$), 60.9 (C-6 $^{\text{G}'}$), 60.9 (C-6 2), 55.9 (C-2 2), 55.8 (C-2 $^{5'}$), 55.8 (C-2 $^{5'}$), 55.4 (C-2 1), 52.6 (C-5 $^{\text{S}}$), 40.6 (C-3 $^{\text{S}}$), 23.3, 23.2, 23.0, 22.9 (NAc).

37:

$C_{73}H_{120}N_8O_{53}$ (1956.69),

$[\alpha]_D^{20} = +17.0$ (0.10, Wasser);

HR-MS (100 % Wasser): $M_{ber} = 1957.7013$ (M+H)⁺, $M_{gef} = 1957.7018$ (M+H)⁺;

¹H-NMR (500 MHz, D₂O mit [D₄]-Methanol als internem Standard): $\delta = 5.11$ (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1⁴), 4.93 (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1^{4'}), 4.76 (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1³), 4.74 (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1¹), 4.63-4.53 (m, 4H, H-1², H-1^{5'}, H-1⁵, H-1^{G'}), 4.47 (d, $J_{1,2} = 7.4$ Hz, 1H, H-1^G), 4.25 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1$ Hz, 1H, H-2³), 4.19 (dd, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, $J_{2,3} = 2.5$ Hz, 1H, H-2⁴), 4.13 (dd, $J_{2,3} = J_{3,4} < 0.1$ Hz, 1H, H-3^{G'}), 4.11 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1$ Hz, 1H, H-2^{4'}), 4.02-3.81 (m, 14H, H-6a^G, H-6a^{G'}, H-6a³, H-4^{G'}, H-6a⁴, H-4^G, H-6a^{4'}, H-3⁴, H-6a², H-9a^{S'}, H-3^{4'}, H-7^{S'}, H-5^{S'}, H-6a¹), 3.81-3.63 (m, 28H, H-2², H-2⁵, H-2^{5'}, H-6b², H-6a⁵, H-6a^{5'}, H-4³, H-6b³, H-3², H-3³, H-2¹, H-6b^G, H-6b^{G'}, H-6b⁵, H-6b^{5'}, H-3⁵, H-3^{5'}, H-5⁴, H-5^G, H-4⁵, H-4^{5'}, H-4², H-6b¹, H-4^{S'}, H-3¹, H-3^G, H-5^{G'}, H-4¹), 3.63-3.43 (m, 15H, H-9b^{S'}, H-6^{S'}, H-6b⁴, H-6b^{4'}, H-5^{4'}, H-5², H-5³, H-8^{S'}, H-5¹, H-2^{G'}, H-2^G, H-5⁵, H-5^{5'}, H-4⁴, H-4^{4'}), 2.76 (dd, $J_{3,3} = 12.9$ Hz, $J_{3,4} < 0.1$ Hz, 1H, H-3a^{S'}), 2.10-2.00 (m, 15H, Ac), 1.80 (dd, $J_{3,3} = 12.0$ Hz, $J_{3,4} < 0.1$ Hz, 1H, H-3b^{S'}),

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O mit [D₄]-Methanol als internem Standard): $\delta = 175.9$, 175.7, 175.6, 174.9 (C=O), 104.0 (C-1^G β , $^1J_{C-1, H-1} = 162.3$ Hz), 103.6 (C-1^{G'} β , $^1J_{C-1, H-1} = 162.2$ Hz), 102.3 (C-1² β , $^1J_{C-1, H-1} = 164.2$ Hz), 101.3 (C-1³ β , $^1J_{C-1, H-1} = 161.7$ Hz), 100.8 (C-2^{S'} α), 100.5 (C-1⁴ α , $^1J_{C-1, H-1} = 170.8$ Hz), 100.4 (C-1⁵ β , $^1J_{C-1, H-1} = 164.8$ Hz), 100.4 (C-1^{5'} β , $^1J_{C-1, H-1} = 164.8$ Hz), 98.0 (C-1^{4'} α , $^1J_{C-1, H-1} = 171.3$ Hz), 89.5 (C-1¹ β , $^1J_{C-1, H-1} = 161.3$ Hz), 81.4 (C-3³), 80.3 (C-4²), 79.6 (C-4¹), 79.4 (C-4⁵), 79.2 (C-4^{5'}), 77.5 (C-5¹), 77.3 (C-2⁴), 77.2 (C-2^{4'}), 76.5 (C-3^{G'}), 76.3 (C-5^G), 76.2 (C-5^{G'}), 75.6 (C-5⁵), 75.6 (C-5^{5'}), 75.4 (C-5³), 75.4 (C-5²), 74.5 (C-5⁴), 73.9 (C-5^{5'}), 73.8 (C-6^{S'}), 73.4 (C-3^{G'}), 73.2 (C-3¹), 73.0 (C-3⁵), 72.9 (C-3^{5'}), 72.9 (C-3²), 72.7 (C-7^{S'}), 71.9 (C-2^G), 71.1 (C-2³), 70.4 (C-2^{G'}), 70.3 (C-3⁴), 70.3 (C-3^{4'}), 69.5 (C-4^G), 69.3 (C-4^{S'}), 69.0 (C-8^{S'}), 68.4 (C-4^{G'}), 68.3 (C-4⁴), 68.2 (C-4^{4'}), 66.7 (C-6³), 66.6 (C-4³), 63.5 (C-9^{S'}), 62.7 (C-6⁴), 62.6 (C-6^{4'}), 62.0 (C-6⁵), 62.0 (C-6^{5'}), 60.9 (C-6¹), 60.9 (C-6^G), 60.9 (C-6^{G'}), 60.9 (C-6²), 55.9 (C-2²), 55.8 (C-2⁵), 55.8 (C-2^{5'}), 55.4 (C-2¹), 52.6 (C-5^{S'}), 40.6 (C-3^{S'}), 23.3, 23.2, 23.1, 23.0 (NAc).

9.8. Versuche zu Kapitel 4.4.

O-(5-Acetamido-3,5-didesoxy-*D*-glycero- α -*D*-galacto-non-2-ulopyranosylsäure)-(2 \rightarrow 6)-*O*-(β -*D*-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -*D*-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-[*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -*D*-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(β -*D*-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-azid **41**

α -Neu5Ac-2,6- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,3-[β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,6]- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4- β -GlcNAc-N₃

O-(2-Acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -*D*-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-[*O*-(5-acetamido-3,5-didesoxy-*D*-glycero- α -*D*-galacto-non-2-ulopyranosylsäure)-(2 \rightarrow 6)-*O*-(β -*D*-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -*D*-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(β -*D*-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-azid **40**

β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,3-[α -Neu5Ac-2,6- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,6]- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4- β -GlcNAc-N₃

6.04 mg (3.09 μ mol, 1 eq) Mischung der Decasaccharide **35** und **36** (ca. 1:1) und 0.25 mg (5 U/mg) *Aspergillus oryzae* β -Galactosidase werden in 117.3 μ L Puffer (100 mM Natriumphosphat, pH 7) gelöst. Es werden 5.5 μ L Natriumazid (100 mM) zugegeben. Die Reaktion wird bei 30 °C inkubiert. Nach 3 d wird die Reaktion durch Erhitzen (5 min, 95 °C) beendet, die Proteinbestandteile werden abzentrifugiert und die Produkte durch HPLC (Hydrosphere C18, 10x150 mm, 5 \rightarrow 6.6 % in 10 CV, Acetonitril/Wasser +0.1 % Ameisensäure, Flussrate: 2 mL/min) gereinigt. Die Produktlösung wird mit 1 M Natriumcarbonat-Lösung neutralisiert (pH 8-9) und anschließend lyophilisiert. Das Salz wird durch Gelpermeationschromatographie (Sephadex G25, 25x155 mm, 5 % Ethanol in Wasser, Flussrate: 2 mL/min) abgetrennt.

40: Ausbeute: 2.00 mg (1.11 μ mol, 35.9 %),

C₆₇H₁₁₀N₈O₄₈ (1794.64),

[α]_D²⁰ = +13.0 (0.10, Wasser);

HR-MS (100 % Wasser): M_{ber} = 1795.6485 (M+H)⁺, M_{gef} = 1795.6420 (M+H)⁺;

¹H-NMR (500 MHz, D₂O mit [D₄]-Methanol als internem Standard): δ = 5.11 (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1⁴), 4.95 (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1^{4'}), 4.77 (d, $J_{1,2} = 5.2$ Hz, 1H, H-1³), 4.75 (d, $J_{1,2} = 4.5$ Hz, 1H, H-1¹), 4.61 (dd, $J_{1,2} = 8.2$ Hz, 2H, H-1², H-1⁵), 4.55 (d, $J_{1,2} = 9.0$ Hz, 1H, H-1⁵), 4.45 (d, $J_{1,2} = 7.5$ Hz, 1H, H-1^{G'}), 4.25 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1$ Hz, 1H, H-2³), 4.19 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1$ Hz, 1H, H-2⁴), 4.11 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1$ Hz, 1H, H-2^{4'}), 4.02-3.85 (m, 12H, H-6a^{G'}, H-6a^{5'}, H-6a³, H-6a⁵, H-6a⁴, H-4^{G'}, H-3⁴, H-6a², H-6a^{4'}, H-9a^{S'}, H-3^{4'}, H-7^{S'}), 3.85-3.70 (m, 17H, H-2², H-6a¹, H-5⁴, H-6b^{5'}, H-4³, H-6a³, H-3², H-3³, H-2¹, H-6b⁵, H-3^{5'}, H-5^{G'}, H-4², H-5^{S'}, H-2^{5'}, H-6b², H-3¹), 3.70-3.58 (m, 15H, H-2⁵, H-6b¹, H-3^{G'}, H-6b⁴, H-9b^{S'}, H-4^{S'}, H-6^{S'}, H-5³, H-4¹, H-4^{5'}, H-6b^{4'}, H-5⁵, H-5², H-5^{5'}, H-5¹), 3.58-3.40 (m, 8H, H-8^{S'}, H-6b^{G'}, H-4⁴, H-2^{G'}, H-3⁵, H-4^{4'}, H-4⁵, H-5⁵), 2.67 (dd, $J_{3,3} = 12.0$ Hz, $J_{3,4} = 6.1$ Hz, 1H, H-3a^{S'}), 2.11-2.00 (m, 15H, Ac), 1.72 (dd, $J_{3,3} = 12.5$ Hz, $J_{3,4} < 0.1$ Hz, 1H, H-3b^{S'}),

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O mit [D₄]-Methanol als internem Standard): δ = 176.1, 176.0, 175.9, 175.8, 174.7 (C=O), 104.4 (C-1^{G'} β , $^1J_{C-1, H-1} = 165.7$ Hz), 102.2 (C-1² β , $^1J_{C-1, H-1} = 162.0$ Hz), 101.4 (C-1³ β , $^1J_{C-1, H-1} = 160.8$ Hz), 101.0 (C-2^{S'} α), 100.5 (C-1⁴ α , $^1J_{C-1, H-1} = 171.2$ Hz), 100.5 (C-1⁵ β , $^1J_{C-1, H-1} = 162.0$ Hz), 100.2 (C-1^{5'} β , $^1J_{C-1, H-1} = 163.3$ Hz), 97.8 (C-1^{4'} α , $^1J_{C-1, H-1} = 172.9$ Hz), 89.4 (C-1¹ β , $^1J_{C-1, H-1} = 163.5$ Hz), 81.6 (C-4^{5'}), 81.3 (C-3³), 80.5 (C-4²), 79.5 (C-4¹), 77.3 (C-5¹), 77.3 (C-2⁴), 77.1 (C-2^{4'}), 76.7 (C-5⁵), 75.3 (C-5³), 75.2 (C-5²), 75.2 (C-5^{5'}), 74.6 (C-5⁴), 74.4 (C-5^{G'}), 74.3 (C-3⁵), 74.1 (C-5^{4'}), 73.7 (C-6^{S'}), 73.4 (C-3^{G'}), 73.3 (C-3¹), 73.1 (C-3^{5'}), 73.0 (C-3²), 72.6 (C-7^{S'}), 71.6 (C-2^{G'}), 71.1 (C-2³), 70.8 (C-4⁵), 70.3 (C-3⁴), 70.3 (C-3^{4'}), 69.3 (C-8^{S'}), 69.2 (C-4^{G'}), 69.1 (C-4^{S'}), 68.2 (C-4⁴), 68.2 (C-4^{4'}), 66.8 (C-6³), 66.6 (C-4³), 64.2 (C-6^{G'}), 63.5 (C-9^{S'}), 62.6 (C-6⁴), 62.5 (C-6^{4'}), 61.5 (C-6^{5'}), 61.1 (C-6⁵), 60.8 (C-6¹), 60.8 (C-6²), 56.2 (C-2⁵), 55.7 (C-2^{5'}), 55.5 (C-2²), 55.3 (C-2¹), 52.7 (C-5^{S'}), 41.0 (C-3^{S'}), 23.3, 23.2, 23.1, 23.0, 22.9 (NAc).

41: Ausbeute: 2.28 mg (1.27 μ mol, 41.1 %),

C₆₇H₁₁₀N₈O₄₈ (1794.64),

[α]_D²⁰ = +5.0 (0.10, Wasser);

HR-MS (100 % Wasser): $M_{\text{ber}} = 1795.6485$ (M+H)⁺, $M_{\text{gef}} = 1795.6499$ (M+H)⁺;

¹H-NMR (500 MHz, D₂O mit [D₄]-Methanol als internem Standard): $\delta = 5.13$ (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1⁴), 4.92 (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1⁴), 4.77 (d, $J_{1,2} = 3.9$ Hz, 1H, H-1³), 4.75 (d, $J_{1,2} = 4.6$ Hz, 1H, H-1¹), 4.61 (dd, $J_{1,2} = 9.3$ Hz, 2H, H-1², H-1⁵), 4.55 (d, $J_{1,2} = 9.3$ Hz, 1H, H-1⁵), 4.45 (d, $J_{1,2} = 8.3$ Hz, 1H, H-1^G), 4.25 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1$ Hz, 1H, H-2³), 4.20 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1$ Hz, 1H, H-2⁴), 4.11 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1$ Hz, 1H, H-2⁴), 4.04-3.84 (m, 12H, H-6a^G, H-6a⁵, H-6a³, H-6a⁵, H-6a⁴, H-4^G, H-3⁴, H-6a², H-6a⁴, H-9a^S, H-3⁴, H-7^S), 3.84-3.70 (m, 17H, H-2², H-6a¹, H-5⁴, H-6b⁵, H-4³, H-6a³, H-3², H-3³, H-2¹, H-6b⁵, H-3⁵, H-5^G, H-4², H-5^S, H-2⁵, H-6b², H-3¹), 3.70-3.57 (m, 15H, H-2⁵, H-6b¹, H-3^G, H-6b⁴, H-9b^S, H-4^S, H-6^S, H-5³, H-4¹, H-4⁵, H-6b⁴, H-5⁵, H-5², H-5⁵, H-5¹), 3.57-3.39 (m, 8H, H-8^S, H-6b^G, H-4⁴, H-2^G, H-3⁵, H-4⁴, H-4⁵, H-5⁵), 2.66 (dd, $J_{3,3} = 12.9$ Hz, $J_{3,4} = 4.6$ Hz, 1H, H-3a^S), 2.12-2.00 (m, 15H, Ac), 1.72 (dd, $J_{3,3} = 12.9$ Hz, $J_{3,4} < 0.1$ Hz, 1H, H-3b^S),

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O mit [D₄]-Methanol als internem Standard): $\delta = 175.8, 175.7, 175.7, 175.6, 174.5$ (C=O), 104.5 (C-1^G β , $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 163.5$ Hz), 102.3 (C-1² β , $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 164.4$ Hz), 101.3 (C-1³ β , $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 161.5$ Hz), 101.0 (C-2^S α), 100.5 (C-1⁴ α , $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 172.2$ Hz), 100.5 (C-1⁵ β , $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 165.4$ Hz), 100.3 (C-1⁵ β , $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 163.5$ Hz), 97.9 (C-1⁴ α , $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 171.3$ Hz), 89.4 (C-1¹ β , $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 161.5$ Hz), 81.7 (C-4⁵), 81.4 (C-3³), 80.5 (C-4²), 79.6 (C-4¹), 77.4 (C-5¹), 77.3 (C-2⁴), 77.2 (C-2⁴), 76.7 (C-5⁵), 75.3 (C-5³), 75.3 (C-5²), 75.2 (C-5⁵), 74.6 (C-5⁴), 74.5 (C-5^G), 74.3 (C-3⁵), 73.7 (C-5⁴), 73.4 (C-6^S), 73.3 (C-3^G), 73.2 (C-3¹), 72.9 (C-3⁵), 72.9 (C-3²), 72.6 (C-7^S), 71.6 (C-2^G), 71.1 (C-2³), 70.8 (C-4⁵), 70.3 (C-3⁴), 70.3 (C-3⁴), 69.3 (C-8^S), 69.2 (C-4^G), 69.1 (C-4^S), 68.3 (C-4⁴), 68.2 (C-4⁴), 66.8 (C-6³), 66.6 (C-4³), 64.2 (C-6^G), 63.5 (C-9^S), 62.6 (C-6⁴), 62.5 (C-6⁴), 61.5 (C-6⁵), 61.5 (C-6⁵), 61.2 (C-6¹), 60.8 (C-6²), 56.2 (C-2⁵), 55.8 (C-2⁵), 55.5 (C-2²), 55.4 (C-2¹), 52.8 (C-5^S), 41.0 (C-3^S), 23.3, 23.2, 23.1, 23.0, 22.9 (NAc).

O-(5-Acetamido-3,5-dideoxy-*D*-glycero- α -*D*-galacto-non-2-ulopyranosylsäure)-(2 \rightarrow 3)-*O*-(β -*D*-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -*D*-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-[*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-

(α-D-mannopyranosyl)-(1→6)]-O-(β-D-mannopyranosyl)-(1→4)-O-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-O-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-azid **43**

α -Neu5Ac-2,3- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,3-[β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,6]- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4- β -GlcNAc-N₃

O-(2-Acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-O-(α-D-mannopyranosyl)-(1→3)-[O-(5-acetamido-3,5-didesoxy-D-glycero-α-D-galacto-non-2-ulopyranosylsäure)-(2→3)-O-(β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-O-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-O-(α-D-mannopyranosyl)-(1→6)]-O-(β-D-mannopyranosyl)-(1→4)-O-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-O-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-azid **42**

β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,3-[α -Neu5Ac-2,3- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,6]- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4- β -GlcNAc-N₃

4.44 mg (2.27 μ mol, 1 eq) Mischung der Decasaccharide **37** und **38** (ca. 1:1) und 0.18 mg (5 U/mg) *Aspergillus oryzae* β -Galactosidase werden in 86.3 μ L Puffer (100 mM Natriumphosphat, pH 7) gelöst. Es werden 4.0 μ L Natriumazid (100 mM) zugegeben. Die Reaktion wird bei 30 °C inkubiert. Nach 3 d wird die Reaktion durch Erhitzen (5 min, 95 °C) beendet, die Proteinbestandteile werden abzentrifugiert und die Produkte durch HPLC (Hydrosphere C18, 10x150 mm, 5→6.6 % in 10 CV, Acetonitril/Wasser +0.1 % Ameisensäure, Flussrate: 2 mL/min) gereinigt. Die Produktlösung wird mit 1 M Natriumcarbonat-Lösung neutralisiert (pH 8-9) und anschließend lyophilisiert. Das Salz wird durch Gelpermeationschromatographie (Sephadex G25, 25x155 mm, 5 % Ethanol in Wasser, Flussrate: 2 mL/min) abgetrennt.

42: Ausbeute: 1.68 mg (0.94 μ mol, 41.4 %),

C₆₇H₁₁₀N₈O₄₈ (1794.64),

$[\alpha]_D^{20} = +13.0$ (0.10, Wasser);

HR-MS (100 % Wasser): $M_{\text{ber}} = 1795.6485$ (M+H)⁺, $M_{\text{gef}} = 1795.6459$ (M+H)⁺;

¹H-NMR (500 MHz, D₂O mit [D₄]-Methanol als internem Standard): δ = 5.11 (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1⁴), 4.92 (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1⁴), 4.76 (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1³), 4.75 (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1¹), 4.60 (d, $J_{1,2} = 8.2$ Hz, 1H, H-1²), 4.59-4.53 (m, 3H, H-1⁵, H-1⁵, H-1^G), 4.25 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1$ Hz, 1H, H-2³), 4.19 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1$ Hz, 1H, H-2⁴), 4.14-4.09 (m, 2H, H-3^G, H-2⁴), 4.02-3.84 (m, 13H, H-6a⁵, H-6a³, H-4^G, H-6a⁴, H-6a², H-3⁴, H-6a^G, H-6a⁵, H-6a⁴, H-6a¹, H-9a^S, H-3⁴, H-7^S), 3.84-3.65 (m, 20H, H-2², H-6b², H-4³, H-6b³, H-3², H-3³, H-2¹, H-6b⁵, H-3⁵, H-5⁴, H-5^G, H-4⁵, H-4², H-2⁵, H-2⁵, H-6b^G, H-6b¹, H-6b⁵, H-4^S, H-3¹), 3.65-3.53 (m, 13H, H-4¹, H-6b⁴, H-9b^S, H-6^S, H-5³, H-6b⁴, H-8^S, H-5⁴, H-5², H-2^G, H-5⁵, H-5¹, H-3⁵), 3.53-3.41 (m, 4H, H-4⁴, H-4⁴, H-4⁵, H-5⁵), 2.75 (dd, $J_{3,3} = 12.9$ Hz, $J_{3,4} = 5.4$ Hz, 1H, H-3a^S), 2.13-2.00 (m, 15H, Ac), 1.79 (dd, $J_{3,3} = 12.8$ Hz, $J_{3,4} < 0.1$ Hz, 1H, H-3b^S),

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O mit [D₄]-Methanol als internem Standard): δ = 175.8, 175.6, 175.5, 174.7 (C=O), 103.4 (C-1^Gβ, $^1J_{C-1, H-1} = 161.5$ Hz), 102.2 (C-1²β, $^1J_{C-1, H-1} = 162.8$ Hz), 101.2 (C-1³β, $^1J_{C-1, H-1} = 161.5$ Hz), 100.6 (C-2^Sα), 100.4 (C-1⁵β, $^1J_{C-1, H-1} = 160.7$ Hz), 100.4 (C-1⁵β, $^1J_{C-1, H-1} = 164.1$ Hz), 100.2 (C-1⁴α, $^1J_{C-1, H-1} = 171.0$ Hz), 97.9 (C-1⁴α, $^1J_{C-1, H-1} = 171.0$ Hz), 89.3 (C-1¹β, $^1J_{C-1, H-1} = 160.3$ Hz), 81.2 (C-3³), 80.2 (C-4²), 79.5 (C-4¹), 79.1 (C-4⁵), 77.3 (C-5¹), 77.2 (C-2⁴), 77.0 (C-2⁴), 76.6 (C-5⁵), 76.3 (C-3^G), 76.0 (C-5^G), 75.5 (C-5⁵), 75.2 (C-5²), 75.2 (C-5³), 74.3 (C-5⁴), 74.1 (C-3⁵), 73.7 (C-5⁴), 73.6 (C-6^S), 73.0 (C-3¹), 72.8 (C-3⁵), 72.8 (C-3²), 72.6 (C-7^S), 71.0 (C-2³), 70.7 (C-4⁵), 70.3 (C-2^G), 70.2 (C-3⁴), 70.2 (C-3⁴), 69.2 (C-4^S), 68.9 (C-8^S), 68.3 (C-4^G), 68.1 (C-4⁴), 68.1 (C-4⁴), 66.9 (C-6³), 66.4 (C-4³), 63.4 (C-9^S), 62.5 (C-6⁴), 62.4 (C-6⁴), 62.0 (C-6⁵), 61.9 (C-6²), 60.8 (C-6⁵), 60.4 (C-6^G), 60.6 (C-6¹), 56.1 (C-2⁵), 55.7 (C-2⁵), 55.6 (C-2²), 55.3 (C-2¹), 52.5 (C-5^S), 40.4 (C-6^S), 23.1, 23.0, 22.9, 22.8 (NAc).

43: Ausbeute: 2.35 mg (1.31 μmol, 57.7 %),

C₆₇H₁₁₀N₈O₄₈ (1794.64),

$[\alpha]_D^{20} = +28.0$ (0.10, Wasser);

HR-MS (100 % Wasser): $M_{\text{ber}} = 1795.6485$ (M+H)⁺, $M_{\text{gef}} = 1795.6447$ (M+H)⁺;

¹H-NMR (500 MHz, D₂O mit [D₄]-Methanol als internem Standard): δ = 5.12 (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1⁴), 4.92 (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1⁴), 4.77 (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1³), 4.75 (d, $J_{1,2} = 2.1$ Hz, 1H, H-1¹), 4.60 (d, $J_{1,2} = 6.4$ Hz, 1H, H-1²), 4.59-4.53 (m, 3H, H-1⁵, H-1⁵, H-1^G),

4.25 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1$ Hz, 1H, H-2³), 4.19 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1$ Hz, 1H, H-2⁴), 4.13 (dd, $J_{2,3} = J_{3,4} < 0.1$ Hz, 1H, H-3^G), 4.11 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1$ Hz, 1H, H-2⁴), 4.02-3.82 (m, 13H, H-6a⁵, H-6a³, H-4^G, H-6a⁴, H-6a², H-3⁴, H-6a^G, H-6a⁵, H-6a⁴, H-6a¹, H-9a^S, H-3⁴, H-7^S), 3.82-3.67 (m, 20H, H-2², H-6b², H-4³, H-6b³, H-3², H-3³, H-2¹, H-6b⁵, H-3⁵, H-5⁴, H-5^G, H-4⁵, H-4², H-2⁵, H-2⁵, H-6b^G, H-6b¹, H-6b⁵, H-4^S, H-3¹), 3.67-3.53 (m, 12H, H-4¹, H-6b⁴, H-9b^S, H-6^S, H-5³, H-6b⁴, H-8^S, H-5⁴, H-5², H-2^G, H-5⁵, H-5¹), 3.53-3.40 (m, 5H, H-4⁴, H-3⁵, H-4⁴, H-4⁵, H-5⁵), 2.75 (dd, $J_{3,3} = 12.9$ Hz, $J_{3,4} = 5.4$ Hz, 1H, H-3a^S), 2.13-2.00 (m, 15H, Ac), 1.79 (dd, $J_{3,3} = 12.8$ Hz, $J_{3,4} < 0.1$ Hz, 1H, H-3b^S),

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O mit [D₄]-Methanol als internem Standard): $\delta = 175.9, 175.7, 175.6, 174.8$ (C=O), 103.5 (C-1^G β , $^1J_{C-1, H-1} = 162.4$ Hz), 102.3 (C-1² β , $^1J_{C-1, H-1} = 163.7$ Hz), 101.3 (C-1³ β , $^1J_{C-1, H-1} = 162.0$ Hz), 100.7 (C-2^S α), 100.5 (C-1⁵ β , $^1J_{C-1, H-1} = 163.7$ Hz), 100.5 (C-1⁵ β , $^1J_{C-1, H-1} = 161.9$ Hz), 100.4 (C-1⁴ α , $^1J_{C-1, H-1} = 172.4$ Hz), 98.9 (C-1⁴ α , $^1J_{C-1, H-1} = 171.5$ Hz), 89.4 (C-1¹ β , $^1J_{C-1, H-1} = 163.3$ Hz), 81.3 (C-3³), 80.4 (C-4²), 79.6 (C-4¹), 79.1 (C-4⁵), 77.4 (C-5¹), 77.2 (C-2⁴), 77.1 (C-2⁴), 76.7 (C-5⁵), 76.3 (C-3^G), 76.1 (C-5^G), 75.6 (C-5⁵), 75.3 (C-5²), 75.2 (C-5³), 74.4 (C-5⁴), 74.3 (C-3⁵), 73.8 (C-5⁴), 73.7 (C-6^S), 73.1 (C-3¹), 72.9 (C-3⁵), 72.8 (C-3²), 72.7 (C-7^S), 71.1 (C-2³), 70.7 (C-4⁵), 70.3 (C-2^G), 70.3 (C-3⁴), 70.3 (C-3⁴), 69.3 (C-4^S), 68.9 (C-8^S), 68.3 (C-4^G), 68.2 (C-4⁴), 68.2 (C-4⁴), 66.8 (C-6³), 66.6 (C-4³), 63.4 (C-9^S), 62.6 (C-6⁴), 62.5 (C-6⁴), 61.9 (C-6⁵), 61.5 (C-6²), 60.8 (C-6⁵), 60.8 (C-6^G), 60.8 (C-6¹), 56.2 (C-2⁵), 55.8 (C-2⁵), 55.7 (C-2²), 55.4 (C-2¹), 52.5 (C-5^S), 40.5 (C-6^S), 23.2, 23.1, 22.9, 22.8 (NAc).

9.9. Versuche zu Kapitel 4.5.

O-(β -D-Galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-[*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-azid **27**

β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,3-[β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,6]- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4- β -GlcNAc-N₃

2.72 mg (1.4 μmol , 1 eq) Nonasaccharid **41** werden in 155.0 μL Puffer (100 mM Natriumphosphat, pH 5) gelöst. Es werden 4.0 μL *Clostridium perfringens* Neuraminidase (25 U/mL) zugegeben. Die Reaktion wird bei 30 °C inkubiert. Nach 24 h wird die Reaktion durch Erhitzen (5 min, 95 °C) beendet, die Proteinbestandteile werden abzentrifugiert und die Produkte durch HPLC (Hydrosphere C18, 10x150 mm, 5→10 % in 10 CV, Acetonitril/Wasser +0.1 % Ameisensäure, Flussrate: 2 mL/min) gereinigt.

Ausbeute: 1.65 mg (1.10 μmol , 86.5 %),

$\text{C}_{56}\text{H}_{93}\text{N}_7\text{O}_{40}$ (1504.37),

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -72.2$ (0.18, Wasser);

HR-MS (100 % Wasser): $M_{\text{ber}} = 1504.5531$ (M+H)⁺, $M_{\text{gef}} = 1504.5454$ (M+H)⁺;

¹H-NMR (500 MHz, D₂O mit [D₄]-Methanol als internem Standard): $\delta = 5.11$ (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1⁴), 4.92 (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1^{4'}), 4.77 (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1³), 4.75 (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1¹), 4.60 (d, $J_{1,2} = 7.9$ Hz, 1H, H-1²), 4.58 (d, $J_{1,2} = 7.7$ Hz, 1H, H-1⁵), 4.55 (d, $J_{1,2} = 8.4$ Hz, 1H, H-1^{5'}), 4.47 (d, $J_{1,2} = 7.7$ Hz, 1H, H-1^G), 4.25 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1$ Hz, 1H, H-2³), 4.12 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1$ Hz, 1H, H-2⁴), 4.11 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1$ Hz, 1H, H-2^{4'}), 4.02-3.80 (m, 10H, H-6a⁵, H-6a^{5'}, H-6a⁴, H-6a³, H-6a², H-6a^{4'}, H-4^G, H-3⁴, H-3^{4'}, H-6a¹), 3.80-3.70 (m, 19H, H-2², H-6b³, H-3², H-2¹, H-6b⁵, H-6b^{5'}, H-6a^G, H-6b^G, H-4³, H-3⁵, H-5⁴, H-5^G, H-4⁵, H-4², H-3³, H-2⁵, H-2^{5'}, H-6b², H-3¹), 3.70-3.39 (m, 16H, H-6b¹, H-3^G, H-5³, H-4¹, H-6b⁴, H-6b^{4'}, H-5^{4'}, H-5², H-4⁴, H-2^G, H-3^{5'}, H-5⁵, H-5¹, H-4^{4'}, H-4^{5'}, H-5^{5'}), 2.13-2.01 (m, 12H, Ac),

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O mit [D₄]-Methanol als internem Standard): $\delta = 175.9, 175.8$ (C=O), 104.1 (C-1^G β , $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 165.5$ Hz), 102.5 (C-1² β , $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 165.5$ Hz), 101.6 (C-1³ β , $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 165.1$ Hz), 100.8 (C-1⁴ α , $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 171.1$ Hz), 100.7 (C-1⁵ β , $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 168.5$ Hz), 100.6 (C-1⁵ β , $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 167.2$ Hz), 98.1 (C-1⁴ α , $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 172.8$ Hz), 89.7 (C-1¹ β , $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 163.7$ Hz), 81.6 (C-3³), 80.7 (C-4²), 79.8 (C-4¹), 79.6 (C-4⁵), 77.6 (C-5¹), 77.5 (C-2⁴), 77.4 (C-2^{4'}), 77.0 (C-5^{5'}), 76.5 (C-5^G), 75.9 (C-5⁵), 75.5 (C-5²), 75.4 (C-5³), 74.7 (C-5⁴), 74.5 (C-3^{5'}), 74.0 (C-5^{4'}), 73.6 (C-3^G), 73.4 (C-3¹), 73.1 (C-3⁵), 73.1 (C-3²), 72.1 (C-2^G), 71.4 (C-2³), 71.0 (C-4^{5'}), 70.6 (C-3⁴), 70.5 (C-3^{4'}), 69.7 (C-4^G), 68.5 (C-4⁴), 68.4 (C-4^{4'}), 67.0 (C-6³), 66.7 (C-4³),

62.9 (C-6⁴), 62.9 (C-6^{4'}), 62.2 (C-6^G), 61.8 (C-6¹), 61.1 (C-6²), 61.0 (C-6⁵), 61.0 (C-6^{5'}), 56.5 (C-2^{5'}), 56.0 (C-2⁵), 56.0 (C-2¹), 55.6 (C-2²), 23.5, 23.3, 23.2 (NAc).

O-(2-Acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-[*O*-(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-azid **26**

β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,3-[β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,6]- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4- β -GlcNAc-N₃

2.33 mg (1.2 μ mol, 1 eq) Nonasaccharid **40** werden in 155.0 μ L Puffer (100 mM Natriumphosphat, pH 5) gelöst. Es werden 4.0 μ L *Clostridium perfringens* Neuraminidase (25 U/mL) zugegeben. Die Reaktion wird bei 30 °C inkubiert. Nach 24 h wird die Reaktion durch Erhitzen (5 min, 95 °C) beendet, die Proteinbestandteile werden abzentrifugiert und die Produkte durch HPLC (Hydrosphere C18, 10x150 mm, 5 \rightarrow 10 % in 10 CV, Acetonitril/Wasser +0.1 % Ameisensäure, Flussrate: 2 mL/min) gereinigt.

Ausbeute: 1.53 mg (1.02 μ mol, 85.0 %),

C₅₆H₉₃N₇O₄₀ (1504.37),

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +107.5$ (0.08, Wasser);

HR-MS (100 % Wasser): $M_{\text{ber}} = 1504.5531$ (M+H)⁺, $M_{\text{gef}} = 1504.5464$ (M+H)⁺;

¹H-NMR (500 MHz, D₂O mit [D₄]-Methanol als internem Standard): $\delta = 5.11$ (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1⁴), 4.93 (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1^{4'}), 4.76 (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1³), 4.75 (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1¹), 4.60 (d, $J_{1,2} = 8.2$ Hz, 1H, H-1²), 4.58 (d, $J_{1,2} = 8.4$ Hz, 1H, H-1^{5'}), 4.55 (d, $J_{1,2} = 8.3$ Hz, 1H, H-1⁵), 4.47 (d, $J_{1,2} = 7.8$ Hz, 1H, H-1^{G'}), 4.25 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1$ Hz, 1H, H-2³), 4.19 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1$ Hz, 1H, H-2⁴), 4.11 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1$ Hz, 1H, H-2^{4'}), 4.02-3.81 (m, 10H, H-6a⁵, H-6a^{5'}, H-6a⁴, H-6a³, H-6a², H-6a^{4'}, H-4^{G'}, H-3⁴, H-3^{4'}, H-6a¹), 3.81-3.64 (m, 21H, H-2², H-6b³, H-3², H-2¹, H-6b⁵, H-6b^{5'}, H-6a^{G'}, H-6b^{G'}, H-4³, H-3^{5'}, H-5⁴, H-5^{G'}, H-4^{5'}, H-4², H-3³, H-2^{5'}, H-2⁵, H-6b², H-3¹, H-6b¹, H-4¹), 3.64-3.40 (m, 14H, H-3^{G'},

H-5³, H-6b⁴, H-6b^{4'}, H-5⁴, H-5², H-4⁴, H-2^{G'}, H-3⁵, H-5^{5'}, H-5¹, H-4^{4'}, H-4⁵, H-5⁵, 2.13-1.96 (m, 12H, Ac),

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O mit [D₄]-Methanol als internem Standard): δ = 175.5, 175.4 (C=O), 103.7 (C-1^{G'}β, ¹J_{C-1, H-1} = 163.5 Hz), 102.1 (C-1²β, ¹J_{C-1, H-1} = 164.0 Hz), 101.2 (C-1³β, ¹J_{C-1, H-1} = 162.1 Hz), 100.4 (C-1⁴α, ¹J_{C-1, H-1} = 173.0 Hz), 100.2 (C-1⁵β, ¹J_{C-1, H-1} = 155.8 Hz), 100.2 (C-1^{5'}β, ¹J_{C-1, H-1} = 160.2 Hz), 97.8 (C-1^{4'}α, ¹J_{C-1, H-1} = 171.1 Hz), 89.3 (C-1¹β, ¹J_{C-1, H-1} = 160.2 Hz), 81.2 (C-3³), 80.2 (C-4²), 79.4 (C-4¹), 79.2 (C-4^{5'}), 77.2 (C-5¹), 77.2 (C-2⁴), 77.0 (C-2^{4'}), 76.5 (C-5⁵), 76.1 (C-5^{G'}), 75.4 (C-5^{5'}), 75.2 (C-5²), 75.2 (C-5³), 74.3 (C-5⁴), 74.0 (C-3⁵), 73.6 (C-5^{4'}), 73.3 (C-3^{G'}), 72.3 (C-3¹), 72.8 (C-3^{5'}), 72.7 (C-3²), 71.7 (C-2^{G'}), 70.9 (C-2³), 70.6 (C-4⁵), 70.2 (C-3⁴), 70.1 (C-3^{4'}), 69.3 (C-4^{G'}), 68.1 (C-4⁴), 68.1 (C-4^{4'}), 66.5 (C-6³), 66.4 (C-4³), 62.4 (C-6⁴), 62.4 (C-6^{4'}), 61.8 (C-6^{G'}), 61.4 (C-6¹), 60.7 (C-6²), 60.7 (C-6^{5'}), 60.7 (C-6⁵), 56.1 (C-2⁵), 55.7 (C-2^{5'}), 55.6 (C-2¹), 55.2 (C-2²), 23.0, 22.9, 22.8 (NAc).

9.10. Versuche zu Kapitel 5.1.

O-(5-Acetamido-3,5-didesoxy-*D*-glycero- α -*D*-galacto-non-2-ulopyranosylsäure)-(2 \rightarrow 6)-*O*-(β -*D*-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -*D*-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-[*O*-(β -*D*-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -*D*-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(β -*D*-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[*O*-(α -*L*-fucosyl)-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-azid **45**

α -Neu5Ac-2,6- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,3-[β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,6]- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4-[α -Fuc-1,6]- β -GlcNAc-N₃

O-(β -*D*-Galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -*D*-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-[*O*-(5-acetamido-3,5-didesoxy-*D*-glycero- α -*D*-galacto-non-2-ulopyranosylsäure)-(2 \rightarrow 6)-*O*-(β -*D*-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -*D*-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(β -*D*-mannopyranosyl)-

(1→4)-O-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-[O-(α-L-fucosyl-(1→6)]-O-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-azid **44**

β-Gal-1,4-β-GlcNAc-1,2-α-Man-1,3-[α-Neu5Ac-2,6-β-Gal-1,4-β-GlcNAc-1,2-α-Man-1,6]-β-Man-1,4-β-GlcNAc-1,4-[α-Fuc-1,6]-β-GlcNAc-N₃

13.2 mg (5.5 μmol, 25 %) Dodecasaccharid **21** werden in 579 μL Puffer (100 mM Natriumphosphat, pH 6.5) gelöst. Es werden 11 μL *Clostridium perfringens* Neuraminidase (25 U/mL) zugegeben. Die Reaktion wird bei 30 °C inkubiert. Nach 90 min wird die Reaktion durch Erhitzen (5 min, 95 °C) beendet, die Proteinbestandteile werden abzentrifugiert und die Produkte durch HPLC (Hydrosphere C18 20x50 mm, 5→30 % in 16 CV, Acetonitril/Wasser +0.1 % Ameisensäure, Flussrate: 4 mL/min), dann (Hydrosphere C18, 10x150 mm, 10 % iso für 10 CV, Acetonitril/Wasser +0.1 % Ameisensäure, Flussrate: 2 mL/min) gereinigt. Die Produktlösung wird mit 1 M Natriumcarbonat-Lösung neutralisiert (pH 8-9) und anschließend lyophilisiert. Das Salz wird durch Gelpermeationschromatographie (Sephadex G25, 25x155 mm, 5 % Ethanol in Wasser, Flussrate: 2 mL/min) abgetrennt.

20: Ausbeute: 0.78 mg (0.4 μmol, 6.8 %),

21: Ausbeute: 4.96 mg (2.1 μmol, 35.6 %),

45: Ausbeute: 2.42 mg (1.2 μmol, 20.3 %),

C₇₉H₁₃₀N₈O₅₇ (2102.75),

[α]_D²⁰ = -10.0 (0.08, Wasser);

HR-MS (100 % Wasser): M_{ber} = 2103.7593 (M+H)⁺, M_{gef} = 2103.7438 (M+H)⁺;

¹H-NMR (500 MHz, D₂O mit [D₄]-Methanol als internem Standard): δ = 5.13 (d, J_{1,2} < 0.1 Hz, 1H, H-1⁴), 4.93 (d, J_{1,2} < 0.1 Hz, 1H, H-1⁴), 4.90 (d, J_{1,2} = 4.3 Hz, 1H, H-1^F), 4.77 (d, J_{1,2} < 0.1 Hz, 1H, H-1³), 4.75 (d, J_{1,2} < 0.1 Hz, 1H, H-1¹), 4.69 (d, J_{1,2} = 8.1 Hz, 1H, H-1²), 4.60 (d, J_{1,2} = 9.0 Hz, 1H, H-1⁵), 4.58 (d, J_{1,2} = 9.0 Hz, 1H, H-1⁵), 4.47 (d, J_{1,2} = 8.9 Hz, 1H, H-1^G), 4.44 (d, J_{1,2} = 8.9 Hz, 1H, H-1^G), 4.26 (dd, J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1 Hz, 1H, H-2³), 4.19 (dd, J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1 Hz, 1H, H-2⁴), 4.14 (dd, J_{4,5} < 0.1 Hz, J_{5,6} = 8.9 Hz, 1H, H-5^F), 4.11 (dd,

$J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1$ Hz, 1H, H-2^{4'}), 4.02-3.84 (m, 16H, H-6a⁵, H-6a^{G'}, H-6a^G, H-6a³, H-6a⁴, H-4^G, H-6a², H-6a^{4'}, H-3⁴, H-3^F, H-9a^S, H-4^{G'}, H-3^{4'}, H-7^S, H-6a¹, H-6b²), 3.84-3.70 (m, 26H, H-5^S, H-2², H-5⁴, H-4¹, H-2⁵, H-6b⁵, H-6b¹, H-6a^{5'}, H-6b^{5'}, H-4³, H-2^F, H-6b³, H-3², H-4^F, H-3³, H-2¹, H-2^{5'}, H-3⁵, H-3¹, H-5^{G'}, H-5^G, H-5¹, H-4^{5'}, H-4², H-3^{G'}, H-3^G), 3.70-3.45 (m, 19H, H-6^S, H-6b⁴, H-9b^S, H-4^S, H-3^{5'}, H-5³, H-4⁵, H-6b^{4'}, H-5^{4'}, H-5², H-6b^{G'}, H-6b^G, H-8^S, H-2^{G'}, H-5⁵, H-5^{5'}, H-4⁴, H-4^{4'}, H-2^G), 2.66 (dd, $J_{3,3} = 11.7$ Hz, $J_{3,4} = 5.3$ Hz, 1H, H-3a^S), 2.11-2.00 (m, 15H, Ac), 1.72 (dd, $J_{3,3} = 12.6$ Hz, $J_{3,4} < 0.1$ Hz, 1H, H-3b^S), 1.23 (d, $J_{5,6} = 6.3$ Hz, 3H, H-6^F),

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O mit [D₄]-Methanol als internem Standard): $\delta = 175.8, 175.6, 175.5, 174.4$ (C=O), 104.4 (C-1^G β , $^1J_{C-1, H-1} = 162.4$ Hz), 103.8 (C-1^{G'} β , $^1J_{C-1, H-1} = 163.3$ Hz), 101.8 (C-1² β , $^1J_{C-1, H-1} = 160.5$ Hz), 101.3 (C-1³ β , $^1J_{C-1, H-1} = 162.4$ Hz), 101.0 (C-2^S α), 100.4 (C-1⁴ α , $^1J_{C-1, H-1} = 172.7$ Hz), 100.2 (C-1^{5'} β , $^1J_{C-1, H-1} = 162.4$ Hz), 100.2 (C-1⁵ β , $^1J_{C-1, H-1} = 160.5$ Hz), 100.1 (C-1^F α , $^1J_{C-1, H-1} = 171.7$ Hz), 97.9 (C-1^{4'} α , $^1J_{C-1, H-1} = 170.3$ Hz), 89.5 (C-1¹ β , $^1J_{C-1, H-1} = 161.0$ Hz), 81.6 (C-4⁵), 81.3 (C-3³), 80.4 (C-4²), 79.3 (C-4^{5'}), 78.9 (C-4¹), 77.3 (C-2⁴), 77.1 (C-2^{4'}), 76.2 (C-5¹), 75.6 (C-5^{5'}), 75.3 (C-5⁵), 75.3 (C-5²), 75.2 (C-5³), 74.6 (C-5⁴), 74.6 (C-5^G), 74.4 (C-5^{G'}), 73.7 (C-5^{4'}), 73.4 (C-3^{5'}), 73.3 (C-6^S), 73.3 (C-3^G), 73.3 (C-3^{G'}), 72.9 (C-3⁵), 72.9 (C-3¹), 72.6 (C-4^F), 72.6 (C-3²), 72.5 (C-7^S), 71.8 (C-2^G), 71.6 (C-2^{G'}), 71.0 (C-2³), 70.3 (C-3⁴), 70.3 (C-3^{4'}), 70.3 (C-3^F), 69.4 (C-4^G), 69.2 (C-4^{G'}), 69.2 (C-8^S), 69.0 (C-2^F), 68.9 (C-4^S), 68.2 (C-4⁴), 68.1 (C-4^{4'}), 67.8 (C-5^F), 66.7 (C-6³), 66.5 (C-4³), 64.2 (C-6^G), 64.1 (C-6^{G'}), 63.5 (C-9^S), 62.5 (C-6⁴), 62.5 (C-6^{4'}), 61.9 (C-6⁵), 61.1 (C-6⁵), 60.8 (C-6¹), 60.8 (C-6²), 55.8 (C-2²), 55.6 (C-2⁵), 55.4 (C-2^{5'}), 55.3 (C-2¹), 52.7 (C-5^S), 40.9 (C-3^S), 23.2, 23.1, 22.9, 22.8 (NAc), 16.1 (C-6^F).

44: Ausbeute: 2.3 mg (1.1 μ L, 18.6 %),

C₇₉H₁₃₀N₈O₅₇ (2102.75),

$[\alpha]_D^{20} = +16.2$ (0.08, Wasser);

HR-MS (100 % Wasser): $M_{\text{ber}} = 2103.7593$ (M+H)⁺, $M_{\text{gef}} = 2103.7571$ (M+H)⁺;

¹H-NMR (500 MHz, D₂O mit [D₄]-Methanol als internem Standard): $\delta = 5.12$ (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1⁴), 4.94 (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1^{4'}), 4.90 (d, $J_{1,2} = 4.1$ Hz, 1H, H-1^F), 4.77 (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1³), 4.75 (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1¹), 4.69 (d, $J_{1,2} = 8.2$ Hz, 1H, H-1²), 4.60

(d, $J_{1,2} = 6.5$ Hz, 1H, H-1^S), 4.58 (d, $J_{1,2} = 6.4$ Hz, 1H, H-1^S), 4.47 (d, $J_{1,2} = 9.0$ Hz, 1H, H-1^G), 4.45 (d, $J_{1,2} = 9.0$ Hz, 1H, H-1^G), 4.25 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1$ Hz, 1H, H-2³), 4.19 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1$ Hz, 1H, H-2⁴), 4.14 (dd, $J_{4,5} < 0.1$ Hz, $J_{5,6} = 7.3$ Hz, 1H, H-5^F), 4.11 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1$ Hz, 1H, H-2⁴), 4.03-3.84 (m, 15H, H-6a⁵, H-6a^G, H-6a^G, H-6a³, H-6a⁴, H-4^G, H-6a², H-6a⁴, H-3⁴, H-3^F, H-9a^S, H-4^G, H-3⁴, H-7^S, H-6a¹), 3.84-3.70 (m, 26H, H-5^S, H-2², H-6b², H-5⁴, H-4¹, H-2⁵, H-6b⁵, H-6b¹, H-6a⁵, H-6b⁵, H-4³, H-2^F, H-6b³, H-3², H-4^F, H-3³, H-2¹, H-2⁵, H-3⁵, H-3¹, H-5^G, H-5^G, H-5¹, H-4⁵, H-4², H-3^G), 3.70-3.47 (m, 20H, H-3^G, H-6^S, H-6b⁴, H-9b^S, H-4^S, H-3⁵, H-5³, H-4⁵, H-6b⁴, H-5⁴, H-5², H-6b^G, H-6b^G, H-8^S, H-2^G, H-5⁵, H-5⁵, H-4⁴, H-4⁴, H-2^G), 2.67 (dd, $J_{3,3} = 12.3$ Hz, $J_{3,4} = 4.9$ Hz, 1H, H-3a^S), 2.14-2.00 (m, 15H, Ac), 1.72 (dd, $J_{3,3} = 12.1$ Hz, $J_{3,4} < 0.1$ Hz, 1H, H-3b^S), 1.24 (d, $J_{5,6} = 7.3$ Hz, 3H, H-6^F),

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O mit [D₄]-Methanol als internem Standard): $\delta = 175.8, 175.6, 175.5, 174.4$ (C=O), 104.5 (C-1^G β , $^1J_{C-1, H-1} = 164.3$ Hz), 103.8 (C-1^G β , $^1J_{C-1, H-1} = 164.2$ Hz), 101.9 (C-1² β , $^1J_{C-1, H-1} = 165.2$ Hz), 101.4 (C-1³ β , $^1J_{C-1, H-1} = 162.8$ Hz), 101.0 (C-2^S α), 100.5 (C-1⁴ α , $^1J_{C-1, H-1} = 170.3$ Hz), 100.4 (C-1⁵ β , $^1J_{C-1, H-1} = 162.8$ Hz), 100.3 (C-1⁵ β , $^1J_{C-1, H-1} = 161.9$ Hz), 100.1 (C-1^F α , $^1J_{C-1, H-1} = 171.7$ Hz), 97.8 (C-1⁴ α , $^1J_{C-1, H-1} = 171.3$ Hz), 89.6 (C-1¹ β , $^1J_{C-1, H-1} = 162.4$ Hz), 81.6 (C-4⁵), 81.3 (C-3³), 80.7 (C-4²), 79.3 (C-4⁵), 78.9 (C-4¹), 77.3 (C-2⁴), 77.1 (C-2⁴), 76.3 (C-5¹), 75.6 (C-5⁵), 75.3 (C-5⁵), 75.2 (C-5²), 75.1 (C-5³), 74.6 (C-5⁴), 74.6 (C-5^G), 74.4 (C-5^G), 73.7 (C-5⁴), 73.4 (C-3⁵), 73.3 (C-6^S), 73.0 (C-3^G), 72.9 (C-3^G), 72.8 (C-3⁵), 72.7 (C-3¹), 72.6 (C-4^F), 72.6 (C-3²), 72.6 (C-7^S), 71.8 (C-2^G), 71.6 (C-2^G), 71.1 (C-2³), 70.3 (C-3⁴), 70.3 (C-3⁴), 70.2 (C-3^F), 69.4 (C-4^G), 69.3 (C-4^G), 69.2 (C-8^S), 69.1 (C-2^F), 69.0 (C-4^S), 68.2 (C-4⁴), 68.2 (C-4⁴), 67.8 (C-5^F), 66.8 (C-6³), 66.6 (C-4³), 64.2 (C-6^G), 64.2 (C-6^G), 63.5 (C-9^S), 62.6 (C-6⁴), 62.5 (C-6⁴), 61.9 (C-6⁵), 61.1 (C-6⁵), 60.8 (C-6¹), 60.8 (C-6²), 55.8 (C-2²), 55.5 (C-2⁵), 55.3 (C-2⁵), 55.2 (C-2¹), 52.8 (C-5^S), 40.9 (C-3^S), 23.3, 23.2, 23.0, 22.9 (NAc), 16.2 (C-6^F).

O-(5-Acetamido-3,5-dideoxy-*D*-glycero- α -*D*-galacto-non-2-ulopyranosylsäure)-(2 \rightarrow 3)-*O*-(β -*D*-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -*D*-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-[*O*-(β -*D*-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -*D*-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(β -*D*-mannopyranosyl)-

(1→4)-O-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-[O-(α-L-fucosyl-(1→6))-O-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-azid 47

α -Neu5Ac-2,3-β-Gal-1,4-β-GlcNAc-1,2-α-Man-1,3-[β-Gal-1,4-β-GlcNAc-1,2-α-Man-1,6]-β-Man-1,4-β-GlcNAc-1,4-[α-Fuc-1,6]-β-GlcNAc-N₃

O-(β-D-Galactopyranosyl)-(1→4)-O-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-O-(α-D-mannopyranosyl)-(1→3)-[O-(5-acetamido-3,5-didesoxy-D-glycero-α-D-galacto-non-2-ulopyranosylsäure)-(2→3)-O-(β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-O-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-O-(α-D-mannopyranosyl)-(1→6)]-O-(β-D-mannopyranosyl)-(1→4)-O-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-[O-(α-L-fucosyl-(1→6))-O-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-azid 46

β-Gal-1,4-β-GlcNAc-1,2-α-Man-1,3-[α-Neu5Ac-2,3-β-Gal-1,4-β-GlcNAc-1,2-α-Man-1,6]-β-Man-1,4-β-GlcNAc-1,4-[α-Fuc-1,6]-β-GlcNAc-N₃

15.00 mg (8.3 μmol, 1 eq) Decasaccharid **20** und 7.90 mg (12.45 μmol, 1.5 eq) CMP-NANA werden in 985.2 μL Wasser und 1.04 mL Puffer (200 mM Natriumcacodylat, 300 mM Natriumchlorid, 50 mM Natriumphosphat, pH 7.4) gelöst. Es werden 49.8 μL *Vibrio species* ST3 (3 mg/mL) zugegeben. Die Reaktion wird bei 30 °C inkubiert. Nach 1 h wird die Reaktion durch Erhitzen (5 min, 95 °C) beendet, die Proteinbestandteile werden abzentrifugiert und die Produkte durch HPLC (Hydrosphere C18, 20x50 mm, 5→30 % in 16 CV, Acetonitril/Wasser +0.1 % Ameisensäure, Flussrate: 4 mL/min) gereinigt. Die Produktlösung wird mit 1 M Natriumcarbonat-Lösung neutralisiert (pH 8-9) und anschließend lyophilisiert. Das Salz wird durch Gelpermeationschromatographie (Sephadex G25, 25x155 mm, 5 % Ethanol in Wasser, Flussrate: 2 mL/min) abgetrennt. Das zurückerhaltene Decasaccharid **20** wird erneut nach der gleichen Vorschrift umgesetzt.

20: Ausbeute: 3.82 mg (2.1 μmol, 25.3 %),

22: Ausbeute: 1.25 mg (0.52 μmol, 6.0 %),

46/47: Ausbeute: 9.36 mg (4.5 μmol, 54.2 %),

47:

$C_{79}H_{130}N_8O_{57}$ (2102.75),

$[\alpha]_D^{20} = -22.0$ (0.21, Wasser);

HR-MS (100 % Wasser): $M_{ber} = 2103.7593$ (M+H)⁺, $M_{gef} = 2103.7513$ (M+H)⁺;

¹H-NMR (500 MHz, D₂O mit [D₄]-Methanol als internem Standard): $\delta = 5.11$ (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1⁴), 4.93 (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1^{4'}), 4.90 (d, $J_{1,2} = 4.0$ Hz, 1H, H-1^F), 4.76 (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1³), 4.75 (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1¹), 4.68 (d, $J_{1,2} = 9.0$ Hz, 1H, H-1²), 4.60-4.53 (m, 3H, H-1^{5'}, H-1⁵, H-1^G), 4.47 (d, $J_{1,2} = 7.8$ Hz, 1H, H-1^{G'}), 4.25 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1$ Hz, 1H, H-2³), 4.19 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1$ Hz, 1H, H-2⁴), 4.17-4.09 (m, 3H, H-3^G, H-2^{4'}, H-5^F), 4.02-3.83 (m, 17H, H-6a^G, H-6a^{G'}, H-6a³, H-4^G, H-6a⁴, H-4^{G'}, H-6a^{4'}, H-3⁴, H-6a², H-9a^S, H-3^F, H-3^{4'}, H-7^S, H-5^S, H-6a^{1'}, H-6b², H-4¹), 3.83-3.65 (m, 29H, H-2², H-2^F, H-2⁵, H-2^{5'}, H-6a⁵, H-6a^{5'}, H-4³, H-6b³, H-3², H-3³, H-2¹, H-6b^G, H-6b^{G'}, H-6b⁵, H-6b^{5'}, H-3⁵, H-3^{5'}, H-5⁴, H-5¹, H-5^G, H-4⁵, H-4^{5'}, H-4², H-6b¹, H-4^S, H-4^F, H-3¹, H-3^{G'}, H-5^{G'}), 3.65-3.45 (m, 14H, H-9b^S, H-6^S, H-6b⁴, H-6b^{4'}, H-5^{4'}, H-5², H-5³, H-8^S, H-2^G, H-2^{G'}, H-5⁵, H-5^{5'}, H-4⁴, H-4^{4'}), 2.76 (dd, $J_{3,3} = 12.6$ Hz, $J_{3,4} = 6.9$ Hz, 1H, H-3a^S), 2.14-1.99 (m, 15H, Ac), 1.80 (dd, $J_{3,3} = 11.5$ Hz, $J_{3,4} < 0.1$ Hz, 1H, H-3b^S), 1.23 (d, $J_{5,6} = 8.0$ Hz, 3H, H-6^F),

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O mit [D₄]-Methanol als internem Standard): $\delta = 175.9, 175.7, 175.6, 175.5, 174.8$ (C=O), 103.8 (C-1^G β , $^1J_{C-1, H-1} = 166.5$ Hz), 103.5 (C-1^G β , $^1J_{C-1, H-1} = 166.9$ Hz), 101.9 (C-1² β , $^1J_{C-1, H-1} = 165.1$ Hz), 101.4 (C-1³ β , $^1J_{C-1, H-1} = 162.7$ Hz), 100.7 (C-2^S α), 100.5 (C-1⁴ α , $^1J_{C-1, H-1} = 170.3$ Hz), 100.4 (C-1⁵ β , $^1J_{C-1, H-1} = 162.3$ Hz), 100.3 (C-1^{5'} β , $^1J_{C-1, H-1} = 162.7$ Hz), 100.2 (C-1^F α , $^1J_{C-1, H-1} = 171.7$ Hz), 97.9 (C-1^{4'} α , $^1J_{C-1, H-1} = 170.7$ Hz), 89.6 (C-1¹ β , $^1J_{C-1, H-1} = 166.0$ Hz), 81.3 (C-3³), 80.5 (C-4²), 79.3 (C-4⁵), 79.1 (C-4^{5'}), 78.9 (C-4¹), 77.3 (C-2⁴), 77.2 (C-2^{4'}), 76.4 (C-3^G), 76.2 (C-5¹), 76.2 (C-5^G), 76.1 (C-5^{G'}), 75.6 (C-5⁵), 75.6 (C-5^{5'}), 75.3 (C-5³), 75.3 (C-5²), 74.4 (C-5⁴), 73.8 (C-5^{5'}), 73.7 (C-6^S), 73.4 (C-3^{G'}), 73.0 (C-3¹), 72.9 (C-3⁵), 72.8 (C-3^{5'}), 72.7 (C-3²), 72.7 (C-4^F), 72.6 (C-7^S), 71.8 (C-2^{G'}), 71.1 (C-2³), 70.4 (C-2^G), 70.3 (C-3⁴), 70.3 (C-3^{4'}), 69.3 (C-4^{G'}), 69.2 (C-4^S), 69.0 (C-8^S), 69.0 (C-2^F), 68.3 (C-4^G), 68.2 (C-4⁴), 68.2 (C-4^{4'}), 67.8 (C-5^F), 67.2 (C-6³), 66.6 (C-4³), 63.4 (C-9^S), 62.6 (C-6⁴), 62.5 (C-6^{4'}), 61.9 (C-6⁵), 61.9 (C-6^{5'}), 60.8 (C-6¹), 60.8 (C-6^G), 60.8 (C-6^{G'}), 60.8 (C-6²), 55.8 (C-2²), 55.7 (C-2⁵), 55.7 (C-2^{5'}), 55.4 (C-2¹), 52.6 (C-5^S), 40.5 (C-3^S), 23.3, 23.2, 23.0, 22.9 (NAc), 16.2 (C-6^F).

46:

$C_{79}H_{130}N_8O_{57}$ (2102.75),

$[\alpha]_D^{20} = -20.7$ (0.16, Wasser);

HR-MS (100 % Wasser): $M_{\text{ber}} = 2103.7593$ (M+H)⁺, $M_{\text{gef}} = 2103.7431$ (M+H)⁺;

¹H-NMR (500 MHz, D₂O mit [D₄]-Methanol als internem Standard): $\delta = 5.12$ (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1⁴), 4.92 (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1^{4'}), 4.91 (d, $J_{1,2} = 4.3$ Hz, 1H, H-1^F), 4.77 (d, $J_{1,2} = 2.7$ Hz, 1H, H-1³), 4.75 (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1¹), 4.68 (d, $J_{1,2} = 7.7$ Hz, 1H, H-1²), 4.60-4.53 (m, 3H, H-1^{5'}, H-1⁵, H-1^{G'}), 4.47 (d, $J_{1,2} = 8.1$ Hz, 1H, H-1^G), 4.25 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1$ Hz, 1H, H-2³), 4.19 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1$ Hz, 1H, H-2⁴), 4.17-4.09 (m, 3H, H-3^{G'}, H-2^{4'}, H-5^F), 4.03-3.84 (m, 16H, H-6a^G, H-6a^{G'}, H-6a³, H-4^G, H-6a⁴, H-4^{G'}, H-6a^{4'}, H-3⁴, H-6a², H-9a^{S'}, H-3^F, H-3^{4'}, H-7^{S'}, H-5^{S'}, H-6a^{1'}, H-6b²), 3.84-3.67 (m, 28H, H-2², H-2^F, H-2⁵, H-2^{5'}, H-6a⁵, H-6a^{5'}, H-4³, H-6b³, H-3², H-4¹, H-3³, H-2¹, H-6b^G, H-6b^{G'}, H-6b⁵, H-6b^{5'}, H-5⁴, H-5¹, H-5^G, H-4⁵, H-4^{5'}, H-4², H-6b¹, H-4^{S'}, H-4^F, H-3¹, H-3^G, H-5^{G'}), 3.67-3.46 (m, 16H, H-9b^{S'}, H-3⁵, H-3^{5'}, H-6^{S'}, H-6b⁴, H-6b^{4'}, H-5^{4'}, H-5², H-5³, H-8^{S'}, H-2^G, H-2^{G'}, H-5⁵, H-5^{5'}, H-4⁴, H-4^{4'}), 2.76 (dd, $J_{3,3} = 12.6$ Hz, $J_{3,4} = 6.0$ Hz, 1H, H-3a^{S'}), 2.11-2.01 (m, 15H, Ac), 1.80 (dd, $J_{3,3} = 12.0$ Hz, $J_{3,4} < 0.1$ Hz, 1H, H-3b^{S'}), 1.24 (d, $J_{5,6} = 6.0$ Hz, 3H, H-6^F),

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O mit [D₄]-Methanol als internem Standard): $\delta = 175.9$, 175.6, 175.5, 174.8 (C=O), 103.8 (C-1^G β , $^1J_{C-1, H-1} = 162.7$ Hz), 103.5 (C-1^{G'} β , $^1J_{C-1, H-1} = 160.8$ Hz), 101.9 (C-1² β , $^1J_{C-1, H-1} = 161.3$ Hz), 101.4 (C-1³ β , $^1J_{C-1, H-1} = 161.7$ Hz), 100.7 (C-2^{S'} α), 100.5 (C-1⁴ α , $^1J_{C-1, H-1} = 173.4$ Hz), 100.3 (C-1⁵ β , $^1J_{C-1, H-1} = 162.2$ Hz), 100.3 (C-1^{5'} β , $^1J_{C-1, H-1} = 162.2$ Hz), 100.1 (C-1^F α , $^1J_{C-1, H-1} = 171.5$ Hz), 97.9 (C-1^{4'} α , $^1J_{C-1, H-1} = 171.1$ Hz), 89.5 (C-1¹ β , $^1J_{C-1, H-1} = 161.8$ Hz), 81.3 (C-3³), 80.4 (C-4²), 79.3 (C-4⁵), 79.1 (C-4^{5'}), 78.9 (C-4¹), 77.3 (C-2⁴), 77.1 (C-2^{4'}), 76.4 (C-3^{G'}), 76.2 (C-5¹), 76.2 (C-5^G), 76.0 (C-5^{G'}), 75.6 (C-5⁵), 75.6 (C-5^{5'}), 75.2 (C-5³), 75.2 (C-5²), 74.4 (C-5⁴), 73.8 (C-5^{5'}), 73.7 (C-6^{S'}), 73.4 (C-3^{G'}), 73.0 (C-3¹), 72.9 (C-3⁵), 72.8 (C-3^{5'}), 72.7 (C-3²), 72.7 (C-4^F), 72.6 (C-7^{S'}), 71.8 (C-2^G), 71.0 (C-2³), 70.3 (C-2^{G'}), 70.3 (C-3⁴), 70.3 (C-3^{4'}), 69.4 (C-4^G), 69.2 (C-4^{S'}), 69.0 (C-8^{S'}), 68.9 (C-2^F), 68.3 (C-4^{G'}), 68.2 (C-4⁴), 68.1 (C-4^{4'}), 67.8 (C-5^F), 67.1 (C-6³), 66.5 (C-4³), 63.4 (C-9^{S'}), 62.6 (C-6⁴), 62.5 (C-6^{4'}), 61.9 (C-6⁵), 61.9 (C-6^{5'}), 60.8 (C-6¹), 60.8 (C-6^G), 60.8 (C-6^{G'}), 60.8 (C-6²), 55.8

(C-2²), 55.7 (C-2⁵), 55.7 (C-2^{5'}), 55.3 (C-2¹), 52.5 (C-5^{S'}), 40.5 (C-3^{S'}), 23.2, 23.1, 23.0, 22.9 (NAc), 16.2 (C-6^F).

9.11. Versuche zu Kapitel 5.2.

O-(5-Acetamido-3,5-didesoxy-*D*-glycero- α -*D*-galacto-non-2-ulopyranosylsäure)-(2 \rightarrow 6)-*O*-(β -*D*-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -*D*-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-[*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -*D*-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(β -*D*-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[*O*-(α -*L*-fucosyl)-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-azid **49**

α -Neu5Ac-2,6- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,3-[β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,6]- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4-[α -Fuc-1,6]- β -GlcNAc-N₃

O-(2-Acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -*D*-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-[*O*-(5-acetamido-3,5-didesoxy-*D*-glycero- α -*D*-galacto-non-2-ulopyranosylsäure)-(2 \rightarrow 6)-*O*-(β -*D*-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -*D*-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(β -*D*-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[*O*-(α -*L*-fucosyl)-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-azid **48**

β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,3-[α -Neu5Ac-2,6- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,6]- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4-[α -Fuc-1,6]- β -GlcNAc-N₃

10.59 mg (5.04 μ mol, 1 eq) Mischung der Decasaccharide **45** und **44** (ca. 1:1) und 1.00 mg (5 U/mg) *Aspergillus oryzae* β -Galactosidase werden in 328.0 μ L Puffer (100 mM Natriumphosphat, pH 6) gelöst. Die Reaktion wird bei 30 °C inkubiert. Nach 17 h wird die Reaktion durch Erhitzen (5 min, 95 °C) beendet, die Proteinbestandteile werden abzentrifugiert und die Produkte durch HPLC (Hydrosphere C18, 10x150 mm, 10 % iso für 10 CV,

Acetonitril/Wasser +0.1 % Ameisensäure, Flussrate: 2 mL/min) gereinigt. Die Produktlösung wird mit 1 M Natriumcarbonat-Lösung neutralisiert (pH 8-9) und anschließend lyophilisiert. Das Salz wird durch Gelpermeationschromatographie (Sephadex G25, 25x155 mm, 5 % Ethanol in Wasser, Flussrate: 2 mL/min) abgetrennt.

48: Ausbeute: 4.36 mg (2.25 μ mol, 44.6 %),

$C_{73}H_{120}N_8O_{52}$ (1940.70),

$[\alpha]_D^{20} = +5.0$ (0.24, Wasser);

HR-MS (100 % Wasser): $M_{ber} = 1941.7064$ (M+H)⁺, $M_{gef} = 1941.7004$ (M+H)⁺;

¹H-NMR (500 MHz, D₂O mit [D₄]-Methanol als internem Standard): $\delta = 5.12$ (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1⁴), 4.94 (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1⁴), 4.90 (d, $J_{1,2} = 3.9$ Hz, 1H, H-1^F), 4.77 (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1³), 4.75 (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1¹), 4.69 (d, $J_{1,2} = 8.4$ Hz, 1H, H-1²), 4.60 (d, $J_{1,2} = 8.4$ Hz, 1H, H-1⁵), 4.55 (d, $J_{1,2} = 8.3$ Hz, 1H, H-1⁵), 4.45 (d, $J_{1,2} = 8.4$ Hz, 1H, H-1^G), 4.25 (dd, $J_{2,3} = J_{3,4} < 0.1$ Hz, 1H, H-3³), 4.19 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1$ Hz, 1H, H-2⁴), 4.14 (dd, $J_{4,5} < 0.1$ Hz, $J_{5,6} = 6.6$ Hz, 1H, H-5^F), 4.11 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1$ Hz, 1H, H-2⁴), 4.03-3.84 (m, 14H, H-6a^G, H-6a², H-6a³, H-6a⁵, H-6a⁴, H-4^G, H-3⁴, H-6a⁵, H-6a⁴, H-3^F, H-7^S, H-6a¹, H-9a^S, H-3⁴), 3.84-3.67 (m, 23H, H-5^S, H-2^F, H-4^F, H-5⁴, H-5¹, H-4¹, H-2², H-6b², H-6b⁵, H-4³, H-3², H-3³, H-2¹, H-6b¹, H-6b⁵, H-3⁵, H-5^G, H-2⁵, H-2⁵, H-6b³, H-3¹, H-3^G, H-4²), 3.67-3.41 (m, 18H, H-6b⁴, H-9b^S, H-4^S, H-6^S, H-5³, H-4⁵, H-6b⁴, H-5⁴, H-5², H-8^S, H-5⁵, H-6b^G, H-4⁴, H-2^G, H-3⁵, H-4⁴, H-4⁵, H-5⁵), 2.67 (dd, $J_{3,3} = 13.3$ Hz, $J_{3,4} = 4.4$ Hz, 1H, H-3a^S), 2.11-2.00 (m, 15H, Ac), 1.72 (dd, $J_{3,3} = 11.9$ Hz, $J_{3,4} < 0.1$ Hz, 1H, H-3b^S), 1.24 (d, $J_{5,6} = 5.7$ Hz, 3H, H-6^F),

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O mit [D₄]-Methanol als internem Standard): $\delta = 175.8$, 175.7, 175.4 (C=O), 104.4 (C-1^G β , $^1J_{C-1,H-1} = 163.6$ Hz), 101.8 (C-1² β , $^1J_{C-1,H-1} = 164.1$ Hz), 101.3 (C-1³ β , $^1J_{C-1,H-1} = 159.5$ Hz), 101.0 (C-2^S α), 100.5 (C-1⁴ α , $^1J_{C-1,H-1} = 171.2$ Hz), 100.5 (C-1⁵ β , $^1J_{C-1,H-1} = 156.0$ Hz), 100.1 (C-1⁵ β , $^1J_{C-1,H-1} = 162.0$ Hz), 100.1 (C-1^F α , $^1J_{C-1,H-1} = 171.2$ Hz), 97.8 (C-1⁴ α , $^1J_{C-1,H-1} = 171.7$ Hz), 89.5 (C-1¹ β , $^1J_{C-1,H-1} = 163.6$ Hz), 81.5 (C-4⁵), 81.2 (C-3³), 80.6 (C-4²), 78.8 (C-4¹), 77.3 (C-2⁴), 77.0 (C-2⁴), 76.6 (C-5⁵), 76.2 (C-5¹), 75.3 (C-5³), 75.2 (C-5²), 75.1 (C-5⁵), 74.5 (C-5⁴), 74.4 (C-5^G), 74.1 (C-3⁵), 73.6 (C-5⁴), 73.4 (C-6^S), 73.2 (C-3^G), 73.0

(C-3¹), 72.9 (C-3⁵), 72.9 (C-3²), 72.7 (C-4^F), 72.5 (C-7^S), 71.6 (C-2^G), 71.0 (C-2³), 70.7 (C-4⁵), 70.3 (C-3⁴), 70.3 (C-3⁴), 70.2 (C-3^F), 69.2 (C-4^G), 69.2 (C-8^S), 69.0 (C-4^S), 68.9 (C-2^F), 68.1 (C-4⁴), 68.1 (C-4⁴), 67.7 (C-5^F), 67.1 (C-6³), 66.6 (C-4³), 64.2 (C-6^G), 63.5 (C-9^S), 62.6 (C-6⁴), 62.5 (C-6⁴), 61.4 (C-6⁵), 61.4 (C-6⁵), 61.0 (C-6²), 60.8 (C-6¹), 56.1 (C-2⁵), 55.7 (C-2⁵), 55.4 (C-2²), 55.3 (C-2¹), 52.7 (C-5^S), 40.9 (C-3^S), 23.2, 23.1, 22.9, 22.8 (NAc), 16.2 (C-6^F).

49: Ausbeute: 4.40 mg (2.27 μ mol, 45.0 %),

C₇₃H₁₂₀N₈O₅₂ (1940.70),

$[\alpha]_D^{20} = -13.4$ (0.25, Wasser);

HR-MS (100 % Wasser): $M_{\text{ber}} = 1941.7064$ (M+H)⁺, $M_{\text{gef}} = 1941.6981$ (M+H)⁺;

¹H-NMR (500 MHz, D₂O mit [D₄]-Methanol als internem Standard): $\delta = 5.13$ (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1⁴), 4.92 (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1⁴), 4.90 (d, $J_{1,2} = 3.9$ Hz, 1H, H-1^F), 4.77 (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1³), 4.75 (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1¹), 4.69 (d, $J_{1,2} = 7.9$ Hz, 1H, H-1²), 4.61 (d, $J_{1,2} = 8.0$ Hz, 1H, H-1⁵), 4.55 (d, $J_{1,2} = 8.8$ Hz, 1H, H-1⁵), 4.45 (d, $J_{1,2} = 8.8$ Hz, 1H, H-1^G), 4.26 (dd, $J_{2,3} = J_{3,4} < 0.1$ Hz, 1H, H-3³), 4.19 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1$ Hz, 1H, H-2⁴), 4.14 (dd, $J_{4,5} < 0.1$ Hz, $J_{5,6} = 7.2$ Hz, 1H, H-5^F), 4.11 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1$ Hz, 1H, H-2⁴), 4.03-3.84 (m, 14H, H-6a^G, H-6a², H-6a³, H-6a⁵, H-6a⁴, H-4^G, H-3⁴, H-6a⁵, H-6a⁴, H-3^F, H-7^S, H-6a¹, H-9a^S, H-3⁴), 3.84-3.67 (m, 23H, H-5^S, H-2^F, H-4^F, H-5⁴, H-5¹, H-4¹, H-2², H-6b², H-6b⁵, H-4³, H-3², H-3³, H-2¹, H-6b¹, H-6b⁵, H-3⁵, H-5^G, H-2⁵, H-2⁵, H-6b³, H-3¹, H-3^G, H-4²), 3.67-3.58 (m, 11H, H-6b⁴, H-9b^S, H-4^S, H-6^S, H-5³, H-4⁵, H-6b⁴, H-5⁴, H-5², H-8^S, H-5⁵), 3.58-3.40 (m, 7H, H-6b^G, H-4⁴, H-2^G, H-3⁵, H-4⁴, H-4⁵, H-5⁵), 2.67 (dd, $J_{3,3} = 12.8$ Hz, $J_{3,4} = 5.6$ Hz, 1H, H-3a^S), 2.11-2.00 (m, 15H, Ac), 1.72 (dd, $J_{3,3} = 12.8$ Hz, $J_{3,4} < 0.1$ Hz, 1H, H-3b^S), 1.23 (d, $J_{5,6} = 6.4$ Hz, 3H, H-6^F),

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O mit [D₄]-Methanol als internem Standard): $\delta = 175.7$, 175.6, 175.5 (C=O), 104.4 (C-1^G β , $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 164.1$ Hz), 101.9 (C-1² β , $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 165.4$ Hz), 101.4 (C-1³ β , $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 161.9$ Hz), 101.0 (C-2^S α), 100.4 (C-1⁴ α , $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 171.1$ Hz), 100.4 (C-1⁵ β , $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 161.1$ Hz), 100.1 (C-1⁵ β , $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 160.2$ Hz), 100.1 (C-1^F α , $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 170.2$ Hz), 97.9 (C-1⁴ α , $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 172.0$ Hz), 89.6 (C-1¹ β , $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 162.8$ Hz), 81.7 (C-4⁵), 81.3 (C-3³), 80.6 (C-4²), 78.9 (C-4¹), 77.2 (C-2⁴), 77.2 (C-2⁴), 76.7 (C-5⁵), 76.3 (C-5¹), 75.3 (C-5³), 75.2 (C-5²),

75.1 (C-5⁵), 74.6 (C-5⁴), 74.4 (C-5^G), 74.3 (C-3⁵), 73.7 (C-5⁴), 73.4 (C-6^S), 73.3 (C-3^G), 73.0 (C-3¹), 72.9 (C-3⁵), 72.9 (C-3²), 72.7 (C-4^F), 72.6 (C-7^S), 71.6 (C-2^G), 71.1 (C-2³), 70.7 (C-4⁵), 70.3 (C-3⁴), 70.3 (C-3⁴), 70.3 (C-3^F), 69.3 (C-4^G), 69.2 (C-8^S), 69.1 (C-4^S), 69.0 (C-2^F), 68.0 (C-4⁴), 68.1 (C-4⁴), 67.8 (C-5^F), 67.1 (C-6³), 66.6 (C-4³), 64.2 (C-6^G), 63.5 (C-9^S), 62.6 (C-6⁴), 62.5 (C-6⁴), 61.4 (C-6⁵), 61.4 (C-6⁵), 61.1 (C-6²), 60.8 (C-6¹), 56.2 (C-2⁵), 55.8 (C-2⁵), 55.5 (C-2²), 55.3 (C-2¹), 52.7 (C-5^S), 40.9 (C-3^S), 23.3, 23.2, 23.0, 22.9 (NAc), 16.2 (C-6^F).

O-(5-Acetamido-3,5-didesoxy-*D*-glycero- α -*D*-galacto-non-2-ulopyranosylsäure)-(2 \rightarrow 3)-*O*-(β -*D*-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -*D*-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-[*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -*D*-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(β -*D*-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[*O*-(α -*L*-fucosyl)-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-azid **51**

α -Neu5Ac-2,3- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,3-[β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,6]- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4-[α -Fuc-1,6]- β -GlcNAc-N₃

O-(2-Acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -*D*-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-[*O*-(5-acetamido-3,5-didesoxy-*D*-glycero- α -*D*-galacto-non-2-ulopyranosylsäure)-(2 \rightarrow 3)-*O*-(β -*D*-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -*D*-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(β -*D*-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[*O*-(α -*L*-fucosyl)-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-azid **50**

β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,3-[α -Neu5Ac-2,3- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,6]- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4-[α -Fuc-1,6]- β -GlcNAc-N₃

9.36 mg (4.5 μ mol, 1 eq) Mischung der Decasaccharide **46** und **47** (ca. 1:1) und 1.40 mg (5 U/mg) *Aspergillus oryzae* β -Galactosidase werden in 450.0 μ L Puffer (100 mM Natriumphosphat, pH 6) gelöst. Die Reaktion wird bei 30 °C inkubiert. Nach 12 h wird die Reaktion durch Erhitzen (5 min, 95 °C) beendet, die Proteinbestandteile werden abzentrifugiert

und die Produkte durch HPLC (Hydrosphere C18, 10x150 mm, 10 % iso für 10 CV, Acetonitril/Wasser +0.1 % Ameisensäure, Flussrate: 2 mL/min) gereinigt. Die Produktlösung wird mit 1 M Natriumcarbonat-Lösung neutralisiert (pH 8-9) und anschließend lyophilisiert. Das Salz wird durch Gelpermeationschromatographie (Sephadex G25, 25x155 mm, 5 % Ethanol in Wasser, Flussrate: 2 mL/min) abgetrennt.

50: Ausbeute: 2.82 mg (1.45 μ mol, 32.2 %),

$C_{73}H_{120}N_8O_{52}$ (1940.70),

$[\alpha]_D^{20} = -25.7$ (0.2, Wasser);

HR-MS (100 % Wasser): $M_{ber} = 1941.7064$ (M+H)⁺, $M_{gef} = 1941.7034$ (M+H)⁺;

¹H-NMR (500 MHz, D₂O mit [D₄]-Methanol als internem Standard): $\delta = 5.10$ (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1⁴), 4.92 (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1^{4'}), 4.91 (d, $J_{1,2} = 3.5$ Hz, 1H, H-1^F), 4.77 (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1³), 4.75 (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1¹), 4.68 (d, $J_{1,2} = 7.9$ Hz, 1H, H-1²), 4.59-4.53 (m, 3H, H-1⁵, H-1^{5'}, H-1^G), 4.25 (dd, $J_{2,3} = J_{3,4} < 0.1$ Hz, 1H, H-3³), 4.17-4.09 (m, 3H, H-5^F, H-2⁴, H-3^G), 4.06 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1$ Hz, 1H, H-2⁴), 4.02-3.84 (m, 16H, H-6a^G, H-6a², H-6a³, H-6a⁵, H-6a⁴, H-4^G, H-3⁴, H-6a^{5'}, H-6a^{4'}, H-3^F, H-7^S, H-6a¹, H-9a^S, H-6b², H-3^{4'}, H-5^S), 3.84-3.67 (m, 24H, H-2^F, H-4^F, H-5⁴, H-5¹, H-4¹, H-2², H-6b⁵, H-6b⁴, H-6b^{4'}, H-4³, H-3², H-3³, H-2¹, H-6b¹, H-6b^{5'}, H-3⁵, H-5^G, H-2⁵, H-2^{5'}, H-4^S, H-6b³, H-3¹, H-4², H-4⁵), 3.67-3.45 (m, 14H, H-9b^S, H-6^S, H-5³, H-5^{4'}, H-5², H-8^S, H-5⁵, H-6b^G, H-4⁴, H-2^G, H-3^{5'}, H-4^{4'}, H-4^{5'}, H-5^{5'}), 2.76 (dd, $J_{3,3} = 12.3$ Hz, $J_{3,4} = 4.4$ Hz, 1H, H-3a^S), 2.11-2.00 (m, 15H, Ac), 1.80 (dd, $J_{3,3} = 12.3$ Hz, $J_{3,4} < 0.1$ Hz, 1H, H-3b^S), 1.24 (d, $J_{5,6} = 6.1$ Hz, 3H, H-6^F),

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O mit [D₄]-Methanol als internem Standard): $\delta = 175.9, 175.6, 175.5, 174.7$ (C=O), 103.5 (C-1^G β , $^1J_{C-1, H-1} = 161.9$ Hz), 103.4 (C-1⁴ α , $^1J_{C-1, H-1} = 171.8$ Hz), 101.9 (C-1² β , $^1J_{C-1, H-1} = 163.8$ Hz), 101.3 (C-1³ β , $^1J_{C-1, H-1} = 161.9$ Hz), 100.7 (C-2^S α), 100.3 (C-1⁵ β , $^1J_{C-1, H-1} = 161.9$ Hz), 100.3 (C-1⁵ β , $^1J_{C-1, H-1} = 161.9$ Hz), 100.1 (C-1^F α , $^1J_{C-1, H-1} = 172.2$ Hz), 97.9 (C-1⁴ α , $^1J_{C-1, H-1} = 170.8$ Hz), 89.6 (C-1¹ β , $^1J_{C-1, H-1} = 163.8$ Hz), 81.4 (C-3³), 80.4 (C-4²), 79.1 (C-4⁵), 79.1 (C-4^{5'}), 78.8 (C-4¹), 77.1 (C-2⁴), 76.3 (C-3^G), 76.3 (C-5^G), 76.0 (C-5¹), 75.5 (C-5⁵), 75.5 (C-5^{5'}), 75.3 (C-5³), 75.2 (C-5²), 74.3 (C-5⁴), 73.7 (C-5^{4'}), 73.7 (C-6^S), 73.0 (C-3¹), 72.9 (C-3⁵), 72.9 (C-3^{5'}), 72.7 (C-3²), 72.7 (C-4^F), 72.6 (C-7^S), 71.2

(C-3⁴), 71.0 (C-2³), 70.9 (C-2⁴), 70.3 (C-2^G), 70.3 (C-3⁴), 70.2 (C-3^F), 69.1 (C-4^S), 69.0 (C-8^S), 69.0 (C-2^F), 68.3 (C-4^G), 68.2 (C-4⁴), 67.8 (C-4⁴), 67.7 (C-5^F), 67.1 (C-6³), 66.4 (C-4³), 63.4 (C-9^S), 62.0 (C-6⁴), 61.9 (C-6⁴), 60.8 (C-6^G), 60.8 (C-6⁵), 60.8 (C-6⁵), 60.8 (C-6²), 60.8 (C-6¹), 55.8 (C-2⁵), 55.8 (C-2⁵), 55.7 (C-2²), 55.3 (C-2¹), 52.5 (C-5^S), 40.5 (C-3^S), 23.2, 23.0, 22.9 (NAc), 16.2 (C-6^F).

51: Ausbeute: 4.18 mg (2.15 μ mol, 47.8 %),

C₇₃H₁₂₀N₈O₅₂ (1940.70),

$[\alpha]_D^{20} = -16.3$ (0.1, Wasser);

HR-MS (100 % Wasser): $M_{\text{ber}} = 1941.7064$ (M+H)⁺, $M_{\text{gef}} = 1941.7074$ (M+H)⁺;

¹H-NMR (500 MHz, D₂O mit [D₄]-Methanol als internem Standard): $\delta = 5.12$ (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1⁴), 4.92 (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1⁴), 4.90 (d, $J_{1,2} = 3.7$ Hz, 1H, H-1^F), 4.79-4.73 (m, 2H, H-1³, H-1¹), 4.69 (d, $J_{1,2} = 8.3$ Hz, 1H, H-1²), 4.59-4.52 (m, 3H, H-1⁵, H-1⁵, H-1^G), 4.25 (dd, $J_{2,3} = J_{3,4} < 0.1$ Hz, 1H, H-3³), 4.19 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1$ Hz, 1H, H-2⁴), 4.17-4.09 (m, 3H, H-5^F, H-2⁴, H-3^G), 4.03-3.84 (m, 15H, H-6a^G, H-6a², H-6a³, H-6a⁵, H-6a⁴, H-4^G, H-3⁴, H-6a⁵, H-6a⁴, H-3^F, H-7^S, H-6a¹, H-9a^S, H-3⁴, H-5^S), 3.84-3.67 (m, 25H, H-2^F, H-4^F, H-5⁴, H-5¹, H-4¹, H-2², H-6b², H-6b⁵, H-4³, H-3², H-3³, H-2¹, H-6b¹, H-6b⁵, H-3⁵, H-3⁵, H-5^G, H-2⁵, H-2⁵, H-4^S, H-6b³, H-3¹, H-4², H-4⁵, H-4⁵), 3.67-3.46 (m, 14H, H-6b⁴, H-9b^S, H-6^S, H-5³, H-6b⁴, H-5⁴, H-5², H-8^S, H-5⁵, H-6b^G, H-4⁴, H-2^G, H-4⁴, H-5⁵), 2.75 (dd, $J_{3,3} = 11.9$ Hz, $J_{3,4} = 3.6$ Hz, 1H, H-3a^S), 2.11-2.00 (m, 15H, Ac), 1.80 (dd, $J_{3,3} = 12.8$ Hz, $J_{3,4} < 0.1$ Hz, 1H, H-3b^S), 1.23 (d, $J_{5,6} = 6.4$ Hz, 3H, H-6^F),

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O mit [D₄]-Methanol als internem Standard): $\delta = 175.9$, 175.7, 175.6, 174.7 (C=O), 103.4 (C-1^G β , $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 160.8$ Hz), 101.9 (C-1² β , $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 165.4$ Hz), 101.3 (C-1³ β , $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 162.1$ Hz), 100.7 (C-2^S α), 100.5 (C-1^F α , $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 170.9$ Hz), 100.4 (C-1⁴ α , $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 171.7$ Hz), 100.4 (C-1⁵ β , $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 165.0$ Hz), 100.4 (C-1⁵ β , $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 165.0$ Hz), 100.2 (C-1⁴ α , $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 170.9$ Hz), 89.6 (C-1¹ β , $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 165.0$ Hz), 81.3 (C-3³), 80.6 (C-4²), 79.1 (C-4⁵), 79.1 (C-4⁵), 78.9 (C-4¹), 77.3 (C-2⁴), 76.4 (C-2⁴), 76.3 (C-3^G), 76.1 (C-5¹), 76.1 (C-5^G), 75.6 (C-5⁵), 75.3 (C-5⁵), 75.3 (C-5³), 75.1 (C-5²), 74.5 (C-5⁴), 73.7 (C-5⁴), 73.6 (C-6^S), 73.0 (C-3¹), 72.9 (C-3⁵), 72.8 (C-3⁵), 72.7 (C-3²), 72.7 (C-4^F), 72.6 (C-7^S),

71.3 (C-3⁴), 71.1 (C-2³), 70.8 (C-3⁴), 70.3 (C-3^F), 70.3 (C-2^G), 69.2 (C-4^S), 69.0 (C-8^S), 69.0 (C-2^F), 68.3 (C-4^G), 68.1 (C-4⁴), 67.8 (C-5^F), 67.6 (C-4⁴), 67.1 (C-6³), 66.8 (C-4³), 63.5 (C-9^S), 62.6 (C-6⁴), 62.6 (C-6⁴), 61.9 (C-6⁵), 61.8 (C-6⁵), 60.8 (C-6^G), 60.8 (C-6²), 60.8 (C-6¹), 55.7 (C-2⁵), 55.7 (C-2⁵), 55.3 (C-2²), 55.3 (C-2¹), 52.6 (C-5^S), 40.5 (C-3^S), 23.2, 23.0 (NAc), 16.3 (C-6^F).

9.12. Versuche zu Kapitel 5.3.

O-(β-D-Galactopyranosyl)-(1→4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-*O*-(α-D-mannopyranosyl)-(1→3)-[*O*-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-*O*-(α-D-mannopyranosyl)-(1→6)]-*O*-(β-D-mannopyranosyl)-(1→4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-[*O*-(α-L-fucosyl)-(1→6)]-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-azid **53**

β-Gal-1,4-β-GlcNAc-1,2-α-Man-1,3-[β-GlcNAc-1,2-α-Man-1,6]-β-Man-1,4-β-GlcNAc-1,4-[α-Fuc-1,6]-β-GlcNAc-N₃

3.00 mg (1.6 μmol, 1 eq) Decasaccharid **51** werden in 155.0 μL Puffer (100 mM Natriumphosphat, pH 5) gelöst. Es werden 4.0 μL *Clostridium perfringens* Neuraminidase (25 U/mL) zugegeben. Die Reaktion wird bei 30 °C inkubiert. Nach 24 h wird die Reaktion durch Erhitzen (5 min, 95 °C) beendet, die Proteinbestandteile werden abzentrifugiert und die Produkte durch HPLC (Hydrosphere C18, 10x150 mm, 5→10 % in 10 CV, Acetonitril/Wasser +0.1 % Ameisensäure, Flussrate: 2 mL/min) gereinigt.

Ausbeute: 2.21 mg (1.34 μmol, 86.5 %),

C₆₂H₁₀₃N₇O₄₄ (1649.60),

[α]_D²⁰ = -29.5 (0.21, Wasser);

HR-MS (100 % Wasser): M_{ber} = 1650.6110 (M+H)⁺, M_{gef} = 1650.6100 (M+H)⁺;

¹H-NMR (500 MHz, D₂O mit [D₄]-Methanol als internem Standard): δ = 5.12 (d, J_{1,2} < 0.1 Hz, 1H, H-1⁴), 4.92 (d, J_{1,2} < 0.1 Hz, 1H, H-1⁴), 4.90 (d, J_{1,2} = 3.4 Hz, 1H, H-1^F), 4.77 (d,

$J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1³), 4.75 (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1¹), 4.67 (d, $J_{1,2} = 8.1$ Hz, 1H, H-1²), 4.58 (d, $J_{1,2} = 8.1$ Hz, 1H, H-1⁵), 4.55 (d, $J_{1,2} = 8.6$ Hz, 1H, H-1^{5'}), 4.47 (d, $J_{1,2} = 7.6$ Hz, 1H, H-1^G), 4.25 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1$ Hz, 1H, H-2³), 4.19 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1$ Hz, 1H, H-2⁴), 4.14 (dd, $J_{4,5} < 0.1$ Hz, $J_{5,6} = 7.0$ Hz, 1H, H-5^F), 4.11 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1$ Hz, 1H, H-2^{4'}), 4.01-3.87 (m, 11H, H-6a⁵, H-6a^{5'}, H-6a¹, H-6a⁴, H-6a³, H-4^G, H-3⁴, H-6a², H-6a^{4'}, H-3^F, H-3^{4'}), 3.87-3.67 (m, 25H, H-6b¹, H-5¹, H-4¹, H-2², H-6b², H-2^F, H-4^F, H-2¹, H-6b⁵, H-6a^G, H-6b^G, H-4³, H-3², H-3³, H-2⁵, H-2^{5'}, H-6b^{5'}, H-6b³, H-3⁵, H-3¹, H-3^G, H-5⁴, H-5^G, H-4⁵, H-4²), 3.67-3.39 (m, 12H, H-6b⁴, H-5^{4'}, H-5³, H-6b^{4'}, H-5², H-5⁵, H-4⁴, H-2^G, H-3^{5'}, H-4^{4'}, H-4^{5'}, H-5^{5'}), 2.13-2.03 (m, 12H, Ac), 1.23 (d, $J_{5,6} = 7.2$ Hz, 3H, H-6^F),

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O mit [D₄]-Methanol als internem Standard): $\delta = 175.7, 175.6$ (C=O), 103.9 (C-1^G β , $^1J_{C-1, H-1} = 161.0$ Hz), 102.0 (C-1² β , $^1J_{C-1, H-1} = 162.8$ Hz), 101.4 (C-1³ β , $^1J_{C-1, H-1} = 160.1$ Hz), 100.5 (C-1⁴ α , $^1J_{C-1, H-1} = 171.8$ Hz), 100.4 (C-1⁵ β , $^1J_{C-1, H-1} = 161.0$ Hz), 100.4 (C-1^{5'} β , $^1J_{C-1, H-1} = 161.0$ Hz), 100.2 (C-1^F α , $^1J_{C-1, H-1} = 170.3$ Hz), 97.9 (C-1^{4'} α , $^1J_{C-1, H-1} = 171.2$ Hz), 89.6 (C-1¹ β , $^1J_{C-1, H-1} = 161.9$ Hz), 81.4 (C-3³), 80.6 (C-4²), 79.4 (C-4⁵), 78.9 (C-4¹), 77.3 (C-2⁴), 77.2 (C-2^{4'}), 76.7 (C-5^{5'}), 76.3 (C-5¹), 76.3 (C-5^G), 75.7 (C-5⁵), 75.3 (C-5²), 75.2 (C-5³), 74.5 (C-5⁴), 74.3 (C-3^{5'}), 73.8 (C-5^{4'}), 73.5 (C-3^G), 73.1 (C-3¹), 72.9 (C-3⁵), 72.9 (C-3²), 72.8 (C-4^F), 71.9 (C-2^G), 71.1 (C-2³), 70.8 (C-4^{5'}), 70.4 (C-3⁴), 70.4 (C-3^{4'}), 70.3 (C-3^F), 69.5 (C-4^G), 69.1 (C-2^F), 68.3 (C-4⁴), 68.3 (C-4^{4'}), 67.9 (C-5^F), 67.2 (C-6³), 66.6 (C-4³), 62.6 (C-6⁴), 62.5 (C-6^{4'}), 62.0 (C-6^G), 61.5 (C-6¹), 61.5 (C-6²), 60.9 (C-6⁵), 60.9 (C-6^{5'}), 56.3 (C-2^{5'}), 55.8 (C-2²), 55.8 (C-2¹), 55.4 (C-2⁵), 23.2, 23.0 (NAc), 16.3 (C-6^F).

O-(2-Acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-[*O*-(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[*O*-(α -L-fucosyl)-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-azid **52**

β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,3-[β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,6]- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4-[α -Fuc-1,6]- β -GlcNAc-N₃

1.38 mg (1.7 μmol , 1 eq) Decasaccharid **50** werden in 71.0 μL Puffer (100 mM Natriumphosphat, pH 5) gelöst. Es werden 2.0 μL *Clostridium perfringens* Neuraminidase (25 U/mL) zugegeben. Die Reaktion wird bei 30 °C inkubiert. Nach 24 h wird die Reaktion durch Erhitzen (5 min, 95 °C) beendet, die Proteinbestandteile werden abzentrifugiert und die Produkte durch HPLC (Hydrosphere C18, 10x150 mm, 5→10 % in 10 CV, Acetonitril/Wasser +0.1 % Ameisensäure, Flussrate: 2 mL/min) gereinigt.

Ausbeute: 1.03 mg (0.62 μmol , 87.3 %),

$\text{C}_{62}\text{H}_{103}\text{N}_7\text{O}_{44}$ (1649.60),

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -25.2$ (0.13, Wasser);

HR-MS (100 % Wasser): $M_{\text{ber}} = 1650.6110$ (M+H)⁺, $M_{\text{gef}} = 1650.6119$ (M+H)⁺;

¹H-NMR (500 MHz, D₂O mit [D₄]-Methanol als internem Standard): $\delta = 5.11$ (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1⁴), 4.93 (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1⁴), 4.91 (d, $J_{1,2} = 4.5$ Hz, 1H, H-1^F), 4.77 (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1³), 4.75 (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1¹), 4.69 (d, $J_{1,2} = 8.5$ Hz, 1H, H-1²), 4.58 (d, $J_{1,2} = 8.5$ Hz, 1H, H-1⁵), 4.55 (d, $J_{1,2} = 8.5$ Hz, 1H, H-1⁵), 4.47 (d, $J_{1,2} = 7.8$ Hz, 1H, H-1^G), 4.25 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1$ Hz, 1H, H-2³), 4.19 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1$ Hz, 1H, H-2⁴), 4.14 (dd, $J_{4,5} < 0.1$ Hz, $J_{5,6} = 6.5$ Hz, 1H, H-5^F), 4.11 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1$ Hz, 1H, H-2⁴), 4.00-3.87 (m, 10H, H-6a⁵, H-6a⁵, H-6a¹, H-6a⁴, H-6a³, H-4^G, H-3⁴, H-6a², H-6a⁴, H-3^F), 3.87-3.65 (m, 26H, H-6b¹, H-3⁴, H-5¹, H-4¹, H-2², H-6b², H-2^F, H-4^F, H-2¹, H-6b⁵, H-6a^G, H-6b^G, H-4³, H-3², H-3³, H-2⁵, H-2⁵, H-6b⁵, H-6b³, H-3⁵, H-3¹, H-3^G, H-5⁴, H-5^G, H-4⁵, H-4²), 3.65-3.40 (m, 12H, H-6b⁴, H-5⁴, H-5³, H-6b⁴, H-5², H-5⁵, H-4⁴, H-2^G, H-3⁵, H-4⁴, H-4⁵, H-5⁵), 2.13-2.00 (m, 12H, Ac), 1.24 (d, $J_{5,6} = 6.5$ Hz, 3H, H-6^F),

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O mit [D₄]-Methanol als internem Standard): $\delta = 175.5$, 175.4 (C=O), 103.7 (C-1^G β , $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 162.7$ Hz), 101.8 (C-1² β , $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 167.9$ Hz), 101.3 (C-1³ β , $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 161.6$ Hz), 100.4 (C-1⁴ α , $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 173.3$ Hz), 100.4 (C-1⁵ β , $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 169.0$ Hz), 100.2 (C-1⁵ β , $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 168.5$ Hz), 100.0 (C-1^F α , $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 171.2$ Hz), 97.8 (C-1⁴ α , $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 171.7$ Hz), 89.4 (C-1¹ β , $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 165.3$ Hz), 81.2 (C-3³), 80.3 (C-4²), 79.2 (C-4⁵), 78.7 (C-4¹), 77.2 (C-2⁴), 77.0 (C-2⁴), 76.6 (C-5⁵), 76.1 (C-5¹), 76.1 (C-5^G), 75.5 (C-5⁵), 75.1 (C-5²), 75.1 (C-5³), 74.3 (C-5⁴), 74.0 (C-3⁵), 73.6 (C-5⁴), 73.2 (C-3^G), 72.0 (C-3¹), 72.8 (C-3⁵), 72.8

(C-3²), 72.8 (C-4^F), 71.7 (C-2^{Gⁱ}), 70.9 (C-2³), 70.7 (C-4⁵), 70.2 (C-3⁴), 70.2 (C-3^{4ⁱ}), 70.1 (C-3^F), 69.3 (C-4^{Gⁱ}), 68.9 (C-2^F), 68.1 (C-4⁴), 68.1 (C-4^{4ⁱ}), 67.7 (C-5^F), 67.2 (C-6³), 67.6 (C-4³), 62.4 (C-6⁴), 62.4 (C-6^{4ⁱ}), 61.7 (C-6^{Gⁱ}), 61.4 (C-6¹), 61.4 (C-6²), 60.7 (C-6^{5ⁱ}), 60.7 (C-6⁵), 56.1 (C-2⁵), 55.7 (C-2²), 55.6 (C-2¹), 55.3 (C-2^{5ⁱ}), 23.1, 22.8 (NAc), 16.1 (C-6^F).

9.13. Versuche zu Kapitel 6.1.

O-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-[*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)]-[*O*-(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-azid **60**

β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,3-[β -GlcNAc-1,4]-[β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,6]- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4- β -GlcNAc-N₃

0.2 mg (0.13 μ mol, 1 eq) Octasaccharid-Mischung (**26:27**, 1:1) und 0.13 mg (0.20 μ mol, 1.5 eq) UDP-GlcNAc werden in 2.3 μ L Puffer (HEPES 20 mM, NaCl 200 mM, pH 6.5) gelöst. Es werden 0.2 μ L Mangan(II)-chlorid (100 mM), 0.2 μ L alkalische Phosphatase (1 U/ μ L), 1.2 μ L Natriumazid (100 mM), 0.8 μ L BSA (20 mg/mL) und 2.5 μ L *Homo sapiens* GnT III zugegeben. Die Reaktion wird bei 30 °C inkubiert.

O-(2-Acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-[*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)]-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-[*O*-(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-azid **61**

β -GlcNAc-1,2-[β -GlcNAc-1,4]- α -Man-1,3-[β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,6]- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4- β -GlcNAc-N₃

2.5 mg (1.66 μmol , 1 eq) Octasaccharid-Mischung (**26:27**, 1:1) und 1.62 mg (2.49 μmol , 1.5 eq) UDP-GlcNAc werden in 171.3 μL Puffer (HEPES 20 mM, NaCl 1 M, pH 7) gelöst. Es werden 2.1 μL Mangan(II)-chlorid (100 mM), 2.1 μL alkalische Phosphatase (1 U/ μL), 0.4 μL Natriumazid (100 mM), 10.4 μL BSA (20 mg/mL) und 21.8 μL *Bos taurus* GnT IVa (1.05 mg/mL) zugegeben. Die Reaktion wird bei 30 °C inkubiert. Nach 5 d wird die Reaktion durch Erhitzen (5 min, 95 °C) beendet, die Proteinbestandteile werden abzentrifugiert und die Produkte durch HPLC (Hypercarb, 4.6x150 mm, 10→20 % in 24 CV, Acetonitril/Wasser +0.1 % Ameisensäure, Flussrate: 1 mL/min) gereinigt.

27: Ausbeute: 1.00 mg (0.67 μmol , 80.7 %),

61: Ausbeute: 0.56 mg (0.33 μmol , 40.0 %),

$\text{C}_{64}\text{H}_{106}\text{N}_8\text{O}_{45}$ (1707.6);

HR-MS (100 % Wasser): $M_{\text{ber}} = 1707.6325$ (M+H)⁺, $M_{\text{gef}} = 1707.6220$ (M+H)⁺;

O-(β -D-Galactopyranosyl)-(1→4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1→2)-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1→3)-{*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1→2)-[*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1→6)]-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1→6)}-*O*-(β -D-mannopyranosyl)-(1→4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1→4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-azid **62**

β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,3-{ β -GlcNAc-1,2-[β -GlcNAc-1,6]- α -Man-1,6}- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4- β -GlcNAc-N₃

2.5 mg (1.66 μmol , 1 eq) Octasaccharid-Mischung (**26:27**, 1:1) und 1.62 mg (2.49 μmol , 1.5 eq) UDP-GlcNAc werden in 168.1 μL Puffer (MES 50 mM, NaCl 200 mM, pH 6.5) gelöst. Es werden 2.1 μL Mangan(II)-chlorid (100 mM), 2.1 μL alkalische Phosphatase (1 U/ μL), 0.4 μL Natriumazid (100 mM), 10.4 μL BSA (20 mg/mL) und 25.0 μL *Mus musculus* GnT V zugegeben. Die Reaktion wird bei 30 °C inkubiert. Nach 5 d wird die Reaktion durch Erhitzen (5 min, 95 °C) beendet, die Proteinbestandteile werden abzentrifugiert und die Produkte durch HPLC (Hypercarb, 4.6x150 mm, 10→20 % in 24 CV, Acetonitril/Wasser +0.1 % Ameisensäure, Flussrate: 1 mL/min) gereinigt.

26: Ausbeute: 0.40 mg (0.27 μ mol, 32.5 %),

62: Ausbeute: 1.00 mg (0.59 μ mol, 71.1 %),

$C_{64}H_{106}N_8O_{45}$ (1707.6);

HR-MS (100 % Wasser): $M_{ber} = 1707.6325 (M+H)^+$, $M_{gef} = 1707.6270 (M+H)^+$;

O-(2-Acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-[*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)]-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-[*O*-(5-Acetamido-3,5-didesoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosylsäure)-(2 \rightarrow 3)-*O*-(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-azid **65**

β -GlcNAc-1,2-[β -GlcNAc-1,4]- α -Man-1,3-[α -Neu5Ac-2,3- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,6]- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4- β -GlcNAc-N₃

1.68 mg (0.94 μ mol, 1 eq) Nonasaccharid **42** und 0.85 mg (1.40 μ mol, 1.5 eq) UDP-GlcNAc werden in 95.8 μ L Puffer (HEPES 20 mM, NaCl 1 M, pH 7) gelöst. Es werden 1.2 μ L Mangan(II)-chlorid (100 mM), 1.2 μ L alkalische Phosphatase (1 U/ μ L), 1.2 μ L Natriumazid (100 mM), 5.9 μ L BSA (20 mg/ml) und 6.2 μ L *Bos taurus* GnT IVa (1.05 mg/mL) zugegeben. Die Reaktion wird bei 30 °C inkubiert. Nach 6 d wird die Reaktion durch Erhitzen (5 min, 95 °C) beendet, die Proteinbestandteile werden abzentrifugiert und die Produkte durch HPLC (Hydrosphere C18, 2.1x50 mm, 0 \rightarrow 50 % in 10 CV, Acetonitril/Wasser +0.1 % Ameisensäure, Flussrate: 0.2 mL/min), dann (Hypercarb, 4.6x150 mm, 12 \rightarrow 17 % in 24 CV, Acetonitril/Wasser +0.1 % Ameisensäure, Flussrate: 1 mL/min) gereinigt. Die Produktlösung wird mit 1 M Natriumcarbonat-Lösung neutralisiert (pH 8-9) und anschließend lyophilisiert. Das Salz wird durch Gelpermeationschromatographie (Sephadex G25, 15x200 mm, 5 % Ethanol in Wasser, Flussrate: 1 mL/min) abgetrennt.

Ausbeute: 1.17 mg (0.59 μ mol, 62.8 %),

$C_{75}H_{123}N_9O_{53}$ (1997.7),

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +13.0$ (0.15, Wasser);

HR-MS (100 % Wasser): $M_{\text{ber}} = 1998.7279$ (M+H)⁺, $M_{\text{gef}} = 1998.7234$ (M+H)⁺;

¹H-NMR (500 MHz, D₂O mit [D₄]-Methanol als internem Standard): $\delta = 5.11$ (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1⁴), 4.92 (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1^{4'}), 4.77-4.73 (m, 2H, H-1³, H-1¹), 4.62-4.50 (m, 5H, H-1², H-1^{5'}, H-1⁵, H-1⁶, H-1^{G'}), 4.21 (dd, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 2H, H-2³, H-2⁴), 4.13 (dd, $J_{2,3} < 0.1$ Hz, $J_{3,4} = 3.2$ Hz, 1H, H-3^{G'}), 4.11 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1$ Hz, 1H, H-2^{4'}), 4.07-3.84 (m, 14H, H-6a^{5'}, H-3⁴, H-6a⁵, H-6a⁶, H-6a³, H-4^{G'}, H-6a², H-6a⁴, H-6a^{4'}, H-6a¹, H-9a^{S'}, H-3^{4'}, H-7^{S'}, H-5^{S'}), 3.84-3.65 (m, 21H, H-2², H-6a^{G'}, H-4³, H-6b³, H-6b^{5'}, H-6b⁵, H-3², H-4^{5'}, H-3³, H-2¹, H-2⁶, H-2⁵, H-6b⁶, H-6b⁴, H-3^{5'}, H-4², H-2^{5'}, H-6b², H-4^{S'}, H-5⁴, H-5^{G'}), 3.65-3.53 (m, 17H, H-6b¹, H-9b^{S'}, H-3¹, H-6^{S'}, H-5³, H-4¹, H-6b^{4'}, H-6b^{G'}, H-8^{S'}, H-2^{G'}, H-5^{4'}, H-5², H-5¹, H-4⁴, H-3⁶, H-3⁵, H-5^{5'}), 3.53-3.40 (m, 5H, H-4⁴, H-4⁶, H-5⁶, H-4⁵, H-5⁵), 2.76 (dd, $J_{3,3} = 13.0$ Hz, $J_{3,4} = 4.0$ Hz, 1H, H-3a^{S'}), 2.11-2.00 (m, 18H, Ac), 1.80 (dd, $J_{3,3} = 12.5$ Hz, $J_{3,4} < 0.1$ Hz, 1H, H-3b^{S'}).

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O mit [D₄]-Methanol als internem Standard): $\delta = 175.8, 175.6, 175.5, 175.4, 174.7$ (C=O), 103.4 (C-1^{G'}β, $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 161.6$ Hz), 102.5 (C-1⁶β, $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 163.6$ Hz), 102.1 (C-1²β, $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 165.5$ Hz), 101.1 (C-1³β, $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 162.1$ Hz), 100.6 (C-2^{S'}α), 100.4 (C-1⁵β, $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 161.1$ Hz), 100.3 (C-1^{5'}β, $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 161.1$ Hz), 100.0 (C-1⁴α, $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 173.8$ Hz), 97.9 (C-1^{4'}α, $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 171.8$ Hz), 89.3 (C-1¹β, $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 163.6$ Hz), 81.2 (C-3³), 80.2 (C-4²), 79.4 (C-4¹), 79.1 (C-4⁴), 79.0 (C-4^{5'}), 77.2 (C-5¹), 77.0 (C-2^{4'}), 76.7 (C-2⁴), 76.7 (C-5⁶), 76.6 (C-5⁵), 76.3 (C-3^{G'}), 76.0 (C-5^{G'}), 75.5 (C-5^{5'}), 75.2 (C-5²), 75.2 (C-5³), 74.3 (C-3⁵), 74.0 (C-3⁶), 73.7 (C-5^{4'}), 73.6 (C-6^{S'}), 73.0 (C-3¹), 72.82 (C-5⁴), 72.8 (C-3^{5'}), 72.7 (C-3²), 72.6 (C-7^{S'}), 70.9 (C-2³), 70.7 (C-4⁵), 70.4 (C-4⁶), 70.2 (C-2^{G'}), 70.2 (C-3^{4'}), 69.2 (C-4^{S'}), 68.9 (C-8^{S'}), 68.9 (C-3⁴), 68.2 (C-4^{4'}), 68.1 (C-4^{G'}), 66.6 (C-6³), 66.4 (C-4³), 63.3 (C-9^{S'}), 62.4 (C-6^{4'}), 62.1 (C-6^{G'}), 61.8 (C-6⁴), 61.5 (C-6⁶), 61.4 (C-6⁵), 60.7 (C-6^{5'}), 60.7 (C-6²), 60.7 (C-6¹), 56.4 (C-2⁵), 56.1 (C-2⁶), 55.7 (C-2^{5'}), 55.6 (C-2²), 55.2 (C-2¹), 52.4 (C-5^{S'}), 40.4 (C-6^{S'}), 23.2, 23.1, 23.0, 22.9, 22.8 (NAc).

O-(2-Acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-[*O*-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)]-*O*-(α-D-mannopyranosyl)-(1→3)-[*O*-(5-Acetamido-3,5-didesoxy-D-glycero-α-D-galacto-non-2-ulopyranosylsäure)-(2→6)-*O*-

(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-O-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-O-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-O-(β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-O-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-O-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-azid **63**

β -GlcNAc-1,2-[β -GlcNAc-1,4]- α -Man-1,3-[α -Neu5Ac-2,6- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,6]- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4- β -GlcNAc-N₃

2.0 mg (1.12 μ mol, 1 eq) Nonasaccharid **40** und 1.02 mg (1.68 μ mol, 1.5 eq) UDP-GlcNAc werden in 114.6 μ L Puffer (HEPES 20 mM, NaCl 1 M, pH 7) gelöst. Es werden 1.4 μ L Mangan(II)-chlorid (100 mM), 1.4 μ L alkalische Phosphatase (1 U/ μ L), 1.4 μ L Natriumazid (100 mM), 7.0 μ L BSA (20 mg/ml) und 7.4 μ L *Bos taurus* GnT IVa (1.05 mg/mL) zugegeben. Die Reaktion wird bei 30 °C inkubiert. Nach 6 d wird die Reaktion durch Erhitzen (5 min, 95 °C) beendet, die Proteinbestandteile werden abzentrifugiert und die Produkte durch HPLC (Hydrosphere C18, 2.1x50 mm, 0 \rightarrow 50 % in 10 CV, Acetonitril/Wasser +0.1 % Ameisensäure, Flussrate: 0.2 mL/min) dann (Hypercarb, 4.6x150 mm, 12 \rightarrow 17 % in 24 CV, Acetonitril/Wasser +0.1 % Ameisensäure, Flussrate: 1 mL/min) gereinigt. Die Produktlösung wird mit 1 M Natriumcarbonat-Lösung neutralisiert (pH 8-9) und anschließend lyophilisiert. Das Salz wird durch Gelpermeationschromatographie (Sephadex G25, 15x200 mm, 5 % Ethanol in Wasser, Flussrate: 1 mL/min) abgetrennt.

Ausbeute: 1.38 mg (0.70 μ mol, 62.5 %),

C₇₅H₁₂₃N₉O₅₃ (1997.7),

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -5.8$ (0.14, Wasser);

HR-MS (100 % Wasser): $M_{\text{ber}} = 1998.7279$ (M+H)⁺, $M_{\text{gef}} = 1998.7241$ (M+H)⁺;

¹H-NMR (500 MHz, D₂O mit [D₄]-Methanol als internem Standard): $\delta = 5.11$ (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1⁴), 4.94 (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1⁴), 4.77-4.73 (m, 2H, H-1³, H-1¹), 4.60 (dd, $J_{1,2} = 7.7$ Hz, 2H, H-1², H-1⁵), 4.55-4.50 (m, 2H, H-1⁵, H-1⁶), 4.45 (d, $J_{1,2} = 8.6$ Hz, 1H, H-1⁶), 4.21 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1$ Hz, 2H, H-2³, H-2⁴), 4.11 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1$ Hz, 1H, H-2⁴), 4.05 (dd, $J_{2,3} < 0.1$ Hz, $J_{3,4} = 10.3$ Hz, 1H, H-3⁴), 4.01-3.85 (m, 12H, H-6a⁵, H-6a⁶, H-6a⁵, H-6a³, H-6a⁶, H-4⁶, H-6a², H-6a⁴, H-9a⁵, H-3⁴, H-7⁵, H-6a¹), 3.85-3.72 (m, 18H, H-5⁵, H-2², H-6a⁴, H-5⁶, H-2¹, H-2⁶, H-6b⁵, H-6b⁵, H-6b⁶, H-4³, H-6b³, H-3², H-3³, H-2⁵, H-6b², H-3⁵, H-5⁴, H-4²),

3.85-3.53 (m, 21H, H-2^{S'}, H-6b¹, H-9b^{S'}, H-4^{S'}, H-3¹, H-3^{G'}, H-5³, H-4¹, H-4^{S'}, H-6b⁴, H-6^{S'}, H-5², H-6b^{4'}, H-5^{S'}, H-5¹, H-4⁴, H-6b^{G'}, H-8^{S'}, H-2^{G'}, H-5^{4'}, H-3⁶), 3.53-3.40 (m, 6H, H-4^{4'}, H-4⁶, H-3⁵, H-5⁶, H-4⁵, H-5⁵), 2.67 (dd, $J_{3,3} = 12.9$ Hz, $J_{3,4} = 4.3$ Hz, 1H, H-3a^{S'}), 2.11-2.00 (m, 18H, Ac), 1.74 (dd, $J_{3,3} = 12.9$ Hz, $J_{3,4} < 0.1$ Hz, 1H, H-3b^{S'}).

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O mit [D₄]-Methanol als internem Standard): $\delta = 175.8, 175.7, 175.6, 175.5, 174.4$ (C=O), 104.5 (C-1^{G'} β , $^1J_{C-1, H-1} = 161.2$ Hz), 102.5 (C-1⁶ β , $^1J_{C-1, H-1} = 164.8$ Hz), 102.2 (C-1² β , $^1J_{C-1, H-1} = 163.6$ Hz), 101.4 (C-1³ β , $^1J_{C-1, H-1} = 167.3$ Hz), 101.1 (C-2^{S'} α), 100.6 (C-1⁵ β , $^1J_{C-1, H-1} = 161.2$ Hz), 100.2 (C-1^{5'} β , $^1J_{C-1, H-1} = 161.2$ Hz), 100.1 (C-1⁴ α , $^1J_{C-1, H-1} = 170.9$ Hz), 98.7 (C-1^{4'} α , $^1J_{C-1, H-1} = 170.9$ Hz), 89.4 (C-1¹ β , $^1J_{C-1, H-1} = 164.8$ Hz), 81.6 (C-4^{S'}), 81.2 (C-3³), 80.5 (C-4²), 79.5 (C-4¹), 79.2 (C-4⁴), 77.4 (C-5¹), 77.1 (C-2⁴), 76.8 (C-2⁴), 76.8 (C-5⁶), 76.8 (C-5⁵), 75.3 (C-5³), 75.2 (C-5²), 75.2 (C-5^{5'}), 74.6 (C-5^{G'}), 74.4 (C-3⁵), 74.1 (C-3⁶), 73.8 (C-5^{4'}), 73.7 (C-6^{S'}), 73.4 (C-3^{G'}), 73.3 (C-3¹), 73.1 (C-5⁴), 73.0 (C-3^{5'}), 72.8 (C-3²), 72.6 (C-7^{S'}), 71.6 (C-2^{G'}), 71.0 (C-2³), 70.8 (C-4⁵), 70.5 (C-4⁶), 70.4 (C-3^{5'}), 69.3 (C-8^{S'}), 69.2 (C-4^{G'}), 69.1 (C-4^{S'}), 69.0 (C-3⁴), 68.2 (C-4^{5'}), 66.8 (C-6³), 66.7 (C-4³), 64.2 (C-6^{G'}), 63.5 (C-9^{S'}), 62.5 (C-6⁴), 62.2 (C-6^{4'}), 61.6 (C-6⁶), 61.4 (C-6⁵), 61.1 (C-6^{5'}), 61.1 (C-6²), 60.8 (C-6¹), 56.5 (C-2⁶), 56.1 (C-2⁵), 55.7 (C-2^{5'}), 55.5 (C-2²), 55.3 (C-2¹), 52.7 (C-5^{S'}), 40.9 (C-3^{S'}), 23.3, 23.2, 23.1, 23.0, 22.9 (NAc).

O-(5-Acetamido-3,5-didesoxy-*D*-glycero- α -*D*-galacto-non-2-ulopyranosylsäure)-(2 \rightarrow 6)-*O*-(β -*D*-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -*D*-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-{*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-[*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(α -*D*-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)}-*O*-(β -*D*-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-azid **64**

α -Neu5Ac-2,6- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,3-{ β -GlcNAc-1,2-[β -GlcNAc-1,6]- α -Man-1,6}- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4- β -GlcNAc-N₃

7.86 mg (4.38 μ mol, 1 eq) Nonasaccharid **41** und 4.28 mg (6.57 μ mol, 1.5 eq) UDP-GlcNAc werden in 355.7 μ L Puffer (MES 50 mM, NaCl 200 mM, pH 6.5) gelöst. Es werden 5.5 μ L

Mangan(II)-chlorid (100 mM), 5.5 µL alkalische Phosphatase (1 U/µL), 5.5 µL Natriumazid (100 mM), 27.4 µL BSA (20 mg/mL) und 119.5 µL *Mus musculus* GnT V zugegeben. Die Reaktion wird bei 30 °C inkubiert. Nach 18 d wird die Reaktion durch Erhitzen (5 min, 95 °C) beendet, die Proteinbestandteile werden abzentrifugiert und die Produkte durch HPLC (Hydrosphere C18, 2.1x50 mm, 0→50 % in 10 CV, Acetonitril/Wasser +0.1 % Ameisensäure, Flussrate: 0.2 mL/min), dann (Hypercarb, 4.6x150 mm, 10→20 % in 24 CV, Acetonitril/Wasser +0.1 % Ameisensäure, Flussrate: 1 mL/min) gereinigt. Die Produktlösung wird mit 1 M Natriumcarbonat-Lösung neutralisiert (pH 8-9) und anschließend lyophilisiert. Das Salz wird durch Gelpermeationschromatographie (Sephadex G25, 15x200 mm, 5 % Ethanol in Wasser, Flussrate: 1 mL/min) abgetrennt.

Ausbeute: 5.46 mg (2.73 µmol, 62.0 %),

$C_{75}H_{123}N_9O_{53}$ (1997.7),

$[\alpha]_D^{20} = -18.2$ (0.30, Wasser);

HR-MS (100 % Wasser): $M_{ber} = 1998.7279$ (M+H)⁺, $M_{gef} = 1998.7214$ (M+H)⁺;

¹H-NMR (500 MHz, D₂O mit [D₄]-Methanol als internem Standard): $\delta = 5.14$ (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1⁴), 4.87 (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1⁴), 4.77-4.72 (m, 2H, H-1³, H-1¹), 4.60 (dd, $J_{1,2} = 7.2$ Hz, 2H, H-1², H-1⁵), 4.56 (d, $J_{1,2} = 8.9$ Hz, 1H, H-1⁵), 4.53 (d, $J_{1,2} = 8.5$ Hz, 1H, H-1⁶), 4.44 (d, $J_{1,2} = 8.5$ Hz, 1H, H-1^G), 4.26 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1$ Hz, 1H, H-2³), 4.22-4.18 (m, 2H, H-2⁴, H-6a⁴), 4.09 (dd, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, $J_{2,3} = 3.3$ Hz, 1H, H-2⁴), 4.03-3.84 (m, 12H, H-6a⁵, H-6a^G, H-6a⁵, H-6a⁴, H-6a⁶, H-6a³, H-4^G, H-3⁴, H-6a², H-9a^S, H-3⁴, H-7^S), 3.84-3.70 (m, 20H, H-5^S, H-2², H-6a¹, H-4³, H-5⁴, H-2⁵, H-6b⁵, H-6b⁶, H-3², H-3³, H-2¹, H-6b⁵, H-6b³, H-5⁵, H-3⁵, H-5^G, H-2⁵, H-6b², H-3^G, H-4²), 3.70-3.48 (m, 20H, H-2⁶, H-6b¹, H-3¹, H-6b⁴, H-9b^S, H-4^S, H-6^S, H-5³, H-5², H-4¹, H-4⁵, H-6b⁴, H-5⁵, H-5¹, H-6b^G, H-8^S, H-3⁶, H-4⁴, H-2^G, H-3⁵), 3.48-3.38 (m, 5H, H-4⁴, H-4⁵, H-4⁶, H-5⁵, H-5⁶), 2.67 (dd, $J_{3,3} = 11.7$ Hz, $J_{3,4} = 3.9$ Hz, 1H, H-3a^S), 2.10-2.00 (m, 18H, Ac), 1.72 (dd, $J_{3,3} = 12.4$ Hz, $J_{3,4} < 0.1$ Hz, 1H, H-3b^S),

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O mit [D₄]-Methanol als internem Standard): $\delta = 175.8, 175.7, 175.6, 175.2, 174.4$ (C=O), 104.5 (C-1^Gβ, $^1J_{C-1, H-1} = 161.2$ Hz), 102.5 (C-1⁶β, $^1J_{C-1, H-1} = 163.7$ Hz), 102.2 (C-1²β, $^1J_{C-1, H-1} = 164.8$ Hz), 101.3 (C-1³β, $^1J_{C-1, H-1} = 162.7$ Hz), 101.0 (C-2^Sα), 100.7

(C-1⁵β, ¹J_{C-1, H-1} = 161.2 Hz), 100.4 (C-1⁴α, ¹J_{C-1, H-1} = 171.1 Hz), 100.2 (C-1⁵β, ¹J_{C-1, H-1} = 160.1 Hz), 98.1 (C-1⁴α, ¹J_{C-1, H-1} = 170.1 Hz), 89.4 (C-1¹β, ¹J_{C-1, H-1} = 163.8 Hz), 81.7 (C-4⁵), 81.4 (C-3³), 80.3 (C-4²), 79.7 (C-4¹), 77.4 (C-2⁴), 77.3 (C-5¹), 77.2 (C-2⁴), 76.7 (C-5⁵), 76.7 (C-5⁶), 75.4 (C-5³), 75.3 (C-5²), 75.3 (C-5⁵), 74.6 (C-5⁴), 74.6 (C-3⁶), 74.5 (C-5⁶), 74.2 (C-3⁵), 73.4 (C-6⁵), 73.3 (C-3¹), 73.1 (C-3⁶), 73.0 (C-3⁵), 72.8 (C-5⁴), 72.6 (C-7⁵), 72.5 (C-3²), 71.6 (C-2⁶), 71.1 (C-2³), 71.0 (C-6⁴), 70.8 (C-4⁵), 70.8 (C-4⁶), 70.3 (C-3⁴), 70.3 (C-3⁴), 69.3 (C-8⁵), 69.3 (C-4⁶), 69.1 (C-4⁵), 68.4 (C-4⁴), 68.2 (C-4⁴), 66.6 (C-4³), 66.5 (C-6³), 64.2 (C-6⁶), 63.6 (C-9⁵), 62.6 (C-6⁴), 61.7 (C-6⁶), 61.5 (C-6¹), 61.1 (C-6²), 60.8 (C-6⁵), 60.8 (C-6⁵), 56.5 (C-2⁵), 56.3 (C-2⁶), 55.8 (C-2²), 55.5 (C-2⁵), 55.4 (C-2¹), 52.7 (C-5⁵), 41.0 (C-3⁵), 23.3, 23.2, 23.0 (NAc).

O-(5-Acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero-α-D-galacto-non-2-ulopyranosylsäure)-(2→3)-*O*-(β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-*O*-(α-D-mannopyranosyl)-(1→3)-{*O*-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-[*O*-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→6)]-*O*-(α-D-mannopyranosyl)-(1→6)}-*O*-(β-D-mannopyranosyl)-(1→4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-azid **66**

α-Neu5Ac-2,3-β-Gal-1,4-β-GlcNAc-1,2-α-Man-1,3-{β-GlcNAc-1,2-[β-GlcNAc-1,6]-α-Man-1,6}-β-Man-1,4-β-GlcNAc-1,4-β-GlcNAc-N₃

6.80 mg (3.79 μmol, 1 eq) Nonasaccharid **43** und 3.70 mg (5.69 μmol, 1.5 eq) UDP-GlcNAc werden in 307.9 μL Puffer (MES 50 mM, NaCl 200 mM, pH 6.5) gelöst. Es werden 4.7 μL Mangan(II)-chlorid (100 mM), 4.7 μL alkalische Phosphatase (1 U/μL), 4.7 μL Natriumazid (100 mM), 23.7 μL BSA (20 mg/mL) und 103.3 μL *Mus musculus* GnT V zugegeben. Die Reaktion wird bei 30 °C inkubiert. Nach 7 d wird die Reaktion durch Erhitzen (5 min, 95 °C) beendet, die Proteinbestandteile werden abzentrifugiert und die Produkte durch HPLC (Hydrosphere C18, 2.1x50 mm, 0→50 % in 10 CV, Acetonitril/Wasser +0.1 % Ameisensäure, Flussrate: 0.2 mL/min), dann (Hypercarb, 4.6x150 mm, 10→20 % in 24 CV, Acetonitril/Wasser +0.1 % Ameisensäure, Flussrate: 1 mL/min) gereinigt. Die Produktlösung wird mit 1 M Natriumcarbonat-Lösung neutralisiert (pH 8-9) und anschließend lyophilisiert.

Das Salz wird durch Gelpermeationschromatographie (Sephadex G25, 15x200 mm, 5 % Ethanol in Wasser, Flussrate: 1 mL/min) abgetrennt.

Ausbeute: 5.13 mg (2.57 μ mol, 67.8 %),

C₇₅H₁₂₃N₉O₅₃ (1997.7),

$[\alpha]_D^{20} = +5$ (0.10, Wasser);

HR-MS (100 % Wasser): $M_{\text{ber}} = 1998.7279$ (M+H)⁺, $M_{\text{gef}} = 1998.7301$ (M+H)⁺;

¹H-NMR (500 MHz, D₂O mit [D₄]-Methanol als internem Standard): $\delta = 5.13$ (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1⁴), 4.87 (d, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, 1H, H-1^{4'}), 4.79-4.73 (m, 2H, H-1³, H-1¹), 4.63-4.51 (m, 5H, H-1², H-1⁵, H-1^{5'}, H-1^{6'}, H-1^G), 4.25 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} < 0.1$ Hz, 1H, H-2³), 4.22-4.17 (m, 2H, H-2⁴, H-6a⁴), 4.13 (dd, $J_{2,3} < 0.1$ Hz, $J_{3,4} = 3.7$ Hz, 1H, H-3^G), 4.09 (dd, $J_{1,2} < 0.1$ Hz, $J_{2,3} = 3.7$ Hz, 1H, H-2^{4'}), 4.01-3.80 (m, 15H, H-6a⁵, H-6a^G, H-6a^{5'}, H-6a⁴, H-6a^{6'}, H-6a³, H-4^G, H-3⁴, H-6a², H-9a^S, H-3^{4'}, H-7^S, H-5^S, H-4³, H-6a¹), 3.80-3.69 (m, 20H, H-2², H-5⁴, H-2⁵, H-6b⁵, H-6b^{6'}, H-3², H-3³, H-2¹, H-6b^{5'}, H-6b³, H-5^{5'}, H-3⁵, H-5^G, H-2^{5'}, H-6b², H-3^G, H-4², H-6b^G, H-3¹, H-4⁵), 3.69-3.54 (m, 17H, H-2^{6'}, H-6b¹, H-6b⁴, H-9b^S, H-4^S, H-6^S, H-5³, H-5², H-4¹, H-6b^{4'}, H-5⁵, H-5¹, H-8^S, H-3^{6'}, H-4⁴, H-2^G, H-3^{5'}), 3.54-3.38 (m, 5H, H-4^{4'}, H-4^{5'}, H-4^{6'}, H-5^{5'}, H-5^{6'}), 2.75 (dd, $J_{3,3} = 11.9$ Hz, $J_{3,4} = 3.7$ Hz, 1H, H-3a^S), 2.11-2.00 (m, 18H, Ac), 1.80 (dd, $J_{3,3} = 11.0$ Hz, $J_{3,4} < 0.1$ Hz, 1H, H-3b^S),

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O mit [D₄]-Methanol als internem Standard): $\delta = 175.9$, 175.6, 175.2, 174.8 (C=O), 103.5 (C-1^G β , $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 161.0$ Hz), 102.6 (C-1^{6'} β , $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 156.0$ Hz), 102.3 (C-1² β , $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 163.7$ Hz), 101.3 (C-1³ β , $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 160.4$ Hz), 100.7 (C-2^S α), 100.6 (C-1^{5'} β , $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 160.4$ Hz), 100.4 (C-1⁴ α , $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 171.9$ Hz), 100.4 (C-1⁵ β , $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 160.4$ Hz), 98.1 (C-1^{4'} α , $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 171.9$ Hz), 89.4 (C-1¹ β , $^1J_{\text{C-1, H-1}} = 162.6$ Hz), 81.2 (C-3³), 80.3 (C-4²), 79.6 (C-4¹), 79.1 (C-4⁵), 77.4 (C-2^{4'}), 77.4 (C-2⁴), 77.3 (C-5¹), 76.7 (C-5^{5'}), 76.7 (C-5^{6'}), 76.4 (C-3^G), 76.0 (C-5^G), 75.6 (C-5⁵), 75.4 (C-5³), 75.3 (C-5²), 74.7 (C-5⁴), 74.5 (C-3^{5'}), 74.4 (C-3^{6'}), 73.8 (C-6^S), 73.1 (C-5^{5'}), 72.8 (C-3¹), 72.7 (C-3⁵), 72.7 (C-7^S), 72.5 (C-3²), 70.8 (C-6⁴), 70.8 (C-4^{5'}), 70.8 (C-4^{6'}), 70.5 (C-2³), 70.4 (C-2^G), 70.3 (C-3⁴), 70.3 (C-3^{4'}), 69.3 (C-4^S), 69.0 (C-8^S), 68.4 (C-4^{4'}), 68.4 (C-4^G), 68.2 (C-4⁴), 66.5 (C-4³), 66.5 (C-6³), 63.4 (C-9^S), 62.6 (C-6⁴), 61.9

(C-6^G), 61.7 (C-6^{6'}), 61.5 (C-6²), 61.2 (C-6¹), 60.8 (C-6⁵), 60.8 (C-6^{5'}), 56.5 (C-2^{5'}), 56.3 (C-2^{6'}), 55.7 (C-2²), 55.7 (C-2⁵), 55.4 (C-2¹), 52.6 (C-5^S), 40.4 (C-3^S), 23.4, 23.3, 23.1, 23.0 (NAc).

O-(5-Acetamido-3,5-didesoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosylsäure)-(2 \rightarrow 6)-*O*-(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-{*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-[*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)}-*O*-(β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[*O*-(α -L-fucosyl-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-azid **68**

α -Neu5Ac-2,6- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,3-{ β -GlcNAc-1,2-[β -GlcNAc-1,6]- α -Man-1,6}- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4-[α -Fuc-1,6]- β -GlcNAc-N₃

O-(β -D-Galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-{*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-[*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)}-*O*-(β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[*O*-(α -L-fucosyl-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-azid **67**

β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,3-{ β -GlcNAc-1,2-[β -GlcNAc-1,6]- α -Man-1,6}- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4-[α -Fuc-1,6]- β -GlcNAc-N₃

0.2 mg (0.1 μ mol, 1 eq) Mischung **53** und **49** (ca. 3:1) und 60 μ g (0.15 μ mol, 1.5 eq) UDP-GlcNAc werden in 7.5 μ L Puffer (50 mM MES, 200 mM NaCl, pH 6.5) gelöst. Es werden 0.1 μ L Mangan(II)-chlorid (100 mM), 0.1 μ L alkalische Phosphatase (1 U/ μ L), 0.1 μ L Natriumazid (100 mM), 0.6 μ L BSA (20 mg/mL) und 0.9 μ L *Mus musculus* GnT V zugegeben. Die Reaktion wird bei 30 °C inkubiert. Nach 5 d wird die Reaktion durch Erhitzen (5 min, 95 °C) beendet, die Proteinbestandteile werden abzentrifugiert und die Produkte durch HPLC-MS analysiert.

O-(2-Acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-[*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)]-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-[*O*-(5-Acetamido-

3,5-didesoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosylsäure)-(2 \rightarrow 6)-O-(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-O-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-O-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-O-(β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-O-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[O-(α -L-fucosyl-(1 \rightarrow 6))]-O-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-azid **70**

β -GlcNAc-1,2-[β -GlcNAc-1,4]- α -Man-1,3-[α -Neu5Ac-2,6- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,6]- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4-[α -Fuc-1,6]- β -GlcNAc-N₃

O-(2-Acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-[O-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)]-O-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-[O-(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-O-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-O-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-O-(β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-O-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[O-(α -L-fucosyl-(1 \rightarrow 6))]-O-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-azid **69**

β -GlcNAc-1,2-[β -GlcNAc-1,4]- α -Man-1,3-[β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,6]- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4- α -Fuc-1,6- β -GlcNAc-N₃

0.15 mg (0.08 μ mol, 1 eq) Mischung **52** und **48** (ca. 2:1) und 70 μ g (0.12 μ mol, 1.5 eq) UDP-GlcNAc werden in 6.3 μ L Puffer (20 mM HEPES, 1M NaCl, pH 7) gelöst. Es werden 0.1 μ L Mangan(II)-chlorid (100 mM), 1.1 μ L alkalische Phosphatase (1 U/ μ L), 0.1 μ L Natriumazid (100 mM), 0.5 μ L BSA (20 mg/mL) und 0.6 μ L *Bos taurus* GnT IVa (1.05 mg/mL) zugegeben. Die Reaktion wird bei 30 °C inkubiert. Nach 8 d wird die Reaktion durch Erhitzen (5 min, 95 °C) beendet, die Proteinbestandteile werden abzentrifugiert und die Produkte durch HPLC-MS analysiert.

9.14. Versuche zu Kapitel 6.2.

Test Monogalactosylierung **66**

3.00 mg (1.5 μ mol, 1 eq) Decasaccharid **66** und 1.10 mg (2.0 μ mol, 1.3 eq) UDP-Gal werden in 345.0 μ L Puffer (50 mM Natriumcacodylat, pH 7.4) gelöst. Es werden 3.8 μ L Mangan(II)-

chlorid (100 mM), 3.8 μ L alkalische Phosphatase (1 U/ μ L), 3.8 μ L Natriumazid (100 mM), 18.8 μ L BSA (20 mg/mL) und 9.5 μ L *Bos taurus* GalT1 (10 mU/ μ L) zugegeben. Die Reaktion wird bei 30 °C inkubiert. Nach 10 min wird die Reaktion durch Erhitzen (5 min, 95 °C) beendet, die Proteinbestandteile werden abzentrifugiert und die Produkte durch HPLC-MS (HyperCarb, 2.1x30 mm, 10-20 %, Acetonitril/Wasser + 0.1 % Ameisensäure, 0.5 mL/min) analysiert.

O-(5-Acetamido-3,5-didesoxy-*D*-glycero- α -*D*-galacto-non-2-ulopyranosylsäure)-(2 \rightarrow 3)-*O*-(β -*D*-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -*D*-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-{*O*-(β -*D*-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-[*O*-(β -*D*-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(α -*D*-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)}-*O*-(β -*D*-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-azid **74**

α -Neu5Ac-2,3- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,3-{ β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2-[β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,6]- α -Man-1,6}- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4- β -GlcNAc-N₃

3.00 mg (1.5 μ mol, 1 eq) Decasaccharid **66** und 2.50 mg (4.4 μ mol, 3 eq) UDP-Gal werden in 320.4 μ L Wasser und 24.6 μ L Puffer (700 mM Natriumcacodylat, pH 7.4) gelöst. Es werden 3.8 μ L Mangan(II)-chlorid (100 mM), 3.8 μ L alkalische Phosphatase (1 U/ μ L), 3.8 μ L Natriumazid (100 mM), 18.8 μ L BSA (20 mg/mL) und 9.5 μ L *Bos taurus* GalT1 (10 mU/ μ L) zugegeben. Die Reaktion wird bei 30 °C inkubiert. Nach 160 min wird die Reaktion durch Erhitzen (5 min, 95 °C) beendet, die Proteinbestandteile werden abzentrifugiert und die Produkte durch HPLC (Hydrosphere C18, 2.1x50 mm, 0 \rightarrow 50 % in 10 CV, Acetonitril/Wasser +0.1 % Ameisensäure, Flussrate: 0.2 mL/min), dann (Hypercarb, 4.6x150 mm, 15 \rightarrow 20 % in 24 CV, Acetonitril/Wasser +0.1 % Ameisensäure, Flussrate: 1 mL/min) gereinigt. Die Produktlösung wird mit 1 M Natriumcarbonat-Lösung neutralisiert (pH 8-9) und anschließend lyophilisiert. Das Salz wird durch Gelpermeationschromatographie (Sephadex G25, 15x200 mm, 5 % Ethanol in Wasser, Flussrate: 1 mL/min) abgetrennt.

Ausbeute: 0.25 mg (0.1 μ mol, 7 %)

C₈₇H₁₄₃N₉O₆₃ (2321.8),

HR-MS (100 % Wasser): $M_{\text{ber}} = 2322.8335 (M+H)^+$, $M_{\text{gef}} = 2322.8263 (M+H)^+$,

O-(5-Acetamido-3,5-didesoxy-*D*-glycero- α -*D*-galacto-non-2-ulopyranosylsäure)-(2 \rightarrow 6)-*O*-(β -*D*-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -*D*-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-{*O*-(β -*D*-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-[*O*-(β -*D*-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(α -*D*-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)}-*O*-(β -*D*-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-azid **75**

α -Neu5Ac-2,6- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,3-{ β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2-[β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,6]- α -Man-1,6]- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4- β -GlcNAc- N_3

2.00 mg (1.0 μ mol, 1 eq) Decasaccharid **64** und 1.70 mg (3.0 μ mol, 3 eq) UDP-Gal werden in 223.7 μ L Puffer (50 mM Natriumcacodylat, pH 7.4) gelöst. Es werden 2.5 μ L Mangan(II)-chlorid (100 mM), 2.5 μ L alkalische Phosphatase (1 U/ μ L), 2.5 μ L Natriumazid (100 mM), 12.5 μ L BSA (20 mg/mL) und 6.3 μ L *Bos taurus* GalT1 (10 mU/ μ L) zugegeben. Die Reaktion wird bei 30 °C inkubiert. Nach 24 h wird die Reaktion durch Erhitzen (5 min, 95 °C) beendet, die Proteinbestandteile werden abzentrifugiert und die Produkte durch HPLC (Hydrosphere C18, 2.1x50 mm, 0 \rightarrow 50 % in 10 CV, Acetonitril/Wasser +0.1 % Ameisensäure, Flussrate: 0.2 mL/min), dann (Hypercarb, 4.6x150 mm, 15 \rightarrow 25 % in 24 CV, Acetonitril/Wasser +0.1 % Ameisensäure, Flussrate: 1 mL/min) gereinigt. Die Produktlösung wird mit 1 M Natriumcarbonat-Lösung neutralisiert (pH 8-9) und anschließend lyophilisiert. Das Salz wird durch Gelpermeationschromatographie (Sephadex G25, 15x200 mm, 5 % Ethanol in Wasser, Flussrate: 1 mL/min) abgetrennt.

Ausbeute: 0.87 mg (0.37 μ mol, 37 %)

$C_{87}H_{143}N_9O_{63}$ (2321.8),

HR-MS (100 % Wasser): $M_{\text{ber}} = 2322.8335 (M+H)^+$, $M_{\text{gef}} = 2322.8211 (M+H)^+$,

O-(β -D-Galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-[*O*-(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)]-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-[*O*-(5-Acetamido-3,5-didesoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosylsäure)-(2 \rightarrow 3)-*O*-(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-azid **73**

β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2-[β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,4]- α -Man-1,3-[α -Neu5Ac-2,3- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,6]- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4- β -GlcNAc-N₃

2.00 mg (1.0 μ mol, 1 eq) Decasaccharid **65** und 1.70 mg (3.0 μ mol, 3 eq) UDP-Gal werden in 223.7 μ L Puffer (50 mM Natriumcacodylat, pH 7.4) gelöst. Es werden 2.5 μ L Mangan(II)-chlorid (100 mM), 2.5 μ L alkalische Phosphatase (1 U/ μ L), 2.5 μ L Natriumazid (100 mM), 12.5 μ L BSA (20 mg/mL) und 6.3 μ L *Bos taurus* GalT1 (10 mU/ μ L) zugegeben. Die Reaktion wird bei 30 °C inkubiert. Nach 24 h wird die Reaktion durch Erhitzen (5 min, 95 °C) beendet, die Proteinbestandteile werden abzentrifugiert und die Produkte durch HPLC (Hydrosphere C18, 2.1x50 mm, 0 \rightarrow 50 % in 10 CV, Acetonitril/Wasser +0.1 % Ameisensäure, Flussrate: 0.2 mL/min), dann (Hypercarb, 4.6x150 mm, 15 \rightarrow 25 % in 24 CV, Acetonitril/Wasser +0.1 % Ameisensäure, Flussrate: 1 mL/min) gereinigt. Die Produktlösung wird mit 1 M Natriumcarbonat-Lösung neutralisiert (pH 8-9) und anschließend lyophilisiert. Das Salz wird durch Gelpermeationschromatographie (Sephadex G25, 15x200 mm, 5 % Ethanol in Wasser, Flussrate: 1 mL/min) abgetrennt.

Ausbeute: 0.70 mg (0.30 μ mol, 30 %),

C₈₇H₁₄₃N₉O₆₃ (2321.8);

HR-MS (100 % Wasser): M_{ber} = 2322.8335 (M+H)⁺, M_{gef} = 2322.8256 (M+H)⁺.

10. Literatur

- [1] E. K. Culyba, J. L. Price, S. R. Hanson, A. Dhar, C.-H. Wong, M. Gruebele, E. T. Powers, J. W. Kelly, *Science* **2011**, *331*, 571–575.
- [2] D. Shental-Bechor, Y. Levy, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2008**, *105*, 8256–8261.
- [3] K. W. Moremen, M. Tiemeyer, A. V. Nairn, *Nat Rev Mol Cell Biol* **2012**, *13*, 448–462.
- [4] K. Ohtsubo, J. D. Marth, *Cell* **2006**, *126*, 855–867.
- [5] A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. R. Bertozzi, G. W. Hart, M. E. Etzler, *Essentials of Glycobiology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, **2009**.
- [6] A. Kirwan, M. Utratna, M. E. O’Dwyer, L. Joshi, M. Kilcoyne, *BioMed Research International* **2015**, *2015*, 1–16.
- [7] M. J. Kailemia, D. Park, C. B. Lebrilla, *Anal Bioanal Chem* **2017**, *409*, 395–410.
- [8] Inês Gomes Ferreira, Michela Pucci, Giulia Venturi, Nadia Malagolini, Mariella Chiricolo, Fabio Dall’Olio, *IJMS* **2018**, *19*, 580.
- [9] R. Dings, M. Miller, R. Griffin, K. Mayo, *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 905.
- [10] H. Blanchard, X. Yu, P. M. Collins, K. Bum-Erdene, *Expert Opin. Ther. Pat.* **2014**, *24*, 1053–1065.
- [11] L.Unione, A. Gimeno, P. Valverde, I. Calloni, H. Coelho, S. Mirabella, A. Poveda, A. Arda, J. Jimenez-Barbero, *Curr. Med. Chem.* **2017**, *24*, DOI 10.2174/0929867324666170217093702.
- [12] M. A. T. Blaskovich, K. A. Hansford, M. S. Butler, Z. Jia, A. E. Mark, M. A. Cooper, *ACS Infect. Dis.* **2018**, *4*, 715–735.
- [13] H. Cai, J. Orwenyo, J. P. Giddens, Q. Yang, R. Zhang, C. C. LaBranche, D. C. Montefiori, L.-X. Wang, *Cell Chem. Biol.* **2017**, *24*, 1513-1522.e4.
- [14] R. J. Linhardt, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2551–2564.
- [15] L. Johannes, R. Jacob, H. Leffler, *J Cell Sci* **2018**, *131*, jcs208884.
- [16] J. Brettschneider, K. Widl, H. Ehrenreich, M. Riepe, H. Tumani, *Neuroscience Letters* **2006**, *404*, 347–351.
- [17] J. Sun, J. M. Martin, V. Vanderpoel, R. K. Sumbria, *Neuromol Med* **2019**, *21*, 12–24.
- [18] R. Chang, A. Al Maghribi, V. Vanderpoel, V. Vasilevko, D. H. Cribbs, R. Boado, W. M. Pardridge, R. K. Sumbria, *Mol. Pharmaceutics* **2020**, *17*, 360.
- [19] M. A. Wolfert, G.-J. Boons, *Nat Chem Biol* **2013**, *9*, 776–784.

- [20] M. Dalziel, M. Crispin, C. N. Scanlan, N. Zitzmann, R. A. Dwek, *Science* **2014**, *343*, 1235681.
- [21] J. E. Hudak, C. R. Bertozzi, *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 16–37.
- [22] A. Fernández-Tejada, F. J. Cañada, J. Jiménez-Barbero, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 10616–10628.
- [23] C. Reily, T. J. Stewart, M. B. Renfrow, J. Novak, *Nat Rev Nephrol* **2019**, *15*, 346–366.
- [24] R. Hevey, *Pharmaceuticals* **2019**, *12*, 55.
- [25] P. Valverde, A. Ardá, N.-C. Reichardt, J. Jiménez-Barbero, A. Gimeno, *Med. Chem. Commun.* **2019**, *10*, 1678–1691.
- [26] S. H. Shakin-Eshleman, A. T. Remaley, J. R. Eshleman, W. H. Wunner, S. L. Spitalnik, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 10690–10689.
- [27] R. A. Dwek, *Biochemical Society Transactions* **1995**, *23*, 1–25.
- [28] R. A. Dwek, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683–720.
- [29] P. V. den Steen, P. M. Rudd, R. A. Dwek, G. Opdenakker, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1998**, *33*, 151–208.
- [30] T. S. Raju, M. K. Ray, P. Stanley, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 30294–30302.
- [31] A. Ceroni, K. Maass, H. Geyer, R. Geyer, A. Dell, S. M. Haslam, *J. Proteome Res.* **2008**, *7*, 1650–1659.
- [32] R. Kornfeld, S. Kornfeld, *Ann. Rev. Biochem.* **1985**, *54*, 631–664.
- [33] C. J. Gray, L. G. Migas, P. E. Barran, K. Pagel, P. H. Seeberger, C. E. Eyers, G.-J. Boons, N. L. B. Pohl, I. Compagnon, G. Widmalm, S. L. Flitsch, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 14463–14479.
- [34] L. März, M. W. C. Hatton, *International Journal of Biochemistry* **1984**, *16*, 253–256.
- [35] K. Mariño, J. Bones, J. J. Kattla, P. M. Rudd, *Nat Chem Biol* **2010**, *6*, 713–723.
- [36] C. Unverzagt, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2350–2353.
- [37] N. Yamamoto, Y. Ohmori, T. Sakakibara, K. Sasaki, L. R. Juneja, Y. Kajihara, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2537–2540.
- [38] B. Sun, B. Srinivasan, X. Huang, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 7072–7081.
- [39] C. Unverzagt, G. Gundel, S. Eller, R. Schuberth, J. Seifert, H. Weiss, M. Niemietz, M. Pischl, C. Raps, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 12292–12302.
- [40] M. A. Walczak, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 16430–16433.
- [41] M. Mönnich, S. Eller, T. Karagiannis, L. Perkams, T. Lubber, D. Ott, M. Niemietz, J. Hoffman, J. Walcher, L. Berger, M. Pischl, M. Weishaupt, C. Wirkner, R. G. Lichtenstein, C. Unverzagt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 10487–10492.

- [42] S. Dey, S. O. Bajaj, T.-I. Tsai, H.-J. Lo, K. Wu, C.-H. Wong, *Tetrahedron* **2018**, *74*, 6003–6011.
- [43] W. Sumiyoshi, S. Nakakita, N. Miyanishi, J. Hirabayashi, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **2009**, *73*, 543–551.
- [44] K. Le Mai Hoang, A. Pardo-Vargas, Y. Zhu, Y. Yu, M. Loria, M. Delbianco, P. H. Seeberger, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 9079–9086.
- [45] L. Li, Y. Liu, C. Ma, J. Qu, A. D. Calderon, B. Wu, N. Wei, X. Wang, Y. Guo, Z. Xiao, J. Song, G. Sugiarto, Y. Li, H. Yu, X. Chen, P. G. Wang, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 5652–5661.
- [46] Z. Wu, Y. Liu, L. Li, X.-F. Wan, H. Zhu, Y. Guo, M. Wei, W. Guan, P. G. Wang, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 8946–8951.
- [47] B. Echeverria, J. Etxebarria, N. Ruiz, Á. Hernandez, J. Calvo, M. Habeger, D. Reusch, N.-C. Reichardt, *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 11460–11467.
- [48] B. Echeverria, S. Serna, S. Achilli, C. Vivès, J. Pham, M. Thépaut, C. H. Hokke, F. Fieschi, N.-C. Reichardt, *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13*, 2269–2279.
- [49] A. Seko, M. Koketsu, M. Nishizono, Y. Enoki, H. R. Ibrahim, L. R. Juneja, M. Kim, T. Yamamoto, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1997**, *1335*, 23–32.
- [50] B. Sun, W. Bao, X. Tian, M. Li, H. Liu, J. Dong, W. Huang, *Carbohydrate Research* **2014**, *396*, 62–69.
- [51] L. Liu, A. R. Prudden, G. P. Bosman, G.-J. Boons, *Carbohydrate Research* **2017**, *452*, 122–128.
- [52] A. L. Tarentino, C. M. Gomez, T. H. Plummer, *Biochemistry* **1985**, *24*, 4665–4671.
- [53] Y. Maki, R. Okamoto, M. Izumi, T. Murase, Y. Kajihara, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 3461–3468.
- [54] Y. Maki, T. Mima, R. Okamoto, M. Izumi, Y. Kajihara, *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 443–451.
- [55] Y. Kajihara, Y. Suzuki, N. Yamamoto, K. Sasaki, T. Sakakibara, L. R. Juneja, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 971–985.
- [56] Y. Kajihara, N. Yamamoto, R. Okamoto, K. Hirano, T. Murase, *Chem Record* **2010**, *10*, 80–100.
- [57] Y. Kajihara, *BCSJ* **2016**, *89*, 409–423.
- [58] A. D. Calderon, J. Zhou, W. Guan, Z. Wu, Y. Guo, J. Bai, Q. Li, P. G. Wang, J. Fang, L. Li, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 7258–7262.

- [59] A. Varki, S. Kornfeld, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 2808–2818.
- [60] B. S. Hamilton, J. D. Wilson, M. A. Shumakovich, A. C. Fisher, J. C. Brooks, A. Pontes, R. Naran, C. Heiss, C. Gao, R. Kardish, J. Heimbürg-Molinaro, P. Azadi, R. D. Cummings, J. H. Merritt, M. P. DeLisa, *Sci Rep* **2017**, *7*, 15907.
- [61] A. D. Calderon, Y. Liu, X. Li, X. Wang, X. Chen, L. Li, P. G. Wang, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 4027–4031.
- [62] G. Longmore, H. Schachter, *Carbohydr. Res.* **1982**, *28*.
- [63] J. A. Voynow, R. S. Kaiser, T. F. Scanlin, M. C. Glick, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 21572–21577.
- [64] Z. Wang, Z. S. Chinoy, S. G. Ambre, W. Peng, R. McBride, R. P. de Vries, J. Glushka, J. C. Paulson, G.-J. Boons, *Science* **2013**, *341*, 379–383.
- [65] Z. S. Chinoy, F. Friscourt, C. J. Capicciotti, P. Chiu, G.-J. Boons, *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 7970–7975.
- [66] T. Li, M. Huang, L. Liu, S. Wang, K. W. Moremen, G.-J. Boons, *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 18742–18746.
- [67] I. A. Gagarinov, T. Li, J. S. Toraño, T. Caval, A. D. Srivastava, J. A. W. Kruijtzter, A. J. R. Heck, G.-J. Boons, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 1011–1018.
- [68] L. Liu, A. R. Prudden, C. J. Capicciotti, G. P. Bosman, J.-Y. Yang, D. G. Chapla, K. W. Moremen, G.-J. Boons, *Nature Chem* **2019**, *11*, 161–169.
- [69] V. Ullmann, M. Rädisch, I. Boos, J. Freund, C. Pöhner, S. Schwarzinger, C. Unverzagt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11566–11570.
- [70] L. Perkams, Dissertation, Universität Bayreuth, **2020**.
- [71] S. Roseman, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 41527–41542.
- [72] P. K. Qasba, B. Ramakrishnan, E. Boeggeman, *Trends in Biochemical Sciences* **2005**, *30*, 53–62.
- [73] P. K. Qasba, B. Ramakrishnan, E. Boeggeman, *Curr. Drug Targets* **2008**, *9*, 292–309.
- [74] C. R. Faltynek, J. E. Silbert, L. Hof, *Journal of Biological Chemistry* **1981**, *256*, 7139–7141.
- [75] T. Yamamoto, *Mar. Drugs* **2010**, *8*, 2781–2794.
- [76] A. Cabanettes, L. Perkams, C. Spies, C. Unverzagt, A. Varrot, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 10178–10181.
- [77] J. E. Blanchard, L. Gal, S. He, J. Foisy, R. A. J. Warren, S. G. Withers, *Carbohydrate Research* **2001**, *11*.

- [78] M. Henze, D.-J. You, C. Kamerke, N. Hoffmann, C. Angkawidjaja, S. Ernst, J. Pietruszka, S. Kanaya, L. Elling, *Journal of Biotechnology* **2014**, *191*, 78–85.
- [79] M. R. Paquet, S. Narasimhan, H. Schachter, M. A. Moscarello, *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 4716–4721.
- [80] J. T. Cassidy, G. W. Jourdian, S. Roseman, *J. Biol. Chem.* **1965**, *240*, 3501–3506.
- [81] A. Canales, A. Mallagaray, J. Pérez-Castells, I. Boos, C. Unverzagt, S. André, H.-J. Gabius, F. J. Cañada, J. Jiménez-Barbero, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 13789–13793.
- [82] K. Usachev, Y. Yamaguchi, M. Takamatsu, N. Pavlova, V. Klochkov, A. Kurbangalieva, T. Murase, T. Shimoda, K. Tanaka, *Analyst* **2017**, *142*, 2897–2900.
- [83] H. Sato, Y. Kajihara, *Carbohydrate Research* **2005**, *340*, 469–479.
- [84] M. Lott, Dissertation in Vorbereitung, Universität Bayreuth, **2020**.
- [85] S. Weidler, Dissertation in Vorbereitung, Universität Bayreuth, **2020**.
- [86] H. Yin, J. Zhu, J. Wu, Z. Tan, M. An, S. Zhou, Y. Mechref, D. M. Lubman, *ELECTROPHORESIS* **2016**, *37*, 2624–2632.
- [87] I. Boos, Dissertation, Universität Bayreuth, **2015**.
- [88] W. Nishima, N. Miyashita, Y. Yamaguchi, Y. Sugita, S. Re, *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 8504–8512.
- [89] J. W. Dennis, J. Pawling, P. Cheung, E. Partridge, M. Demetriou, *Biochimica et Biophysica Acta* **n.d.**, *9*.
- [90] K. Fukuta, R. Abe, T. Yokomatsu, F. Omae, M. Asanagi, T. Makino, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 23456–23461.
- [91] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512–7515.
- [92] K. Lahm, Dissertation in Vorbereitung, Universität Bayreuth, **2018**.

11. Danksagung

Mein großer Dank gilt *Prof. Dr. Carlo Unverzagt* für die interessante Themenstellung sowie die Unterstützung und Betreuung meiner Arbeit.

Ich danke allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für die produktive Zusammenarbeit.

Dr. Claudia Pöhner danke ich für die stetige Hilfsbereitschaft, die Organisation der Saalpraktika und viele gute fachliche Gespräche.

Meinen Laborkollegen *Dr. Thomas Lubert, Judy Metzigt, Marcel Lück* und *Susanne Bänsch* danke ich für die hervorragende Laboratmosphäre und viele lustige Stunden.

Dr. Lukas Perkams, Dr. Manuel Mönnich, Hendrik Hessefort, Konstantin Dieterle und *Johannes Zinggisser* danke ich für das Messen der NMR-Spektren.

Dr. Christopher Graf, Dr. Thomas Lubert, Dr. Simone Seeleitner, Dr. Marissa Rädisch, Elisabeth Rozanski, Marie Lott, Sascha Weidler, David Rau, Kevin Lam, Hendrik und Markus Hessefort und *Theo Karagiannis* danke ich für die Durchführung der LC-MS und HR-MS-Analysen.

Silvia Bernsdorf, Robert Semanca und *Volker Schubert* danke ich für die Destillation der Lösungsmittel, Bestellung von Chemikalien, Reparatur und Instandhaltung der Geräte und Hilfe bei tausend-und-eins kleinen Problemen.

Traudl Herold und *Silvia Kastner* danke ich für die tatkräftige Unterstützung im Sekretariat

Ich bedanke mich auch bei meinen zahllosen Praktikantinnen und Praktikanten für ihre Mithilfe.

Ihr habt meinen Laboralltag sehr viel abwechslungsreicher gemacht!

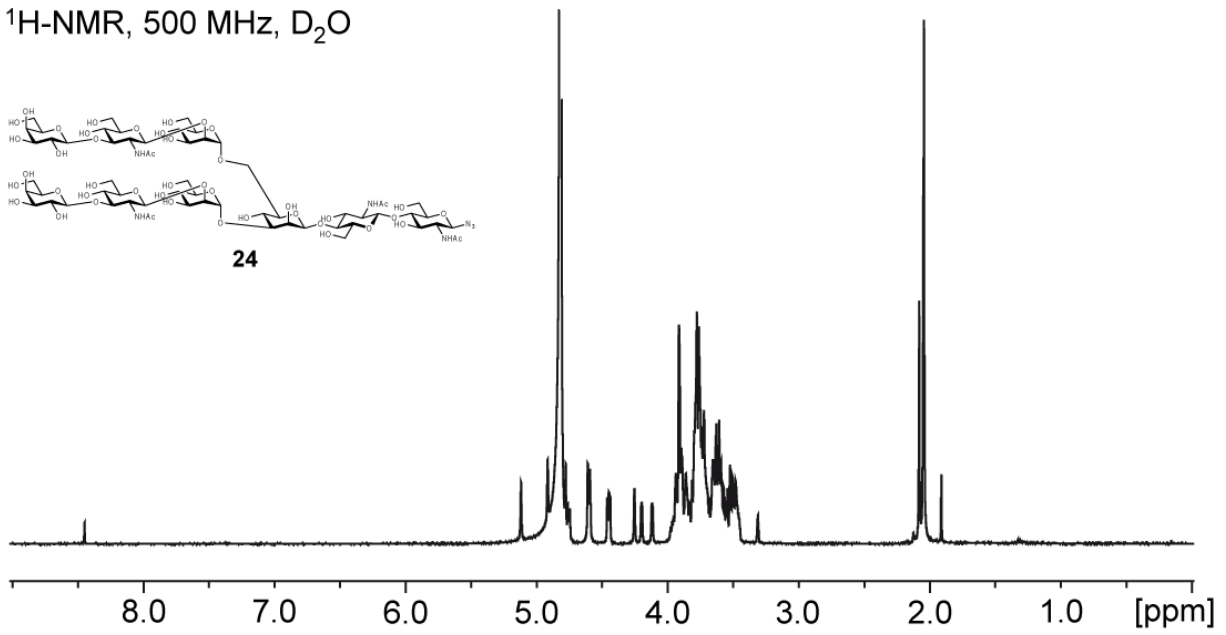
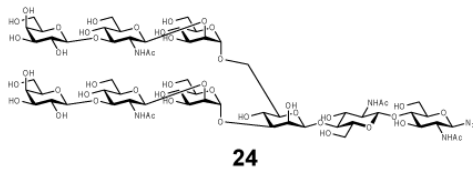
Ein großer Dank geht an meine Freunde, vor allem an *Klaus, Tim, Franny* und *Matthias*, die mich neben der Promotion immer unterstützt und ab und an aufgefangen haben. Ohne euch wäre ich nicht wo ich heute bin.

Ein weiterer großer Dank geht an meine Familie, meine *Eltern* und *Großeltern* die mich immer unterstützt haben und meine wundervolle Schwester *Isabel*, die immer an mich geglaubt hat, ohne wenn und aber.

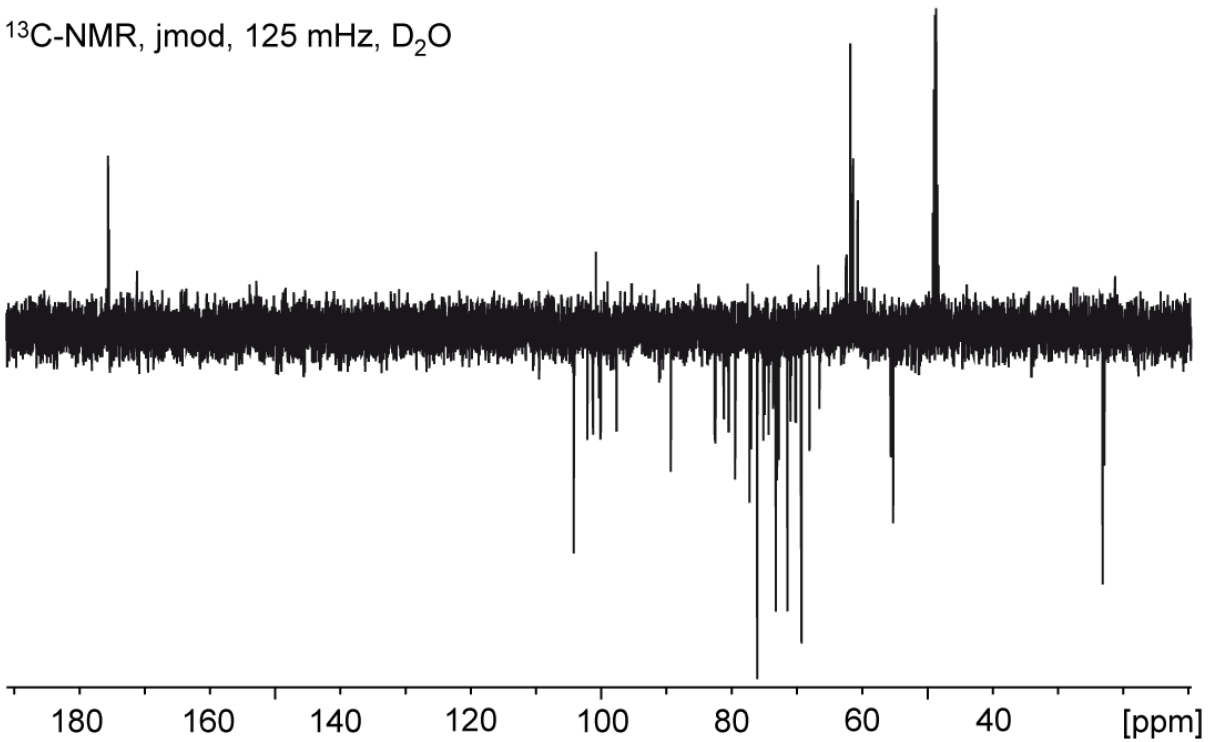
Ein letztes großes Danke geht an meinen Lebenspartner *Matthias*. Du bist bei mir seit ich diese Arbeit begonnen habe und hast mit mir durchgehalten. Ich freue mich unendlich auf die Zukunft mit dir!

Anhang

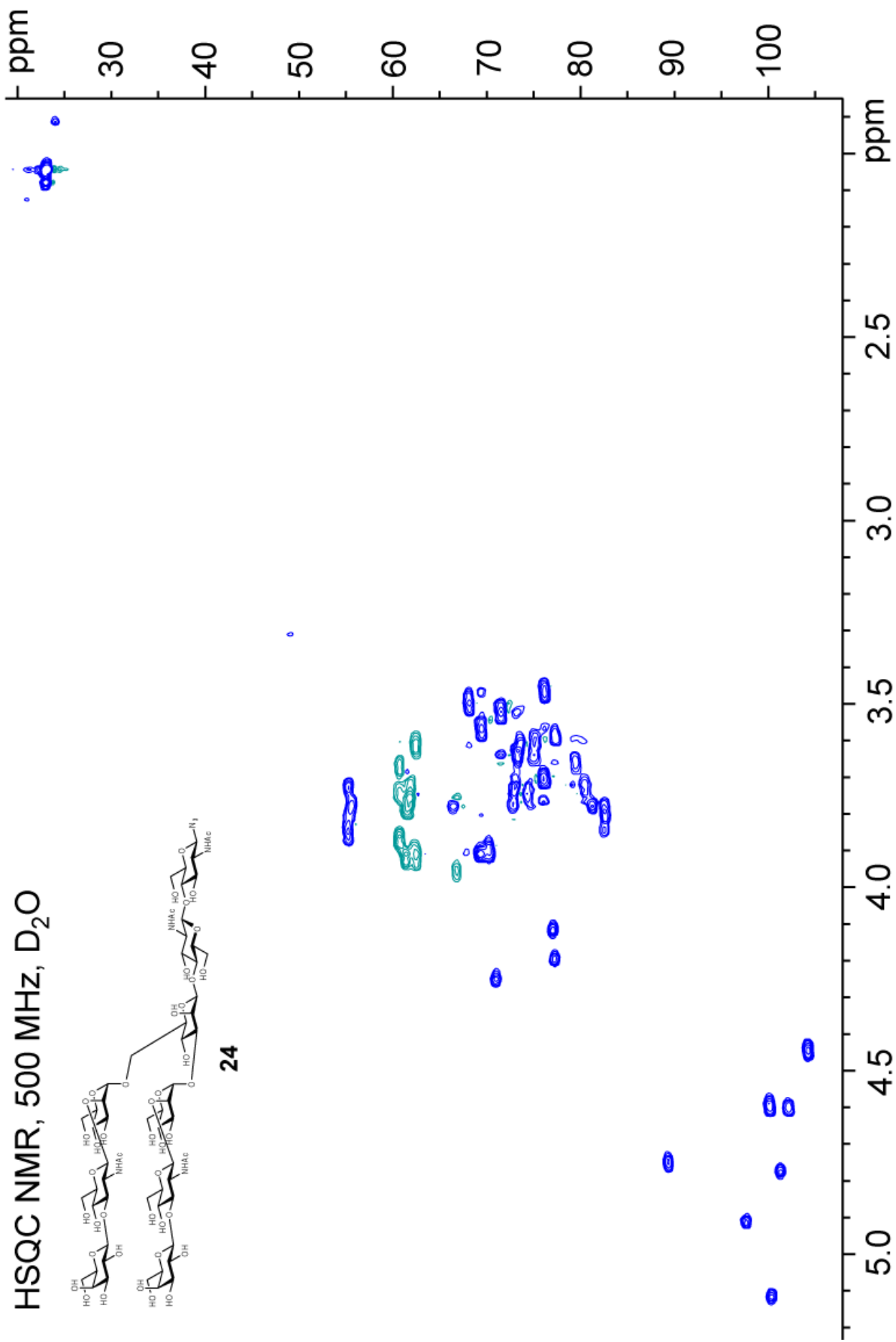
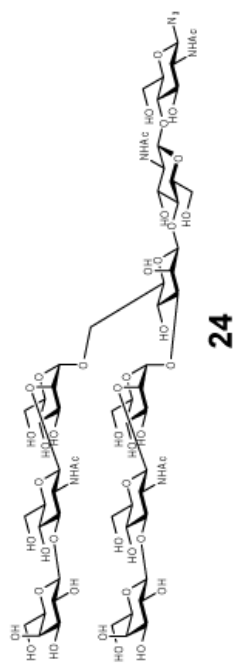
$^1\text{H-NMR}$, 500 MHz, D_2O



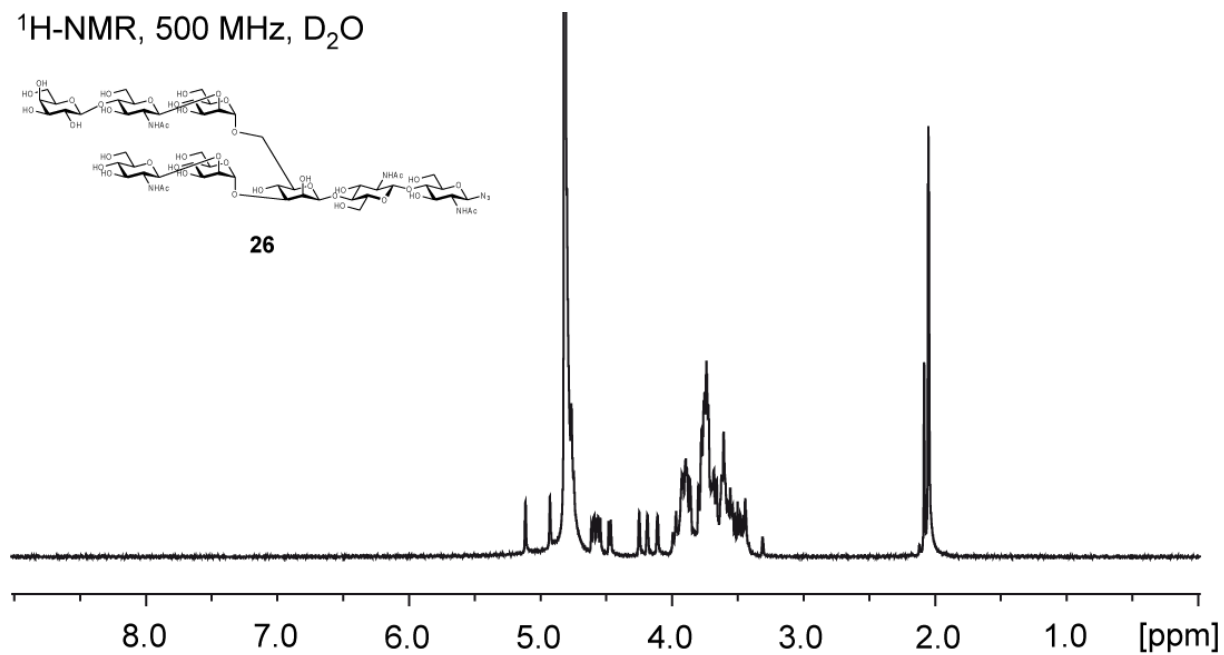
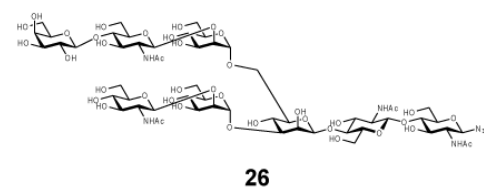
$^{13}\text{C-NMR}$, jmod, 125 MHz, D_2O



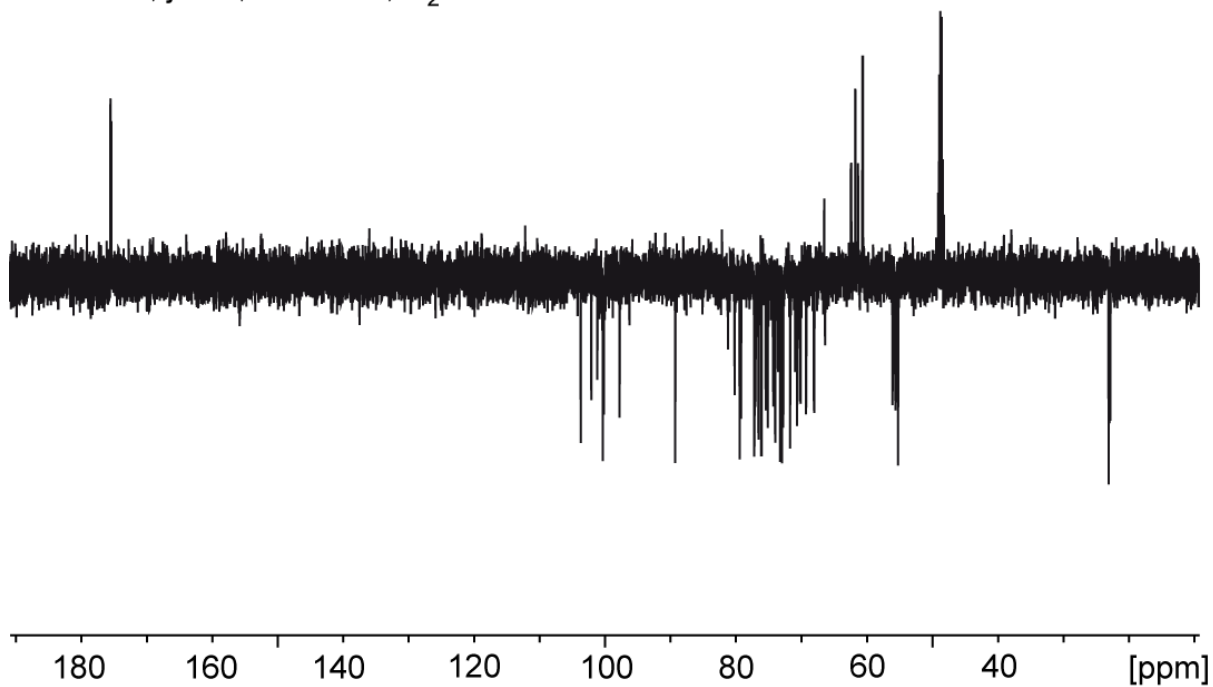
HSQC NMR, 500 MHz, D₂O



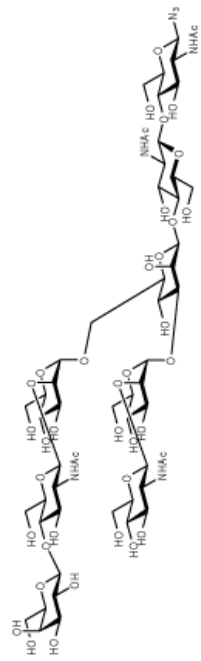
$^1\text{H-NMR}$, 500 MHz, D_2O



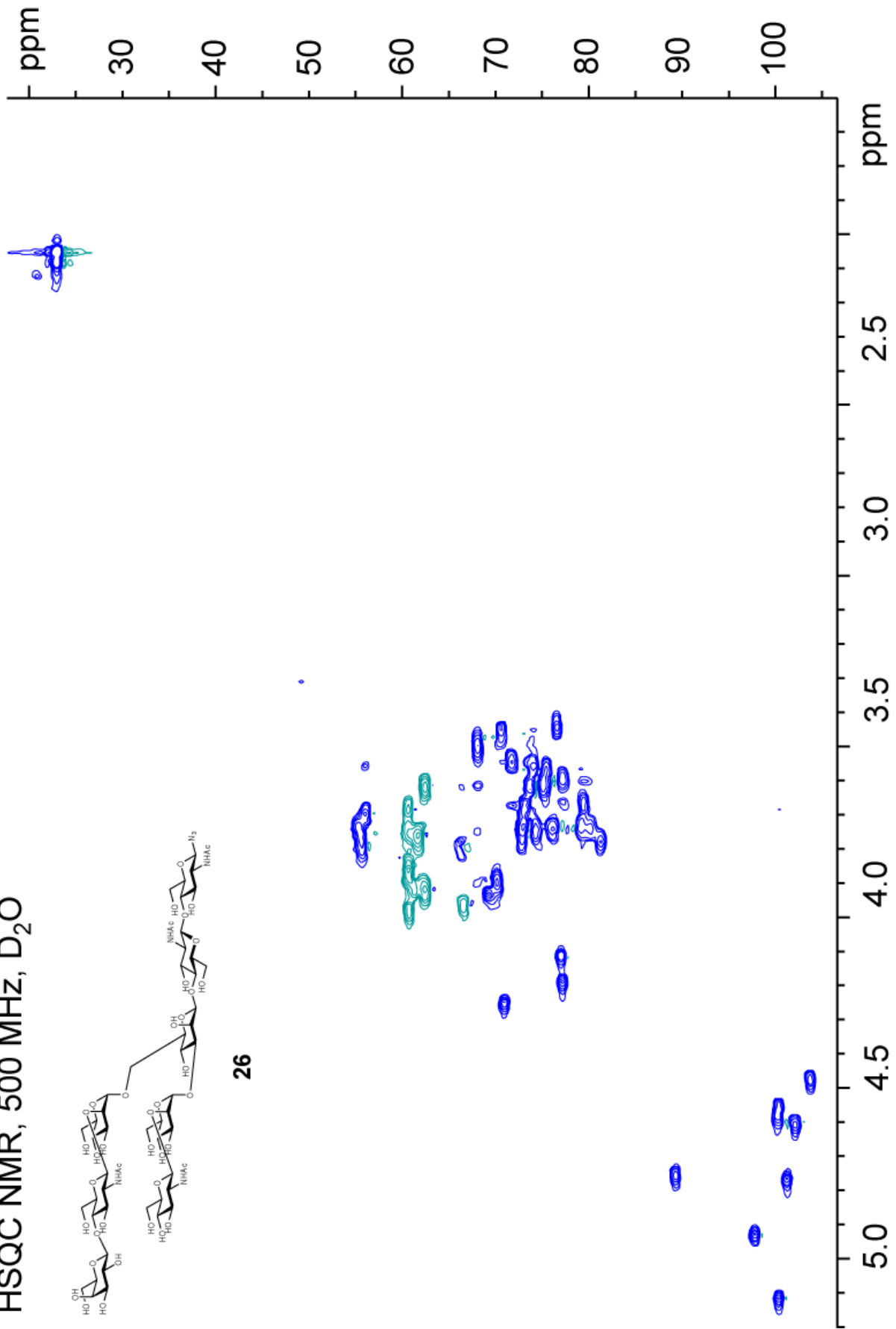
$^{13}\text{C-NMR}$, jmod, 125 mHz, D_2O



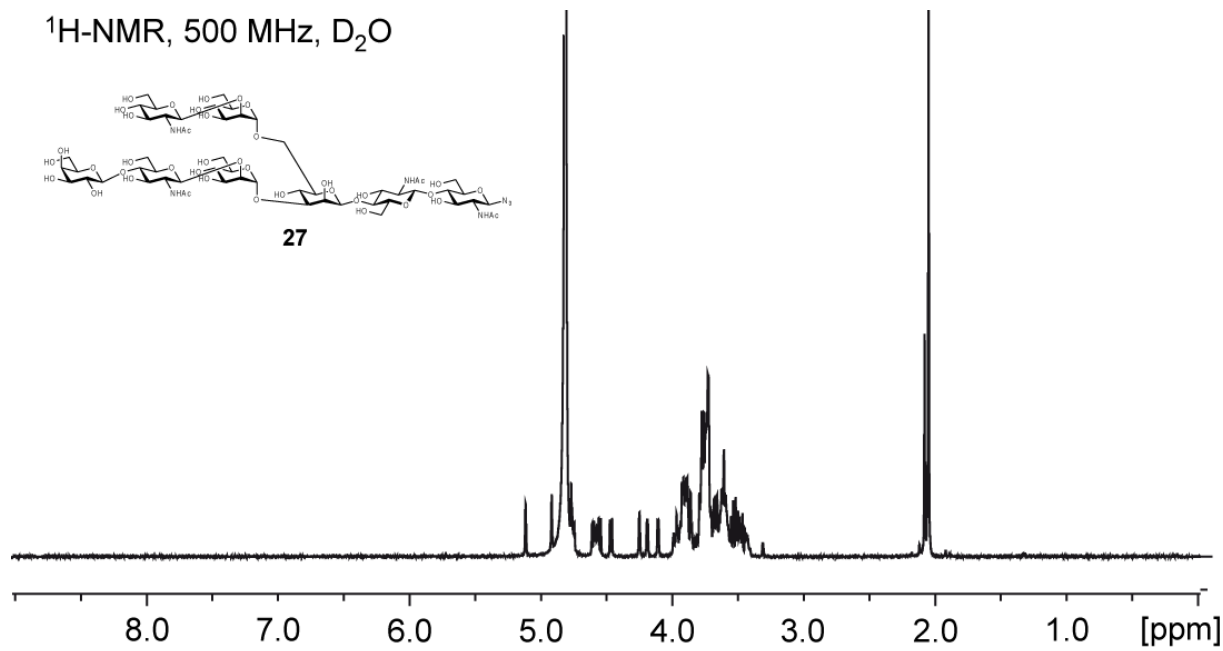
HSQC NMR, 500 MHz, D₂O



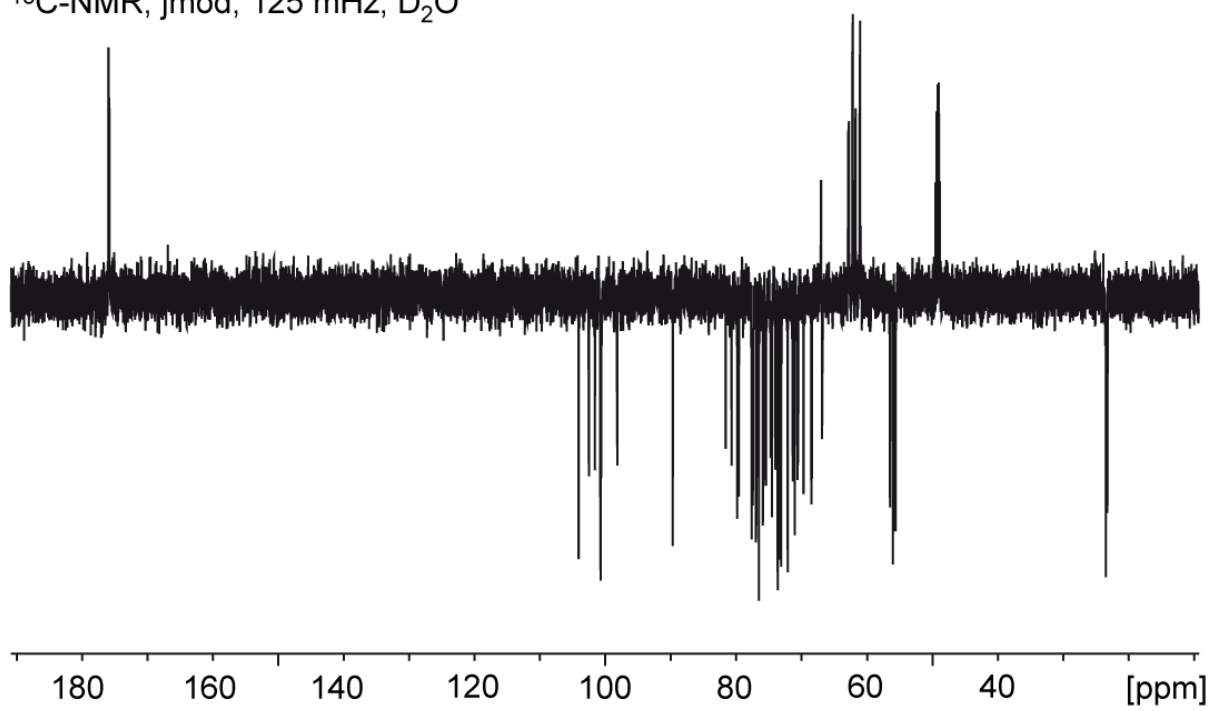
26



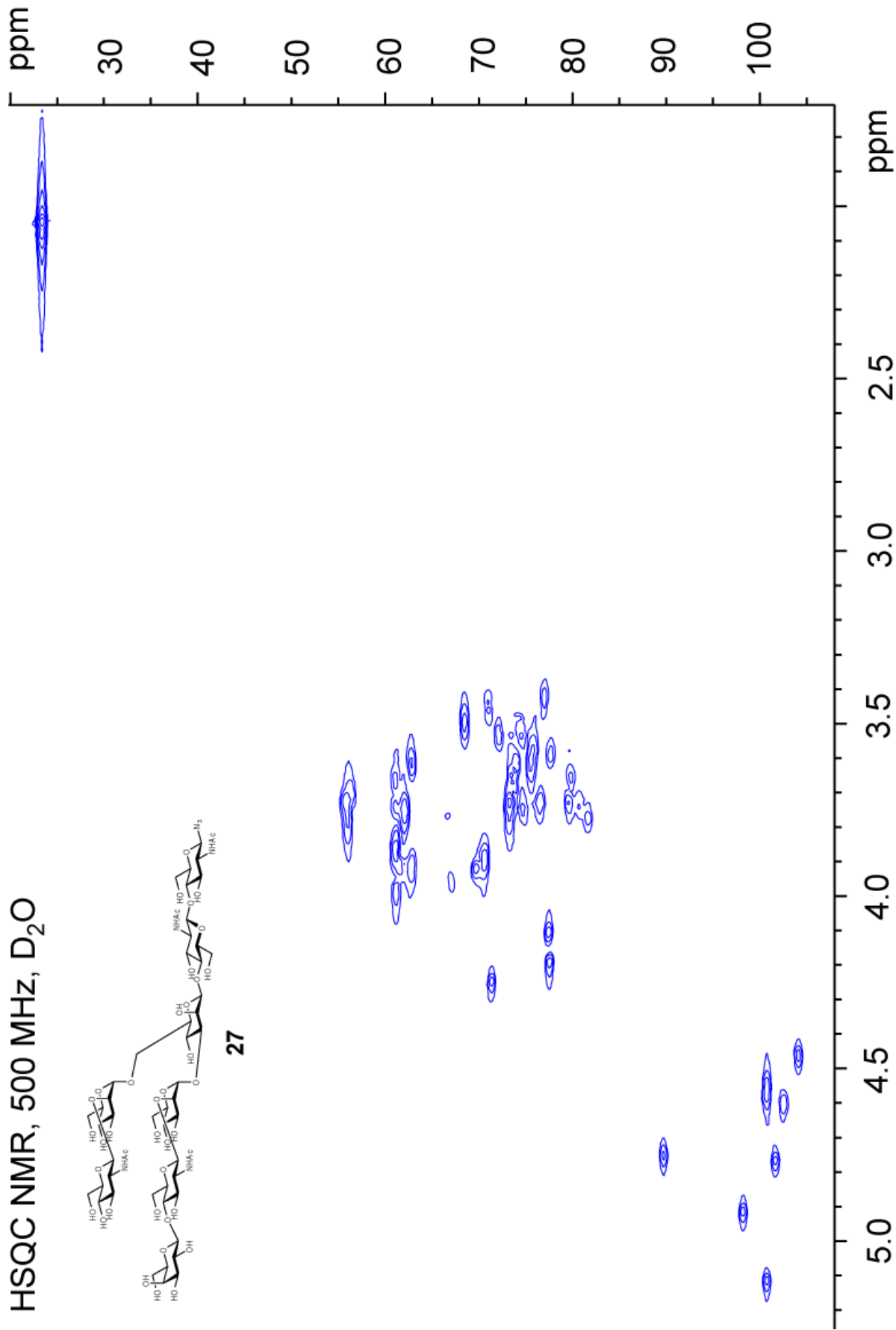
$^1\text{H-NMR}$, 500 MHz, D_2O

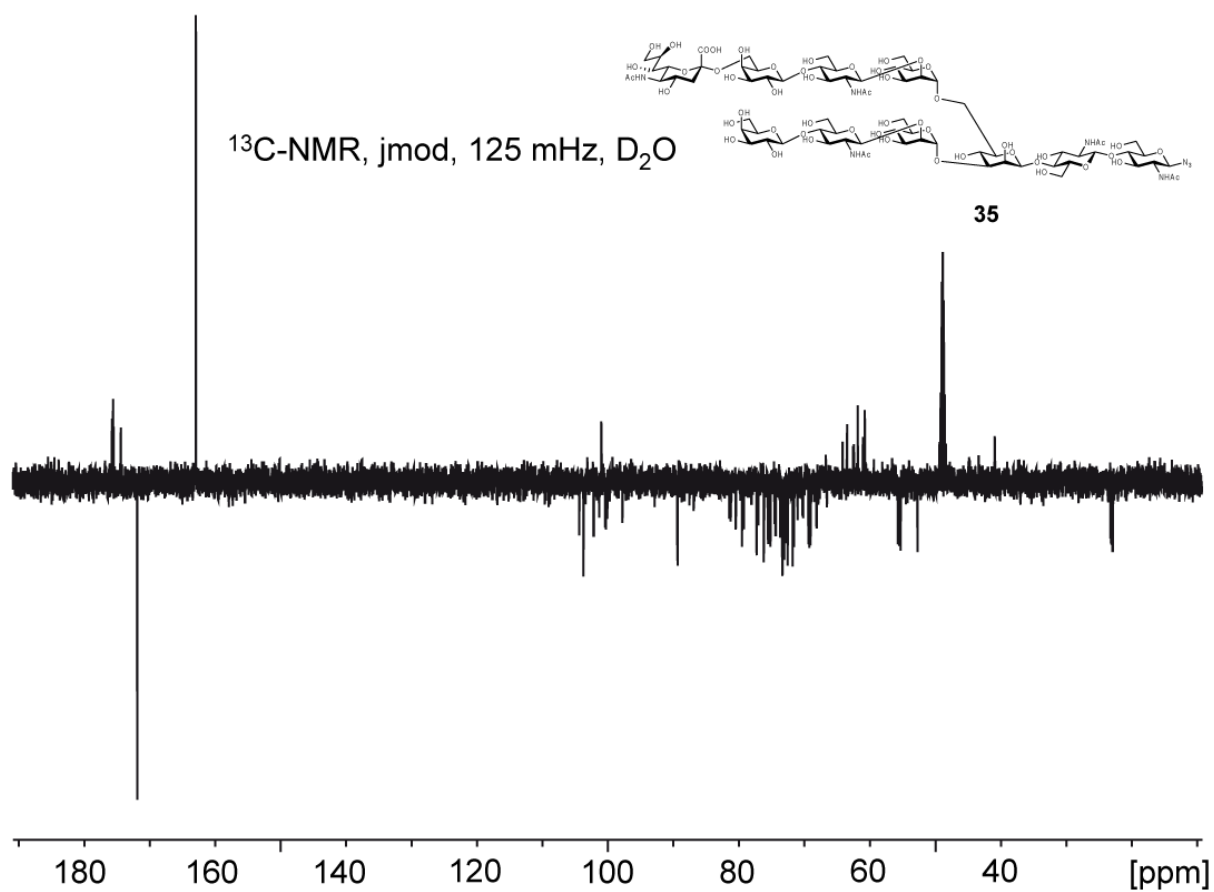
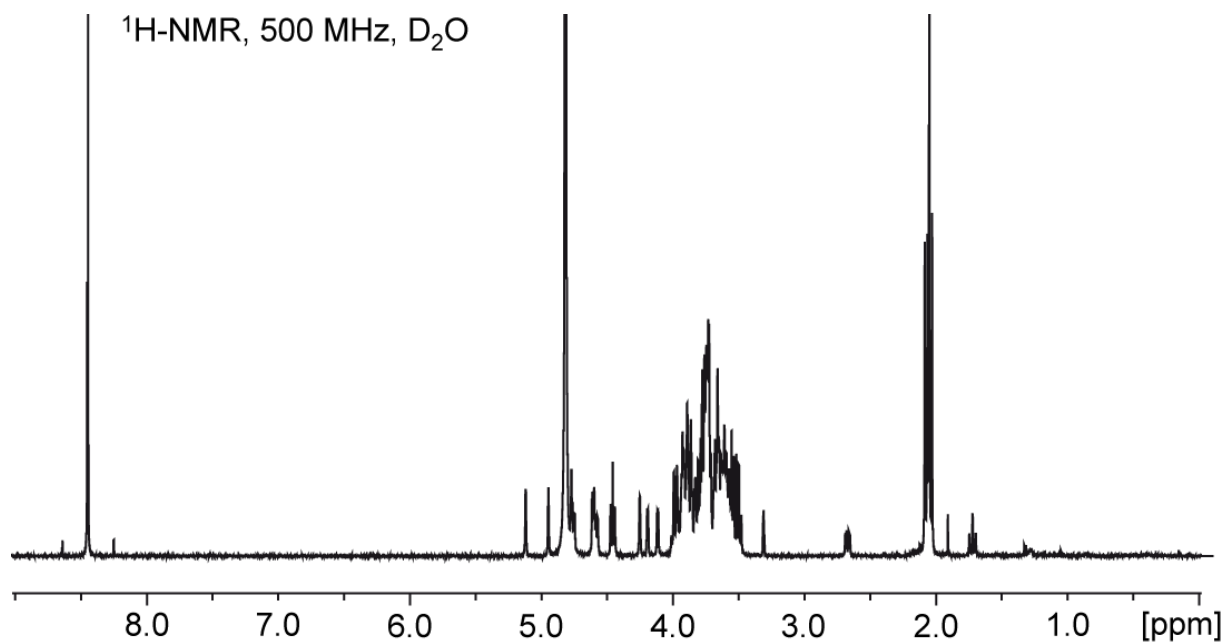


$^{13}\text{C-NMR}$, jmod, 125 MHz, D_2O

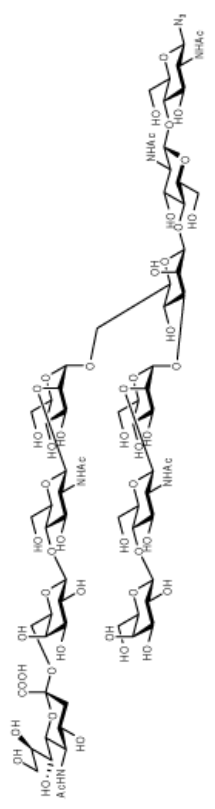


HSQC NMR, 500 MHz, D₂O

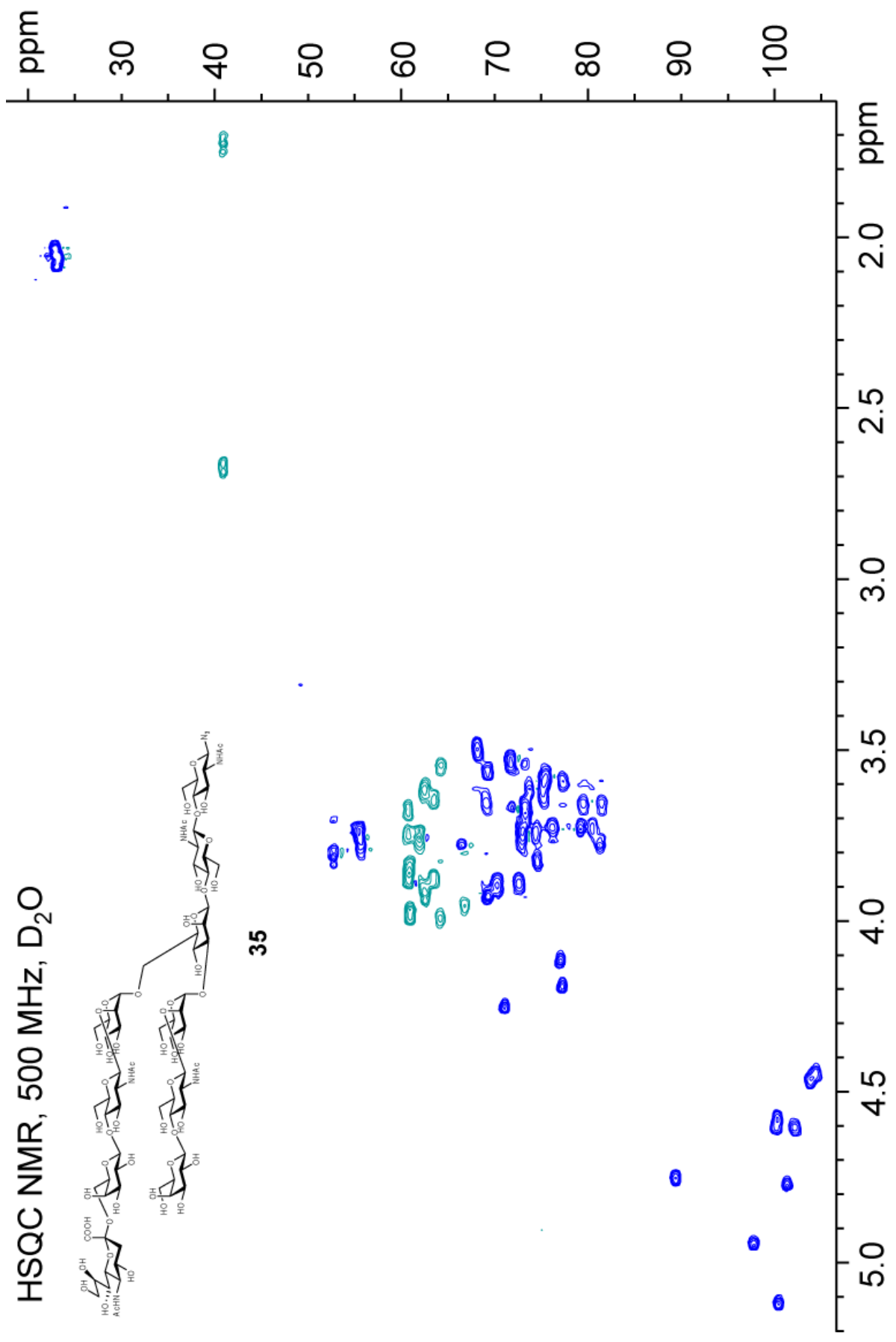


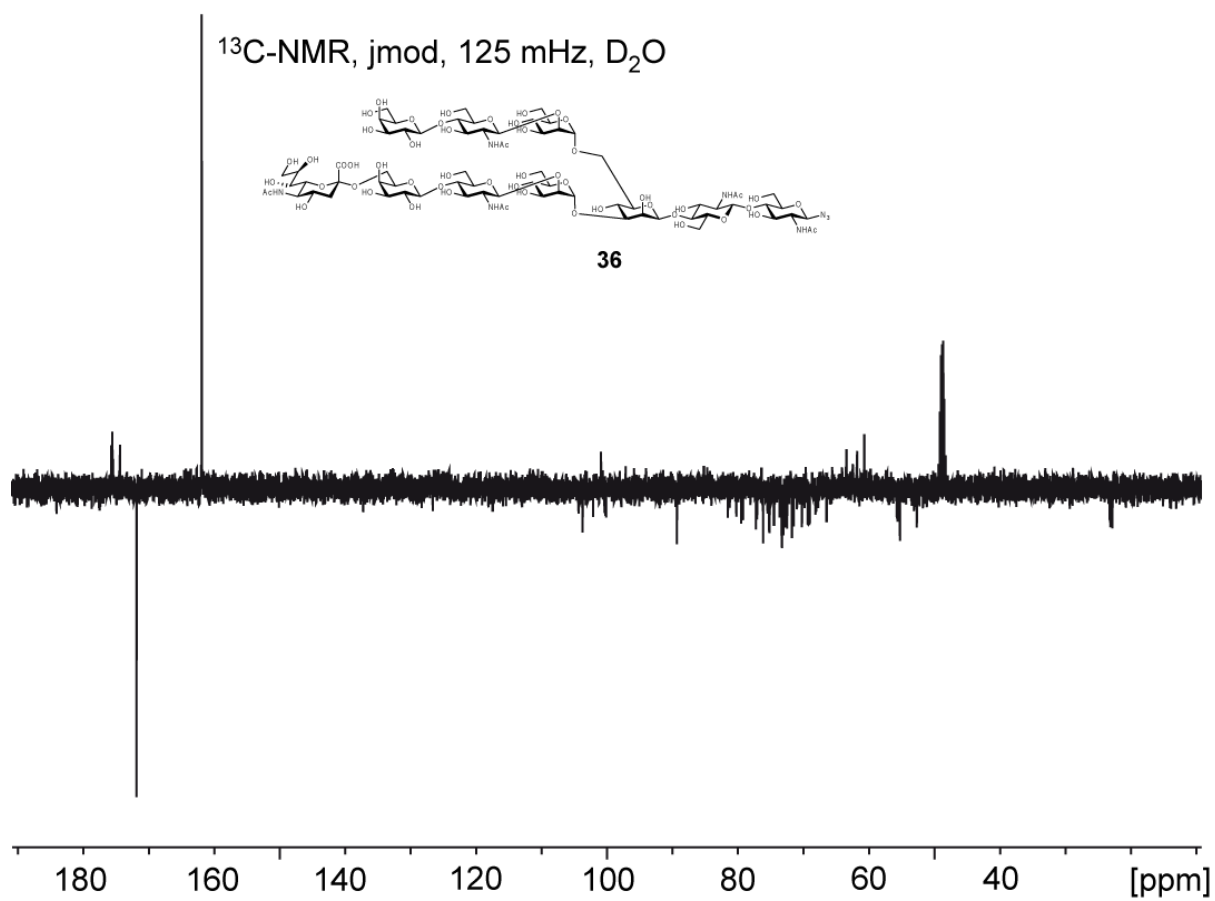
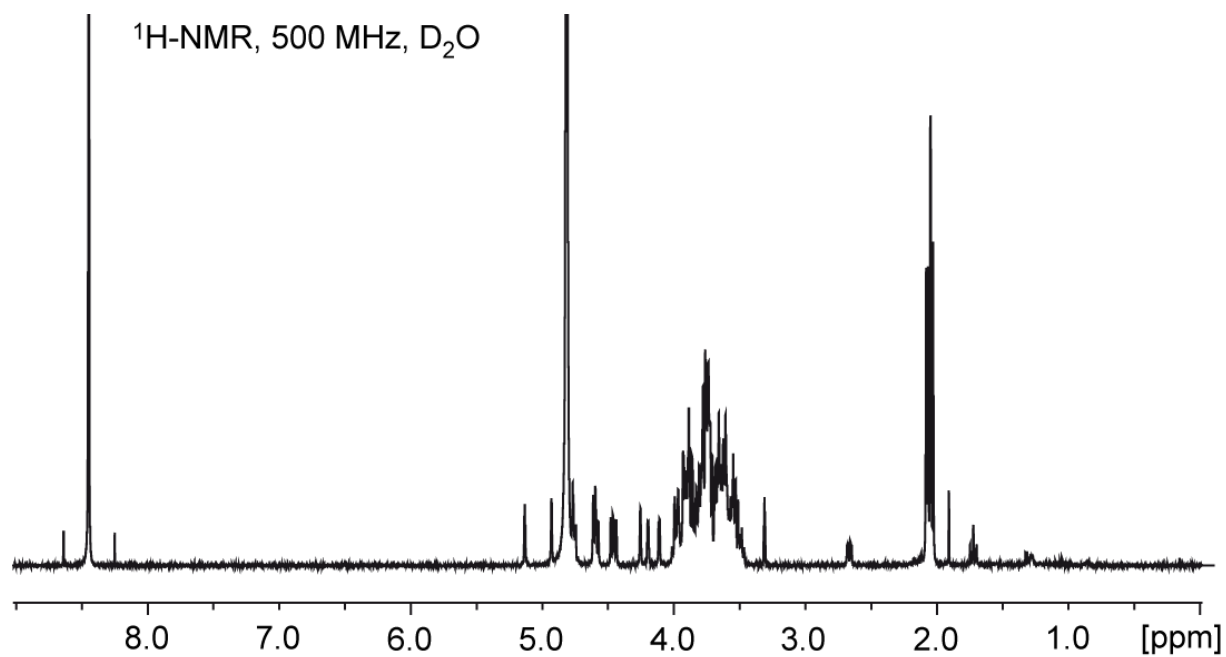


HSQC NMR, 500 MHz, D₂O

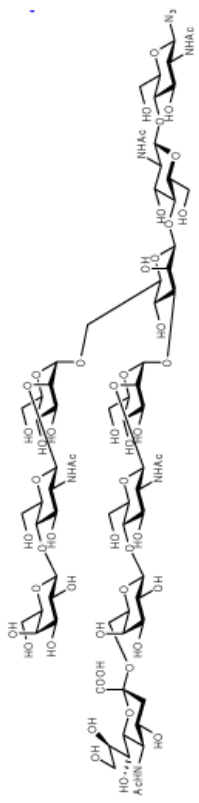


35

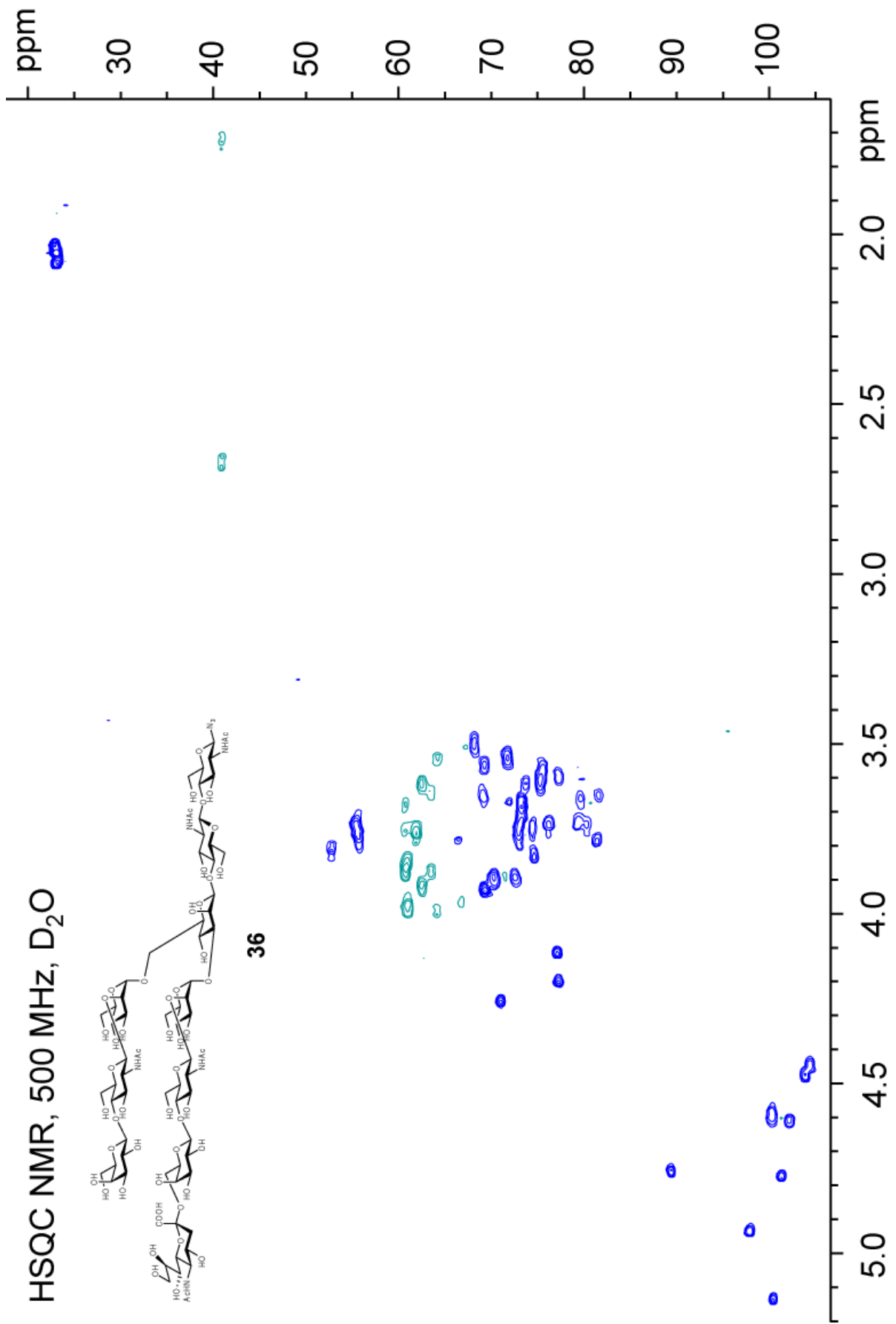




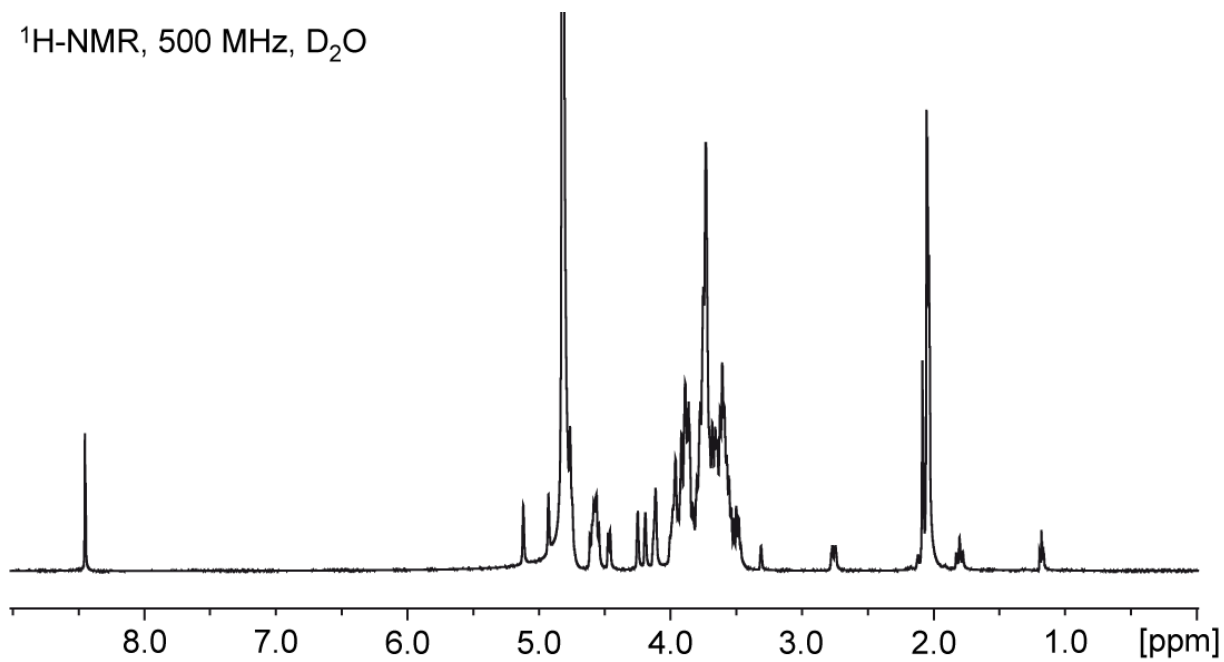
HSQC NMR, 500 MHz, D₂O



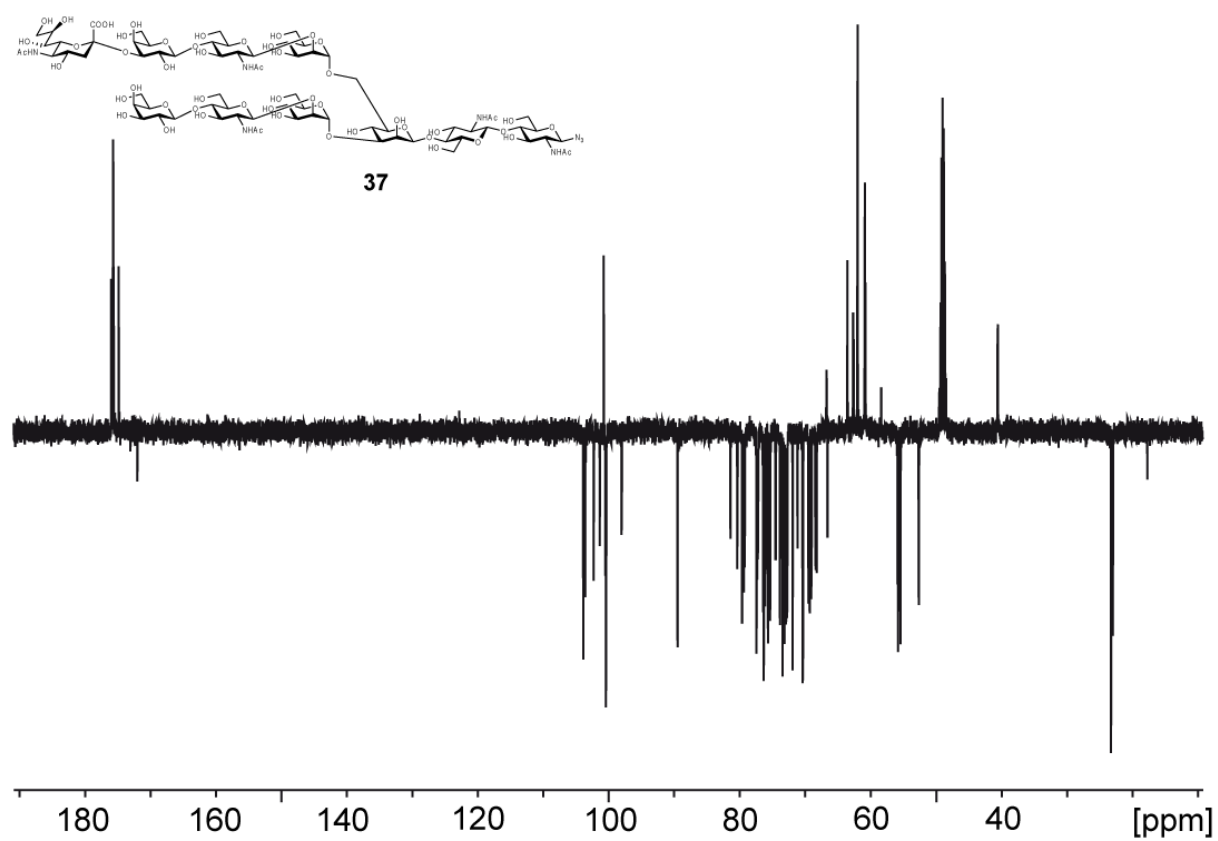
36



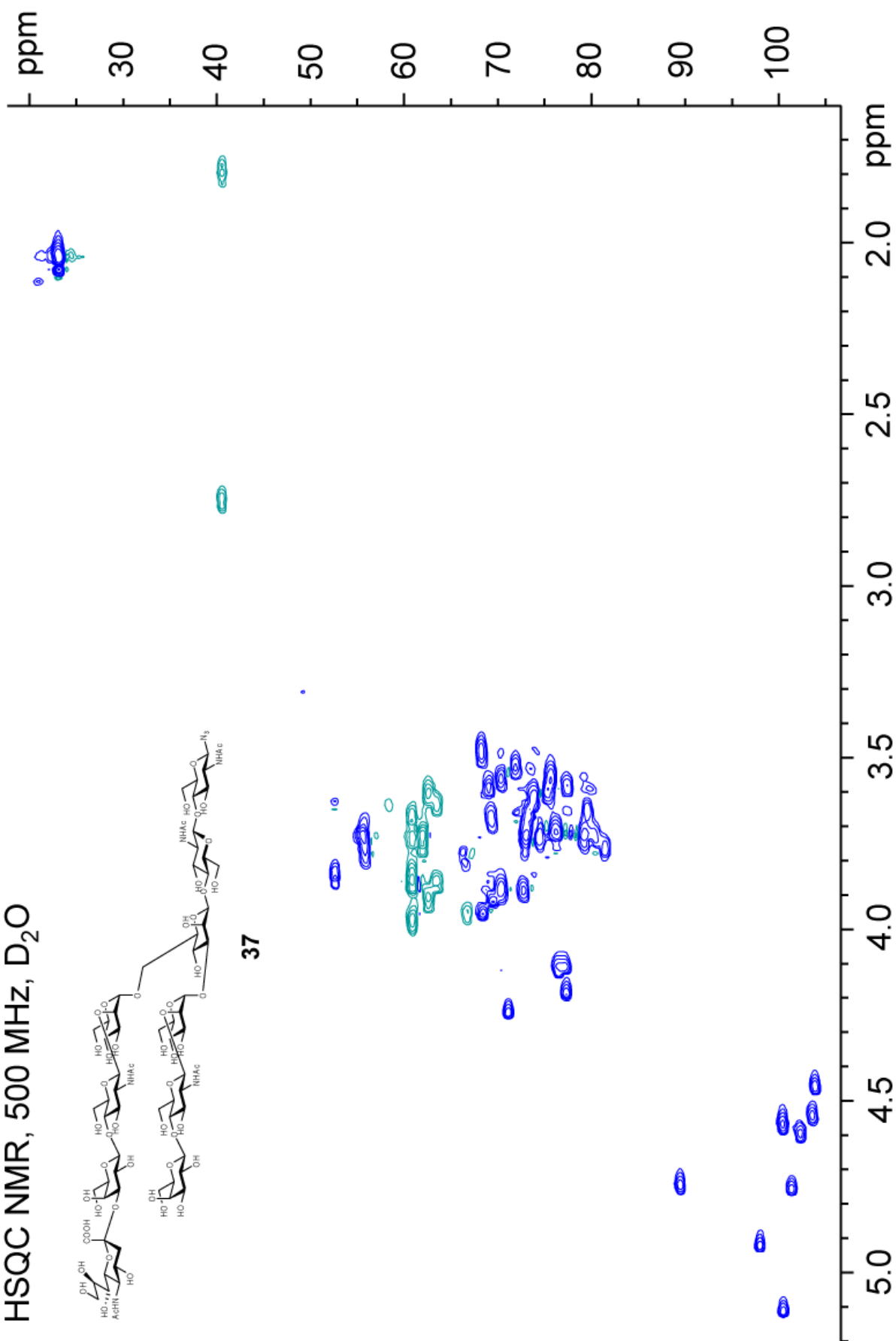
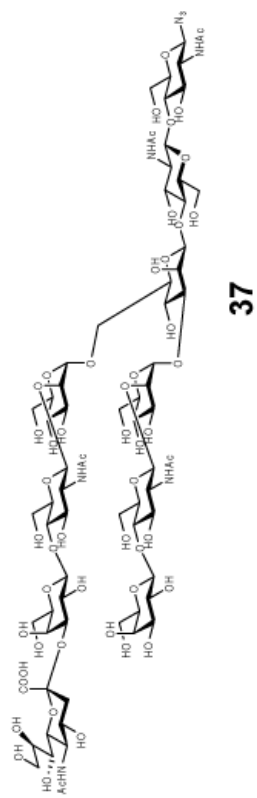
$^1\text{H-NMR}$, 500 MHz, D_2O



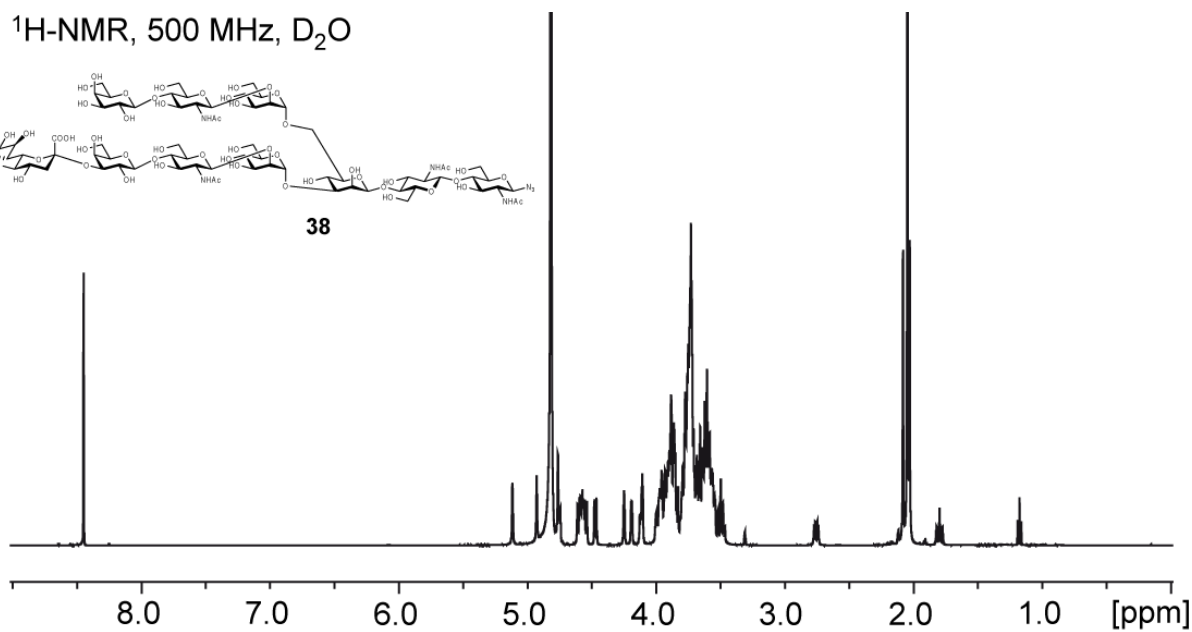
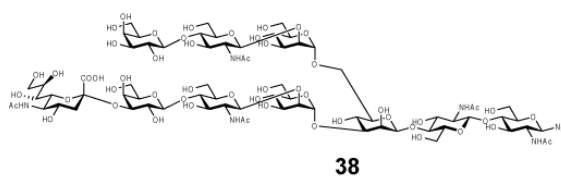
$^{13}\text{C-NMR}$, jmod, 125 MHz, D_2O



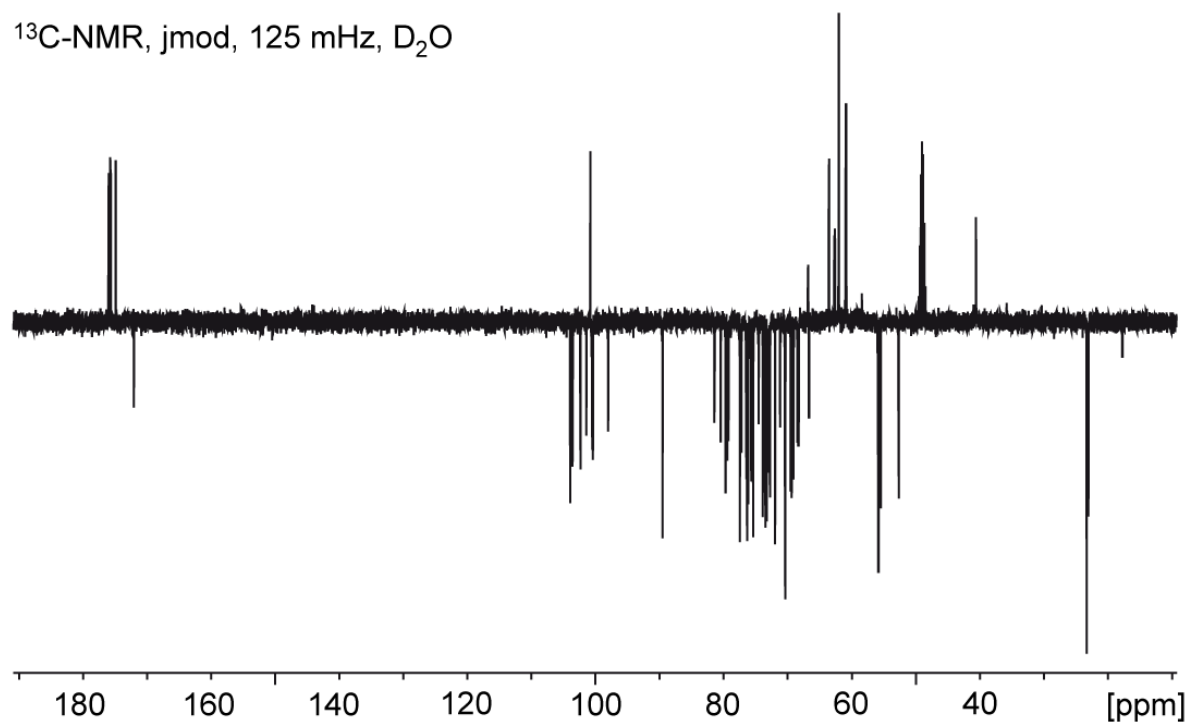
HSQC NMR, 500 MHz, D₂O



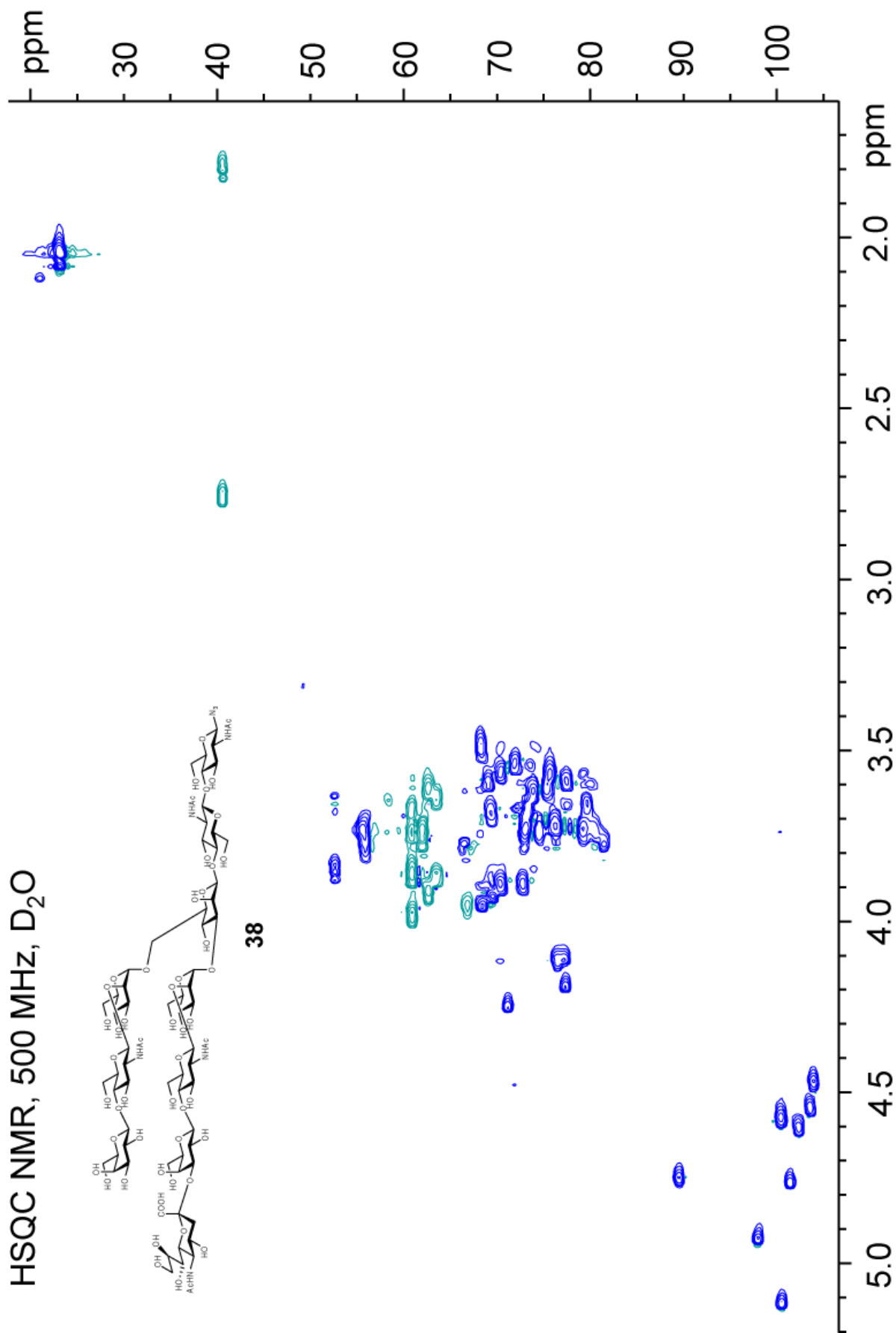
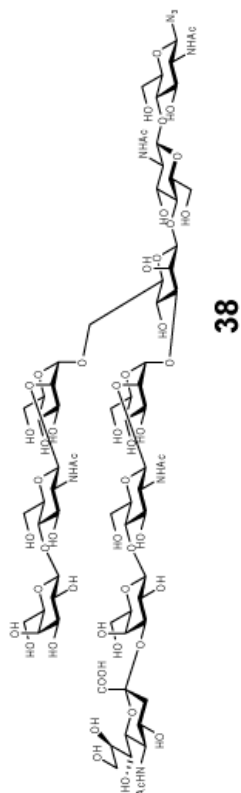
$^1\text{H-NMR}$, 500 MHz, D_2O

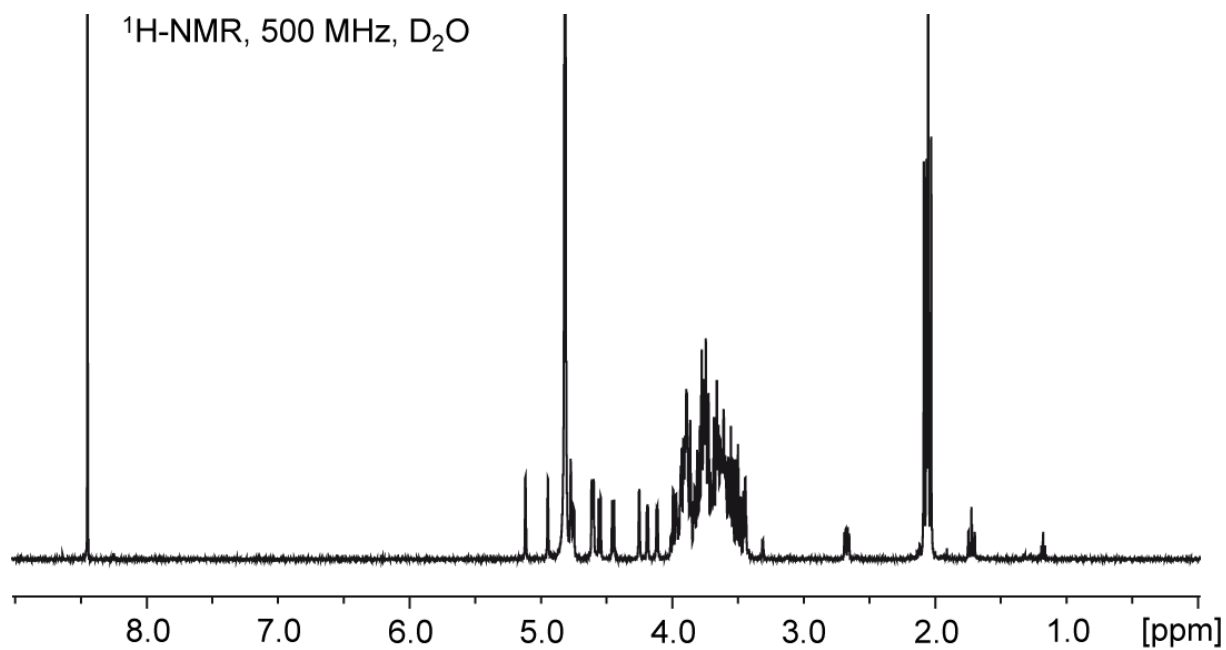


$^{13}\text{C-NMR}$, jmod, 125 MHz, D_2O

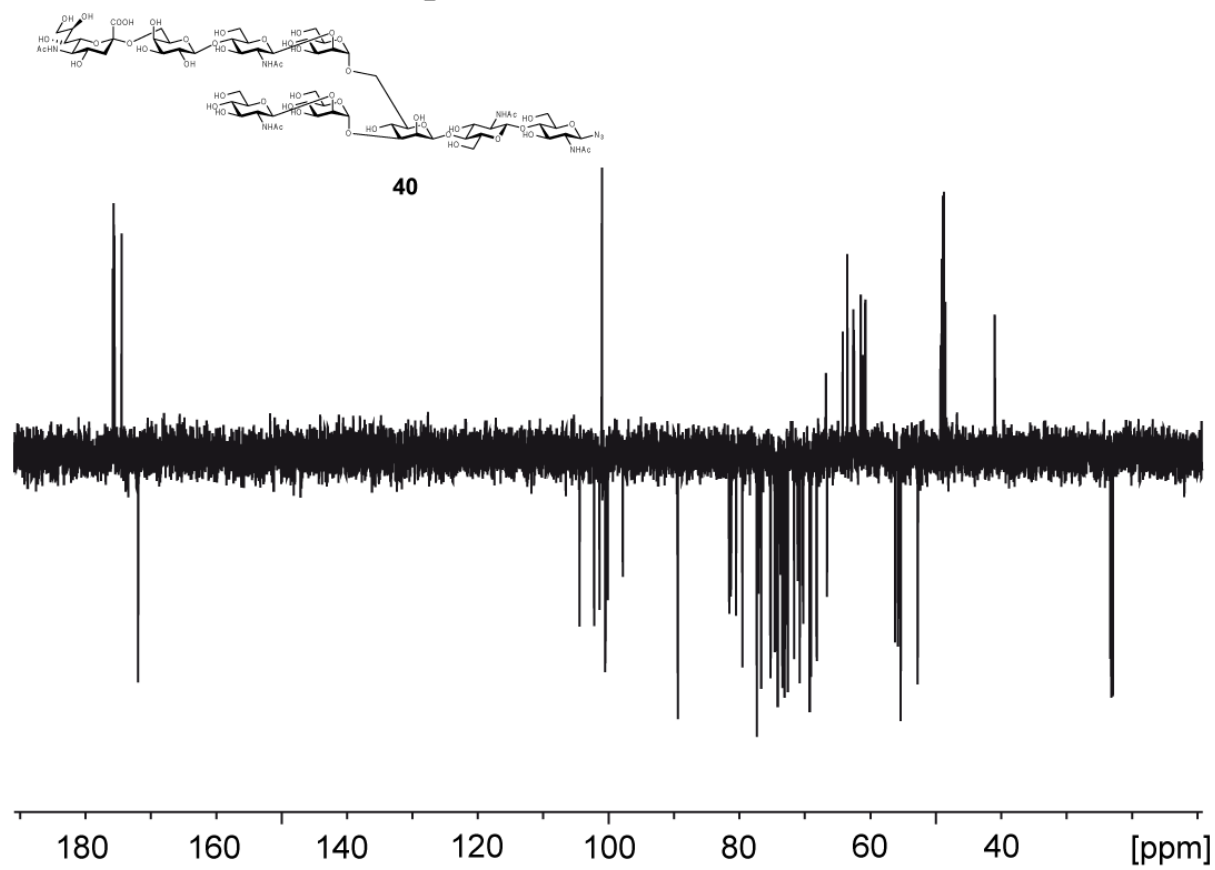


HSQC NMR, 500 MHz, D₂O

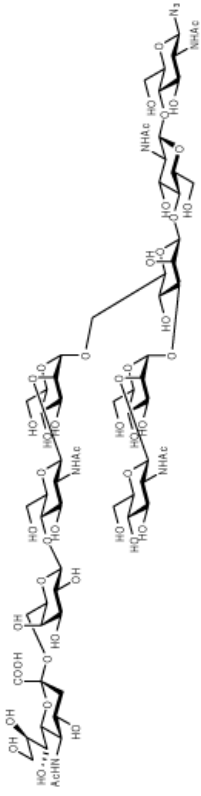




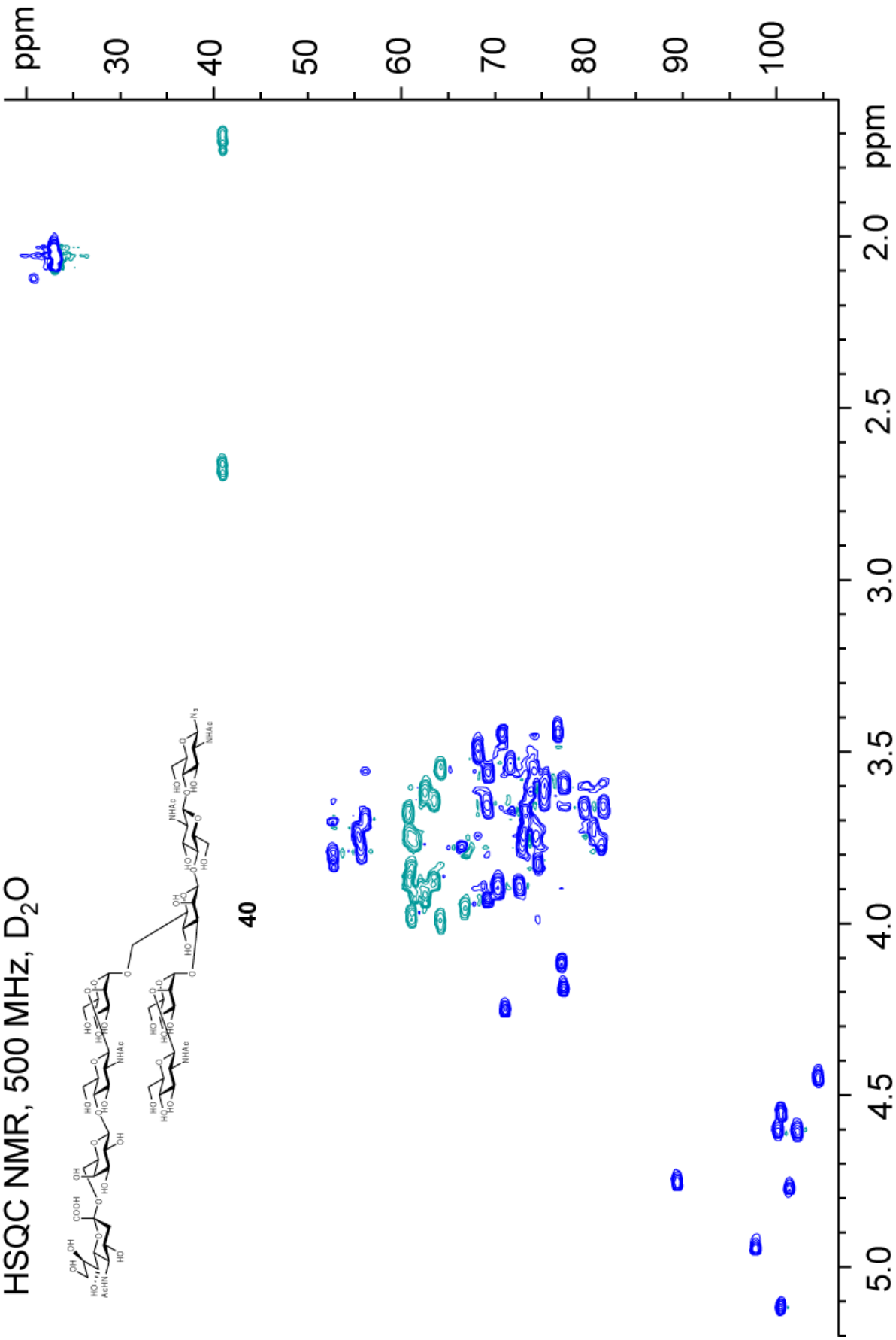
$^{13}\text{C-NMR}$, jmod, 125 MHz, D_2O

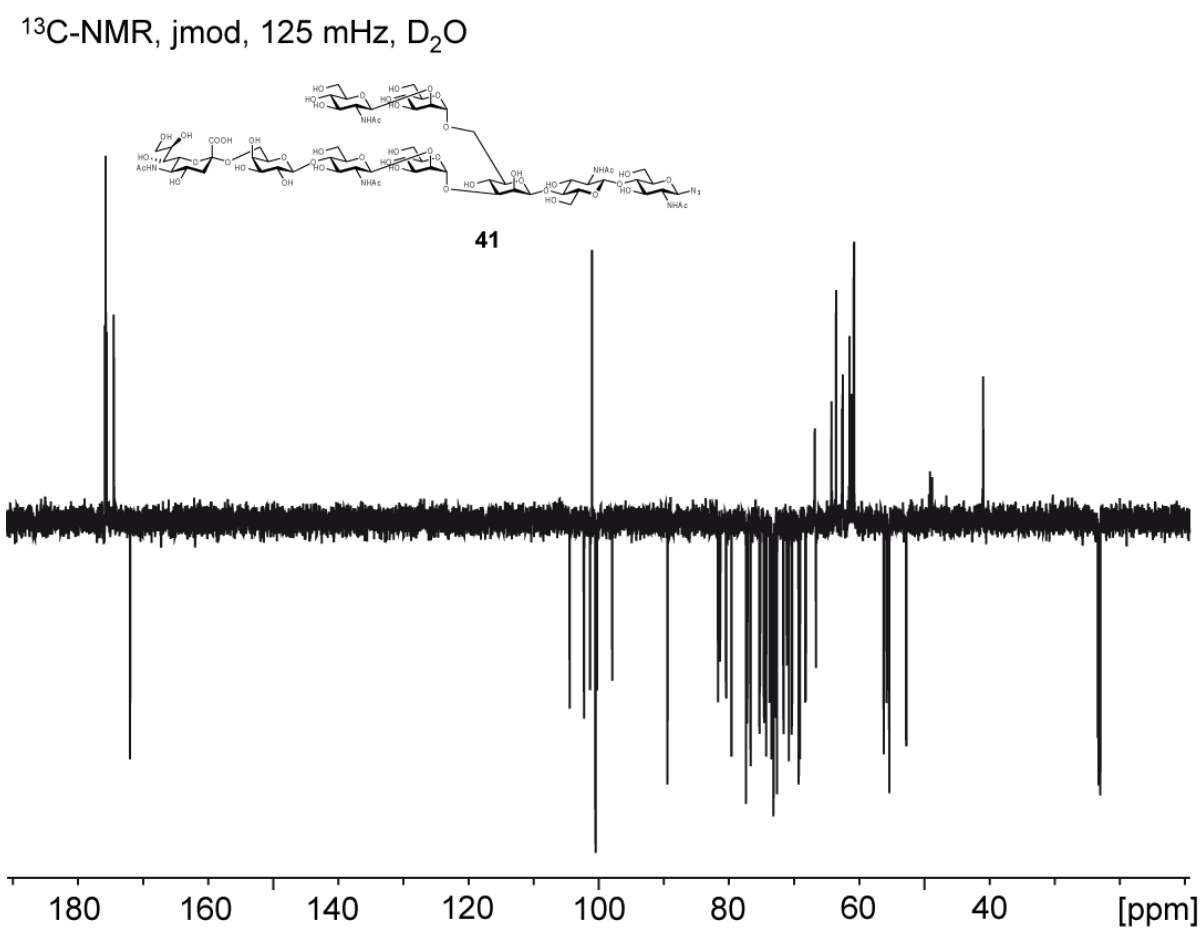
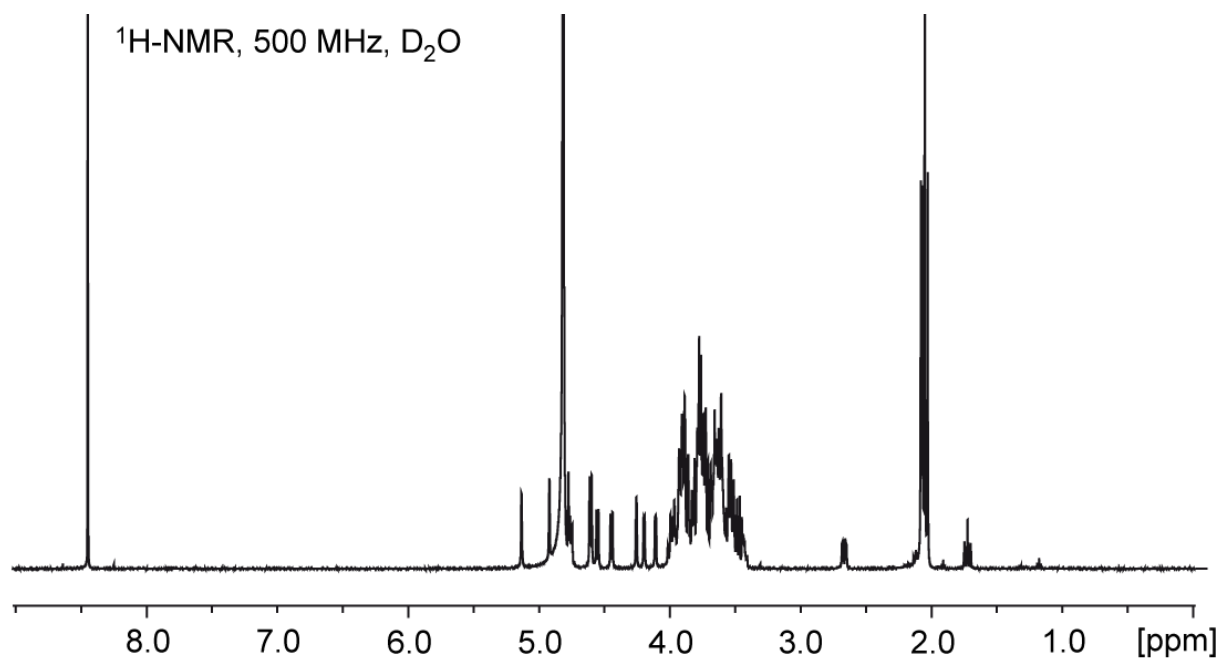


HSQC NMR, 500 MHz, D₂O

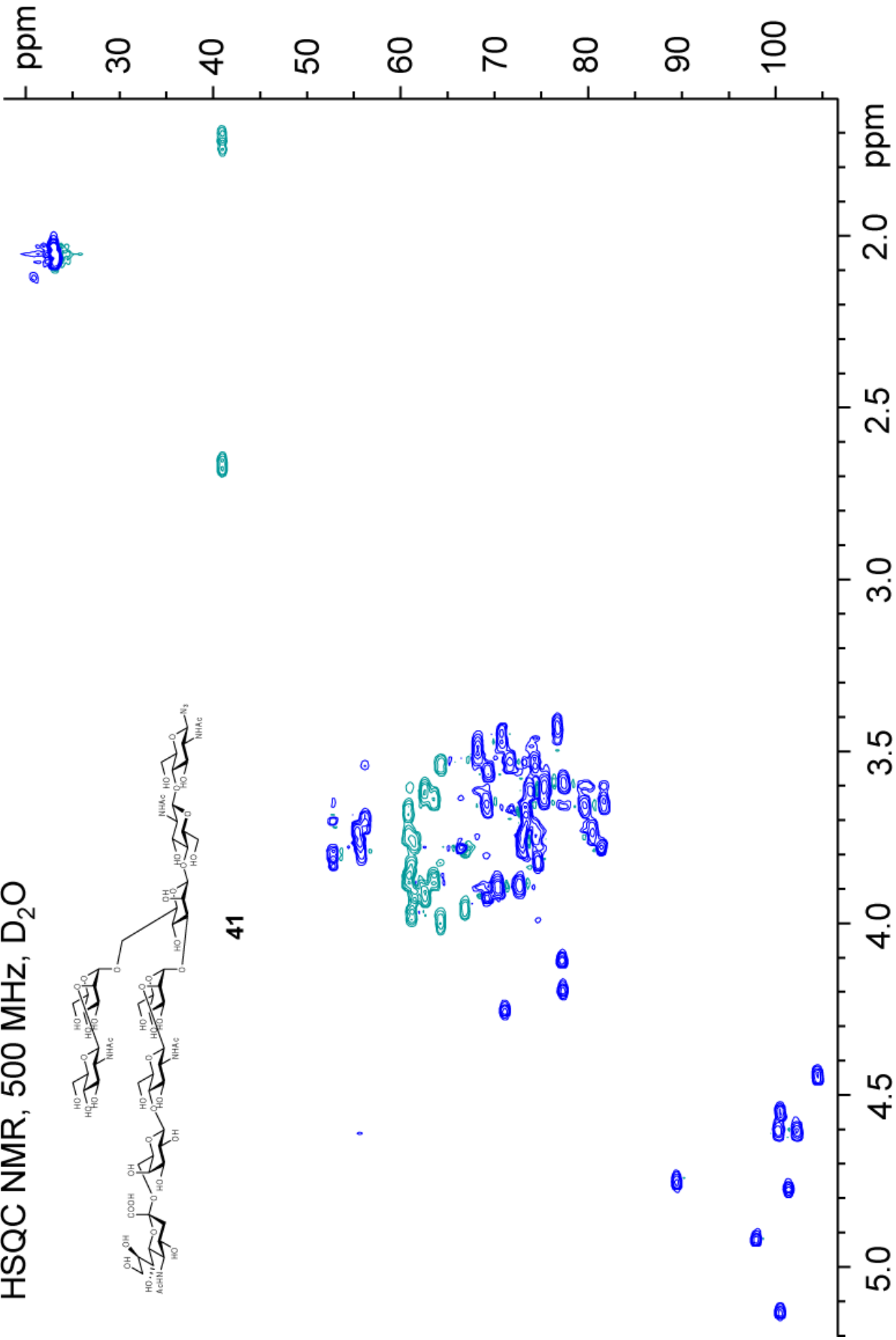


40

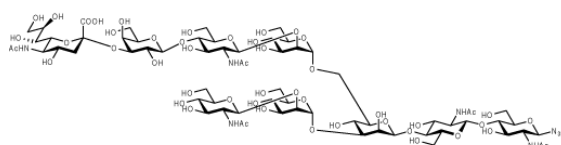




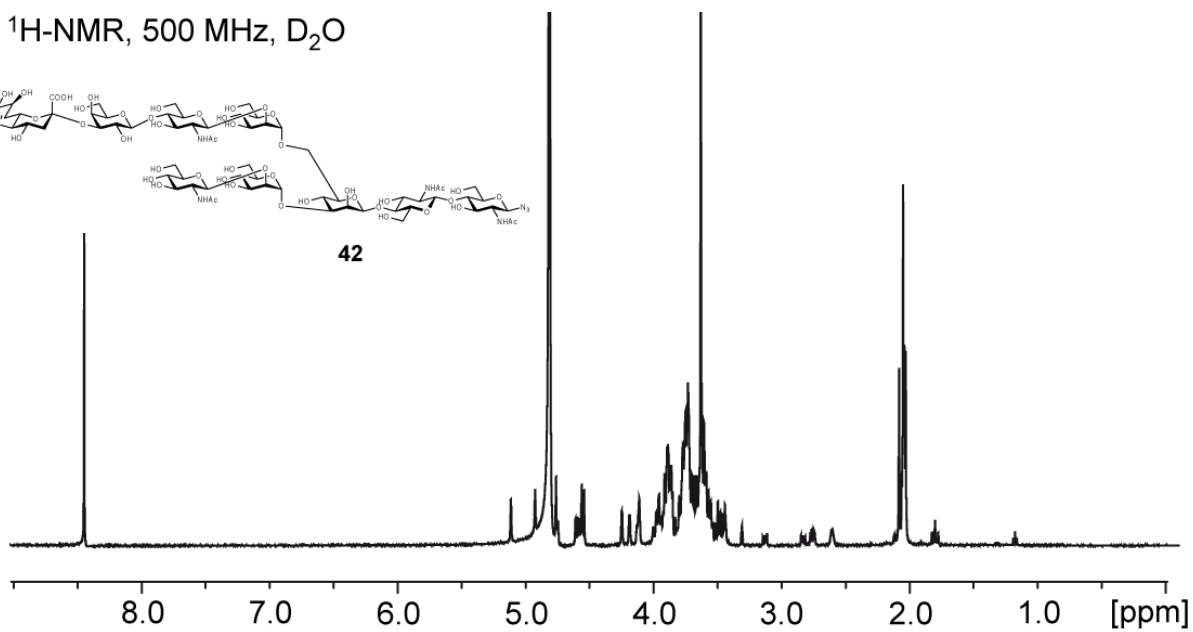
HSQC NMR, 500 MHz, D₂O



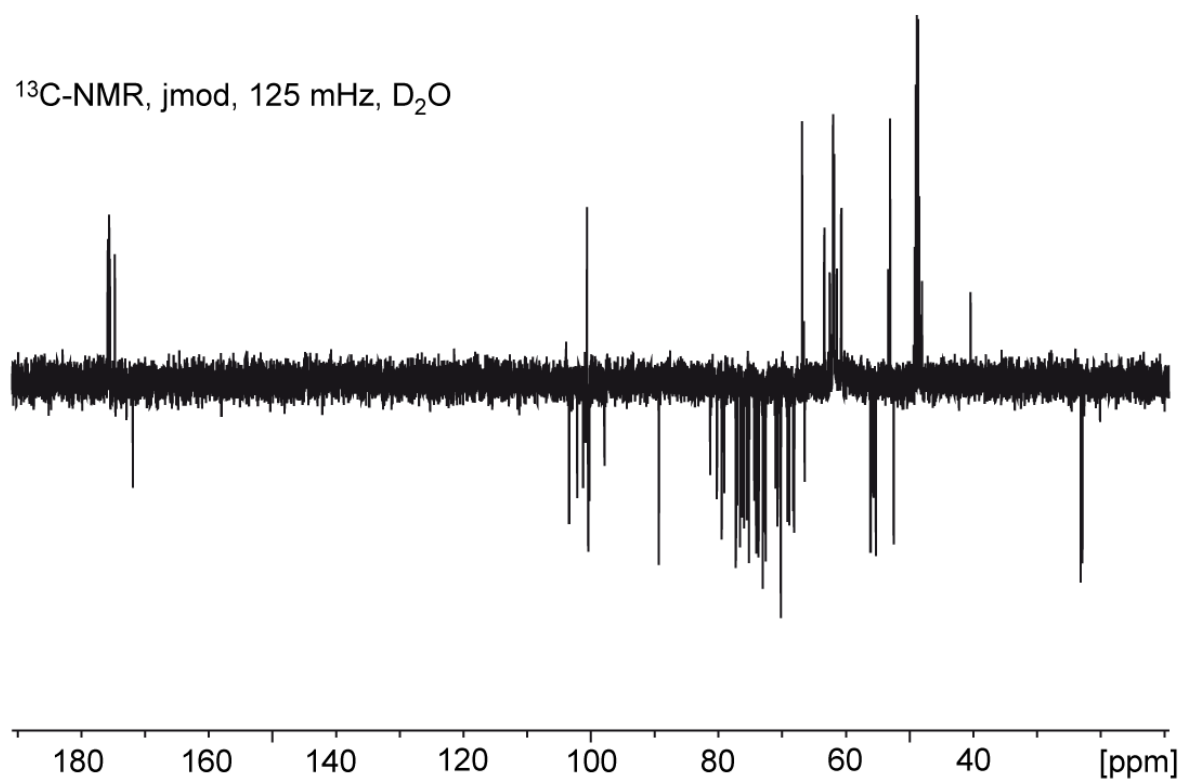
$^1\text{H-NMR}$, 500 MHz, D_2O



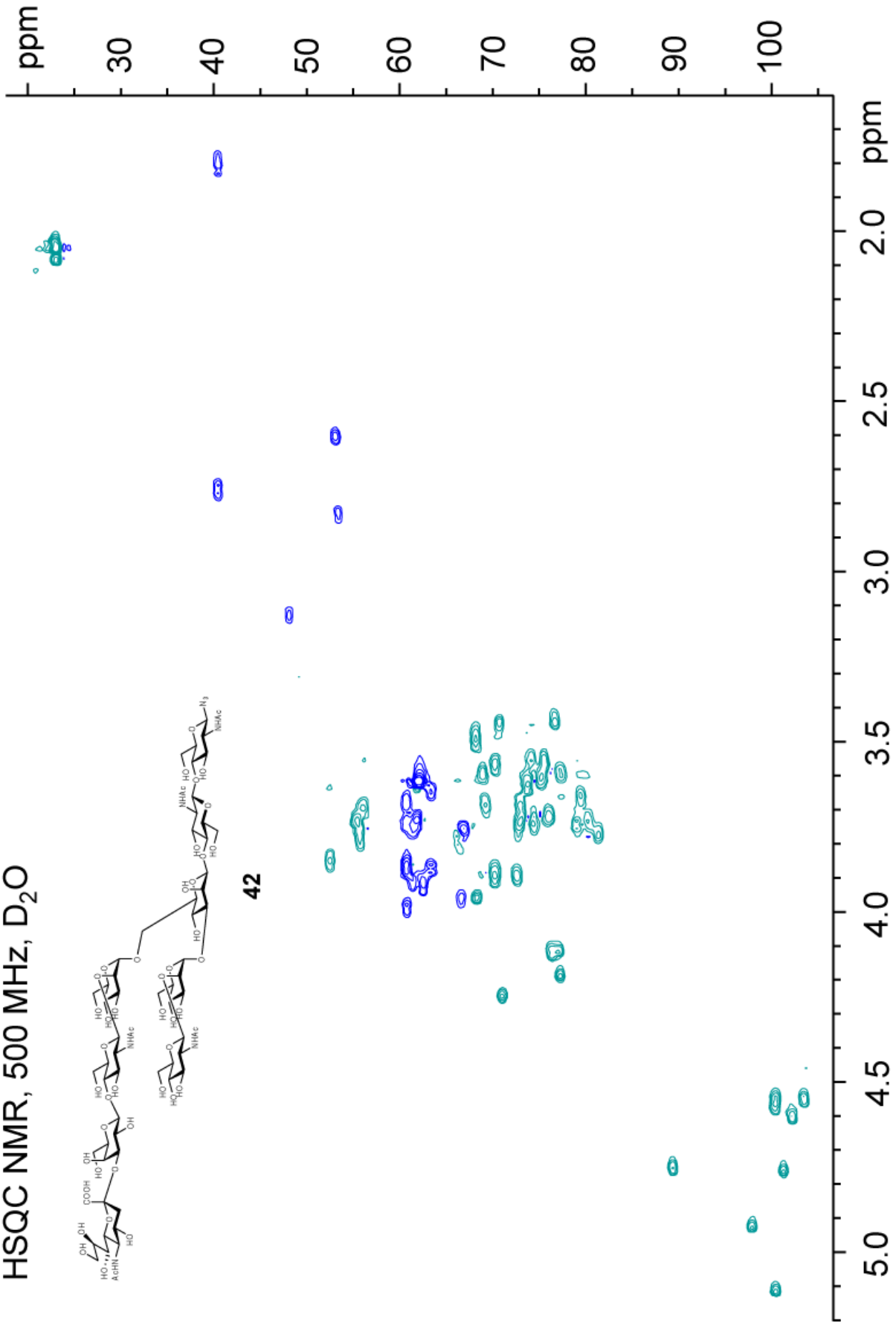
42

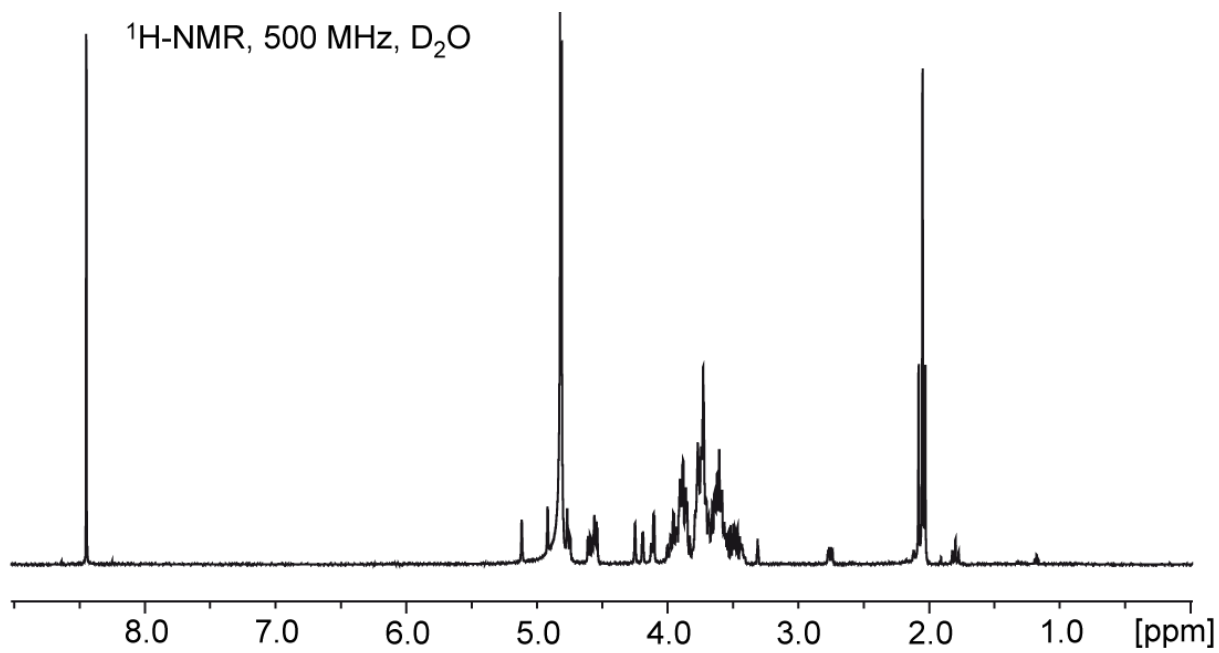


$^{13}\text{C-NMR}$, jmod, 125 MHz, D_2O

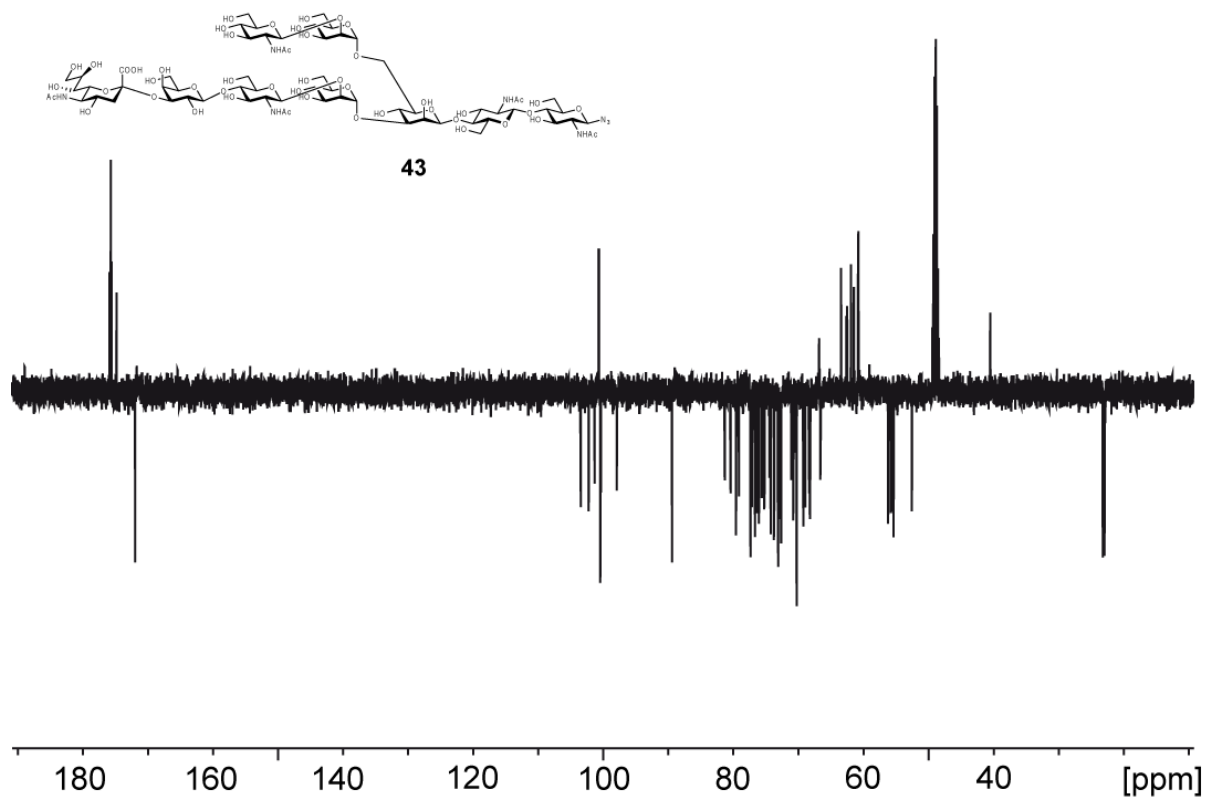


HSQC NMR, 500 MHz, D₂O

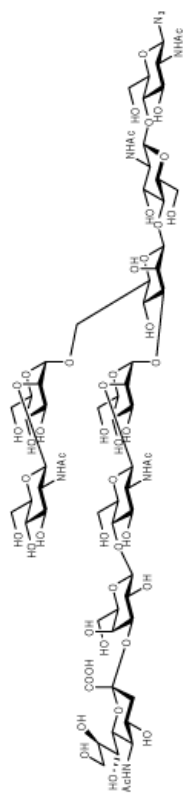




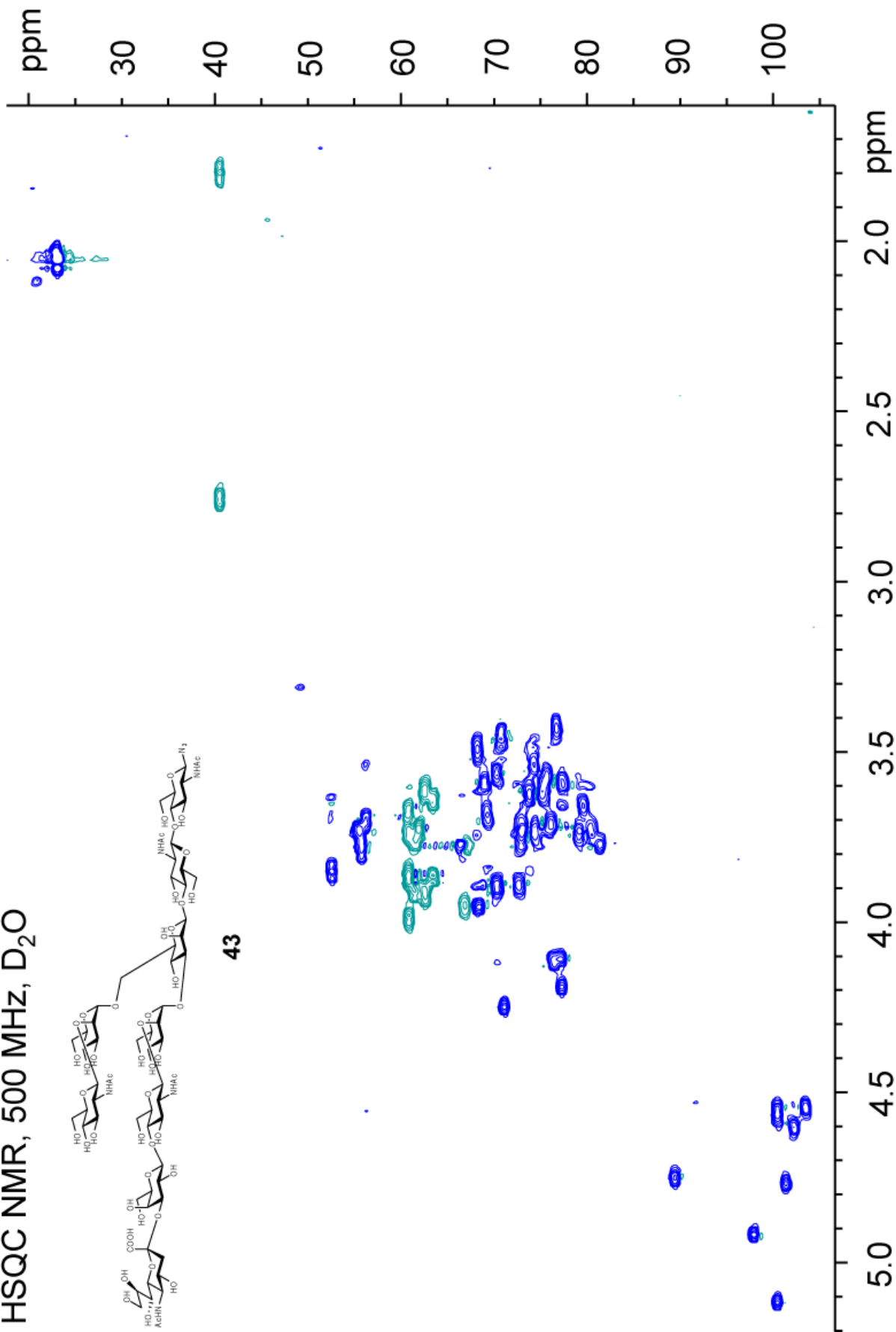
¹³C-NMR, jmod, 125 mHz, D₂O



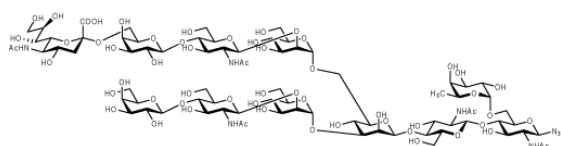
HSQC NMR, 500 MHz, D₂O



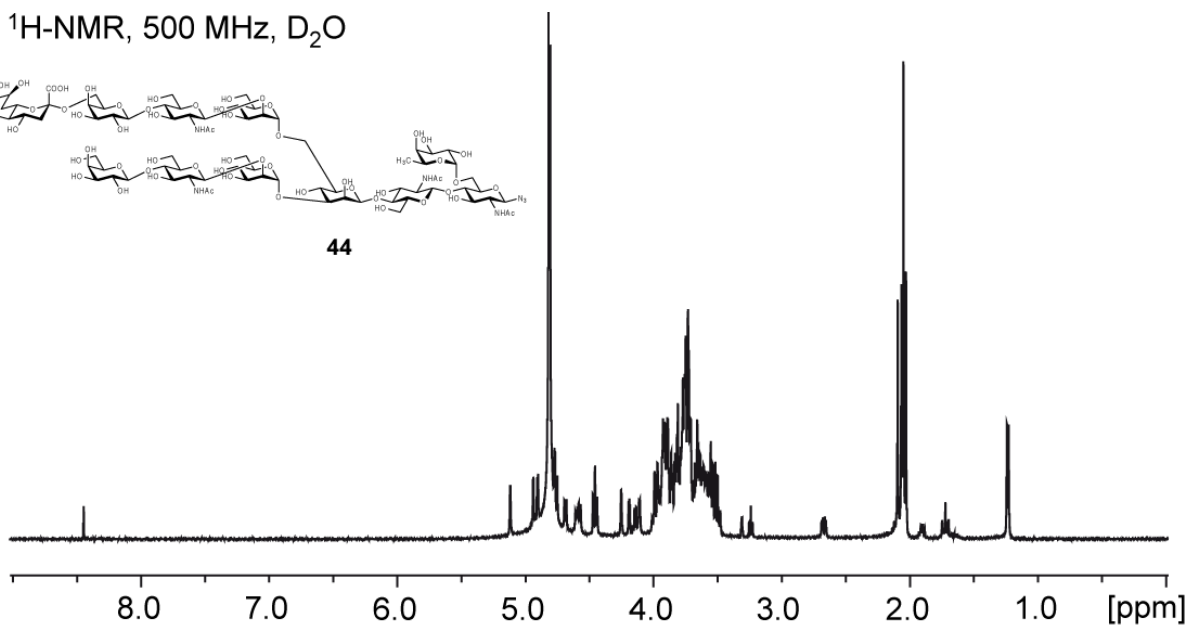
43



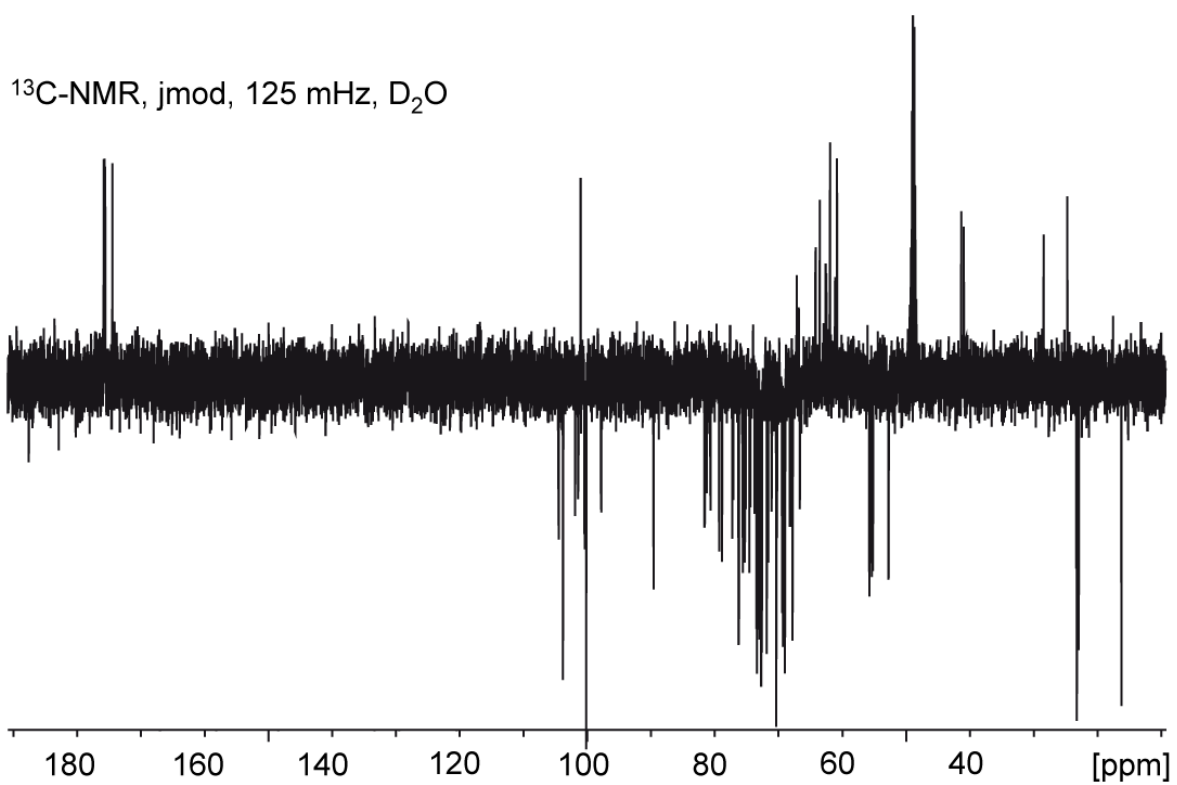
$^1\text{H-NMR}$, 500 MHz, D_2O



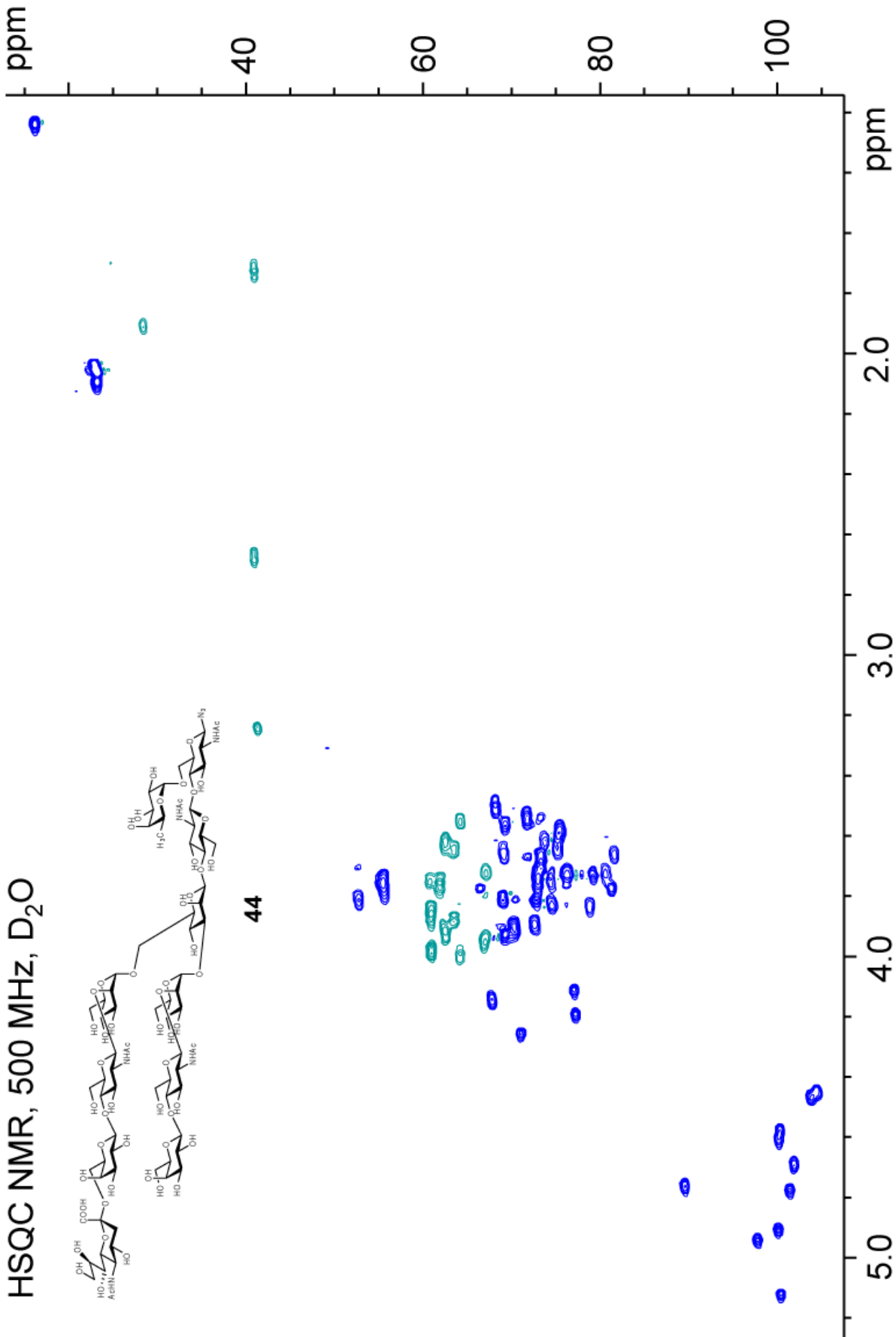
44



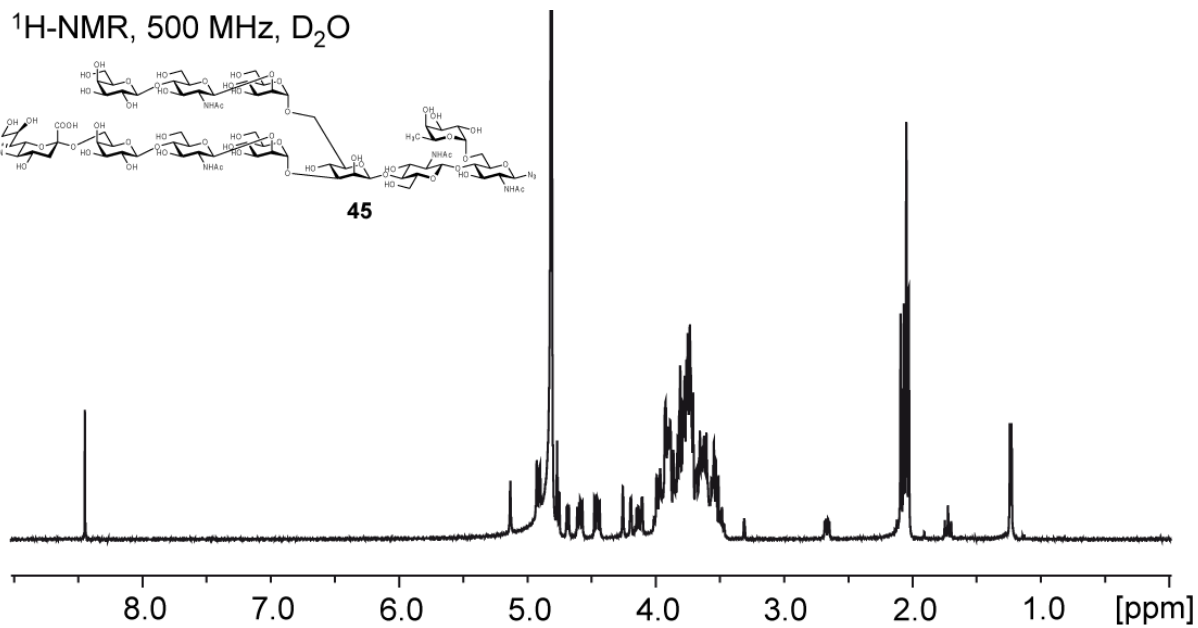
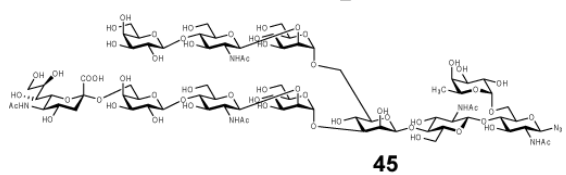
$^{13}\text{C-NMR}$, jmod, 125 MHz, D_2O



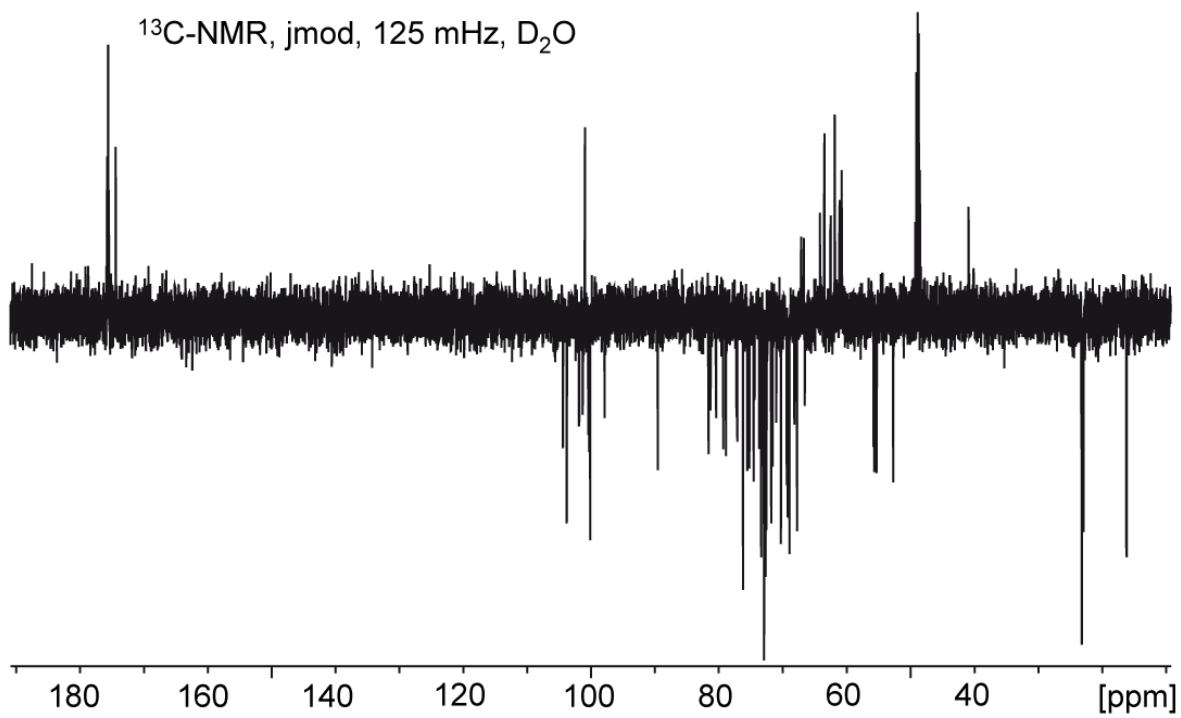
HSQC NMR, 500 MHz, D₂O



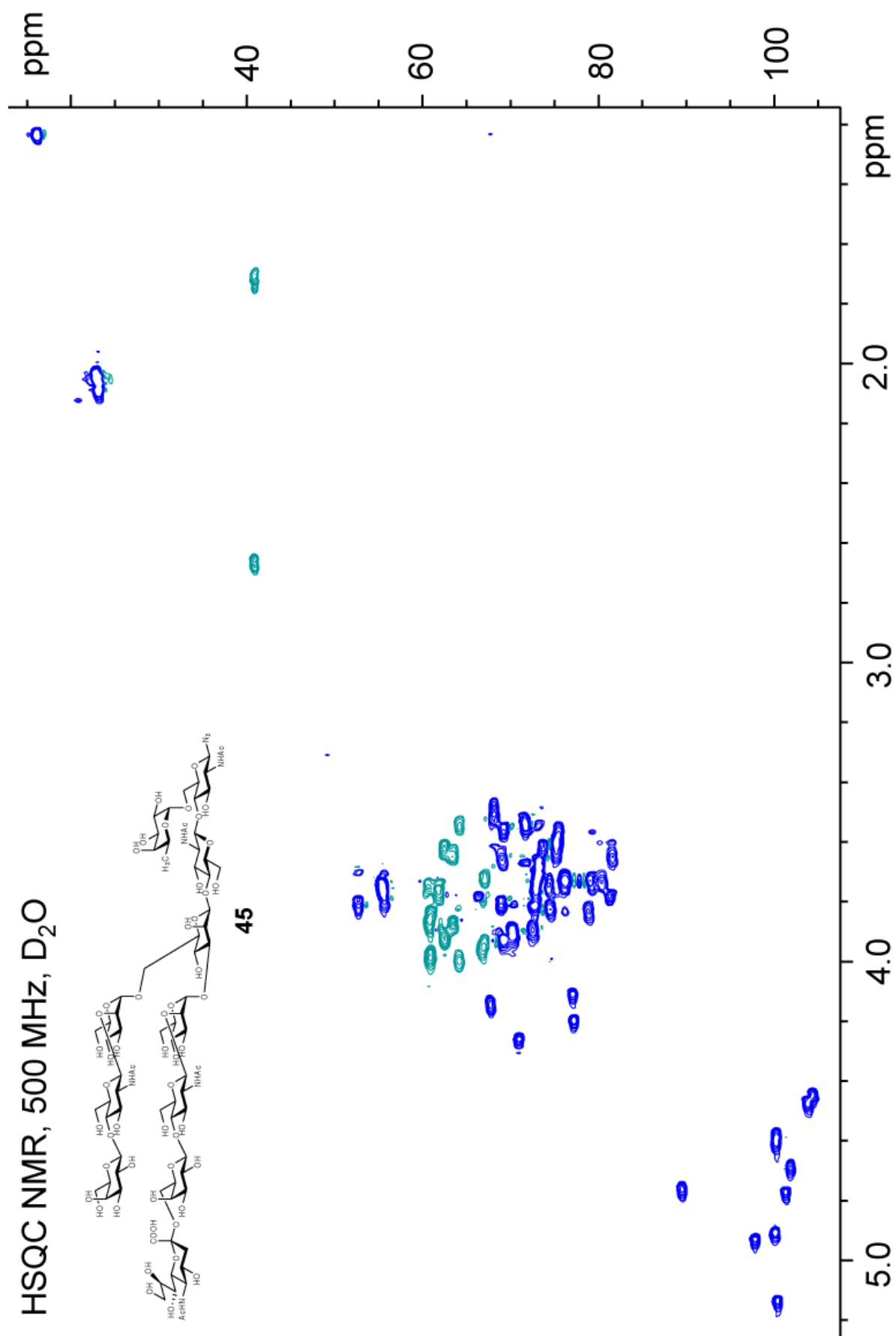
$^1\text{H-NMR}$, 500 MHz, D_2O

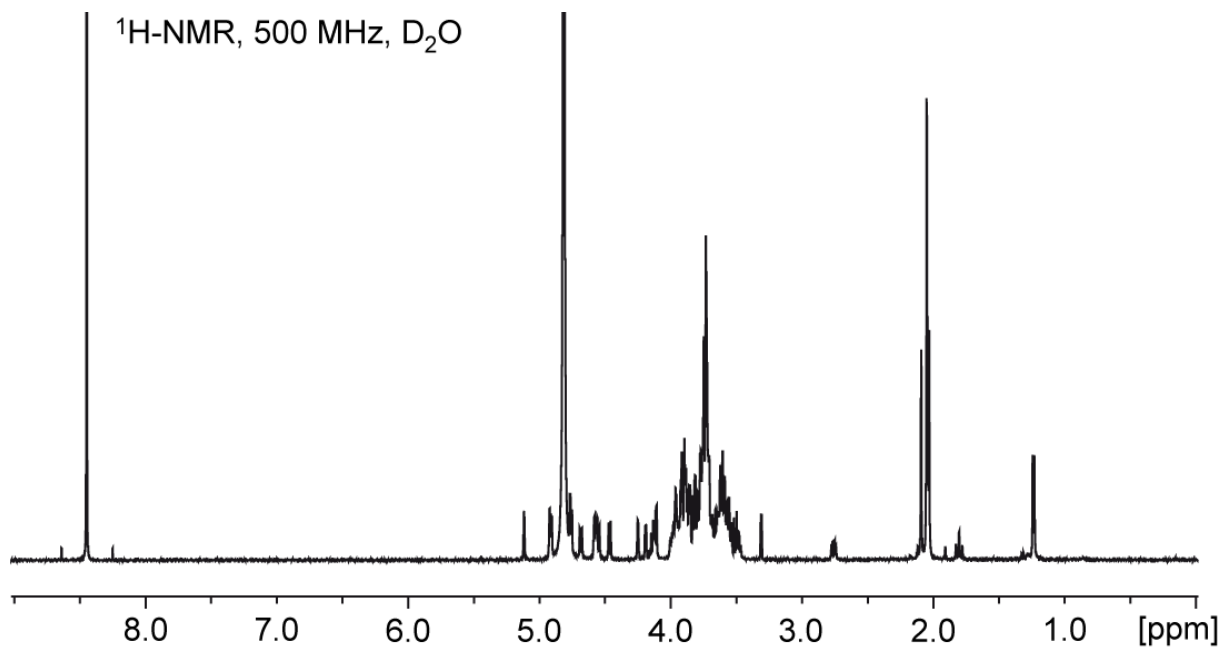


$^{13}\text{C-NMR}$, jmod, 125 MHz, D_2O

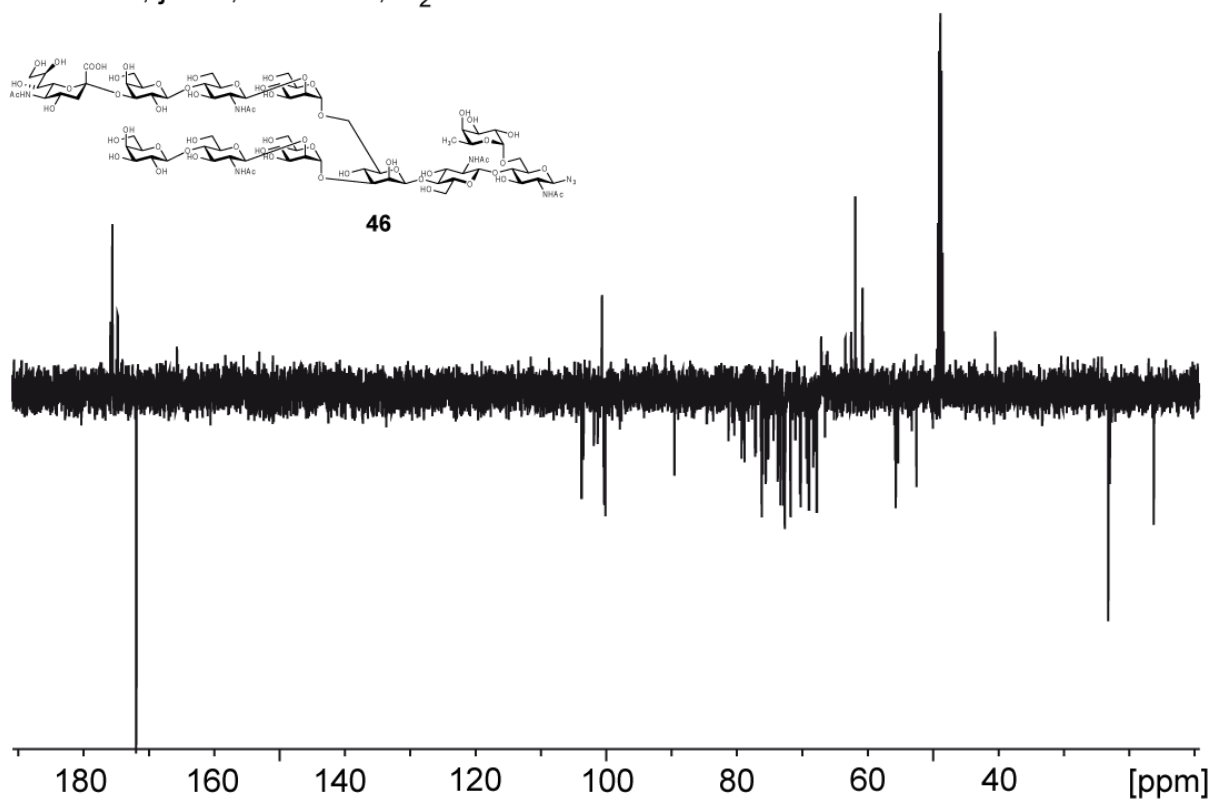


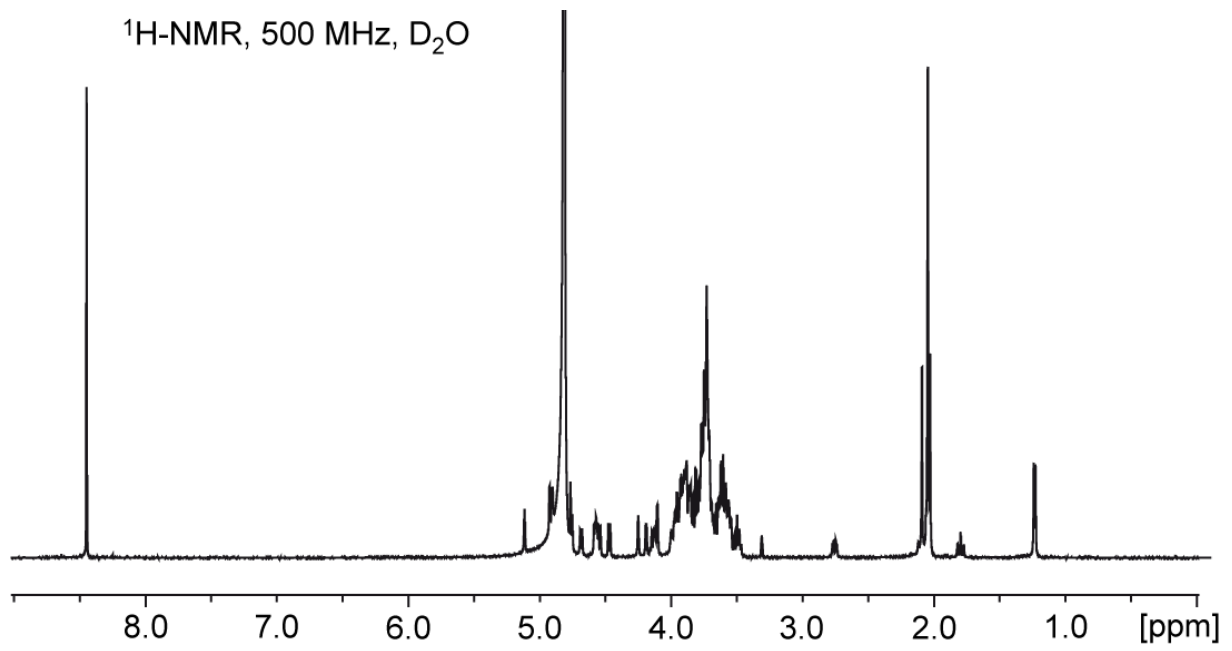
HSQC NMR, 500 MHz, D₂O



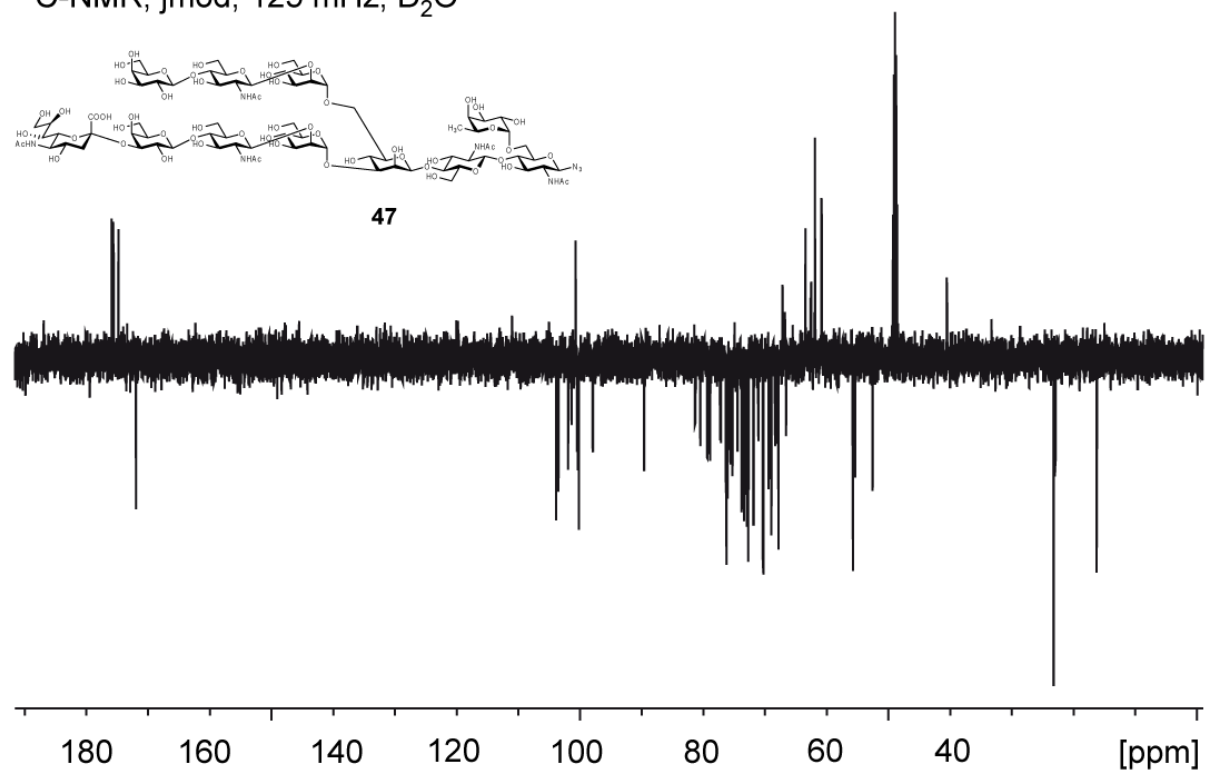


¹³C-NMR, jmod, 125 mHz, D₂O

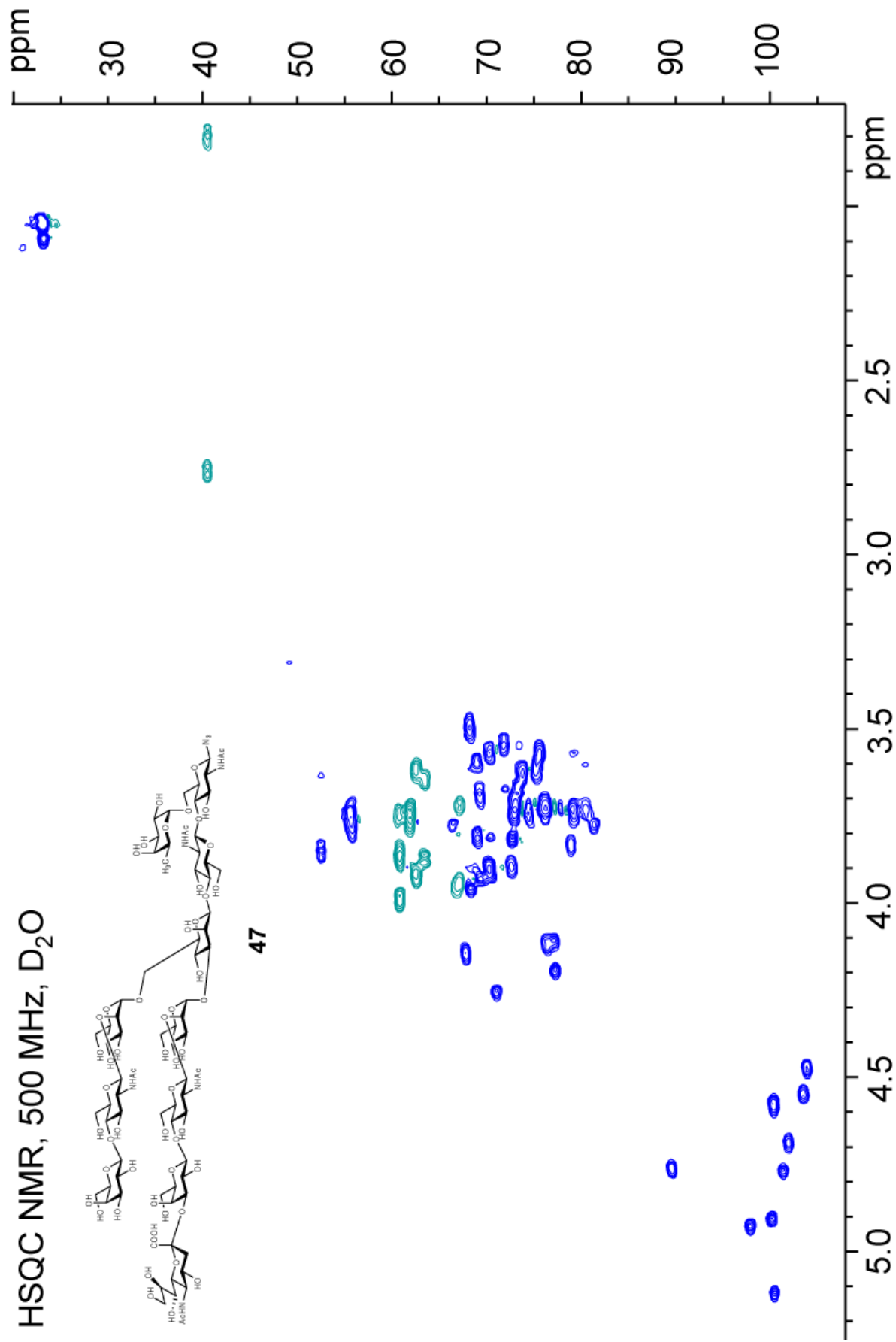


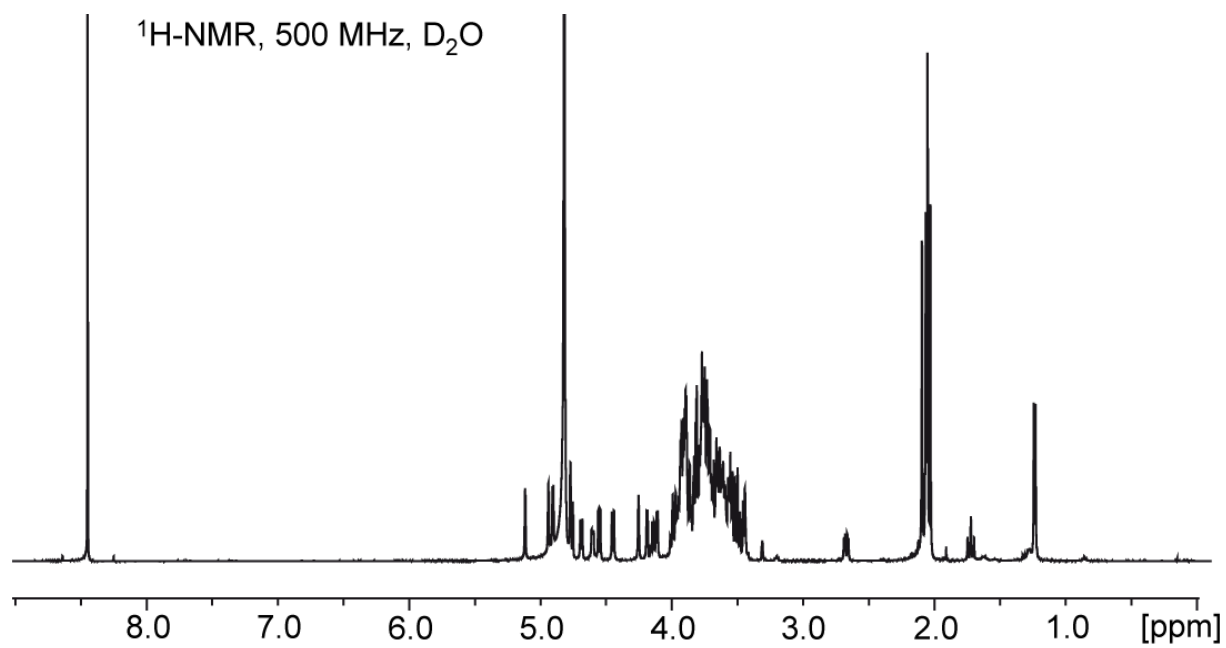


$^{13}\text{C-NMR}$, jmod, 125 MHz, D_2O

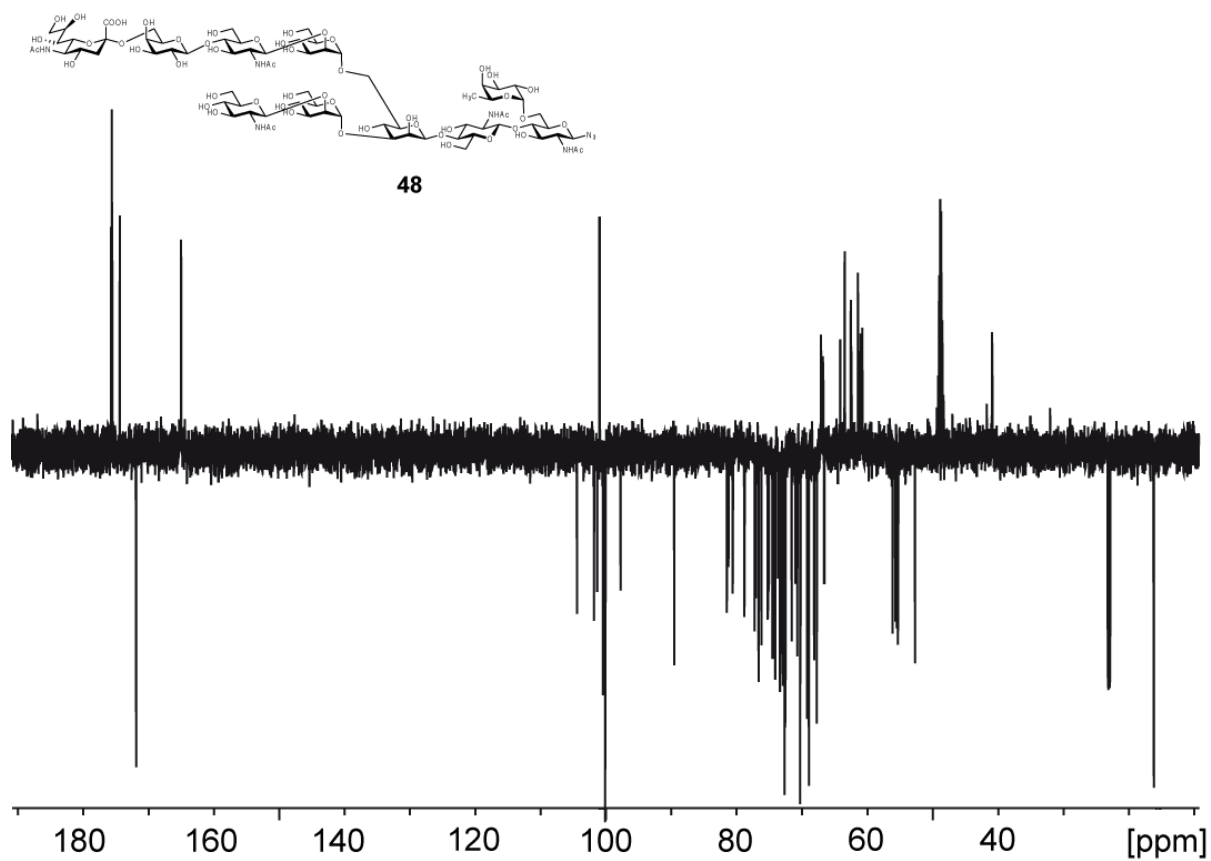


HSQC NMR, 500 MHz, D₂O

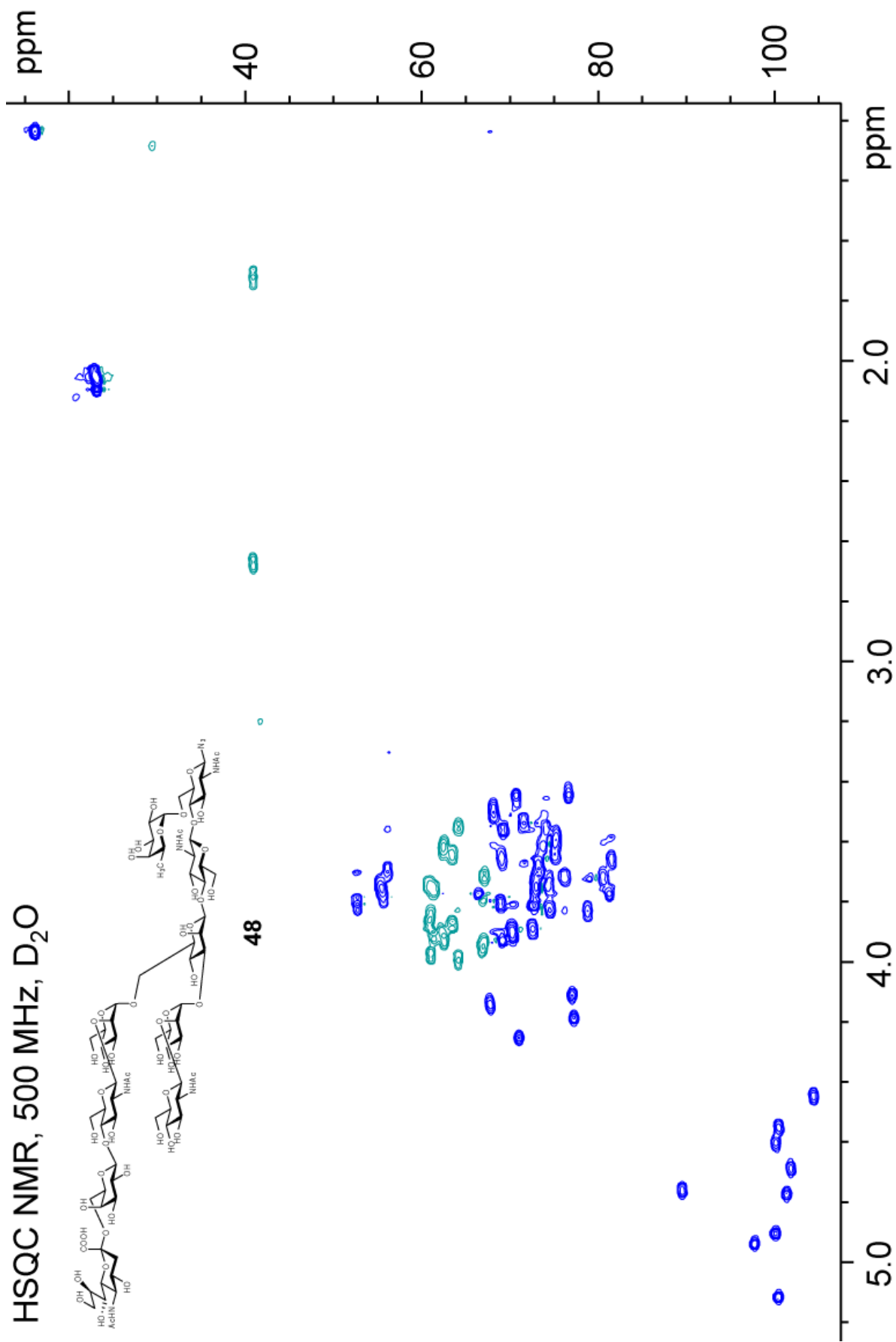


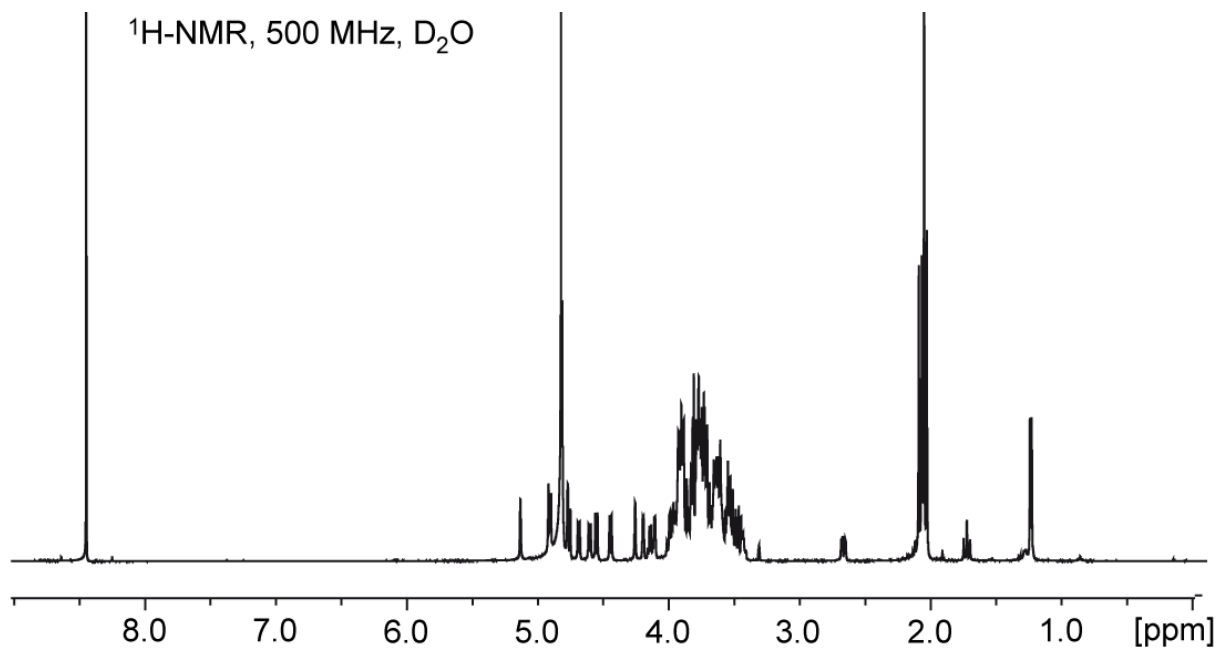


$^{13}\text{C-NMR}$, jmod, 125 mHz, D_2O

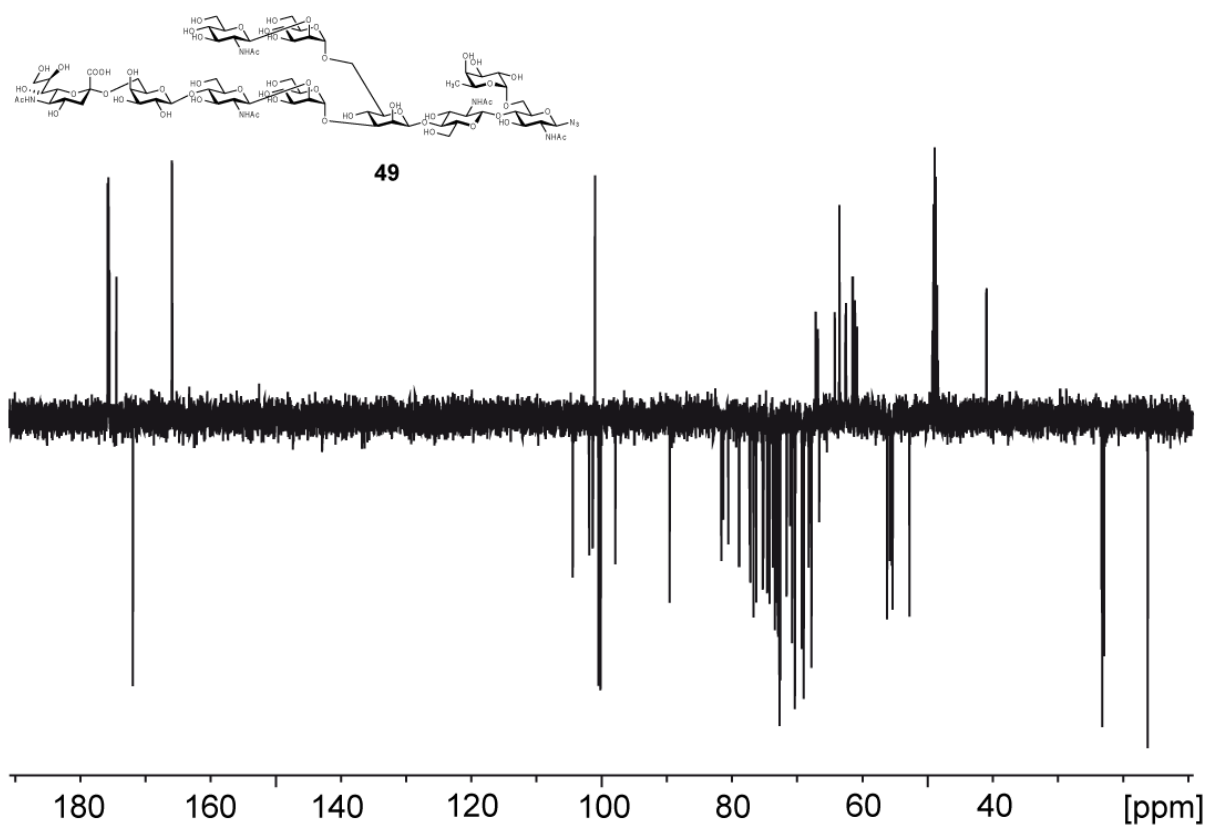


HSQC NMR, 500 MHz, D₂O

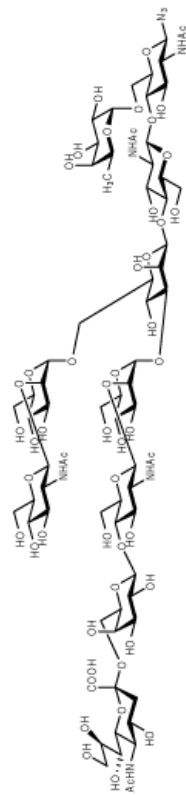




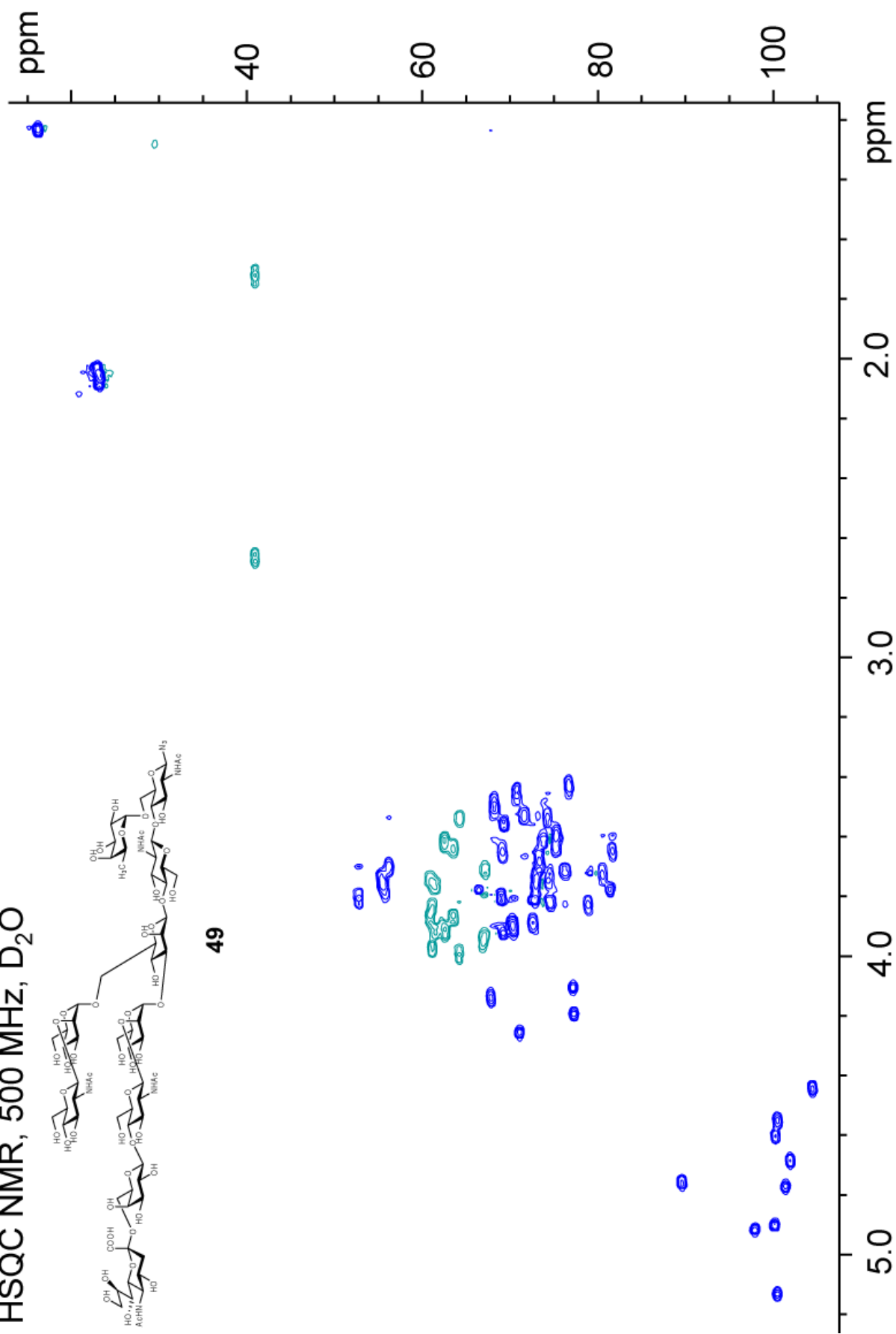
$^{13}\text{C-NMR}$, jmod, 125 mHz, D_2O

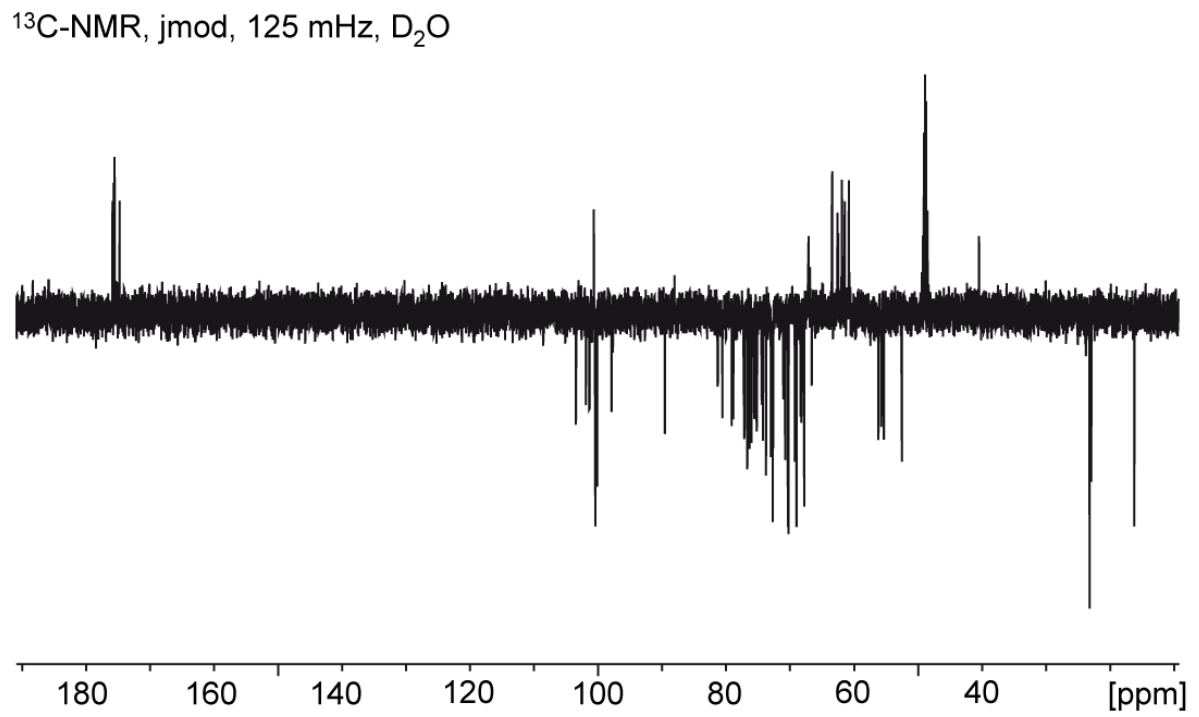
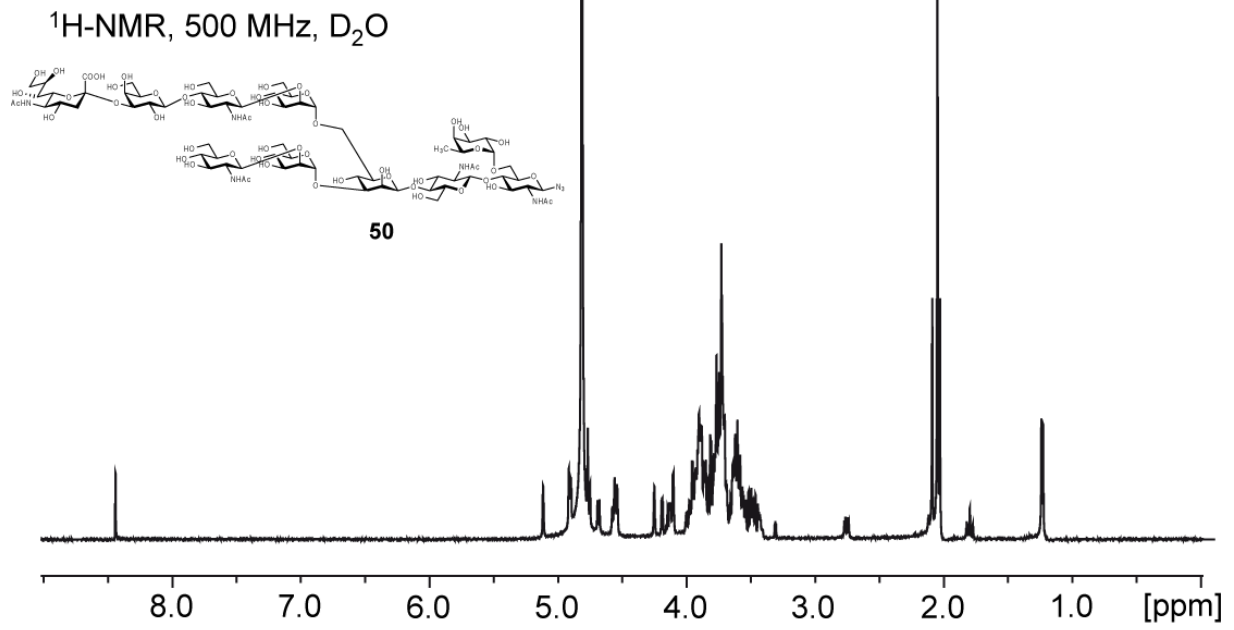


HSQC NMR, 500 MHz, D₂O

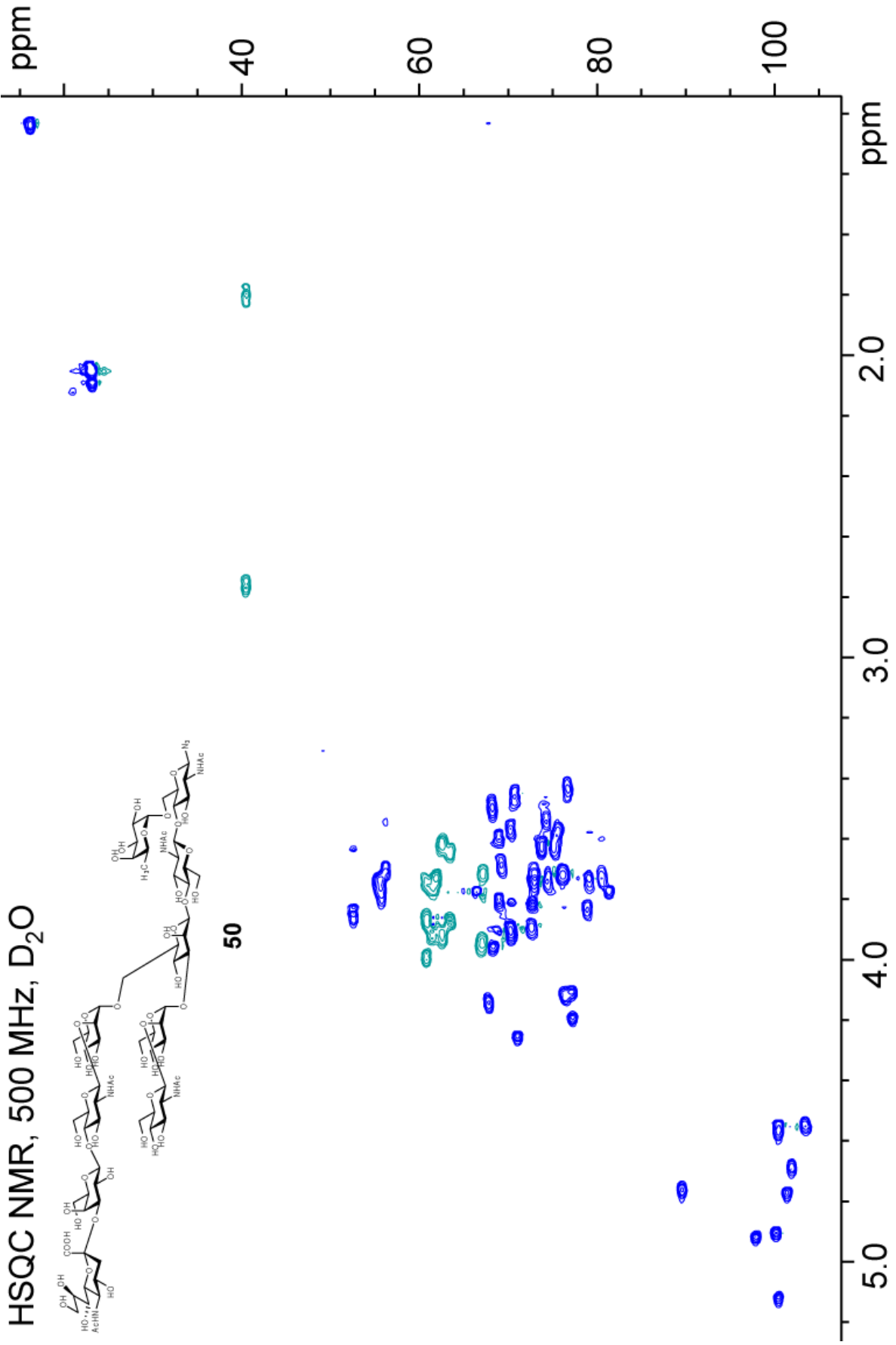
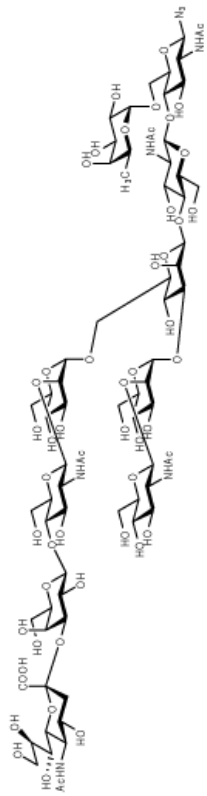


49

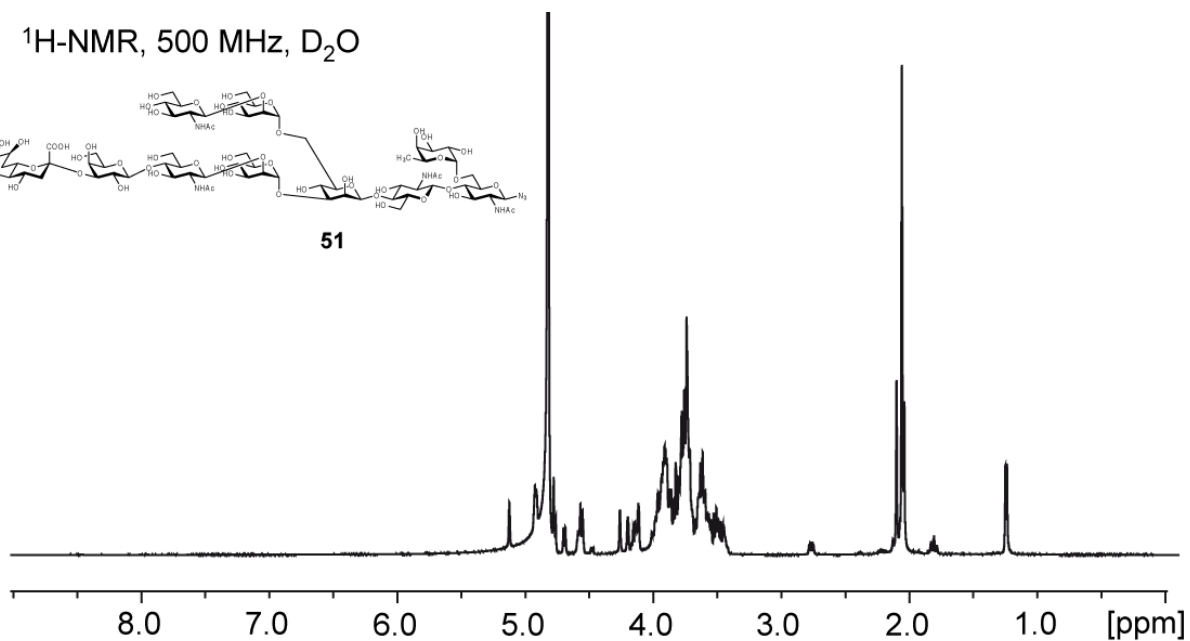
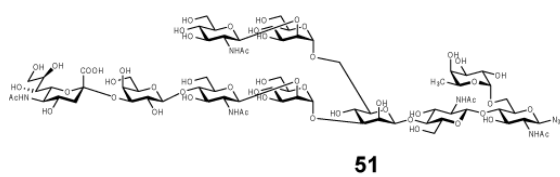




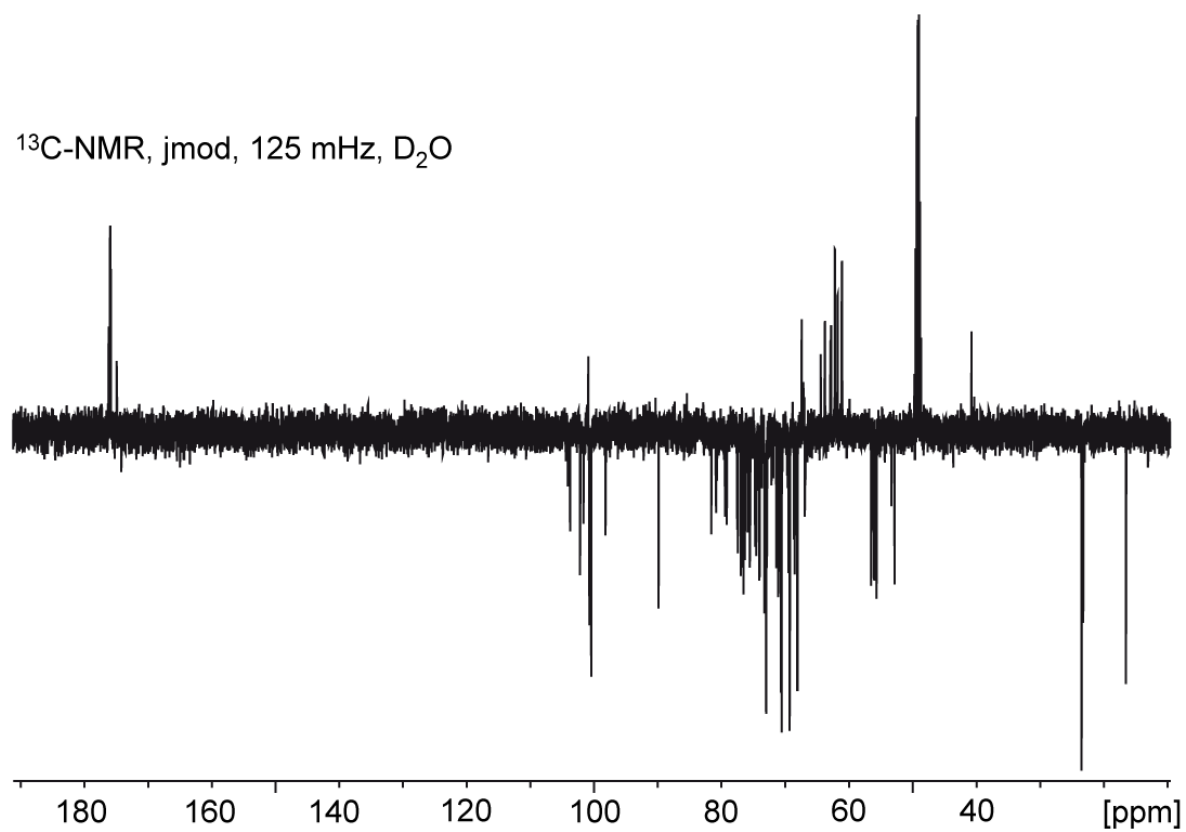
HSQC NMR, 500 MHz, D₂O



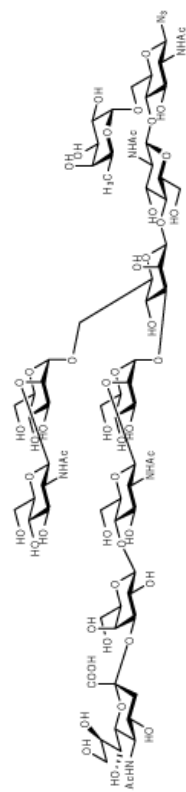
$^1\text{H-NMR}$, 500 MHz, D_2O



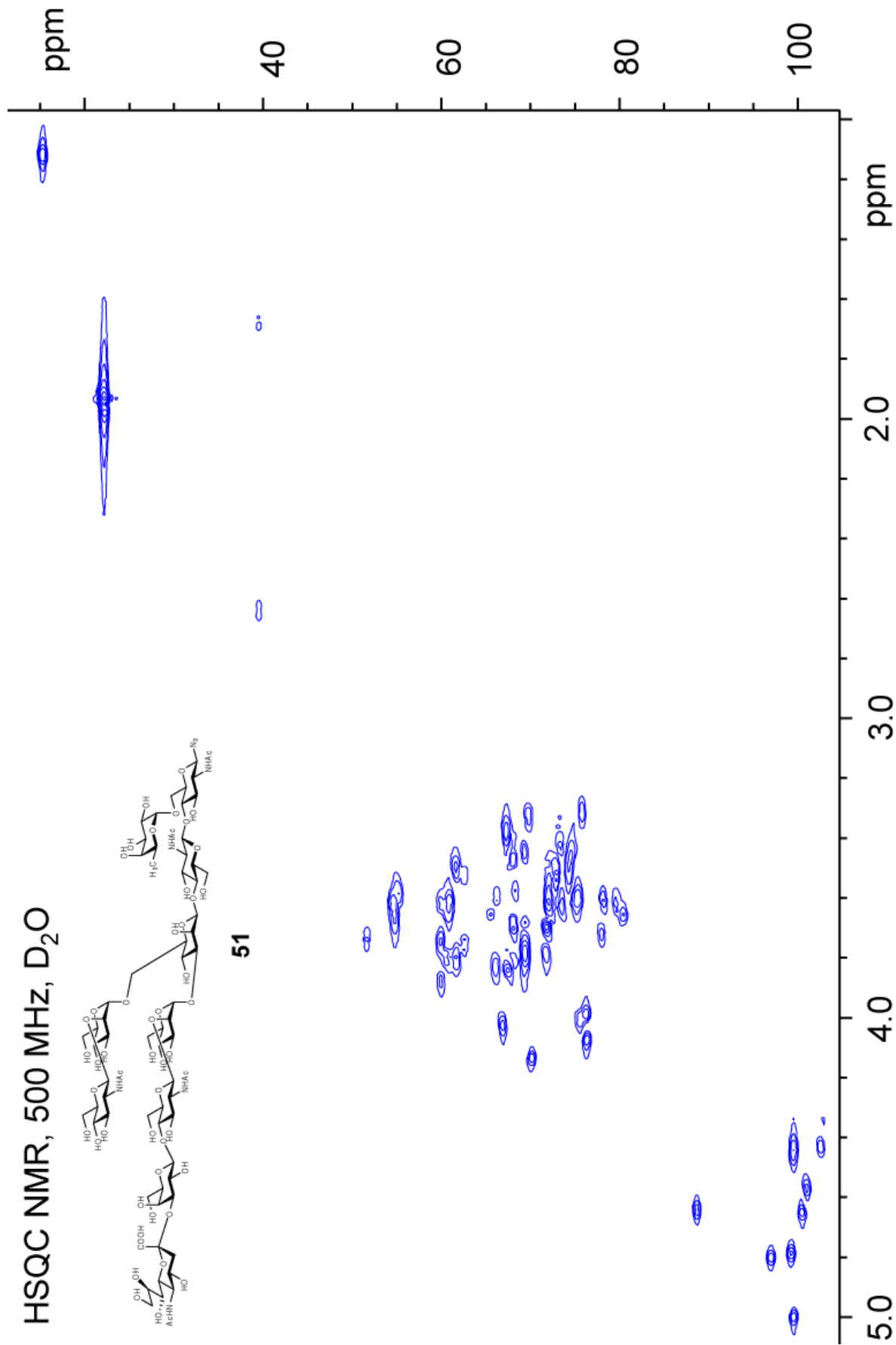
$^{13}\text{C-NMR}$, jmod, 125 MHz, D_2O



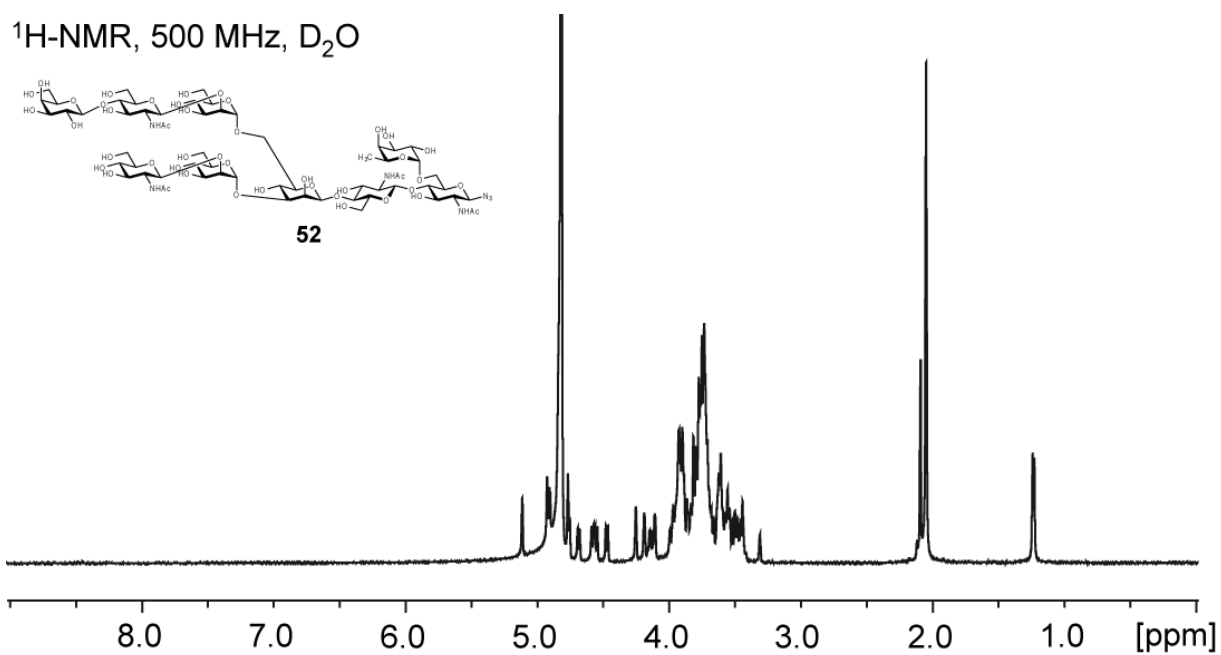
HSQC NMR, 500 MHz, D₂O



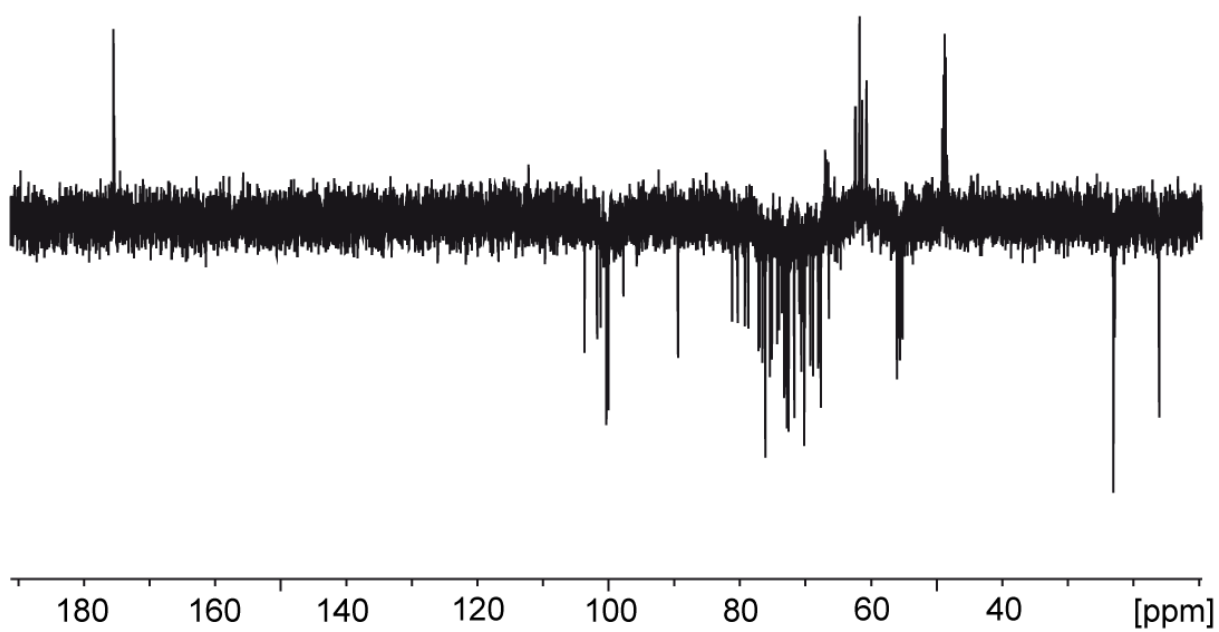
51



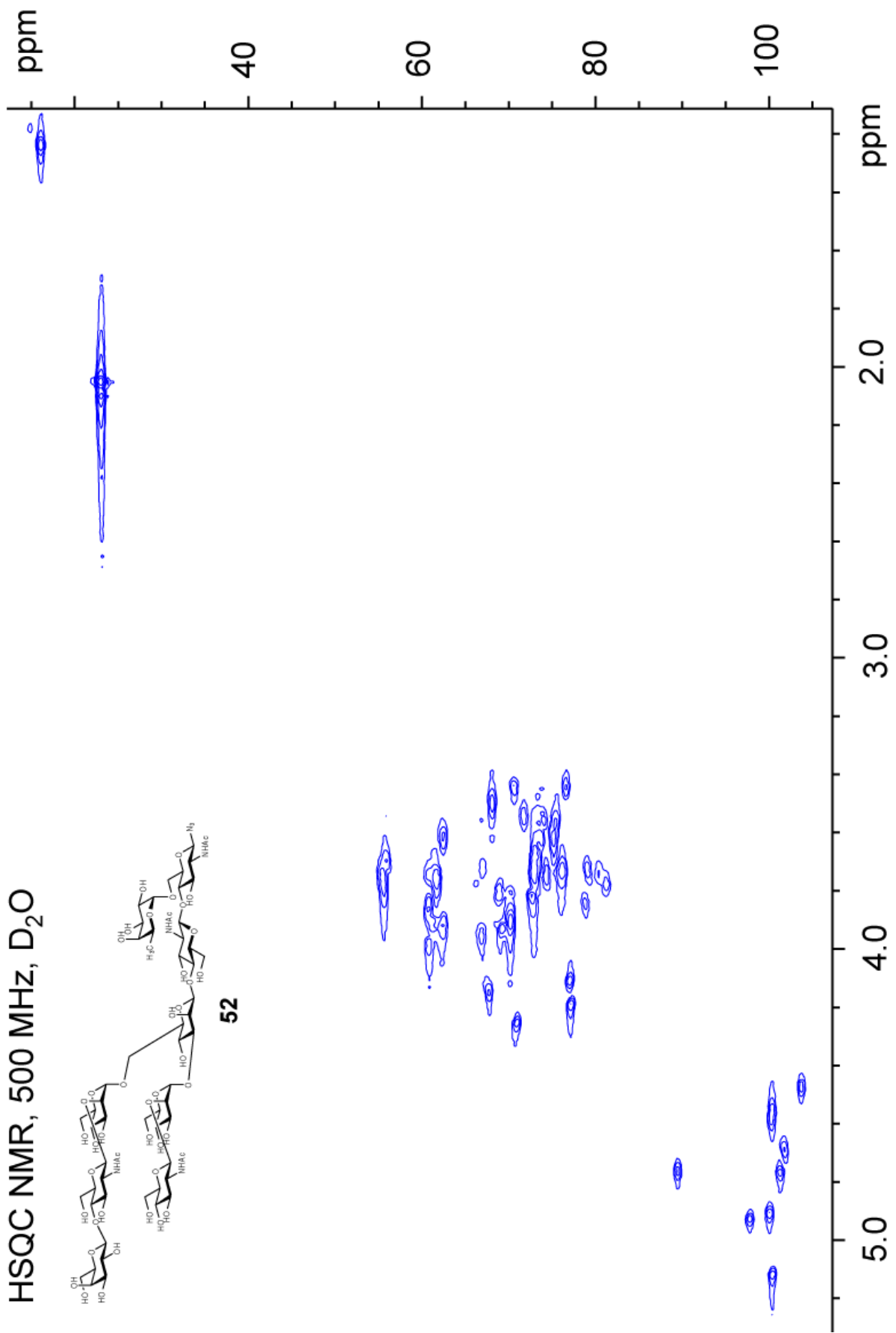
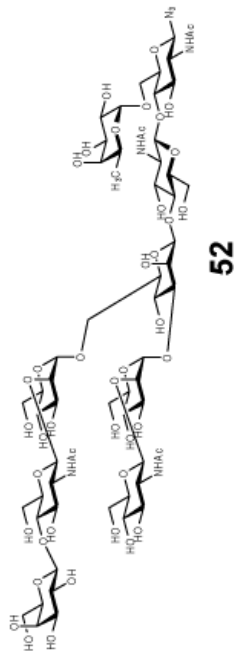
$^1\text{H-NMR}$, 500 MHz, D_2O



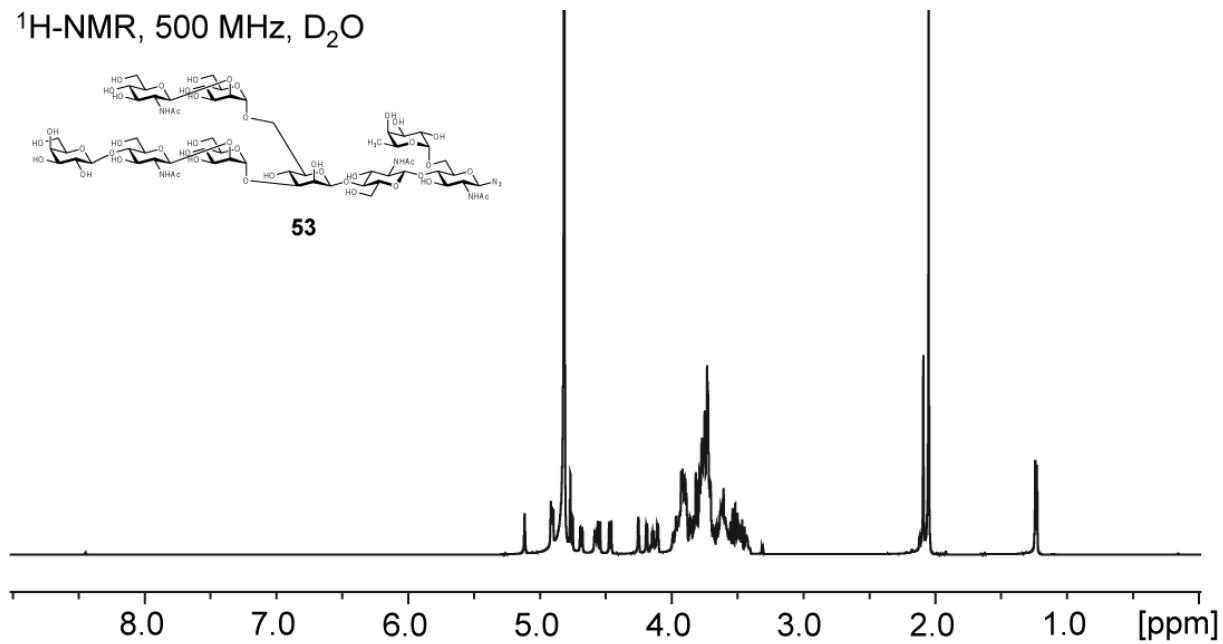
$^{13}\text{C-NMR}$, jmod, 125 mHz, D_2O



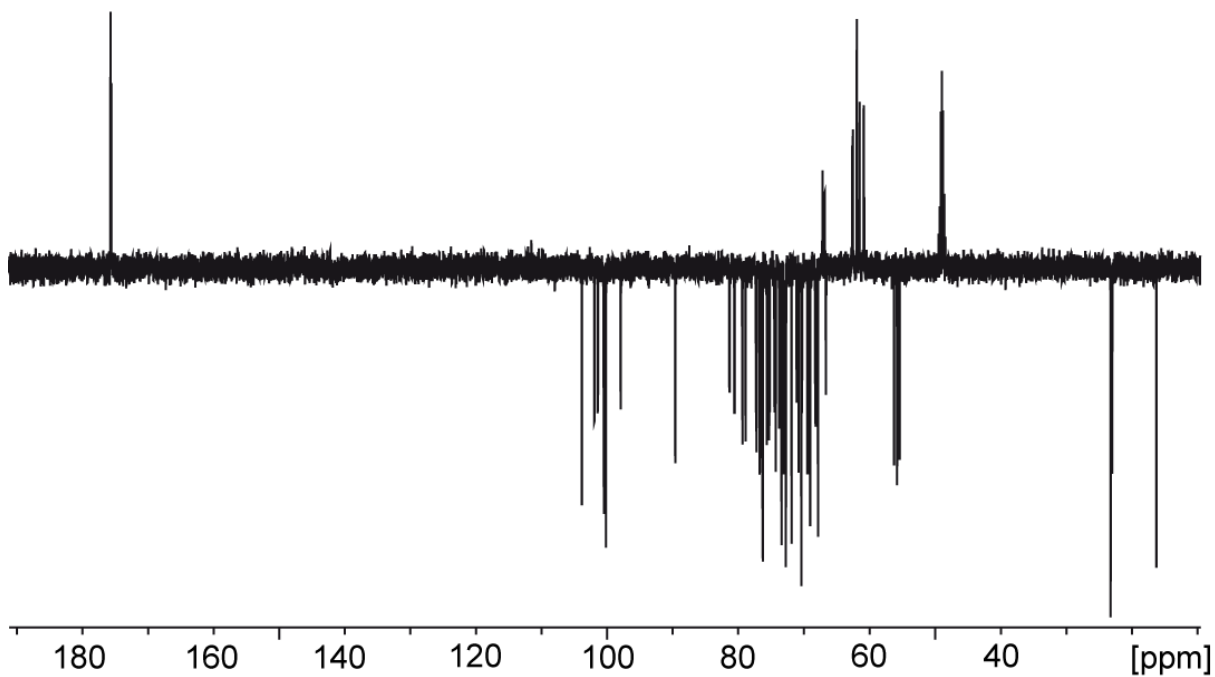
HSQC NMR, 500 MHz, D₂O



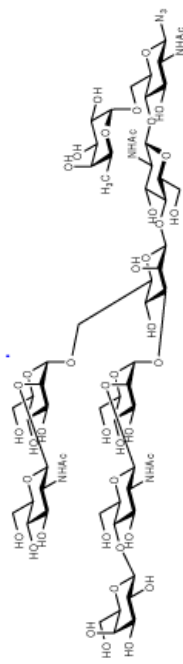
$^1\text{H-NMR}$, 500 MHz, D_2O



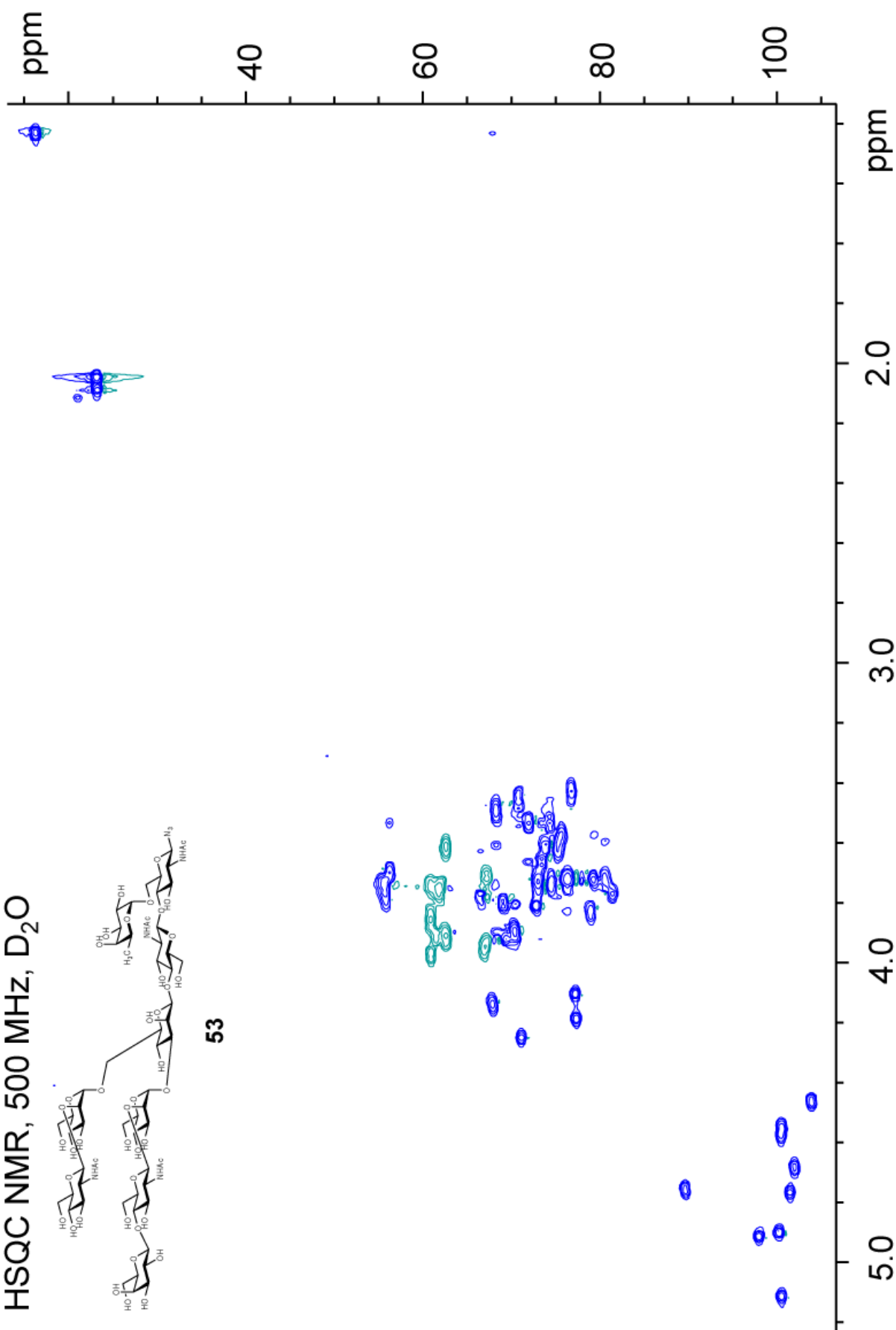
$^{13}\text{C-NMR}$, jmod, 125 MHz, D_2O



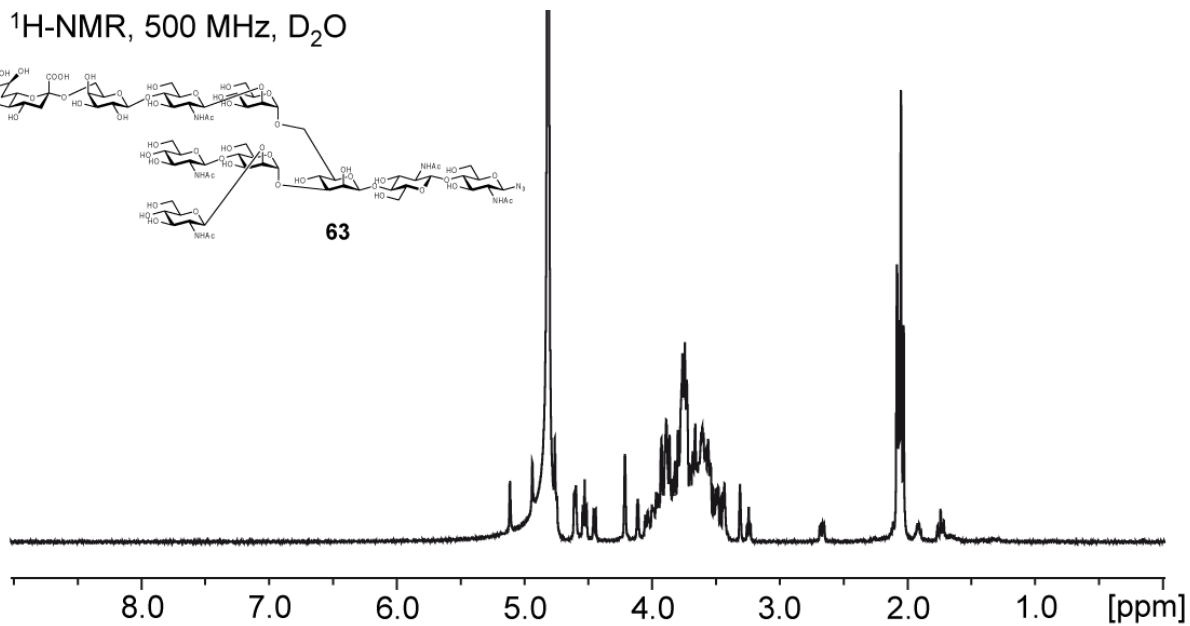
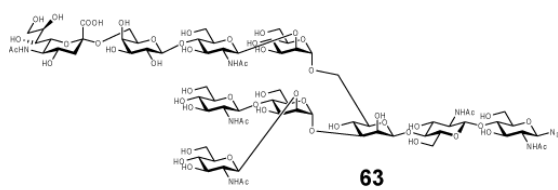
HSQC NMR, 500 MHz, D₂O



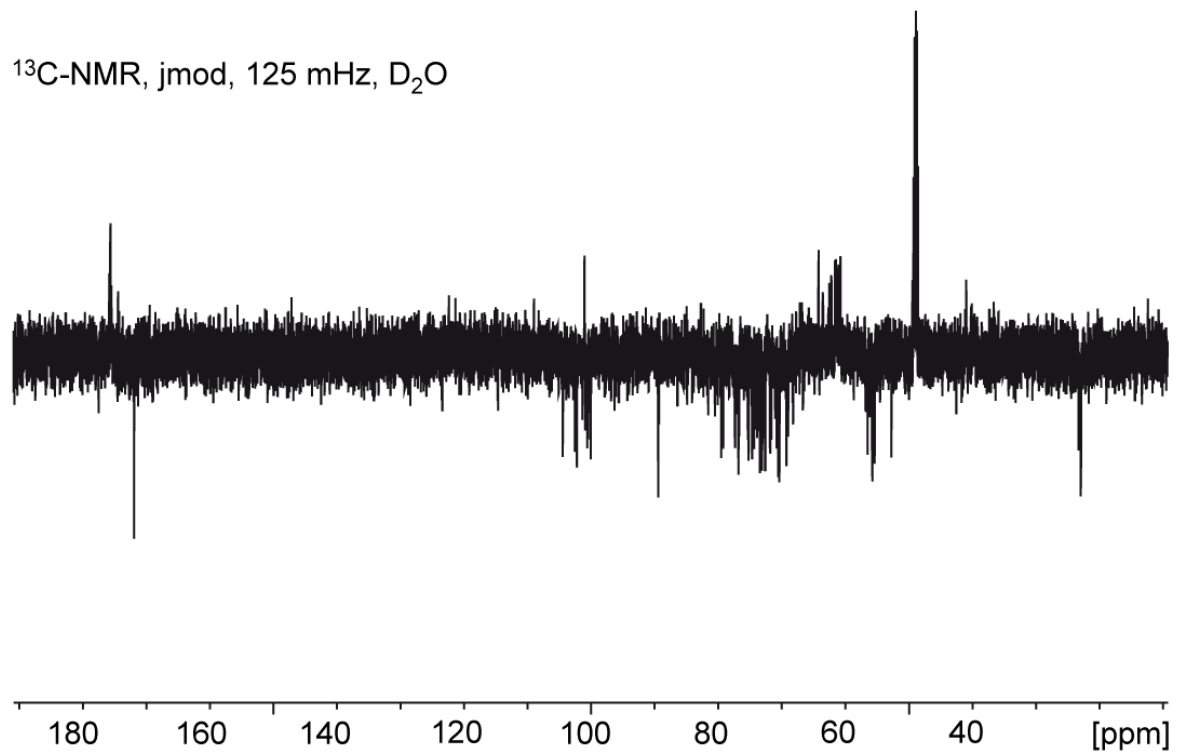
53



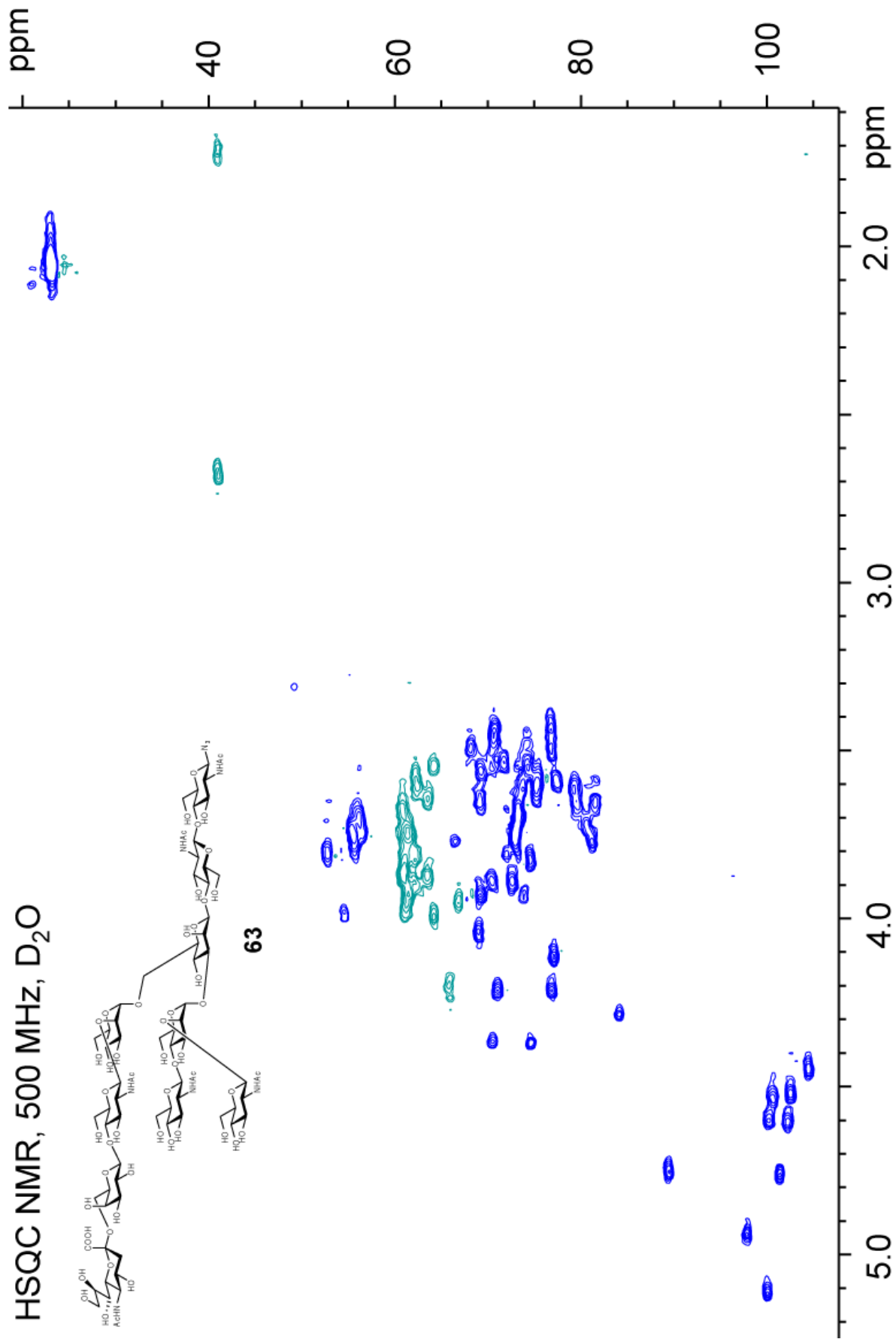
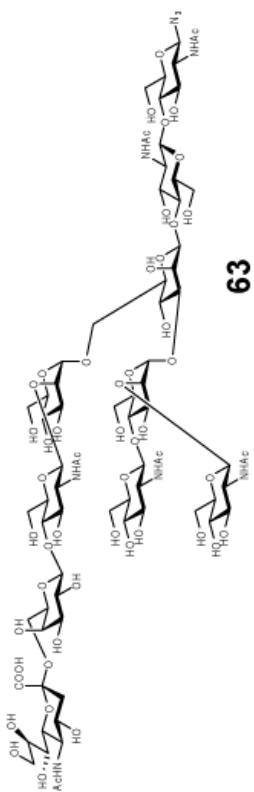
$^1\text{H-NMR}$, 500 MHz, D_2O

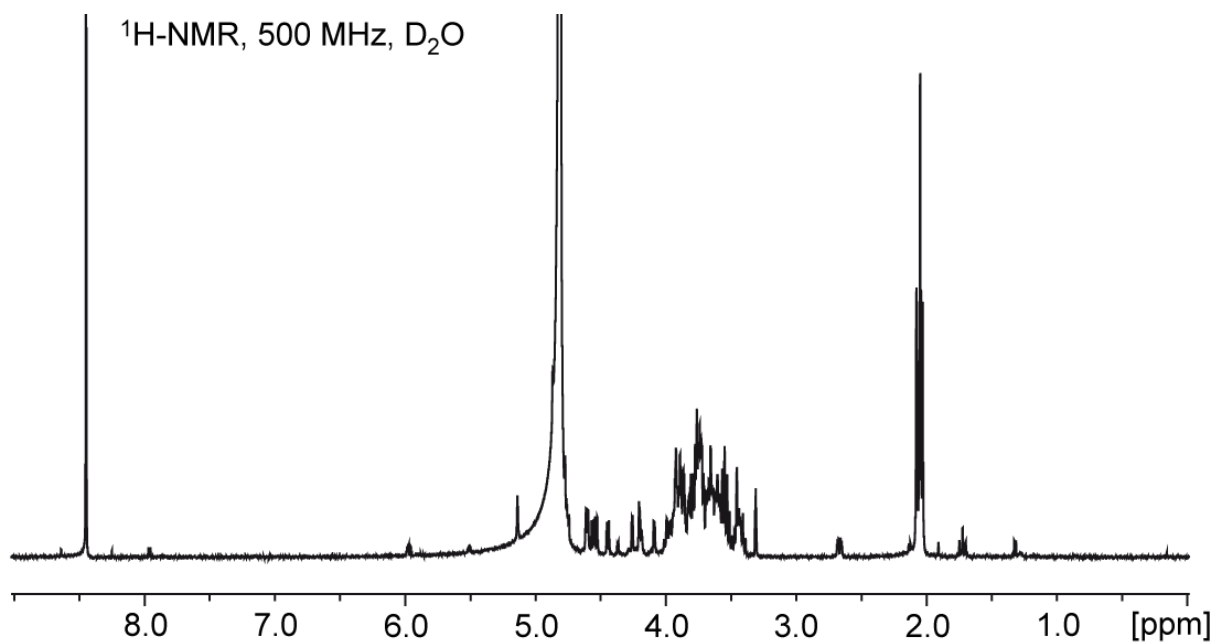


$^{13}\text{C-NMR}$, jmod, 125 MHz, D_2O

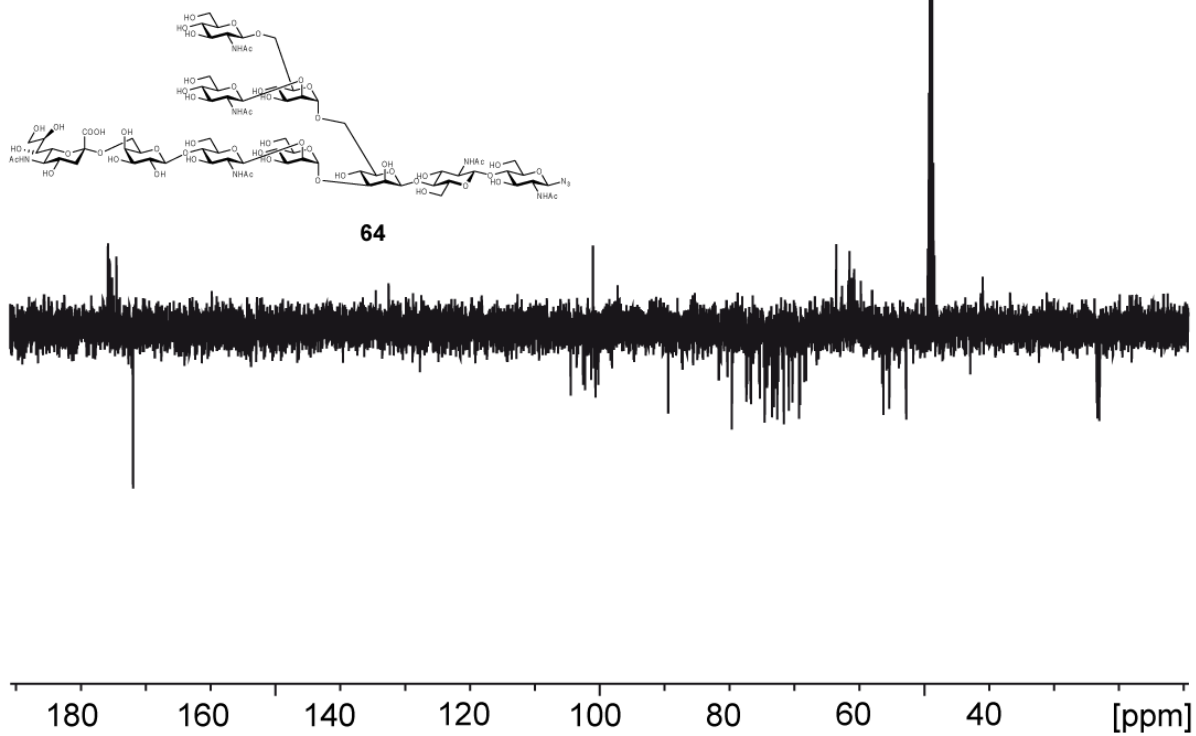


HSQC NMR, 500 MHz, D₂O

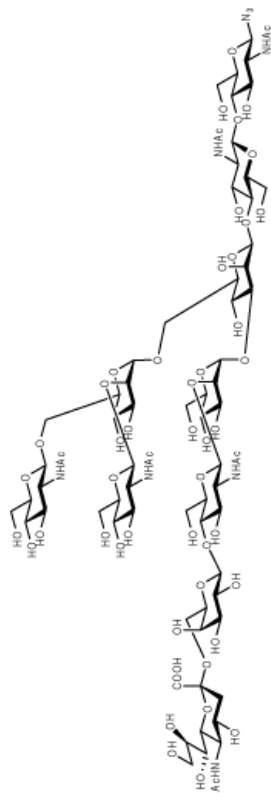




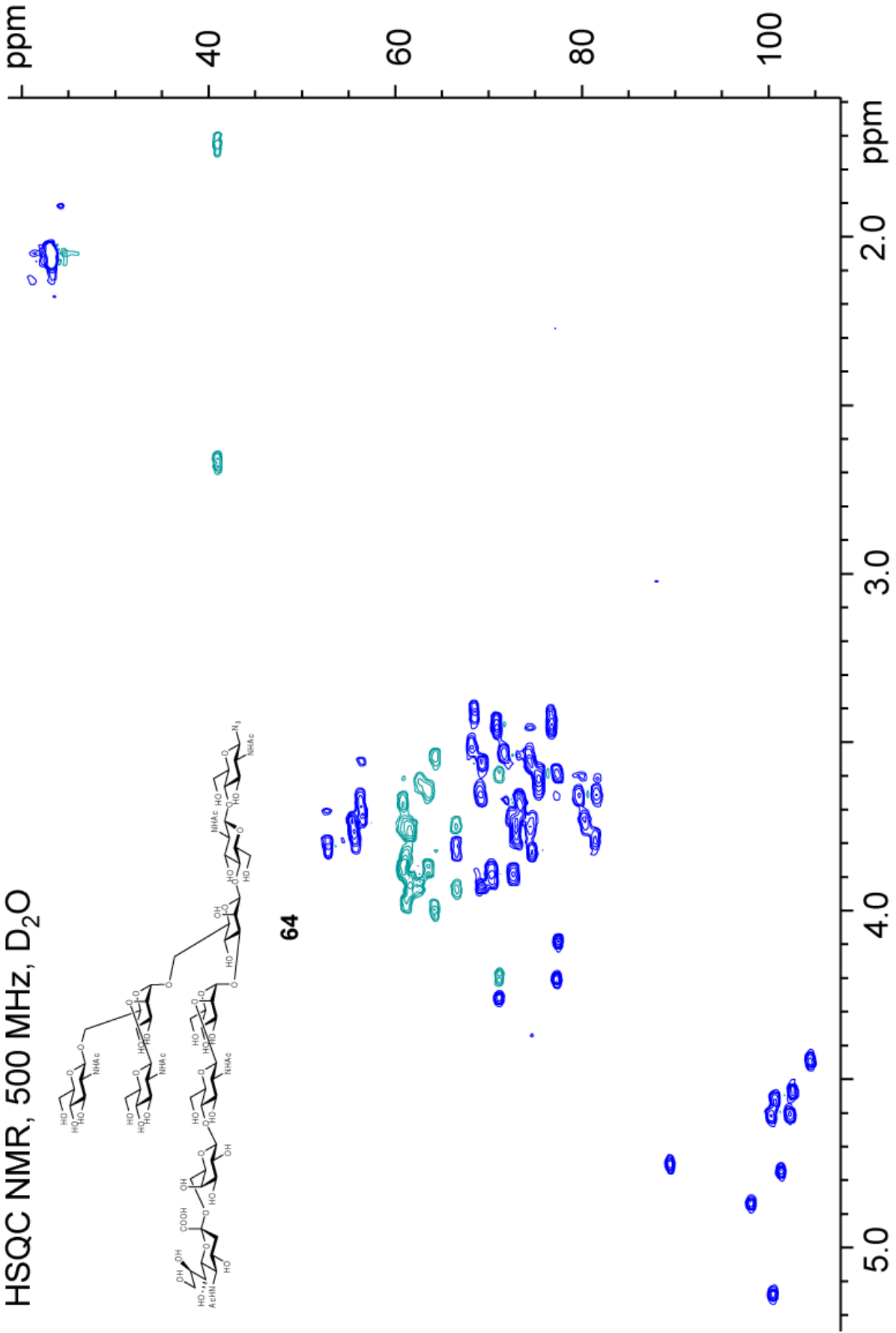
$^{13}\text{C-NMR}$, jmod, 125 mHz, D_2O

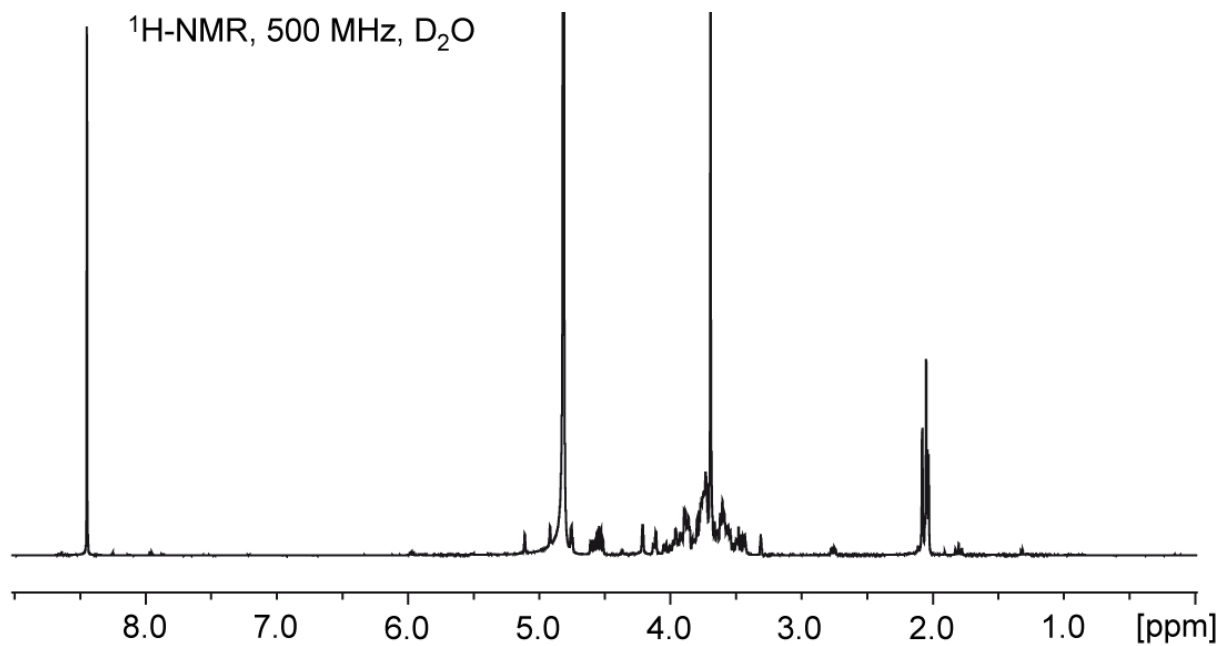


HSQC NMR, 500 MHz, D₂O

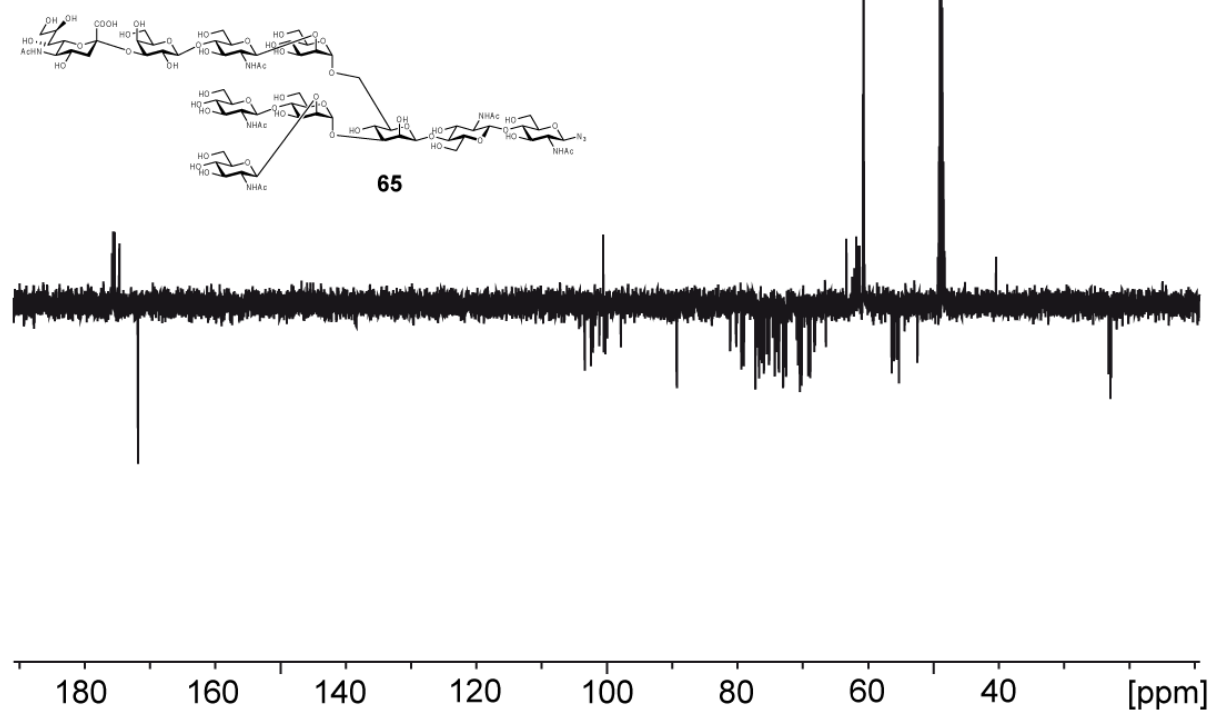


64

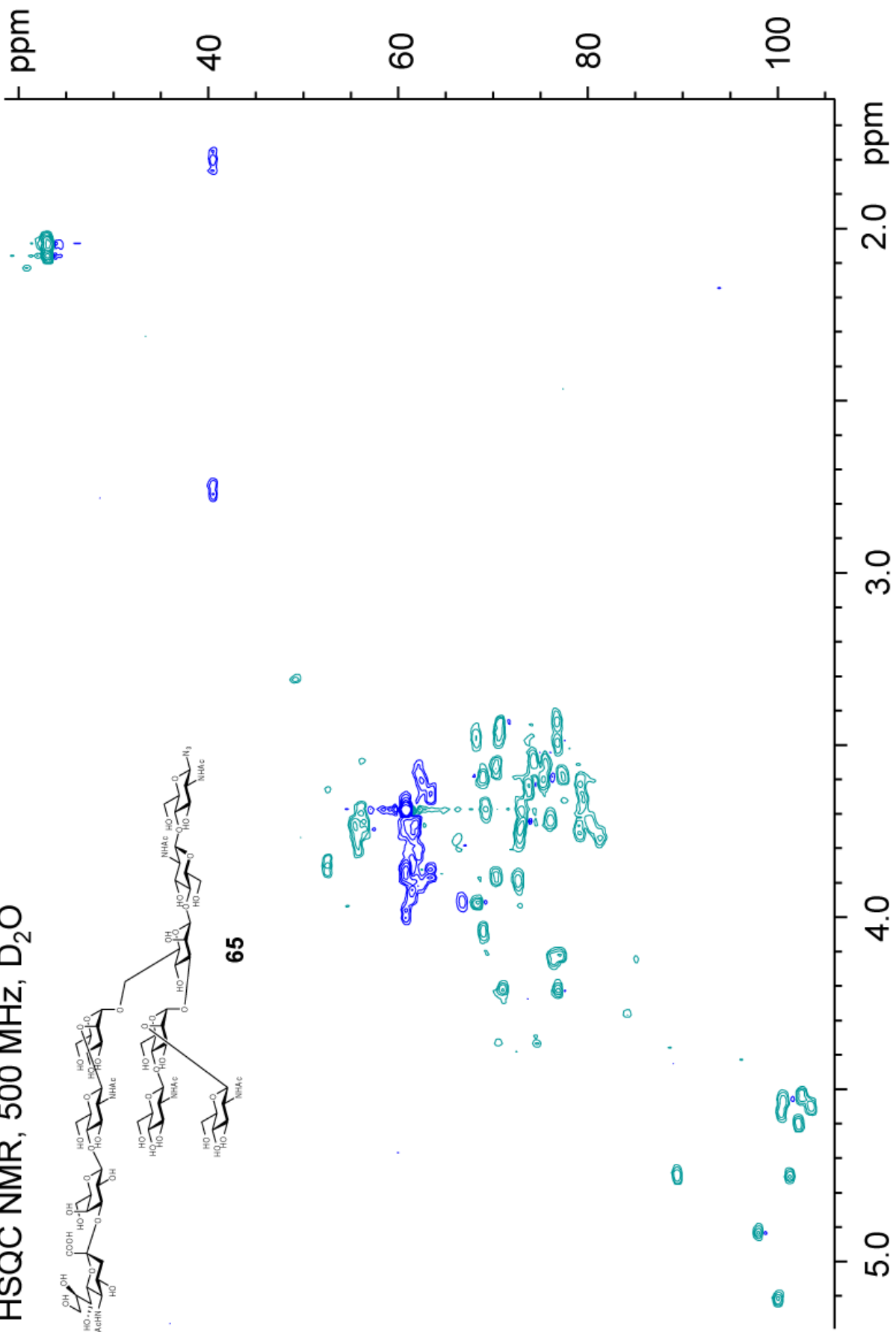


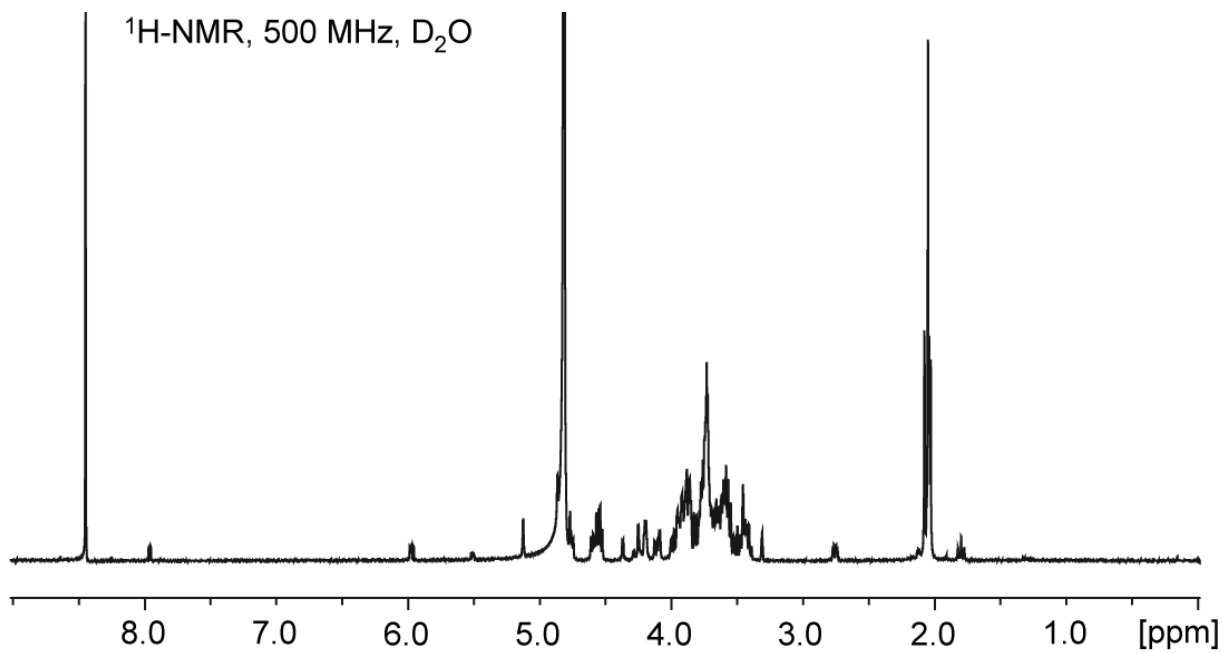


¹³C-NMR, jmod, 125 mHz, D₂O

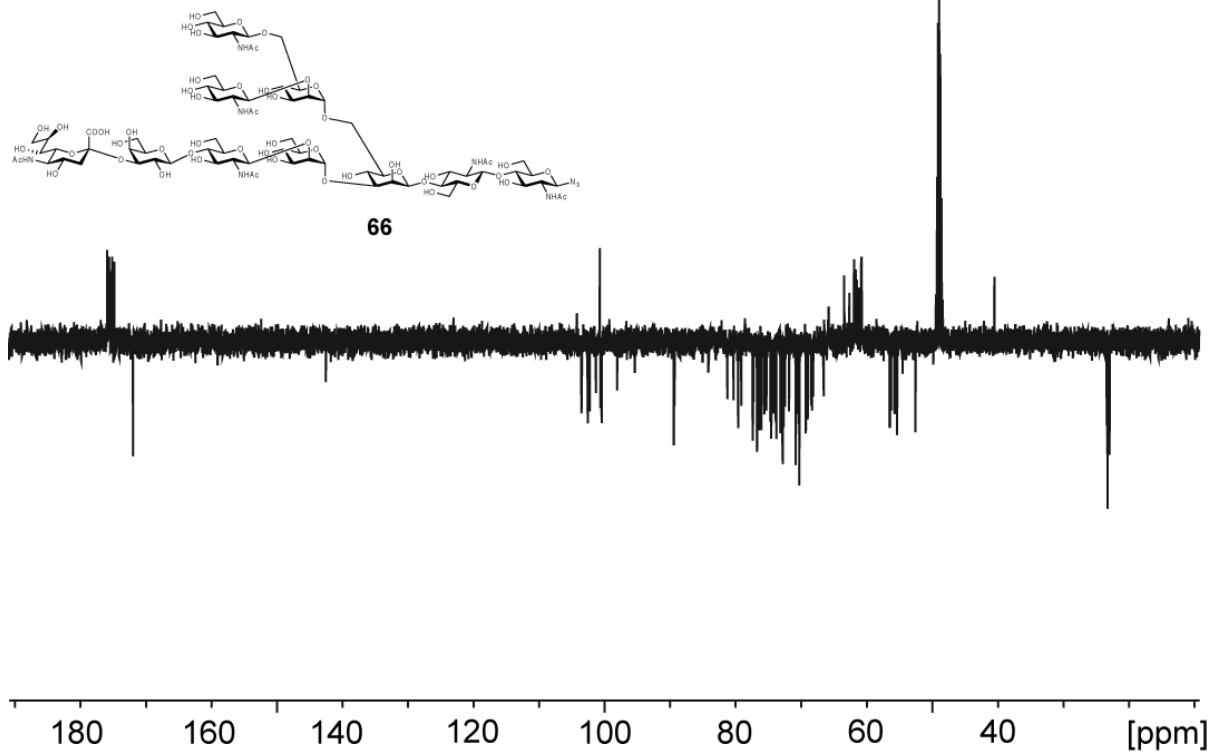


HSQC NMR, 500 MHz, D₂O

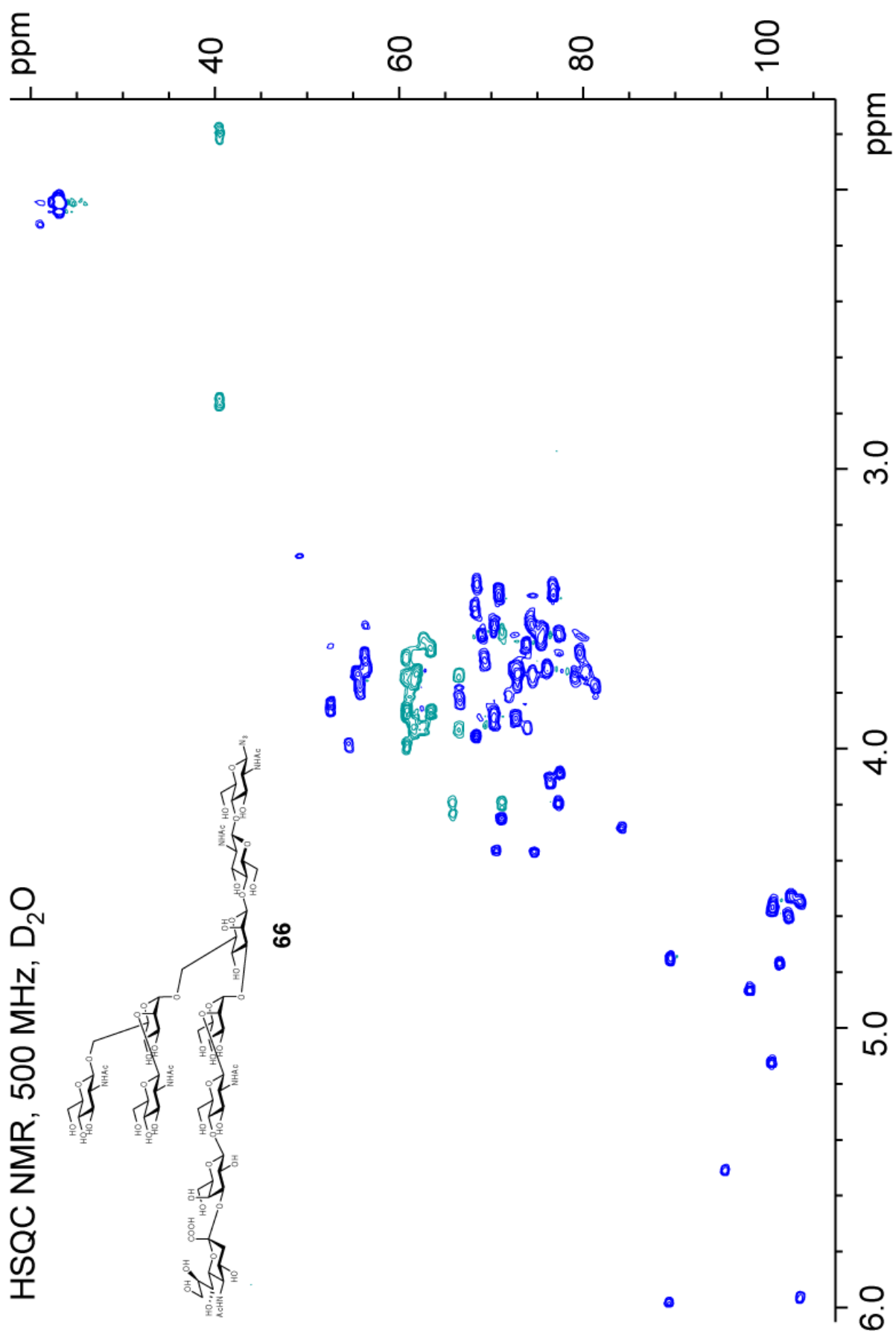
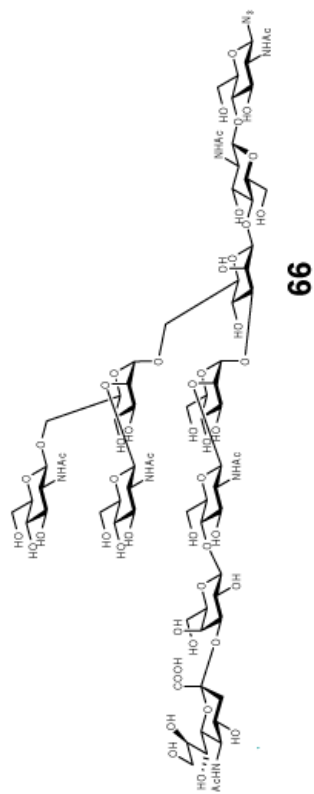




$^{13}\text{C-NMR}$, jmod, 125 mHz, D_2O



HSQC NMR, 500 MHz, D₂O



(Eidesstattliche) Versicherungen und Erklärungen

(§ 8 Satz 2 Nr. 3 PromO Fakultät)

Hiermit versichere ich eidesstattlich, dass ich die Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe (vgl. Art. 97 Abs. 1 Satz 8 BayHIG).

(§ 8 Satz 2 Nr. 3 PromO Fakultät)

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation nicht bereits zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht habe und dass ich nicht bereits diese oder eine gleichartige Doktorprüfung endgültig nicht bestanden habe.

(§ 8 Satz 2 Nr. 4 PromO Fakultät)

*Hiermit erkläre ich, dass ich Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern bzw. –
vermittlern oder ähnlichen Dienstleistern weder bisher in Anspruch genommen habe
noch künftig in Anspruch nehmen werde.*

(§ 8 Satz 2 Nr. 7 PromO Fakultät)

*Hiermit erkläre ich mein Einverständnis, dass die elektronische Fassung der
Dissertation unter Wahrung meiner Urheberrechte und des Datenschutzes einer
gesonderten Überprüfung unterzogen werden kann.*

(§ 8 Satz 2 Nr. 8 PromO Fakultät)

*Hiermit erkläre ich mein Einverständnis, dass bei Verdacht wissenschaftlichen
Fehlverhaltens Ermittlungen durch universitätsinterne Organe der wissenschaftlichen
Selbstkontrolle stattfinden können.*

.....
Ort, Datum, Unterschrift