

SUKKERETS VÆRDIFULDE BINDING

Kemikere vil meget gerne kunne bygge små molekyler af sukkerstoffer (oligosakkarider) i laboratoriet, da sådanne molekyler kan have stor forskningsmæssig og kommerciel værdi. En stor udfordring er at styre den kemiske binding mellem molekylets grundkomponenter, men her kan de rette metalforbindelser hjælpe på vej, viser Robert Madsens forskning.

Om forfatteren

Carsten R. Kjaer,
Aktuel Naturvidenskab



**DET FRIE
FORSKNINGSRÅD**
DANISH COUNCIL
FOR INDEPENDENT
RESEARCH

Artiklen bringes i samarbejde med Det Frie Forskningsråd | Natur og Univers.

Det Frie Forskningsråd dækker alle videnskabelige hovedområder og uddeler hvert år godt 1 mia. kr. til forskningsprojekter baseret på forskernes egne ideer. Det Frie Forskningsråd består af 84 anerkendte forskere udpeget på baggrund af deres høje faglige kompetence. Formand for Det Frie Forskningsråd | Natur og Univers er professor ved Danmarks Tekniske Universitet, Lars Arge. Læs mere på detfrieforskningsraad.dk

Liv kan beskrives som en slags kompliceret kemi. Og i livets kemi spiller tre typer makromolekyler en hovedrolle, nemlig proteiner, nukleinsyrer og oligosakkarider, hvor sidstnævnte består af kulhydrater (sukkerstoffer). De indgår i stort set alle processer i levende organismer. Forskere er derfor meget interesserede i at studere disse biomolekyler og deres vekselvirkninger, fordi det kan være nøglen til at forstå en lang række biologiske processer. Dermed er det også af stor praktisk værdi, fx i forbindelse med udvikling af nye lægemidler.

Til studierne har man brug for simple udgaver af disse komplekse molekyler, som man har 100 % styr på. Dvs. man skal fx være

sikker på, at det udelukkende er et veldefineret molekyle, man arbejder med og ikke en blanding af flere varianter. Det er meget svært at skaffe sådanne veldefinerede molekyler ved blot at isolere dem fra naturlige kilder. Derfor forsøger kemikere i stedet at gøre naturen efter og bygge simple udgaver af molekylerne op i laboratoriet. Den kunst har forskerne bragt til et stade, hvor man i dag hurtigt og effektivt kan bygge relativt store molekyler af proteiner og nukleinsyrer på specialiserede syntesemaskiner.

Oligosakkariderne har derimod vist sig som en langt mere vanskelig nød at knække for kemikerne.

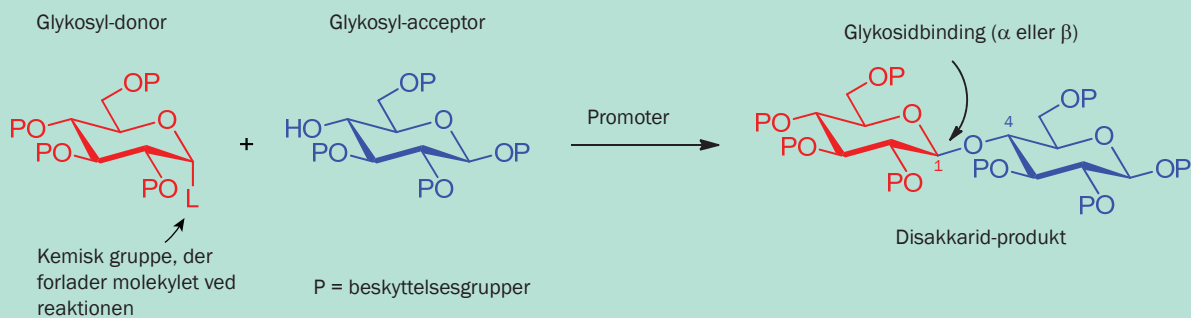
»Det er en meget arbejdskrævende proces at bygge oligosakkarider via

kemisk syntese,« fortæller Robert Madsen, der er professor ved Institut for Kemi på DTU. Men der er grund til optimisme: I et projekt finansieret af Det Frie Forskningsråd | Natur og Univers har Robert med sin forskningsgruppe opnået resultater, der peger på, at oligosakkarider i fremtiden vil kunne fremstilles betydeligt mere effektivt i laboratoriet.

Kemisk modulbyggeri

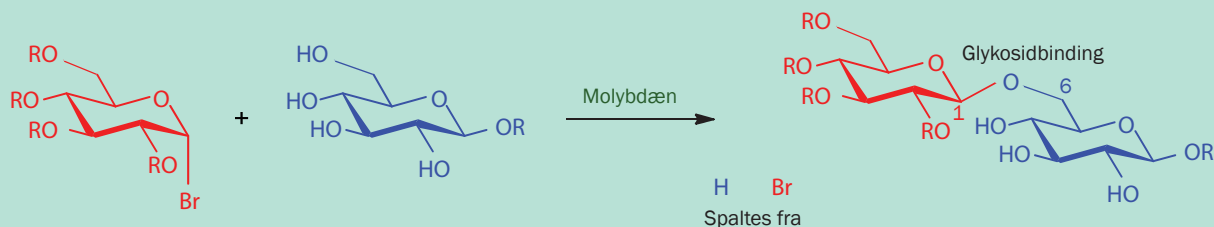
Når man betragter den kemiske struktur af proteiner, nukleinsyrer og oligosakkarider, er det karakteristisk for dem, at de populært sagt alle er modulopbyggede. Dvs. de er opbygget af et stort tal grundlæggende enheder, der er bundet sammen. Proteinerne er grundlæggende opbygget af lange kæder af aminosyrer, som foldes i

Dannelsen af en glykosidbinding i laboratoriet



Øverst ses princippet i dannelsen af en glykosidbinding i laboratoriet, hvor to monosakkarider – en donor og en acceptor – kobles sammen. Alle hydroxygrupper (OH), man ikke ønsker indgår i bindingen, er blokeret af beskyttelsesgrupper. I dette eksempel sker bindingen

ved kulstofatomerne med position hhv. 1 og 4 i de to kulstofringe. Koblingen kan give anledning til to rumligt forskellige udgaver af det endelige disakkarid. For at få reaktionen til at forløbe er der brug for reagenser (promoter), som også forbruges i reaktionen.



En tilsvarende reaktion er illustreret herover. Her bruges metallet molybdæn til at guide reaktionen, så man ikke behøver blokere alle hydroxygrupperne. Molybdæn binder sig til to af hydroxygrupperne og forøger derved deres reaktivitet, så bindingen

sker her fremfor ved andre hydroxygrupper – i dette tilfælde ved kulstofatomerne med position 1 og 6. Udover de viste forbindelse indgår der også reagenser i reaktionen, som er tilsat med henblik på at binde det fraspaltede hydrogen og brom.

en kompliceret struktur i det aktive proteinmolekyle. Nukleinsyrerne (som DNA) er opbygget af en lang streng af kemiske byggeblokke kaldet nukleotider.

Hvad oligosakkarider angår, antyder navnet allerede, at der her er tale om "få" (oligos = ringe antal på græsk) sakkarider. Grundenheden i oligosakkarider kaldes monosakkarider, og dem findes der en del forskellige af – fx glukose, fruktose og mannose, som er nogle af de mere kendte. Generelt siger man, at der er tale om et oligosakkarid, når stoffet indeholder mellem 3 og ca. 25 monosakkarider. Forbindelser med flere monosakkarider kaldes polysakkarider og kan være meget komplekse molekyler med tusindvis af monosakkarider koblet sammen som i stivelse, cel-

lulose og glykogen.

»For en kemiker kan det være en udfordring bare at koble to monosakkarider sammen«, fortæller Robert. »Og hvis man vil koble 25 monosakkarider sammen, snakker vi om et helt ph.d.-projekt. Til sammenligning kan man på syntesemaskiner let koble op til 50 nukleotider eller aminosyrer sammen til et veldefineret molekyle«.

Hermed er det også antydnet, at problemet ikke ligger i at skaffe byggeklodserne – monosakkariderne – men at det hele handler om den kemiske binding, der kobler monosakkariderne sammen.

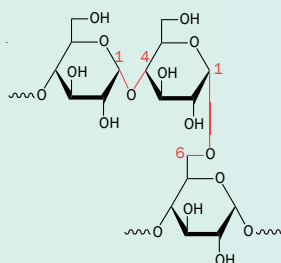
En tricky binding

Mens aminosyrer og nukleotider kobles sammen med simple

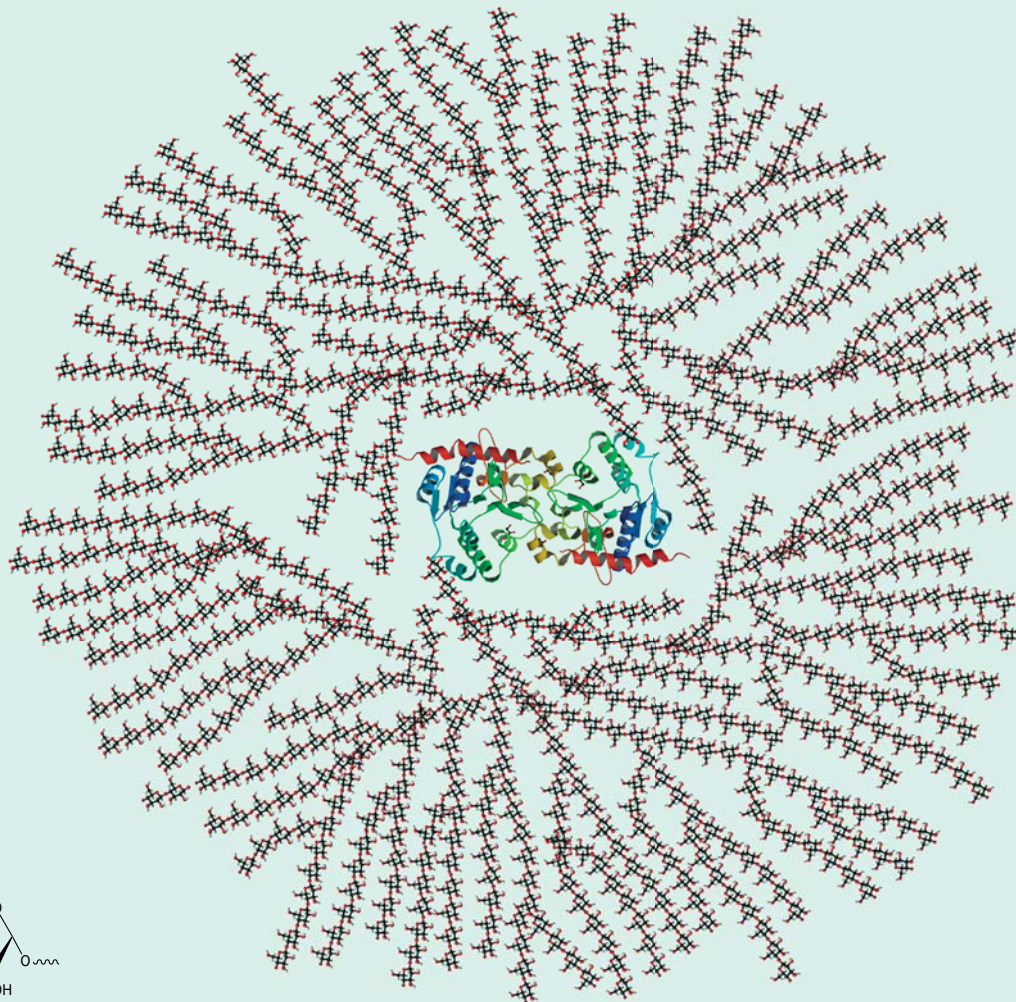
Robert Madsen

Robert Madsen er professor ved institut for Kemi på DTU. Han modtog sin ph.d.-grad i kulhydratkemi fra DTU i 1992 og arbejdede herefter som postdoc i USA ved henholdsvis Duke University og Stanford University. Siden 1996 har han forsket i kulhydrater og metalleres kemi ved DTU, hvor han blev udnævnt til professor i 2003. Hans forskningsgruppe har uddannet over 30 ph.d. studerende og modtaget mange bevillinger fra både private og offentlige råd og fonde. Robert Madsen har også modtaget flere priser for sin forskning herunder Torkil Holms Forskningspris og Bjerrum-Brønsted-Lang forelæsningsen.





Kompleksiteten i polysakkarider kan illustreres med molekylet glycogen, som er opbygget af tusindvis af glukosemolekyler (den farvede struktur i midten er et enzym, glucogenin). Alle de



lineære kæder er forbundet med α -1,4-glykosidbindinger, mens forgreningspunkterne er et resultat af α -1,6-glykosidbindinger. Glykogen fungerer i dyr og mennesker som energidepot. Illustration: Mikael Hægström

kemiske bindinger (kaldet hhv. amidbindinger og fosfodiesterbindinger), er den kemiske binding mellem to monosakkarider en mere kompliceret sag. Denne type binding kaldes en glykosidbinding, og for syntese-kemikeren er der to udfordringer i at få den til at opføre sig præcis som ønsket.

»Den ene udfordring er, at der kan dannes to rumligt forskellige udgaver af det resulterende molekyle, når man kobler monosakkarider sammen«, siger Robert. »Og den anden er, at der er flere forskellige kemiske grupper på monosakkariderne, der potentielt kan indgå i bindingen. Så den store kunst er at få bindingen til at ske netop der, hvor man ønsker den.«

Det er den anden af disse udfor-

dringer, Robert har haft fokus på i sit projekt.

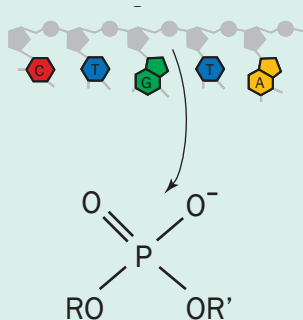
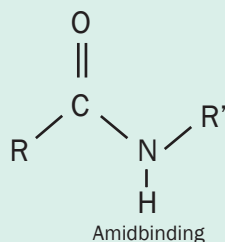
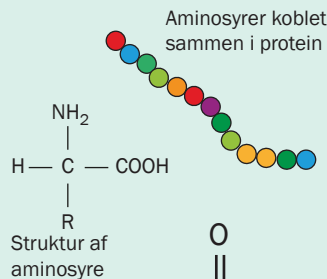
Monosakkarider er grundlæggende opbygget som ringformede strukturer, hvor ringen primært består af kulstofatomer. På nogle af kulstofatomerne sidder der såkaldte hydroxygrupper, der kemisk set består af et hydrogen- og et oxygenatom (OH). En glykosidbinding opstår ved, at et monosakkarid reagerer med en hydroxygruppe på et andet monosakkarid.

»Problemet er så, at der på monosakkarider kan være 3-5 hydroxygrupper, og hvis man ønsker, at bindingen opstår et helt specifikt sted, skal man have styr på de øvrige hydroxygrupper, så de ikke blander sig utidigt,« fortæller Robert.

Traditionelt har man gjort det ved at reagere hydroxygrupperne med kemiske forbindelser, så kun en af dem er fri til at reagere, mens de andre er blokerede, når de to monosakkarider skal kobles sammen. Denne fremgangsmåde kræver i sagens natur en række ekstra reaktioner i syntesen af det færdige oligosakkarid. Derudover skal de molekyler, man bruger til at blokere hydroxygrupperne med, fjernes igen efter at oligosakkaridet er dannet. Det kræver endnu en arbejdsgang og producerer også et affaldsprodukt, der skal håndteres.

Metaller kan dirigere koblingen

»I forskningsprojektet har vi arbejdet med at udvikle en ny strategi til at koble monosakkariderne



Fosfodiesterbinding

Nukleinsyrer som DNA og proteiner er ligesom oligosakkarider modulopbyggede. Men de kemiske bindinger, der kobler modulet sammen, er mere simple og derfor lettere at lave i laboratoriet. Illustrationen viser den principielle struktur af disse bindinger, hhv. amidbindingen og fosfodiesterbindingen.



I laboratoriet kan man i dag let fremstille oligomerer af DNA og RNA med automatiske syntesemaskiner. Billedet viser en model fra det danske firma Oligomaker Aps. Med et sådant apparat kan man fx lave 10 oligomerer bestående af hver 20 nukleotider på under 2,5 time. Foto: Oligomaker.

sammen uden at bruge kemiske beskyttelsesgrupper til at skærme hydroxygrupperne af», fortæller Robert. »Det minder en smule om, hvordan processen foregår i naturen, hvor enzymet glykosyl-transferase klarer sammenkoblingen, ved at enzymet binder substratet i sit aktive site, sådan at kun en bestemt reaktion kan forekomme.«

Tricket er at udnytte metalholdige forbindelser til at dirigere koblingen, således at den kun finder sted med én bestemt hydroxygruppe.

»Princippet består i, at et monosakkarid med frie hydroxygrupper blandes med et metal, hvorved metallet binder til to af hydroxygrupperne. Afhængig af det valgte metal, kan der herefter ske to ting. Enten forøges reaktiviteten af én

af de bundne hydroxygrupper, således at den efterfølgende kobling med et andet monosakkarid kun finder sted med denne gruppe. Alternativt kan metallet nedsætte reaktiviteten af begge hydroxygrupper, og koblingen vil herefter finde sted med en tredje gruppe, som ikke er bundet til metallet,« forklarer Robert.

Han fortæller, at metallet kan være tin eller bor, som dog begge har ulemper. Tin-forbindelser er giftige og vanskelige at adskille fra organiske forbindelser, mens bor-forbindelser er kostbare. I projektet har Robert og kolleger derfor undersøgt en række andre metaller.

»Vi opdagede, at molybdæn-forbindelser også kan anvendes til at dirigere koblingen,« siger

Robert. »Molybdæn-forbindelser er både billige og relativt ugiftige og udgør derfor et godt alternativ til tin- og bor-forbindelserne. Molybdæn-forbindelser virker ved at binde til to hydroxygrupper i et monosakkarid, hvilket øger reaktiviteten af den ene gruppe. Koblingen til et andet monosakkarid sker derefter kun til denne hydroxygruppe, på trods af at molekylet indeholder adskillige andre hydroxygrupper.«

På denne måde er det muligt at koble to monosakkarider, uden at hydroxygrupperne i det ene først skal skærmes via en række separate reaktioner. Det dannede produkt vil være et disakkarid, som efterfølgende kan reagere videre via samme reaktion til et trisakkarid. Ifølge Robert Madsen

Videre læsning

Böttchera, S. & Thiema, J. (2014): Glycosylation Employing Unprotected Carbohydrate Acceptor Components. *Current Organic Chemistry*, 18, 1804-1817. (Artiklen er "pay per view").

Projekttitel: Metal-Directed Glycosylation with Unprotected Carbohydrates

Virkemiddel: Forskningsprojekter (2012).



Syntesemaskiner til at lave oligosakkarider er så småt ved at blive kommercielt tilgængelige. Billedet viser *The glyconeer* fra det tyske firma GlycoUniverse GmbH.

er det ikke realistisk at lave længere oligosakkarider udelukkende ved brug af metaller til at dirigere koblingerne.

»Men teknikken gør det muligt nemt at fremstille en række di- og trisakkarider, som kan fungere som byggesten i fremstillingen af længere oligosakkarider,« siger han.

Forskning med mange perspektiver

Der er en hel række områder, hvor let adgang til at fremstille veldefinerede oligosakkarider, kan få stor praktisk betydning. Det gælder ikke mindst inden for udviklingen af nye lægemidler. Oligosakkarider er involveret i en lang række vitale processer i vores organisme som kommunikation mellem celler, immunrespons, udvikling af kræft og andre sygdomme. Derfor er forbedrede metoder til at fremstille oligosakkarider afgørende for at kunne

studere nogle af de fundamentale biologiske vekselvirkninger, disse molekyler indgår i, ligesom de i sig selv kan være en komponent i et nyt lægemiddel.

Indenfor fødevarerområdet kan der også være interessante anvendelser – fx i forbindelse med fremstilling af kulhydrater, som kan tilsættes fødevarer.

Også inden for udvikling af nye metoder til produktion af produkter ud fra biomasse – fx biobrændsler – er der oplagte perspektiver, idet forskning bygget på veldefinerede oligosakkarider vil kunne hjælpe forskere med at øge forståelsen af, hvordan enzymer nedbryder biomasse.

Alt sammen hænger det altså på, hvor god man kan blive til at lave en bestemt kemisk binding – glykosidbindingen – i laboratoriet. En drøm vil selvfølgelig være at opnå

samme hurtighed og effektivitet, hvormed man i dag producerer oligonukleotider og -peptider på syntesemaskiner i laboratoriet. Men her må man ifølge Robert Madsen indstille sig på, at det på grund af den meget mere komplicerede kemiske binding næppe nogensinde vil være muligt at matche den effektivitet, man kan producere de to andre biomolekyler med.

»Det er faktisk muligt i dag at producere oligosakkarider på syntesemaskiner, men det er som sagt ikke særlig effektivt. Der er dog ingen tvivl om, at det kan gøres meget bedre, og vores resultater kan bidrage til denne udvikling«, slutter Robert. ■



**DET FRIE
FORSKNINGSRÅD**
DANISH COUNCIL
FOR INDEPENDENT
RESEARCH