

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra organické a bioorganické chemie



**Vývoj spolehlivé metody glukosylace a laktosylace
sfingolipidů**

Diplomová práce

Adam Hošek

Hradec Králové 2023

Vedoucí práce: *PharmDr. Lukáš Opálka, Ph.D.*

Konzultant: *Dr. Georgios Paraskevopoulos, Ph.D.*

Poděkování

Touto cestou bych chtěl velmi poděkovat svému školiteli PharmDr. Lukáši Opálkovi, Ph.D. za přátelský přístup při vedení mé práce, cenné rady, odbornou pomoc a zejména trpělivost. Dále bych chtěl poděkovat Panagiotě Velissari a Sorině Hirbod za technické informace a neocenitelnou, vždy dostupnou asistenci při mé práci v laboratoři. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat své snoubence za podporu v průběhu celého studia na fakultě.

Prohlášení:

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Všechna literatura a další zdroje, ze kterých jsem při zpracování čerpal, jsou uvedené v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 31.8.2023

Adam Hošek

Abstrakt

Název Diplomové práce: Vývoj spolehlivé metody glukosylace a laktosylace sfingolipidů

Kandidát: Adam Hošek

Školitel: PharmDr. Lukáš Opálka, Ph.D.

Konzultant: Dr. Georgios Paraskevopoulos, Ph.D.

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Skin Barrier Research Group, Katedra organické a bioorganické chemie

Ceramidy jsou hydrofobní sfingolipidy skládající se ze sfingoidní báze a acylového řetězce. V lidském těle se vyskytují ve stratum corneum, nejsvrchnější vrstvě epidermis, kde jsou součástí kožní bariéry, můžeme je ale nalézt také v mozkové tkáni a uvnitř buněk.

Glukosylceramidy jsou nejjednodušší glykosfingolipidy a ve své struktuře obsahují jednu molekulu glukózy. Jsou obsaženy ve všech typech lidských buněk, kde slouží nejen jako prekurzory pro biosyntézu složitějších glykosfingolipidů, ale mají i vlastní fyziologické funkce. Nejvýznamnější je jejich vliv na růst a vývoj buněk, jejich diferenciaci a apoptózu. Poruchy v jejich syntéze nebo degradaci mají za následek vážné zdravotní problémy a zároveň jsou rizikovým faktorem pro budoucí vznik široké škály onemocnění. Jejich úplná absence v organismu je neslučitelná se životem. Podrobnější studium jejich role a mechanismu působení v lidském těle může v budoucnu pomoci lépe pochopit důležité otázky moderní medicíny, zejména v oblasti onkologických a neurodegenerativních onemocnění, a zároveň potenciálně poskytnout nové možnosti léčby.

Cílem této práce bylo porovnat aktuální metody syntézy glukosylceramidů v literatuře, zvolit ty nevhodnější pro prostory naší laboratoře, postupy ověřit a optimalizovat. Hledali jsme syntézu v budoucnu aplikovatelnou na širokou škálu různých cukrů i ceramidů, která by umožnila spolehlivou přípravu glukosylceramidů pro jejich další studium.

V rámci této práce jsme vyzkoušeli dvě metody přípravy glukosylceramidů dříve popsané v literatuře a pokusili jsme se o jejich optimalizaci. Úspěšně jsme několikrát opakovali a optimalizovali čtyřkrokovou přípravu chráněného glukosylového donoru, a to ve vysokých výtěžcích přesahujících ty v literatuře. Tento postup bude do budoucna možné využít pro přípravu širší škálu glykosylových donorů. Chráněnou glukózu jsme pak využili k reakci s nechráněným ceramidem za vzniku beta-glukosylceramidu. Princip reakce spočívá ve vzniku elektrofilního glukosylmesylátu, který následně reaguje s ceramidem za přítomnosti anhydridu kyseliny difenylborité. Ten tvoří dočasný komplex s C₁ a C₃ OH skupinami ceramidu, zesiluje nukleofilitu volného el. páru kyslíku na C₁ sfingosinu a umožňuje stereoselektivní reakci. Celkový výtěžek této šestikrokové syntézy byl 7 %.

Druhý postup, který jsme v rámci práce vyzkoušeli, byla příprava glukosylceramidu využívající per-O-silylovaného glukosylového donoru a jeho následné převedení na glukosyljodid, který by měl v prostředí TBAI selektivně poskytovat alfa-glukosylceramidy. Tímto postupem se nám nepodařilo získat čistý produkt, avšak průběh reakce sledován na TLC a NMR analýza naznačovaly jeho vzniku.

Abstract

Title of the master thesis: The development of reliable method for glucosylation and lactosylation of sphingolipids

Candidate: Adam Hošek

Supervisor: PharmDr. Lukáš Opálka, Ph.D.

Consultant: Dr. Georgios Paraskevopoulos, Ph.D.

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Skin Barrier Research Group, Department of Organic and Bioorganic Chemistry

Ceramides are hydrophobic sphingolipids consisting of a sphingoid base and an acyl chain. They are found in the stratum corneum, the uppermost layer of the epidermis, where they are important part of the skin barrier, but they can also be found in brain tissue and inside human cells.

Glucosylceramides are the simplest glycosphingolipids, and they contain a single glucose molecule in their structure. They are found in all types of human cells, where they not only serve as precursors for the biosynthesis of other, more complex glycosphingolipids, but also have their own physiological functions. The most significant is their influence on cell growth, development, differentiation, and apoptosis. Disruptions in their synthesis or degradation can lead to serious health problems and are also a risk factor for the future development of a wide range of diseases. Their total absence in the body is incompatible with life. A more thorough study of their roles and mechanisms of action in the human body may help to better understand important issues of modern medicine in the future, especially in the field of cancer and neurodegenerative diseases, and may also potentially provide new treatment options.

The aim of this thesis was to compare the current methods of glucosylceramide synthesis in the literature, to select the most suitable one for the environment of our laboratory and to validate and optimize the procedures. We were looking for a synthesis applicable to a wide range of different sugars and ceramides in the

future, that would allow reliable synthesis of glucosylceramides for their further study.

In this work, we tested two methods of preparing glucosylceramides previously described in the literature and we attempted to optimize them. We successfully replicated and optimized the four-step preparation of the protected glucosyl donor several times in high yields exceeding those in the literature. This approach can be used to prepare a wider range of glycosyl donors in the future. The protected glucose was then used to react with the unprotected ceramide to form beta-glucosylceramide. The principle of the reaction involves the formation of electrophilic glucosyl mesylate, which subsequently reacts with ceramide in the presence of diphenylborinic anhydride. The latter forms a temporary complex with the C₁ and C₃ OH groups of the ceramide, amplifying the nucleophilicity of the free electron pair on the C₁ hydroxyl and allowing a stereoselective reaction. The overall yield of this six-step synthesis was 7 %.

The second procedure we tried in this work was the preparation of a glucosylceramide using a per-O-silylated glucosyl donor and its subsequent conversion to a glucosyl iodide, which should selectively provide alpha-glucosylceramides in the TBAI environment. We were not able to obtain the pure product by this procedure, but the course of the reaction monitored by TLC and the NMR analysis indicated its correct formation.

Obsah

Abstrakt	4
Abstract	6
Obsah	8
1 Úvod a cíl práce	10
2 Seznam zkratk	11
3 Teoretická část.....	13
3.1 Kůže	13
3.1.1 Stavba.....	13
3.1.2 Vrstvy kůže	13
3.1.3 Epidermis.....	14
3.2 Stratum corneum.....	17
3.3 Ceramidy	19
3.4 Glykosfingolipidy.....	20
3.4.1 Struktura, dělení.....	20
3.4.2 Biosyntéza	21
3.4.3 Funkce GSL.....	22
3.5 Glukosylceramidy	23
3.6 Vliv glukosylceramidů na lidská onemocnění	24
3.6.1 Gaucherova choroba	24
3.6.2 Glukosylceramidy a nádorová onemocnění	25
3.6.3 Parkinsonova nemoc (PD)	25
4 Výsledky a diskuse.....	26
4.1 Historické přípravy glykosfingolipidů.....	26
4.2 Syntézy využití v naší práci	28

4.2.1	Syntéza podle D 'Angela a Taylora	29
4.2.2	Jednotlivé reakce provedené v naší laboratoři	29
4.2.3	Syntéza podle Du, Suvarn a Jacquelyn.....	34
4.2.4	Jednotlivé reakce.....	34
5	Experimentální část	36
5.1	Technické parametry a chemikálie.....	36
5.2	Postupy přípravy	37
5.2.1	1,2,3,4,6-penta- <i>O</i> -acetyl- β - <i>D</i> -glukopyranóza (1)	37
5.2.2	Fenyl 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl-1-thio- β - <i>D</i> -glukopyranóza (2).....	38
5.2.3	Fenyl 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -(<i>p</i> -methoxybenzyl) -1-thio- β - <i>D</i> -glukopyranóza (3)	39
5.2.4	2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -(<i>p</i> -methoxybenzyl) - β - <i>D</i> -glukopyranóza (4).....	41
5.2.5	2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -(<i>p</i> -methoxybenzyl)- β - <i>D</i> -glukopyranosyl <i>N</i> -stearyl- <i>D</i> -fytosfingosin (5)	42
5.2.6	β - <i>D</i> -Glukopyranosyl <i>N</i> -stearyl- <i>D</i> -fytosfingosin (6)	44
5.2.1	1,2,3,4,6-penta- <i>O</i> -trimethylsilyl- α - <i>D</i> -glukopyranóza (7)	45
5.2.2	β - <i>D</i> -Glukosyl <i>N</i> -stearyl- <i>D</i> -fytosfingosin (8)	45
5.2.1	<i>p</i> -Tolyl -1-thio- β - <i>D</i> -glukopyranóza (9).....	46
5.2.1	<i>p</i> -Tolyl 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -(<i>p</i> -methoxybenzyl) -1-thio- β - <i>D</i> -glukopyranóza (10).....	47
6	Závěr	48
7	Seznam literatury:.....	49

1 Úvod a cíl práce

Glukosylceramidy patří do rodiny glykosfingolipidů. Jedná se o ceramidy, které mají glykosidicky vázanou jednu molekulu glukózy a můžeme je nalézt ve všech lidských buňkách, kde plní širokou škálu fyziologických funkcí, z nichž velká část zatím nebyla objasněna. Narozdíl od většiny typů ceramidů, jejichž hlavní role spočívá ve správné funkci kůže, se glykosfingolipidy účastní regulace buněčných dějů, mají roli v imunitní odpovědi organismu a jejich přítomnost je esenciální pro správnou funkci mozku.

Hlavním problémem studia glykosfingolipidů je vysoká komerční cena nebo jejich úplná nedostupnost. Cílem této práce tedy bylo porovnat aktuální metody jejich přípravy a následně zvolit nejvhodnější pro naše podmínky, vybrané postupy se pak pokusit reprodukovat a zároveň optimalizovat. Hlavními kritérii bylo vyvinout syntézu co nejvíce selektivní, avšak univerzální z hlediska typu ceramidu a sacharidu. Důležitým kritériem byla také cenová dostupnost a bezpečnost použitých chemikálií, umožňující budoucí syntézu glykosylceramidů ve větším měřítku pro jejich další studium.

2 Seznam zkratek

B4GalT5	beta-1,4-galaktosyltransferáza 5
CCE	cornified cell envelope, zrohovatělá buněčná obálka
CERT	ceramide transport protein, transportní protein pro ceramidy
CGT	galaktosylceramid syntáza, ceramid galaktosyltransferáza
DCM	dichlormethan
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMC	dimethylkarbonát
DMF	dimethylformamid
ERT	enzyme replacement therapy, enzymová substituční terapie
SRT	substrate reduction therapy, terapie redukcí substrátu
Gal	galaktóza
GalCer	galaktosylceramidy
GalNAc	<i>N</i> -acetylgalaktosamin
GCS	glukosylceramid syntáza, ceramid glukosyltransferáza
GD	Gaucherova choroba
Glc	glukóza
GlcCer	glukosylceramidy
GlcNAc	<i>N</i> -acetylglukosamin
GM4	sialovaný gangliosid
GSL	glykosfingolipidy
LacCer	laktosylceramidy
LDS	lysosomal storage disorder, lysozomální onemocnění

MDR	multi-drug resistance, mnohočetná léková rezistence
MeOH	methanol
MK	mastná kyselina
NBS	<i>N</i> -bromsukcinimid
Neu5Ac	<i>N</i> -acetylneuraminová kyselina
NMR	nukleární magnetická rezonance
PD	Parkinsonova nemoc
PMB	paramethoxybenzyl
PMBCl	paramethoxybenzyl chlorid
PMP	1,2,2,6,6-pentamethylpiperidin
SM4	sulfatid, sulfatovaný galaktocerebrosid
TBAI	tetrabutylamonium jodid
TCP	tetrachlorftalidim
TFA	kyselina trifluoroctová
TfN₃	trifluoromethansulfonylazid, triflyl azide
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TMSCl	trimethylsilylchlorid
TMSI	trimethylsilyl jodid
UDP	uridindifosfát
UGCG	UDP-glukóza ceramid glukosyltransferáza
UGT8	UDP glukosyltransferáza 8

3 Teoretická část

3.1 Kůže

Kůže (lat. cutis, řec. derma) je plošný orgán, který vytváří vnější povrch organismu. Představuje hlavní vrstvu obrany organismu před fyzikálními, chemickými a mikrobiologickými vlivy zevního prostředí. Je hlavním termoregulačním systémem lidského těla a účastní se látkové výměny dýcháním, resorpcí a exkrecí. Receptivní funkce je pak zprostředkována ve vrstvách kůže uloženými sensorickými receptory, které zabezpečují interakci s vnějším prostředím [1, 2].

Kůže dále hraje roli v imunitním systému organismu díky imunokompetentním buňkám. Důležitá je její role ve tvorbě vitamínu D z ergosterolu pomocí slunečního záření, před jehož UV složkou kůže zároveň poskytuje ochranu pomocí pigmentu melaninu, který je produkován buňkami pokožky [3].

V neposlední řadě se kůže podílí na sociálních interakcích jedince, a to například mimikou obličeje nebo pachy produkovány žlázami kůže [1].

3.1.1 Stavba

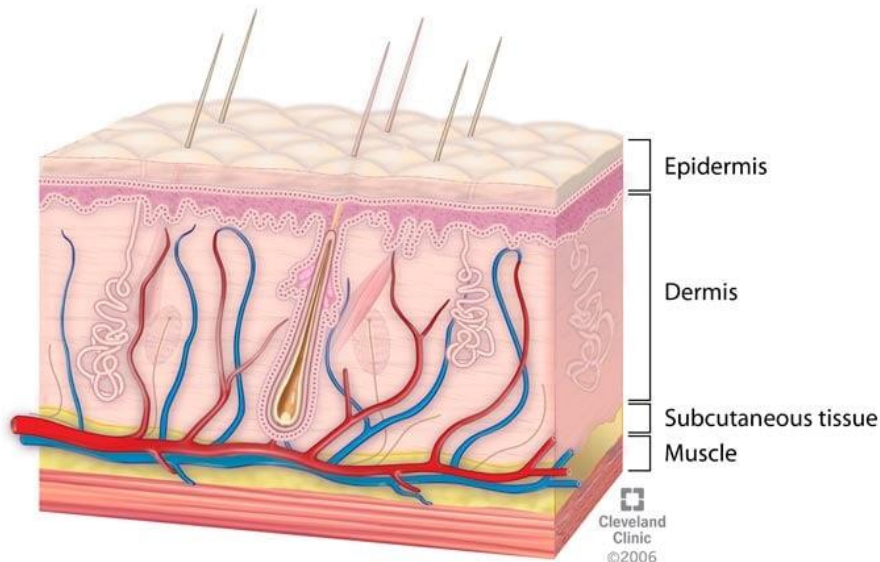
Plocha kůže dospělého člověka dosahuje od 1,2 do 2,3 m², průměrně pak 1,6 - 1,8 m². Tloušťka se liší dle krajiny těla a pohybuje se v rozmezí od 0,5 mm do 4 mm. Nejsilnější kůži najdeme na zádech, kde dosahuje právě zmíněné 4 mm, naopak velmi tenká kůže se nachází na očních víčkách, penisu a skalpu [1, 3].

3.1.2 Vrstvy kůže

Kůže se skládá ze dvou vrstev: z epidermis (pokožky) a dermis (škáry). Epidermis je epitelová vrstva původem z ektodermu, zatímco dermis je vazivová tkáň mezodermového původu. Spojení těchto dvou vrstev je nepravidelné, kdy se výběžky dermis a epidermis alternují. Výběžky dermis se označují jako papily. Výběžky epidermis označujeme pojmem epidermální čepy [3]. Stavbu kůže můžeme vidět na obrázku 1.

Pod dermis se nachází řídká vazivová tkáň – tela subcutanea, hypodermis (podkožní vazivo). Název hypodermis pochází z řeckého hypo, pod + derma,

kůže. Tato tkáň může obsahovat panniculus adiposus, což lze přeložit jako tukový polštář. Anatomicky hypodermis odpovídá povrchové fascii a pomocí ní je kůže volně připojena k okolním tkáním [2].



Obrázek 1 Stavba lidské kůže. Na obrázku můžeme vidět podkožní tuk a na něj navazující dvě hlavní části kůže – dermis a epidermis. Převzato z my.clevelandclinic.org/health/articles/10978-skin.

Přestože v lékařské terminologii jsou kůže a podkoží přísně odděleny, tvoří funkční jednotku. Ke kůži také patří útvary z ní vznikající, jež jsou označovány jako kožní adnexa či deriváty epidermis. Jsou jimi kožní žlázy, nehty a chlupy nebo například mléčná žláza. [1, 2].

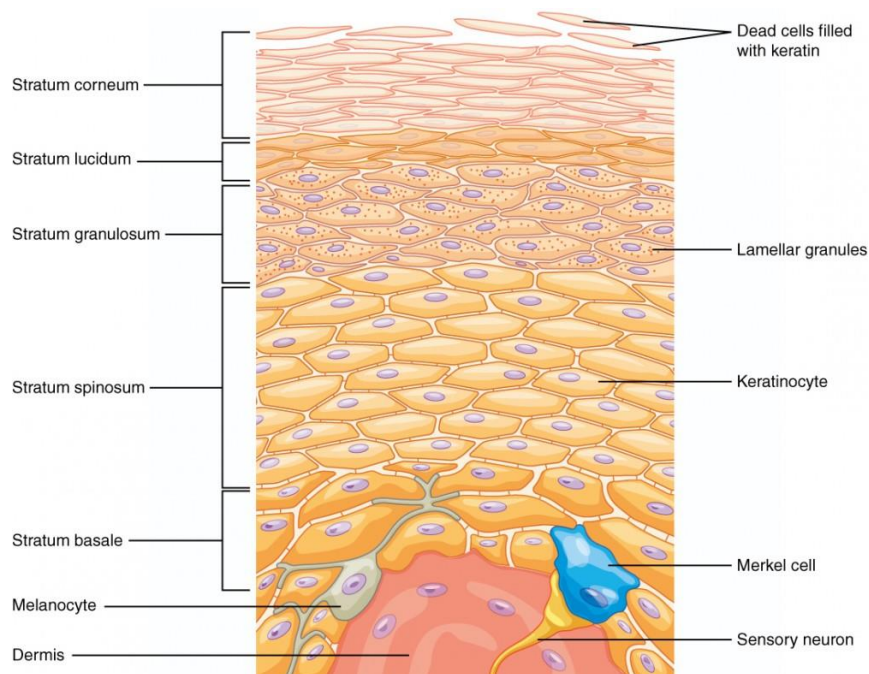
3.1.3 Epidermis

Epidermis (pokožka) je povrchová vrstva kůže tvořená rohovatějícím vrstevnatým dlaždicovým epitelem. Základními buňkami pokožky jsou keratinocyty, které v epidermis najdeme v různém stádiu vývoje. Dále se zde

nachází méně časté tzv. symbiotické buňky, kterými jsou melanocyty, Langerhansovy buňky a Merkelovy buňky [2].

Ve směru od dermis je epidermis tvořena pěti vrstvami keratinocyty (viz. Obrázek 2):

- stratum basale (stratum germinativum)
- stratum spinosum
- stratum granulosum
- stratum lucidum
- stratum corneum



Obrázek 2 Jednotlivé vrstvy epidermis Převzato z courses.lumenlearning.com/suny-ap1/chapter/layers-of-the-skin/

Stratum basale

Stratum basale je tvořeno jednou vrstvou kubických až cylindrických buněk, které leží na bazální lamině, jež odděluje dermis od epidermis. Laterální a horní povrchy buněk jsou propojeny hojným množstvím desmosomů. K bazální lamině jsou buňky vázány pomocí hemidesmosomů [3].

Tato vrstva je charakteristická velkým počtem mitóz, které zajišťují stálou obměnu buněk epidermis. Je tedy místem vzniku nových keratinocytů.

Obsahuje kmenové buňky epidermis a progenitorové buňky schopné dělení. U člověka trvá kompletní obměna epidermis 15 až 30 dní. Rychlost obměny závisí na více faktorech, kterými jsou mimo jiné věk a krajina těla [3].

Stratum spinosum

Stratum spinosum je vrstva tvořená dvěma až pěti řadami polygonálních buněk, u kterých jsou kvůli arteficiálnímu smrštění dobře patrná desmosomová spojení. Díky tomu se označují jako trnové buňky a v literatuře se můžeme se stratum spinosum setkat jako s vrstvou buněk s trnovými výběžky. Výběžky vyplňují svazky filament. Svazky tonofilament, nazývané tonofibrily, mají důležitou funkci v zachování soudržnosti buněk a také v ochraně proti mechanickým činitelům působícím třením a tlakem. Místa s vyšším mechanickým namáháním a vyšším rizikem oděru disponují silnějším stratum spinosum s vyšším počtem tonofibril a desmosomů [3].

Stratum basale a stratum spinosum mohou nést souhrnné označení stratum germinativum Malpighi, což je část kůže, ve které výhradně probíhá mitóza.

Stratum granulosum

Ve stratum granulosum najdeme cca 3 vrstvy oploštělých polygonálních buněk. Cytoplazma těchto buněk je vyplněna bazofilními granuly - tzv. keratohyalinová granula, která se sestávají z filamentů cytokeratinu a proteinů (loricrin, profilagrin), a které hrají roli v procesu rohovatění. Keratohyalin je prekurzorem keratinu. Buňky této vrstvy postupují k povrchu, postupně se diferencují a poté podléhají buněčné smrti. Jakmile buňky ztratí jádro, mění se vrstva ve stratum lucidum [2, 3].

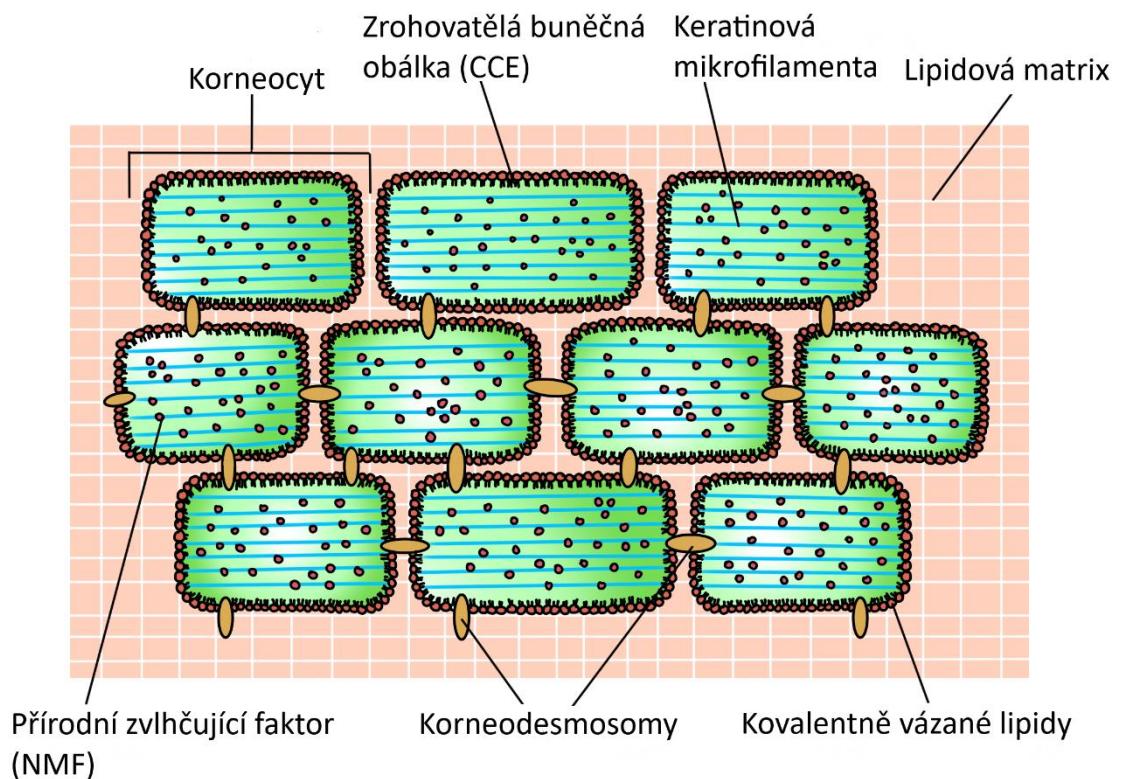
Buňky stratum granulosum obsahují také lamelární granula opatřená membránou. V nich najdeme lamelární disky tvořené zejména sfingolipidy. Tyto lipofilní částice mohou splynout s cytoplazmatickou membránou buňky a předat svůj obsah do mezibuněčného prostoru, kde jejich obsah slouží jako ochrana proti pronikání cizorodých částic.

Stratum lucidum

Stratum lucidum je tenkou vrstvou kůže, která má větší tloušťku v epidermis dlaně či chodidla, tedy v kůži tlustého typu. Jedná se o silně eosinofilní vrstvu, jejíž buňky obsahují látku zvanou eleidin, což je další prekurzor keratinu [2, 3].

3.2 Stratum corneum

Stratum corneum (SC) je od stratum lucidum oddělena v mikroskopu dobře patrnou hranicí. Jedná se o nejsvrchnější vrstvu kůže, která je zodpovědná za její bariérovou funkci. Svou strukturou chrání tělo před vlivy vnějšího prostředí a zároveň zabraňuje ztrátám vody z organismu. Je tvořena plně zrohovatělými bezjadernými keratinocyty, zvanými korneocyty. Jedná se o již odumřelé buňky o průměru cca 30 μm a tloušťce cca 0,5 μm , které jsou uspořádány ve vrstvách, kterých je obvykle 15 až 25, ale například na lidském chodidle těchto vrstev můžeme nalézt až ke 100. Okolí korneocytů je vyplněno lipidovou matrix a společně vytvářejí strukturu, která bývá někdy označována jako „systém cihel a malty“ [1, 2, 4, 5]. Na obrázku 3 můžeme vidět základní schéma této struktury.

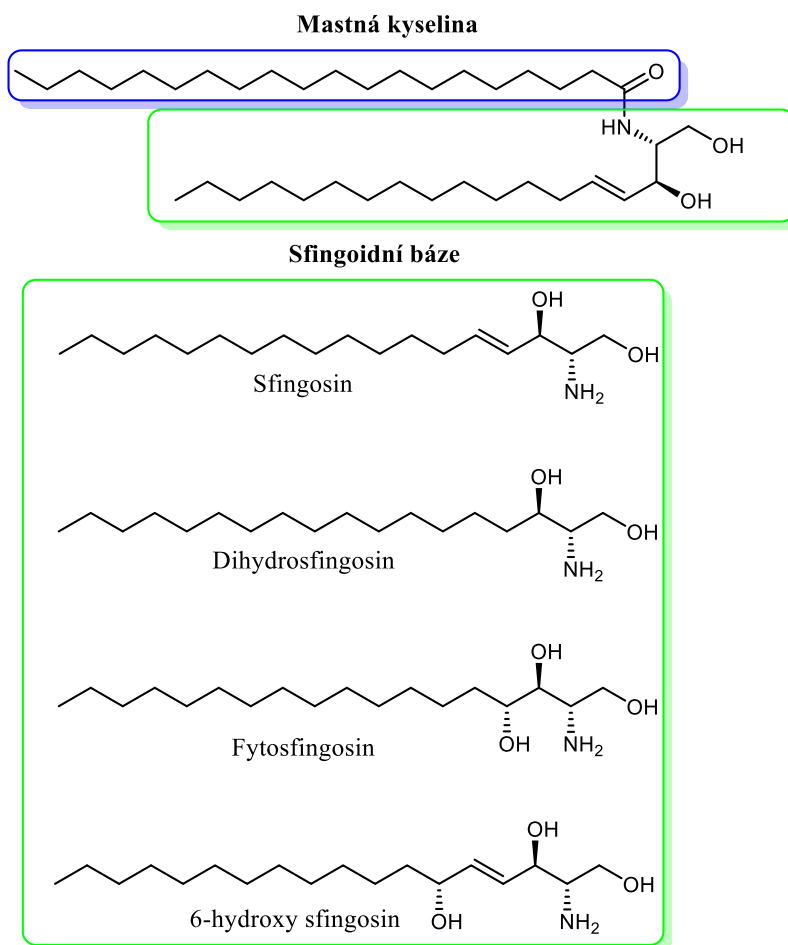


Obrázek 3 Schéma uspořádání korneocytů ve stratum corneum

Lamelární strukturu stratum corneum tvoří korneocyty, korneodesmozomy a lipidy. Korneocyty jsou obaleny zrohovatělou buněčnou obálkou (CCE, *cornified cell envelope*) tvořenou proteiny lorikrinem, involucrinem a dalšími, na které jsou kovalentně navázány molekuly ω -hydroxyceramidů. Uvnitř korneocytů najdeme přírodní zvlhčující faktor (NMF, *natural moisturizing factor*), složku tvořenou hlavně aminokyselinami, které vznikají degradací proteinu filaggrinu. NMF stratum corneum hydratuje a pomáhá udržovat její homeostázu. Korneodesmosomy jsou proteinové struktury držící jednotlivé korneocyty pohromadě a zodpovídající za strukturální integritu SC. Lipidová matrix je tvořená ceramidy (50 %), cholesterolem (25 %) a volnými mastnými kyselinami (10-20 %), zbylou část tvoří minoritní lipidy [6, 7]. Lipidová složka a zejména její ceramidy jsou esenciální pro správnou funkci SC. Pokles jejich koncentrace má za následek ztráty vody z organismu, snížené bariérové vlastnosti, a to včetně snížené ochrany proti patogenům. Dysbalance epidermálních lipidů pak byla nalezena u některých dermatologických onemocnění, například atopické dermatitidy či psoriázy [5, 8].

3.3 Ceramidy

Ceramidy jsou hydrofobní sfingolipidy skládající se ze sfingoidní báze a acylového řetězce tvořeného různými typy mastných kyselin (MK). Základem struktury je tedy bazický aminoalkohol a amidově vázaná mastná kyselina s délkou řetězce mezi 16 až 36 uhlíky. V lidském těle můžeme ceramidy najít v kůži, buď kovalentně vázané na korneocyty, nebo jako součást lamelárních struktur stratum corneum, kde jako součást kožní bariéry chrání tělo před exogenními vlivy a zároveň zabraňují úniku vody z těla, což je funkce nezbytná pro přežití organismu v suchozemském prostředí [5]. Kromě kůže je můžeme nalézt v mozkové tkáni, a v neposlední řadě uvnitř buněk, kde se účastní regulačních a adaptačních procesů [9]. Ceramidy jsou pak výchozími látkami pro biosyntézu celé řady dalších složitějších sfingolipidů [10]. Na obrázku 4 můžeme vidět základní strukturu ceramidu a nejběžnější typy sfingoidních bází.



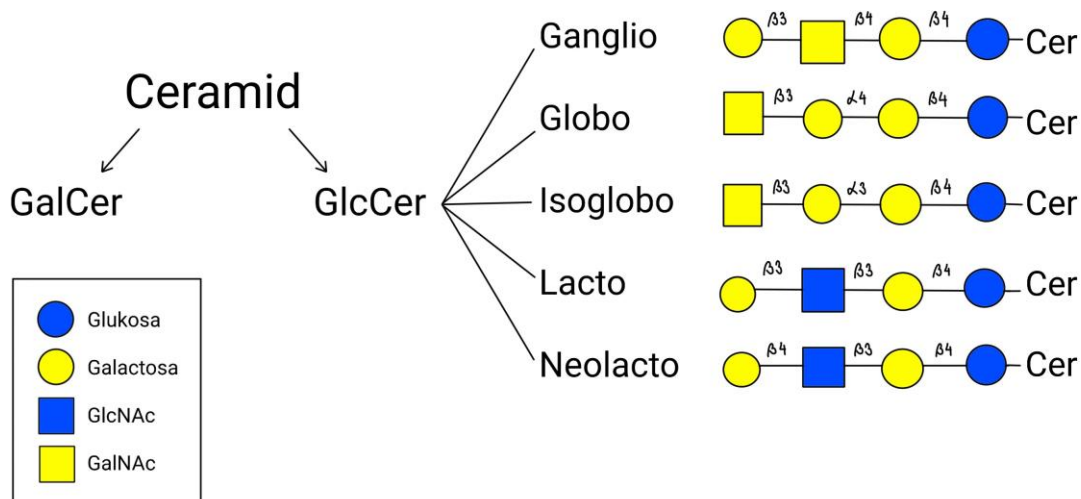
Obrázek 4 Struktura Cer a základní typy sfingoidních bází

3.4 Glykosfingolipidy

Glykosfingolipidy (GSL) jsou heterogenní amfifilní molekuly přítomné na povrchu téměř všech plazmatických membrán savců [11]. Jsou tvořeny ze základní ceramidové kostry kovalentně vázané beta-glykosidickou vazbou k molekule sacharidu (glykanu). Jedná se o velmi různorodou skupinu obsahující tisíce individuálních molekul, ze kterých každá může mít potenciálně jiné biologické účinky [12].

3.4.1 Struktura, dělení

Základní dělení glykosfingolipidů (obrázek 5) závisí na charakteru cukru vázaného beta-glykosidickou vazbou ke kostře ceramidu. Podle toho nejprve dělíme GSL na glukosylceramidy (GlcCer) a galaktosylceramidy (GalCer). Vazbou molekuly galaktózy na GlcCer vznikají laktosylceramidy (LacCer), které do své struktury vlivem enzymů mohou vázat další cukerné jednotky. Podle charakteru třetího a čtvrtého cukru v glykanu LacCer se pak dělí na skupiny (globo-, isoglobo-, lacto-, neolacto-, ganglio-) [13]. GalCer mohou být dále modifikovány zbytkem kyselin na sulfatovaný GalCer (SM4) nebo sialovaný GalCer (GM4) [12].



Obrázek 5 Základní rozdělení glykosfingolipidů

Glykany GSL obsahují ve svých strukturách 1 až 20 monosacharidů a dodnes jich bylo v obratlovcích nalezeno více než 400 [14]. Nejčastějšími cukry zastoupenými v oligosacharidech GSL jsou galaktóza (Gal, 40 %), N-acetylglukosamin (GlcNAc, 20 %), glukóza (Glc, 14 %), fukóza (Fuc, 10 %), N-acetylgalaktosamin (GalNAc, 8 %) a kyselina N-acetylneuraminová (Neu5Ac, 5 %) [12].

3.4.2 Biosyntéza

Syntéza glykosfingolipidů začíná v endoplazmatickém retikulu vznikem ceramidu, který je přepraven do Golgiho aparátu buď pomocí vezikulárního transportu nebo specifického transportního proteinu pro ceramidy (CERT, *ceramide transport protein*). V Golgiho aparátu pak dochází k samotné syntéze GSL. Počátečním krokem je vazba první cukerné jednotky na kostru ceramidu a diferenciaci na GlcCer a GalCer. Glukosylceramidy vznikají přenosem glukosy z UDP-Glc, tato reakce je katalyzována enzymem glukosylceramid syntázou (GCS), který je kódován genem UGCG. Galaktosylceramidy pak vznikají přenosem galaktosy z UDP-Gal zprostředkovaným enzymem galaktosylceramid syntázou (CGT), tento enzym je kódován genem UGT8 [15]. Základní syntetické kroky můžeme vidět na schématu 1.

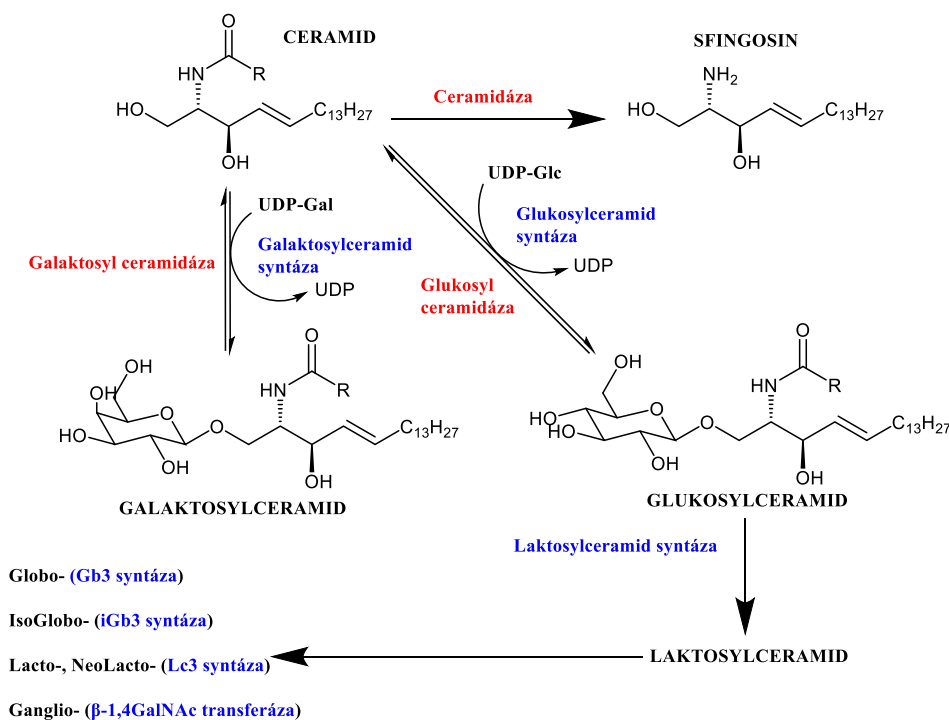


Schéma 1 Biosyntéza základních glykosfingolipidů

3.4.3 Funkce GSL

O existenci GSL a jejich důležitosti pro náš organismus víme už od 80. let minulého století. Množství studií provedených na buněčných a zvířecích modelech nám dává poměrně dobrou představu o fyziologických a patologických procesech, kterých se GSL účastní, jejich konkrétní role v nich však není zcela objasněna, a to i přes obrovské pokroky v možnostech jejich analýzy za poslední desetiletí [16, 17]. GalCer a jejich sulfatované a sialované analogy (SM4, GM4) najdeme především v mozkové tkáni, kde hrají roli v diferenciaci oligodendrocytů, a jsou nezbytné pro správnou tvorbu, udržování struktury a funkce myelinu v CNS. GlcCer jsou nepostradatelné zejména pro správnou funkci pokožky (epidermis), pro kterou jsou zásobním zdrojem ceramidů vznikajících jejich hydrolýzou. Část z nich je v kůži konvertována na acylglukosylceramidy [18, 19].

Glykosfingolipidy se účastní celé řady celulárních funkcí. GalCer, GlcCer a LacCer mají roli v mechanismech buněčné imunitní odpovědi a zánětu. GlcCer vykazují účinky na buněčnou adhezi, růst a diferenciaci a jejich zvýšená syntéza u rezistentních či agresivních nádorů poukazuje na účast v lékové rezistenci nádorových buněk. LacCer pak mají vliv na buněčnou proliferaci a angiogenezi [20].

Esenciální role GSL pro správné fungování organismu vyplývají ze studií prováděných na geneticky modifikovaných myších. Při umělé inhibici UGCG genu kódujícího enzym GCS došlo k úmrtí myších embryí již v jejich rané fázi vývoje [21]. Stejný efekt, tedy smrt všech zárodků kolem desátého dne vývoje, měla inhibice genu B4GalT5 zodpovědného za tvorbu enzymu LacCer syntázy. [22] Tyto výsledky ukazují na nenahraditelnou roli i samotných LacCer a složitějších GSL z nich vycházejících [23]. Zásahy do syntézy různých gangliosidů a jejich deficit neměl za následek úmrtí plodu, ale projevoval se neurodegenerativními změnami v pozdějších fázích vývoje, sníženými sensorickými funkcemi, parkinsonismem, neplodností (související s inhibicí transportu testosteronu) [24], demyelinizací a dalšími neurologickými defekty [25-28]. Problémem pak není pouze defekt v syntéze GSL, ale i jejich nedostatečná degradace, která může mít za následek ukládání molekul GSL

v tělesných orgánech a tkáních. Tento jev je pozorován nejčastěji u různých genetických lysozomálních onemocnění (LSD). Pro správné fungování lidského těla není zásadní pouze dostatek všech typů GSL, ale zejména rovnováha v jejich biosyntéze a degradaci.

3.5 Glukosylceramidy

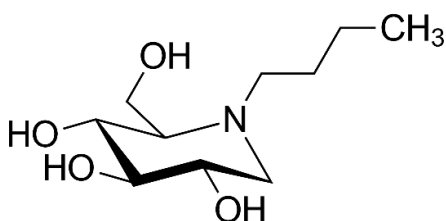
Glukosylceramidy jsou nejjednodušší glykosfingolipidy, obsahující ve své struktuře pouze β -glykosidicky vázanou glukosu. I tento malý rozdíl ve struktuře má za následek velmi rozdílné účinky oproti ceramidům v těle člověka, někdy až přímo antagonistické působení (proliferální úč. GlcCer vs. anti-proliferální Cer, pro-apoptické Cer vs. anti-apoptické GlcCer) [29].

Jedná se o esenciální lipidy, které můžeme najít u všech savců, ale také v buňkách rostlin a hub. Přestože máme určitou představu o jejich vlivu na různé části organismu, tyto informace vyplývají spíše ze studia aktivity enzymů účastnících se jejich metabolismu, samotný mechanismus jejich účinku zůstává z velké části otázkou [19]. Přestože glukosylceramidy tvoří jen malou část epidermálních lipidů (4 %), jsou pro její funkci esenciální. Ceramidy kožní bariéry jsou syntetizovány v endoplazmatickém retikulu a dále jsou v Golgiho aparátu přeměněny na GlcCer, z důvodu omezení jejich intracelulární cytotoxicity a umožnění jejich transportu do lamelárních tělísek stratum granulosum, kde slouží jako zásobní forma ceramidů. Z nich jsou vylévány exocytózou do spodních vrstev stratum corneum, kde jsou hydrolyzovány na finální lipofilní ceramidy tvořící kožní bariéru [30-32]. Glukosylceramidy jsou především prekurzory v biosyntéze dalších, složitějších, GSL nebo naopak zdrojem jednodušších ceramidů, ale mají i vlastní fyziologické účinky. Nejvíce poznatků máme o jejich již zmíněném vlivu na růst, proliferaci a diferenciaci buněk, ať už se jedná o ranou fázi embrya, zdravé buňky v těle nebo rakovinné bujení [18, 29, 33].

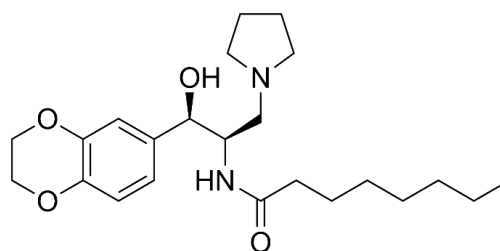
3.6 Vliv glukosylceramidů na lidská onemocnění

3.6.1 Gaucherova choroba

Gaucherova choroba (GD) je první objevené LSD. Zároveň se jedná o nejčastější nemoc tohoto typu s celosvětovou incidencí okolo 1:100 000 [34, 35]. Některé geneticky zatížené komunity, jmenovitě aškenázští Židé, mohou dosahovat prevalence až 1:900 [36]. Jedná se o genetickou mutaci GBA1 genu způsobující deficit enzymu glukosylceramidázy zodpovědného za degradaci GlcCer a dalších glukosylsfiningosinů. Důsledkem narušení tohoto metabolismu pak dochází k hromadění GlcCer a dalších sfingolipidů zejména v makrofázích a jejich následnému hromadění v orgánech, primárně v játrech a slezině, ale také v mozku, plicích, ledvinách a dalších. To má za následek výrazné zvětšení těchto orgánů. Například váha sleziny člověka s GD může dosahovat až dvacetinásobku hmotnosti sleziny zdravého člověka. Nejčastějšími život ovlivňujícími symptomy jsou pak bolesti velkých kloubů (ramenní, kolenní, kyčelní), a zároveň jejich snížená funkčnost z důvodu hromadění sfingolipidů. To vede ke snížení kvality života až invaliditě, současně se snížením průměrného věku dožití. U malé části pacientů (okolo 10 %) se v průběhu života vyvinou neurologické symptomy jako např. poruchy vidění, sluchu nebo epilepsie [37].



Obrázek 7 Miglustat



Obrázek 6 Eliglustat

Farmakoterapie Gaucherovy choroby se dělí na dva typy dle mechanismu účinku. Prvním je enzymová substituční terapie (ERT, *Enzyme replacement therapy*), kdy dochází k externímu doplnění enzymu deficitního v těle nemocného [38]. K léčbě se používají rekombinantní glukocerebrozidázy Taliglucerase alfa a Velaglucerase alfa. Druhým přístupem je redukce substrátu (SRT, *Substrate reduction therapy*). Aktuálně používaná léčiva Miglustat (obrázek 7) a Eliglustat (obrázek 6) jsou substráty glukosylceramid syntázy

(GCS) a působí jako její kompetitivní inhibitory [39]. Všechny tyto látky spadají do kategorie *Orphan drugs* (léčiva na velmi vzácná onemocnění).

3.6.2 Glukosylceramidy a nádorová onemocnění

GSL jsou v poslední době spojovány s řadou onkologických onemocnění. Celulární mechanismy, do kterých GSL zasahují, zejména buněčná proliferace, apoptóza, endocytóza a transport jsou vše procesy úzce související s kancerogenezí. Zvýšená aktivita enzymu GCS a zvýšená kumulace glukosylceramidů byla opakovaně sledována u rezistentních nádorů. Předpokládá se tedy, že GlcCer hrají významnou roli ve vzniku mnohočetné lékové rezistence (MDR). Přirozeně nižší aktivita tohoto enzymu naopak bývá spojována s vyšší senzitivitou k léčbě a lepší prognózou [40], a její umělé snížení koreluje s regresí nádoru [41]. Blokování účinků GCS v nádorové tkáni je tedy potenciální cestou, jak v budoucnu přistupovat ke špatně léčitelným nádorovým onemocněním. Aktivita enzymů spojených se syntézou GSL by pak mohla být jedním z hlavních markerů agresivity nádorů. Zvýšený obsah GlcCer je obecně znakem většiny nádorů, nejen v závislosti na rezistenci. Konkrétně byl pozorován u zhoubného melanomu [42], kolorektálních karcinomů, nádorů prsu a děložního čípku [43]. Poruchy metabolismu GSL pak byly identifikovány jako rizikový faktor pro rozvoj onkologických onemocnění, zejména krevních malignit jako lymfomu nebo myelomu [44].

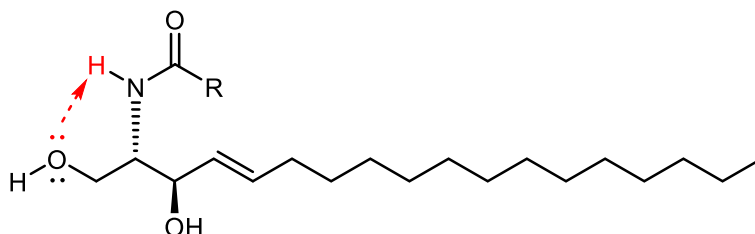
3.6.3 Parkinsonova nemoc (PD)

Screening pacientů s Parkinsonovou nemocí ukazuje, že mutace v GBA genu kódujícího enzym glukosylceramidázu je nejvýznamnějším rizikovým faktorem pro vznik PD ve stáří. Mutace tohoto genu byla zjištěna u více než 7 % pacientů žijících s PD [45, 46].

4 Výsledky a diskuse

4.1 Historické přípravy glykosfingolipidů

Glykosylace ceramidů je složitým chemickým procesem. Hlavním problémem je přítomnost intramolekulární vodíkové vazby mezi amidovým vodíkem a el. párem kyslíku na C₁ sfingosinu, která výrazně snižuje jeho nukleofilitu. Většina postupů tedy zahrnuje nějakou formu narušení této interakce, buď zbavením se amidového vodíku substitucí jinou skupinou nebo dočasnou tvorbou komplexu s OH skupinou. Další komplikací je reaktivní C₃ OH skupina, která může být buď dočasně substituována nebo společně s C₁ hydroxylem zapojena do komplexu. Tato metoda je nejuhodnější, jelikož zároveň řeší problém reaktivity OH skupiny i vznik vodíkové vazby. Další komplikací je samotná reaktivita cukrů. Jejich C₁ uhlík není sám o sobě dostatečně silným elektrofilním centrem a je nutné tyto vlastnosti zesílit různými modifikacemi. Zároveň není žádoucí reaktivita zbylých hydroxylových skupin a je nutné je před konjugací dočasně zablokovat.



Obrázek 8 Intramolekulární vodíková vazba ceramidů

V literatuře bylo popsáno několik způsobů přípravy GSL. Jedním z prvních je postup využívající přípravu azidosfingosinu s aromaticky chráněnou OH skupinou v poloze tři a jeho následnou reakci s chráněným glykosyltrichloracetimidátem, takto připravený glukosylovaný sfingosin je následně acylován za vzniku glukosylceramidu [47]. Tento postup je však poměrně komplikovaný kvůli přípravě azidosfingosinu a následné nutnosti chránění OH skupiny v poloze 3. Zároveň postup vyžaduje i modifikaci cukrů a přípravu chráněných glykosylacetimidátů. Nepříjemností pak může být také práce s některými chemikáliemi využívanými v této syntéze, zejména s vysoce

toxickými a potenciálně výbušnými azidy (TfN_3). Zjednodušený postup můžeme vidět na schématu 2.

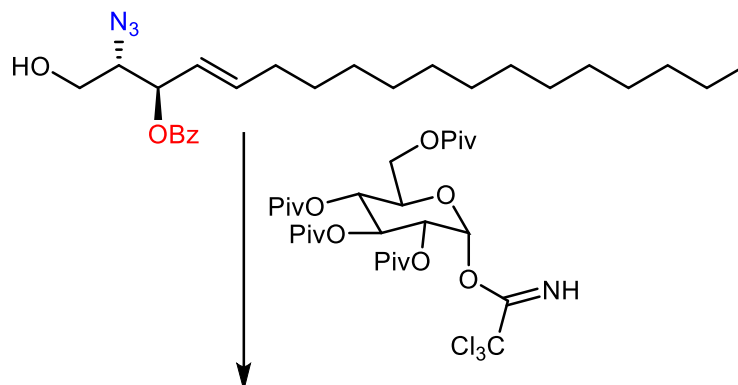
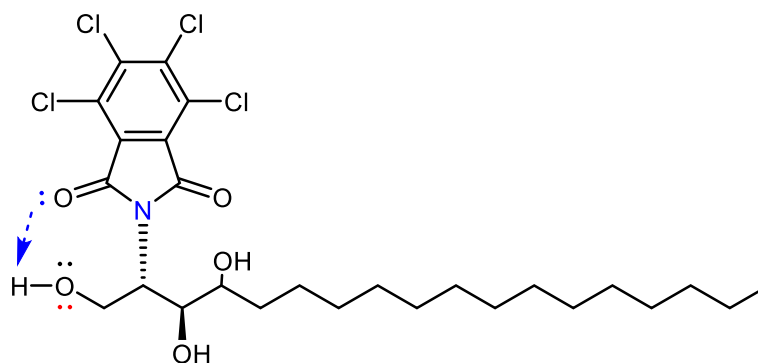


Schéma 2 Příprava glukosylceramidu z azidosfingosinu. Piv (pivaloyl), Bz (benzyl)

Dalším, poměrně novým, postupem je obdobná příprava glukosylceramidu, která ale namísto azidosfingosinu využívá ochranu aminové skupiny pomocí tetrachlorftalidimu (TCP), který nabízí méně nebezpečnou alternativu [48]. Tento postup vychází z výrazně levnějšího fytosfingosinu, jehož OH skupina v poloze 4 je v průběhu syntézy aktivována pomocí PPh_3 a následně substituována jodem. Po eliminaci molekuly jodovodíku pak vzniká sfingosin. Jedná se tedy o ekonomicky výhodný postup, pokud je požadovanou bazí výsledného ceramidu sfingosin. Zároveň není nutná ochrana C_3 OH skupiny, jelikož zvýšená nukleofilita C_1 kyslíku výrazně posouvá reaktivitu jeho směrem. I přes své výhody tento postup vyžaduje jak přípravu chráněného glykosyltrichloracetimidátu, tak přípravu chráněného sfingosinu a následnou konverzi na ceramid a odchránění. Celkově se tedy jedná o poměrně složitý a dlouhý proces, pokud je cílem získat glykosylceramid. Na obrázku 9 můžeme vidět mechanismus, kterým dochází ke zvýšení nukleofility na C_1 kyslíku.



Obrázek 9 TCP substituovaná aminoskupina sfingosinu

Další metodou je reakce organocínitých etherů ceramidů s glykosyljodidy v přítomnosti tetrabutylamoniumjodidu (TBAI). Tento postup nabízí dobrý výtěžek a malý počet reakčních kroků [49]. Hlavním problémem této syntézy je vysoká toxicita organických sloučenin cínu.

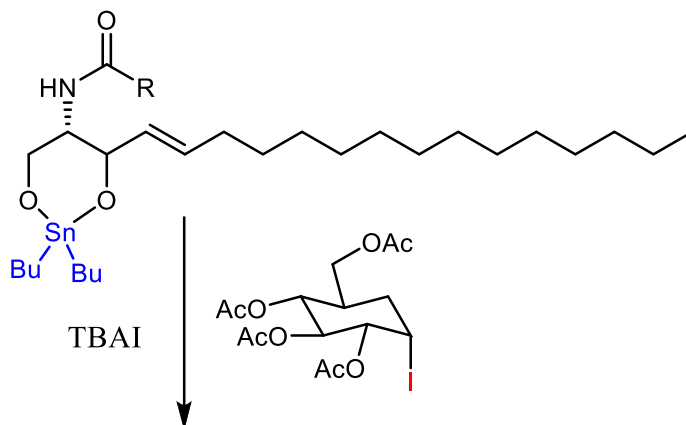


Schéma 3 Úvodní krok přípravy glukosylceramidu pomocí tributylcínoxidu

4.2 Syntézy využité v naší práci

V této práci jsme vyzkoušeli dvě syntézy glukosylceramidů vycházející z literatury, a to konkrétně α -selektivní one-pot syntézu podle Du, Suvarn a Jacquelyn a β -selektivní syntézu dle D'Angela a Taylora.

První zmíněná syntéza jako glykosylový donor využívá silylované glykosyl jodidy. Její hlavní výhodou je, že obsahuje pouze dva kroky, nevyžaduje žádnou předchozí úpravu ceramidu, nabízí vysoký výtěžek a využívá dostupných chemikálií [50, 51]. Druhé syntéze vycházející z práce D'Angela a Taylora [52, 53] byla věnována většina času na experimentální části této práce. Syntéza je β -selektivní a skládá se ze dvou částí. První částí je syntéza chráněného cukru s volnou C₁ OH skupinou. V druhé části následuje navázání glykosylu na ceramid, jehož hlavním mechanismem je vytvoření elektrofilního centra na cukru tvorbou mesylátu a zároveň posílení nukleofilních vlastností C₁ kyslíku ceramidu reakcí s anhydridem kyseliny difenylborité.

4.2.1 Syntéza podle D 'Angela a Taylora

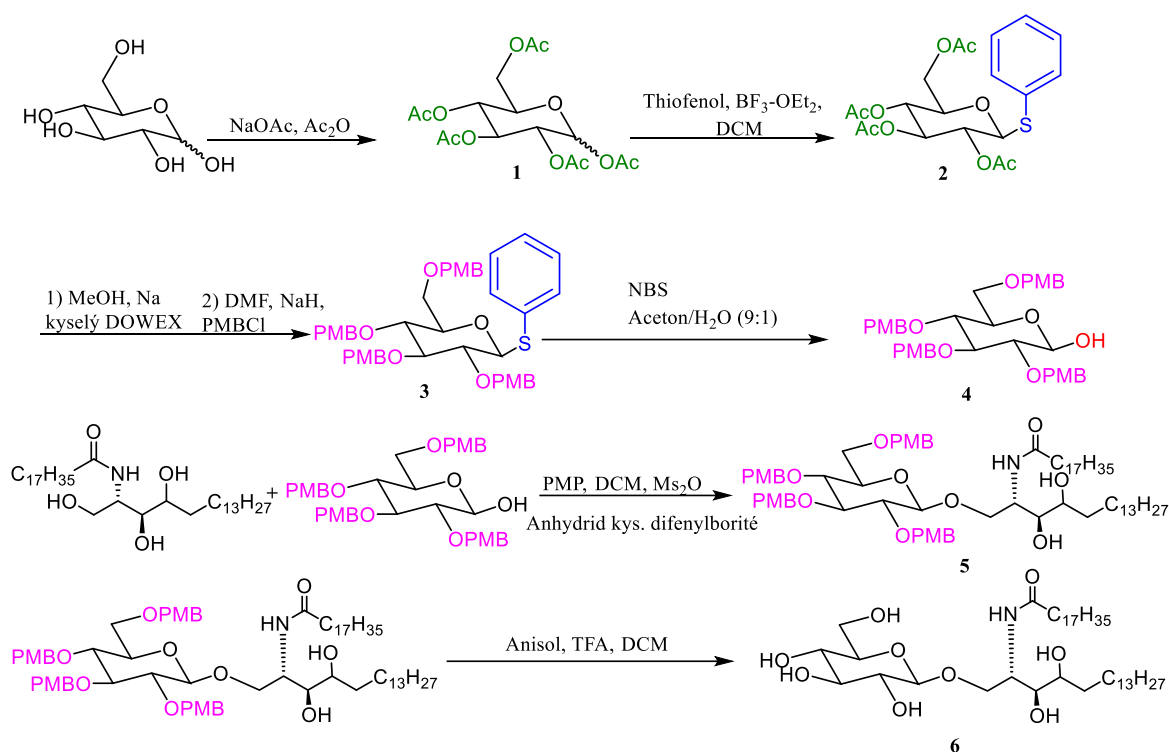


Schéma 4 Syntéza glukosylceramidu pomocí přípravy chráněného cukru a následná reakce s ceramidem v přítomnosti anhydridu kyseliny difenylborité.

DCM (dichlormethan), PMBCl (4-methoxybenzylchlorid), DMF (dimethylformamid), NBS (N-bromsukcinimid), PMP (1,2,2,6,6-pentamethylpiperidin), Ms₂O (anhydrid kyseliny methansulfonové)

4.2.2 Jednotlivé reakce provedené v naší laboratoři

(1) První krok syntézy spočívá v peracetylaci hydroxylových skupin cukru pomocí acethanhydridu v přítomnosti octanu sodného, který slouží jako pufovací činidlo a vychytává protony, které se během reakce odštěpují. Jedná se o jednoduchou reakci, kterou lze provést několika způsoby. Při provedení této reakce byl výtěžek pouze 50 %, a to kvůli vlastní chybě, avšak standardně reakce probíhá kvantitativně a v literatuře se výtěžky pohybují ke 100 %. Pro výpočty výtěžků celé syntézy tak budeme počítat s teoretickým výtěžkem 98 %.

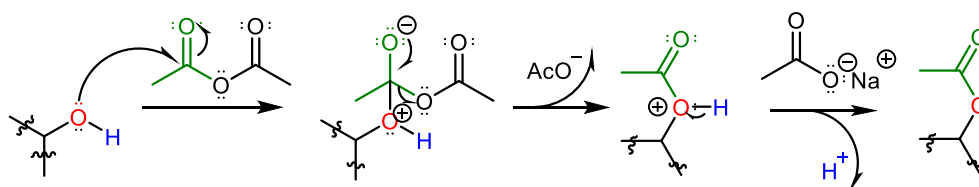


Schéma 5 Acylace OH skupiny monosacharidu

(2) Druhým krokem je navázání aromatického thiolu do polohy 1 cukru. Reakce využívá BF_3 ve formě komplexu s diethyletherem jako Lewisovy kyseliny, který svým působením aktivuje substrát pro nukleofilní atak thiolu. Reakce probíhala selektivně na C_1 uhlíku a nesledovali jsme substituci jiných skupin. Jedinou komplikací reakce je nepříjemná práce s benzenthiolem. Naměřený výtěžek reakce byl 59 %, který je do budoucna ještě možné zlepšit. Alternativně jsme se pokusili o přípravu obdobného sirného derivátu (v experimentální části popsáno jako sloučenina 9), kdy jsme vycházeli přímo z glukózy a tolylthiolu za bazické katalýzy TEA. Tato syntetická cesta nám nicméně neposkytla požadovaný produkt.

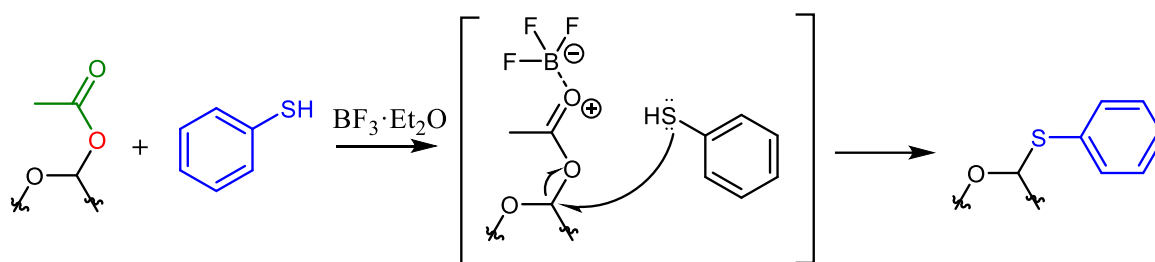


Schéma 6 Nukleofilní atak thiofenolu na chráněnou glukózu

(3) Následuje odchránění hydroxylových skupin a jejich následné opětovné ochránění 4-methoxybenzylóvými (PMB) skupinami. Reakce se skládá ze dvou kroků, kdy prvním z nich je odštěpení acetylových skupin trans esterifikační reakcí působením methanolátu sodného a následné neutralizace směsi pomocí kyselého DOWEXU. Po odstranění DOWEXU filtrací a odpaření rozpouštědla následuje druhá reakce, ve které dochází k ochránění OH skupin pomocí PMBCl v přítomnosti NaH v DMF. Tuto reakci jsme nejprve několikrát zkoušeli přímo z komerční *p*-tolylthioglukózy (experimentální reakce 10) a následně z acetylované fenythioglukózy, ale s nízkými výtěžky, a ne úplně přesnou NMR

charakterizací. Po optimalizaci průběhu vycházející z literatury [54, 55], zejména zkrácením reakčního času a zvýšením teploty ze 40 na 100 °C, se nám povedlo reakci několikrát úspěšně opakovat s výtěžky přesahující původní syntézu (73 % vs 44 %). Výhodná je možnost čištění produktu pouze extrakcí a rekrystalizací při větších objemech.

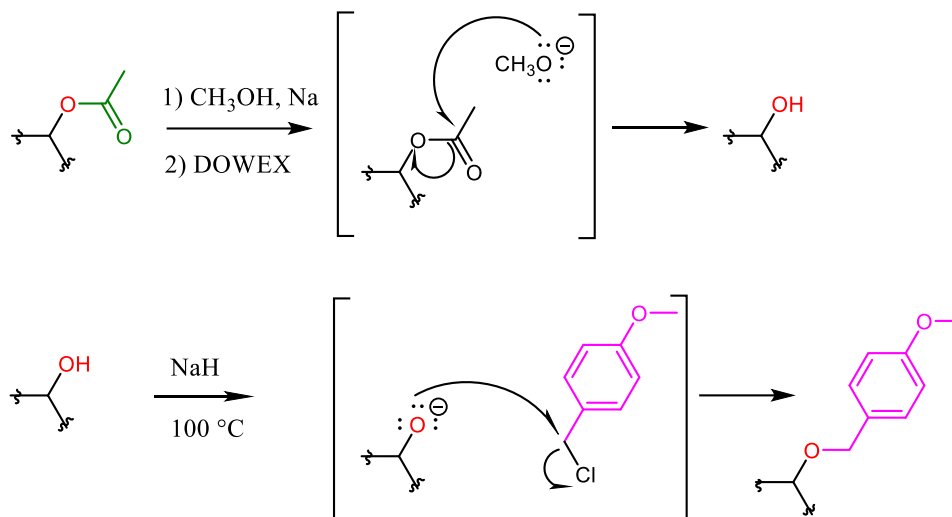


Schéma 7 Odštěpení acetylových skupin a navázání PMB na OH skupiny

(4) Poslední reakcí přípravy glukosylového donoru je odstranění aromatického thiolu pomocí NBS v prostředí acetonu/vody. Mechanismus reakce je naznačený na schématu níže. Tato reakce probíhala bezproblémově s vysokými výtěžky (94 % vs 70 % literatura). Vyšší výtěžky byly spojeny s větším objemem reaktantů 62 % při 120 mg výchozí látky vs. 94 % při použití 2 g. Celkový výtěžek čtyřkrokové přípravy glukosylového donoru byl 40 %.

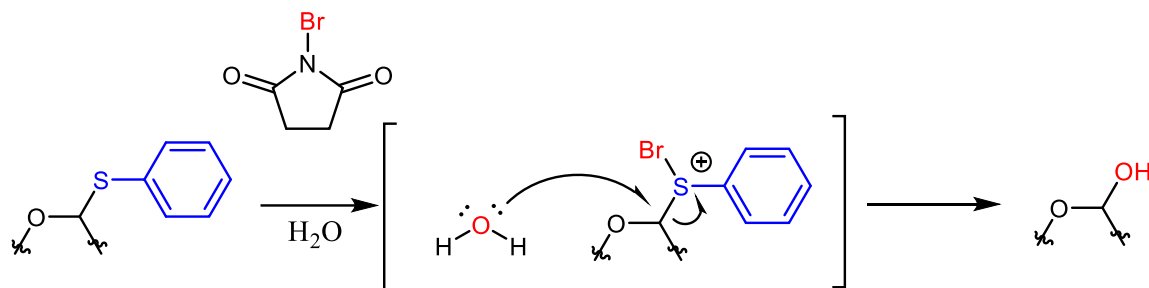


Schéma 8 Odštěpení arylthiolové části molekuly pomocí NBS

(5) Glykosylace ceramidu se skládá z přípravy glykosylmesylátu (methansulfonátu) pomocí Ms_2O a PMP a jeho následné připojení na ceramid v prostředí anhydridu kyseliny difenylborité, který se v průběhu reakce váže na 1,3 OH skupiny ceramidu. Glykosylmesylát je silným elektrofilem, zatímco tvorba komplexu s borem umožňuje beta-selektivitu reakce, ztěžuje vznik intramolekulární vodíkové vazby ceramidu a posiluje nukleofilní vlastnosti volného elektronového páru na kyslíku. Vysoká lipofilita způsobená objemnými PMB skupinami má za následek velmi podobné separační vlastnosti produktu a výchozí látky, jejich izolace byla tedy velmi obtížná. Tento problém bude pravděpodobně ještě umocněn rostoucím počtem chráněných skupin u disacharidů a oligosacharidů. Nejjednodušším řešením, které šetří čas i množství mobilní fáze, je jejich pouze částečná separace a nasazení do následující reakce, po které se výchozí látky a produkt oddělují velmi snadno. Výtěžek této reakce byl 55 %.

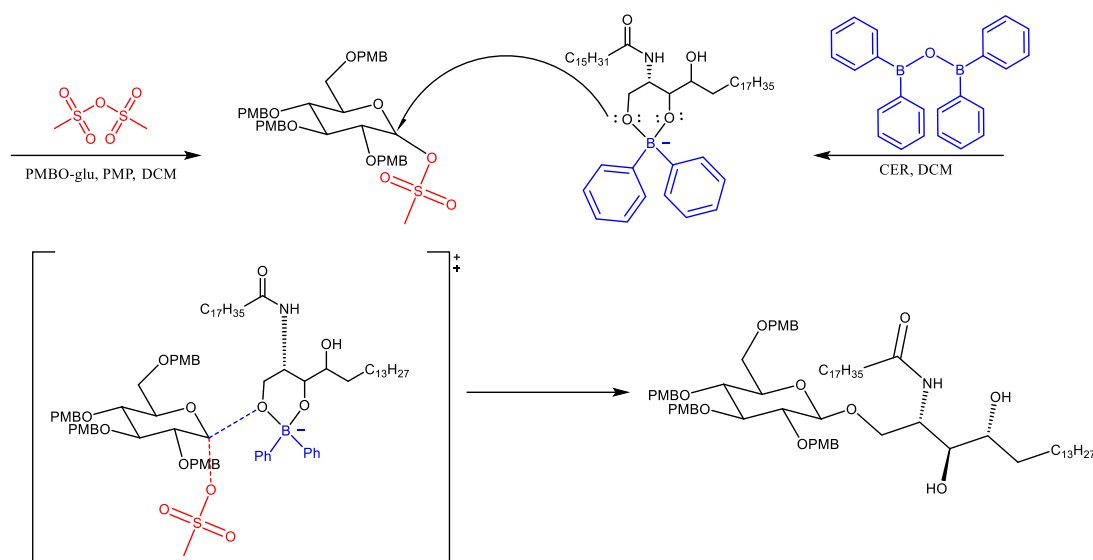


Schéma 9 Mechanismus glykosylace ceramidu v přítomnosti anhydridu kyseliny difenylborité

(6)

Posledním krokem této syntézy bylo odstranění chránících PMB skupin z molekuly cukru pomocí TFA v prostředí anisolu. Výtěžek této reakce byl 30 %, a mohl být ovlivněn chybou při separaci a ztrátou některých frakcí produktu. I přes několik opakování reakcí se nám však nepodařilo získat kumulativní výtěžek kroků 5 a 6 větší než 17% a tyto výtěžky byly konzistentní. Oproti tomu

v literatuře se výtěžek pohyboval mezi 38 % – 55 % v závislosti na použitém cukru. Tyto výtěžky mohla ovlivnit práce s poměrně nízkými objemy a vlastní chyby při separaci. Největším rozdílem pak bylo, že jsme ve všech reakcích používali fytoceramid, na rozdíl od sfingosinového ceramidu použitého ve studii a je známo, že fytoceramidy mají horší akceptorové vlastnosti. Například studie popisující druhý postup použitý v této práci uvádí u fytoceramidu jako akceptoru výtěžky 20 % - 30 %, zatímco u všech ostatních typů ceramidů výtěžky kolem 80 %. Jako důvod uvádí potenciální tvorbu micel díky lineárním řetězcům [50]. Tyto výsledky není možné vztáhnout na náš postup, ale zopakování postupu v budoucnu s jinými akceptory by mohlo poskytnout lepší odpověď. My sami jsme reakce se sfingosinovým ceramidem zkoušeli v rané fázi této práce, kdy se nám ještě nedařilo spolehlivě získat produkt a následně jsme z ekonomických důvodů přešli na výrazně levnější fytoceramid.

Celá syntéza vycházející z *D*-glukózy měla v součtu 6 kroků, celkový výtěžek pak činil 7 %. Hlavní výhodou této syntézy je spolehlivá příprava chráněných cukrů, které lze následně použít pro reakce s různými ceramidy. Takto připravené chráněné cukry mají dobrou stabilitu (po 2 letech nedošlo ke změnám struktury při skladování v mrazničce) a díky ekonomické dostupnosti použitých chemikálií je lze připravit jednorázově ve velkém množství, které pokryje desítky až stovky glykosylací. Hlavní nevýhodou pak je nízký výtěžek posledních dvou kroků, který je ještě nutné optimalizovat a vyzkoušet na jiných ceramidech.

4.2.3 Syntéza podle Du, Suvarn a Jacquelyn

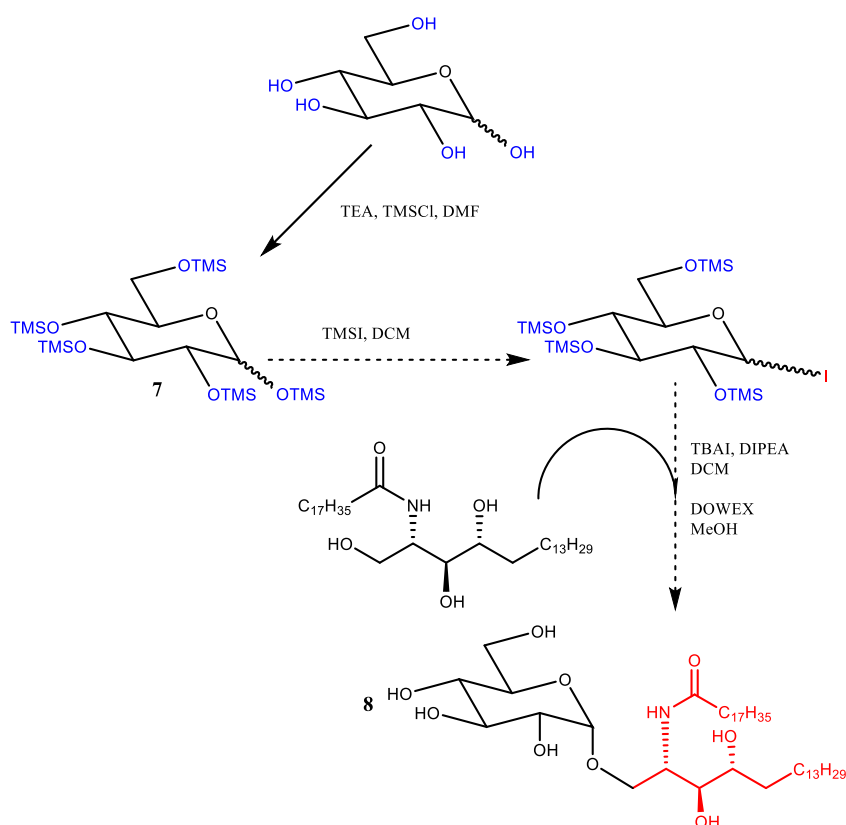


Schéma 10 Syntéza alfa glukosylceramidu reakcí se silylovaným glukosyljodidem. TEA (triethylamin), TMSCl (trimethylsilylchlorid), TBAI (tetrabutylamoniumjodidu), DIPEA (N,N-diizopropylethylamin)

4.2.4 Jednotlivé reakce

(7)

První reakce tohoto postupu spočívá v ochraně všech OH skupin glukózy pomocí TMSCl a vznik per-O-silylovaného glukosylového donoru. Tato reakce fungovala velmi dobře a v téměř kvantitativním výtěžku (97%).

(8)

Druhým a hlavním krokem je pak nahrazení OH skupiny v poloze 1 cukru jódem pomocí TMSI a vznik intermediátu, který stereoselektivně reaguje s ceramidem díky přítomnosti TBAI. Následně dochází k ochráně OH skupin cukru pomocí hydrolyzy v mírně kyselém prostředí DOWEXU. TMSI s TMS-glukózou reaguje kvantitativně, hlavním krokem je tedy reakce glukosyljodidu s ceramidem. Tento

krok standardně běží 48 hodin, v našich podmínkách jsme zkoušeli reakci nechat probíhat bez zásahu 3 až 7 dnů, ale na TLC nebyly sledovány další změny ani nedošlo ke zvýšení výtěžků. Průběh reakce sledován pomocí TLC odpovídal správnému vzniku produktu, zároveň jednotlivé píky NMR odpovídaly požadovaným funkčním skupinám, nepodařilo se nám však izolovat čistý produkt pro jeho přesnou charakterizaci. Tyto reakce jsme zkoušeli v prvních fázích práce a nestihli se k nim vrátit, nicméně se jedná o postup volby, pokud je požadován produkt v alfa konfiguraci. Příprava per-O-silylovaných donorů je spolehlivá, probíhá kvantitativně a nevyžaduje chromatografické čištění. Do budoucna by bylo vhodné postup vyzkoušet na ceramidech obsahujících jinou bázi než fytosfingosin, se kterými by reakce měla mít spolehlivější výsledky. Částečný neúspěch u této syntézy přikládám i tomu, že jsem postup prováděl 4 roky zpátky, kdy jsem ještě neměl moc zkušeností s prací v laboratoři a zejména čištění produktu mohlo být provedeno ne úplně precizně.

V této práci jsme chtěli postupy vyzkoušet ještě na laktóze pro přípravu laktosylceramidů, ale bohužel to z časových důvodů nebylo možné. První postup využívající anhydrid kyseliny difenylborité byl v literatuře na laktóze vyzkoušen a očekáváme že bude fungovat obdobně. Druhý postup využívající TMSI nebyl na disacharidech testován, ale minimálně první krok ochránění pomocí TMSCl by měl být téměř totožný, pouze je potřeba vzít v potaz větší množství hydroxylových skupin a dle toho upravit množství reaktantů.

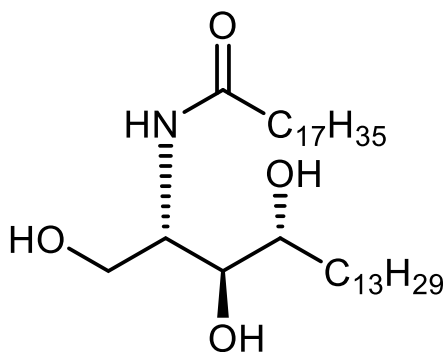
5 Experimentální část

5.1 Technické parametry a chemikálie

Výchozí látky, činidla, rozpouštědla a další komerčně dostupné chemikálie a materiály byly koupeny od tradičních dodavatelů: Merck, VWR a PENTA.

Na sloupcovou chromatografii byl využitý Silikagel 60 (230-400). Na sledování průběhu chemických reakcí, kontrolu čistoty produktů a charakterizaci látek byla využita tenkovrstvá chromatografie na hliníkových TLC deskách Silikagel 60 F254 (Merck). K detekci vyvinutých TLC byla využívána detekční směs $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, $\text{H}_3[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4]$, koncentrovaná kyselina sírová a voda. ^1H a ^{13}C NMR spektra všech látek byly naměřeny pomocí přístrojů VARIAN VNMR S500 a JEOL JNM-ECZ 600Rv (rozpuštědla jsou uvedeny u jednotlivých spekter).

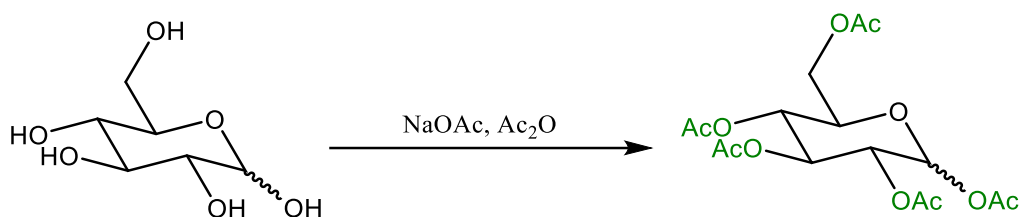
V glukosylacích byl jako akceptor použit kosmetický fytoceramid (CER III, obrázek 10).



Obrázek 10 Kosmetický fytoceramid (*N*-stearyl-*D*-fytosfingosin)

5.2 Postupy přípravy

5.2.1 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetyl- β -*D*-glukopyranóza (1)



Octan sodný (0,5 g, 6,1 mmol, 1,1 ekv.) byl rozpuštěn v acetanhydridu (7 ml, 74 mmol, 13,33 ekv.) a směs byla za stálého míchání po dobu 20 minut zahřívána na 100 °C pod refluxem. Následně byla do reakce za současného zahřívání přidána po částech *D*-glukosa (1 g, 5,55 mmol, 1,0 ekv.) Po dalších 15 minutách byla reakce ukončena a po klesnutí teploty na pokojovou byla reakce ukončena přidáním 25 ml vody. Reakční směs byla 4 hodiny chlazena na 0 °C v ledové lázni a vzniklé krystaly byly zfiltrány a omyty ledovou vodou a studeným etanolem. Krystaly produktu byly vysušeny za sníženého tlaku a výsledný produkt **(1)** byl dočištěn rekrystalizací z etanolu (20 ml).

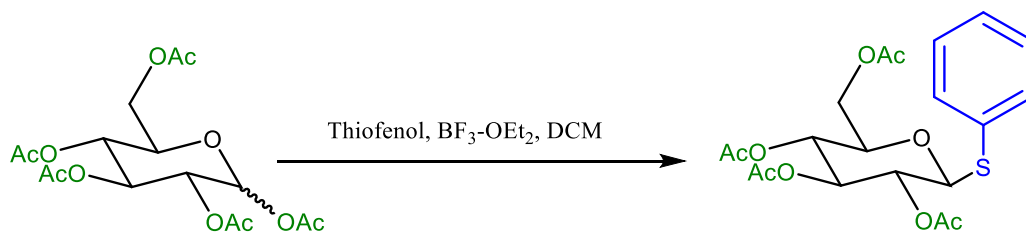
Výtěžek: 1,15 g (2,95 mmol, 53 %), bezbarvá krystalická látka

Charakterizace:

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 5.69 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 5.23 (t, $J = 9.4$ Hz, 1H), 5.16 – 5.02 (m, 2H), 4.26 (dd, $J = 12.5, 4.6$ Hz, 1H), 4.16 – 4.00 (m, 1H), 3.85 – 3.79 (m, 1H), 2.13 – 2.03 (m, 6H), 2.02 – 1.98 (m, 9H).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 170.68, 170.17, 169.46, 169.32, 169.03, 91.78, 72.87, 72.80, 70.31, 67.84, 61.53, 20.87, 20.76, 20.62.

5.2.2 Fenyl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -*D*-glukopyranóza (2)



1,2,3,4,6-penta-*O*-acetyl- β -*D*-glukopyranóza (1) (500 mg, 1,28 mmol, 1,0 ekv.) byla umístěna do ochranné atmosféry pod argon a následně rozpuštěna v DCM (3,3 ml). Směs byla nejprve ochlazená ledovou lázní na 0 °C, následně byl po kapkách přidán thiofenol (0,27 ml, 2,64 mmol, 2,06 ekv.) a BF₃-OEt₂ 46,5 % (1 ml, 3,72 mmol, 2,9 ekv.). Po hodině byla odstraněna ledová lázeň a směs byla míchána za pokojové teploty 24 hodin. Následně byla reakce ukončena 10 ml vodného roztoku NaHCO₃ (5 %). Směs byla extrahována DCM (3x15 ml), organická fáze vysušena Na₂SO₄, přefiltrována a vysušena za sníženého tlaku. Výsledná směs byla rozpuštěna v CHCl₃ a odpařena se silikagelem a dočištěna pomocí sloupcové chromatografie (30 g silikagelu, mobilní fáze Hexan/EtOAc 3:1).

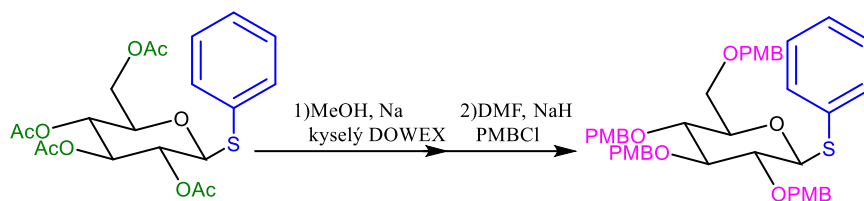
Výtěžek: 320 mg (0,75 mmol, 59%), pevná bílá látka

Charakterizace:

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.50 – 7.45 (m, 2H), 7.34 – 7.26 (m, 3H), 5.24 – 5.17 (m, 1H), 5.05 – 4.99 (m, 1H), 4.98 – 4.92 (m, 1H), 4.69 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H), 4.23 – 4.13 (m, 2H), 3.74 – 3.68 (m, 1H), 2.06 (d, *J* = 4.5 Hz, 6H), 1.98 (d, *J* = 17.2 Hz, 6H).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 170.63, 170.25, 169.47, 169.32, 133.21, 131.73, 129.02, 128.50, 85.81, 75.89, 74.05, 70.04, 68.31, 62.23, 20.81, 20.79, 20.65, 20.64.

5.2.3 Fenyl 2,3,4,6-tetra-*O*-(*p*-methoxybenzyl) -1-thio- β -*D*-glukopyranóza (3)



Fenyl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -*D*-glukopyranóza (2) (4 g, 9 mmol, 1 ekv.) byla rozpuštěna v bezvodém MeOH (200 ml). Po malých kouscích byl opatrně přidáván sodík za indikace pH, dokud nebylo dosaženo stabilního pH 10. Směs byla další 4 hodiny míchána za pokojové teploty a následně byl přidán po částech kyselý DOWEX, dokud pH nedosáhlo neutrální hodnoty. DOWEX byl odfiltrován a směs vysušena za sníženého tlaku.

Meziprodukt byl následně rozpuštěn v bezvodém DMF (75 ml) a ochlazen v ledové lázni na 0 °C. Do směsi byl přidán NaH (1,8 g, 75 mmol, 8,33 ekv.) a kvůli exotermické reakci velmi pomalu po kapkách PMBCl (6,1 ml, 45 mmol, 5 ekv.). Vodní lázeň byla odstraněna a směs míchána 4 hodiny při pokojové teplotě a následně další 2 hodiny zahřívána na 100 °C. Reakce byla ukončena přidáním ledové vody (300 ml), vykrystalizovaný produkt zfiltrován a zbylý filtrát byl 3x extrahován Et₂O, organická fáze byla 5x promyta vodou a vysušena pomocí Na₂SO₄. Organická fáze a krystaly získané filtrací byly vysušeny za sníženého tlaku, znovu rozpuštěny v CHCl₃ a odpařeny se silikagelem. Finální produkt byl získán čistěním pomocí sloupcové chromatografie (80 g silikagelu, gradientová eluce, mobilní fáze Hexan/EtOAc 5:1, 3:1, 1:1).

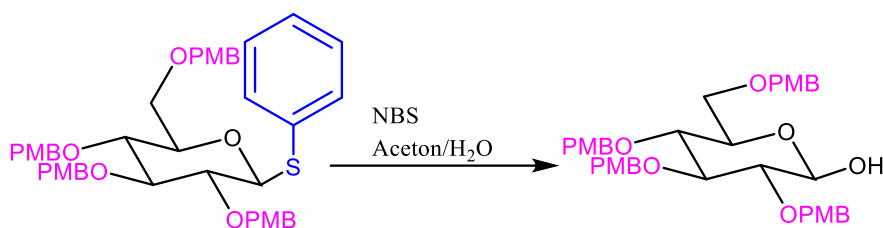
Výtěžek: 5,014 g (6,6 mmol, 73 %), bílá krystalická látka

Charakterizace:

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.60 – 7.54 (m, 2H), 7.35 – 7.18 (m, 9H), 7.12 – 7.06 (m, 2H), 6.92 – 6.78 (m, 8H), 4.85 – 4.75 (m, 3H), 4.72 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H), 4.69 – 4.58 (m, 2H), 4.53 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H), 4.50 – 4.43 (m, 2H), 3.84 – 3.75 (m, 12H), 3.72 (dd, *J* = 10.8, 2.0 Hz, 1H), 3.68 – 3.61 (m, 2H), 3.57 (t, *J* = 9.4 Hz, 1H), 3.50 – 3.41 (m, 2H).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 159.47, 159.40, 159.32, 159.26, 134.10, 131.92, 130.83, 130.50, 130.41, 130.37, 129.96, 129.67, 129.49, 129.45, 128.97, 128.75, 127.43, 114.07, 113.96, 113.94, 113.91, 113.84, 87.60, 86.60, 80.72, 79.23, 77.67, 77.33, 77.12, 76.90, 75.55, 75.13, 74.75, 73.14, 68.76, **65.17**, 55.39, 55.36, 55.33.

5.2.4 2,3,4,6-tetra-*O*-(*p*-methoxybenzyl) - β -*D*-glukopyranóza (4)



Fenyl 2,3,4,6-tetra-*O*-(*p*-methoxybenzyl)-1-thio- β -*D*-glukopyranóza (5) (2,5g, 3,32 mmol, 1,0 ekv.) byla rozpuštěna v srdcové baňce přidáním roztoku acetonu/vody (9:1, 33,3 ml). Po ochlazení v ledové lázni byl přidán NBS (1,2 g, 6,74 mmol, 2,03 ekv.) a bylo okamžitě pozorováno oranžovo-žluté zbarvení, které se postupně vytratilo. Reakce byla míchána za pokojové teploty po dobu 18 h, ukončena přidáním vody (25 ml) a extrahována EtOAc (3x75 ml). Organická fáze byla vysušena síranem sodným a rozpouštědlo odpařeno za sníženého tlaku se silikagelem. Produkt byl vyčištěn sloupcovou chromatografií (50g silikagel, Hexan/EtOAc 2:1 → Hexan/EtOAc 1:1)

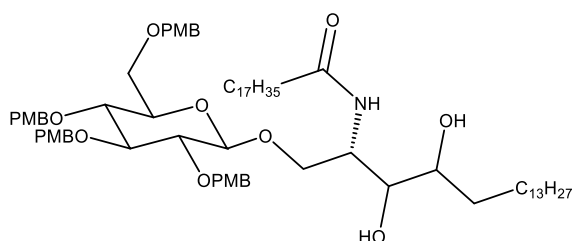
Výtěžek: 2,05g (3,1 mmol, 93 %), bílá voskovitá látka

Charakterizace:

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.60 – 7.54 (m, 2H), 7.35 – 7.18 (m, 9H), 7.12 – 7.06 (m, 2H), 6.92 – 6.78 (m, 8H), 4.85 – 4.75 (m, 3H), 4.72 (d, J = 10.5 Hz, 1H), 4.69 – 4.58 (m, 2H), 4.53 (d, J = 11.7 Hz, 1H), 4.50 – 4.43 (m, 2H), 3.84 – 3.75 (m, 12H), 3.72 (dd, J = 10.8, 2.0 Hz, 1H), 3.68 – 3.61 (m, 2H), 3.57 (t, J = 9.4 Hz, 1H), 3.50 – 3.41 (m, 2H).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 159.47, 159.40, 159.32, 159.26, 134.10, 131.92, 130.83, 130.50, 130.41, 130.37, 129.96, 129.67, 129.49, 129.45, 128.97, 128.75, 127.43, 114.07, 113.96, 113.94, 113.91, 113.84, 87.60, 86.60, 80.72, 79.23, 77.67, 77.33, 77.12, 76.90, 75.55, 75.13, 74.75, 73.14, 68.76, **65.17**, 55.39, 55.36, 55.33.

5.2.5 2,3,4,6-tetra-*O*-(*p*-methoxybenzyl)- β -*D*-glukopyranosyl *N*-stearyl-*D*-fytosfingosin (5)



Ve vysušené srdcové baňce byl chráněný cukr (6) (142 mg, 0,21 mmol, 1,32 ekv.) umístěn pod ochranou atmosféru Ar, rozpuštěn v suchém DCM (2 ml) a následně byl přidán 1,2,2,6,6-pentamethylpiperidin (PMP) (130 μ l, 0,7 mmol, 4,34 ekv.). Do další vysušené baňky byl navážen anhydrid kyseliny methansulfonové (Ms_2O) (92 mg, 0,53 mmol), který byl rozpuštěn v suchém DCM (3,52 ml). Část 0.15 M roztoku Ms_2O (2,2 ml, 0,33 mmol, 1,57 ekv.) byla poté přidána k roztoku chráněného cukru. Směs byla poté míchána alespoň 10 minut nebo do vzniku žlutého zabarvení. Ve třetí baňce byl odvážen ceramid (CER III, kosmetický fytoceramid) (100 mg, 0,171 mmol, 1.0 ekv.) a anhydrid kyseliny difenylborité (12,6 mg, 0,036 mmol, 0,21 ekv.). Obsah baňky byl vysušen a umístěn pod ochrannou atmosféru Ar. Následně byl ke směsi ceramidu a anhydridu přidán celý připravený roztok cukru a Ms_2O . Směs byla míchána přes noc za pokojové teploty alespoň 15 hodin. Produkt byl vyčištěn sloupcovou chromatografií (20 g silikagel, gradient Hexan/EtOAc 5:1, 3:1, 1:1).

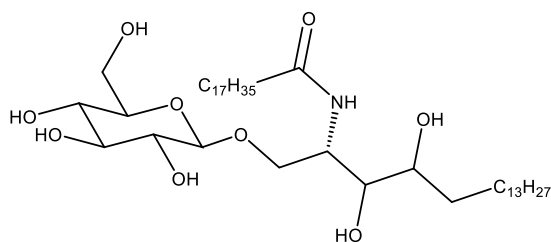
Výtěžek: 115 mg (0,094 mmol, 55 %), bílá krystalická látka

Charakterizace:

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.30 – 7.19 (m, 6H), 7.08 – 6.99 (m, 2H), 6.89 – 6.77 (m, 8H), 6.28 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 4.87 – 4.79 (m, 1H), 4.77 – 4.63 (m, 4H), 4.57 (dd, $J = 37.9, 11.7$ Hz, 1H), 4.49 – 4.33 (m, 4H), 4.23 (dd, $J = 11.1, 3.6$ Hz, 1H), 4.12 (dd, $J = 8.2, 4.2$ Hz, 1H), 4.00 – 3.93 (m, 1H), 3.90 – 3.82 (m, 1H), 3.83 – 3.71 (m, 13H), 3.67 – 3.62 (m, 1H), 3.60 – 3.40 (m, 5H), 3.40 – 3.30 (m, 1H), 2.47 – 1.86 (m, 1H), 1.67 – 1.07 (m, 56H), 0.87 (t, $J = 7.0$ Hz, 6H).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 173.54, 159.57, 159.48, 159.35, 131.11, 130.72, 130.37, 129.94, 129.84, 129.81, 129.76, 129.69, 129.63, 129.57, 129.49, 114.01, 113.95, 113.91, 113.84, 104.63, 97.59, 91.50, 84.47, 81.82, 81.58, 79.80, 77.70, 77.47, 77.32, 77.11, 76.90, 75.44, 74.98, 74.70, 74.49, 73.36, 73.17, 73.10, 73.02, 70.96, 70.45, 69.05, 68.19, 55.36, 55.31, 51.20, 36.74, 32.74, 32.02, 29.81, 29.76, 29.64, 29.52, 29.46, 26.20, 25.85, 22.78, 14.21.

5.2.6 β -D-Glukopyranosyl N-stearyl-D-fytosfingosin (6)



PMBO-glukosylceramid (8) (95 mg, 0,077 mmol, 1,0 ekv.) byl rozpuštěn v suchém DCM (2.5 ml) a následně byl do roztoku přidán anisol (150 μ l, 13,8 mmol, 1,5 ekv.) a trifluoroctová kyselina (300 μ l, 39 mmol, 4,3 ekv.). Roztok byl míchán 1 h za pokojové teploty a poté byl zředěn toluenem a rozpouštědla odpařována za sníženého tlaku a občasného přidání toluenu, dokud nedošlo k odstranění veškerých kapalin. Výsledný produkt byl vyčištěn sloupcovou chromatografií (8g silikagel, CHCl_3 :MeOH: CH_3COOH : H_2O 400:70:18:9).

Výtěžek: 17 mg (0,023 mmol, 30 %), bílá krystalická látka

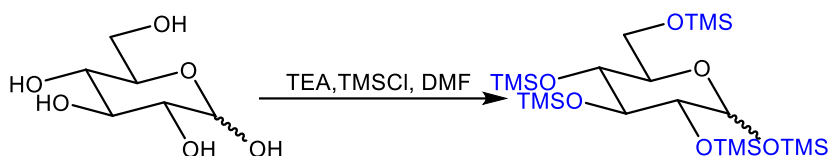
(část produktu byla ztracena při čištění).

Charakterizace:

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.63 – 7.49 (m, 1H), 4.28 – 4.20 (m, 1H), 4.19 – 4.13 (m, 1H), 4.08 (ddd, J = 10.2, 4.9, 1.9 Hz, 1H), 3.87 – 3.78 (m, 1H), 3.77 – 3.70 (m, 1H), 3.68 – 3.60 (m, 2H), 3.59 – 3.44 (m, 1H), 3.41 – 3.33 (m, 1H), 3.32 – 3.23 (m, 5H), 3.19 (ddd, J = 9.3, 7.8, 1.9 Hz, 1H), 2.16 (td, J = 7.6, 2.0 Hz, 2H), 1.93 (s, 1H), 1.66 – 1.42 (m, 4H), 1.40 – 1.04 (m, 54H), 0.84 (td, J = 7.1, 2.2 Hz, 6H).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 174.81, 129.67, 113.79, 103.31, 77.83, 77.62, 77.40, 76.53, 74.24, 73.72, 72.15, 70.28, 69.10, 61.54, 50.52, 48.84, 48.70, 48.56, 48.41, 48.27, 48.13, 47.99, 36.39, 31.96, 31.90, 29.73, 29.68, 29.66, 29.53, 29.43, 29.33, 25.92, 25.86, 22.61, 13.72.

5.2.1 1,2,3,4,6-penta-*O*-trimethylsilyl- α -*D*-glukopyranóza (7)



D-glukóza (300 mg, 1,67 mmol, 1,0 ekv.) byla vysušena, umístěna pod argon a následně rozpuštěna v suchém DMF (15 ml) a TEA (1,27 ml, 9,1 mmol, 5,45 ekv.). Po ochlazení reakční směsi na 0°C v ledové lázni byl po kapkách přidán TMSCl (1,15 ml, 9,06 mmol, 5,42 ekv.) a reakce míchána při pokojové teplotě 4 h. Směs byla extrahována vodou a hexanem, organická fáze vysušena síranem sodným a produkt zakoncentrován sušením za sníženého tlaku.

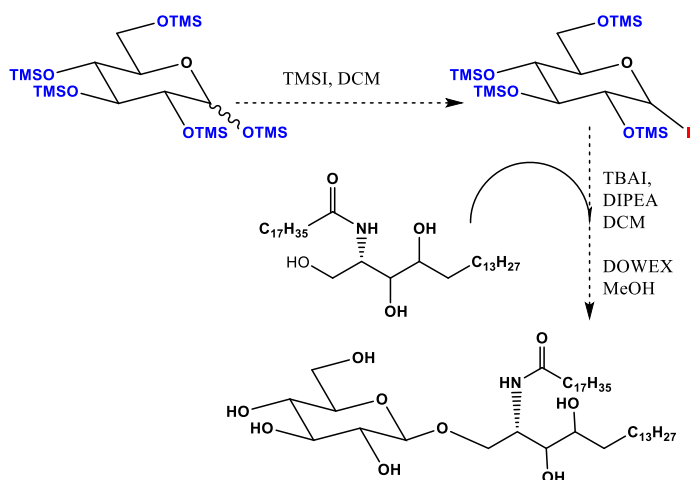
Výtěžek: 875 mg (1,61 mmol, 97 %), bezbarvý olej

Charakterizace:

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 5.01 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H), 3.84 – 3.59 (m, 4H), 3.46 – 3.23 (m, 2H), 0.31 – -0.04 (m, 45H).

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 98.17, 93.89, 78.45, 77.55, 77.25, 77.00, 76.92, 76.74, 74.20, 74.02, 72.48, 72.28, 71.98, 62.32, 1.38, 1.33, 1.27, 0.96, 0.93, 0.46, 0.44, 0.18, -0.24, -0.46.

5.2.2 β -*D*-Glukosyl *N*-stearyl-*D*-fytosfingosin (8)



1,2,3,4,6-penta-*O*-trimethylsilyl- α -*D*-glukopyranosa (7) (216 mg, 0,4 mmol, 3,33 ekv.) byla v baňce vysušena a pod argonem rozpuštěna v DCM (6 ml).

Roztok byl ochlazen v ledové lázni na 0 °C a bylo přidáno TMSI 1M v DCM (0,4 ml, 0,4 mmol, 3,33 ekv.). Reakce byla poté míchána 20 minut při pokojové teplotě a následně ukončena přidáním benzenu (40 ml). Rozpouštědla byla odpařena za sníženého tlaku, dokud v baňce nezůstala nahnědlá olejovitá směs, která byla následně umístěna pod argon a rozpuštěna v DCM (20 ml).

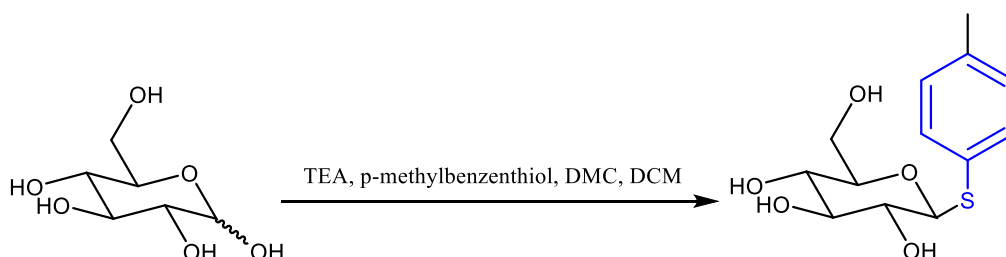
Mezitím jsme v druhé baňce připravili molekulová síta (100 mg) a DCM (3 ml), ke kterým bylo přidáno TBAI (440 mg, 1,2 mmol, 10 ekv.), DIPEA (154 mg, 1,2 mmol, 10 ekv.) a ceramid III (kosmetický fytoceramid) (74,4 mg, 0,127 mmol, 1 ekv.). Po chvilce míchání směsi pod argonem za pokojové teploty byl po kapkách opatrně přidán roztok připraveného glukosyljodidu. Reakce byla míchána 3 dny za pokojové teploty, molekulární síta odstraněna a rozpouštědla odpařena. Finální směs byla rozpuštěna v MeOH (15 ml), přidán kyselý DOWEX a reakce byla míchána alespoň 4 h. Výsledný produkt byl vyčištěn sloupcovou chromatografií (CHCl₃:MeOH 87:13).

Výtěžek: 62 mg (0.083 mmol, 65 %)

Charakterizace: TLC CHCl₃: MeOH 87:13 (R_f = 0,35, odpovídá literatuře)

Finální produkt se bohužel přes 3 pokusy nepodařilo perfektně izolovat. NMR odpovídá vzniku glukosylceramidu, avšak spektra nejsou dostatečně čistá k charakterizaci produktu.

5.2.1 *p*-Tolyl -1-thio- β -D-glukopyranóza (9)

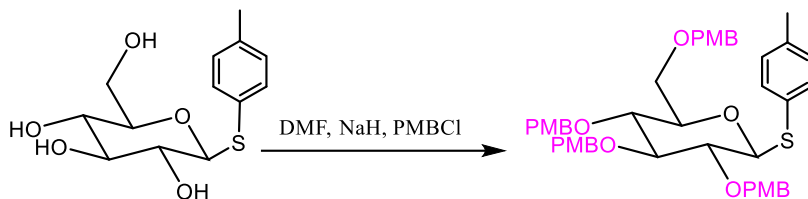


Do 25 ml srdcové baňky bylo odváženo DMC (282 mg, 1,66 mmol, 3,02 ekv.) jako 25 % roztok v DCM. Rozpouštědlo bylo odpařeno za sníženého tlaku a ke krystalickému DMC byla přidána *D*-glukóza (100 mg, 0,55 mmol, 1,0 ekv.). Do reakční směsi byla přidána voda/acetonitril (2,22 ml, 9/1), triethylamin (0,77 ml, 5,52 mmol, 10,03 ekv.) a 4-methylbenzenethiol (345 mg, 2,77 mmol, 5,05 ekv.). Směs byla míchána 2 h za pokojové teploty, rozpouštědla odpařena za

sníženého tlaku v přítomnosti silikagelu a výsledná směs byla čištěna sloupcovou chromatografií (mobilní fáze $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 19:1, po získání první frakce urychleno na $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 5:1).

Nepodařilo se izolovat čistý produkt.

5.2.1 *p*-Tolyl 2,3,4,6-tetra-*O*-(*p*-methoxybenzyl) -1-thio- β -*D*-glukopyranóza (10)



Postup převzat z [52]

p-Tolyl-1-thio- β -*D*-glukopyranóza (100 mg, 0,35 mmol, 1,0 ekv., vzhledem k neúspěchu předchozí reakce zakoupena) byla přidána do 25 ml srdcové baňky, umístěna do inertní atmosféry Ar a rozpuštěna v suchém DMF (2,6 ml). Po ochlazení roztoku v ledové lázni na 0 °C byl přidán NaH (60% v minerálním oleji) (93mg, 2,33 mmol, 6,6 ekv.). Chlazení bylo odstraněno a po 20 minutách, nebo dokud se v reakční směsi nepřestaly tvořit bublinky, byla baňka znovu umístěna do ledové lázně, načež byl do reakce přidán po kapkách PMBCl (0,32ml, 2,36 mmol, 6,7 ekv.). Reakce běžela 16 h za pokojové teploty a pak dalších 8 h při zahřívání na 40 °C ve vodní lázni. DMF bylo odstraněno extrakcí (diethylether/voda), organická fáze promyta roztokem NaCl, vodou a následně vysušena síranem sodným. Po vysušení za sníženého tlaku se silikagelem byl produkt vyčištěn sloupcovou chromatografií (EtOAc/Hexan, 35:65). Nepodařilo se získat čistý produkt.

6 Závěr

Cílem této práce bylo porovnat způsoby syntéz glukosylceramidů a laktosylceramidů v literatuře, vybrat ty nejvhodnější pro naše potřeby a námi zvolené postupy vyzkoušet a optimalizovat. Hlavním cílem bylo připravit a izolovat glukosylceramid. Dílčím cílem pak bylo vyvinout dva způsoby přípravy, jeden alfa-selektivní a druhý beta-selektivní. Hlavní cíl, a to příprava glukosylceramidu a jeho charakterizace, se podařilo splnit. Další cíle se povedlo splnit pouze částečně. Hlavním úspěchem v rámci práce je optimalizovaný čtyřkrokový způsob přípravy chráněných glykosylových donorů, který jsme opakovali ve větších množstvích s vysokým kumulativním výtěžkem (40 %). Postup je výhodný i z důvodu, že využívá běžné a finančně dobře dostupné chemikálie a lze do budoucna využít na širokou škálu mono, di a oligosacharidů. Následně se nám i přes neúspěchy v počátcích práce podařilo chráněnou glukózu použít k přípravě glukosylceramidu za katalýzy anhydridem kyseliny difenylborité. Zde už byl výtěžek nižší, celkový výtěžek této beta-selektivní šestikrokové syntézy pak byl 7 %. Otestování tohoto postupu na laktóze a přípravu laktosylceramidu se nám bohužel z časových důvodů nepodařilo do práce zahrnout, předpokládáme ale, že postup bude fungovat obdobně na všech základních cukrech.

Alfa-selektivní syntézu jsme několikrát opakovali a jsme si jistí, že dochází ke vzniku glukosylceramidu, avšak nemáme čistá NMR data pro 100% potvrzení těchto tvrzení. Tato syntéza však zůstává postupem volby pro přípravu alfa-glykosylceramidů a její opakování s jinými ceramidy by mělo do budoucna přinést dobré výsledky.

Do budoucna by bylo vhodné postupy využít k přípravě širší škály PMBO-chráněných cukrů (galaktóza, laktóza) a finální reakce opakovat se sfingosinovými, dihydrosfingosinovými a 6-hydroxysfingosinovými ceramidy. Tím by se mohl vyřešit problém s nižšími výtěžky sledovanými u fytoceramidů a v případě úspěšné syntézy těchto glykosylceramidů by se do budoucna otevřela cesta k syntéze složitějších GSL.

7 Seznam literatury:

1. ČIHÁK, Radomír. Anatomie 3. Svazek III, Periferní nervový systém, kůže a kožní orgány, smyslové orgány. Třetí, upravené a doplněné vydání. Ilustroval Ivan HELEKAL, ilustroval Jan KACVINSKÝ. Praha: Grada Publishing, 2016. ISBN 978-80-247-5636-3.
2. LÜLLMANN-RAUCH, Renate. *Histologie*. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-3729-4.
3. JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchoa, José CARNEIRO a Robert O. KELLEY. *Základy histologie*. Jinočany: H & H, 1997. ISBN 80-85787-37-7.
4. Menon, G.K., G.W. Cleary, and M.E. Lane, *The structure and function of the stratum corneum*. International Journal of Pharmaceutics, 2012. **435**(1): p. 3-9.
5. Coderch, L., O. López, A. de la Maza, and J.L. Parra, *Ceramides and skin function*. American Journal of Clinical Dermatology, 2003. **4**(2): p. 107-29.
6. Elias, P.M., *Epidermal barrier function: intercellular lamellar lipid structures, origin, composition and metabolism*. Journal of Controlled Release, 1991. **15**: p. 199-208.
7. Rawlings, A.V., *Molecular basis for stratum corneum maturation and moisturization*. British Journal of Dermatology, 2014. **171 Suppl 3**: p. 19-28.
8. Holleran, W.M., Y. Takagi, and Y. Uchida, *Epidermal sphingolipids: metabolism, function, and roles in skin disorders*. FEBS Letters, 2006. **580**(23): p. 5456-66.
9. Hannun, Y.A., *Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress*. Science, 1996. **274**(5294): p. 1855-9.
10. Olsen, A.S.B. and N.J. Færgeman, *Sphingolipids: membrane microdomains in brain development, function and neurological diseases*. Open Biology, 2017. **7**(5).

11. Kolter, T. and K. Sandhoff, *Recent advances in the biochemistry of sphingolipidoses*. Brain Pathology, 1998. **8**(1): p. 79-100.
12. D'Angelo, G., S. Capasso, L. Sticco, and D. Russo, *Glycosphingolipids: synthesis and functions*. Febs Journal, 2013. **280**(24): p. 6338-6353.
13. Merrill, A.H., *Sphingolipid and Glycosphingolipid Metabolic Pathways in the Era of Sphingolipidomics*. Chemical Reviews, 2011. **111**(10): p. 6387-6422.
14. Sud, M., E. Fahy, D. Cotter, A. Brown, E.A. Dennis, C.K. Glass, A.H. Merrill, Jr., R.C. Murphy, C.R. Raetz, D.W. Russell, and S. Subramaniam, *LMSD: LIPID MAPS structure database*. Nucleic Acids Research, 2007. **35**(Database issue): p. D527-32.
15. Kapitonov, D. and R.K. Yu, *Cloning, characterization, and expression of human ceramide galactosyltransferase cDNA*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1997. **232**(2): p. 449-53.
16. Furukawa, K., Y. Ohmi, Y. Ohkawa, R.H. Bhuiyan, P. Zhang, O. Tajima, N. Hashimoto, K. Hamamura, and K. Furukawa, *New era of research on cancer-associated glycosphingolipids*. Cancer Science, 2019. **110**(5): p. 1544-1551.
17. Du, H.Q., H.J. Yu, L.Y. Jia, and Z. Li, *Advances in Analysis of Glycosphingolipids and Related Diseases*. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2016. **43**(1): p. 14-27.
18. Reza, S., M. Ugorski, and J. Suchanski, *Glucosylceramide and galactosylceramide, small glycosphingolipids with significant impact on health and disease*. Glycobiology, 2021. **31**(11): p. 1416-1434.
19. Holleran, W.M., Y. Takagi, G.K. Menon, G. Legler, K.R. Feingold, and P.M. Elias, *Processing of epidermal glucosylceramides is required for optimal mammalian cutaneous permeability barrier function*. The Journal of Clinical Investigation, 1993. **91**(4): p. 1656-1664.
20. Hannun, Y.A. and L.M. Obeid, *Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2018. **19**(3): p. 175-191.

21. Yamashita, T., R. Wada, T. Sasaki, C. Deng, U. Bierfreund, K. Sandhoff, and R.L. Proia, *A vital role for glycosphingolipid synthesis during development and differentiation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(16): p. 9142-7.
22. Asano, M., K. Furukawa, M. Kido, S. Matsumoto, Y. Umesaki, N. Kochibe, and Y. Iwakura, *Growth retardation and early death of beta-1,4-galactosyltransferase knockout mice with augmented proliferation and abnormal differentiation of epithelial cells*. The EMBO Journal, 1997. **16**(8): p. 1850-7.
23. Kumagai, T., T. Sato, S. Natsuka, Y. Kobayashi, D. Zhou, T. Shinkai, S. Hayakawa, and K. Furukawa, *Involvement of murine β -1,4-galactosyltransferase V in lactosylceramide biosynthesis*. Glycoconjugate Journal, 2010. **27**(7-9): p. 685-95.
24. Takamiya, K., A. Yamamoto, K. Furukawa, J. Zhao, S. Fukumoto, S. Yamashiro, M. Okada, M. Haraguchi, M. Shin, M. Kishikawa, H. Shiku, S. Aizawa, and K. Furukawa, *Complex gangliosides are essential in spermatogenesis of mice: possible roles in the transport of testosterone*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998. **95**(21): p. 12147-52.
25. Yoshikawa, M., S. Go, K. Takasaki, Y. Kakazu, M. Ohashi, M. Nagafuku, K. Kabayama, J. Sekimoto, S. Suzuki, K. Takaiwa, T. Kimitsuki, N. Matsumoto, S. Komune, D. Kamei, M. Saito, M. Fujiwara, K. Iwasaki, and J. Inokuchi, *Mice lacking ganglioside GM3 synthase exhibit complete hearing loss due to selective degeneration of the organ of Corti*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009. **106**(23): p. 9483-8.
26. Wu, G., Z.H. Lu, N. Kulkarni, R. Amin, and R.W. Ledeen, *Mice lacking major brain gangliosides develop parkinsonism*. NEUROCHEMICAL RESEARCH, 2011. **36**(9): p. 1706-14.
27. Chiavegatto, S., J. Sun, R.J. Nelson, and R.L. Schnaar, *A functional role for complex gangliosides: motor deficits in GM2/GD2 synthase knockout mice*. Experimental Neurology, 2000. **166**(2): p. 227-34.

28. Sheikh, K.A., J. Sun, Y. Liu, H. Kawai, T.O. Crawford, R.L. Proia, J.W. Griffin, and R.L. Schnaar, *Mice lacking complex gangliosides develop Wallerian degeneration and myelination defects*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(13): p. 7532-7.
29. Ishibashi, Y., A. Kohyama-Koganeya, and Y. Hirabayashi, *New insights on glucosylated lipids: metabolism and functions*. Biochimica et Biophysica Acta, 2013. **1831**(9): p. 1475-85.
30. Hamanaka, S., S. Nakazawa, M. Yamanaka, Y. Uchida, and F. Otsuka, *Glucosylceramide accumulates preferentially in lamellar bodies in differentiated keratinocytes*. British Journal of Dermatology, 2005. **152**(3): p. 426-34.
31. Rabionet, M., K. Gorgas, and R. Sandhoff, *Ceramide synthesis in the epidermis*. Biochimica et Biophysica Acta, 2014. **1841**(3): p. 422-34.
32. Jennemann, R., R. Sandhoff, L. Langbein, S. Kaden, U. Rothermel, H. Gallala, K. Sandhoff, H. Wiegandt, and H.-J. Gröne, *Integrity and Barrier Function of the Epidermis Critically Depend on Glucosylceramide Synthesis**. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(5): p. 3083-3094.
33. Dubot, P., L. Astudillo, N. Therville, L. Carrié, M. Pettazoni, D. Cheillan, J. Stirnemann, T. Levade, N. Andrieu-Abadie, and F. Sabourdy, *Potential Role of Sphingolipidoses-Associated Lysosphingolipids in Cancer*. Cancers (Basel), 2022. **14**(19).
34. Meikle, P.J., J.J. Hopwood, A.E. Clague, and W.F. Carey, *Prevalence of lysosomal storage disorders*. Jama, 1999. **281**(3): p. 249-54.
35. Wang, M., F. Li, J. Zhang, C. Lu, and W. Kong, *Global Epidemiology of Gaucher Disease: an Updated Systematic Review and Meta-analysis*. JOURNAL OF PEDIATRIC HEMATOLOGY ONCOLOGY, 2023. **45**(4): p. 181-188.
36. Burrow, T.A., S. Barnes, and G.A. Grabowski, *Prevalence and management of Gaucher disease*. Pediatric Health, Medicine and Therapeutics, 2011. **2**: p. 59-73.

37. Cox, T.M., *Gaucher disease: clinical profile and therapeutic developments*. *Biologics-Targets & Therapy*, 2010. **4**: p. 299-313.
38. Shemesh, E., L. Deroma, B. Bembi, P. Deegan, C. Hollak, N.J. Weinreb, and T.M. Cox, *Enzyme replacement and substrate reduction therapy for Gaucher disease*. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2015. **2015**(3): p. Cd010324.
39. McCormack, P.L. and K.L. Goa, *Miglustat*. *Drugs*, 2003. **63**(22): p. 2427-2434.
40. Song, M., W. Zang, B. Zhang, J. Cao, and G. Yang, *GCS overexpression is associated with multidrug resistance of human HCT-8 colon cancer cells*. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2012. **31**(1): p. 23.
41. Ghosh, S., S.K. Juin, and S. Majumdar, *Cancer stem cells and ceramide signaling: the cutting edges of immunotherapy*. *Molecular Biology Reports*, 2020. **47**(10): p. 8101-8111.
42. Ghosh, S., S.K. Juin, S.B. Majumdar, and S. Majumdar, *Crucial role of glucosylceramide synthase in the regulation of stem cell-like cancer cells in B16F10 murine melanoma*. *Molecular Carcinogenesis*, 2021. **60**(12): p. 840-858.
43. Liu, Y.Y., G.A. Patwardhan, P. Xie, X. Gu, A.E. Giuliano, and M.C. Cabot, *Glucosylceramide synthase, a factor in modulating drug resistance, is overexpressed in metastatic breast carcinoma*. *International Journal of Oncology*, 2011. **39**(2): p. 425-31.
44. Linari, S. and G. Castaman, *Hematological manifestations and complications of Gaucher disease*. *Expert Review of Hematology*, 2016. **9**(1): p. 51-58.
45. Sidransky, E., M.A. Nalls, J.O. Aasly, J. Aharon-Peretz, G. Annesi, E.R. Barbosa, A. Bar-Shira, D. Berg, J. Bras, A. Brice, C.M. Chen, L.N. Clark, C. Condroyer, E.V. De Marco, A. Dürr, M.J. Eblan, S. Fahn, M.J. Farrer, H.C. Fung, Z. Gan-Or, T. Gasser, R. Gershoni-Baruch, N. Giladi, A. Griffith, T. Gurevich, C. Januario, P. Kropp, A.E. Lang, G.J. Lee-Chen, S. Lesage, K.

Marder, I.F. Mata, A. Mirelman, J. Mitsui, I. Mizuta, G. Nicoletti, C. Oliveira, R. Ottman, A. Orr-Urtreger, L.V. Pereira, A. Quattrone, E. Rogaeva, A. Rolfs, H. Rosenbaum, R. Rozenberg, A. Samii, T. Samaddar, C. Schulte, M. Sharma, A. Singleton, M. Spitz, E.K. Tan, N. Tayebi, T. Toda, A.R. Troiano, S. Tsuji, M. Wittstock, T.G. Wolfsberg, Y.R. Wu, C.P. Zabetian, Y. Zhao, and S.G. Ziegler, *Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease*. The New England Journal of Medicine, 2009. **361**(17): p. 1651-61.

46. Winder-Rhodes, S.E., J.R. Evans, M. Ban, S.L. Mason, C.H. Williams-Gray, T. Foltynie, R. Duran, N.E. Mencacci, S.J. Sawcer, and R.A. Barker, *Glucocerebrosidase mutations influence the natural history of Parkinson's disease in a community-based incident cohort*. Brain, 2013. **136**(Pt 2): p. 392-9.

47. Schmidt, R.R. and P. Zimmermann, *Synthesis of Glycosphingolipids and Psychosines*. Angewandte Chemie International Edition in English, 1986. **25**(8): p. 725-726.

48. Di Benedetto, R., L. Zanetti, M. Varese, M. Rajabi, R. Di Brisco, and L. Panza, *Protected sphingosine from phytosphingosine as an efficient acceptor in glycosylation reaction*. Organic Letters, 2014. **16**(3): p. 952-5.

49. Morales-Serna, J.A., Y. Díaz, M.I. Matheu, and S. Castellón, *Efficient Synthesis of β -Glycosphingolipids by Reaction of Stannylceramides with Glycosyl Iodides Promoted by TBAI/AW 300 Molecular Sieves*. European Journal of Organic Chemistry, 2009. **2009**(23): p. 3849-3852.

50. Du, W., S.S. Kulkarni, and J. Gervay-Hague, *Efficient, one-pot syntheses of biologically active α -linked glycolipids*. Chemical Communications, 2007(23): p. 2336-2338.

51. Schombs, M., F.E. Park, W. Du, S.S. Kulkarni, and J. Gervay-Hague, *One-Pot Syntheses of Immunostimulatory Glycolipids*. The Journal of Organic Chemistry, 2010. **75**(15): p. 4891-4898.

52. D'Angelo, K.A. and M.S. Taylor, *Borinic acid-catalyzed stereo- and site-selective synthesis of β -glycosylceramides*. Chemical Communications, 2017. **53**(44): p. 5978-5980.

53. D'Angelo, K.A. and M.S. Taylor, *Borinic Acid Catalyzed Stereo- and Regioselective Couplings of Glycosyl Methanesulfonates*. Journal of the American Chemical Society, 2016. **138**(34): p. 11058-11066.
54. Heuckendorff, M., L.T. Poulsen, and H.H. Jensen, *Remote Electronic Effects by Ether Protecting Groups Fine-Tune Glycosyl Donor Reactivity*. The Journal of Organic Chemistry, 2016. **81**(12): p. 4988-5006.
55. Kim, S. and P. Nagorny, *Electrochemical Synthesis of Glycosyl Fluorides Using Sulfur(VI) Hexafluoride as the Fluorinating Agent*. Organic Letters, 2022. **24**(12): p. 2294-2298.