



**A citoplazmában előforduló glikoprotein pentaszacharid  
szénhidrát részének szintézise**  
doktori (PhD) értekezés tézisei

**Szabó Zoltán**

(Témavezető: Dr. Lipták András)

**Synthesis of the pentasaccharide-segment of a glycoprotein  
found in the cytoplasm**  
theses of doctoral (PhD) dissertation

**Zoltán Szabó**

(Supervisor: Dr. András Lipták)

Debreceni Egyetem  
Természettudományi Doktori Tanács  
Kémia Doktori Iskola  
Debrecen, 2007.



**A citoplazmában előforduló glikoprotein pentaszacharid  
szénhidrát részének szintézise**  
doktori (PhD) értekezés tézisei

**Szabó Zoltán**

(Témavezető: Dr. Lipták András)

**Synthesis of the pentasaccharide-segment of a glycoprotein  
found in the cytoplasm**  
theses of doctoral (PhD) dissertation

**Zoltán Szabó**

(Supervisor: Dr. András Lipták)

Debreceni Egyetem  
Természettudományi Doktori Tanács  
Kémia Doktori Iskola  
Debrecen, 2007.

## 1. Az értekezés előzményei és célkitűzései

A szénhidrátok az élő szervezetekben nemcsak energiaforrásként vagy vázanyagként játszanak fontos szerepet, hanem a biológiai információk hordozóiként (glikokonjugátumok) is nagy jelentőségűek. Ezen felismerésre a tisztítás és a szerkezetmeghatározás során alkalmazott technikák, illetve műszerek (HPLC, MS, GC-MS, NMR) terén történt nagymértékű fejlődés után nyílt lehetőség.

Az oligoglikozil rész a glikokonjugátumokban sokféle szerepet tölthet be: a glikoproteinekben védi a fehérjét a proteázok támadásával szemben, másodlagos kölcsönhatásokkal rögzíti a fehérjét egy bizonyos konformációban, valamint alkalmassá teszi a glikoproteint egy adott szervezet citoplazmájában vagy sejtmagjában a betöltendő szerep ellátására. A plazmamembrán felületén lévő oligoszacharid szekvenciák receptorként működnek. A glikokonjugátumok vizsgálataiból sikerült olyan összefüggésekre fényt deríteni, amelyekkel mélyebben megérthetjük a glikokonjugátumok szénhidrát részének szerepét, a sejtek és a környezetük közötti kapcsolattartást és a sejt-sejt kölcsönhatást.

Az oligoszacharidok biológiai jelentőségének felismerése újabb kihívást jelent a kémikusok számára. A magasabb tagszámú, elágazó láncú oligoszacharidok szintézisének igénye megkövetelte újfajta blokk-szintézisek, védőcsoport stratégiák és új, sztereospecifikus glikozilezési módszerek kidolgozását, ezzel együtt a vegyületek izolálásában, szerkezetük meghatározásában használt technikák további fejlődését.

A DE-MTA Szénhidrátkémiai Tanszéki Kutatócsoportjában régóta folynak a természetben fellelhető glikokonjugátumok cukor részeinek szintézisére irányuló kutatások. A változatosan kapcsolódó oligoszacharidok előállítását nagymértékben elősegítette, hogy Lipták és munkatársai egy új, acetál/éter típusú védőcsoport stratégiát dolgoztak ki. Felismerték, hogy a szénhidrátok benzilidén acetáljai, a cukorgyűrűn való elhelyezkedésüktől függően, regio- és sztereoszelektíven, redukzív úton felnyithatók, és így szabad hidroxil-csoporttal rendelkező, benzil-éter származékok keletkeznek. A hidroxil-csoportot szinte tetszőleges helyzetben felszabadítva oligoszacharid építőelemek szintézisére nyílt lehetőség.

2000-ben, egyetemi hallgatóként kapcsolódtam be a Kutatócsoportban folyó cukor-védőcsoportok vizsgálatába, és témavezetőmtől, Dr. Lipták András akadémikus Úrtól a (2-naftil)metilén acetál és (2-naftil)metil éter védőcsoportok vizsgálatát kaptam feladatomul. Ezek a csoportok, a benzilidén acetál / benzil éter stratégia analógiájára, alkalmazhatóak szénhidrátok szelektív védelmére, de sokkal enyhébb és változatosabb körülmények között manipulálhatóak.

Célul tűztük ki, hogy a (2-naftil)metilén acetál / (2-naftil)metil(NAP) éter stratégiát monoszacharid építőelemek szintézisére használjuk fel és az építőelemek segítségével izomer oligoszacharidokat állítunk elő. Az értekezés témáját az ebben a kutatásban elért eredmények adják.

## 2. Az alkalmazott vizsgálati módszerek

A szintetikus munka során a modern preparatív szerves kémia makro-, félmikro- és mikromódszereit alkalmaztam. A reakciók követésére, az anyagok tisztaságának ellenőrzésére és a termékarányok meghatározására vékonyréteg kromatográfiás módszert használtam, a nyerstekek tisztítását és az izomerek szétválasztását kristályosítással, valamint oszlopkromatográfiával hajtottam végre. Az előállított vegyületek jellemzésére, azonosítására és szerkezetének igazolására elemanalízist, olvadáspont- és fajlagos forgatóképesség meghatározást, egy- és kétdimenziós ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY, TOCSY,  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ -HSQC) NMR spektroszkópiát és MALDI/ESI-TOF tömegspektrometriai módszert használtunk.

## 3. Az értekezés új tudományos eredményei

### 3.1 A pentaszacharid építőelemek előállítása

A *Dictyostelium discoideum*ban található Skp1 fehérje 143. aminosavja egy pentaszachariddal glikozilezett. A pentaszacharid vizsgálata során West és munkatársai nem tudták egyértelműen eldönteni, hogy a redukáló végi triszacharid [Fuc $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 2)Galp $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3)GlcNAc(1 $\rightarrow$  )HyPro; **C+B+A**] fukóz egységének melyik pozíciójához kapcsolódik a Galp $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 6)Galp $\alpha$ (1 $\rightarrow$ ?) szerkezetű diszacharid (**E+D**). A probléma megoldásául három izomer - a fukóz egységen eltérő kapcsolódású - pentaszacharid szintézisét terveztük megvalósítani, (2-trimethylsilyl)-etil-glikozidok formájában.

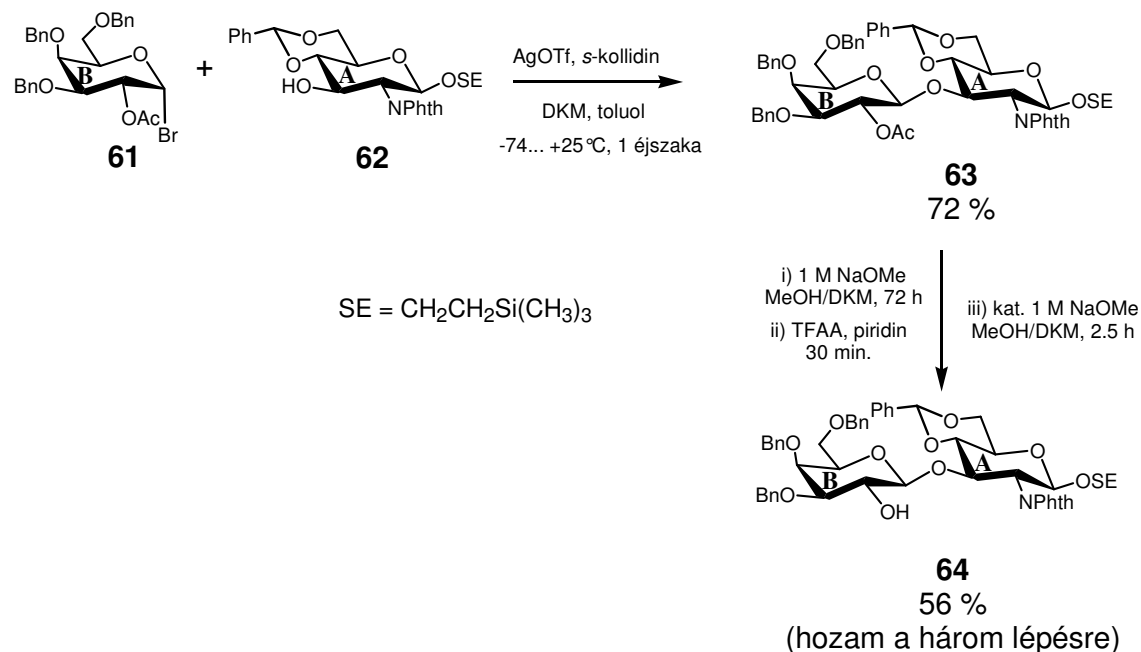
A pentaszacharid **B+A** és **E+D** részlete a megfelelő monoszacharidokból építhető fel. A **C**-egységek előállítása viszont körültekintőbb tervezést igényelt. Három olyan izomer származékra volt szükség, amelyeknek egy-egy hidroxil csoportja szelektíven felszabadítható a fukozilezési lépést követően. Ennek megoldását terveztük a (2-naftil)metil védőcsoporttal, mert a benzilek mellől szelektíven eltávolítható.

A **B+A diszacharid** fragmenst **61**<sup>\*</sup>-es és **62**-es, irodalomból ismert vegyület összekapcsolásával állítottam elő 72 %-os hozammal. A képződött **63**-as diszacharidról a 2'-

---

\* A vegyületek számozása azonos az értekezésben használttal.

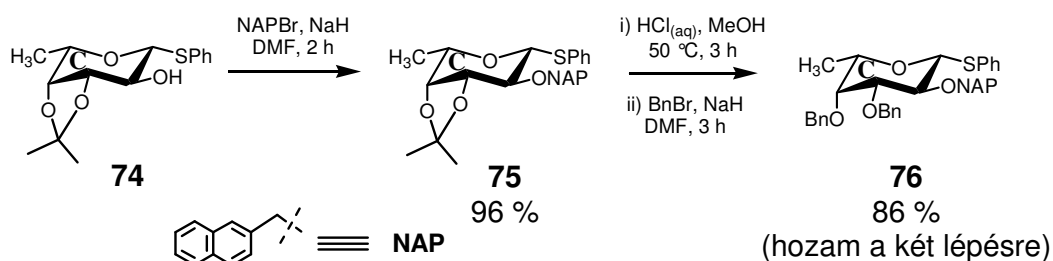
helyzetű acetil-csoport Zemplén-módszer szerinti lehasításával nyertem a kívánt **64**-es akceptort (1. ábra).



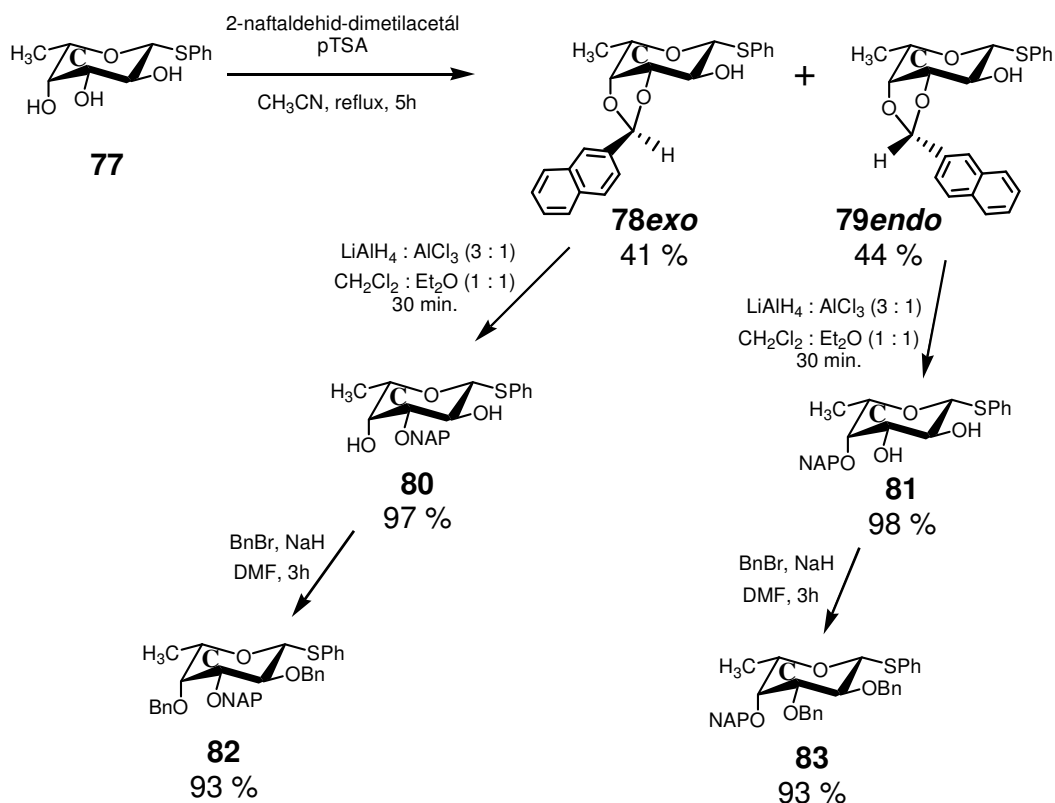
1. ábra

A dezacetilezési lépés közben a ftálimid-csoport is reagált, ennek visszazárása megnehezítette **64**-es előállítását. A védőcsoport manipuláció elkerülése végett megpróbáltam a glikozilezést **61**-hez hasonló, 2-*O*-klóracetilezett donorokkal, de nem sikerült a kívánt  $\beta$ -kötésű származékot főtermékként kinyernem.

A **C2**, **C3** és **C4** fukozid-vegyületeket - amelyek eltérő pozícióban tartalmaztak (2-naftil)metil védőcsoportot - **74**-ből, valamint **77**-ből állítottam elő. A NAP csoport bevitelét háromféleképpen hajtottam végre: közvetlen alkilezéssel, (2-naftil)metilén acetálok gyűrűnyitásával és sztannilén acetálon keresztüli alkilezéssel.

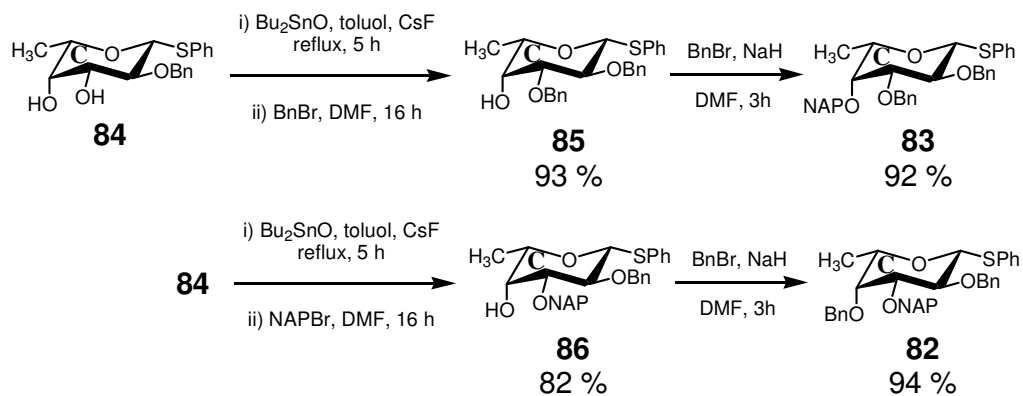


A **76**-os vegyület 2-ONAP csoportját közvetlen alkilezéssel alakítottam ki (2. ábra). A 3-ONAP és 4-ONAP vegyületek előállítását először a megfelelő sztereokémiájú (2-naftil)metilén acetál gyűrűnyitásával végeztem el (3. ábra).



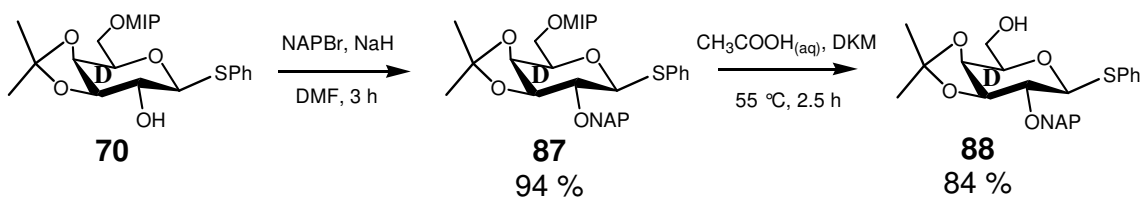
3. ábra

A **82**-es és **83**-as származékok szintézisét sztanilén acetálon keresztül alkilezéssel is végrehajtottam, és - még több szintézislépés kivitelezése mellett is - jobb hozamokat sikerült elérnem (4. ábra).

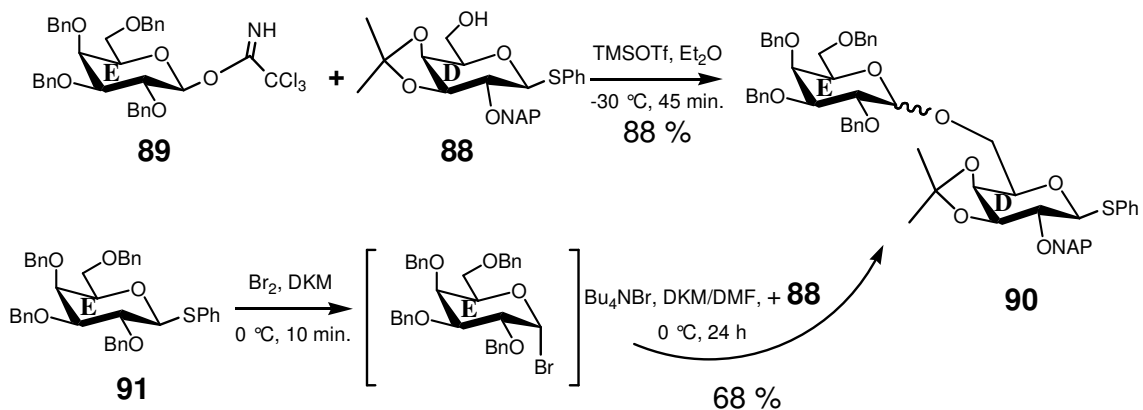


4.ábra

Az **E+D diszacharid donor előállítását** egy 6-os helyzetben szabad galaktóz-tioglikozid akceptor (**88**, 5. ábra) és egy tetra-*O*-benzil-galaktopiranozil-donor összekapcsolásával sikerült kivitelezni. A glikozilezést kétféle, irodalomból ismert, donorral (**89** és **91**) is megpróbáltam, ám egyik esetben sem sikerült anomertiszta formában az  $\alpha$ -glikozidot előállítanom (6. ábra).



5. ábra



6. ábra

A **90**-es keverékből védőcsoportcsere után sikerült a számomra szükséges  $\alpha$ -glikozidot kinyernem kromatográfia segítségével (7. ábra).



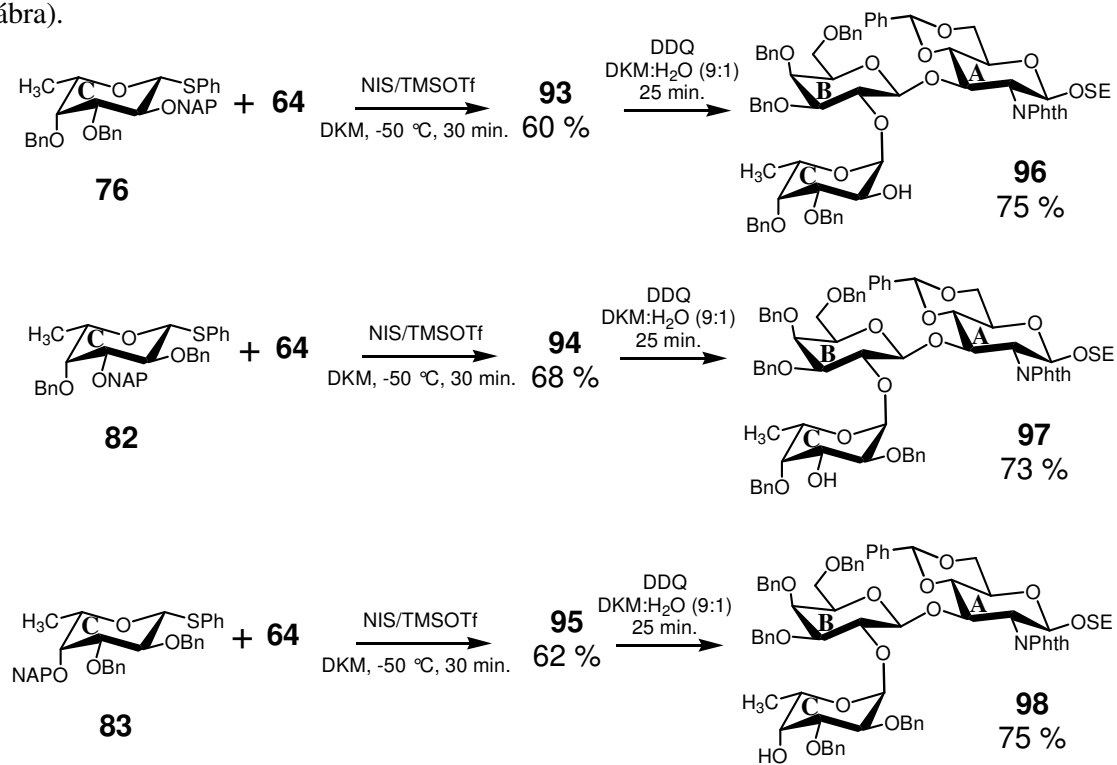
7. ábra

### 3.2 Glikozilezési reakciók

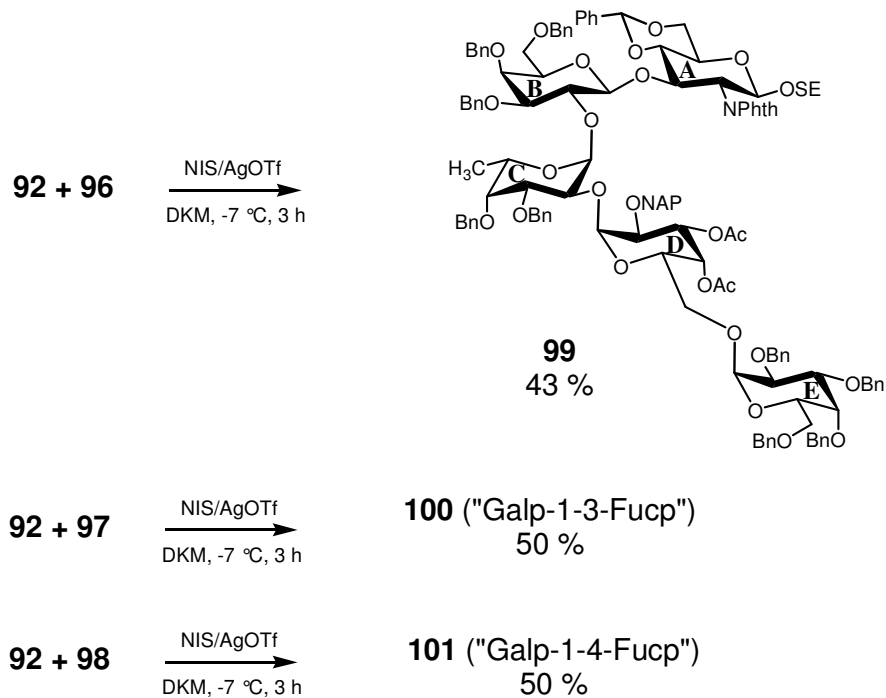
A redukáló végi triszacharidok szintézise a **64**-es akceptor és a megfelelő fukozid-donor (**76**, **82**, **83**) összekapcsolásával történt. A három izomer vegyület előállítását és védőcsoportjainak átalakítását ugyanolyan körülmények között végeztem, mert a reakciók lefutásában nem észleltem jelentős különbséget. A fukozilezést és a (2-naftil)metil-csoport szelektív eltávolítását követően izoláltam **96**-os, **97**-es és **98**-as triszacharid akceptorokat (8. ábra).

A **védett pentaszacharidokat** a **92**-es diszacharid-donor és a megfelelő helyzetben egyetlen OH-csoporttal rendelkező triszacharid-akceptor [**96** (2''-OH), **97** (3''-OH), **98** (4''-OH)] összekapcsolásával hoztam létre. A reakciókat NIS/AgOTf promotor jelenlétében

hajtottam végre és elfogadható hozammal nyertem **99**-es, **100**-as és **101**-es vegyületeket (9. ábra).



8. ábra

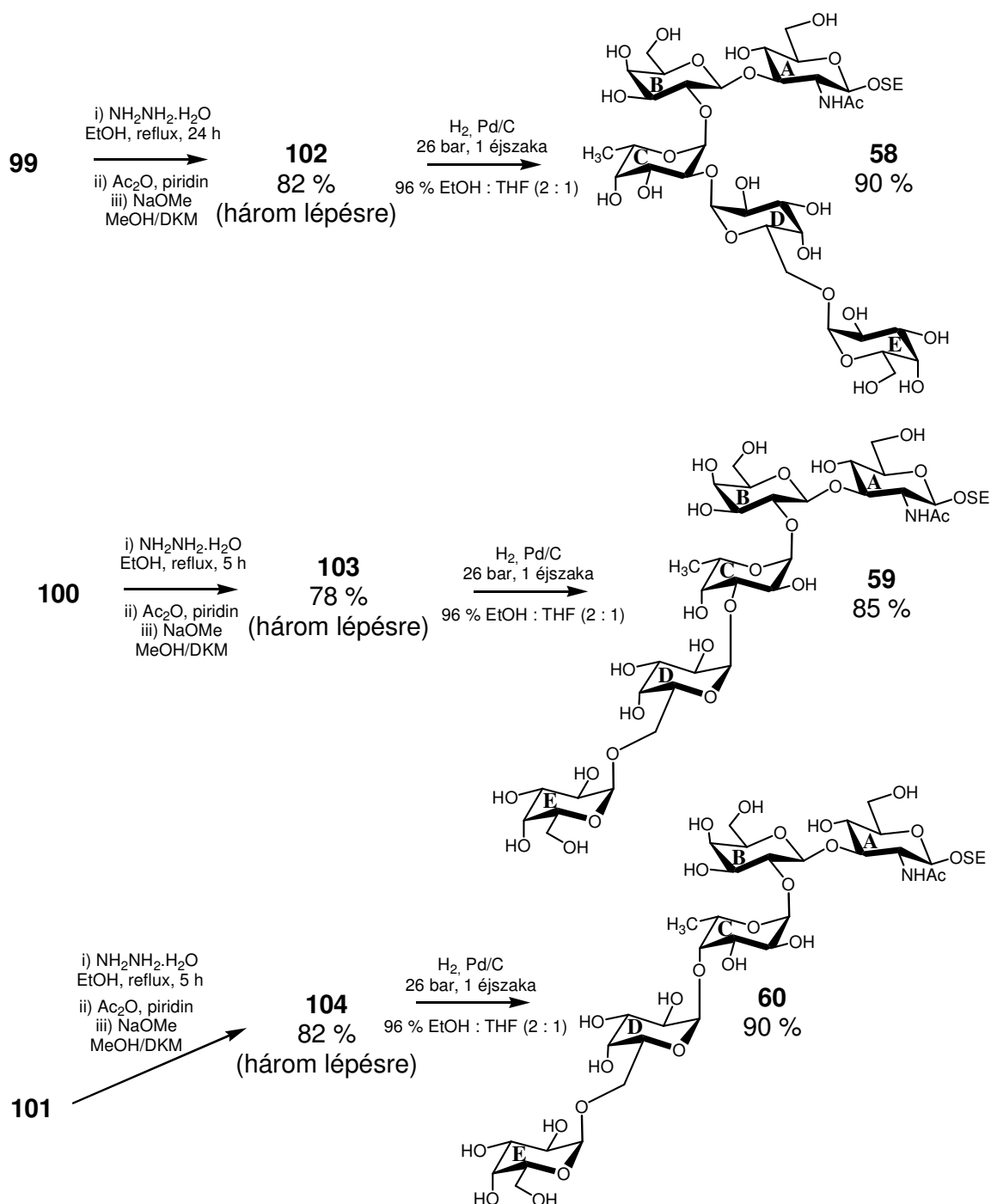


9. ábra



### 3.3 Védőcsoportok eltávolítása a pentaszacharidokról

A **99**-es, **100**-as és **101**-es vegyületeket hidrazin-hidráttal kezelve, majd ecetsavanhidriddel acetilézve a ftaloil-csoport *N*-acetillé alakítását hajtottam végre. A nyert származékokat Zemplén szerint dezacetilezve izoláltam **102**-es, **103**-as és **104**-es vegyületeket. A redukzív úton hasítható védőcsoportokat nyomás alatti katalitikus hidrogénezéssel távolítottam el, és az **58**-as, **59**-es és **60**-as, szabad célpentaszacharidokat kaptam (10. ábra).



10. ábra

#### 4. Összefoglalás

Munkám során sikerrel előállítottam a célkitűzésben megfogalmazott izomer pentaszacharidokat szabad formában, ~60-100 mg-os mennyiségekben. A szintetizált vegyületek az irodalom számára még nem ismertek. A feladat végrehajtásához ismert glikozilezési módszereket és a Kutatócsoportunkban először alkalmazott (2-naftil)metilén acetál / (2-naftil)metil éter védőcsoport stratégiát alkalmaztam. A (2-naftil)metil védőcsoport kialakítható volt a fukóz monoszacharid egység bármely pozíciójában és könnyedén el lehetett távolítani benzil-éterek jelenlétében. A NAP-védőcsoport több donor molekulánál is C-2 pozícióban szerepelt, és a vártak megfelelően nem résztvevő csoportként „működött”.

Az általam szintetizált vegyületek, remélhetőleg, képesek lesznek alátámasztani, vagy megcáfolni a természetből izolált vegyület szerkezetére tett javaslatot.

## 5. Publikációk jegyzéke

### 5.1 Közlemények jegyzéke

- 1.) A. Borbás, **Z. B. Szabó**, L. Szilágyi, A. Béneyei, A. Lipták: **Dioxane-type (2-naphthyl)-methylene acetals of glycosides and their hydrogenolytic transformation into 6-O- and 4-O-(2-naphthyl)methyl (NAP) ethers**, *Tetrahedron* **2002**, 58, 5723-5732.
- 2.) A. Borbás, **Z. B. Szabó**, L. Szilágyi, A. Béneyei, A. Lipták: **Stereoselective (2-naphthyl)-methylation of sugars by hydrogenolysis of diastereomeric dioxolane-type (2-naphthyl)methylene acetals**, *Carbohydr. Res.*, **2002**, 337, 1941-1951.
- 3.) T. Kurtán, A. Borbás, **Z. B. Szabó**, A. Lipták, A. Béneyei, S. Antus: **Circular Dichroism of 1,3-Dioxane-Type (2'-Naphthyl)Methylene Acetals of Glycosides**, *Chirality* **2004**, 16, 244-250.
- 4.) Magdolna Csávás, **Zoltán B. Szabó**, Anikó Borbás, András Lipták; *2-Naphthylmethyl bromide: Electronic Encyclopaedia of Reagents for Organic Synthesis*, (2004).
- 5.) Anikó Borbás, Magdolna Csávás, **Zoltán B. Szabó**, András Lipták; *2-(Dimethoxymethyl)naphthalene: Electronic Encyclopaedia of Reagents for Organic Synthesis*, (2004).
- 6.) **Zoltán B. Szabó**, Anikó Borbás, István Bajza, András Lipták: **Synthesis of fully protected  $\alpha$ -L-fucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-galactopyranosides with a single free hydroxy group at position 2', 3' or 4' using O-(2-naphthyl)methyl (NAP) ether as a temporary protecting group**, *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, 16, 83-95.

### 5.2 Előadások és poszterek

- 1.) A. Lipták, A. Borbás, **Z. B. Szabó**, L. Jánossy, L. Szilágyi: Preparation of (2-naphthyl)methylene acetals of glycosides and their hydrogenolytic transformation into 2-naphthylmethyl(NAP) ethers, *20<sup>th</sup> International Carbohydrate Symposium, Hamburg, Germany, 27 August – 01 September, 2000*. B-224 poszter (p. 170, Abstract book )

- 2.) **Szabó Zoltán**: Glikozidok (2-naftil)metilén acetáljainak szintézise és hidrogenolitikus átalakításuk (2-naftil)metil éterekké, *XXV. OTDK Kémiai és Vegyipari Szekció, Szerves Kémia "A" tagozat, Gödöllő, 2001. április 10-12.* - előadás
- 3.) **Szabó B. Z.**, Lipták A., Borbás A., Szilágyi L., Bényei A.: Glikozidok (2-naftil)metilén-acetáljainak szintézise és hidrogenolitikus átalakításuk (2-naftil)metil(NAP) éterekké, *MKE Vegyészkonferencia, Hajdúszoboszló, 2001. június 27-29.* P-99 poszter (konferencia kiadvány 133. old)
- 4.) A. Lipták, A. Borbás, **Z. B. Szabó**, L. Szilágyi: Preparation of (2-naphthyl)methylene acetals of glycosides and their selective hydrogenolysis into (2-naphthyl)methyl ethers, *11<sup>th</sup> European Carbohydrate Symposium, Lisboa, Portugal, 2-7 September, 2001.* PA035 poszter (p. 163, Abstract book)
- 5.) **Z. B. Szabó**, A. Lipták, L. Jánossy: L-Fucoside building blocks suitable for oligosaccharide synthesis, *12<sup>th</sup> European Carbohydrate Symposium, Grenoble, France, 6-11 July, 2003.* PB-025 poszter
- 6.) **Z. B. Szabó**, A. Lipták, L. Jánossy: L-Fucoside building blocks suitable for oligosaccharide synthesis, *First Austrian-Hungarian Carbohydrate Conference, Burg-Schlaining, Austria, 24-27 September 2003.* - előadás
- 7.) **Szabó B. Zoltán**, Lipták András, Jánossy Lóránt:  $\alpha$ -L-Fukopiranozil kötések kialakítására alkalmas védett tioglikozidok szintézise, *XXVI. Kémiai Előadói Napok, Szeged, 2003. október 27-29.* – előadás (konferencia kiadvány 23. old.)
- 8.) **Zoltán B. Szabó**, Anikó Borbás, András Lipták: L-Fucose Building Blocks Suitable For Oligosaccharide Synthesis, *First German-Hungarian Workshop, Hannover, Germany, 5-6 July 2004.* - előadás
- 9.) **Zoltán B. Szabó**, Mihály Herczeg, Magda Csávás, Anikó Borbás, Gyula Batta, András Lipták: Synthetic Studies on the Pentasaccharide Side-Chain of the Skp1 Glycoprotein Found in *Dictyostelium discoideum*, *Second German-Hungarian Workshop, Debrecen, Hungary, 4-9 April 2006.* - előadás