

Elektronenspinresonanzspektroskopie an multivalenten Systemen

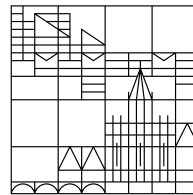
Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Braun, Patrick

an der

Universität
Konstanz



Mathematisch-Naturwissenschaftliche Sektion
Fachbereich Chemie

Tag der mündlichen Prüfung: 20. September 2013

1. Referent: Dr. Malte Drescher
2. Referent: Prof. Dr. Helmut Cölfen

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
2	Multivalente Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen	7
2.1	Biologische Funktion und medizinische Anwendung von Lektinen	7
2.2	Das Weizenkeimagglutinin	10
2.3	Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen	12
2.4	Methoden zur Untersuchung von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen	14
2.5	Multivalenz	16
2.6	Allosterische- und Chelat-Kooperativität	19
3	ESR-Spektroskopie	26
3.1	Cw-ESR-Spektroskopie	26
3.2	Puls-ESR-Spektroskopie	34
4	Experimentelle Details	41
4.1	Synthese nitroxidmarkierter GlcNAc-Derivate	41
4.2	EPR Messungen	45
5	Mechanistische Untersuchung multivalenter Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen	50
5.1	Aufgabenstellung	50
5.2	ESR-Experimente	52
6	Bifrequenz-cw-ESR an WGA-Liganden	71
6.1	Aufgabenstellung	71
6.2	WGA-Ligand 1 ₁	74
6.3	WGA-Ligand 2 ₁	90
7	Zusammenfassung	106
8	Anhang zu Kapitel 5	109
9	Anhang zu Kapitel 6	117
10	Literaturverzeichnis	122
11	Danksagung	136

1 Einleitung

Die Wechselwirkungen zwischen Kohlenhydratstrukturen und Kohlenhydrat bindenden Proteinen (Lektine) sind die Grundlage zahlreicher biologischer Prozesse. Alle Lektine verbindet die Eigenschaft, zwischen chemisch eng verwandten Kohlenhydraten unterscheiden zu können, und sind daher von großem medizinischen Interesse, da ihre Inhibition durch synthetische Kohlenhydratliganden die Behandlung einer Vielzahl menschlicher Krankheiten ermöglicht^[1]. So ist die Erkennung von Kohlenhydraten durch Lektine bei Entzündungsvorgängen^[2], bei der Anhaftung von Bakterien an die Wirtszelle^[3] und bei der Metastasierung von Krebszellen^[4] von zentraler Bedeutung.

Häufig weisen Lektine mehrere kohlenhydraterkennende Domänen auf, die eine gleichzeitige Interaktion verschiedener Liganden erlauben. Das gleichzeitige Binden mehrerer Liganden einer biologischen Einheit an mehrere Rezeptoren einer anderen biologischen Einheit nennt man auch Multivalenz^[5]. Multivalente Wechselwirkungen sind in der Regel wesentlich stärker als die Summe der monovalenten Wechselwirkungen, sodass die meist schwache Bindungsaffinität von monovalenten Liganden kompensiert werden kann. Ein Mechanismus zur Erklärung der erhöhten Bindungsaffinitäten ist das überbrückende Binden benachbarte Bindungsstellen durch multivalente Liganden^[6]. Dieser Mechanismus ist auch als Chelateffekt bekannt^[7].

In einer neueren Arbeit von Schwefel *et al.*^[8] konnte röntgenkristallographisch gezeigt werden, dass divalente N-Acetylglucosamin- (GlcNAc-) Derivate an Weizenkeimagglutinin (WGA) überbrückend bindet. Da die Kristallstruktur eines Biomakromoleküls jedoch nicht zwangsläufig der Struktur in Lösung entspricht^[9], sind Methoden, die eine Untersuchung biologischer Systeme in Lösung ermöglichen, von großer Bedeutung. Unter Anwendung von Elektronenspinresonanz-(ESR-) spektroskopischen Methoden an spinmarkierten Liganden gelang es in dieser Arbeit erstmals, chelatisierendes Binden in Lösung nachzuweisen. Die Kombination von Continuous-Wave-(cw-)ESR und gepulsten Zweifrequenz-ESR-Methoden lieferte ein detailliertes Bild der molekularen Bindungsmechanismen mono- und divalenter Liganden an WGA.

Neben der intermolekularen Gleichgewichtskonstanten wird die Chelatkooperativität maßgeblich von der mikroskopischen effektiven Molarität EM bestimmt. Von ihr ist abhängig, ab welcher Ligandenkonzentration der Zustand überbrückend bindender Liganden in einen Zustand monovalent bindender Liganden übergeht^[10]. Dieser Parameter EM ist nur mit geeigneten Referenzsystemen zugänglich, da man mit einem klassischen Titrationsexperiment lediglich eine makroskopische Gesamtstellenbesetzung ermitteln kann. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass es mit Bifrequenz-ESR-Spektroskopie an spinmarkierten Liganden möglich ist, den mikroskopischen Parameter EM zu bestimmen und chelatbedingte Kooperativität zu charakterisieren.

2 Multivalente Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen

2.1 Biologische Funktion und medizinische Anwendung von Lektinen

Das häufige Vorkommen von Lektinen in höherentwickelten Pflanzen^[11,12], Pilzen^[13], Wirbeltieren^[14,15], wirbellosen Tieren^[16], Bakterien^[17] und Viren^[18], ihre große strukturelle Vielfalt^[19] und ihre Eigenschaft zwischen chemisch eng verwandten Sacchariden unterscheiden zu können, führt zu einer hohen Anzahl von Hypothesen über ihre biologische Funktion. So konnte beispielsweise in einer neueren Studie gezeigt werden, dass in Pflanzen Oligosaccharide zur Informationsvermittlung eingesetzt werden, indem sie durch nicht-kovalente Bindung an Rezeptoren auf der Zelloberfläche eine Zellantwort herbeiführen. Man vermutet, dass auf diesem Wege wichtige Prozesse bezüglich des Pflanzenwachstums gesteuert werden^[20,21]. Es gilt dabei als sehr wahrscheinlich, dass Lektine als Rezeptoren oder als Transportmittel der Oligosaccharide eine wichtige Rolle bei der Informationsübertragung spielen. Die Identifikation und Charakterisierung der Lektine dieser Klasse machen gegenwärtig Fortschritte und tragen erheblich zum besseren Verständnis elementarer Pflanzenprozesse bei.



Abbildung 1: Lektineigenschaft aus der Sichtweise eines Cartoonisten.

Schon seit vielen Jahren wird Pflanzenlektinen eine tragende Rolle zum Schutz vor Fressfeinden zugeschrieben, nicht zuletzt weil Lektine und Antikörper viele Gemeinsamkeiten bei ihren Funktionseigenschaften aufweisen^[22]. So ist es Aufgabe von Lektinen, spezifische Oligosaccharide zu erkennen, die von Zellen, deren Membranschicht beschädigt oder von Krankheitserregern befallen sind, freigesetzt werden. Dieser Vorgang veranlasst die Pflanze, ein Isoflavonoid auszuschütten,

welches antimikrobielle Eigenschaften besitzt und die befallene Zelle unschädlich macht^[23]. Eine weitere Klasse immunaktiver Lektine geht eine direkte Bindung mit dem Pathogen ein. Es konnte gezeigt werden, dass chitinbindende Lektine wie Weizenkeimagglutinin das Wachstum von Pilzen, Insekten und anderen Organismen hemmt, indem es sich direkt in die Zellwände dieser chitinhaltigen Organismen einlagert^[24]. Selbst Einkapselungen von Krankheitserregern durch Lektine konnten schon beobachtet werden^[22]. Lektine aus *Phaseolus vulgaris* (Bohnengewächs) können durch Interaktion mit Epithelzellen zu Beschwerden im Verdauungstrakt der Pflanzenfresser führen^[24]. Als ein besonders toxischer Vertreter dieser Lektinklasse gilt *Ricin*, welches aus zwei Untereinheiten besteht: Das Protein kann über eine Lektindomäne, welche Galactosereste auf der Zelloberfläche erkennt, in das Innere einer Zelle gelangen und mit einer katalytisch aktiven Domäne die Proteinsynthese der Zelle zum Erliegen bringen^[25].

Die wichtigsten Funktionen von Lektinen in Säugetieren erstrecken sich von der Zell-Zellkommunikation bei Entzündungsprozessen^[2,26] über die Anheftung von Bakterien oder Viren an Wirtszellen^[3,27] bis hin zur Gewährleistung, dass nur korrekt gefaltete Proteine aus dem endoplasmatischen Retikulum in das Cytosol gelangt^[28].

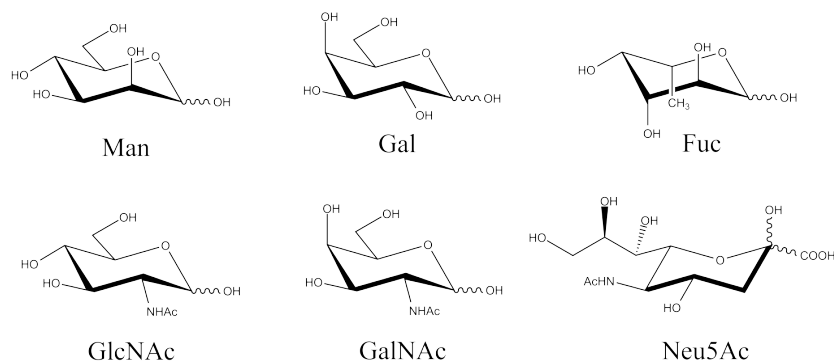


Abbildung 2: Strukturformeln der Monosaccharide, nach denen die Lektinklassen eingeteilt sind.

Lektine finden in vielen Bereichen der Forschung und Medizin eine immer breitere Anwendung und werden vor allem bei der Detektion, Identifikation und Spezifikation von Kohlenhydraten eingesetzt^[29,30] (Abbildung 1). Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie nicht-kovalente und spezifische Bindungen ausbilden, die bei Zugabe von geeigneten Zuckern wieder gelöst werden können. Darüber hinaus sind Lektine in verhältnismäßig großen Mengen verfügbar und bei physiologischen Bedingungen chemisch stabil. Beispielsweise konnten mit Hilfe von Lektinen Erkenntnisse über die Aufgabe und Zusammensetzung der Glycocalix, einem Kohlenhydratmantel, der die Zelle umgibt, gewonnen werden. Da sich der der Aufbau der Glycocalix im Laufe der Entwick-

lung, Differenzierung und Erkrankung einer Zelle auf charakteristische Weise verändern kann, ist es vorstellbar, dass Signalwege, die solche Prozesse auslösen, durch den gezielten Einsatz von Lektinen besser verstanden werden^[31,32].

Lektine finden auch Anwendung in der Neurobiologie. Die Affinität bestimmter Pflanzenlektine gegenüber Nervenzellen ermöglichte es, die Kommunikationswege zwischen Neuronen aufzuzeigen und somit neuronale Signalwege zu bestimmen. Dabei wurde mit Meerrettich-Peroxidase markiertes Lektin *in vivo* an bestimmten Stellen im Nervensystem eingespeist, von den Axonterminalen aufgenommen und mittels axonalem Transport zum peripheren Ende des Axons transportiert^[33,34,35].

Prinzipiell ist es möglich, Zellen jeglicher Art mit Hilfe von Lektinen in Subpopulationen aufzutrennen, vorausgesetzt, es besteht ein Unterschied in den Kohlenhydratstrukturen auf den entsprechenden Zellmembranen. Im Gegensatz zu Antikörpern können die Zellpopulationen unversehrt und in grossen Ausbeuten wiedergewonnen werden, da die Lektin-Zell-Bindungen wie bereits oben erwähnt reversibel verlaufen^[36].

Manche Lektine besitzen die außergewöhnliche Eigenschaft, mitotisch ruhende Lymphozyten zur Zellteilung bzw. zum Wachstum anzuregen, die nicht Klone einer gemeinsamen Mutterzelle sind. Man bezeichnet diese Lektinklasse deswegen auch als *polyclonale Mitogene*. Eine derartige Verstärkung der Zellteilung hat sich zur Erforschung von wichtigen Prozessen wie der *Antigen Stimulation* und der *Signaltransduktion* als nützlich erwiesen.

Neben der Klassifizierung nach ihrer Herkunft^[37] und nach ihrer Aminosäure-Sequenz-Homologie^[38], hat sich bei Untersuchungen von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen die Einteilung von Lektinen nach ihrer Bindungsaffinität durchgesetzt^[39]. Man unterscheidet zwischen fünf verschiedenen Gruppen, die nach dem Monosaccharid, für welches das Lektin die höchste Affinität besitzt, benannt sind: D-Mannose (Man), D-Galactose/N-Acetyl-D-galactosamin (Gal/GalNAc), N-Acetyl-D-glucosamin (GlcNAc), L-Fructose (Fuc), und N-Acetyl-D-neuraminsäure (Neu5Ac) (Abbildung 2). Alle genannten Gruppen verbindet die Eigenschaft, dass die entsprechenden Di-, Tri- und Tetrasaccharide mit einer bis zu 1000-fach höheren Affinität gebunden werden^[40]. Im Allgemeinen weisen Lektine eine erstaunlich hohe Toleranz bezüglich der Konformation ihrer Liganden auf, so unterscheiden sich die Bindungskonstanten von N-Acetylglucosamin und N-Acetylneuraminsäure an Weizenkeimglutinin aufgrund ihrer Gemeinsamkeiten in der C-2 (Acetamido) und C-3 (Hydroxyl) Position kaum voneinander^[41].

2.2 Das Weizenkeimagglutinin

Weizenkeimagglutinin (WGA) gehört zu der Familie der hoch konservierten Chitin-bindenden Lektine (*Gramineae*) und ist eines der am häufigsten untersuchten und am besten charakterisierten Lektine überhaupt^[42,43]. Es liegt in einer Mischung aus drei Isolektinen WGA I, WGA II und WGA III vor, die sich in ihrer Aminosäuresequenz leicht unterscheiden, aber immunologisch identische Eigenschaften aufweisen^[44,45]. An WGA konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass Lektine an Tumorzellen stärker binden als an gesunden Zellen^[46]. Diese Lektine nehmen im Vergleich zu anderen Lektinklassen eine Sonderrolle ein, da sie aufgrund eines vierfachen Repetitions-Motiv der Primärsequenz mehrere N-Acetyl-D-Neuraminsäuren und N-Acetyl-D-Glucosamine spezifisch an eine Untereinheit binden können^[47]. WGA ist ein C_2 -symmetrisches Dimer, welches sich aus zwei identischen glycin- und cysteinreichen 17 kDa Untereinheiten zusammensetzt, wobei jede Untereinheit aus vier homologen Subdomänen (A bis D) mit jeweils 43 Aminosäuren aufgebaut ist. Jede der beiden unregelmäßig gefalteten Peptidketten wird durch insgesamt 16 Disulfidbrücken in eine kompakte und stabile Konfiguration gebracht^[48]. Durch „Kopf-zu-Schwanz“ Dimerisierung treten alle vier Subdomänen einer Untereinheit paarweise mit den Subdomänen der anderen Untereinheit gegensätzlicher Polarität in Kontakt (A-D und B-C) und bilden insgesamt acht Kohlenhydratbindungsstellen S aus^[49,8]. Jede dieser acht voll funktionsfähigen Kohlenhydrat-erkennenden Domänen (CRD) liegt somit zwischen zwei Domänen unterschiedlicher Aminosäureketten (Abbildung 3).

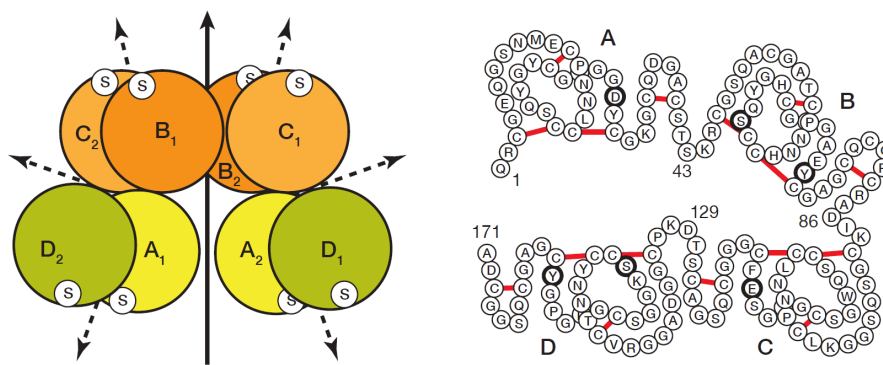


Abbildung 3: Links: Schematische Darstellung der acht Domänen A1, B1, C1, D1, A2, B2, C2 und D2 des WGA-Dimers. Der durchgezogene Pfeil zeigt die Richtung der C_2 -Symmetrieachse an und die Positionen der CRD-Domänen sind als „S“ gekennzeichnet. Rechts: Primärstruktur des WGA II Monomers mit rot eingezeichneten Disulfidbrücken (rechts)^[48,50].

Zur Unterscheidung der CRD's wird jede Bindungsstelle einer Abkürzung, wie z. B. B2C1 zu-geordnet: Der erste Buchstabe kennzeichnet die „tiefe Tasche“, bestehend aus drei aromatischen Aminosäuren, und einem konservierten Serinrest. Sie trägt den Hauptteil zur Bindungsfestigkeit bei und ist in allen acht Bindungsstellen vorhanden. Der zweite Buchstabe kennzeichnet die „flache Tasche“ oder „Helferdomäne“, die die polare Region beisteuert. Sie besteht aus maximal zwei polaren Aminosäuren, die sich aber nur schwach an der Bindung beteiligen können bzw. bei den Bindungsstellen A1 und A2 überhaupt nicht vorkommen. Die Zahlen kennzeichnen die jeweilige Peptidkette des WGA-Dimers. Aufgrund der C_2 -Symmetrie kommt jede Bindungsstelle zweimal vor: A1 und A2, B1C2 und B2C1, D1A2 und D2A1. Zahlreiche Studien belegen, dass die „Helferdomäne“ Wasserstoffbrücken ausbildet und somit entscheidend zur Stabilisierung des Kohlenhydrat-WGA-Komplexes beiträgt^[47]. Man unterscheidet deswegen zwischen primären Bindungsstellen mit höherer Affinität (B1C2, B2C1, C1B2, C2B1) und sekundären Bindungsstellen mit niedrigerer Affinität^[50] (A1, A2, D1A2, D2A1).

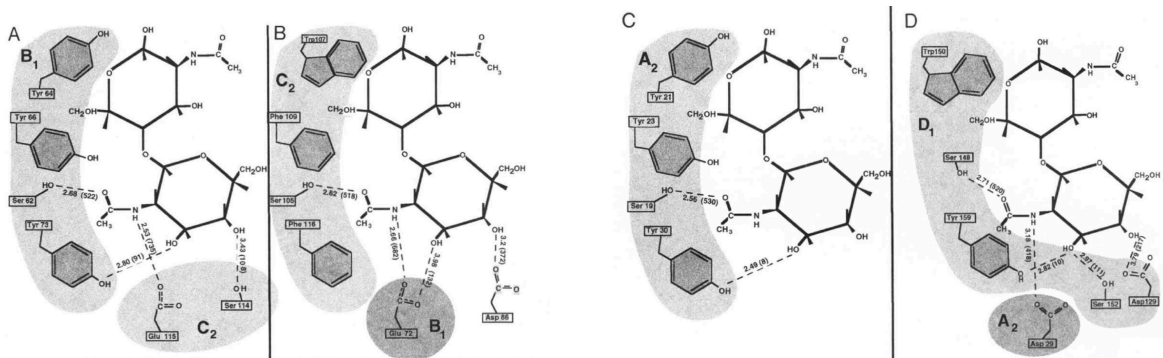


Abbildung 4: GlcNAc-Derivat Wechselwirkungen mit den vier WGA-Bindungstaschen (A) B1C1, (B) C2B1, (C) A2 und (D) D1A2. Die Bindungslänge der Wasserstoffbrücken sind in Angström angegeben^[50].

Durch die Ausbildung einer Netzwerks von Wasserstoffbrücken, polaren Wechselwirkungen und hydrophoben Wechselwirkungen wird zwischen GlcNAc (bzw. GlcNAc-Oligomeren) und den Aminosäureresten der CRD eine vergleichsweise hohe Bindungsaffinität erreicht. Eine besonders wichtige Rolle spielt dabei die N-Acetylgruppe des Zuckers, die zum einen eine stabile Wasserstoffbrücke mit dem Serinrest in der „tiefen Tasche“ ausbilden kann, und zum anderen eine stark polare Wechselwirkung mit einem Carboxylrest in der „flachen Tasche“ eingeht (Ausnahme A1 und A2). Bei den primären Bindungsstellen sind zusätzlich starke Wasserstoffbrücken zwischen dem Tyr⁷³ der aromatischen Domäne und der OH-Gruppe des C3-Atoms (B1C2), sowie

zwischen dem Glu⁷² der Helferdomäne und der OH-Gruppe des C3-Atoms (C2B1) vorhanden (Abbildung 4). Einen großen Anteil zur Stabilität der Bindung leisten hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem aromatischen Tyr¹⁰⁷ und dem Kohlenhydratring (C2B1). Als stereochemische Grundvoraussetzung für eine stabile Bindung gilt das Vorhandensein einer äquatorialen N-Acetylgruppe^[50,51].

2.3 Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen

Die thermodynamische Stabilität und Spezifität einer Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkung ist abhängig von dem Zusammenspiel intermolekularer Kräfte. Zu den wichtigsten intermolekularen Kräften zählen die Dipol-Dipol-Wechselwirkung, die Dipol-induzierter-Dipol Wechselwirkung, die Dispersionswechselwirkung und Wasserstoffbrückenbindungen. Ein solches Modellsystem lässt sich in der Regel physikalisch recht einfach beschreiben^[52].

Dagegen ist die Bindung von Molekülen in Lösung bedeutend komplexer, da Lösungsmittelmoleküle Kräfte auf die gelösten Stoffe ausüben können, die in ihrer Stärke häufig im Bereich der oben genannten intermolekularen Wechselwirkungen liegen. Dies hat zur Folge, dass die effektive Stärke einer Coulombwechselwirkung für einen gegebenen Abstand sehr stark abnimmt. Zudem kann bei polaren Lösungsmittelmolekülen in Gegenwart von unpolaren Verbindungen ein *hydrophober Effekt* auftreten^[53,54]. Diese hydrophoben Wechselwirkungen kommen dadurch zustande, dass die geordnete Struktur des polaren Lösungsmittels durch unpolare Verbindungen gestört wird und einen energetisch günstigeren Zustand durch Verringerung der polar-unpolar-Grenzfläche erreicht werden kann. Die Grenzfläche wird durch eine partielle „Desolvation“ des unpolaren Moleküls durch Anlagerung eines zweiten unpolaren Moleküls verringert und bewirkt so eine effektive Abstoßung zwischen polarer und unpolarer Spezies. Bisher war es nur möglich die hydrophobe Wechselwirkung semi-quantitativ zu beschreiben^[55,56].

Allgemein läßt sich sagen, dass zwei gelöste Moleküle genau dann eine nicht-kovalente Bindung eingehen, wenn die Summe der anziehenden Kräfte größer ist als die Summe aus den Solvatisierungseffekten *und* den abstoßenden Kräften zwischen den Bindungspartnern. Ob die Ausbildung einer intermolekularen Bindung erfolgt, hängt also davon ab, ob der Verlust energetisch günstiger Wechselwirkungen zwischen den Substraten und Lösungsmittel durch neue günstige Kontakte zwischen den Bindungspartnern überkompensiert wird. Im Folgenden sollen die bereits oben genannten intermolekularen Wechselwirkungen zwischen Protein und Kohlenhydrat ausführlicher diskutiert werden^[52,57,58].

Dipol–Dipol–Wechselwirkung: Moleküle, bei denen sich der Schwerpunkt der Elektronenverteilung und der Massenschwerpunkt voneinander unterscheiden, besitzen ein permanentes Dipolmoment. Die Kräfte zwischen zwei permanenten Dipolen werden als Dipol-Dipol Wechselwirkung bezeichnet und deren Stärke μ (Dipolmoment) ist von den Partiaalladungen, der Entfernung und der relativen Orientierung der Komponenten abhängig.

Viele Moleküle wie z. B. Kohlendioxid und Tetrachlormethan, weisen trotz stark polarisierter Atombindungen kein intrinsisches Dipolmoment auf, da die Partiaalladungen symmetrisch um den Schwerpunkt angeordnet sind. Allerdings besitzen sie ein zentrales Moment höherer Ordnung und tragen daher beträchtlich zur Stabilität einer Kohlenhydrat-Proteinbindung bei. Die Gesamtheit der permanenten dipolaren Kräfte zwischen zwei Molekülen A und B setzt sich dabei aus den Beiträgen der einzelnen Wechselwirkungen, wie Dipol-Dipol, Dipol-Quadrupol, Quadrupol-Quadrupol etc., zusammen. Wie bereits oben erwähnt ist die Stärke der Wechselwirkungen vom Abstand r abhängig und fällt für zwei Multipole n -ter Ordnung proportional zu $r^{-(n_A+n_B+1)}$ ab.

In Lösung können die Coulomb-Wechselwirkungen zwischen zwei Substraten durch die Dipolmomente der Lösungsmittelmoleküle um mehrere Größenordnungen abgeschwächt werden. Eine ionische Wechselwirkung in der Gasphase beträgt üblicherweise 50-200 $\frac{\text{kcal}}{\text{mol}}$, während in Wasser selten Werte größer als 1 $\frac{\text{kcal}}{\text{mol}}$ erreicht werden. Trotz dieser starken Abschwächung spielen dipolare Wechselwirkungen eine wichtige Rolle bei der Spezifitätskontrolle von Kohlenhydraten und bei der Erlangung der optimalen Bindungskonformation.

Dipol-induzierter-Dipol-Wechselwirkung: Wenn sich ein permanenter Dipol einem polarisierbaren Teilchen nähert, kann durch das elektrische Feld des Dipols eine Ladungsverschiebung in der Elektronenhülle des unpolaren Teilchens hervorgerufen werden. Dabei entsteht ein *temporärer* Dipol, da die induzierte Polarität von der sich ständig ändernden Elektronenverteilung des unpolaren Teilchens abhängig ist. Die Stärke des induzierten Dipols μ_{ind} hängt von dem elektrischen Feld E des permanenten Dipols und der Polarisierbarkeit α des unpolaren Teilchens ab^[57]. Man erhält für die Wechselwirkungsenergie den Ausdruck:

$$\langle U_{\text{ind}} \rangle = \frac{\mu^2 \alpha}{(4\pi\epsilon_0)^2 r^6} \quad , \quad (1)$$

wobei hier wieder eine Boltzmann-Verteilung der Orientierungen zwischen Dipol und induziertem Dipol angenommen wurde. In polaren Lösungsmitteln wird die Dipol-induzierter-Dipol-Wechselwirkung ähnlich wie die Dipol-Dipol-Wechselwirkung sehr stark abgeschwächt.

Londonsche Dispersionswechselwirkung: Eine Dispersionswechselwirkung liegt vor, wenn sich zwei unpolare Teilchen A und B nahe kommen und durch die ständige Fluktuation der Ladungsverteilungen in der Elektronenhülle von Molekül A ein Dipol in Molekül B induziert wird. Da ein temporärer Dipol nur so lange Bestand haben kann, bis es zu einer Umstrukturierung der Elektronenhülle kommt, ist die Dispersionswechselwirkungsenergie E von den Dispersionsfrequenzen ν_A und ν_B der Teilchen A und B abhängig. Es gilt die Beziehung^[59]:

$$E_{\alpha_A\alpha_B} = \frac{3}{4} \frac{h\nu_A\nu_B}{\nu_A + \nu_B} \frac{\alpha_A\alpha_B}{r^6}, \quad (2)$$

wobei α_A und α_B die Polarisierbarkeiten der Teilchen A und B sind. Obwohl die Kräfte zwischen zwei polarisierbaren Molekülen verhältnismäßig klein sind, stellen sie aufgrund ihres häufigen Auftretens die mit Abstand stärkste intermolekulare Wechselwirkung dar.

Wasserstoffbrücken: Eine Wasserstoffbrücke liegt vor, wenn ein elektronegatives Atom an das ein Wasserstoffatom kovalent gebunden ist (Protonendonator) mit einem freien Elektronenpaar eines zweiten Atoms (Protonenakzeptor) in Kontakt tritt^[58]. Im Unterschied zu anderen Coloumb Wechselwirkungen sind sie direktional und haben eine *a priori* klar festgelegte Stöchiometrie, da pro freiem Elektronenpaar nur eine Wasserstoffbrücke ausgebildet werden kann. Auch wenn die Bindungsfestigkeit von Wasserstoffbrücken wie bei allen Coulomb Wechselwirkungen in polaren Lösungsmitteln stark abnimmt, sind sie doch entscheidend für die Spezifitätskontrolle bei der Kohlenhydraterkennung^[60]. Vor allem durch ihre starke Richtungsabhängigkeit ermöglichen sie eine optimale Positionierung des Kohlenhydrats in der Bindungstasche^[61].

2.4 Methoden zur Untersuchung von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen

Eines der wichtigsten Ziele der Molekularbiologie ist es, die thermodynamischen Parameter von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen zu bestimmen. Die gebräuchlichsten Methoden sind der Hämagglutinations-Inhibitionstest (HLA)^[62], die isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)^[63], der Enzym-gekoppelte Lektinbindungstest (ELLA)^[64] und Kernresonanzexperimente^[65]. Die gewonnenen Bindungsdaten sind allerdings nur unter Vorbehalt miteinander vergleichbar, da sie stark von Art und Aufbau der Methode abhängen. Im Folgenden wird nur auf den ELLA und die ITC näher eingegangen.

Enzym-gekoppelter Lektinbindungstest: Der ELLA (enzyme-linked lectin assay) ist eine Methode, mit der eine Inhibitionskonzentration (IC_{50} -Wert) bestimmt werden kann, bei der die Bindung eines Lektins an einen immobilisierten Liganden zu 50 % inhibiert wird^[8,66]. Dabei konkurrieren Kohlenhydrate (frei in Lösung) mit hochmolekularen polymeren Sacchariden (immobilisiert auf der Oberfläche einer Mikrotiterplatte) um Bindungsstellen auf enzymmarkierten Lektinen^[49]. Der Bindungstest erfolgt durch die Zugabe des enzymmarkierten Lektins zusammen mit verschiedenen Konzentrationen des zu untersuchenden Liganden in die mit polymeren Sacchariden beschichteten *Wells* einer Mikrotiterplatte^[67,68]. Nach einer Inkubationszeit wird der ungebundene Teil der Lektine durch Waschen entfernt und die Konzentration der gebundenen Lektine durch eine enzymatische Farbreaktion spektrometrisch bestimmt. Die Intensität der Färbung nimmt dabei mit zunehmendem Bindungsgrad des löslichen Liganden ab. Zur Bestimmung der IC_{50} -Werte werden die Absorptionswerte gegen den Logarithmus der Ligandenkonzentration aufgetragen^[69] (Abbildung 5). Wie bereits eingangs erwähnt handelt es sich bei den IC_{50} -Werten nicht um Bindungskonstanten und sie sind somit auch nicht mit K_a -Werten von ITC-Messungen zu vergleichen.

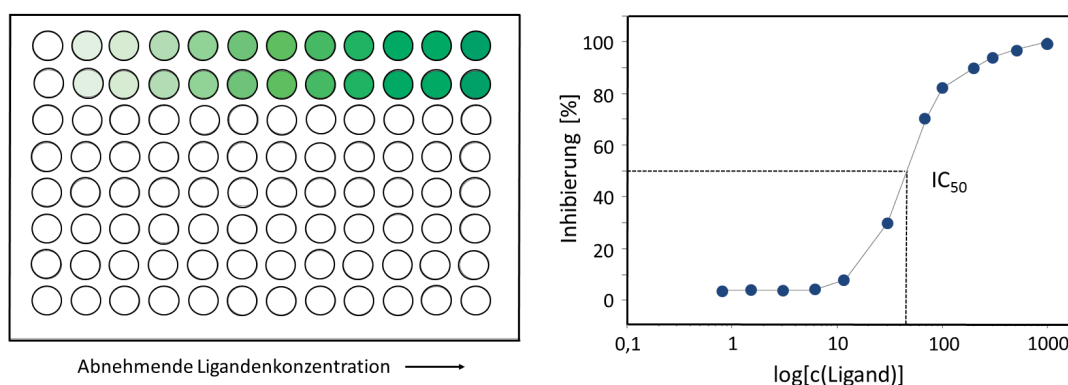


Abbildung 5: Die Farbintensität ist proportional zu der Konzentration des Lektin-Enzym-Konjugats (links). Der IC_{50} -Wert lässt direkt sich aus der Inhibitionskurve entnehmen^[49] (rechts).

Isotherme Titrationskalorimetrie: Die ITC (isothermal titration calorimetry) ist eine biophysikalische Messtechnik, die es ermöglicht, die Assoziationskonstante K_a , die Bindungsenthalpie ΔH und die Bindungsstöchiometrie n von Bindungsprozessen zu bestimmen^[70]. Des Weiteren lässt sich über die Beziehung

$$\Delta G = -RT \ln K_a = \Delta H - T\Delta S \quad (3)$$

die Freie Enthalpie ΔG und die Entropie ΔS berechnen^[71,72]. Ein wärmeisoliertes Titrationskalorimeter enthält eine Messzelle und eine Referenzzelle, die jeweils von einem adiabatischen Schutzschild umgeben sind. Zur Durchführung eines Experiments werden genau bekannte Mengen des Liganden zugegeben, was bei einer exothermen Reaktion zu einem Anstieg der Temperatur in der Messzelle führt. Die auftretende Temperaturdifferenz zwischen Referenz- und Messzelle wird durch einen Heizstrom ausgeglichen und in Abhängigkeit von der Zeit aufgezeichnet^[73]. Eine typische ITC-Messkurve weist mehrere negative *Spikes* auf, wobei jeder Spike einer Ligandeninjektion mit anschließendem Temperatureausgleich darstellt. Mittels Integration der Titrationspeaks erhält man schließlich ein Spektrum mit sigmoidalen Kurvenverlauf, aus dem sich die oben genannten thermodynamischen Parameter bestimmen lassen^[74] (Abbildung 6).

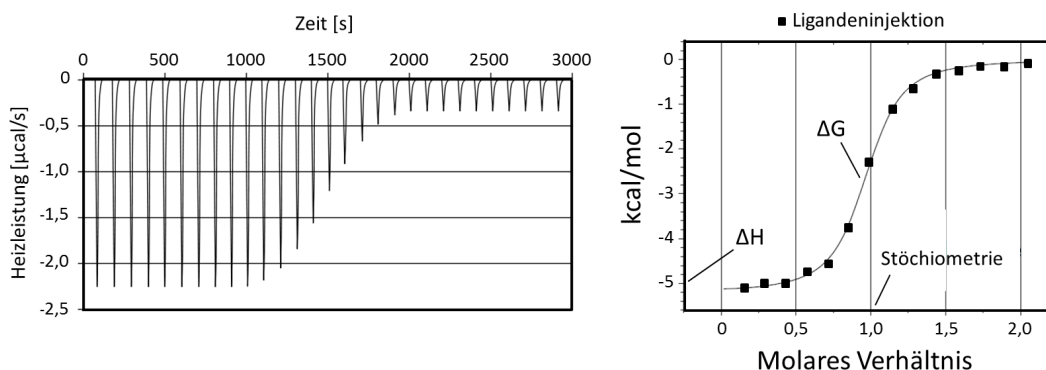


Abbildung 6: Darstellung einer typischen ITC-Messkurve einer exothermen Reaktion (links). Zusammenhang zwischen den thermodynamischen Parametern und der Titrationskurve nach der Integration^[25] (rechts).

2.5 Multivalenz

Unter Multivalenz versteht man das gleichzeitige Binden mehrerer Liganden einer biologischen Einheit an mehrere Rezeptoren einer anderen biologischen Einheit^[5]. Multivalente Wechselwirkungen in biologischen Systemen sind in der Regel wesentlich stärker als die Summe der entsprechenden monovalenten Wechselwirkungen, und es kann so die meist schwache Bindungsaffinität von monovalenten Liganden kompensiert werden^[4]. Es sind zahlreiche Abläufe aus der Natur bekannt, die sich diese besondere Eigenschaft zu Nutze machen. So konnten Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen bei der Bindung von *Escherichia coli* an Epithelzellen des Harnleiters^[75], bei

der Bindung von Influenzaviren an bronchiale Epithelzellen^[76,77] und bei der Bindung von Makrophagen an Pathogenen^[78,79] mit Multivalenz in Verbindung gebracht werden. Neben der Valenz ist auch die Geometrie, Struktur und Form der Liganden, sowie die chemische Beschaffenheit des Linkers entscheidend dafür, ob und wie gut der Ligand bindet^[80].

Die vollständige Beschreibung eines multivalenten Systems kann bei Berücksichtigung der *Zwischenzustände* und *Crosslinking* problematisch werden, es wird daher im Folgenden nur der einfachste Fall, die Wechselwirkung zwischen divalenten Komponenten bei Ligandenüberschuss, betrachtet^[5,81].

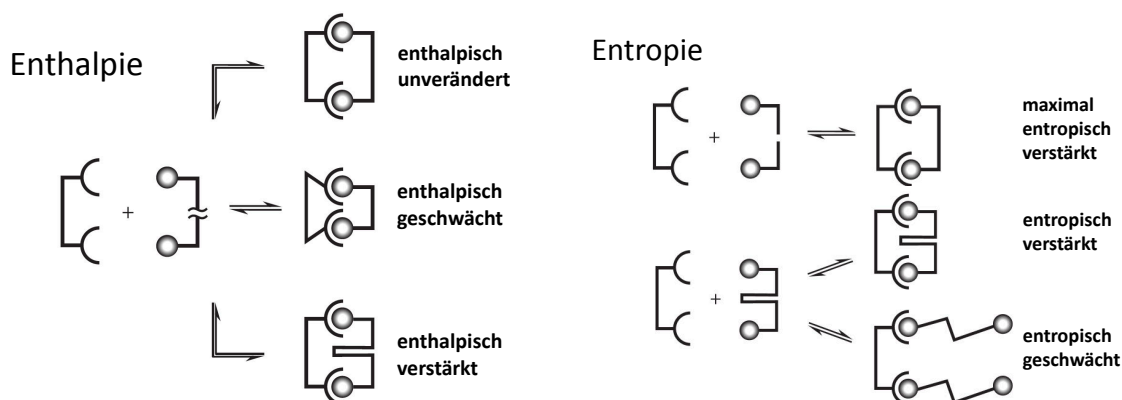


Abbildung 7: Enthalpie und Entropie eines divalenten Systems (siehe Text).

Die freie Enthalpie ΔG^{Di} einer bivalenten Wechselwirkung setzt sich gemäß Gleichung (3) aus einem enthalpischen ΔH^{Di} und einem entropischen ΔS^{Di} Beitrag zusammen. Nach dem Modell von Whitesides und Mitarbeiter^[5] können bezüglich der Enthalpie drei Fälle voneinander unterschieden werden: Ein *enthalpisch verstärktes* Binden liegt vor, wenn die Bindung der zweiten Bindungseinheit aufgrund positiver allosterischer Effekte oder vorteilhafter sekundärer Wechselwirkungen zwischen Linker und Rezeptor energetisch begünstigt ist ($\Delta H^{Di} < 2\Delta H^{Mono}$). Wenn die Bindung der zweiten Bindungseinheit durch das Binden der ersten Bindungseinheit gestört wird, ist die frei werdende Energie des divalenten Systems ΔH^{Di} geringer (weniger negativ) als die doppelte Bindungsenergie der monovalenten Wechselwirkung. Man spricht dann von *enthalpisch geschwächtem* Binden ($\Delta H^{Di} > 2\Delta H^{Mono}$). Dieser Fall tritt auf, wenn die räumliche Anordnung eines starren Liganden und eines Rezeptors zu stark voneinander abweichen oder wenn negative allosterische Effekte vorliegen. Passt die räumliche Anordnung eines Liganden und eines Rezeptors exakt zueinander und werden die intermolekularen Wechselwirkungen der

zwei Bindungseinheiten nicht voneinander beeinflusst, entspricht die divalente Bindungsenthalpie ΔH^{Di} der doppelten monovalenten Bindungsenthalpie ΔH^{Mono} ($\Delta H^{Di} = 2\Delta H^{Mono}$).

Die Änderung der Gesamtentropie einer bivalenten Wechselwirkung ΔS^{Di} kann als die Summe aus Translations- (ΔS_{Trans}), Rotations- (ΔS_{Rot}) und Konformationsentropie (ΔS_{Konf}) der Reaktanten aufgefaßt werden, zudem gibt es einen weiteren Beitrag, der die Entropieänderung des umgebenden Lösungsmittels (ΔS_{Solv}) berücksichtigt:

$$\Delta S^{Di} = \Delta S_{Trans} + \Delta S_{Rot} + \Delta S_{Konf} + \Delta S_{Solv} \quad (4)$$

Zur Vereinfachung wird die Änderung der Hydratationsentropie (ΔS_{Solv}) vernachlässigt, da sie einen vergleichsweise kleinen Beitrag leistet. Des Weiteren kann man aufgrund der schwachen logarithmischen Abhängigkeit der Translations- und Rotationsentropie von der Masse näherungsweise davon ausgehen, dass die Entropie aller Teilchen, sowohl Liganden als auch Rezeptoren, gleich groß ist. Ausgehend von diesen Näherungen kann man auch für die Entropie drei Fälle voneinander unterscheiden: Eine Bindung ist *maximal entropisch verstärkt*, wenn ein starrer Ligand ($\Delta S_{Konf} = 0$) eine optimale räumliche Anordnung aufweist. In diesem Fall entspricht der Entropieverlust einer bivalenten Wechselwirkung dem Entropieverlust einer monovalenten Wechselwirkung, d.h. $\Delta S^{Di} \approx \Delta S_{trans}^{Mono} + \Delta S_{rot}^{Mono} \approx \Delta S^{Mono}$. Ist die Summe aus Rotations- und Translationsentropie geringer (weniger Entropieverluste) als die Konformationsentropie ($\Delta S_{Konf}^{Di} < \Delta S_{Konf}^{Di} + \Delta S_{rot}^{Di}$), dann ist die divalente Wechselwirkung immer noch *entropisch verstärkt*. Für den umgekehrten Fall ($\Delta S_{Konf}^{Di} > \Delta S_{trans}^{Di} + \Delta S_{rot}^{Di}$) werden zwei monovalente Bindungen gegenüber einer divalenten Bindung bevorzugt, d. h. die divalente Wechselwirkung ist *entropisch geschwächt* (Abbildung 7).

Aus der Darstellung von oben folgt, dass sich in einem divalenten System entropische und enthalpische Effekte gegenseitig auslöschen können: Während eine große Flexibilität des Liganden hohe Entropieverluste bei der Bindung mit sich bringt, kann dieselbe Flexibilität dazu beitragen die optimale räumliche Anordnung zu finden und enthalpische Verluste zu vermeiden.

2.6 Allosterische- und Chelat-Kooperativität

Ein multivalentes System weist Kooperativität auf, wenn sich mehrere Wechselwirkungen in einer Weise beeinflussen, dass sich das System als Ganzes anders verhält, als man es aus den Eigenschaften der einzelnen Wechselwirkungen erwarten würde^[82,83]. Ein wichtiges Kennzeichen stark *positiver* Kooperativität ist die niedrige Konzentration von partiell gebundenen Zwischenstufen. Es werden fast ausschließlich die Extremzustände „vollständig gebunden“ und „vollständig ungebunden“ bevölkert, weshalb man auch von „alles-oder-nichts“-Verhalten spricht. In einem solchen System liegen auf *molekularer Ebene* nur vollständig gebundene Liganden oder Liganden frei in Lösung vor. Das Verhalten auf *makroskopischer Ebene* ist dadurch gekennzeichnet, dass die gesamte Population bei einer kleinen Konzentrationsänderung von einem vorwiegend ungebundenen in einen vorwiegend gebundenen Zustand wechselt. Die Bindungsisotherme nimmt dabei einen für positive Kooperativität charakteristische sigmoidale Linienform an^[84,85].

In den kürzlich erschienenen Arbeiten von Whitty^[86], Hunter^[10] und Ercolani^[87] wurden zwei Typen von Kooperativität vorgestellt: Allosterische Kooperativität und Chelatkooperativität. Ersteres entsteht durch das Zusammenspiel mehrerer *intermolekularer* Wechselwirkungen und Letzteres durch die gegenseitige Beeinflussung mehrerer *intramolekularer* Wechselwirkungen, also als Folge einer Chelatwirkung. Ausgehend von diesen drei Arbeiten sollen die zwei Typen von Kooperativität im Folgenden genauer betrachtet werden.

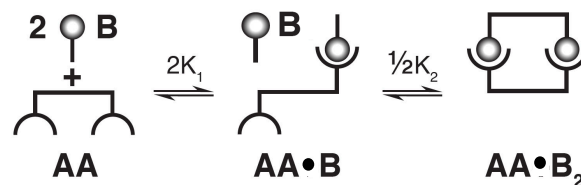


Abbildung 8: Bindungsschema eines Systems mit divalentem Rezeptor AA und monovalenten Liganden B.

Das Bezugssystem: Ein Komplex bestehend aus einem Rezeptor mit einer Bindungsstelle A und einem monovalenten Liganden B dient als Bezugssystem, da hier keine Kooperativität auftritt. Es liegt ein einfaches Zwei-Zustands-Gleichgewicht vor, das durch die Assoziationskonstante K , den Konzentrationen des gebundenen $[AB]$ bzw. freien Rezeptors $[A]$ und der Konzentration des freien Liganden $[B]$ beschreiben werden kann. Es gilt:

$$K = \frac{[AB]}{[A][B]} \quad (5)$$

Allosterische Ligandenbindung: Zur Veranschaulichung von allosterischer Kooperativität geht man von einem divalenten Rezeptor $[AA]$ und zwei monovalenten Liganden $[B]$ aus. In diesem System können die drei möglichen Zustände freier Rezeptor AA , partiell besetzter Rezeptor $AA \bullet B$ und vollständig besetzter Rezeptor $AA \bullet B_2$ auftreten (Abbildung 8), wobei die Gleichgewichte zwischen den Zuständen durch die mikroskopischen Assoziationskonstanten K_1 und K_2 charakterisiert sind:

$$2K_1 = \frac{[AA \bullet B]}{[AA][B]} \quad (6)$$

$$\frac{1}{2}K_2 = \frac{[AA \bullet B_2]}{[AA \bullet B][B]} \quad (7)$$

Auf molekularer Ebene kann allosterische Kooperativität mit Hilfe des Wechselwirkungsparameters α beschrieben werden:

$$\alpha = \frac{K_1}{K_2} \quad (8)$$

Liegt keine Kooperativität vor, gilt $K_1 = K_2 = K$, und es ist somit $\alpha = 1$. Weitere wichtige Parameter sind die Bindungsstellenbesetzung Θ_A , die den auf Eins normierten Anteil der gebundenen Rezeptoren angibt, und die Gesamtkonzentration des Rezeptors $[AA]_0$. Es gilt folgende Beziehung:

$$\Theta_A = \frac{\frac{1}{2}[AA \bullet B] + [AA \bullet B_2]}{[AA_0]}, \quad (9)$$

wobei $[AA_0]$ durch

$$[AA_0] = [AA] + [AA \bullet B] + [AA \bullet B_2] = [AA](1 + 2K_1 + K_1K_2[B]^2) \quad (10)$$

gegeben ist. Für die Diskussion der Kooperativität ist es sehr hilfreich, den Verlauf von $[AA \bullet B]$ und $[AA \bullet B_2]$ in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration $[B]$ für verschiedene α zu berechnen und in einem Schaubild (*Speziationsprofil*) aufzutragen. Hierfür stellt man zunächst die Gleichungen (6) und (7) nach $[AA \bullet B]$ und $[AA \bullet B_2]$ um:

$$[AA \bullet B] = 2K_1[AA][B] \quad (11)$$

$$[AA \bullet B_2] = K_1K_2[AA][B]^2 \quad (12)$$

Durch Einsetzen von (10), (11) und (12) in (9) erhält man schließlich eine Gleichung, mit der sich das Speziationsprofil berechnen lässt:

$$\Theta_A = \frac{K_1[B] + K_1K_2[B]^2}{1 + 2K_1 + K_1K_2[B]^2} \quad (13)$$

In Abbildung 9 sind die entsprechenden Kurvenverläufe für negative Kooperativität ($\alpha < 1$) und positive Kooperativität ($\alpha > 1$) gezeigt, wobei die Populationen des partiell besetzten Zustands $AA \bullet B$ durch die roten Kurven und die Populationen des vollständig besetzten Zustands $AA \bullet B_2$ durch die blauen Kurven beschrieben werden.

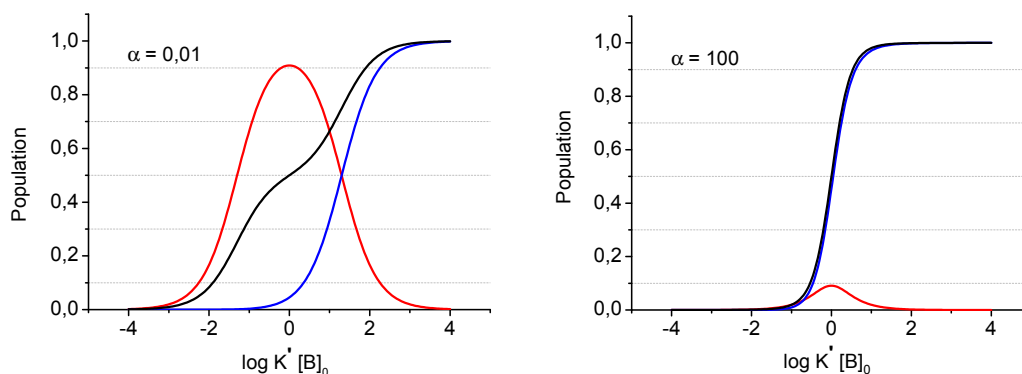


Abbildung 9: Speziationsprofile für die Wechselwirkung zwischen monovalenten Liganden und einem divalenten Rezeptor mit $\alpha = 0,01$ (links) und $\alpha = 100$ (rechts). Es ist jeweils der vollständig besetzte Zustand $AA \bullet B_2$ (blau), der partiell besetzte Zustand $AA \bullet B$ (rot) und die Bindungsstellenbesetzung Θ (schwarz) eingezeichnet. Die Konzentrationskala ist auf die effektive Assoziationskonstante $K' = \sqrt{K_1K_2}$ normiert, wobei am Punkt $\Theta = 0,5$ die Ligandenkonzentration durch $1/K'$ gegeben ist.

Aus der Abbildung geht hervor, dass für negative Kooperativität der Zustand des partiell besetzten Rezeptors in einem breiten Konzentrationsbereich die vorherrschende Spezies ist und erst bei hoher Ligandenkonzentration von dem Zustand des vollständig besetzten Rezeptors verdrängt wird. Demgegenüber beobachtet man für positive Kooperativität

ein Zwei-Zustands-Verhalten („alles oder nichts“) zwischen den Zuständen des unbesetzten Rezeptors und des vollständig besetzten Rezeptors. Das für positive Kooperativität charakteristische „Umschalten“ zwischen diesen beiden Zuständen findet dabei innerhalb eines verhältnismäßig kleinen Konzentrationsfensters statt. Auf makroskopischer Ebene kann Kooperativität entweder durch Auftragung in Form einer Hill-Kurve^[88,10] (Hill-Parameter n_H) oder mit Hilfe eines Umschaltfensters^[89] („switching window“ c_R) charakterisiert werden.

Chelat-Ligandenbindung: Zur Diskussion der Chelatkooperativität betrachtet man die Bindung divalenter Liganden BB an divalente Rezeptoren AA, mit der Bedingung, dass $\alpha = 1$, um allosterische Kooperativität auszuschließen. In einem solchen Modellsystem gibt es lediglich vier Zustände: Freies AA, ein partiell gebundener Komplex o-AA•BB, ein zyklischer Komplex c-AA•BB und ein 2:1-Komplex AA•(BB)₂. Die Populationen der Zustände werden von der *intramolekularen* Gleichgewichtskonstanten $K_{intra} = \frac{1}{2} \cdot K \cdot EM$ und der *intermolekularen* Gleichgewichtskonstanten K bestimmt. Die *mikroskopische effektive Molarität* EM (Einheit: $\frac{mol}{l}$) quantifiziert dabei das Ausmaß, mit dem der zyklische Komplex gebildet wird, und K beschreibt die Stärke der intermolekularen Wechselwirkung zwischen Rezeptor und Ligand. Um ein besseres Verständnis für die Chelatkooperativität zu bekommen, sollen ähnlich wie im vorangegangenen Abschnitt Speziationsprofile mit Chelatwechselwirkung ($K \cdot EM > 0$) und ohne Chelatwechselwirkung ($K \cdot EM = 0$) diskutiert werden.

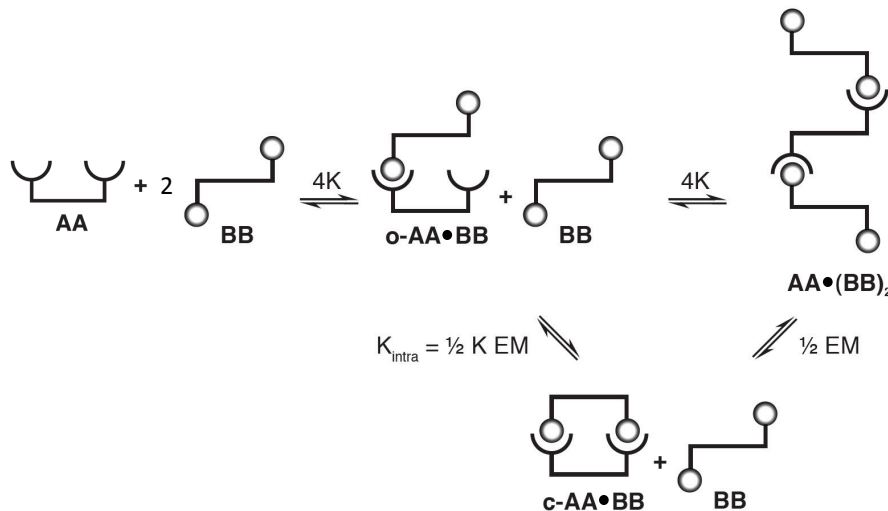


Abbildung 10: Bindungsschema eines Systems mit divalenten Rezeptor AA und divalenten Liganden BB, wobei $[BB]_0 \gg [AA]_0$ und $\alpha = 1$ gilt.

Die Konzentrationen der Zwischenstufe $[o-AA \bullet BB]$, des zyklischen Komplexes $[c-AA \bullet BB]$ und des 2:1-Komplexes $[AA \bullet (BB)_2]$ können mit Hilfe der Gleichgewichtskonstanten ausgedrückt werden (Abbildung 10). Man findet:

$$[o - AA \bullet BB] = 4K[AA][BB] \quad (14)$$

$$[c - AA \bullet BB] = 2K^2 EM[AA][BB] \quad (15)$$

$$[AA \bullet (BB)_2] = 4K^2[AA][BB]^2 \quad (16)$$

Die Gesamtkonzentration des Rezeptors $[AA]_0$ setzt sich hier wie oben aus den Konzentrationen aller Zustände zusammen:

$$\begin{aligned} [AA]_0 &= [AA] + [o - AA \bullet BB] + [c - AA \bullet BB] + [AA \bullet (BB)_2] \quad (17) \\ &= [AA] (1 + 4K[BB] + 2K^2 EM[BB] + 4K^2[BB]^2) \end{aligned}$$

Zur Berechnung der Speziationsprofile benötigt man die Bindungsstellenbesetzung Θ_A . Sie setzt sich aus der auf $[AA]_0$ normierten Summe der Fraktionen (14) - (16) zusammen:

$$\begin{aligned} \Theta_A &= \frac{\frac{1}{2}[o - AA \bullet BB] + [c - AA \bullet BB] + [AA \bullet (BB)_2]}{[AA]_0} \quad (18) \\ &= \frac{4K[BB] + 2K^2 EM[BB] + 4K^2[BB]^2}{1 + 4K_1[BB] + 2K^2 EM[BB] + 4K^2[BB]^2} \end{aligned}$$

Ein Vergleich der beiden Speziationsprofile in Abbildung 11 zeigt, dass die Chelatwechselwirkung bei moderater Ligandenkonzentration zu einer starken Abnahme der partiell gebundenen Komplexes $o-AA \bullet BB$ (rot) zugunsten des zyklischen Komplexes $c-AA \bullet BB$ (grün) führt. Die Verdrängung des intermediären Zustands ist ein charakteristisches Merkmal für Kooperativität, und man beobachtet, ähnlich wie bei allosterischer Kooperativität, auf makroskopischer Ebene ein „alles oder nichts“-Verhalten. Auf mikroskopischer Ebene zeigt sich jedoch, dass der zyklische Komplex $c-AA \bullet BB$ ($\sim[BB]$ siehe (15)) bei hohen Ligandenkonzentrationen von dem 2:1-Komplex $AA \bullet (BB)_2$ ($\sim[BB]^2$ siehe (16)) wieder zurückgedrängt wird. Das Speziationsprofil des Chelatkomplex $c-AA \bullet BB$ ist daher glockenförmig und weist entgegen der makroskopischen Bindungsstellenbesetzung Θ_A ein „alles-nichts-alles“ Verhalten auf. Sind die Ausdrücke auf der rechten Seite der Gleichungen (15) und (16) gleich groß, erhält man die Beziehung:

$$[BB]_U = \frac{EM}{2} \quad (19)$$

Laut dieser Gleichung kann man $\frac{EM}{2}$ auch als die Ligandenkonzentration $[BB]_U$ auffassen, bei der es zum „Umschalten“ zwischen dem zyklischen Komplex und dem offenen 2:1-Komplex kommt (Abbildung 11 rechts)^[90,91]. Die Chelatkooperativität ist somit im Gegensatz zur allosterischen Kooperativität von der Ligandenkonzentration abhängig^[92].

Aus der Darstellung von oben geht hervor, dass chelatbedingte Kooperativität zu einem makroskopischen Verhalten führen kann, das von einer positiven allosterischen Kooperativität nicht zu unterscheiden ist, selbst wenn sie sich auf mikroskopischer Ebene vollkommen voneinander unterscheiden. Die klassischen Parameter n_H und c_R können daher keinen Aufschluß über Chelatkooperativität (bzw. EM) geben, da sie einzig von dem makroskopischen Parameter Θ_A bestimmt werden. Nur in Ausnahmefällen und mit geeigneten Referenzsystemen besteht die Möglichkeit, den mikroskopischen Parameter EM zu bestimmen und chelatbedingte Kooperativität zu charakterisieren („*double mutant cycle*“)^[93,94,95].

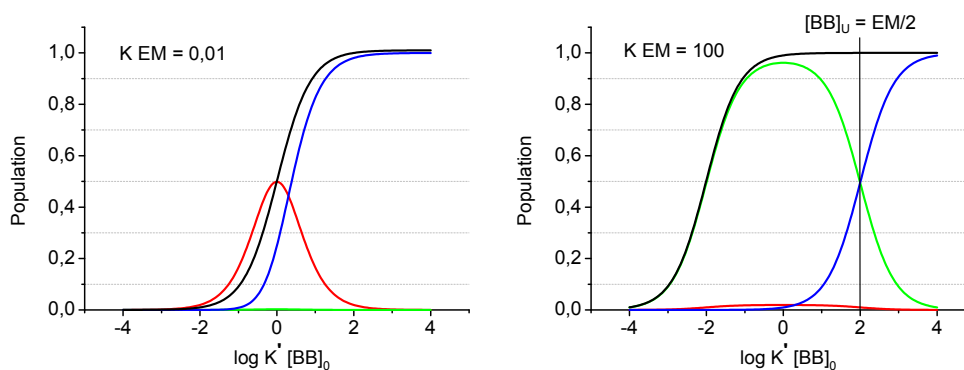


Abbildung 11: Speziationsprofile für die Wechselwirkung zwischen divalenten Liganden und einem divalenten Rezeptor mit $K EM = 0,01$ (links) und $K EM = 100$ (rechts). Es ist jeweils der zyklische Komplex $c-AA\bullet BB$ (grün), der partiell gebundene Komplex $o-AA\bullet BB$ (rot), der 2:1-Komplex $o-AA\bullet BB_2$ (blau) und die Bindungsstellenbesetzung Θ (schwarz) eingezeichnet. Die Konzentrationskala ist auf die effektive Assoziationskonstante $K' = 2 K$ normiert, wobei am Punkt $\Theta = 0,5$ die Ligandenkonzentration durch $1/K'$ gegeben ist.

3 ESR-Spektroskopie

3.1 Cw-ESR-Spektroskopie

a.) Mobilitätsmessungen an Nitroxid: Zu den gebräuchlichsten Spinmarkern, die in der ESR-Spektroskopie verwendet werden, zählen Nitroxid-Derivate mit der allgemeinen Formel $R^1R^2N-O\bullet$ ^[96,97]. Die Spindichte des Nitroxidradikals ist dabei näherungsweise zu 60 % am nicht magnetischen Sauerstoffkern mit Kernspin $I(^{16}O) = 0$ und zu 40 % am Stickstoffatom mit Kernspin $I(^{14}N) = 1$ lokalisiert^[98]. Der Hamiltonian für ein Nitroxid setzt sich dann aus einem Elektronen-Zeeman- und einen Hyperfeinwechselwirkungs-Term zusammen^[99]:

$$\hat{H} = \frac{\mu_B}{\hbar} \vec{B} \vec{g} \vec{S} + \vec{S} \vec{A} \vec{I} \quad (20)$$

Können die Aufspaltungen durch Dipol-Dipol-Kopplungen zu weiteren Elektronen und 1H -Hyperfeinkopplungen zu Wasserstoffatomen in α -Stellung zur Nitroxidgruppe vernachlässigt werden, erhält man im Aufspaltungsschema der Energieniveaus drei erlaubte Übergänge, die durch Hyperfein kopplungen zum ^{14}N -Kern verursacht werden (Abbildung 12).

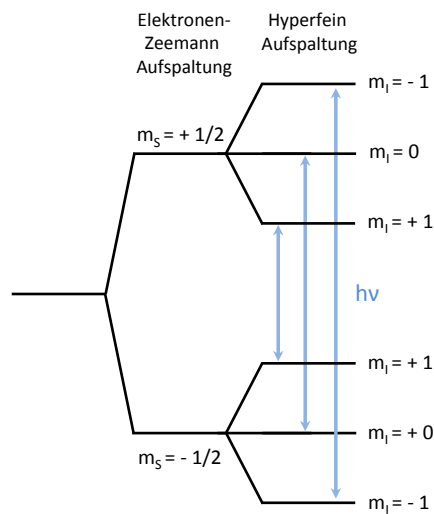


Abbildung 12: Aufspaltungsschema eines Nitroxids mit Elektronenspin $S = 1/2$ und Kernspin $I = 1$. Die blauen Pfeile kennzeichnen die drei erlaubten Übergänge (nicht maßstäblich).

Aus ESR-Spektren können Informationen sowohl über die Dynamik des Nitroxids als auch über die lokale Dynamik des spinmarkierten Moleküls gewonnen werden. Eine isotrope brownsche Rotationsdiffusion wird durch die Rotationskorrelationszeit τ_c charakterisiert^[100]:

$$\tau_c = \frac{4\pi\eta r^3}{3k_B T}, \quad (21)$$

wobei k_B die Boltzmann-Konstante, T die Temperatur, r der hydrodynamische Radius des Moleküls und η die Viskosität ist. Allgemein gilt, dass die Linienform eines cw-ESR Spektrums von der Dynamik (τ_c) des Spinmarkers abhängig ist (Abbildung 13): Im X-Band (9 GHz) werden im Grenzfall schneller Dynamik ($\tau_c \approx 10$ ps) g - und A -Tensor gänzlich ausgemittelt, sodass der Hamiltonian in (20) sehr stark vereinfacht wird^[101]:

$$\hat{H}_0 = g_{iso}\mu_B B_0 + a_{iso}m_I, \quad (22)$$

wobei $g_{iso} = (g_x + g_y + g_z)/3$ der isotrope g -Wert und $a_{iso} = (A_{xx} + A_{yy} + A_{zz})/3$ die isotrope Hyperfeinaufspaltung ist. In diesem Limit schneller Rotationsdiffusion beobachtet man drei schmale Linien mit gleicher Intensität, deren Resonanzlinien durch $(\mu_B g_{iso} B_0 - a_{iso})/\hbar$, $(\mu_B g_{iso} B_0)/\hbar$ und $(\mu_B g_{iso} B_0 + a_{iso})/\hbar$ gegeben sind^[102].

Im Grenzfall sehr langsamer Dynamik ($\tau_c = 1$ μ s) erhält man ein breites Festkörperspektrum, da die verbleibenden Bewegungseffekte viel kleiner sind als die anisotropen Linienverbreiterungen und sie damit keinen Einfluß mehr auf die Linienform haben. Die Rotationsbewegung des Nitroxids kann also nicht mehr aufgelöst werden. Drückt man die Orientierungen der axialsymmetrischen Nixtroxide im Laborkoordinatensystem (z -Achse $\parallel B_0$) durch die Polarwinkel Θ und ϕ aus, können die Resonanzfrequenzen mit folgende Gleichung berechnet werden^[99]:

$$E = \hbar\nu = \mu_B g(\Theta, \phi) B + A(\Theta, \phi) m_I \quad (23)$$

wobei

$$g(\Theta, \phi) = g_x \sin^2 \Theta \cos^2 \phi + g_y \sin^2 \Theta \sin^2 \phi + g_z \cos^2 \Theta \quad (24)$$

und

$$A(\Theta, \phi) = \sqrt{A_x \sin^2 \Theta \cos^2 \phi + A_y \sin^2 \Theta \sin^2 \phi + A_z \cos^2 \Theta} \quad (25)$$

Die Gleichungen (23) - (25) beschreiben also die Abhängigkeit der Resonanzfrequenz von der Orientierung des Nitroxids im Magnetfeld. Skaliert man noch die Intensitäten der Resonanzlinien

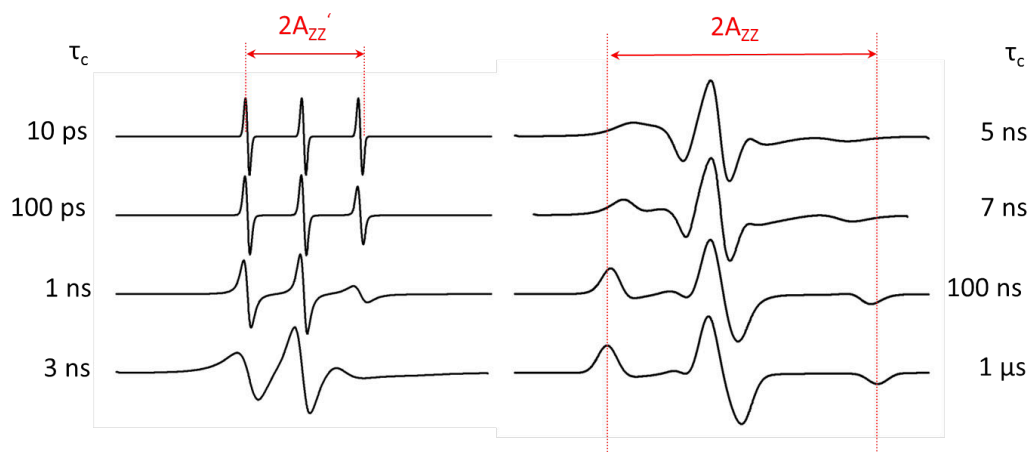


Abbildung 13: Simulierte Nitroxidspektren in Abhängigkeit von der Rotationskorrelationszeit τ_c für den Fall isotroper Rotationsdiffusion.

nach ihrer statistischen Wahrscheinlichkeit, erhält man ein Festkörperspektrum mit maximal anisotroper Linienverbreiterung. Die äußere Extremaseparation des Festkörperspektrums entspricht der doppelten Hyperfeinkopplung $2A_{ZZ}$ und beträgt typischerweise $6,8 \text{ mT}$ ^[103].

Im dynamischen Bereich zwischen den Grenzfällen ($1 \mu\text{s} > \tau_c > 10 \text{ ps}$) ist die Linienform des Spektrums von der Rotationsgeschwindigkeit des Nitroxids abhängig^[104,105]. In diesem Fall kann die Orientierung der Nitroxide zum B -Feld nicht mehr als konstant angenommen werden und die Polarwinkel (Θ, ϕ) in den Gleichungen (23) – (25) werden durch die zeitabhängigen Funktionen $\Theta = \Theta(t)$ und $\phi = \phi(t)$ ersetzt. Folglich werden auch die Matrizen für g - und Hyperfeinanisotropie mit $\vec{g} = \vec{g}(t)$ und $\vec{A} = \vec{A}(t)$ zeitabhängig. Der entsprechende Hamiltonian erweist sich als besonders praktisch, wenn man ihn in einen isotropen (\hat{H}_0) und in einen anisotropen ($\hat{H}_1(t)$) Teil aufteilt^[99]:

$$\hat{H} = \hat{H}_0 + \hat{H}_1(t) \quad (26)$$

mit

$$\hat{H}_1(t) = \mu_B \vec{B}_0^T [g(t) - g_{iso}] + \vec{S}^T [A(t) - A_{iso}] \vec{I}, \quad (27)$$

wobei g_{iso} und A_{iso} durch (22) gegeben sind. Der Beitrag von $\hat{H}_1(t)$ an \hat{H} ist also abhängig von der Rotationsgeschwindigkeit des Nitroxids in Lösung, während \hat{H}_0 zeitinvariant und unabhängig von Bewegungseffekten ist. Jede Änderung der Rotationskorrelationszeit τ_c führt daher zu einer Veränderung der Verteilung der Resonanzfrequenzen und somit zu einer unterschiedlichen Linienform des cw-ESR Spektrums. In diesem Regime kann die Rotationskorrelationszeit

τ_c über die doppelte bewegungsgemittelte Hyperfeinkopplung in z-Richtung ($2A'_{zz}$) abgeschätzt werden^[106].

Die Zeeman-Wechselwirkung ist im Gegensatz zur Hyperfein-Wechselwirkung proportional zum Magnetfeld. In Hochfeld-/Hochfrequenz-ESR-Experimenten kann man diese Eigenschaft ausnutzen, um zwei Signale mit unterschiedlichen g -Werten auf der Magnetfeldachse voneinander aufzutrennen^[107]. Die g -Wert-Differenz Δg und die Magnetfeldaufspaltung ΔB zweier Signale stehen in folgender Beziehung zueinander:

$$\Delta B = B_0 \frac{\Delta g}{g_e}, \quad (28)$$

wobei B_0 das statische Magnetfeld und g_e der g -Wert des freien Elektrons ist^[99]. Ein typisches (Tieftemperatur-) Nitroxidspektrum ist erst ab einer Mikrowellenfrequenz von $\nu_{\text{MW}} = 94$ MHz ($B_0 = 3,4$ T) g -Wert aufgelöst, da sich die Hauptwerte der g -Matrix mit g_{xx} (2,0095), g_{yy} (2,0095) und g_{zz} (2,0027) nur gering voneinander unterscheiden^[108].

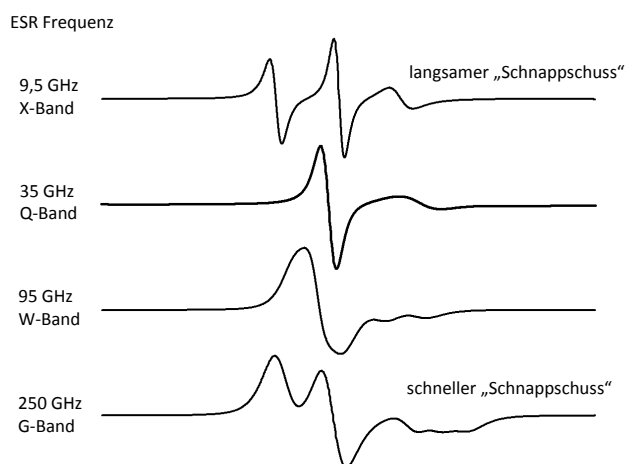


Abbildung 14: Simulierte Nitroxidspektren mit $\tau = 1,5$ ns in Abhängigkeit von der ESR Frequenz für den Fall isotroper Rotationsdiffusion.

Durch die lineare Abhängigkeit der Elektronen-Zeeman-Wechselwirkung vom Magnetfeld wird ein cw-ESR-Spektrum bei höheren Frequenzen *anisotrop verbreitert*. Diese Verbreiterung wird durch die Zunahme des anisotropen Hamiltonians $\hat{H}_1(t)$ in Gleichung (27) verursacht. Dadurch wird im Hochfeld eine breitere Linie weniger stark von den dynamischen Prozessen ausgemittelt (Abbildung 14). Die Linienform eines cw-ESR Spektrums wird also nicht nur von der Rotationskorrelationszeit τ_c , sondern auch von dem magnetfeldabhängigen (bzw. frequenzabhängigen)

Hamiltonian \hat{H}_1 bestimmt. Das Verhältnis der beiden Parameter legt die „Zeitskala“ fest, in der die Dynamik des Nitroxids noch aufgelöst werden kann^[99]:

$$|\hat{H}_1(t)| \tau_c \ll 1 \quad (\text{„schneller Grenzfall“}) \quad (29)$$

$$|\hat{H}_1(t)| \tau_c = 1 \quad (\text{„Taumeln“}) \quad (30)$$

$$|\hat{H}_1(t)| \tau_c \gg 1 \quad (\text{„langsamer Grenzfall“}) \quad (31)$$

Die Abhängigkeit der Linienform von den dynamischen Prozessen ist am größten, wenn das Produkt $|\hat{H}_1(t)| \tau_c$ etwa Eins beträgt.

Spinmarkierte Biomakromoleküle weisen oftmals eine komplexe Dynamik auf, die sich aus drei unabhängigen Bewegungen zusammensetzt: 1.) Bewegung des Linkers zwischen Makromolekül und Spinmarker, 2.) Bewegung der Proteindomänen durch Konformationsänderungen und 3.) Bewegung des Makromoleküls als Ganzes^[98]. Da sich die drei Dynamiken in der Regel stark unterscheiden, müssen cw-ESR Spektren bei mehreren Frequenzen gemessen werden, damit die Bedingung (30) für 1.), 2.) und 3.) erfüllt ist. Diese *Multifrequency-ESR* Methode erlaubt es, komplizierte Dynamiken vollständig zu beschreiben^[109,110,111,112,113]. Beispielsweise sind niedrigere Frequenzen wie L- oder X-Band (3 GHz bzw. 9 GHz) zur Untersuchung langsamer Bewegungen wie in 3.) besser geeignet, da man bei höheren Frequenzen wie im Q- oder W-Band (34 GHz bzw. 95 GHz) aufgrund des größeren $\hat{H}_1(t)$ -Terms die Situation in (31) vorfindet. Entsprechend umgekehrt lassen sich schnelle Bewegungen wie in 1.) bei höheren Frequenzen genauer analysieren.

b.) Mobilitätsmessungen an Systemen mit Vorzugsrichtung: Bei vielen Systemen wie Polymeren, Biomakromolekülen oder Lipiddoppelschichten kann der Bewegungsprozess nicht mit isotroper Brown'scher Rotationsdiffusion beschrieben werden. In diesen Fällen geht man von einem Modell aus, bei dem das Makromolekül eine isotrope Bewegung ausführt und die Seitenkettendynamik des Spinmarkers durch die lokale Struktur des Makromoleküls eingeschränkt ist. Die unmittelbare Umgebung des Spinmarkers wird dann näherungsweise als geordnet angesehen, da die Seitenkette aufgrund der molekulinternen Topologie nur bestimmte Konformationen annehmen kann. In diesem System liegt also eine *mikroskopische Ordnung und makroskopische Unordnung* (MOMD) vor^[114,115,116]. Zur Beschreibung des MOMD-Modells ist es notwendig, mehrere Koordinatensysteme und deren Relation zueinander genau festzulegen^[117].

Das Hauptachsensystem der magnetischen Wechselwirkungen (g -Matrix und Hyperfeinmatrix weisen nur Diagonalelemente auf) wird auch als Molekülkoordinatensystem bezeichnet. Der g - und Hyperfeintensor können dabei in guter Näherung als koaxial angesehen werden^[118]. Die-

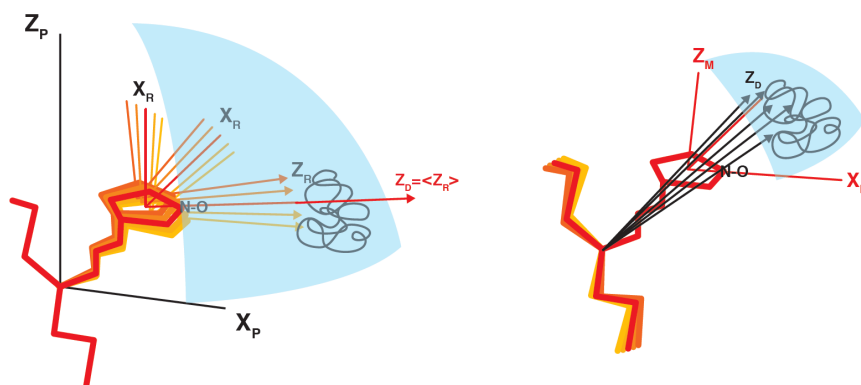


Abbildung 15: Das dynamische Verhalten der Spinmarkerseitenkette beschreibt eine Trajektorie im Proteinkoordinatensystem x_p , y_p und z_p . Die mittlere zeitliche Ausrichtung der z_R -Diffusionsachse des Spinmarkers legt dabei die Richtung des *Direktors* z_D fest (links). Umgekehrt führt der Direktor aus Sichtweise des Molekülkoordinatensystems eine Bewegung aus (rechts).

ses rechtshändige Koordinatensystem mit der Achsenbeschriftung x_M , y_M und z_M ist *in Bezug auf das Nitroxid* so angeordnet, dass z_M entlang des p_z -Orbitals des Stickstoffs und x_M entlang der kovalenten Bindung zwischen dem Stickstoff- und Sauerstoffatom liegt^[119,120]. Analog zu dem Hauptachsensystem der magnetischen Wechselwirkungen gibt es ein Hauptachsensystem des Rotationsdiffusionstensors mit der Achsenbeschriftung x_R , y_R und z_R . Die z_R -Achse wird hier definitionsgemäß entlang der Rotationsachse mit der größten Diffusionskonstanten festgelegt, d. h. sie liegt in vielen Fällen parallel zum Linker zwischen Makromolekül und Spinmarker. Das Hauptachsensystem der magnetischen Tensoren und das Hauptachsensystem des Rotationsdiffusionstensors haben eine feste Orientierung zueinander. Diese beiden Hauptachsensysteme können mit Hilfe der drei Eulerwinkel $\Omega_D = (\alpha_D, \beta_D, \gamma_D)$ ineinander überführt werden, wobei das Hauptachsensystem des Rotationsdiffusionstensors als Basiskoordinatensystem für die Transformation dient. Mit Hilfe eines weiteren Hauptachsensystems mit der Achsenbeschriftung x_D , y_D und z_D wird die Vorzugsrichtung der Seitenkette beschrieben. Im Gegensatz zu den beiden anderen Hauptachsensystemen ist die Orientierung dieses Koordinatensystems *in Bezug auf das Makromolekül* klar festgelegt, sodass die z_D -Achse (*Direktor*) mit dem Makromolekül einen festen Winkel einschließt^[117]. Aus der Sicht des Direktors führt die Nitroxidseitenkette daher eine stochastische Diffusionsbewegung aus. Die Richtung des Direktors wird dabei durch die mittlere zeitliche Ausrichtung der z_R -Diffusionsachse festgelegt und es gilt $z_D = \langle z_R \rangle$, womit ein Zusammenhang zwischen allen drei Hauptachsensystemen hergestellt ist (Abbildung 15).

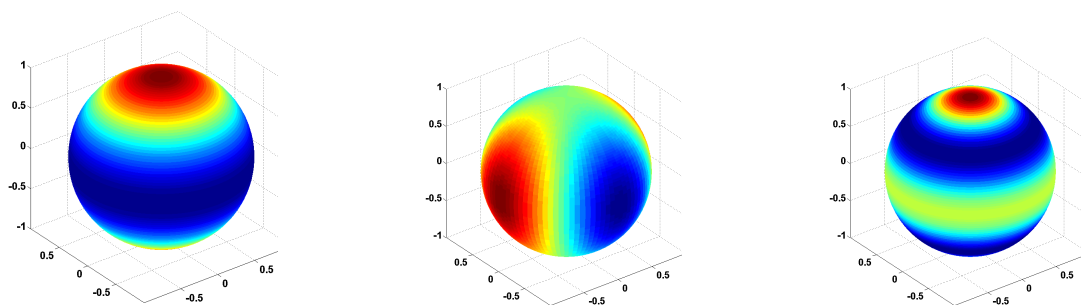


Abbildung 16: Darstellung der Kugelflächenfunktionen $D_0^2(\Theta)$ (links), $D_2^2(\Theta, \phi)$ (mitte) und $D_0^4(\Theta)$ (rechts). Rot entspricht einer hohen und dunkelblau einer niedrigeren Aufenthaltswahrscheinlichkeit.

Die Richtung des Direktors kann als die wahrscheinlichste Seitenkettenkonformation interpretiert werden, die durch die Stereometrie der näheren Umgebung bestimmt wird. Jede Auslenkung aus dieser Gleichgewichtslage bewirkt ein Rückstellpotential (Orientierungspotential), das darauf hinwirkt, die Seitenkette wieder entlang der Vorzugsrichtung zu orientieren^[103]. Das Rückstellpotential kann als Funktion der Polarkoordinaten (Θ, ϕ) ausgedrückt werden, die der Direktor im *Hauptachsensystem des Rotationsdiffusionstensors* einnimmt^[117]. Die Orientierungsabhängigkeit des Rückstellpotentials wird dabei in Kugelflächenfunktionen D_K^L entwickelt, wobei der Beitrag jeder Kugelflächenfunktion durch den Vorfaktor λ_{LK} quantifiziert wird. Das Rückstellpotential $U(\Omega)$ ist dann gegeben durch:

$$U(\Omega) = - \sum_{L,K} \lambda_{LK} D_K^L(\Theta, \phi), \quad (32)$$

wobei L eine Nebenquantenzahl und K eine Magnetquantenzahl ist. In der in dieser Arbeit verwendeten Software (Matlab Toolbox EasySpin 4.0.0^[121]) stehen insgesamt fünf Kugelflächenfunktionen mit den Koeffizienten λ_{20} , λ_{22} , λ_{40} , λ_{42} und λ_{44} zur Verfügung, um die Orientierungsabhängigkeit der Spinmarkerseitenkette zu modellieren. In der folgenden Tabelle ist die funktionelle Form der D_K^L -Parameter zusammen mit den entsprechenden Atomorbitalen aus der Quantenmechanik aufgeführt (Abbildung 16).

$$\begin{aligned}
 D_0^2(\Theta) &= \frac{1}{2}(3 \cos^2 \Theta - 1) & d_{z^2} \\
 D_2^2(\Theta, \phi) &= \sqrt{\frac{3}{2}}(\sin^2 \Theta \cos 2\phi) & d_{x^2-y^2} \\
 D_0^4(\Theta) &= \frac{1}{8}[(35 \cos^2 \Theta - 30) \cos^2 \Theta + 3] & g_{z^4} \\
 D_2^4(\Theta, \phi) &= \sqrt{\frac{5}{8}} \sin^2 \Theta (7 \cos^2 \Theta - 1) \cos 2\phi & g_{z^2(x^2-y^2)} \\
 D_4^4(\Theta, \phi) &= \sqrt{\frac{35}{8}} \sin^4 \Theta \cos 4\phi & g_{x^4-y^4}
 \end{aligned}$$

Das Rückstellpotential $U(\Omega)$ in (32) bestimmt letztendlich die Wahrscheinlichkeit P , mit der die Spinmarkerseitenkette in dem Kugelausschnitt zwischen (Θ, ϕ) und $(\Theta + d\Theta, \phi + d\phi)$ anzutreffen ist. Es gilt eine Boltzmannstatistik mit:

$$P(\Theta, \phi) = \frac{\exp[-U(\Omega)/kT]}{\int_{\Omega} \exp[-U(\Omega)/kT] d\Omega} \quad (33)$$

Die Anisotropie dieser Wahrscheinlichkeitsverteilung hat einen sichtbaren Effekt auf die Linienform des cw-ESR Spektrums. Zur Veranschaulichung der Auswirkungen dieser Anisotropie auf die Linienform wurden zwei Spektren simuliert, deren Parametersätze sich lediglich durch die Koeffizienten λ_{20} und λ_{22} unterscheiden (Abbildung 17). Selbst bei einer moderaten Orientierungsabhängigkeit mit $\lambda_{20} = 1$ (links) und $\lambda_{22} = 1$ (rechts) ist ein deutlicher Unterschied zwischen beiden Linienformen erkennbar.

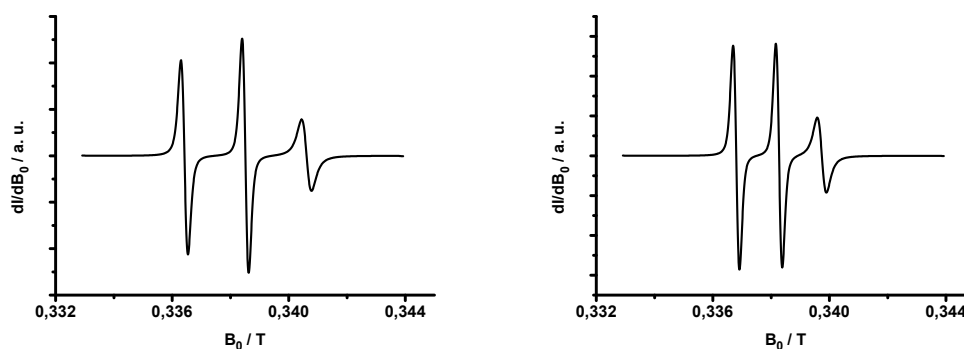


Abbildung 17: Simulierte Nitroxidspektren für den Fall axialsymmetrischer Rotationsdiffusion τ [0,5 ns 1 ns] und Vorzugsrichtung. Die Linienformen der Spektren mit $\lambda_{20} = 1$ (links) und $\lambda_{22} = 1$ (rechts) unterscheiden sich deutlich voneinander.

In dem MOMD-Modell setzt sich das Spektrum schließlich aus den Einzelspektren aller isotrop im Laborkoordinatensystem verteilten Direktoren z_D zusammen^[117,114] (Abbildung 18).

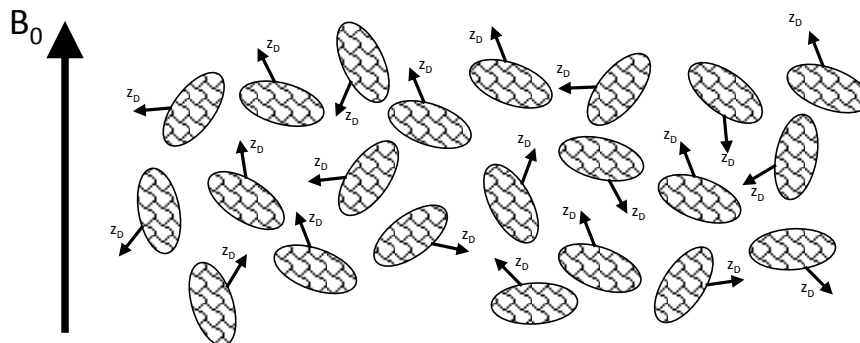


Abbildung 18: Schematische Darstellung eines Systems mit mikroskopischer Ordnung und makroskopischer Unordnung (MOMD). Die Richtungen der Direktoren z_D sind durch die schwarzen Pfeile gekennzeichnet.

3.2 Puls-ESR-Spektroskopie

Im Allgemeinen sind cw-ESR-Spektren nicht so gut aufgelöst, als dass man alle Wechselwirkungen des Spin-Hamiltonians daraus ermitteln könnte. Selbst bei Spektren, die von einer Wechselwirkung dominiert werden, kann die Überlagerung von Signalen bei der Datenanalyse große Schwierigkeiten bereiten. Die Separation des Spin-Hamiltonians mit Hilfe der Puls-ESR-Spektroskopie erlaubt es, Wechselwirkungen zu messen, die in vielen Fällen mit cw-ESR Experimenten unzugänglich sind^[122,103,123].

Aus der Dipol-Dipol-Kopplung lässt sich der Abstand zwischen zwei Spins bestimmen. Allerdings wird bei zwei Nitroxidspinmarker S_A und S_B mit einem Abstand größer als 2 nm die Dipol-Dipol Kopplung vollständig durch die inhomogene Linienverbreiterung (g -Anisotropie und unaufgelöste Hyperfeinwechselwirkungen) überlagert. Daher muß die Kopplung zwischen den beiden Elektronenspins \hat{H}_{EE} mit

$$\hat{H}_{EE} = \vec{\tilde{S}}\vec{\tilde{D}}\vec{\tilde{S}} + J\vec{\tilde{S}}_A\vec{\tilde{S}}_B \quad (34)$$

von den anderen Kopplungen mit Hilfe von gepulsten Doppelresonanz-Methoden separiert werden^[124,125,126], beispielsweise mit der 4-Puls-DEER-Sequenz. Hierbei ist $\vec{\tilde{D}}$ der Dipol-Dipol-Tensor und J die Austauschkopplung. In dem folgenden Abschnitt wird zur Vereinfachung angenommen,

dass sich zum einen die Austauschkopplung für Abstände größer als 1 nm isotrop verhält und zum anderen die Quantisierungsachsen der beiden Elektronenspins parallel zum äußeren Magnetfeld in z-Richtung liegen (*Hochfeldnäherung*). Der Hamiltonian in Gleichung (34) vereinfacht sich dann zu

$$\hat{H}_{EE} = [\omega_{dd}(1 - \cos^2 \Theta) + J] \vec{S}_{A,z} \vec{S}_{B,z}, \quad (35)$$

wobei ω_{dd} die dipolare Kopplungsfrequenz ist. Ferner wird angenommen, dass der pseudosekuläre Teil von (35) für Abstände größer als 1,5 nm vernachlässigt werden kann^[106].

a.) 4-Puls-DEER: Totzeitfreie Messung der Dipol-Dipol-Wechselwirkung: Das DEER Experiment beginnt mit der Einstrahlung eines selektiven $(\frac{\pi}{2})_x$ -Pulses, der ausschließlich A-Spins in die $-y$ -Richtung des rotierenden Koordinatensystems klappt. In der anschließenden Evolutionszeit τ_1 präzedieren die einzelnen *Spinpakete* \vec{m}_i mit verschiedenen Resonanzoffsets $\Delta\Omega_i$ um die z-Achse, was gemäß $\phi_i = \Delta\Omega_i \tau_1$ zu einer Dephasierung der Spinpakete in der xy-Ebene führt. Die unterschiedlichen Resonanzoffsets können dabei durch die Inhomogenität des Magnetfelds oder durch eine anisotrope Wechselwirkung bedingt sein. Beispielsweise bewirkt die Elektron-Elektron-Kopplung ω_{ee} mit einem B-Spin je nach Spinzustand eine Addition, oder eine Subtraktion von $\pm \frac{1}{2} \omega_{ee}$ ^[127]. Zum Zeitpunkt τ_1 nach dem $(\frac{\pi}{2})_x$ -Puls wird ein $(\pi)_x$ -Puls eingestrahlt, der die Spinpakete der A-Spins um 180° an der x-Achse dreht und eine Refokussierung entlang der $+y$ -Achse einleitet. Nach einer weiteren Evolutionszeit τ_1 sind alle Spinpakete wieder in Phase und man beobachtet ein *Hahn-Echo*. Durch Einstrahlen eines zweiten $(\pi)_x$ -Pulses beobachtet man schließlich zum Zeitpunkt $2(\tau_1 + \tau_2)$ ein refokussiertes Echo, dessen Intensität im Vergleich zum Hahn-Echo aufgrund transversaler Relaxation abgenommen hat.

Um letztendlich den Beitrag der Elektron-Elektron-Wechselwirkung zu separieren, muss ein weiterer π -Puls (*PELDOR*-Puls) eingestrahlt werden, der im Idealfall ausschließlich die B-Spins invertiert. Die Inversion der B-Spins bewirkt ein Vorzeichenwechsel der Elektron-Elektron-Kopplung von $+\frac{1}{2} \omega_{ee}$ zu $-\frac{1}{2} \omega_{ee}$ und *vice versa*. Dieser Vorzeichenwechsel hat zur Folge, dass die A-Spins zum Zeitpunkt $2(\tau_1 + \tau_2)$ nicht mehr entlang der $+y$ -Achse refokussiert werden. Die „gesammelte Phase“ ϕ_{ee} ist dabei von der Kopplungsfrequenz ω_{ee} und dem Zeitpunkt t , an dem der PELDOR-Puls eingestrahlt wird abhängig. Dem Vektordiagramm in Abbildung 19 kann man entnehmen, dass zum Zeitpunkt des refokussierten Echos ϕ_{ee} durch:

$$\begin{aligned} \phi_{ee}(4\tau) &= \left(\pm \frac{1}{2} \omega_{ee}\right) \tau - \left(\pm \frac{1}{2} \omega_{ee}\right) t - \left(\mp \frac{1}{2} \omega_{ee}\right) (2\tau - t) + \left(\mp \frac{1}{2} \omega_{ee}\right) \tau \\ &= \pm \omega_{ee}(\tau - t) \end{aligned} \quad (36)$$

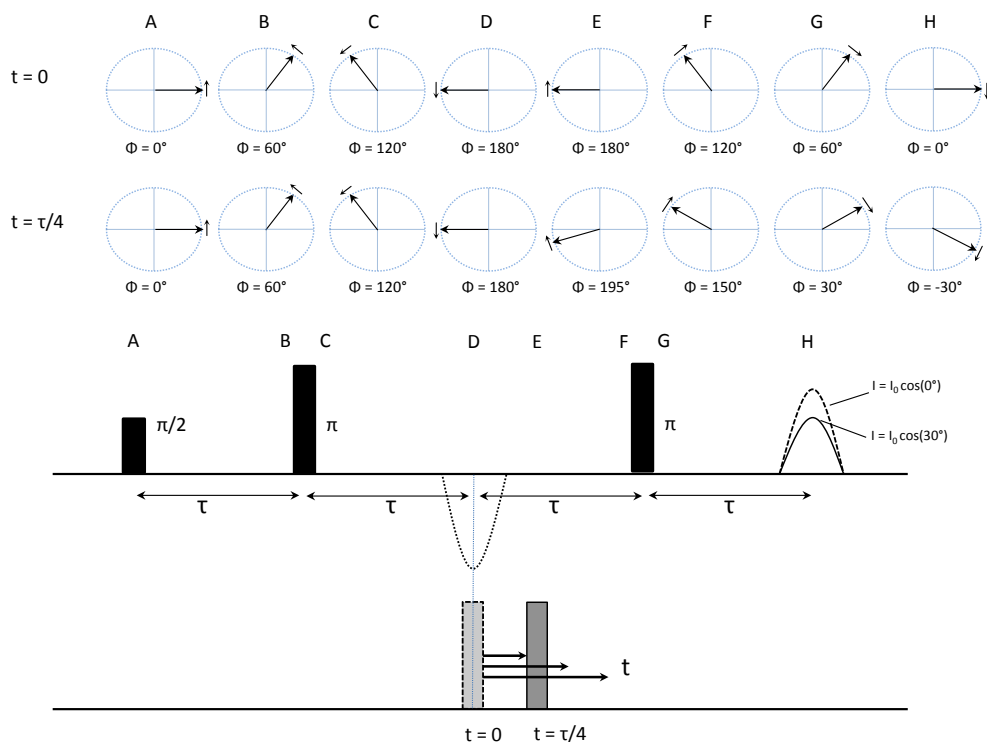


Abbildung 19: 4-Puls DEER Vektordiagramme der $+\frac{1}{2}\omega_{ee}$ Spinnpakete für die beiden Fälle $t = 0$ und $t = \frac{\tau}{4}$. Für die Darstellung wurde ein mit ω_A rotierendes Koordinatensystem, und $\tau_1 = \tau_2$ angenommen (Details siehe Text).

gegeben ist^[128], wobei mit den Vorzeichen in $\pm\frac{1}{2}\omega_{ee}$ das Dublett der Elektron-Elektron Aufspaltung berücksichtigt wird. Aus dem Vektordiagramm geht auch hervor, dass sich die Echointensität mit dem Kosinus von ϕ_{ee} ändert. Daraus ergibt sich unter Berücksichtigung von Gleichung (36), dass die Echointensität I in Abhängigkeit von t mit ω_{ee} oszilliert. Man findet:

$$I(t) = I_0 \cos(\omega_{ee}(\tau - t)), \quad (37)$$

wobei $I_0(t)$ die Echointensität in Abwesenheit von Elektron-Elektron-Kopplungen ist. Die abstands- und orientierungsabhängige Elektron-Elektron-Kopplung ist durch

$$\omega_{ee} = \omega_{dd}(3 \cos^2 \Theta - 1) + J \quad (38)$$

mit

$$\omega_{dd} = \frac{g_A g_B \mu_B^2 \mu_0}{4\pi \hbar} \frac{1}{r^3} \quad (39)$$

gegeben, wobei g_A und g_B die g-Werte der beiden Elektronen sind, μ_B ist das Bohr'sche Magneton, r ist der Abstand zwischen den Elektronenspins und Θ ist der Winkel zwischen dem Abstandsvektor \vec{r} und dem statischen Magnetfeld \vec{B}_0 ^[129]. Mittels einer Kosinus-Fourier-Transformation von $I(t)$ erhält man ein *Pake Pattern*, aus dem sich gemäß Abbildung 20 ω_{dd} und J bestimmen lassen^[130,128].

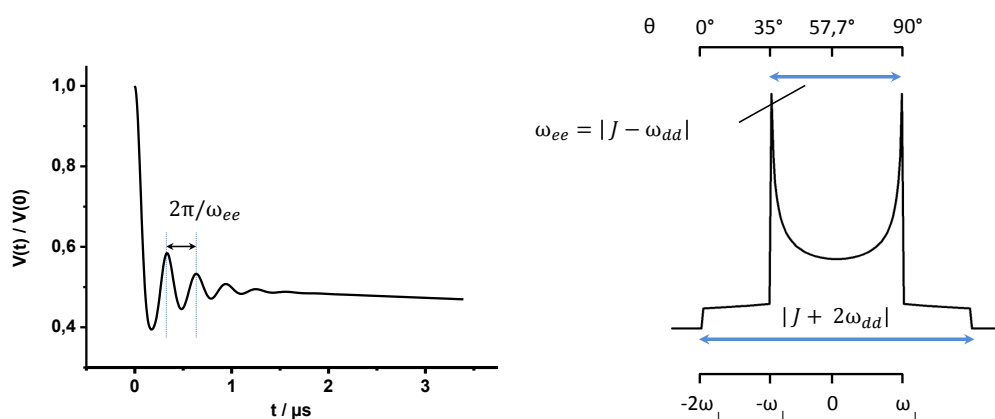


Abbildung 20: Simuliertes DEER-Spektrum mit einer Oszillationsfrequenz $2\pi/\omega_{ee}$ (links). Simuliertes Pake Pattern für eine makroskopisch isotrope Orientierung des Abstandsvektors \vec{r} (rechts).

Im Allgemeinen setzt sich das Signal $V(t)$ eines Doppel-Elektronen-Elektronen-Resonanz (DEER) Experiments aus einem exponentiell abfallenden intermolekularen Teil $B(t)$ (*Hintergrundfaktor*) und einem periodisch oszillierenden intramolekularen Teil $F(t)$ (*Formfaktor*) zusammen^[131,132]:

$$V(t) = F(t)B(t) \quad (40)$$

Wie oben gezeigt, resultiert die Modulation von $F(t)$ aus der Änderung der Signalintensität einer Spinspezies A (*Observer spins*) in Abhängigkeit von dem Zustand einer dipolar gekoppelten Spinspezies B (*Pump spins*). $V(t)$ stellt dabei eine messbare Größe dar, die mit Hilfe eines 4-Puls DEER-Experimentes zugänglich gemacht wird^[128,133,134].

Gleichung (37) beschreibt den Verlauf einer DEER-Kurve unter der Annahme, dass ein isoliertes Spinpaar vorliegt und alle B-Spins von dem ELDOR-Puls invertiert werden. In der Praxis

treffen die beiden Idealisierungen nicht zu und man findet stattdessen ein DEER-Signal mit

$$V(t) = \underbrace{\exp(-kCF_B|\tau - t|)}_{B(t)} \underbrace{\left[1 - \int_0^{\pi/2} \lambda(1 - \cos(\omega_{ee}|\tau - t|) \sin \Theta d\Theta) \right]}_{F(t)}, \quad (41)$$

wobei k eine Konstante, C die Spinkonzentration, λ die Modulationstiefe und F_B die Fraktion der B -Spins ist, die von dem ELDOR-Puls invertiert wurde^[135,98]. Für gewöhnlich muss $V(t)$ bei der Auswertung in den Formfaktor $F(t)$ und den Hintergrundfaktor $B(t)$ separiert werden^[136].

Mit einem 4-Puls-DEER Experiment sind Abstandsmessungen zwischen 1,5 nm zirka 10 nm möglich^[137,138]. Die untere Detektionsgrenze bei 1,5 nm wird von der Anregungsbandbreite der Pulse festgelegt, da bei einer großen Aufspaltung ω_{ee} das Dublett $\pm \frac{1}{2}\omega_{ee}$ nicht mehr gleichzeitig angeregt werden kann^[139]. Die obere Detektionsgrenze wird durch den Zerfall des Echsignals mit der Zeitkonstanten T_2 bestimmt.

b.) DEER-Datenanalyse mit Tikhonov-Regularisierung: Aus dem letzten Abschnitt ging hervor, dass die Orientierungsabhängigkeit der Kopplungsfrequenz ω_{ee} mit einem Pake Pattern beschrieben werden kann. Liegt eine Abstandsverteilung $P(t)$ vor, erhält man eine Überlagerung vieler Pake Pattern, deren Linienform dem jeweiligen Abstand r entspricht. Die Abstandsverteilung $P(t)$ lässt sich dann über eine Funktion F_{theor} bestimmen, die an den experimentellen Formfaktor F_{exp} angefitet wird. Es gilt^[106,136]:

$$F_{theor}(t) = P(r)K(t, r) = P(r) \int_0^1 \cos[(3x^2 - 1)\omega_{ee}t] dx, \quad (42)$$

Die Berechnung von $P(t)$ aus F_{theor} erweist sich jedoch als schwierig, da bereits kleinste Störungen des Formfaktors, wie z. B. durch Rauschen, eine große Änderung der Abstandsverteilung zur Folge haben. Das Problem liegt darin begründet, dass in der Zeitdomäne der Beitrag eines Abstands r durch die zwei Beiträge $r + \Delta r$ und $r - \Delta r$ kompensiert werden kann. Dem kann abgeholfen werden, indem man einen Kompromiss zwischen der Gleichmässigkeit („Glätte“) der Abstandsverteilung η und der Qualität des Formfaktor-Fits ρ einget. Die beiden Parameter sind wie folgt definiert^[136]:

$$\eta = \left\| \left\| \frac{d^2}{r^2} P(r) \right\| \right\|^2 \quad \text{und} \quad \rho = \|F_{theor} - F_{exp}\|^2, \quad (43)$$

wobei η die zweite Ableitung der Abstandsverteilung zum Quadrat und ρ die mittlere quadratische Abweichung zwischen dem theoretischen und dem experimentellen Formfaktor ist. Der optimale Kompromiss zwischen ρ und η kann durch Minimieren der Zielfunktion $G_\alpha(P)$, mit

$$G_\alpha(P) = \rho + \alpha\eta \quad (44)$$

gefunden werden, wobei α ein *Regularisierungsparameter* ist^[106]. Die Linienform der Abstandsverteilung ist dabei sehr stark von der Wahl des α -Parameters abhängig: Für sehr kleine α -Parameter wird auch η in Gleichung (44) klein und man erhält eine ungeglättete Abstandsverteilung mit Rauschartefakten (*undersmoothing*), während man für große α -Parameter eine überglättete Abstandsverteilung erhält (*oversmoothing*)^[136]. Der optimale α -Parameter kann gefunden werden, indem man gemäß dem L-Kurven-Kriterium^[140] $\log \eta(\alpha)$ gegen $\log \rho(\alpha)$ aufträgt und den α -Wert des Eckpunkts ermittelt (Abbildung 21). Dieses Verfahren wird auch als *Tikhonov-Regularisierung* bezeichnet^[141,140,142,143].

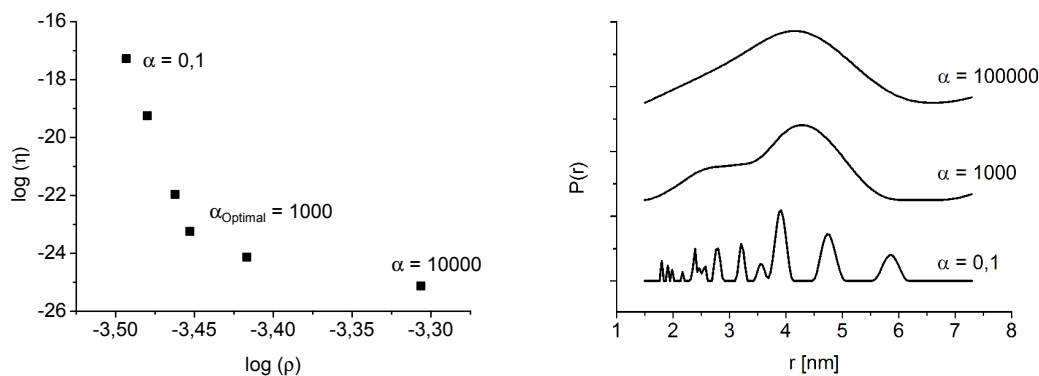


Abbildung 21: Optimierung des Regularisierungsparameters α mit einer Tikhonov-Regularisierung. Der optimale Regularisierungsparameter entspricht dem Eckpunkt zwischen *undersmoothing* (kleine α) und *oversmoothing* (große α) (links). Abstandsverteilungen für $\alpha = 0,1$, $\alpha = 1000$ und $\alpha = 10000$ (rechts)^[144].

4 Experimentelle Details

4.1 Synthese nitroxidmarkierter GlcNAc-Derivate

Die Synthesen wurden von M.Sc. B. Nägele und M.Sc. T. Seitz durchgeführt.

Synthese des azidsubstituierten Glycosylcarbonat 8: Ausgehend von N-Acetylglucosamin (**4**) wurde die primäre Hydroxylgruppe selektiv tosyliert und anschließend mit Essigsäureanhydrid peracetyliert (**5**). Nach Zugabe von Natriumazid wurde die Tosylgruppe durch ein Azid ausgetauscht (**6**) und im folgenden Schritt mittels Ethylendiamin das anomere Zentrum selektiv entschützt (**7**). Die Umsetzung von **7** mit Chlorameisensäure-4-nitrophenylester ergab schließlich das Glycosylcarbonat **8** (Abbildung 22).

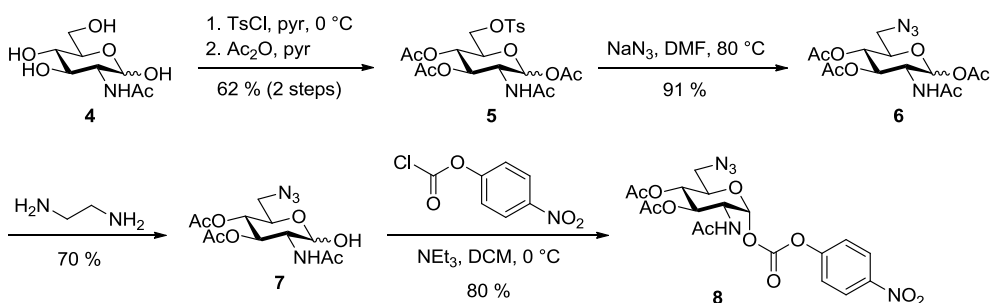


Abbildung 22: Synthese des Glycosylcarbonat **8**.

Synthese des einfach spinmarkierten Liganden 3₁: Bei der Synthese des einfach spinmarkierten Liganden **3₁** wurde im ersten Schritt das Glycosylcarbonat **8** mit Propylamin zum Glycosylcarbamat **21** umgesetzt. Anschließend wurde die Verbindung **21** mit Natriummethanolat deacetyliert, das Azid mit H₂/Pd-C zum Amin reduziert und das Reaktionsprodukt mit dem Aktivester **16** zu dem einfach spinmarkierten Liganden **3₁** umgesetzt (Abbildung 23).

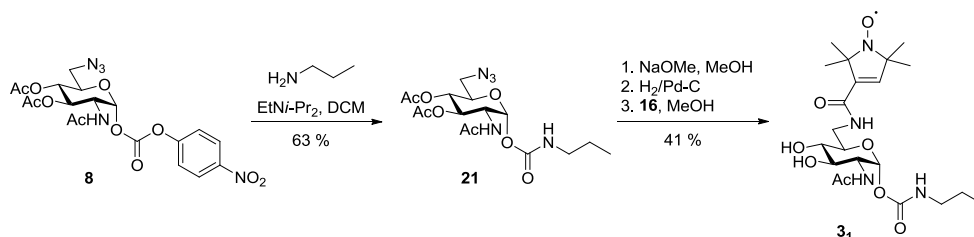


Abbildung 23: Synthese der einfach spinmarkierten Liganden **3₁**.

Synthese der einfach spinmarkierten Liganden **1₁ und **2**₁:** Für die Darstellung der einfach spinmarkierten Liganden **1**₁ und **2**₁ wurde zunächst das Glycosylcarbonat **9**^[8] mit den mono Boc-geschützten Diaminen **10** und **11** verknüpft, wobei die Carbamate **12** und **13** gebildet wurden. Die Boc-Schutzgruppe wurde durch Zugabe von Trifluoressigsäure entfernt und das entschützte Amin an das Glycosylcarbonat **8** gekoppelt (**14** und **15**). Anschließend wurden die Produkte **14** und **15** unter Verwendung von Natriummethanolat deacetyliert und das Azid mittels H₂/Pd zum Amin reduziert. Im letzten Schritt wurde das Nitroxid über den Aktivester **16**^[145] mit dem Amin vergekuppelt und die einfach spinmarkierten GlcNAc-Derivate **1**₁ und **2**₁ erhalten (Abbildung 24).

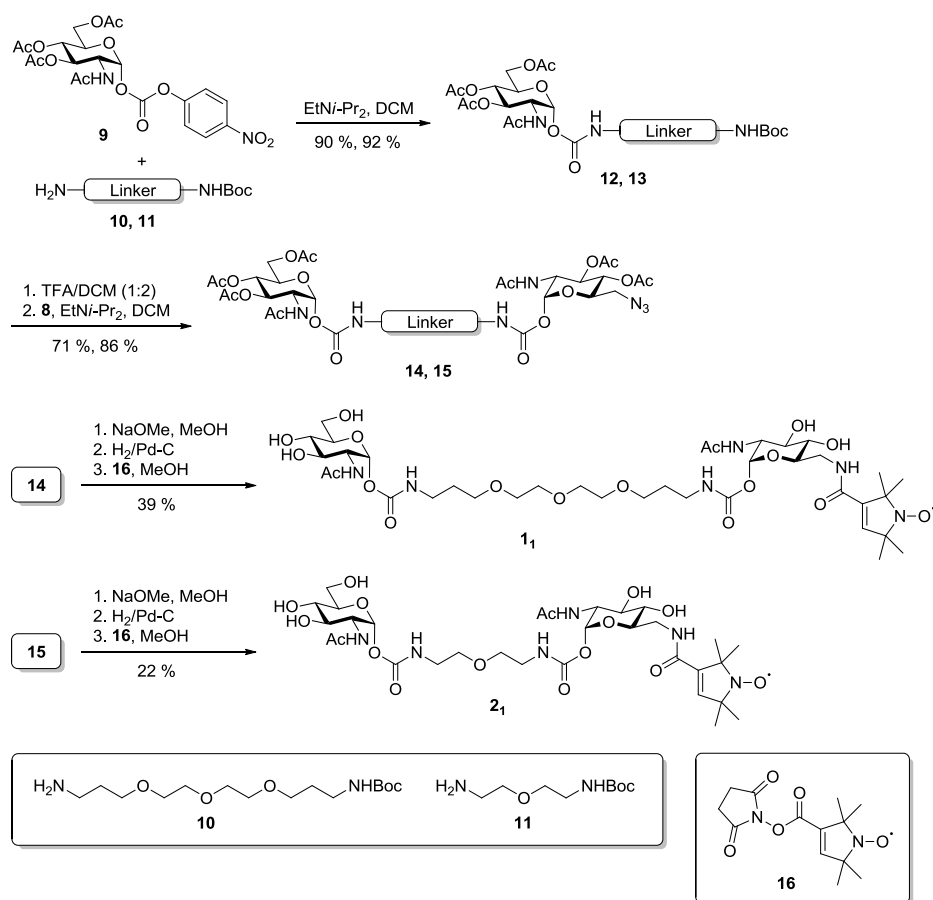


Abbildung 24: Synthese der einfach spinmarkierten Liganden **1**₁ und **2**₁.

Synthese der zweifach spinmarkierten Liganden **1₂ und **2₂**:** Für die Darstellung der zweifach spinmarkierten Liganden **1₂** und **2₂** wurde das Glycosylcarbonat **8** mit den Diaminen **17** und **18** verknüpft und anschließend die Reaktionsprodukte **19** und **20** mit Natriumazid de-O-acetyliert. Im nächsten Schritt wurde das Azid zum Amin reduziert und das Produkt mit dem Aktivester **16** zu **1₂** und **2₂** umgesetzt (Abbildung 25).

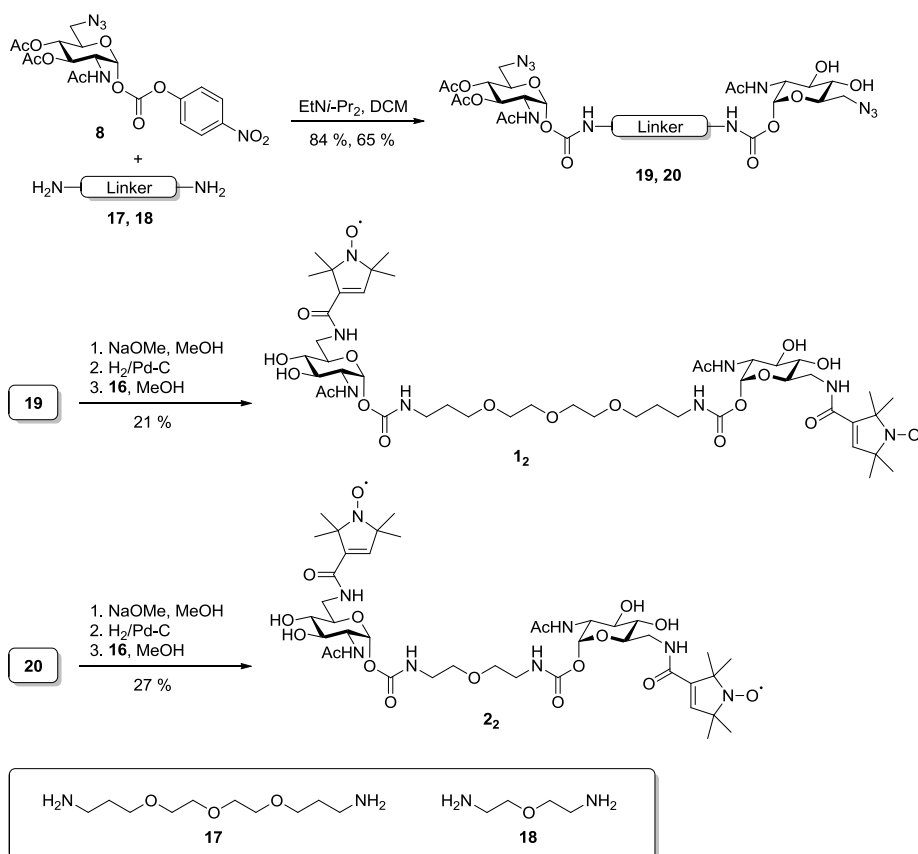


Abbildung 25: Synthese der zweifach spinmarkierten Liganden **1₂** und **2₂**.

Synthese der linkermarkierten Liganden 23 und 24: Ausgehend von dem Glycosylcarbonat **9** wurden nach Zugabe der mono Boc-geschützten Diamine **10** und **11** die Carbamate **21** und **22** erhalten. Anschließend wurde durch eine Säurehydrolyse mit Trifluoressigsäure das Amin entschützt und das Nitroxidderivat über eine Reaktion mit **16** an den Linker geknüpft. Man erhält direkt die linkermarkierten Liganden **23** und **24** (Abbildung 26).

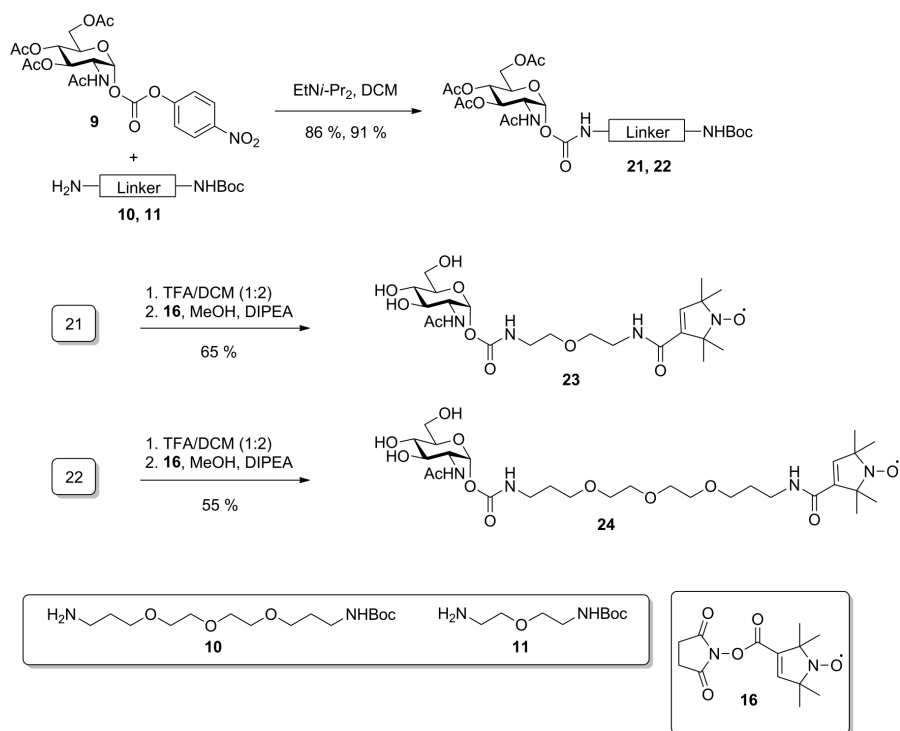


Abbildung 26: Synthese der linkermarkierten Liganden **23** und **24**.

4.2 EPR Messungen

a.) Probenpräparation: Zur Herstellung der ESR-Proben in **Kapitel 5** wurden zunächst 100 μM Stammlösungen der Liganden **1₁**, **1₂**, **2₁**, **2₂** und **3₁** hergestellt. Dazu wurde eine auf hundertstel Milligramm genau abgewogene Menge Ligand in ein Eppendorfgefäß überführt und mit einem berechneten Volumen Reinstwasser (Milli-Q) aufgefüllt. In der folgenden Tabelle sind die molaren Massen der Liganden aufgeführt:

Ligand	molare Masse [$\frac{\text{g}}{\text{mol}}$]
1₁	878,41
1₂	1043,52
2₁	762,76
2₂	927,97
3₁	471,52
23	517,55
24	633,71

Tabelle 1: Molare Massen der Liganden **1₁**, **1₂**, **2₁**, **2₂**, **3₁**, **23** und **24**.

Zur Herstellung der Proben mit den Ligand/Protein-Mischungsverhältnissen 7 : 1, 4 : 1, 1 : 1 und 1 : 8, wurde eine auf hundertstel Milligramm genau abgewogene Menge an WGA ($M(\text{WGA}) = 36000 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$, lyophilisiert, Sigma Aldrich) in 50 μl Reinstwasser gelöst und mit 50 μl Liganden-Stammlösung (100 μM) versetzt. Die Ligandenkonzentration der ESR-Proben betrug damit 50 μM . Für die Tieftemperaturmessungen wurden zusätzlich 30 Vol-% Glycerin (> 99,5%, p. a., Roth) zugegeben und eine Endkonzentration des Liganden von 33 μM erreicht.

In **Kapitel 6** wurde zur Präparation der Proben **23** und **24** mit dem Ligand/Protein-Mischungsverhältnis von 1 : 8 zunächst eine 100 μM Stammlösung hergestellt. Anschließend wurde eine auf hundertstel Milligramm genau abgewogene Menge an WGA in 50 μl Reinstwasser gelöst und mit 50 μl Liganden-Stammlösung versetzt. Die Ligandenkonzentration der ESR-Proben betrug damit 50 μM .

Zur Herstellung der Proben mit den Ligand/WGA-Verhältnissen 1 : 1, 2 : 1, 4 : 1, 6 : 1, 8 : 1, 12 : 1, und 16 : 1 wurde zunächst eine 50 μM WGA-Stammlösung angesetzt, indem 0,875 mg WGA in 500 μl Reinstwasser gelöst wurde. Zusätzlich wurden zwei 100 μM Stammlösungen der Liganden **1₁** und **2₁** hergestellt. Um die Ligand/WGA-Mischungsverhältnisse möglichst genau einzustellen, wurden aus *derselben* Liganden-Stammlösung Aliquote in ein Eppendorfgefäß pipet-

tiert, über Nacht lyophilisiert und die Rückstände in 50 μM WGA Stammlösung aufgenommen. In der folgenden Tabelle sind die Aliquote für die jeweiligen Mischungsverhältnisse aufgeführt:

Ligand : WGA	1 : 1	2 : 1	4 : 1	6 : 1	8 : 1	12 : 1	16 : 1
Stammlösung 1 ₁ [μl]	25	/	100	150	200	300	400
Stammlösung 2 ₁ [μl]	25	50	100	150	200	300	/

Tabelle 2: Aliquote einer 100 μM Liganden-Stammlösung, um Proben mit unterschiedlichem Ligand/WGA-Verhältnis herzustellen.

Alle Messproben ($V = 50 \mu\text{l}$) wurden anschließend mit 20 μl Glycerin ($\approx 28 \%$ vol/vol) versetzt, mit einem Vortexer homogenisiert und in die Probenröhrchen überführt.

Die Tieftemperaturmessungen bei 120 K erfolgten mit 3 mm Probenröhrchen (Bruker ER221 Tub/2), die vor dem Einbau in das Spektrometer mit flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden, um die sich im Gleichgewicht befindlichen Konformationen zu konservieren. Für die Messungen bei Raumtemperatur wurden entweder 1 mm (X-Band Messungen) oder 0,5 mm (Q-Band Messungen) Kapillaren verwendet.

b.) Versuchsdurchführung: Die cw-ESR-Messungen im X-Band wurden entweder an einem MiniScope Spektrometer (MS200, Magnetech GmbH) mit Temperaturregulierung (Temperatur Controller TC-H02, Magnetech GmbH) oder an einem ELEXSYS E580 Spektrometer (Bruker BioSpin), mit ELEXSYS Super High Sensivity Resonator (Bruker BioSpin), Heliumstromkühlung (ESR 900, Oxford Instruments) und Temperaturregelung (ITC5035, Oxford Instruments) durchgeführt. Für die cw-ESR Messungen im Q-Band wurde ein ELEXSYS E580 Spektrometer mit Heliumkryostaten (CF935, Oxford Instruments) und Q-Band-Resonator (EN 5107 D2, Bruker BioSpin) verwendet. Vor jeder Messung die optimale Modulationsamplitude und Mikrowellenleistung bestimmt, um eine unverfälschte Linienform des Spektrums zu gewährleisten.

Die DEER-Experimente im X-Band wurden an einem ELEXSYS E580 Spektrometer mit MS-3 Split-Ring Resonator (ER 4118X-MS3, Bruker BioSpin) und Heliumkryostaten (CF935, Oxford Instruments) bei 40 K durchgeführt. Die Trägerfrequenz ν_{pump} des Pumpimpulses (Pulslänge 12 ns) und das Magnetfeld wurden so abgestimmt, dass die Pumpfrequenz mit der Resonatorfrequenz übereinstimmte und die maximale Absorptionsbande des Nitroxidspektrums von dem Pumpimpuls angeregt wurde. Für die Observerfrequenz ν_{obs} wurde ein Wert eingestellt, der 70 MHz überhalb der Pumpfrequenz lag. Die Pulslängen 16 ns und 32 ns entsprachen einem Flipwinkel von $\pi/2$

bzw. π und der erste Observerpuls durchlief einen $(+x)-(-x)$ Phasenzzyklus. Das Pulsprogramm ist durch: $(\pi/2)_{\text{obs}} - \tau_1 - (\pi)_{\text{obs}} - t - (\pi)_{\text{pump}} - (\tau_1 + \tau_2 - t) - \pi_{\text{obs}} - \tau_2 - \text{Echo}$ gegeben. Zur Unterdrückung von Kermodulationen wurde die τ_1 -Zeit ab $\tau_1 = 200$ ns zehnmal um 8 ns inkrementiert und die resultierenden DEER-Kurven aufaddiert. Die Akkumulationszeit einer DEER-Messung betrug üblicherweise 10 h.

c.) Datenauswertung: In Kapitel 5 wurden die Rotationskorrelationszeiten aus den Linienformen der cw-ESR-Messungen bei Raumtemperatur abgeschätzt. Dazu wurde die „Peak-zu-Peak“-Linienbreite und das relative Verhältnis der Signalintensitäten gemäß der Kivelson-Gleichung mit:

$$\tau_c = 6,6 \cdot 10^{-10} \cdot W_0 \left[\left(\frac{h_0}{h_{-1}} \right)^{\frac{1}{2}} + \left(\frac{h_0}{h_{+1}} \right)^{\frac{1}{2}} - 2 \right] \quad (45)$$

ausgewertet, wobei W_0 die „Peak-zu-Peak“-Linienbreite des Mittelfeldpeaks und h_{-1} , h_0 und h_{+1} die Intensität des Tief-, Mittel-, und Hochfeldpeaks ist^[146].

Um die dipolare Verbreiterung der Tieftemperatur-cw-ESR-Messungen abzuschätzen, wurde die Differenz der zweiten Momente $\langle \Delta \Delta B^2 \rangle$ eines verbreiterten $\langle \Delta B_2^2 \rangle$ und eines unverbreiterten Spektrums $\langle \Delta B_1^2 \rangle$ berechnet. Dazu wurden die cw-ESR-Spektren eines zweifach markierten Liganden S_2' und eines einfach markierten Liganden S_1' aufgenommen und $\langle \Delta \Delta B^2 \rangle$ mit der folgenden Gleichung bestimmt^[147]:

$$\begin{aligned} \langle \Delta \Delta B^2 \rangle &= \langle \Delta B_2^2 \rangle - \langle \Delta B_1^2 \rangle \\ &= \frac{\int (B - B_{F2})^2 S_2(B) dB}{\int S_2(B) dB} - \frac{\int (B - B_{F1})^2 S_1(B) dB}{\int S_1(B) dB}, \end{aligned} \quad (46)$$

wobei S_2 und S_1 die Absorptionsspektren von S_2' und S_1' sind. B_{F2} und B_{F1} sind die ersten Momente und B ist der Magnetfeldwert.

Die Ermittlung der Abstandsverteilungen aus den dipolaren Entwicklungen und die Validierung der Abstandsverteilungen erfolgte mit dem Softwarepaket DEERAnalysis2009^[148,149]. Zur Identifizierung der Artefakte in der DEER-Abstandsverteilung von $\mathbf{1}_2$ bei einem Ligand/WGA-Verhältnis von 1 : 8 und den Abstandsverteilungen von $\mathbf{1}_2$ bzw. $\mathbf{2}_2$ in Abwesenheit von WGA, wurden die Daten mit der *Suppress*-Funktion in DEERAnalysis2009 eingehend untersucht. Wann immer möglich, wurde die Auswertung der DEER-Spektren mit einer experimentell bestimmten Hintergrundfunktion $B(t)$ durchgeführt. Die Abstandsverteilungen wurden mit Hilfe der modellfreien Tikhonov-Regularisierung erhalten^[141].

In Kapitel 6 erfolgte die Anpassung der simulierten Spektren an das experimentelle cw-ESR Spektrum durch einen nichtlinearen Algorithmus, basierend auf der Methode der kleinsten Fehlerquadrate. Über Linienformanalysen mit der Matlab Toolbox EasySpin 4.0.0^[121] konnten die Hyperfeinwechselwirkung (A), Linienbreite (lw), Rotationskorrelationszeit (τ) und die Orientierungsparameter (λ) ermittelt werden, die g-Werte wurden aus der Literatur übernommen^[150].

Die Zwei-Frequenz-Simulationen der X- und Q-Band cw-ESR-Spektren erfolgten mit einem von Martin Spitzbarth geschriebenen MATLAB-Skript, das die Parameter entweder simultan oder für jedes Spektrum separat anpassen konnte. Für die Fehlergewichtung der X- und Q-Band Spektren wurde ein Verhältnis von 1 : 1 gewählt, da die spektralen Breiten der Spektren kaum einen Unterschied aufwiesen.

5 Mechanistische Untersuchung multivalenter Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen

5.1 Aufgabenstellung

In der kürzlich erschienenen Arbeit von Schwefel *et al.*^[8] gelang es, überbrückendes Binden multivalenter GlcNAc-Derivate an WGA-Dimer röntgenkristallographisch zu charakterisieren. Die Kristallstrukturanalyse ergab, dass bis zu vier Moleküle des divalenten Liganden **1** (Abbildung 33) an die benachbarten GlcNAc-Bindungsstellen B1C2 – C2B1, B2C1 – C1B2, A1 – D2A1 und A2 – D1A2 gleichzeitig binden können. Weitere Untersuchungen der Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen mit enzymgekoppelten Lektinbindungstests lieferten für den divalenten Liganden **1** eine sehr hohe Bindungsaffinität ($IC_{50} = 57 \mu M$), während der divalente Ligand **2** mit dem kürzeren Linker zwischen den GlcNAc-Resten ($IC_{50} = 734 \mu M$) und der monovalente Ligand **3** ($IC_{50} = 8mM$) weitaus geringere Bindungsaffinitäten aufwiesen.

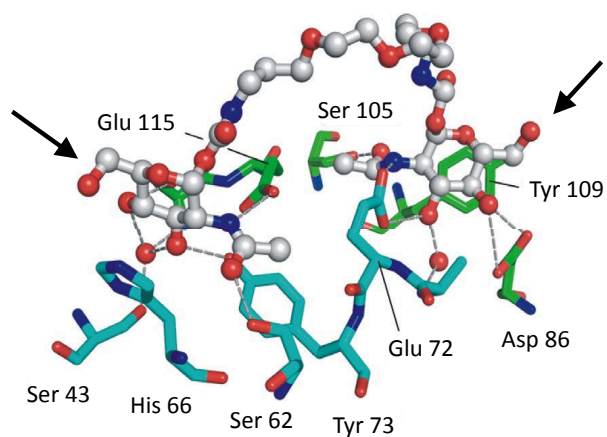


Abbildung 27: Kristallstruktur des Komplexes **1** und WGA (PDB-Code: 2X52)^[8]. Der Ligand **1** ist in einer Kugel-Stab-Schreibweise dargestellt, wobei Kohlenstoffatome weiß, Stickstoffatome blau und Sauerstoffatome rot markiert sind. Die interagierenden Aminosäurereste der beiden WGA-Untereinheiten sind grün bzw. türkis gefärbt. Aufgrund ihrer exponierten Lage eignen sich besonders die C6-Positionen der GlcNAc-Reste zur Anbringung der Spinmarker. Die C6-Positionen sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Die unterschiedlichen IC_{50} -Werte machten deutlich, dass neben der chemischen und sterischen Beschaffenheit der Bindungspartner sowohl die Geometrie des Linker als auch die Valenz der Liganden einen großen Einfluss auf die Bindungsaffinität ausübt. Zur Erklärung der erhöhten

Bindungsaffinität des divalenten Liganden **1** wurde das chelatisierende Binden an benachbarten Bindungsstellen vorgeschlagen. Dieser Mechanismus ist auch als Chelateffekt bekannt^[7].

Es ist inzwischen unbestritten, dass die Kristallstruktur eines Biomakromoleküls nicht zwangsläufig der Struktur in Lösung entspricht^[151,9] und auch der Bindungsmechanismus einer Kohlenhydrat-Protein-Komplexierung kann sich bei nicht-physiologischen Bedingungen, wie z. B. in einer dichten Kristallpackung, verändern. Aus diesem Grund sind Methoden, die eine Untersuchung biologischer Systeme in Lösung ermöglichen von großer Bedeutung.

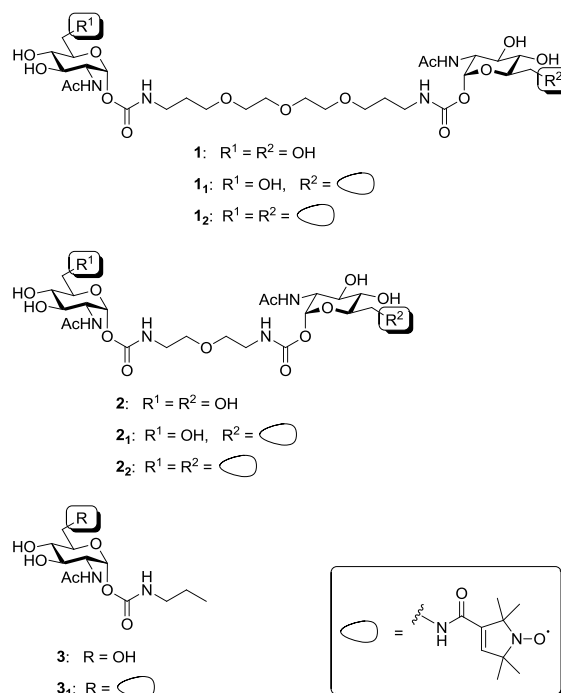


Abbildung 28: Strukturformeln der mono- und divalenten GlcNAc-Derivate ohne (**1**, **2**, **3**), mit einfacher (**1₁**, **2₁**, **3₁**) und mit zweifacher (**1₂**, **2₂**) Spinmarkierung.

Im folgenden Abschnitt wird zum ersten Mal gezeigt, dass ESR-Spektroskopie an spinmarkierten Liganden bestens geeignet ist, um sowohl Ligand-Protein-Interaktionen, als auch Bindungsmechanismen in gefrorener Lösung zu untersuchen. Tieftemperatur-cw-ESR und Zweifrequenz-Puls-ESR-Experimente ergänzen sich ideal, da sich mit diesen Methoden Abstandsmessungen zwischen Spinmarkern in einem kürzeren (0,8 nm - 2,0 nm) und in einem längeren Messbereich (1,5 nm - 10 nm) durchführen lassen^[137,138,133]. Eine Kombination beider Methoden lässt sich bei einer geeigneten Markierungsstrategie dafür nutzen, um Informationen über die Konformation oder den Bindungsmodus der Liganden zu erlangen. Zusätzlich kann mit Hilfe von cw-ESR-

Messungen bei Raumtemperatur die rotatorische Beweglichkeit der Spinmarkierung bestimmt und eine Aussage bezüglich des Bindungszustands der Liganden getroffen werden.

Zur Durchführung einer unverfälschten und aussagekräftigen ESR-Studie muss gewährleistet sein, dass durch das Anbringen der Spinmarker sowohl die Beweglichkeit des Liganden, als auch die Interaktion zwischen Ligand und Protein so wenig wie möglich beeinträchtigt wird. Gemäß der Kristallstruktur des Komplexes WGA und **1** (PDB-Code: 2X52)^[8] eignet sich besonders die C6-Position der GlcNAc-Reste zur Anbringung der Spinmarker, da sie sich nicht an der Bindung zum Protein beteiligt (Abbildung 27). Als verknüpfende Einheit zwischen dem C6-Atom des GlcNAc-Rests und der Nitroxid-Spinsonde wurde eine Amidbindung gewählt, da sie aufgrund mesomerer Grenzstrukturen eine hohe Stabilität aufweist. In Abbildung 28 sind die Strukturformeln der einfach (**1₁**, **2₁**, **3₁**) und zweifach (**1₂**, **2₂**) spinmarkierten Analoga von **1**, **2** und **3** aufgeführt.

5.2 ESR-Experimente

Die Mobilitätsmessung an einfach spinmarkierten Liganden **1₁** ohne Zusatz von WGA ergab ein für schnell rotierende Nitroxide typisches Dreilinienspektrum, dessen Tief-, Mittel-, und Hochfeldpeaks annähernd gleiche Intensitäten und schmale Linienbreiten aufweisen (Abbildung 29 A, unten). Eine solche Linienform ist charakteristisch für kleine Moleküle, die sich gemäß isotroper brownischer Molekularbewegung ungehindert in Lösung bewegen und deren rotatorische Diffusion nicht durch Wechselwirkungen mit einem Biomakromolekül verlangsamt wird.

Neben der vollständigen Beschreibung eines cw-ESR-Spektrums mit Hilfe von spektraler Simulation besteht zusätzlich die Möglichkeit, die Rotationsgeschwindigkeit der Nitroxide über eine Auswertung der „Peak-zu-Peak“-Linienbreite und dem relativen Verhältnis der Signalintensitäten quantitativ abzuschätzen (Kivelson-Gleichung (45)). Diese Methode ist für cw-ESR-Spektren mit äquidistanten Abständen zwischen den drei Nulldurchgängen (*schnelles Regime*) gut geeignet, um eine Veränderungen der Ligandenmobilität infolge einer Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkung zu analysieren. Aus diesem Grund wurde sie zur Auswertung der Rotationskorrelationszeiten aller Mobilitätsmessungen in diesem Kapitel verwendet. Die Auswertung der Mobilitätsmessung von **1₁** in Abwesenheit von WGA nach (45) ergab mit $\tau_c = 120$ ps einen Wert, den man für ein Molekül dieser Größe erwartet hätte: Nimmt man für den Radius r dieses Moleküls $r = 0,9$ nm (siehe DEER-Abstandsmessung in Abbildung 30 B, unten) und für die Viskosität η bei $T = 293,15$ K einen Wert von $\eta = 0,001$ Pa·s an, erhält man gemäß der Gleichung^[100]:

$$\tau_c = \frac{4\pi\eta r^3}{3k_B T}, \quad (47)$$

eine Rotationskorrelationszeit τ_c , die weniger als eine Größenordnung von $\tau_c = 120$ ps abweicht.

Das hintergrundkorrigierte und normierte DEER-Spektrum von $\mathbf{1}_2$ ohne Protein weist mit $\lambda = 0,4$ eine für diese Messbedingungen annähernd optimale Modulationstiefe auf (Abbildung 30 A, unten). Durch die hohe Modulationstiefe konnte die Aufnahme der dipolaren Entwicklung mit hohen Sensitivität erfolgen. Die Auswertung des DEER-Experiments mit einer Tikhonov-Regularisierung lieferte eine breite Abstandsverteilung mit einem Maximum bei 1,8 nm (Abbildung 30 B, unten). Größere Abstände mit $r > 3$ nm weisen sehr geringe Intensitäten auf. Diese Abstände konnten mittels einer Validierung der Abstandsverteilung mit DEERAnalysis2009 als Artefakte identifiziert werden (Abbildung A67).

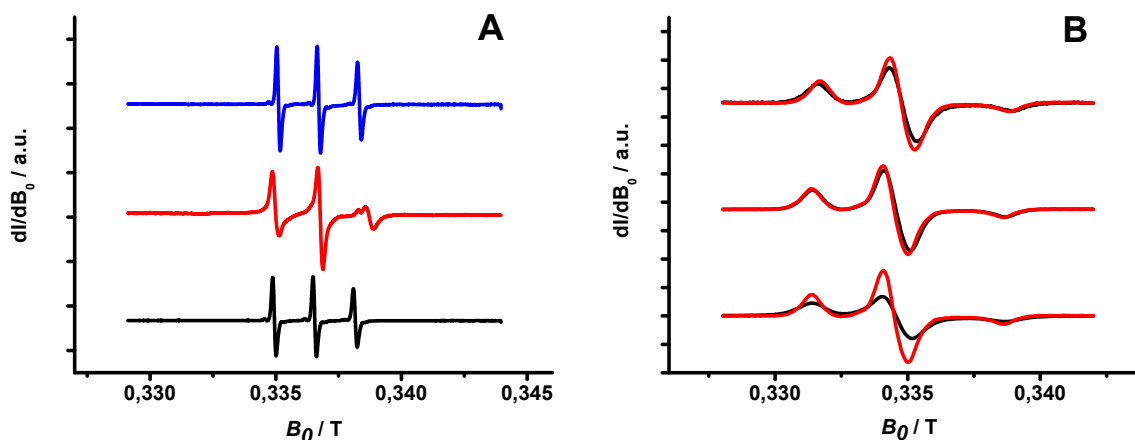


Abbildung 29: **A:** Cw-ESR-Spektren von $\mathbf{1}_1$ bei $T = 295$ K. Unten: Spektrum in Abwesenheit von WGA mit einer Rotationskorrelationszeit von 120 ps. Mitte: Spektrum bei einem WGA/Ligand-Verhältnis von 8 : 1 mit einer deutlich verlangsamten Rotationskorrelationszeit von 1,8 ns. Die verringerte rotatorische Diffusion spricht für eine quantitative Proteinbindung des Liganden. Oben: Spektrum bei einem WGA/Ligand-Verhältnis von 1 : 4. Die breiten Linien des gebundenen Liganden werden von dem Signal der ungebundenen Liganden überlagert. Für dieses Spektrum wurde eine effektive Rotationskorrelationszeit von 160 ps ermittelt.

B: Vergleich der cw-ESR-Spektren ($T = 120$ K) eines einfach ($\mathbf{1}_1$, rot) und zweifach ($\mathbf{1}_2$, schwarz) markierten Liganden in Abwesenheit von WGA (unten), bei einem WGA/Ligand-Verhältnis von 8 : 1 (Mitte) und bei einem WGA/Ligand-Verhältnis von 1 : 4 (oben). Das Spektrum des doppelt markierten Liganden $\mathbf{1}_2$ ohne Protein weist eine signifikante dipolare Verbreiterung auf, die auf Spinmarkerabstände unterhalb von 1,5 nm schließen lässt.

Die große Halbwertsbreite der Kurve spiegelt sowohl die hohe Flexibilität des Polyethylenglycol-Linkers zwischen den GlcNAc-Derivaten als auch die Flexibilität der verknüpfenden Einheit zwischen den GlcNAc-Resten und der Nitroxidspinsonde wider, da sie zu vielen Konformationen mit unterschiedlichen Abständen zwischen den Spinmarkern führt. Die vielen Rotations- und Schwingungsfreiheitsgrade von $\mathbf{1}_2$ in Lösung haben also eine breite Verteilung der Abstände zur Folge. Weiterhin ist der Kurve zu entnehmen, dass Abstände bei 1,5 nm mit einer Wahrscheinlichkeit größer Null auftreten. Da sich Abstände kleiner als 1,5 nm aus methodischen Gründen nicht zuverlässig bestimmen ließen, kann bereits eine Extrapolation der Abstandsverteilung einen ersten Hinweis auf signifikante Beiträge unterhalb von 1,5 nm liefern.

Die cw-ESR-Spektroskopie bei tiefen Temperaturen kann als eine zu DEER komplementäre Messtechnik angesehen werden, mit der sich Interspinabstände zwischen 0,8 nm und 2 nm^[152] bestimmen lassen. Anders als bei einer DEER-Messung, lässt sich hier mit einer Dekonvolution die Dipol-Dipol-Wechselwirkung direkt aus einem dipolar verbreiterten Spektrum (zweifach markierte Spezies) und einem dipolar unverbreiterten Referenzspektrum (einfach markierte Spezies) ermitteln, da diese Wechselwirkung bei diesen kleinen Abständen nicht mehr von der inhomogenen Linienbreite überlagert wird. Der Abbildung 29 B, unten ist zu entnehmen, dass sich die Signalintensitäten und Linienbreiten der normierten cw-ESR-Spektren von $\mathbf{1}_1$ (rot) und $\mathbf{1}_2$ (schwarz) in Abwesenheit von WGA deutlich voneinander unterscheiden. Die starke dipolare Verbreiterung der Messung mit dem zweifach markierten Liganden $\mathbf{1}_2$ belegt, dass Interspinabstände unterhalb von 1,5 nm vorliegen. Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit der DEER-Abstandsverteilung in Abbildung 30 B, unten. Auf eine quantitative Auswertung der Linienverbreiterung mit einer Dekonvolution musste allerdings verzichtet werden, da der Algorithmus zur Bestimmung der Abstandsverteilung keine konsistenten Ergebnisse lieferte. Stattdessen wurde die dipolare Verbreiterung über die Differenz der zweiten Momente $\langle \Delta \Delta B^2 \rangle$ des verbreiterten $\langle \Delta B_2^2 \rangle$ und unverbreiterten Spektrums $\langle \Delta B_1^2 \rangle$ ausgewertet, um das Ausmaß der Linienverbreiterungen abschätzen zu können (Gleichung (46)). Der Parameter $\langle \Delta \Delta B^2 \rangle$ steigt dabei mit abnehmendem Interspinabstand an. Die Differenz der zweiten Momente der Festkörperspektren von $\mathbf{1}_2$ und $\mathbf{1}_1$ in Abwesenheit von WGA beträgt $\langle \Delta \Delta B^2 \rangle = 1,8 \cdot 10^{-6} \text{ T}^2$ (Tabelle 3).

Nach Zugabe eines mehrfachen molaren Überschusses an WGA-Dimer, ist statistisch nicht mehr als ein Ligand an das Protein gebunden. Nimmt man an, dass die IC_{50} -Werte der enzymgekoppelten Lektinbindungstests den Dissoziationskonstanten K_D entsprechen, erwartet man bei diesen Bedingungen annähernd quantitatives Binden von **1** ($IC_{50} = 57\mu\text{M}$) an das WGA-Protein. Diese Abschätzung konnte durch eine Mobilitätsmessung an einfach markierten Liganden **1₁**, bei einem Protein/Ligand-Verhältnis von 8 : 1 bestätigt werden (Abbildung 29 A, Mitte): Im Vergleich zu dem cw-ESR-Spektrum des Liganden **1₁** in Lösung (Abbildung 29 A, unten), weisen die Signale eine größere Linienbreite auf und die Intensitäten der drei Linien unterscheiden sich deutlich voneinander. Diese typischen Merkmale langsamer rotatorischer Diffusion lassen bereits auf eine deutlich geringere Mobilität des Liganden schließen. Die Auswertung der relativen Intensitäten des Dreilinienspektrums mit der Kivelson-Gleichung in (45) ergab eine drastisch reduzierte rotatorische Mobilität, die sich mit $\tau_c \approx 1,8$ ns um mehr als eine Größenordnung von der Mobilität der Liganden in Abwesenheit von WGA unterscheidet. Dies lässt auf eine nahezu quantitative Proteinbindung schließen, bei der die Rotationsbewegung des Liganden durch die Wechselwirkungen mit dem WGA-Dimer signifikant verlangsamt wird.

Für die DEER-Messung des zweifach markierten Liganden **1₂** mit WGA-Überschuss (Abbildung 30 A, Mitte) erhält man mit $\lambda = 0,37$ eine etwas geringere Modulationstiefe, als für die Messung **1₂** ohne Ligand (Abbildung 30 A, unten). Allerdings unterscheidet sich bei diesen Bedingungen die resultierende Abstandsverteilung deutlich von jener ohne Zusatz von WGA (Abbildung 30 B, Mitte): Das Maximum der Abstandsverteilung verschiebt sich von 1,8 nm auf 2,3 nm, die Breite der Kurve wird geringer und es kommen keine Abstände mehr unterhalb von 1,5 nm vor. Ein Peak bei $r \approx 4$ nm mit verhältnismäßig geringer Intensität, konnte nach einer ausführlichen Validierung des hintergrundkorrigierten DEER-Spektrums als Artefakt identifiziert werden (Abbildung A68). Diese Befunde sprechen für einen gestreckten Liganden **1₂**, der mit beiden GlcNAc-Resten an benachbarte Bindungsstellen überbrückend bindet. Durch die gleichzeitige Interaktion beider Zuckerreste mit dem WGA wird der Polyethylenglycol-Linker des Liganden gedehnt und infolgedessen in seiner Flexibilität deutlich eingeschränkt. Dementsprechend wird auch der Abstand zwischen den Spinmarkern vergrößert, was eine Verschiebung des Maximums in der Abstandsverteilung um zirka 0,5 nm bewirkt. Die Ligandenbindung spiegelt sich auch in der geringeren Breite der Abstandsverteilung wider, da durch die Fixierung der Zuckerreste nur noch Konformationen mit weniger unterschiedlichen Spinmarkerabständen möglich sind. Ein Großteil der verbliebenen Kurvenbreite ist vermutlich auf die Flexibilität der verknüpfenden Einheit zwischen Zuckerring und Spinmarker zurückzuführen.

Zur Analyse der Abstände unterhalb 1,5 nm wurden Tieftemperatur-cw-ESR-Spektren der Liganden **1₁** und **1₂** mit jeweils achtfachen molaren Überschuss an WGA aufgenommen (Abbildung

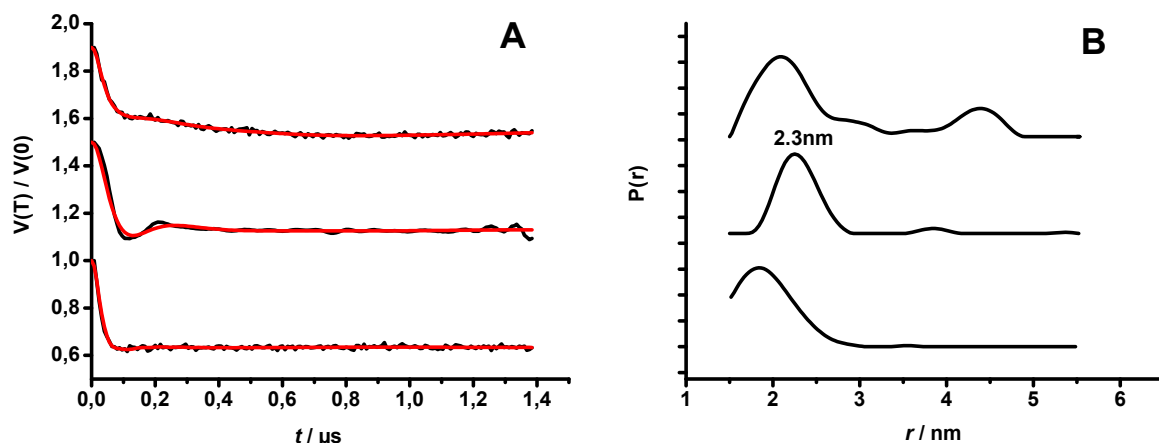


Abbildung 30: **A:** Hintergrundkorrigierte und normierte DEER-Spektren von **1₂** (schwarz) mit Simulation (rot). Die Simulation der dipolaren Entwicklung erfolgte ohne Vorgabe eines Modells mit einer Tikhonov-Regularisierung. Unten: Ligand in Abwesenheit von WGA. Mitte: WGA/Ligand-Verhältnis von 8 : 1 (Kurve um 0,5 nach oben versetzt). Oben: WGA/Ligand-Verhältnis von 1 : 4 (Kurve um 0,9 nach oben versetzt).

B: DEER-Abstandsverteilungen von **1₂**, die nach einer Auswertung der dipolaren Entwicklungen in **A** erhalten wurden. Unten: Ligand in Abwesenheit von WGA. Mitte: WGA/Ligand-Verhältnis von 8 : 1. Oben: WGA/Ligand-Verhältnis von 1 : 4. Der Peak bei 2,3 nm (Mitte) entspricht der Distanz zwischen den Spinmarkierungen des überbrückend bindenden Liganden **1₂**. Die Peaks bei Abständen größer als 2,3 nm (oben) konnten Abständen zwischen Spinmarkern verschiedener Liganden, die an dasselbe WGA-Dimer gebunden sind, zugeordnet werden.

29 B, Mitte). Da sich die Linienformen des einfach- und zweifach markierten Liganden nur unwesentlich voneinander unterscheiden, kann man größere Populationen mit Spinsondenabständen kleiner als 1,5 nm ausschließen. Eine quantitative Auswertung der dipolaren Linienverbreiterung ergab mit $\langle \Delta \Delta B^2 \rangle = 0,1 \cdot 10^{-6} \text{ T}^2$ einen Wert, der im Vergleich zu den Messungen ohne WGA um mehr als eine Größenordnung kleiner ist (Tabelle 3). Aufgrund der geringen Differenz der zweiten Momente und der nahezu kongruenten Linienform der Festkörperspektren, kann eine Annäherung der Spinsonden auf $r < 1,5 \text{ nm}$, nach einer Bindung an die Proteinoberfläche, praktisch ausgeschlossen werden.

Es sprechen somit alle ESR-Daten für einen gestreckten Liganden **1**, der gleichzeitig mit beiden Zuckerresten an das WGA-Dimer bindet. In Abbildung 31 sind die beiden Fälle Ligand in Anwesenheit von WGA und Ligand frei in Lösung schematisch dargestellt. Während der überbrückend

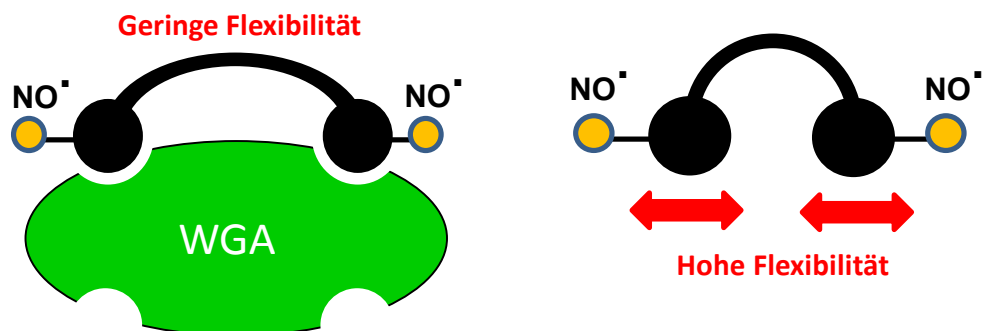


Abbildung 31: Schematische Darstellung der Bindungssituation zwischen WGA und $\mathbf{1_2}$ bei einem Protein/Ligand-Verhältnis von 8 : 1 (links) und Ligand $\mathbf{1_2}$ in Lösung (rechts). Die gelben Kreise stellen die Nitroxidmarker dar, und durch die roten Pfeile soll die Flexibilität des Linkers veranschaulicht werden.

bindende Ligand einen größeren Nitroxid-Nitroxid Abstand aufweist und sowohl die Flexibilität des Linkers als auch die rotatorische Mobilität stark eingeschränkt ist (links), liegt bei dem Ligand in Lösung ein geringerer Interspinabstand und eine höhere Flexibilität des Linkers vor (rechts).

Als Referenz zu den ESR-Messungen wurden aus der hochaufgelösten Röntgenstruktur die Abstände zwischen den C6-Hydroxylgruppen der WGA gebundenen GlcNAc-Reste ermittelt (Abbildung 33). Die Analyse der Abstandsverteilung unter Zuhilfenahme der Kristallstruktur (PDB-Code 2X52) zeigt, dass der Ligand die benachbarten primären Bindungsstellen B1C2/C2B1 oder B2C1/C1B2 besetzt (Abbildung 35 A). Selbst wenn man für die Anknüpfung des Spinmarkers eine Abweichung der Abstände von wenigen Ångström annimmt, kommen für überbrückendes Binden nur benachbarte Bindungsstellen mit $r < 2,5$ nm in Frage. Die Besetzung nicht benachbarter Bindungsstellen kann praktisch ausgeschlossen werden, da diese Bindungsstellen zwischen $r \approx 3$ nm und $r \approx 5,5$ nm voneinander entfernt sind. Eine Überbrückung der benachbarten sekundären Bindungsstellen A1 - D2A1 und A2 - D1A2, die sich in einem ähnlichen Abstand zueinander befinden ($r \approx 2,0$ nm), ist verhältnismäßig unwahrscheinlich, da diese Bindungsstellen eine weitaus geringere Bindungsaffinität aufweisen^[50].

Eine Validierung der Orientierungsmöglichkeiten der Spinmarker mittels *molekularer Modellierung* ergab eine erstaunlich gute Übereinstimmung mit der Breite der Abstandsverteilung (Abbildung 32). Zur Abschätzung der Abstände zwischen den Sauerstoffatomen der Nitroxid-

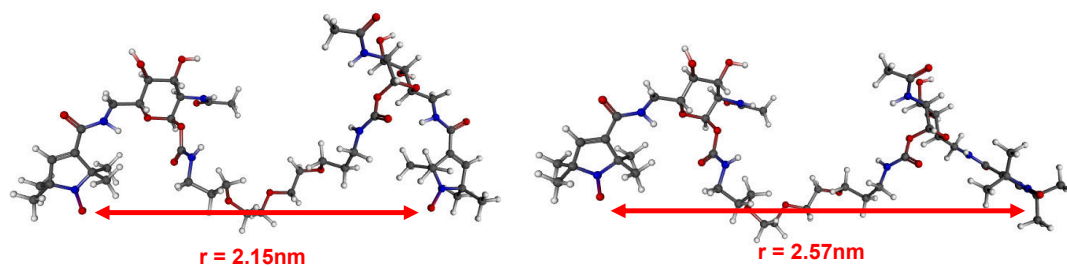


Abbildung 32: Molekulare Modellierung von **12**. Die Konformation von **1** wurde der Kristallstruktur entnommen und die Hydroxylgruppen an den C6-Positionen der GlcNAc-Reste durch die Spinmarker ersetzt. Rotation um die C5-C6-Einfachbindungen ergab die Extremwerte $r = 2,15 \text{ nm}$ und $r = 2,57 \text{ nm}$ zwischen den Sauerstoffatomen der Nitroxidgruppen. Die Modellierung erfolgte mit dem Programm Gaussian03 (Gaussian Inc.).

gruppen wurde eine Konformation von **1** aus der Kristallstruktur verwendet, bei der die Hydroxylgruppen in den 6-Positionen durch die Strukturen der Spinmarker ausgetauscht wurden. Die chemische Strukturformel des modellierten Moleküls entspricht somit der des zweifach markierten Liganden **12**, mit dem auch die DEER-Abstandsmessungen durchgeführt wurden. Bei den räumlichen Anordnungen der Spinsonden wurden sterische Restriktionen aufgrund der Topologie des Makromoleküls vernachlässigt und eine freie Drehbarkeit um die Kohlenstoff-Kohlenstoff-Einfachbindung (C5-C6-Bindung) der verknüpfenden Einheit zwischen Spinmarker und GlcNAc-Resten angenommen. Durch Rotation der Spinsonden um diese C5-C6-Bindungen konnten minimale ($r = 2,15 \text{ nm}$) und maximale Interspinabstände ($r = 2,57 \text{ nm}$) ermittelt werden, die in guter Näherung mit den äußeren Rändern der Abstandsverteilung in Abbildung 30 B, Mitte übereinstimmen. Nimmt man an, dass die Abstände zwischen den Nitroxiden symmetrisch um den Mittelwert der beiden Extremwerte verteilt vorliegen, erhält man in Analogie zu dem DEER-Experiment den wahrscheinlichsten Abstand bei zirka $2,3 \text{ nm}$. Bei dieser Modellierung wurde die Beweglichkeit aller anderen Atombindungen aufgrund mesomerer Grenzstrukturen (Amidbindung) und Stereometrien (5-Ring des Pyrrol-Derivats) nicht berücksichtigt.

Liegt bezüglich der Bindungsstellen ein stöchiometrisches WGA/Ligand-Verhältnis von $1 : 4$ vor, erwartet man, dass die divalenten Liganden **1** nicht quantitativ an WGA binden. Ein Teil der Liganden sollte aufgrund der deutlich geringeren Bindungsaffinität der sekundären Bindungsstellen ungebunden vorliegen. Tatsächlich liefert die Mobilitätsmessung des einfach markierten

Liganden **1₁** ein Dreilinienspektrum, das die typischen Merkmale einer schnellen rotatorischen Diffusion aufweist (Abbildung 29 A, oben). Obwohl ein beträchtliche Teil der Liganden gebunden ist, erkennt man zwischen den Linienformen dieses Spektrums und der Linienform des Spektrums **1₁** in Abwesenheit von WGA keinen signifikanten Unterschied. Dennoch handelt es sich bei dieser Messung um ein Mischspektrum, das sich aus den Signalen der gebundenen und ungebundenen Liganden zusammensetzt, wobei das Signal der verlangsamten Komponente (Abbildung 29 A, mitte) von dem intensitätsstarken Signal der schnellen Komponente (Abbildung 29 A, unten) nahezu komplett überlagert wird. Eine Abschätzung der effektiven Rotationskorrelationszeit mit der Kivelson-Gleichung ergab einen Wert ($\tau_c = 160$ ps) der etwas langsamer ist, als für ungebundene Liganden ($\tau_c = 120$ ps). Dies lässt auf partielles Binden schließen.

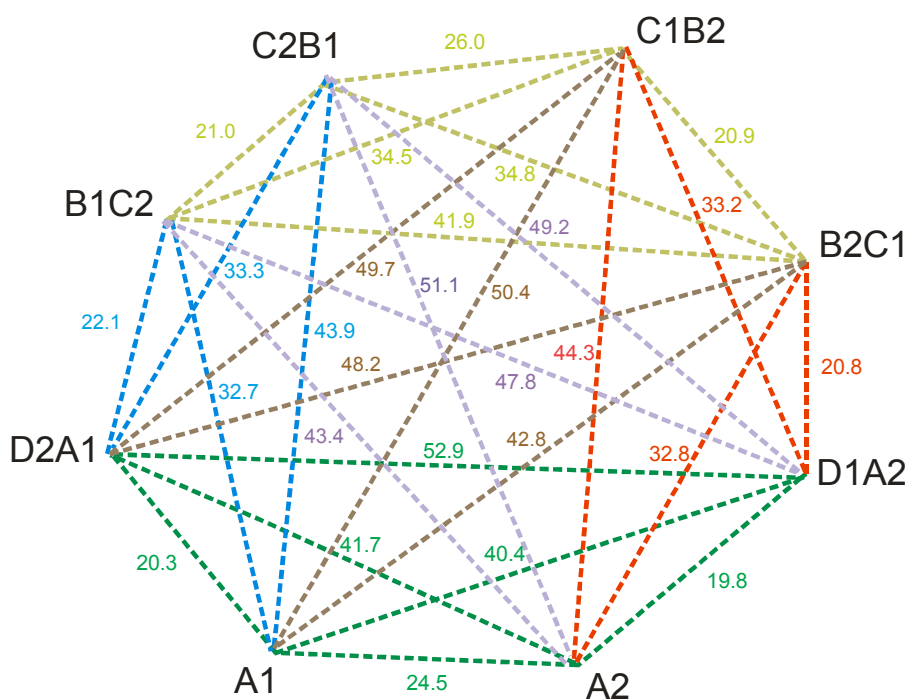


Abbildung 33: Abstände (Å) zwischen den C6-Sauerstoffatomen der WGA gebundenen GlcNAc-Reste gemäß der Kristallstruktur 2X52.

Die Koexistenz von gebundenen und ungebundenen Liganden spiegelt sich auch in der DEER-Abstandsverteilung des zweifach markierten Liganden **1₂** wider (Abbildung 30 B, oben). Der Peak bei den kleineren Abständen weist im Vergleich zu der Abstandsverteilung des quantitativ gebundenen Liganden eine breitere Schulter auf Seite der kleinen Abstände auf und das Maximum des Peaks befindet sich bei einem kleineren Abstand ($r = 2,1$ nm). Die Linienbreite der

Kurve ist an dieser Stelle ungefähr so groß, wie die Linienbreite der Peaks in den Abstandsverteilungen des gebundenen und ungebundenen Liganden zusammen. Tatsächlich konnte mit einer Simulation gezeigt werden, dass dieser Peak einer Überlagerung der Abstandsverteilungen des gebundenen ($\approx 60\%$) und des ungebundenen Liganden ($\approx 40\%$) entspricht (Abbildung 34). Dazu wurden die Abstandsverteilungen des gebundenen und ungebundenen Liganden jeweils mit einer Gaußkurve angepasst und mit diesen Fits eine Linearkombination durchgeführt. Gemäß dieser Linearkombination beträgt der Anteil der gebundenen Fraktion etwa 60% .

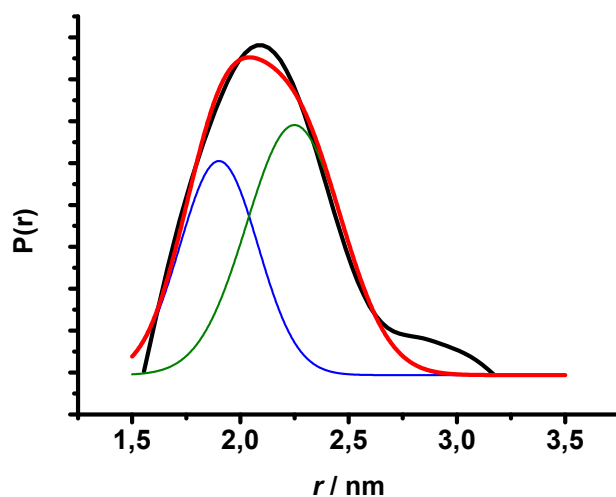


Abbildung 34: Ausschnitt der DEER-Abstandsverteilung von $\mathbf{1}_2$ bei einem WGA/Ligand-Verhältnis von 1 : 4 (schwarz) mit Simulation (rot). Die rote Linie ist eine Linearkombination der Abstandsverteilungen des ungebundenen (blau, 40 %) und gebundenen Liganden (grün, 60 %).

Vergleicht man die Linienformen der Tieftemperatur-cw-ESR-Spektren des einfach ($\mathbf{1}_1$) und doppelt markierten Liganden ($\mathbf{1}_2$) bei einem Protein/Ligand-Verhältnis von 1 : 4, lässt sich eine geringe, aber dennoch klar sichtbare dipolare Verbreiterung erkennen (Abbildung 29 B, oben). Aus dieser Verbreiterung kann man auf Interspinabstände unterhalb von 1,5 nm schließen. Ähnlich wie bei den cw-ESR-Messungen bei Raumtemperatur handelt es sich hier um Mischspektren, die sich aus einer unverbreiterten Fraktion gebundener Liganden und einer verbreiterten Fraktion ungebundenen Liganden zusammensetzen. Die Mittelung der dipolar verbreiterten und unverbreiterten Komponente resultiert in einem Spektrum mit moderater Verbreiterung. Die Auswertung der Differenz der zweiten Momente ergab mit $\langle \Delta \Delta B^2 \rangle = 0,3 \cdot 10^{-6} \text{ T}^2$ einen Wert, der zwischen den beiden Werten des gebundenen ($\langle \Delta \Delta B^2 \rangle = 0,1 \cdot 10^{-6} \text{ T}^2$) und ungebundenen ($\langle \Delta \Delta B^2 \rangle = 1,8 \cdot 10^{-6} \text{ T}^2$) Liganden liegt (Tabelle 3). Somit sprechen bei einem WGA/Ligand-

Verhältnis von 1 : 4 alle ESR-Daten für einen partiell gebundenen Zustand.

Bei einem WGA/Ligand-Verhältnis von 1 : 4 ist statistisch mehr als ein divalenter Ligand an ein Protein gebunden, d. h. es werden mehr als zwei der acht Bindungsstellen des WGA-Dimers von divalenten Liganden **1** besetzt (Abbildung 35 B). Folglich weist die Abstandsverteilung neben *intramolekularen* Spinmarkerabständen innerhalb eines überbrückend bindenden Liganden noch weitere Werte auf, die den *intermolekularen* Abständen zwischen den Spinmarker verschiedener Liganden zugeordnet werden können. Die Auswertung der DEER-Abstandsmessung eines Systems mit mehr als zwei Spins ist jedoch schwierig, da sich die verschiedenen Beiträge der Dipol-Dipol-Wechselwirkung überlagern. Eine Auftrennung dieser Beiträge gelang bisher nur für ein Dreispinsystem^[153,154]. Dennoch sind bei 2,9 nm und 4,3 nm Peaks auszumachen, die Interligandabständen zwischen den primären Bindungsstellen zugewiesen werden können: Eine Auswertung des Messergebnisses unter Berücksichtigung der Kristallstruktur zeigt (Abbildung 33), dass die Abstände zwischen den Bindungsstellen C1B2 - C2B1 (2,7 nm) und B2C1 - B1C2 (4,2 nm) gut mit der Abstandsverteilung harmonisieren. Aufgrund den Abmessungen des Spinmarkers selbst, ist für die DEER-Abstandsbestimmung eine Abweichung von wenigen Ångström zu erwarten. Im Gegensatz dazu können die größeren Abstände zwischen primären und sekundären Bindungsstellen, wie C1B2 und A1 (5,0 nm) oder C2B1 und A2 (5,1 nm), mit DEER nicht beobachtet werden. Dies spricht für eine geringe Besetzungswahrscheinlichkeit der sekundären Bindungsstellen bei diesen Bedingungen.

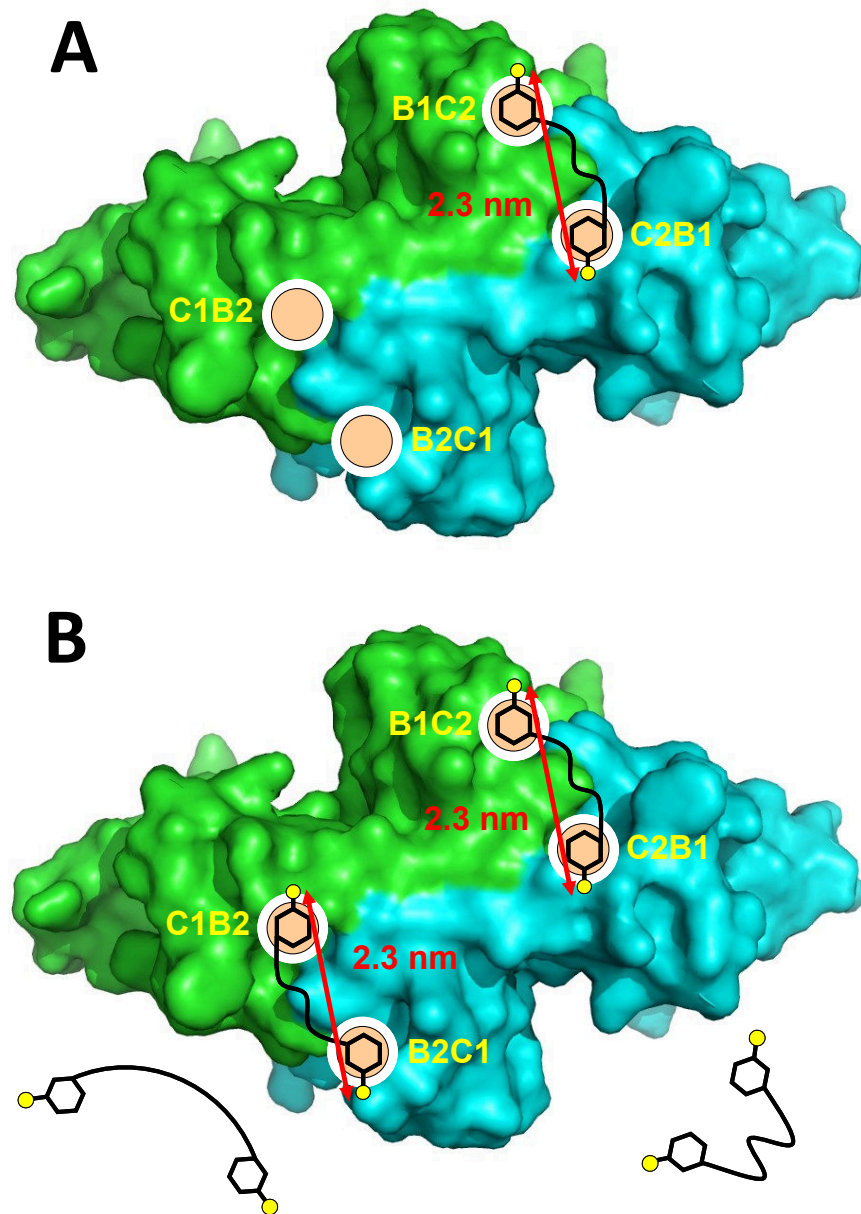


Abbildung 35: Kristallstrukturen des WGA-Dimers (PDB-Code: 2X52) mit blau und grün gefärbten Untereinheiten. Die Positionen der Bindungsstellen sind durch die weiß umrandeten braunen Kreise gekennzeichnet und die Spinsonden der zweifach markierten Liganden sind als gelbe Kreise dargestellt. **A:** Vorgeschlagener Bindungsmodus für 1_2 bei einem Protein/Ligand-Verhältnis von 8 : 1. **B:** Vorgeschlagener Bindungsmodus für 1_2 bei einem Protein/Ligand-Verhältnis von 1 : 4.

Im Folgenden werden die Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen zwischen dem divalenten Liganden **2** mit dem kürzeren Linker und WGA-Protein untersucht. Die Mobilitätsmessung an **2₁** lieferte ein Nitroxidspektrum im Regime der schnellen Bewegung mit drei schmalen und annähernd gleich intensiven Linien (Abbildung 36 A, unten). Eine Abschätzung der Rotationskorrelationszeit mit der Kivelson-Gleichung (45) ergab $\tau_c \approx 120$ ps. Somit unterscheidet sich die rotatorische Diffusion des Liganden **2₁** in Lösung nur unwesentlich von der rotatorischen Diffusion des Liganden **1₁** in Lösung ($\tau_c \approx 120$ ps), obwohl man aufgrund des kürzeren Linkers eine etwas schnellere Rotationskonstante erwarten für **2₁** würde. Da die beiden Proben im gleichen Medium und bei der gleichen Temperatur gemessen wurden, sollte gemäß der Gleichung (45) für **1₂** und **2₂** ein ähnlicher hydrodynamischer Radius r_H vorliegen. Dies spricht für eine gefaltete Linkerkonformation des Liganden **1₂**. Die rotatorische Diffusion der Spinsonden von **1₁** und **2₁** in Lösung liegt also in einem ähnlichen Größenbereich, obwohl der Linker von **2₁** um mehrere Atombindungen kürzer ist als bei **1₁**.

Ein Vergleich der Rotationskorrelationszeiten, die mit der Kivelson-Gleichung abgeschätzt wurden (**1₁** ohne WGA: $\tau_c \approx 120$ ps, **2₁** ohne WGA: $\tau_c \approx 120$ ps) mit den Rotationskorrelationszeiten, die in Kapitel 6 aus Linienformanalysen erhalten wurden (**1₁** ohne WGA: $\tau_c = 230$ ps, **2₁** ohne WGA: $\tau_c = 240$ ps) zeigt, dass die Abschätzung mit einem beträchtlichen Fehler behaftet ist. Dennoch scheint die Kivelson-Gleichung zur Abschätzung der relativen Größe von τ_c gut geeignet zu sein.

Auch bei den DEER-Abstandsmessungen an **2₂** ohne WGA stellt sich eine vergleichbare Situation wie für den Liganden **1₂** dar. Die Abstandsverteilung weist bei 1,8 nm einen einzelnen Peak mit großer Halbwertsbreite auf, der sowohl auf Beiträge unterhalb von 1,5 nm, als auch auf eine hohe Flexibilität des Linkers schließen lässt (Abbildung 37 B, unten). Demnach liegt das Maximum der Kurve bei dem gleichen Abstand wie für **1₂**, obwohl sich die Anzahl der Atombindungen beider Linker deutlich unterscheidet (Abbildung 28). Diese Divergenz lässt sich mit dem *gauche*-Effekt^[155] der Sauerstoffatome im Linker von **1₂** erklären, der zu einer gefalteten Konformation der Oligoethylenglycol-Ketten zwischen den GlcNAc-Resten führt und somit den Abstand zwischen den Spinmarker verkürzt. Dieses Verhalten ist für Oligoethylenglycol-Ketten in wässriger Lösung allgemein bekannt und kann hier mittels einer Abstandsmessung indirekt bestätigt werden. Die Beobachtung einer gefalteten Konformation von **1₂** deckt sich mit dem Ergebnis der Mobilitätsmessungen, als für **1₁** ein verhältnismäßig kleiner hydrodynamischer Radius abgeschätzt wurde.

Weitere Abstände bei $r \approx 3$ nm und $r \approx 4$ nm weisen sehr geringe Intensitäten auf und konnten mittels einer Validierung der Abstandsverteilung als Artefakte identifiziert werden (Abbildung A69).

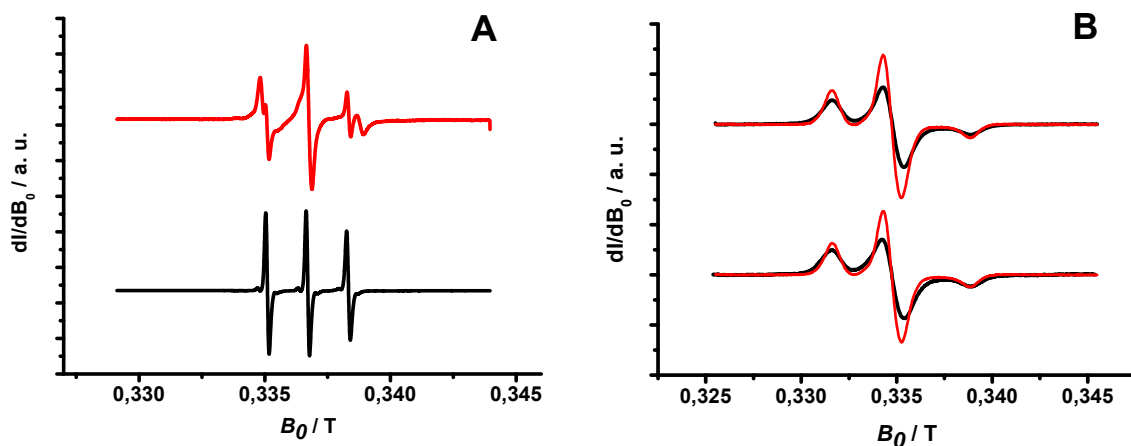


Abbildung 36: **A:** Cw-ESR-Spektren von $\mathbf{2}_1$ bei $T = 295$ K ohne WGA (unten) und bei einem WGA/Ligand-Verhältnis von 8 : 1 (oben). In Abwesenheit von WGA liegt eine schnelle rotatorische Diffusion vor ($\tau_c = 120$ ps), während sich das Spektrum in Anwesenheit von WGA aus einer schnellen und einer verlangsamten Komponente zusammensetzt. **B:** Vergleich der cw-ESR-Spektren ($T = 120$ K) eines einfach ($\mathbf{2}_1$, rot) und zweifach ($\mathbf{2}_2$, schwarz) markierten Liganden in Abwesenheit von WGA (unten) und bei einem WGA/Ligand-Verhältnis von 8 : 1 (oben). In beiden Fällen liegt eine dipolare Verbreiterung für die Spektren von $\mathbf{2}_2$ vor.

Passend zu den DEER-Daten beobachtet man für das Tieftemperatur-cw-ESR-Spektrum des doppelt spinmarkierten Liganden $\mathbf{2}_2$ ohne WGA-Zusatz eine erhebliche dipolare Verbreiterung (Abbildung 36 B, unten). Die Auswertung der Differenz der zweiten Momente ergab einen Wert ($\langle \Delta \Delta B^2 \rangle = 0,9 \cdot 10^{-6} \text{ T}^2$), der zwar nur halb so groß ist wie der für die Analoga des Liganden $\mathbf{1}$ ($\langle \Delta \Delta B^2 \rangle = 1,8 \cdot 10^{-6} \text{ T}^2$). Dennoch muss ein beträchtlicher Teil der Liganden einen Spinmarkerabstand kleiner als 1,5 nm aufweisen. Aus der kleineren Differenz der zweiten Momente kann gefolgert werden, dass die Spinsonden des Liganden $\mathbf{2}_2$ infolge der geringeren Flexibilität des kurzen Linkers einen gewissen Abstand bewahren und zu einer weniger starken dipolaren Verbreiterung führen.

Nach Zugabe eines achtfachen molaren Überschusses an WGA unterscheidet sich die Situation für $\mathbf{2}$ deutlich von der Situation für $\mathbf{1}$. Im Gegensatz zu $\mathbf{1}_1$ beobachtet man bei $\mathbf{2}_1$ ein Raumtemperatur-cw-ESR-Spektrum, das sich aus einer Komponente mit verlangsamter Mobilität und einer Komponente mit höherer Mobilität zusammensetzt (Abbildung 36 A, oben). Es ist klar zu sehen, dass die langsamere Komponente von drei schmalen Linien mit äquidistanten Abständen überlagert wird. Sowohl die Linienform als auch die g-Werte dieser *Spikes* sprechen

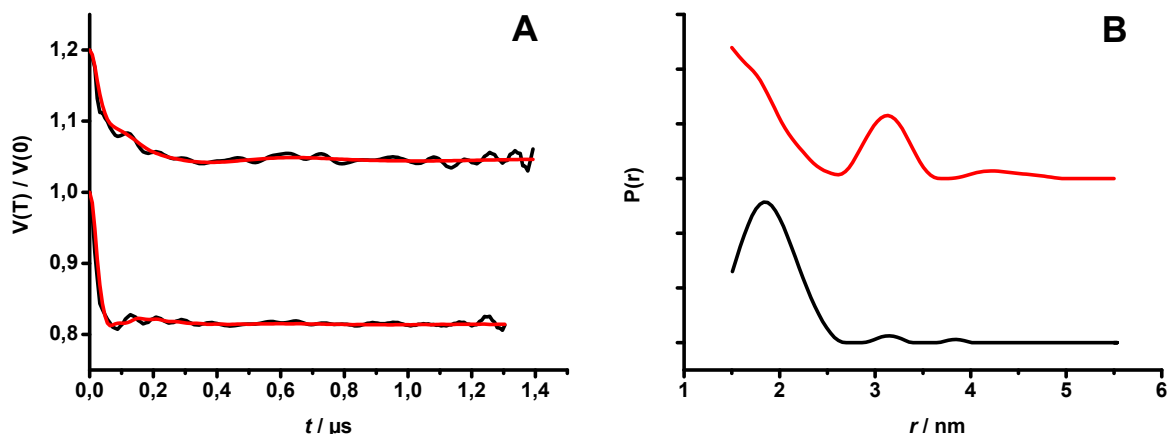


Abbildung 37: **A:** Hintergrundkorrigierte und normierte DEER-Spektren von **2₂** (schwarz) mit Simulation (rot). Die Simulation der dipolaren Entwicklungen erfolgte ohne Vorgabe eines Modells mit einer Tikhonov-Regularisierung. Unten: Ligand in Abwesenheit von WGA. Oben: WGA/Ligand-Verhältnis von 8 : 1 (Kurve um 0,2 nach oben versetzt). **B:** DEER-Abstandsverteilungen von **2₂**, die nach einer Auswertung der Spektren in **A** erhalten wurden. Unten: Ligand in Abwesenheit von WGA. Oben: WGA/Ligand-Verhältnis von 8 : 1. Der Peak bei 1,8 nm (unten) unterscheidet sich kaum von dem Peak in Abbildung 30 B, unten.

dafür, dass es sich bei diesen Signalen um ungebundene Liganden handelt. Demgegenüber weist die Linienform der verlangsamten Komponente eine gewisse Ähnlichkeit mit dem Spektrum des gebundenen Liganden in Abbildung 29 A, mitte auf. Auch mit Blick auf die wesentlich niedrigere Bindungsaffinität von **2** (IC_{50} -Wert ist mit 734 μ M um eine Größenordnung höher als bei **1**), kann man aus diesen Beobachtungen auf eine Koexistenz von gebundenen und ungebundenen divalenten Liganden schließen.

Bei einem achtfachen molaren Überschuss an WGA weist die DEER-Abstandsverteilung für **2₂** zwischen der unteren Detektionsgrenze bei $r \approx 1,5$ nm und $r \approx 2$ nm eine hohe Intensität auf, während der für überbrückendes Binden charakteristische Abstand bei 2,3 nm kaum auftritt (Abbildung 37 B, oben). Weiterhin ist bei $r \approx 3$ nm ein markanter Peak und bei $r \approx 4$ nm ein Peak mit geringer Intensität zu beobachten. Aus der Absenz des charakteristischen Peaks bei 2,3 nm und dem Auftreten von Interligandabständen bei 3 nm folgt, dass der kurze divalente Ligand **2₂** die primären Bindungsstellen C1B2 und B2C1 bzw. B1C2 und C2B1 nicht gleichzeitig besetzt (Abbildung 38). Somit ist der Ligand **2₂** zu kurz, um zwei benachbarte Bindungsstellen chelatisierend zu binden. Dies erklärt auch die im Vergleich zu **1** erheblich verringerte Bindungs-

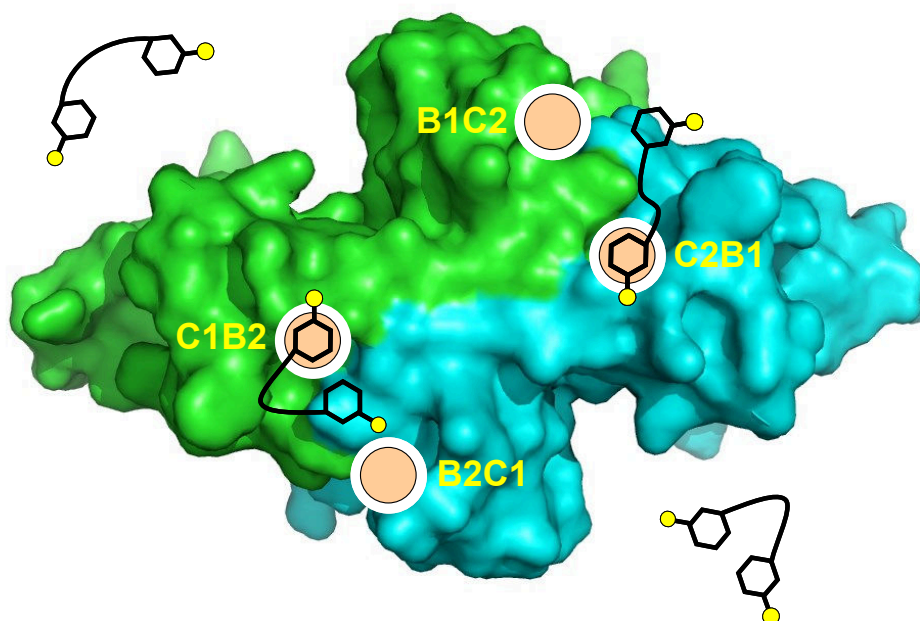


Abbildung 38: Kristallstruktur des WGA-Dimers (PDB-Code: 2X52) mit blau und grün eingefärbten Untereinheiten. Die Positionen der Bindungsstellen sind durch die weiß umrandeten braunen Kreise gekennzeichnet und die Spinsonden der zweifach markierten Liganden werden als gelbe Kreise dargestellt: Vorgeschlagener Bindungsmechanismus für **2₂** bei einem Protein/Ligand-Verhältnis von 8 : 1. Es werden bevorzugt die Bindungsstellen C1B2 und C2B1 von dem mutmaßlich monovalent bindenden Liganden **2₂** besetzt.

affinität.

Als Alternative kommen zwei Modelle in Frage: 1.) Der divalente Ligand bindet monovalent an eine WGA-Bindungsstelle, wobei das ungebundene Ende des Liganden frei beweglich ist. 2.) Der divalente Ligand bindet mit einem Ende an eine WGA-Bindungsstelle und mit dem anderen Ende an eine WGA-Subbindungsstelle. Ein Vergleich der Abstandsverteilungen in Abbildung 37 B zeigt, dass sich das Maximum des Peaks nach Zugabe von WGA von 1,8 nm zu niedrigeren Abständen verschiebt. Passend dazu beobachtet man bei den Tieftemperatur-cw-Spektren in Abbildung 36 B für die Messung mit WGA eine größere dipolare Verbreiterung (Tabelle 3). Die Verringerung des intramolekularen Abstands in Anwesenheit von WGA spricht für eine Bindung an eine Subbindungsstelle, die sich in direkter Nachbarschaft zu der WGA-Bindungsstelle befindet^[41].

Der intermolekulare Abstand bei 3 nm konnte mit Hilfe der Kristallstruktur den Bindungsstellen C1B2 und C2B1 zugeordnet werden, die sich gemäß Abbildung 33 rund 2,7 nm voneinander entfernt befinden. Wie bereits erwähnt, ist eine geringfügige Abweichung beider Messmethoden im Bereich von 2 Å – 3 Å zu erwarten, da bei der Abstandsbestimmung mittels Kristallstruktur die Abstände zwischen den Sauerstoffatomen an den 6-Positionen der GlcNAc-Reste ermittelt wurden. Nichtsdestotrotz lässt sich diese Bindungsstellenbesetzung nur mit einer höheren Bindungsaffinität von C1B2 und C2B1 erklären, da die Röntgenstruktur keine Hinweise auf sterische Einschränkungen liefert, die eine Besetzung benachbarter Bindungsstellen verhindern würde (Abbildung 38).

Bei den Tieftemperatur-cw-ESR-Spektren von **2**₁ und **2**₂ ist bezüglich der dipolaren Verbreiterung des zweifach markierten Liganden kaum einen Unterschied zu den Messungen ohne WGA erkennen (vgl. Abbildung 36 B, oben und unten). Das Spektrum des zweifach markierten Liganden weist mit $\langle \Delta \Delta B^2 \rangle = 1,1 \cdot 10^{-6} \text{ T}^2$ eine deutliche dipolare Verbreiterung auf und liefert damit den Beweis, dass für **2** selbst in Anwesenheit von WGA Abstände unterhalb von 1,5 nm vorliegen. Dieses Ergebnis ist ein weiterer Beleg dafür, dass der Ligand **2** zu kurz ist, um überbrückend an WGA zu binden.

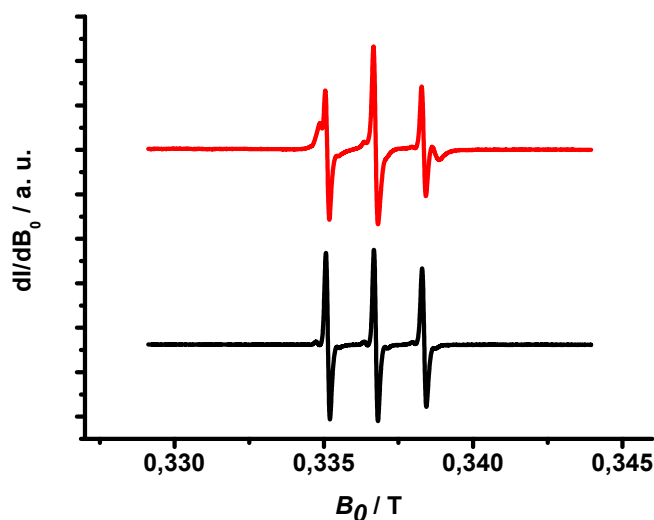


Abbildung 39: Cw-ESR-Spektren von **3**₁ bei $T = 295 \text{ K}$ ohne WGA (unten) und bei einem WGA/Ligand-Verhältnis von 8 : 1 (oben). In Abwesenheit von WGA liegt eine schnelle rotatorische Diffusion vor ($\tau_c = 120 \text{ ps}$), während sich das Spektrum in Anwesenheit von WGA aus dieser schnellen und einer verlangsamten Komponente zusammensetzt.

Aufgrund des höheren IC_{50} -Werts (8 mM) erwartet man für den monovalenten Liganden **3** eine geringere Bindungsaffinität als bei den divalenten Liganden **1** und **2**. Dementsprechend beobachtet man bei der Mobilitätsmessung an **3₁** mit einem Protein/Ligand-Verhältnis von 8 : 1 eine größere Fraktion des ungebundenen Liganden (Abbildung 39, oben). Es ist klar zu sehen, dass die intensitätsstarken *Spikes* der ungebundenen Komponente das Mischspektrum dominieren und die breiten Linien der gebundenen Komponente kaum zu erkennen sind. Eine Bestimmung der Rotationskorrelationszeit erfordert in diesem Fall eine quantitative Auswertung mittels einer Linienformanalyse, da eine Abschätzung mit Gleichung (45) für Mischspektren nicht sinnvoll ist. Aus diesem Grund wurde auf eine Auswertung der Rotationskorrelationszeit verzichtet.

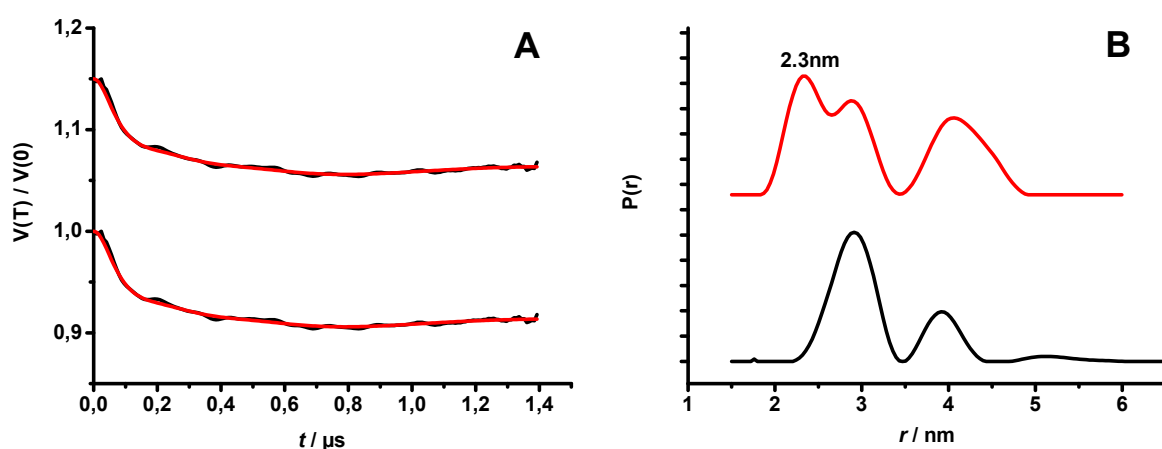


Abbildung 40: **A:** Hintergrundkorrigierte und normierte DEER-Spektren von **3₁** (schwarz) mit Simulation (rot). Die Simulation der dipolaren Entwicklung erfolgte ohne Vorgabe eines Modells mit einer Tikhonov-Regularisierung. Unten: WGA/Ligand-Verhältnis von 1 : 1. Oben: WGA/Ligand-Verhältnis von 7 : 1 (Kurve um 0,2 nach oben versetzt). **B:** DEER-Abstandsverteilungen von **3₁**, die nach einer Auswertung der Spektren in **A** erhalten wurden. Unten: WGA/Ligand-Verhältnis von 1 : 1. Oben: WGA/Ligand-Verhältnis von 7 : 1. Der charakteristische Abstand benachbarter Bindungsstellen (2,3 nm) kann erst bei einem Ligandenüberschuss beobachtet werden.

Der Anteil des ungebundenen Liganden liegt in Lösung dreidimensional homogen verteilt vor und trägt nicht zu der Modulationstiefe λ der DEER-Abstandsmessung bei. Trotz dieses Sensitivitätsverlusts konnte mit $\lambda = 0,1$ ein Anteil interagierender monovalenter Liganden **3₁**, die an dasselbe WGA-Protein binden, detektiert werden (Abbildung 40 A). Bei einem Protein/Ligand-Verhältnis von 1 : 1 findet man größere Abstände bei $r \approx 3$ nm und $r \approx 4$ nm, die mit Hilfe der Kristallstruktur den Abständen zwischen den Bindungsstellen C1B2 und C2B1 bzw. B1C2

und B2C1 zugeordnet werden konnten. Da die Abstände um 3 nm und 4 nm schon bei den Abstandsmessungen von Ligand **2** beobachtet wurden, gibt diese Messung einen weiteren Hinweis darauf, dass monovalent bindende Liganden bevorzugt an nicht benachbarte Bindungsstellen binden. Das bevorzugte Binden an nicht benachbarten Bindungsstellen könnte ein Hinweis auf negative allosterische Kooperativität ($\alpha < 1$) sein. Passend dazu tritt der für überbrückendes Binden charakteristische Peak bei 2,3 nm nicht auf (Abbildung 40 B, unten). Erst bei einem Ligandenüberschuss von 7 : 1 werden benachbarte Bindungsstellen besetzt, sodass ein deutlich sichtbarer Peak bei 2,3 nm beobachtet werden kann (Abbildung 40 B, oben). Damit sprechen sowohl die Daten von Ligand **2**, als auch die Daten von Ligand **3** für eine höhere Bindungsaffinität der beiden Bindungsstellen C1B2 und C2B1.

Die hier vorgestellte Methode zur Untersuchung von multivalenten Protein-Ligand-Wechselwirkungen birgt großes Potential und ist auch auf Systeme anwendbar, deren Strukturen noch unbekannt sind.

	$\langle \Delta B_i^2 \rangle (T^2), i = 1$	$\langle \Delta B_i^2 \rangle (T^2), i = 2$	$\langle \Delta \Delta B^2 \rangle (T^2)$
1_i in Abwesenheit von WGA	$2,9 \cdot 10^{-6}$	$4,7 \cdot 10^{-6}$	$1,8 \cdot 10^{-6}$
1_i WGA : Ligand = 8 : 1	$3,4 \cdot 10^{-6}$	$3,5 \cdot 10^{-6}$	$0,1 \cdot 10^{-6}$
1_i WGA : Ligand = 1 : 4	$3,4 \cdot 10^{-6}$	$3,7 \cdot 10^{-6}$	$0,3 \cdot 10^{-6}$
2_i in Abwesenheit von WGA	$3,3 \cdot 10^{-6}$	$4,3 \cdot 10^{-6}$	$0,9 \cdot 10^{-6}$
2_i WGA : Ligand = 8 : 1	$3,2 \cdot 10^{-6}$	$4,3 \cdot 10^{-6}$	$1,1 \cdot 10^{-6}$

Tabelle 3: Zweite Momente der Tieftemperatur-cw-ESR-Spektren der einfach ($i = 1$) und zweifach ($i = 2$) markierten Liganden 1_i und 2_i .

6 Bifrequenz-cw-ESR an WGA-Liganden

6.1 Aufgabenstellung

In Kapitel 5 dieser Arbeit konnte mit ESR-Methoden gezeigt werden, dass der Ligand **1** in gefrorener Lösung chelatisierend an WGA bindet. Bei diesen Messungen lag entweder ein achtfacher molarer Überschuss an WGA-Dimer, oder ein bezüglich der WGA-Bindungsstellen äquimolares Ligand/Protein-Verhältnis vor. Eine Erhöhung des Ligand/Protein-Verhältnisses könnte jedoch dazu führen, dass sich die Bindungssituation ändert und die Population der chelatisierend bindenden Liganden von einer Population monovalent bindender divalenter Liganden verdrängt wird. Dieses Verhalten wurde in einer theoretischen Studie von Hunter *et al.*^[10] zur Beschreibung von Chelatkooperativität für ein Modellsystem mit divalenten Liganden und divalenten Rezeptoren vorgeschlagen.

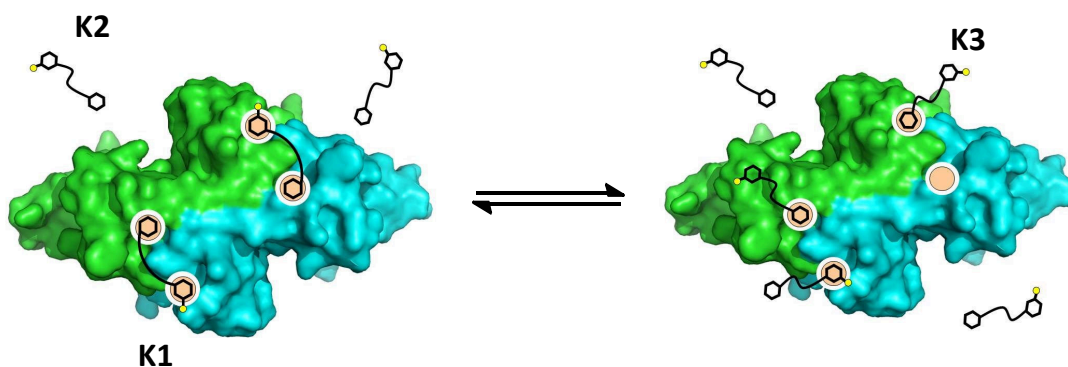


Abbildung 41: Kristallstrukturen des WGA-Dimers (PDB-Code: 2X52) mit blau und grün gefärbten Untereinheiten. Die Positionen der Bindungsstellen sind durch weiß umrandete braune Kreise gekennzeichnet und die Spinsonden der einfach markierten Liganden sind als gelbe Kreise dargestellt. Links: Überbrückendes Binden eines divalenten Liganden (K1) an WGA-Dimer. Rechts: Monovalentes Binden eines divalenten Liganden (K3) an WGA-Dimer. Beide Bindungsmodi stehen im dynamischen Gleichgewicht mit ungebundenen Liganden (K2).

Wie bereits in Abschnitt 2.6 erwähnt, gibt es in diesem Modellsystem in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration drei verschiedene Bindungsmodi, den chelatisierend gebundenen Liganden (1), den ungebundenen Liganden (2) und den monovalent gebundenen Liganden (3). Neben der intermolekularen Gleichgewichtskonstanten K , werden die Population der chelatisierend und monovalent gebundenen Liganden dabei maßgeblich von der mikroskopischen effektiven

Molarität EM bestimmt: Sie legt fest, ab welcher Ligandenkonzentration es zum „Umschalten“ vom überwiegend chelatisierend gebundenen Zustand zum überwiegend monovalent gebundenen Zustand kommt. Ihre Bestimmung ist daher essentiell zur Charakterisierung von Chelatkooperativität. Allerdings war der Parameter EM bisher nur mit Hilfe von Referenzsystemen experimentell zugänglich, da man mit einem klassischen Titrationsexperiment lediglich die makroskopische Gesamtstellenbesetzung Θ ermitteln kann.

Ist man jedoch in der Lage, zwischen der Mobilität eines gebundenen Liganden ($K1$), der Mobilität eines ungebundenen Liganden ($K2$) und der Mobilität des ungebundenen Ende eines monovalent bindenden Liganden ($K3$) zu unterscheiden, besteht die Möglichkeit, die Ligandenkonzentration des *Umkehrpunkts* mit $[BB]_u = EM/2$ über cw-ESR-Messungen experimentell zu bestimmen. Dieser Ansatz lässt sich direkt auf das System WGA (Rezeptor) und divalentes GlcNAc-Derivat **1** (Ligand) übertragen. Da unter den in Kapitel 5 gewählten Bedingungen ausschließlich Chelatbindung von **1** an WGA beobachtet wurde, ist davon auszugehen, dass $K \cdot EM \gg 0$ und somit ein vergleichbares Speziationsprofil wie in Abbildung 11 rechts vorliegt. In einem solchen System wird selbst bei einer kleinen Veränderung der Ligandenkonzentration der Chelat-Bindungsmodus (Abbildung 41, links) fast vollständig von dem monovalenten Bindungsmodus (Abbildung 41, rechts) verdrängt. Für ein Speziationsprofil mit solch scharfem Übergang, wäre der Umkehrpunkt zwischen den beiden Zuständen mit großer Präzision bestimmbar.

Liegt das WGA-Dimer in Gegenwart eines Überschusses an GlcNAc-Derivat-Liganden vor, erwartet man, dass sich die drei Zustände divalent gebundener Ligand, ungebundener Ligand und monovalent gebundener Ligand in einem dynamischen Gleichgewicht befinden. Dementsprechend setzt sich auch das cw-ESR-Spektrum von einfach markierten Liganden aus den Signalen jener drei Komponenten zusammen. Man erhält somit eine Überlagerung dreier verschiedener Signale, die ein Mischspektrum ergeben. Die vollständige Beschreibung eines Mehrkomponentenspektrums ist aufwendig und erfordert sowohl eine Linienformanalyse mit einem Fitprogramm als auch eine geeignete Fitstrategie. Eine der naheliegendsten Methoden zur Analyse eines Mischspektrums ist es, die cw-ESR-Spektren der verschiedenen Komponenten separat zu messen und auszuwerten, um dann mit einer Linearkombination jener Spektrenfits das Mischspektrum zu simulieren. Diese Fitstrategie hat zum einen den Vorteil, dass die Parametersätze zur Beschreibung der einzelnen Komponenten direkt aus den jeweiligen experimentellen Spektren zugänglich sind und zum anderen müssen bei der Simulation des Mischspektrums lediglich die prozentualen Anteile der Parametersätze gefittet werden. Dieses Verfahren gewährleistet eine exakte Bestimmung der Fitparameter und eine genaue Beschreibung der Bindungszustände. In Bezug auf das System WGA mit divalentem Ligand **1**₁ bedeutet dies, dass die drei Spektren quantitativ gebundener divalent Ligand (Komponente 1), divalenter Ligand in Abwesenheit von WGA (Komponente 2) und

quantitativ monovalent gebundener divalenter Ligand (Komponente 3) experimentell zugänglich sein müssen.

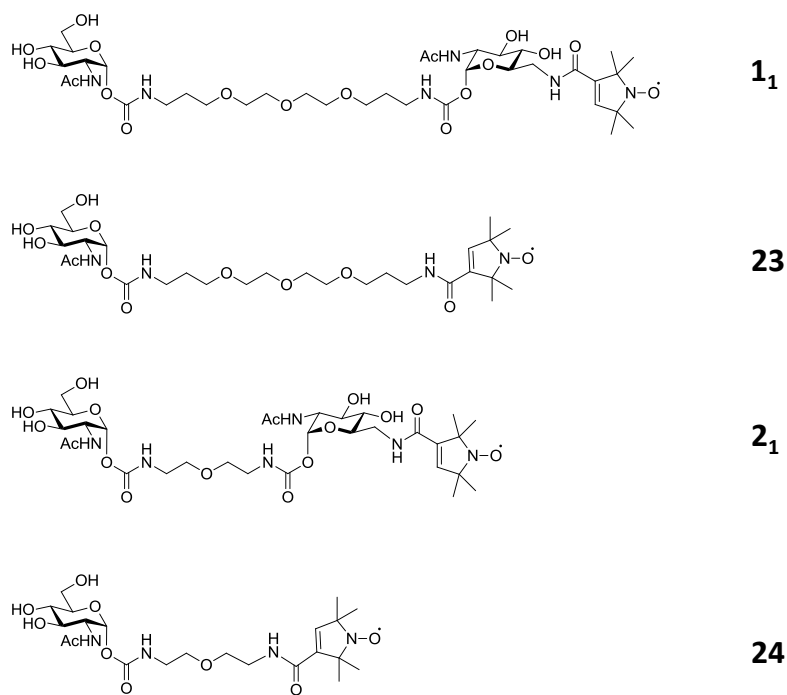


Abbildung 42: Strukturformeln der Liganden, die in Abschnitt 6.2 (**1₁**, **23**) und in Abschnitt 6.3 (**2₁**, **24**) zur Untersuchung verschiedenen Bindungsmodi verwendet wurden. Mit den Verbindungen **23** und **24** wurde der Bindungsmodus monovalent bindender divalenter Liganden simuliert.

Die Komponente 1 lässt sich am einfachsten in Gegenwart eines hohen WGA-Überschusses bestimmen. In Anbetracht der IC_{50} -Werte im mikromolaren Bereich, kann man bei diesen Bedingungen von annähernd quantitativem Binden ausgehen und die Parameter zur Beschreibung der Komponente 1 lassen sich direkt aus dem cw-ESR-Spektrum ermitteln. Auch das experimentelle Spektrum der Komponente 2 sollte leicht zugänglich sein, da hierfür lediglich eine cw-ESR-Messung divalenter Liganden ohne WGA notwendig ist. Allerdings bereitet die Bestimmung der Komponente 3 Schwierigkeiten, da der Ligand **1** unter den in Kapitel 5 gewählten Bedingungen überbrückend an WGA bindet. Eigens aus diesem Grund wurde ein neues GlcNAc-Derivat synthetisch hergestellt, um das cw-ESR-Spektrum des ungebundenen Ende eines monovalent bin-

denden divalenten Liganden zu simulieren. Dazu wurde ein GlcNAc-Rest des divalenten Liganden $\mathbf{1}_1$ durch ein Nitroxid-Derivat ausgetauscht, sodass sich die Spinmarkierung direkt am Ende des Oligoethylenglycol-Linkers befand (Abbildung 42). Da ein solcher Ligand monovalent an das WGA bindet, kann mit dem frei beweglichen Linkerende die Mobilität des Bindungsmodus der Komponente 3 experimentell imitiert werden. Bezüglich der Mobilitäten sind zwischen diesem monovalenten Liganden und dem ungebundenen Ende eines monovalent bindenden divalenten Liganden nur geringe Abweichungen zu erwarten, da sie die gleichen Linker aufweisen und sich die Anzahl der frei rotierbaren Atombindungen nur um eine C-C-Einfachbindung unterscheidet.

Das cw-ESR-Spektrum von $\mathbf{1}_1$ in Gegenwart von WGA weist drei unabhängige Dynamiken auf, die auf der einen Seite einander ähnlich sind (Komponente 2 und 3) und sich auf der anderen Seite deutlich voneinander unterscheiden (Komponente 1 und 2, 3). Um zwischen den Dynamiken von Komponente 2 und 3 besser unterscheiden zu können, wurden alle Proben gemäß der Bifrequenz-ESR-Methode bei verschiedenen Frequenzen im X-Band (9 GHz) und im Q-Band (34 GHz) gemessen. Wie bereits in Abschnitt 3.1 beschrieben, ermöglicht die simultane Simulation von Spektren, die bei unterschiedlichen Messfrequenzen aufgenommen wurden, eine genauere Bestimmung der Fitparameter.

Im ersten Teil dieses Kapitels sollen die drei Bindungsmodi des Liganden $\mathbf{1}_1$ an WGA in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration untersucht werden. Im zweiten Teil dieses Kapitels sollen die Bindungsmodi des Liganden $\mathbf{2}_1$ untersucht werden, dessen Linker nicht lang genug ist, um gleichzeitig an benachbarte Bindungsstellen im WGA zu binden. Ferner wird im weiteren Verlauf dieses Kapitels angenommen, dass allosterische Kooperativität nur einen geringen Einfluss auf die Ligandenbindung ausübt und damit näherungsweise $\alpha = 1$ gilt. Die Beobachtung des bevorzugten Bindens monovalenter Liganden an nicht benachbarten Bindungsstellen in Kapitel 5 liefert zwar einen Hinweis auf negative allosterische Kooperativität mit $\alpha < 1$. Dennoch ist dieses Zusammenspiel mehrerer Interligandwechselwirkungen im Vergleich zur Chelatwechselwirkung als vernachlässigbar klein einzuschätzen.

6.2 Untersuchung des divalenten Liganden $\mathbf{1}_1$

Für ein System bestehend aus WGA-Dimer und divalentem WGA-Ligand $\mathbf{1}_1$ sind die drei Bindungsmodi divalent gebundener Ligand (Komponente 1), ungebundener Ligand (Komponente 2) und monovalent gebundener Ligand (Komponente 3) möglich. Laut einer theoretische Studie über das Bindungsverhalten divalenter Liganden befinden sich die Populationen der Komponente 1 und Komponente 2 in einem dynamischen Gleichgewicht, wobei die Gleichgewichtslage von der Ligandenkonzentration und von der mikroskopischen effektiven Molarität EM abhängig ist. Wird die Ligandenkonzentration $\mathbf{1}_1$ bei gleichbleibender WGA-Konzentration erhöht, verschiebt sich

das Gleichgewicht von Komponente 1 zugunsten von Komponente 3 und der Parameter EM kann über die Bestimmung des Umschlagpunkts ermittelt werden (siehe Abbildung 11). Um diesen Umschlagpunkt aufzufinden, soll das Speziationsprofil von Ligand $\mathbf{1}_1$ und WGA experimentell bestimmt werden, indem man die prozentualen Anteile der drei Komponenten in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration mit cw-ESR-Spektrenfits untersucht.

Aufgrund der Ergebnisse in Kapitel 5 ist der Umschlagpunkt aber erst bei einem mehrfachen Ligandenüberschuss zu erwarten. Aus diesem Grund wurden Ligand $\mathbf{1}_1$ /WGA-Proben mit den Mischungsverhältnissen 4 : 1, 6 : 1, 8 : 1, 12 : 1 und 16 : 1 hergestellt und jeweils im X-Band und im Q-Band Mobilitätsmessungen durchgeführt. Wie bereits in Abschnitt 6.1 erwähnt, kann man ein cw-ESR-Spektrum von WGA in Gegenwart eines Überschusses von einfach markierten Liganden $\mathbf{1}_1$ als eine Überlagerung der Signale dreier verschiedener Komponenten auffassen. Deshalb sollen die drei Komponenten in separaten Experimenten bestimmt und das Mischspektrum mit einer Linearkombination der gefitteten Einzelspektren simuliert werden.

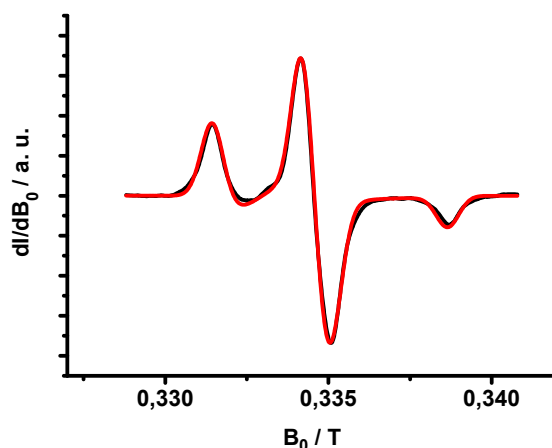


Abbildung 43: X-Band cw-ESR-Spektrum ($T = 120$ K) von $\mathbf{1}_1$ bei einem Ligand/WGA-Verhältnis von 1 : 8 (schwarz) mit Simulation (rot). Die Simulation lieferte die Hauptwerte des Hyperfeintensors der Komponente 1.

Das cw-ESR-Spektrum von Komponente 1 ist problemlos zugänglich, da $\mathbf{1}_1$ bereits bei äquimolarem Ligand/WGA-Verhältnis quantitativ bindet und somit keine größeren Anteile der Komponenten 2 und 3 zu erwarten sind. In Abbildung 44, oben sind die X-Band (links) und Q-Band (rechts) cw-ESR-Spektren (schwarz) bei einem $\mathbf{1}_1$ /WGA-Verhältnis von 1 : 1 dargestellt. Die detaillierten Linienformen beide Spektren lassen auf eine Spinmarkerdynamik schließen, die nicht mit isotroper brownischer Rotationsdiffusion beschrieben werden kann. Vielmehr wird die Ni-

troxiddynamik durch das WGA-Protein eingeschränkt, da die Spinmarkerseitenkette aufgrund der proteininternen Topologie nur bestimmte Konformationen annehmen kann. Im Gegensatz dazu führt das WGA-Protein als Ganzes eine isotrope Rotationsbewegung aus. Zur Beschreibung dieses Systems mit mikroskopischer Ordnung und makroskopischer Unordnung wurde das MOMD-Modell angewendet (siehe Abschnitt 3.1).

Für eine vollständige Beschreibung des X-Band und Q-Band Spektrums mittels MOMD-Simulation ist die Bestimmung folgender Parameter notwendig: g-Tensor (g_{xx} , g_{yy} , g_{zz}), Hyperfeintensor (A_{xx} , A_{yy} , A_{zz}), axialsymmetrische Rotationskorrelationszeit (τ_{\perp} , τ_{\parallel}), Orientierungsparameter (λ_{20} , λ_{22} , λ_{40}) und Linienbreite (lw). Ein wesentlicher Teil dieser Parameter wurde jedoch nicht aus den beiden Spektren hergeleitet, sondern mit Hilfe von Vorexperimenten ermittelt oder der Literatur entnommen. Diese Parameter gehen als unveränderliche Größen in die Spektrensimulation mit ein und werden somit nicht mitgefittet. Die g-Werte eines Fünfring-Nitroxidderivats wurden bereits bei einer Hochfrequenz-ESR Studie im W-Band untersucht und konnten daher in guter Näherung direkt aus der Literatur übernommen werden^[150]. Diese Praxis ist für paramagnetische Zentren mit gleichen lokalen Molekülstrukturen zulässig, da der g-Tensor hauptsächlich von dem Atomorbital abhängig ist, in dem sich das ungepaarte Elektron befindet. Der g-Tensor mit $g_{xx} = 2,0095$, $g_{yy} = 2,0091$ und $g_{zz} = 2,0027$ wurde nicht nur für die Spektren der Komponente 1, sondern auch für alle anderen Spektren in diesem Kapitel verwendet. Auch die Linienbreite lw wurde nicht in die Fitroutine miteinbezogen, da sie neben Relaxationsprozessen (homogene Linienbreite) noch zusätzlich von unaufgelösten anisotropen Wechselwirkungen (inhomogene Linienbreite) bestimmt wird. Deshalb wurde sie als einziger Parameter für das X-Band und Q-Band Spektrum separat optimiert und während des anschließenden Fitprozesses konstant gehalten. Weiterhin konnte der Hyperfeintensor von Komponente 1 aus einer Tieftemperatur-cw-ESR-Messung im X-Band ermittelt werden (Abbildung 43). Festkörperspektren im X-Band sind zur Bestimmung des Hyperfeintensors ideal geeignet, da sie eine maximale anisotrope Linienverbreiterung aufweisen, die von der Hyperfeinwechselwirkung dominiert wird. Die Simulation (rot) des experimentellen Spektrums (schwarz) lieferte mit $A_{xx} = A_{yy} = 13,14$ MHz und $A_{zz} = 100,62$ MHz eine axialsymmetrische Hyperfeinwechselwirkung.

Im Gegensatz zu der Rotationskorrelationszeit und den Orientierungsparametern wurden bei der Simulation des X- und Q-Band Spektrums in Abbildung 44, oben also weder der g- oder Hyperfeintensor noch die Linienbreite gefittet. Dem Fitergebnis in Tabelle 4 ist zu entnehmen, dass die beiden Spektren mit zwei Parametersätzen beschrieben werden können. In Anbetracht der acht unterschiedlichen Bindungsstellen pro WGA-Dimer war zu erwarten, dass sich die Mobilität und Orientierungsabhängigkeit der Komponente 1 nicht nur mit einem Parametersatz beschreiben lässt, da sich die Karbohydrat-erkennenden Domänen zum Teil deutlich voneinander

unterscheiden. Unter Berücksichtigung der zehnfach stärkeren Bindungsaffinität der primären Bindungsstellen^[50], kann man jedoch bei diesen Bedingungen das Binden an sekundäre Bindungsstellen nahezu ausschließen und von einer quantitativen Bindung an die vier primären Bindungsstellen ausgehen.

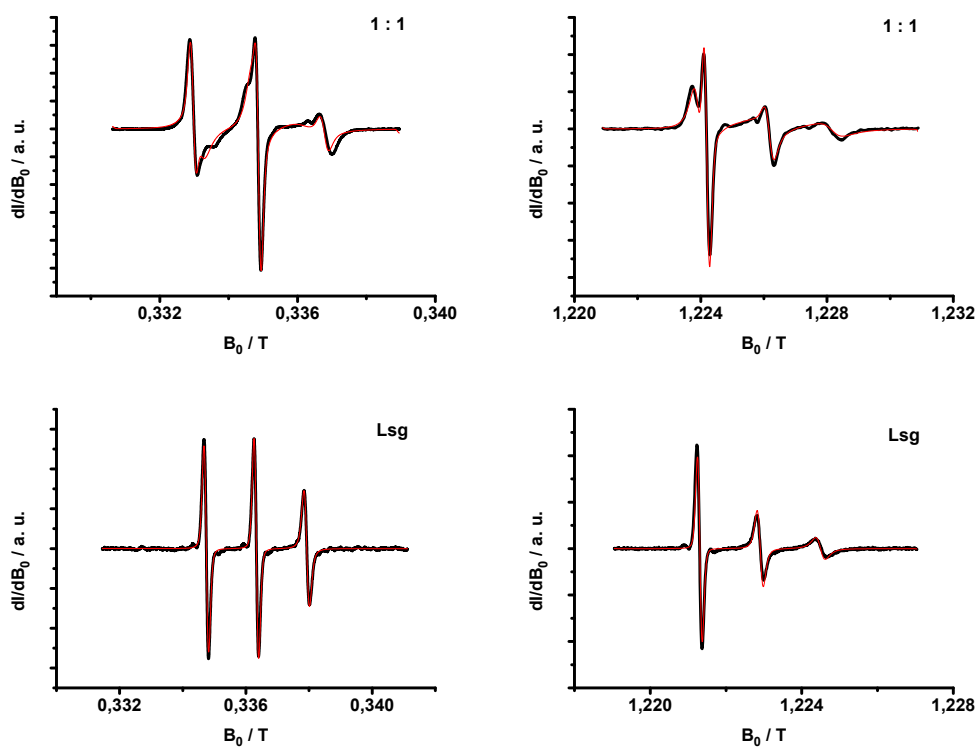


Abbildung 44: Oben: X-Band (links) und Q-Band (rechts) cw-ESR-Spektren ($T = 295$ K) von $\mathbf{1_1}$ bei einem Ligand/WGA-Verhältnis von 1 : 1 (schwarz) mit Simulation (rot). Die simultane Simulation der Spektren lieferte die Parametersätze zur Beschreibung der Komponente 1.

Unten: X-Band (links) und Q-Band (rechts) cw-ESR-Spektren ($T = 295$ K) von $\mathbf{1_1}$ in Abwesenheit von WGA (schwarz) mit Simulation (rot). Die simultane Simulation der Spektren lieferte die Parametersätze zur Beschreibung der Komponente 2.

Die Mobilität der Nitroxidspinsonden konnte mit einer axialsymmetrischen Rotationskorrelationszeit beschreiben werden, deren zwei Diffusionskonstanten sich um mehr als eine Größenordnung voneinander unterscheiden. Diese Beobachtung konnte schon bei verschiedenen ESR-Studien über spinmarkierte Makromoleküle gemacht werden und lässt sich mit der deutlich größeren Rotationsdiffusion (kurze Rotationskorrelationszeit) entlang der Achse zwischen Makro-

	Parametersatz 1	Parametersatz 2	Einheit
$[A_{xx} A_{yy} A_{zz}]$	[13,14 13,14 100,62]	[13,14 13,14 100,62]	MHz
$[\tau_{\perp} \tau_{\parallel}]$	[0,11 4,88]	[0,58 7,46]	ns
[lw]	0,156 (0,206)	0,110 (0,570)	mT
$[\lambda_{20} \lambda_{22} \lambda_{40}]$	[1,217 1,871 1,398]	[2,484 4,113 0,965]	/

Tabelle 4: Parametersätze zur Beschreibung der cw-ESR-Spektren bei einem Ligand/Protein-Verhältnis von 1 : 1 (Abbildung 44, oben). Das Verhältnis der Parametersätze liegt bei 3,7 : 1 und in den runden Klammern sind die Linienbreiten für das Q-Band Spektrum angegeben.

molekül und Spinmarker erklären. Im Vergleich dazu ist die Rotationskorrelationszeit senkrecht zu dieser Achse merklich geringer (lange Rotationskorrelationszeit), da hier effektiv ein größerer hydrodynamischer Radius vorliegt (vgl. Gleichung (47)). Die Beträge der Koeffizienten λ_{20} , λ_{22} , λ_{40} lassen auf eine hohe Orientierungsabhängigkeit der Spinmarkerseitenkette und auf eine erhebliche Einschränkung der Seitenkettenkonformation durch die lokale Struktur des WGA-Proteins schließen.

Ähnlich wie bei der Komponente 1 sind auch die cw-ESR-Spektren der Komponente 2 experimentell problemlos zugänglich, da hierfür lediglich eine Messung Ligand **1** in Abwesenheit von WGA erforderlich ist. In Abbildung 44, unten sind die Messungen (schwarz) im X-Band (links) und im Q-Band (schwarz) mit den jeweiligen Simulationen (rot) dargestellt. Das X-Band Spektrum weist mit seinen drei schmalen Linien mit annähernd gleichen Intensitäten die typischen Merkmale schneller rotatorischer Diffusion auf, während die drei Linien im Q-Band breiter sind und sich in ihren Intensitäten deutlich voneinander unterscheiden. Verglichen mit dem X-Band-Spektrum befindet sich das Q-Band Spektrum in einem langsameren Mobilitätsbereich in dem die Linienform stärker von den dynamischen Prozessen abhängig ist und daher die Mobilität des Nitroxids besser aufgelöst wird. An diesem Beispiel ist klar zu sehen, dass eine höhere Frequenz besser geeignet ist, um schnelle Dynamiken zu analysieren. Die simultane Auswertung beider Spektren ergab eine nahezu ideale Simulation. Kleinere Abweichungen am Fuße der Linien sind auf ^{13}C -Satelliten zurückzuführen und haben keine nennenswerten Einfluss auf die Qualität des Spektrenfits. Bei dem Ligand **1** in Lösung konnte der Bewegungsprozess mit einer isotropen Rotationsdiffusion beschrieben werden. Weiterhin ergab die Simulation der Hyperfeinwechselwirkung einen axialsymmetrischen A-Tensor (siehe Komponente 2, Tabelle 5).

Die Bestimmung des cw-ESR-Spektrums von Komponente 3 war verglichen mit den Komponenten 1 und 2 mit größerem Aufwand verbunden. Wie bereits in Abschnitt 6.1 erwähnt, muss die Dynamik dieses Bindungszustands mit Hilfe des monovalenten Liganden **2** imitiert werden, da

ein solcher Bindungsmodus bei moderaten Ligandenkonzentrationen nicht zu erwarten ist. Allerdings erwartet man gemäß den Ergebnissen der enzymgekoppelten Lektinbindungstests^[8] für ein monovalent bindenden Liganden wie **23** eine deutlich geringere Bindungsaffinität, als für divalente Liganden. Dementsprechend liegt selbst bei einem Proteinüberschuss ein Mischspektrum vor, das sich aus dem Signal gebundener Liganden **23** und ungebundener Liganden **23** zusammensetzt. In Abbildung 45 (oben) sind die auf das Doppelintegral normierten Mobilitätsmessungen im X-Band (links, rot) und im Q-Band (rechts, rot) bei einem Ligand/Protein-Verhältnis von 1 : 8 dargestellt. Zum Vergleich sind die cw-ESR-Spektren von **23** in Abwesenheit von WGA in den gleichen Schaubildern eingezeichnet (schwarz). Zwischen den roten und den schwarzen Linien besteht ein deutlicher Intensitätsunterschied, da die Messungen mit WGA neben einer Fraktion ungebundener Liganden eine verlangsamte, monovalent gebundene Fraktion aufweist, die zu einem Dreilinienspektrum mit größeren Linienbreiten und geringeren Signalintensitäten führt. Zur Bestimmung der Komponente 3 muss daher vor der Linienformanalyse das Signal der gebundenen Fraktion von dem Signal der ungebundenen Fraktion separiert werden.

Betrachtet man das Spektrum von Ligand **23** in Anwesenheit von WGA, $S(WGA)$, als Überlagerung der zwei Signale gebundener Ligand $S(GEB)$ und ungebundener Ligand $S(UNG)$ ist es möglich, mit einer Linearkombination gemäß

$$S(WGA) - a \cdot S(UNG) = (1 - a) \cdot S(GEB) \quad (48)$$

das Signal $S(GEB)$ zu extrahieren, da sowohl $S(WGA)$, als auch $S(UNG)$ bekannt sind. Zur Bestimmung des optimalen a -Parameters wurden von $a = 0$ bis $a = 1$ in 0,1 Abständen Linearkombinationen durchgeführt und die resultierenden Linienformen durch einen Fit der Rotationskorrelationszeit simuliert. Die Parameter lw und A_{ZZ} wurden nur zu Beginn optimiert und bei den Fits der Linearkombinationen durchweg konstant gehalten. Die mittlere quadratische Fehlerabweichung zwischen der Linearkombination und der Simulation der Linearkombination wurde für das X-Band (Abbildung 45, mitte, links) und Q-Band (Abbildung 45, mitte, rechts) in Abhängigkeit von dem a -Parameter in einem Schaubild aufgetragen. Beiden Schaubildern ist zu entnehmen, dass für $a \approx 0,3$ bezüglich der Fehlerabweichung ein Minimum erreicht wird. Der Anteil des monovalent gebundenen Liganden **23** in Gegenwart eines achtfachen molaren Überschusses an WGA beträgt somit 70 %, während 30 % des Liganden ungebunden vorliegen. Die Auftragung der Absorptionsspektren für $a = 0$ bis $a = 0,7$ spricht für dieses Ergebnis (Abbildung A70): Es ist klar zu erkennen, dass sowohl im X-Band, als auch im Q-Band die Absorptionsspektren für die Linearkombinationen $a > 0,6$ negative Werte annehmen. Der Anteil der ungebundenen Fraktion muss somit deutlich unterhalb von 60 % liegen, um eine negative Absorption zu vermeiden.

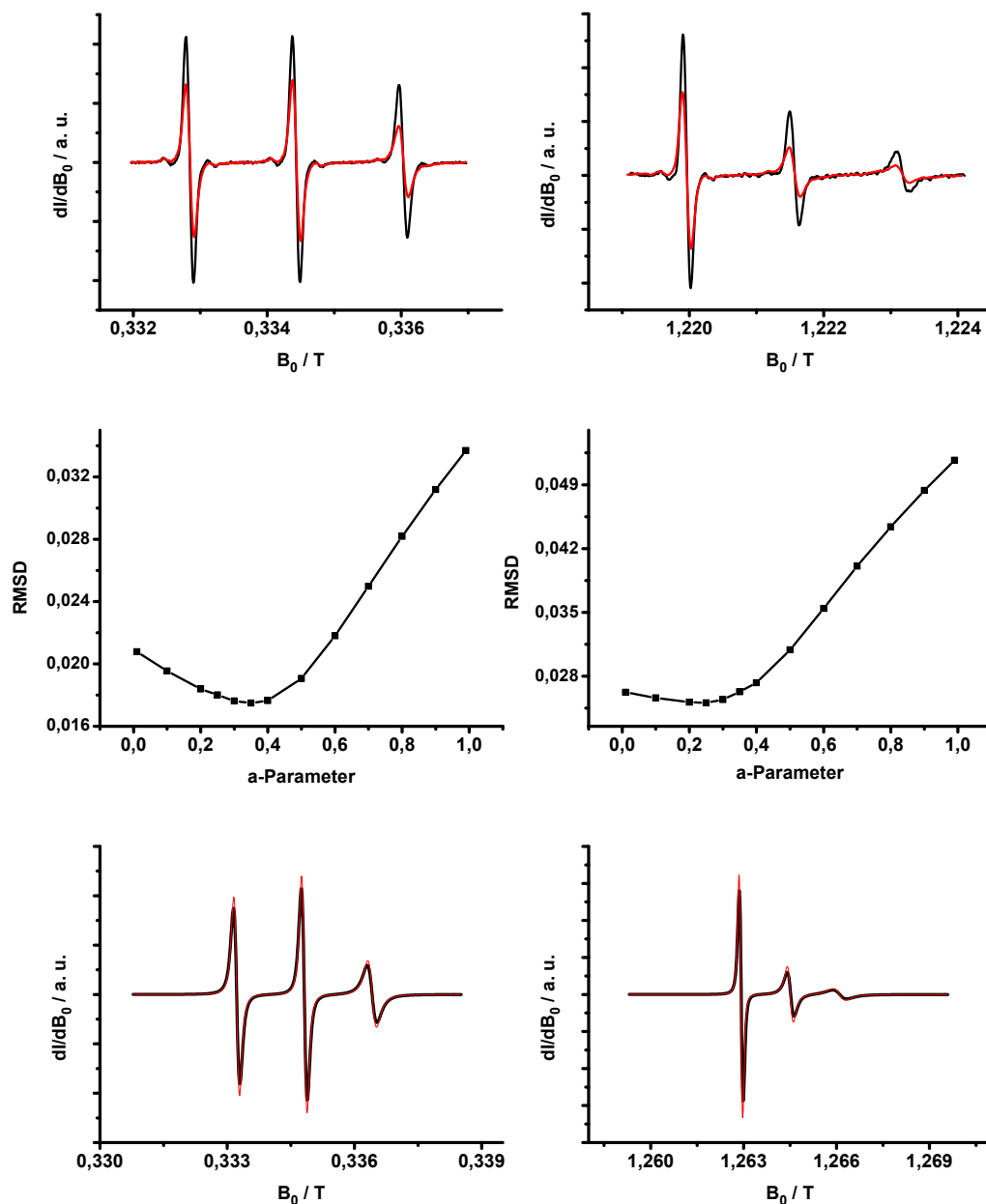


Abbildung 45: Oben: Vergleich der normierten X-Band (links) und Q-Band (rechts) cw-ESR-Spektren ($T = 295$ K) von **23** bei einem Ligand/WGA-Verhältnis von 1 : 8 (rot) und in Abwesenheit von WGA (schwarz). Mitte: Auftragung der Fehlerabweichung zwischen der Linearkombination $S(\text{WGA}) - a \cdot S(\text{UNG})$ und der Simulation der Linearkombination in Abhängigkeit von dem a -Parameter. Unten: Linienformen von $S(\text{GEB})$ nach Gleichung (48) mit $a = 0,3$ (schwarz) im X-Band (links) und im Q-Band (rechts). Diese Linienformen entsprechen dem cw-ESR-Spektrum der Komponente 3. Die simultane Simulation dieser Spektren lieferte den Parametersatz zur Beschreibung der Komponente 3.

In der Abbildung 45, unten sind die Linienformen des a-Parameters mit der kleinsten Fehlerabweichung ($a = 0,3$) für das X-Band (links) und Q-Band (rechts) dargestellt. Diese Linienformen können auch als die cw-ESR-Spektren eines quantitativ monovalent bindenden Liganden **1₁** aufgefasst werden (Komponente 3). Verglichen mit den Linienformen der Komponente 2 (Abbildung 44, unten), weist die Komponente 3 eine deutlich langsamere rotatorische Diffusion auf, da die Linien breiter sind und sich die Signalintensitäten des Tieffeld-, Mittelfeld- und Hochfeldpeaks stärker unterscheiden. Tatsächlich ergab der simultane Spektrenfit eine Rotationskorrelationszeit, die um einen Faktor zwei länger ist als die der Komponente 2, während sich die Fitparameter A_{zz} kaum voneinander unterscheiden (Tabelle 5). Analog zu der Komponente 2, kann die Dynamik von Komponente 3 in guter Näherung mit einer isotropen Rotationsbewegung beschrieben werden.

Im ersten Teil dieses Abschnitts wurden die cw-ESR-Spektren der drei Komponenten divalent gebundener Ligand, ungebundener divalenter Ligand und monovalent gebundener divalenter Ligand in separaten Experimenten bestimmt und mittels Spektrensimulation vollständig beschrieben. Mit diesen Parametersätzen können die Populationen der drei Bindungsmodi für beliebige Ligand/WGA-Mischungsverhältnisse ermittelt werden, indem man lediglich die prozentualen Anteile der Komponenten fittet. Es ist jedoch zu beachten, dass man für den Bindungsmodus der Komponente 3 zwei unterschiedliche ESR-Signale erhält: Ein Experiment in Abschnitt 6.3 (Abbildung 58) zeigt, dass die Bindungsaffinität der GlcNAc-Reste von der Nitroxidmarkierung nicht beeinflusst wird und statistisch etwa genauso viele nitroxidmarkierte wie nicht-nitroxidmarkierte Zuckerreste in der gebundenen bzw. ungebundenen Position zu erwarten sind. Somit setzt sich das Spektrum dieses Bindungsmodus zur Hälfte aus dem Signal der Komponente 1 und zur anderen Hälfte aus dem Signal der Komponente 3 zusammen.

Insgesamt wurden fünf Proben mit den Ligand/Protein-Verhältnissen 4 : 1, 6 : 1, 8 : 1, 12 : 1 und 16 : 1 hergestellt und jeweils im X-Band (Abbildung 46 und 47, links) und im Q-Band (Abbildung 46 und 47, rechts) Mobilitätsmessungen durchgeführt. Die experimentellen Spektren (schwarz) bei allen Mischungsverhältnissen wurden simuliert (rot). An den Linienformen ist deutlich zu sehen, dass mit ansteigendem Ligandenüberschuss die breiten Linien des gebundenen Liganden fast vollständig von dem intensitätsstarken Dreilinienspektrum des ungebundenen Liganden überlagert werden. Ab einem Ligand/Protein-Verhältnis von etwa 12 : 1 dominiert das Signal des ungebundenen Liganden die Signale der anderen Bindungsmodi. Das Ergebnis der Spektrensimulationen aller fünf Proben ist in Tabelle 6 aufgeführt: Es sind die prozentualen Anteile der drei Komponenten divalent gebundener Ligand (Komponente 1), ungebundener Ligand (Komponente 2) und monovalent gebundener Ligand (Komponente 3) für alle Ligand/Protein-Verhältnisse aufgelistet.

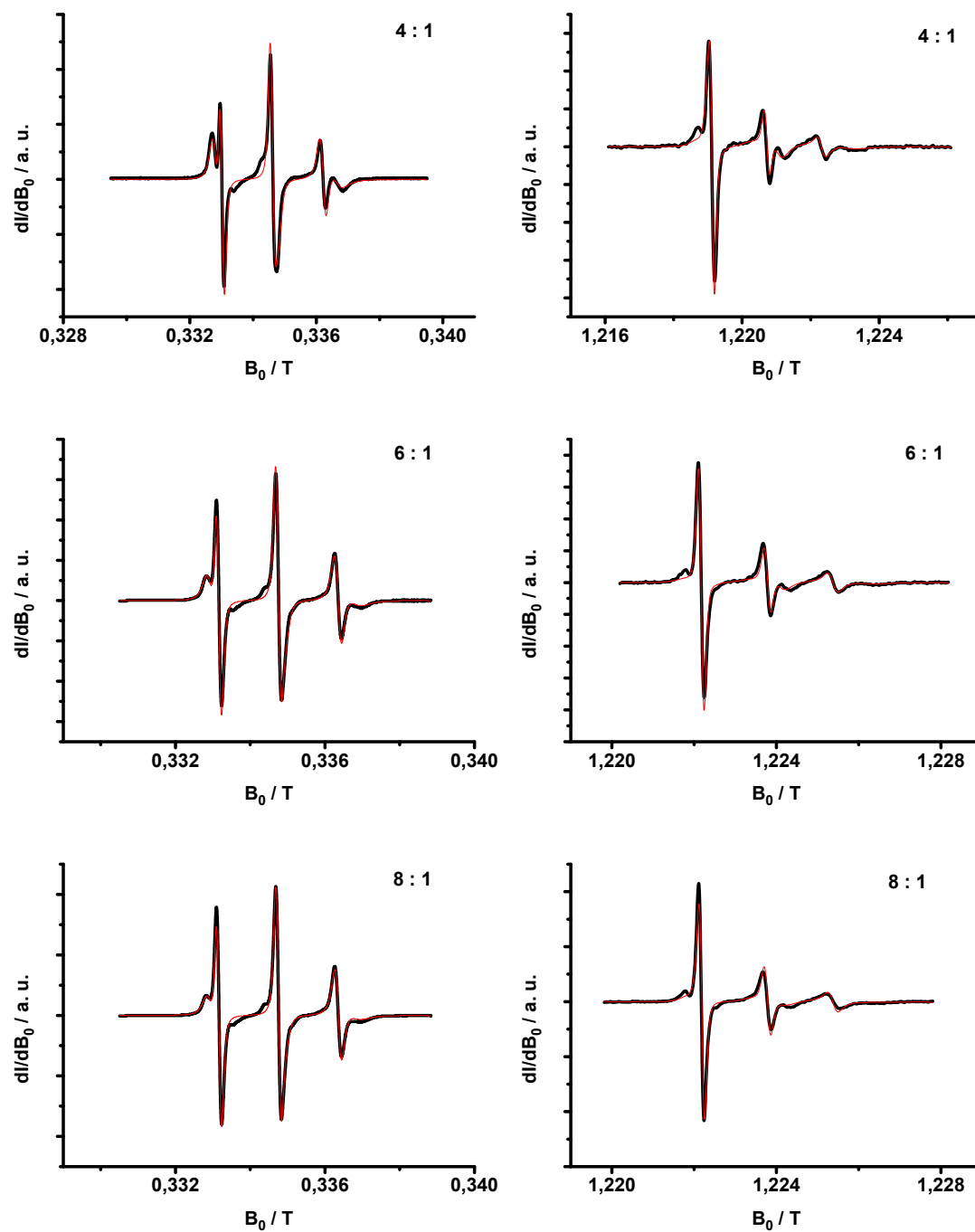


Abbildung 46: Cw-ESR-Spektren ($T = 295$ K) von 1_1 (schwarz) mit Simulation (rot) bei einem Ligand/WGA-Verhältnis von 4 : 1 (oben), 6 : 1 (mitte) und 8 : 1 (unten). Die simultane Simulation der X-Band (links) und Q-Band Spektren (rechts) erfolgte durch einen Fit der prozentualen Anteile der drei Komponenten in Tabelle 5.

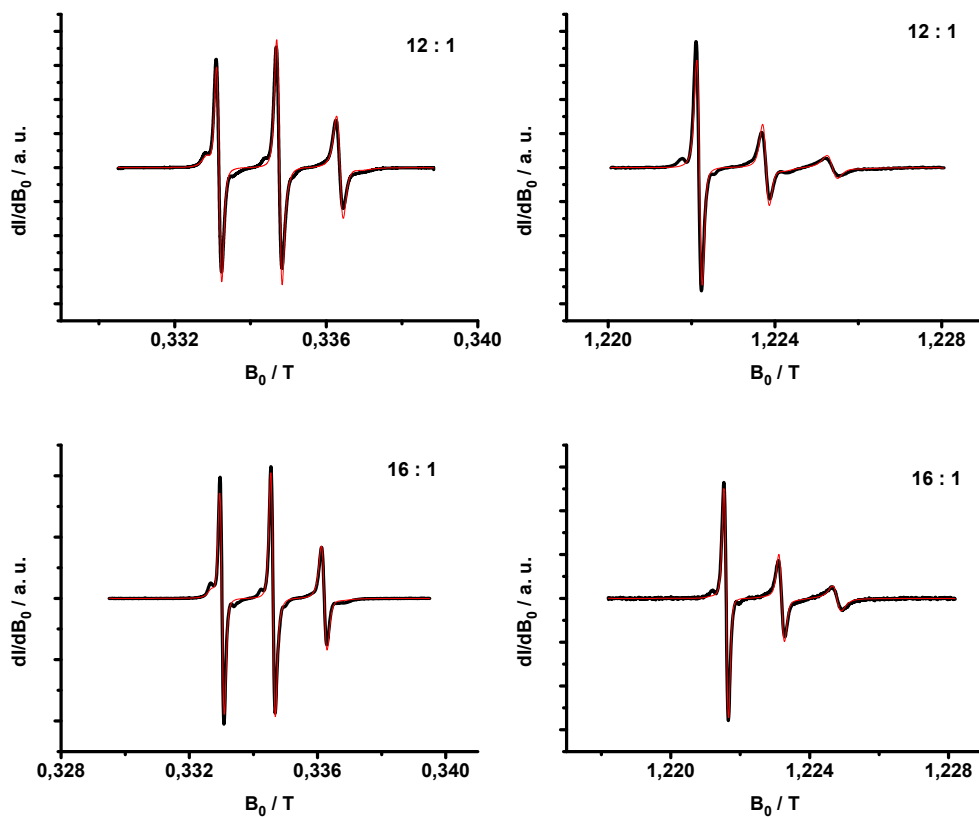


Abbildung 47: Cw-ESR-Spektren ($T = 295$ K) von $\mathbf{1}_1$ (schwarz) mit Simulation (rot) bei einem Ligand/WGA-Verhältnis von 12 : 1 (oben) und 16 : 1 (unten). Die simultane Simulation der X-Band (links) und Q-Band Spektren (rechts) erfolgte durch einen Fit der prozentualen Anteile der drei Komponenten in Tabelle 5.

Geht man davon aus, dass die Bindungswahrscheinlichkeit des spinmarkierten und nicht spinmarkierten Ende von Ligand $\mathbf{1}_1$ gleich ist, erwartet man für den Anteil der Komponente 3 einen gleich großen Anteil der Komponente 1. Aus diesem Grund ist die Population der monovalent bindenden Liganden immer doppelt so groß, wie der prozentuale Anteil von Komponente 3. Dieser Faktor zwei wurde für die Fitergebnisse in Tabelle 6 nicht berücksichtigt.

	Komponente 1		Einheit
$[A_{xx} A_{yy} A_{zz}]$	[13,14 13,14 100,62]	[13,14 13,14 100,62]	MHz
$[\tau_{\perp} \tau_{\parallel}]$	[0,24 4,88]	[0,55 7,46]	ns
[lw]	0,099 (0,428)	0,188	mT
$[\lambda_{20} \lambda_{22} \lambda_{40}]$	[1,144 2,170 0,011]	[0,872 0,686 0,435]	/

	Komponente 2	Komponente 3	Einheit
$[A_{xx} A_{yy} A_{zz}]$	[13,0 13,0 108,44]	[13,14 13,14 108,85]	MHz
τ	0,23	0,46	ns
lw	0,132	0,104	mT

Tabelle 5: Parametersätze der drei Komponenten. Das Verhältnis der Parametersätze für Komponente 1 liegt bei 1 : 2,1 und in den runden Klammern ist die Linienbreite des Q-Band Spektrums angegeben. Mit diesen Parametersätzen wurden die Spektren mit den Ligand/WGA-Mischungsverhältnissen 4 : 1, 6 : 1, 8 : 1, 12 : 1 und 16 : 1 simuliert.

Ligand/WGA	Komponente 1	Komponente 2	Komponente 3
1 : 0	0 %	99 %	1 %
4 : 1	75 %	23 %	2 %
6 : 1	63 %	35 %	2 %
8 : 1	50 %	46 %	4 %
12 : 1	35 %	63 %	2 %
16 : 1	27 %	72 %	1 %

Tabelle 6: Prozentuale Anteile der drei Komponenten für die Mischspektren mit unterschiedlichen Ligand/Protein-Verhältnissen. Das Ligand/Protein-Verhältnis 1 : 0 entspricht der Messung Ligand in Abwesenheit von WGA.

Die prozentualen Anteile der drei Komponenten in Abhängigkeit von dem Ligand/Protein-Verhältnis geben ein klares Bild ab. Während der Anteil von Komponente 1 mit ansteigendem Ligandenüberschuss sinkt, steigt der Anteil von Komponente 2 kontinuierlich an und erreicht bei einem Ligand/Protein-Verhältnis von 16 : 1 etwa 72 %. Im Gegensatz dazu bleibt der Anteil von Komponente 3 fast unverändert und schwankt zwischen 1 % und 4 %. Übertragen auf das System $\mathbf{1}_1$ /WGA bedeutet dieses Ergebnis, dass der divalente Ligand $\mathbf{1}_1$ bis zu einem Ligand/Protein-Verhältnis von 16 : 1 fast ausschließlich überbrückend an das WGA-Dimer bindet und den Bin-

Modus monovalent gebundener divalenter Liganden nahezu komplett verdrängt. Proben mit einem Ligand/Protein-Verhältnis größer als 16 : 1 lieferten keine reproduzierbaren Fitergebnisse mehr, da das starke Signal ungebundener Liganden eine Auswertung des schwachen Signals gebundener Liganden nicht zulässt. Die prozentualen Anteile aller Dreikomponentenfits sind in dem Säulendiagramm in Abbildung 48 zusammengefasst, wobei zur Kontrolle auch die cw-ESR-Spektren von 1_1 in Abwesenheit von WGA mit den drei Komponenten gefittet wurden (1 : 0 Säule). Wie zu erwarten ergab der Spektrenfit einen annähernd hundertprozentigen Anteil der Komponente 2.

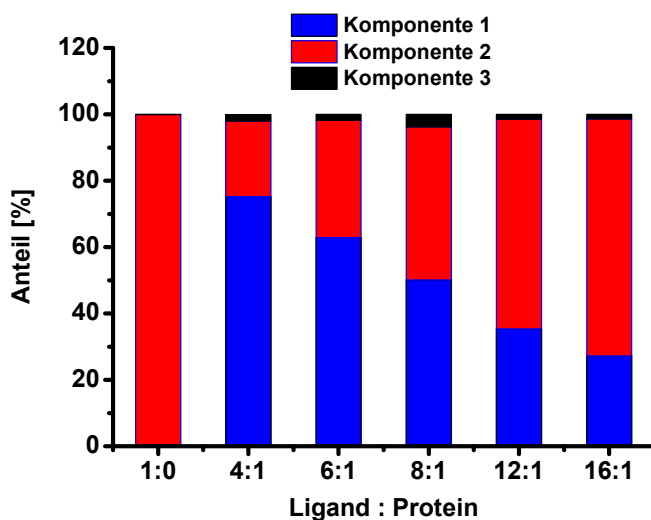


Abbildung 48: Prozentuale Anteile der drei Komponenten in Abhängigkeit vom Ligand/Protein-Verhältnis (siehe Tabelle 6). Das Ligand/Protein-Verhältnis 1 : 0 entspricht der Messung Ligand in Abwesenheit von WGA.

Für die Proben ab einem Ligand/Protein-Mischungsverhältnis von 4 : 1 können rein statistisch alle Bindungsstellen im WGA-Dimer mit divalenten Liganden besetzt werden, wohingegen für die Probe mit dem Mischungsverhältnis von 1 : 1 statistisch nur zwei von acht Bindungsstellen besetzt werden können. Es ist daher zu erwarten, dass bei den Proben ab dem Mischungsverhältnis von 4 : 1 neben den primären Bindungsstellen auch sekundäre Bindungsstellen mit Liganden besetzt werden. Da sich die Karbohydrat-erkennenden Domänen der primären und sekundären Bindungsstellen strukturell voneinander unterscheiden, mussten die Parameter zur Beschreibung der Komponente 1 entsprechend angepasst werden. Die Anpassung der Parameter von Komponente 1 bei einem Ligand/WGA-Verhältnis von 1 : 1 an die Bedingungen eines Ligand/WGA-Verhältnisses von $\geq 4 : 1$ kann den Tabellen 4 und 5 entnommen werden.

Das Fitergebnis in Abbildung 48 sollte angesichts der niedrigen Anteile von Komponente 3 genauer untersucht werden. Daher wurde überprüft, wie sich eine Erhöhung des prozentualen Anteils von Komponente 3 auf die Fehlerabweichung zwischen dem experimentellen Spektrum und der Simulation auswirkt. Dazu wurden mit den Parametersätzen in Tabelle 5 mehrere Spektren simuliert, wobei die Anteile der Komponenten 2 und 3 dem steigenden Anteil von Komponente 3 entsprechend angepasst wurden. Die Auftragung der mittleren quadratischen Abweichung (rmsd) zwischen diesen Simulationen und den experimentellen Spektren gegen den Anteil der Komponente 3 liefert ein klares Ergebnis (Abbildung A71): Für die Proben mit den Ligand/Protein-Verhältnissen 6 : 1, 8 : 1, 12 : 1 und 16 : 1 steigt die Fehlerabweichung mit steigendem Anteil der Komponente 3 streng monoton an. Dieser Befund spricht für einen sehr geringen Anteil monovalent bindender Liganden.

Signal/Rauschen	Komponente 1	Komponente 2	Komponente 3
400 / 1	39,5 % ± 0,20 %	57,6 % ± 0,31 %	2,9 % ± 0,39 %
100 / 1	40,2 % ± 1,59 %	58,7 % ± 2,55 %	1,1 % ± 1,61 %
50 / 1	42,1 % ± 3,34 %	56,5 % ± 5,88 %	1,4 % ± 2,52 %
20 / 1	35 %	41 %	24 %

Tabelle 7: Abschätzung der Fehlergrenzen in Abhängigkeit vom Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Die Fraktionen der verrauschten Simulation betragen 40 % / 57 % / 3 % (siehe Text).

Eine ausführlichere Interpretation der Linienformanalysen ist aber erst dann möglich, wenn die Präzision des Fitalgorithmus bzw. die Fehlergrenzen der Fitparameter bekannt sind. Deshalb wurden die Reproduzierbarkeit und die Fehlergrenzen der Fitparameter in Abhängigkeit von der Rauschintensität untersucht. Dazu wurde mit den Parametersätzen in Tabelle 5 ein Mischspektrum simuliert, dessen Anteile der drei Komponenten mit 40 % / 57 % / 3 % so gewählt wurden, dass sie ungefähr im Bereich der Fitergebnisse liegen. Anschließend wurde zu den simulierten Spektren ein Boltzmann-verteiltetes Rauschsignal addiert. Insgesamt wurden vier verschiedene Signal-zu-Rausch-Verhältnisse erzeugt: 400/1, 100/1, 50/1, 20/1 (Abbildung 49, schwarz). Um zu prüfen bei welcher Rauschintensität der Algorithmus noch zuverlässige Ergebnisse liefert, wurden diese künstlich verrauschten Simulationen mit den Input-Parametersätzen gefittet (Abbildung 49, rot). Dabei wurden lediglich die prozentualen Anteile der drei Komponenten gefittet, während die Parametersätze selbst unverändert blieben. Die Reproduzierbarkeit der Fitparameter lässt sich abschätzen, indem man die prozentualen Anteile der Komponenten, aus denen sich die verrauschte Simulation zusammensetzt (40 % / 57 % / 3 %), mit dem Fitergebnis vergleicht. Zur Bestimmung der Fehlergrenzen wurden die Simulationen für jedes künstlich verrauschte Spek-

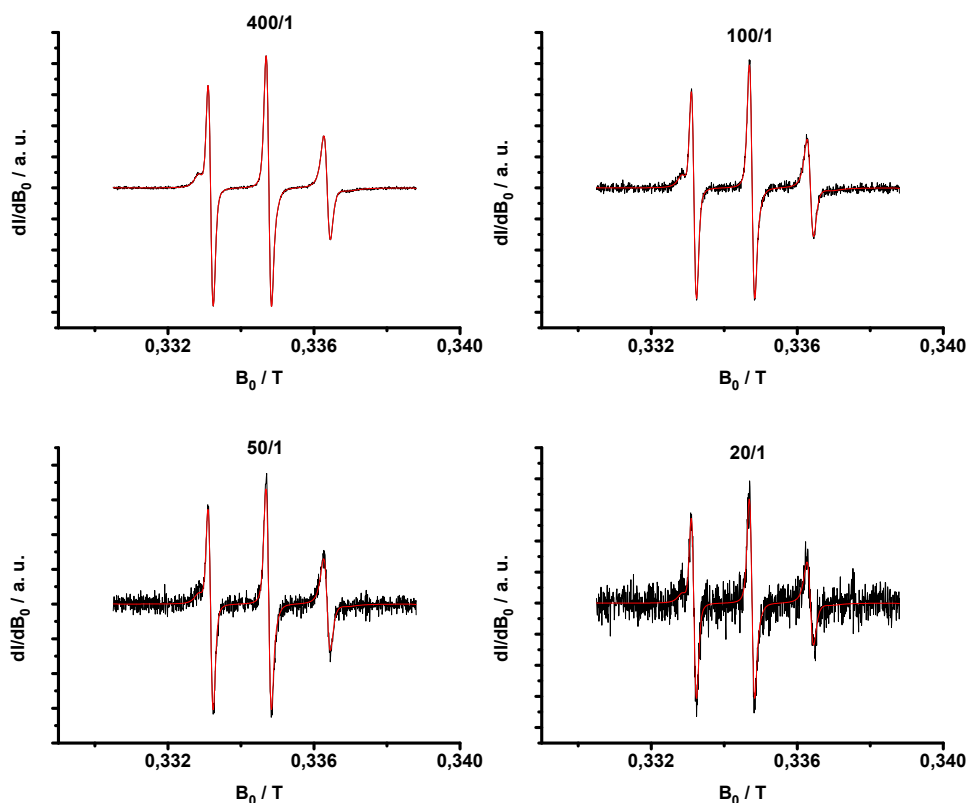


Abbildung 49: Simulierte Spektren mit künstlich erzeugtem Rauschen (schwarz) mit Simulation (rot). Die Signal-zu-Rausch Verhältnisse betragen 400/1 (oben links), 100/1 (oben rechts), 50/1 (unten links) und 20/1 (unten rechts). Es ist zu beachten, dass sich die Angaben zum Signal-zu-Rausch-Verhältnis auf das Verhältnis zwischen der maximalen Signalintensität und der Standardabweichung der Rauschintensität bezieht.

trum mindestens zehn mal wiederholt und für jede der Komponenten die Standardabweichung berechnet. In der Tabelle 7 sind die Fitergebnisse der drei Komponenten mit den jeweiligen Standardabweichungen für alle vier Signal-zu-Rausch-Verhältnisse aufgeführt. Aus der Tabelle geht hervor, dass die drei Input-Parameter bis zu einem Signal-zu-Rausch-Verhältnis von 50/1 mit einer Abweichung von wenigen Prozent reproduziert werden können und die Standardabweichung von 0,3 % - 0,4 % (400/1) auf 2,5 % - 5,8 % (50/1) ansteigt. Erst bei einem Signal-zu-Rausch-Verhältnis von 20/1 ist das Rauschen so groß, dass der Fitalgorithmus kein verlässliches Ergebnis mehr liefern kann. Auf die Angabe einer Standardabweichung wurde in diesem Fall verzichtet.

Eine Abschätzung des Signal-zu-Rausch-Verhältnis der *experimentellen* Spektren ergibt in etwa 500/1 für die Messungen im X-Band und 100/1 für die Messungen im Q-Band. Unter Be-

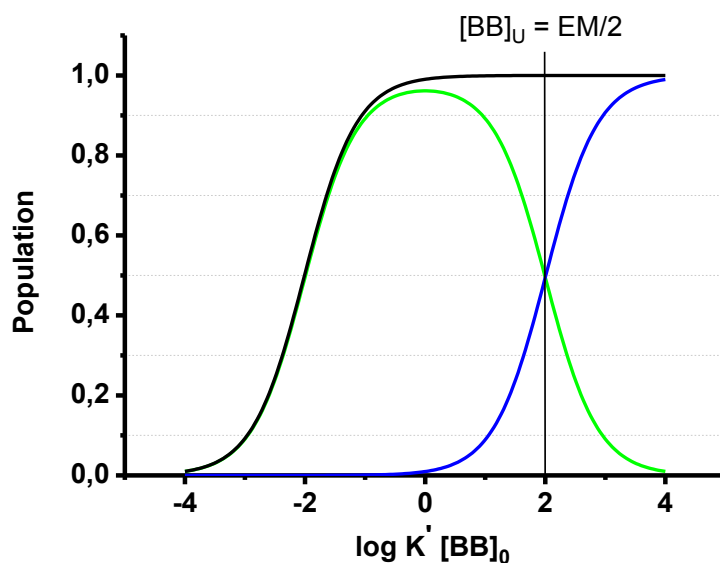


Abbildung 50: Speziationsprofil für die Wechselwirkung zwischen divalenten Liganden und divalenten Rezeptoren mit $KEM = 100$. In dem Schaubild ist die überbrückend bindende Spezies (grün), die monovalent gebundene Spezies (blau) und Bindungsstellenbesetzung Θ (schwarz) eingezeichnet. In dem gepunkteten Konzentrationsbereich findet fast ausschließlich überbrückendes Binden statt.

rücksichtigung der Standardabweichungen in Tabelle 7 kann man daher für die Fitergebnisse in Abbildung 48 von einem Fehler im Bereich von 2 % - 3 % ausgehen. Gemäß dieser Abschätzung liegt der Anteil von Komponente 3 weitestgehend innerhalb der Fehlertoleranz. Überdies ist bezüglich der Entwicklung des prozentualen Anteils von Komponente 3 in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration keine klare Tendenz erkennbar, da der Anteil zunächst von 2 % (Ligand/Protein = 4 : 1) auf 4 % (Ligand/Protein = 8 : 1) ansteigt, um dann wieder auf 1 % (Ligand/Protein = 16 : 1) zu fallen. Diese Ergebnisse sprechen für einen ausschließlich überbrückend bindenden Liganden $\mathbf{1}_1$ und gegen eine bedeutsame Population monovalent bindender Liganden $\mathbf{1}_1$.

Das Speziationsprofil für die Wechselwirkung zwischen divalenten Liganden und divalenten Rezeptoren in Abbildung 50 kann Aufschluss darüber geben, warum der divalente Ligand $\mathbf{1}_1$ bis zu einem Ligand/Protein-Verhältnis von 16 : 1 nicht signifikant monovalent bindet. Aufgrund dominanter Chelatwechselwirkungen ist der Bindungsmodus des überbrückend bindenden Li-

ganden über einen breiten Konzentrationsbereich die vorherrschende Spezies (grün) und erst bei einem hohen Ligandenüberschuss wird dieser Zustand von dem monovalent bindenden Liganden verdrängt (blau). Da das „Umschalten“ zwischen diesen beiden Zuständen innerhalb eines kleinen Konzentrationsfensters stattfindet, liegt bei einer Ligandenkonzentration $\mathbf{1}_1$, die deutlich kleiner als $[\mathbf{1}_1]_{\text{U}} = \text{EM}/2$ ist, keine nennenswerte Population monovalent gebundener divalenter Liganden vor. Es ist also naheliegend, dass selbst bei einem Ligand/Protein-Verhältnis von 16 : 1 die Konzentration von $\mathbf{1}_1$ unterhalb von $\text{EM}/2$ liegt (gepunkteter Bereich) und deswegen fast ausschließlich das ESR-Signal von divalent gebundenen und ungebundenen Liganden detektiert wurde. Die mikroskopische effektive Molarität EM liegt für das System $\mathbf{1}_1$ /WGA ausserhalb des Zugänglichkeitsbereich der cw-ESR-Spektroskopie, da die starken Chelatwechselwirkungen sehr hohe Ligandenkonzentrationen erforderlich machen. Bei diesen Bedingungen werden die schwachen Signale der gebundenen Liganden von den starken Signalen ungebundener Liganden komplett überlagert, was zur Folge hat, dass eine reproduzierbare Linienformanalyse der cw-ESR-Spektren nicht mehr möglich ist. Ungeachtet davon haben ESR-spektroskopische Methoden prinzipiell das Potential den mikroskopischen Parameter EM zu bestimmen und chelatbedingte Kooperativität zu charakterisieren, solange die Chelatwechselwirkungen in diesem System nicht zu stark ausgeprägt ist.

Ungeachtet davon, kann aus den vorliegenden ESR-Daten abgeschätzt werden, wie groß der EM-Parameter für das System $\mathbf{1}_1$ /WGA mindestens sein muss. Da die Ligandenkonzentration für die Probe mit dem größten Ligand/WGA-Verhältnis bekannt ist (16 : 1, $[\mathbf{1}_1] = 800 \mu\text{M}$), kann über die Beziehung $[\text{BB}]_{\text{U}} = \text{EM}/2$ dieser Wert auf $\text{EM} > 1600 \pm 48 \mu\text{M}$ abgeschätzt werden. Gleichzeitig legt dieser EM-Wert die Obergrenze des Konzentrationsbereichs fest, in dem EM mit ESR-spektroskopischen Methoden analysiert werden kann.

6.3 Untersuchung des divalenten Liganden $\mathbf{2_1}$

In diesem Abschnitt sollen die Bindungsmodi des divalenten WGA-Liganden $\mathbf{2_1}$ untersucht werden, dessen Linker nicht lang genug ist, um chelatisierend an WGA zu binden (siehe Kapitel 5). Im Gegensatz zum Liganden $\mathbf{1_1}$ erwartet man hier kein Gleichgewicht zwischen den in Abbildung 41 gezeigten Bindungsmodi, sondern einen ausschließlich monovalent bindenden Liganden. Man rechnet auch für $\mathbf{2_1}$ in Gegenwart von WGA mit drei verschiedenen Beiträgen, aus denen sich das cw-ESR-Spektrum zusammensetzt: Das Signal des gebundenen Ende eines monovalent bindenden Liganden (Komponente 1), das Signal des ungebundenen Ende eines monovalent bindenden Liganden (Komponente 3) und das Signal der ungebundenen Liganden (Komponente 2). Nimmt man dabei an, dass die Bindungsaffinität des nitroxidmarkierten und nicht-nitroxidmarkierten Ende gleich ist, sollten auch die prozentualen Anteile von Komponente 1 und Komponente 3 gleich groß sein. Die Spektrensimulation würde sich in diesem Fall erheblich vereinfachen, da das Verhältnis zwischen den Komponenten 1 und 3 konstant bleibt und nur noch der Anteil von Komponente 2 zu bestimmen wäre.

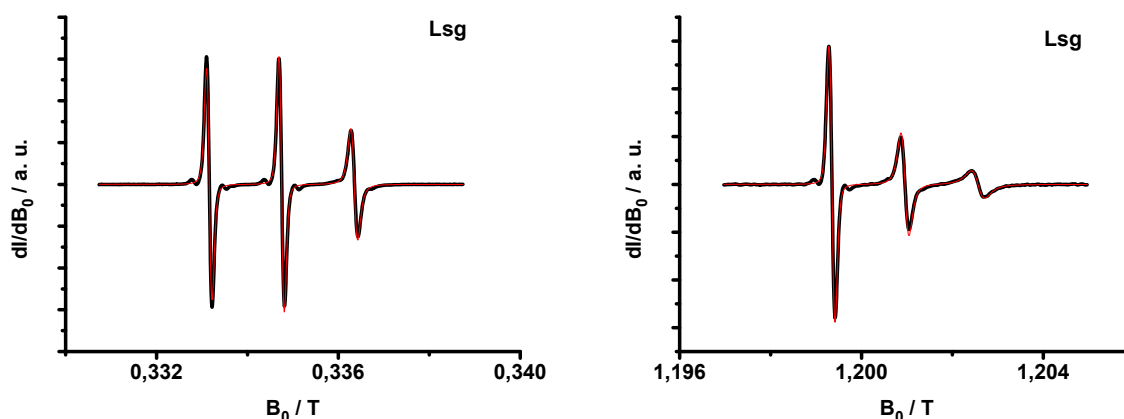


Abbildung 51: X-Band (links) und Q-Band (rechts) cw-ESR-Spektren ($T = 295$ K) von $\mathbf{2_1}$ in Abwesenheit von WGA (schwarz) mit Simulation (rot). Die simultane Simulation der Spektren lieferte den Parametersatz zur Beschreibung der Komponente 2.

Ähnlich wie in Abschnitt 6.2 wurden die cw-ESR-Spektren der drei Komponenten in separaten Experimenten gemessen und mit Linienformanalysen vollständig beschrieben, um dann mit einer Linearkombination der Simulationen die Mischspektren zu simulieren. Dabei wurden alle Proben gemäß der Bifrequenz-ESR-Methode sowohl im X-Band (9 GHz), als auch im Q-Band (34 GHz) gemessen. Allerdings bereitet die Bestimmung der Komponente 1 Schwierigkeiten, da sie nur

zusammen mit der Komponente 2 auftritt. Deshalb wurden zunächst die cw-ESR-Spektren von Komponente 2 und Komponente 3 aufgenommen und deren Parametersätze mit Hilfe von Linienformanalysen ermittelt. Die Simulationen von Komponente 2 und 3 wurden wiederum als Input-Daten zur Bestimmung der Parametersätze von Komponente 1 genutzt.

In Abbildung 51 sind die X-Band (links) und Q-Band (rechts) cw-ESR-Spektren von **2₁** ohne WGA-Dimer (schwarz) mit Simulation (rot) dargestellt. Das X-Band weist drei schmale Linien mit annähernd gleichen Signalintensitäten auf, die ein typisches Erkennungsmerkmal hoher rotatorischer Diffusion des Nitroxids darstellen, wohingegen sich die Intensitäten drei Linien im Q-Band Spektrum deutlich voneinander unterscheiden. Das Q-Band Spektrum befindet sich im Gegensatz zum X-Band Spektrum nicht im Regime der schnellen Bewegung, sondern in einem moderateren Mobilitätsregime. Die „Zeitskala“ des Q-Bands ist daher besser geeignet, um die Dynamik von **2₁** in Abwesenheit von WGA aufzulösen. Bei der simultanen Simulation des X- und Q-Band Spektrums wurde lediglich die Hyperfeinwechselwirkung in z-Richtung (A_{zz}) und die isotrope Rotationskorrelationszeit (τ_c) gefittet, während die Linienbreite (lw) nur zu Beginn des Fitprozesses optimiert wurde. Der gewonnene Parametersatz diente zur Beschreibung der Komponente 2 (Tabelle 8). Ein Vergleich der Rotationskorrelationszeit von **1₁** ($\tau_c = 0,46$ ns) und **2₁** ($\tau_c = 0,48$ ns) in Abwesenheit von WGA zeigt, dass die Diffusionskonstante des Liganden mit dem längerem Linker um 0,02 ns kürzer ist, als die Diffusionskonstante des Liganden mit dem kürzeren Linker. Obwohl man bei der Bestimmung von τ_c eine Fehlerabweichung in diesem Größenbereich erwartet, sprechen diese Werte doch für einen kleineren hydrodynamischen Radius von **1₁**. Dieser Vergleich ist ein weiterer Hinweis darauf, dass der Linker von **1₁** in Lösung eine gefaltete Konformation aufweist.

Analog zu dem Liganden **1₁** wurde auch für Ligand **2₁** die Komponente 3 mit Hilfe eines monovalenten WGA-Liganden bestimmt. Das Linkerende dieses monovalenten Liganden **2₄** ist mit einem Spinmarker versehen und soll die Mobilität des ungebundenen Ende eines monovalent gebundenen divalenten Liganden **2₁** simulieren. Bezüglich der Spinmarkerdynamik sind keine nennenswerte Abweichungen zu erwarten, da **2₁** und **2₄** den gleichen Linker aufweisen und sich die Anzahl der frei rotierbaren Atombindungen zwischen GlcNAc-Reste und Spinmarker nur um eine C-C-Einfachbindung unterscheidet. Die Bindungsaffinität für monovalente Liganden wie **2₄** ist jedoch deutlich geringer als die Bindungsaffinität des divalenten Liganden **2₁**, weshalb man bei dem cw-ESR-Spektrum von **2₄** in Anwesenheit von WGA neben dem ESR-Signal gebundener Liganden, auch das ESR-Signal von ungebundenen Liganden beobachtet. In Abbildung 52, oben sind zum Vergleich die normierten cw-ESR-Spektren von **2₄** in Gegenwart eines achtfachen molaren Überschusses an WGA (schwarz) und in Abwesenheit von WGA (rot) in einem Schaubild dargestellt. Sowohl im X-Band (links) als auch im Q-Band (rechts) weisen die roten und

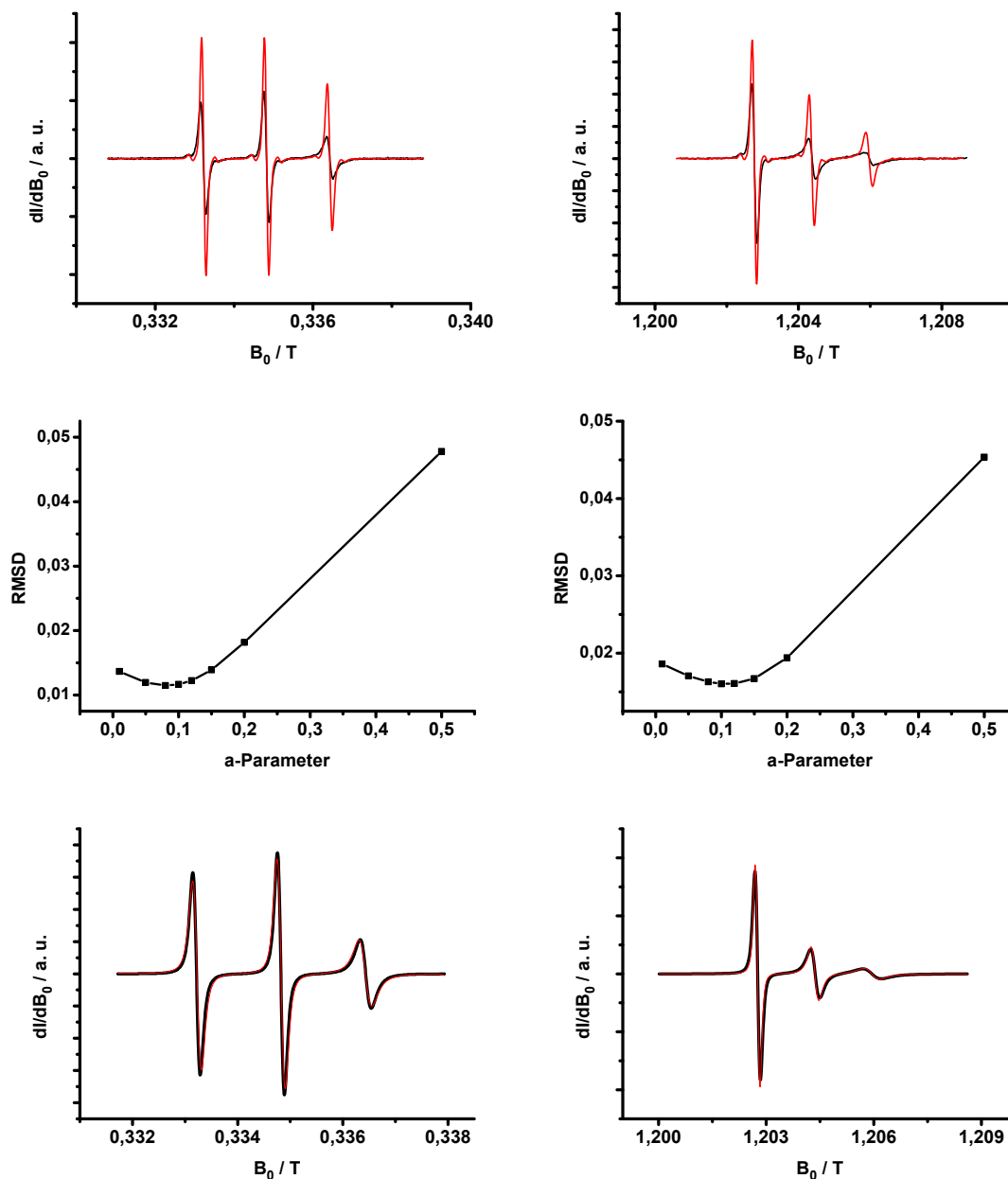


Abbildung 52: Oben: Vergleich der normierten X-Band (links) und Q-Band (rechts) cw-ESR-Spektren ($T = 295$ K) von **21** bei einem Ligand/WGA-Verhältnis von 1 : 8 (schwarz) und in Abwesenheit von WGA (rot). Mitte: Auftragung der Fehlerabweichung zwischen der Linearkombination $S(\text{WGA}) - a \cdot S(\text{UNG})$ und der Simulation der Linearkombination in Abhängigkeit von dem a-Parameter. Unten: Linienformen von $S(\text{GEB})$ nach Gleichung (45) mit $a = 0,3$ (schwarz) im X-Band (links) und im Q-Band (rechts). Diese Linienformen entsprechen dem cw-ESR-Spektrum der Komponente 3. Die simultane Simulation der Spektren lieferte den Parametersatz zur Beschreibung der Komponente 3.

schwarzen Linien große Intensitätsunterschiede auf. Der Unterschied resultiert aus einer großen Fraktion monovalent gebundener Liganden, deren verringerte Mobilität zu einem Signal mit größerer Linienbreite und geringerer Signalintensität führt (schwarz). Die roten und schwarzen Linien in Abbildung 52, oben wären nahezu deckungsgleich, wenn die Fraktion der monovalent gebundenen Liganden auch in Anwesenheit von WGA 0 % betragen würde.

Wie bereits in Abschnitt 6.2 gezeigt, besteht die Möglichkeit, das Signal der gebundenen Fraktion von dem Signal der ungebundenen Fraktion zu separieren, indem man eine Linearkombination gemäß der Formel (48) durchführt. Man geht hier davon aus, dass sich das Spektrum von **24** in Anwesenheit von WGA (S(WGA)) als Überlagerung der Spektren **24** ohne WGA (S(UNG)) und **24** gebunden an WGA (S(GEB)) darstellen lässt. Das Verhältnis zwischen den Fraktionen S(UNG) und S(GEB) wird von dem a-Parameter festgelegt, wobei $a = 0$ einem quantitativ gebundenen Liganden und $a = 1$ einem quantitativ ungebundenen Liganden entspricht. Um den Anteil der gebundenen Fraktion zu ermitteln, wurde von dem Spektrum S(WGA) das Spektrum S(UNG) von $a = 0$ bis $a = 1$ in $a = 0,05$ Abständen subtrahiert und die resultierenden Linearkombinationen durch einen Fit der Rotationskorrelationszeit simuliert. Die mittlere quadratische Fehlerabweichung zwischen der Linearkombination und der Simulation (rmsd) wurde jeweils für das X-Band (Abbildung 52, mitte, links) und Q-Band (Abbildung 52, mitte, rechts) in Abhängigkeit von dem a-Parameter in einem Schaubild aufgetragen. Bei beiden Schaubildern liegt der a-Parameter mit der geringsten Fehlerabweichung bei $a \approx 0,1$, d.h. der Anteil des gebundenen monovalenten Liganden **24** in Anwesenheit eines achtfachen molaren Überschusses an WGA beträgt rund 90 %. Die Kurvenverläufe für die X-Band und Q-Band-Daten weisen eine große Ähnlichkeit auf und man beobachtet bei beiden Schaubildern einen streng monotonen Anstieg der Fehlerabweichung für a-Werte größer als 0,1. Dieser Befund bestätigt sich, wenn man die Absorptionsspektren der Linearkombinationen in Abhängigkeit von dem a-Parameter untersucht (Abbildung A72). Es ist deutlich zu sehen, dass sowohl im X-Band (links), als auch im Q-Band (rechts) die Absorptionsspektren für $a > 0,2$ eine unstetige Form aufweisen und für $a > 0,5$ sogar negative Werte annehmen. Dieses Ergebnis spricht für eine Fraktion ungebundener Liganden die deutlich unterhalb von 0,5 liegt. Nicht zuletzt erscheint angesichts des achtfachen molaren Überschusses an WGA und des IC_{50} -Werts im niedrigen millimolaren Bereich eine gebundene Fraktion von rund 90 % durchaus plausibel.

Die simultane Simulation der X-Band und Q-Band Linearkombinationen mit der geringsten Fehlerabweichung ($a = 0,1$) lieferte den Parametersatz zur Beschreibung der Komponente 3. In Abbildung 52 (unten) sind die entsprechenden Linearkombinationen (schwarz) mit Simulation (rot) im X-Band (links) und im Q-Band (rechts) dargestellt. Bei den schwarzen Linien handelt es sich ausschließlich um das Signal S(GEB), welches mit Hilfe der Linearkombination von S(UNG)

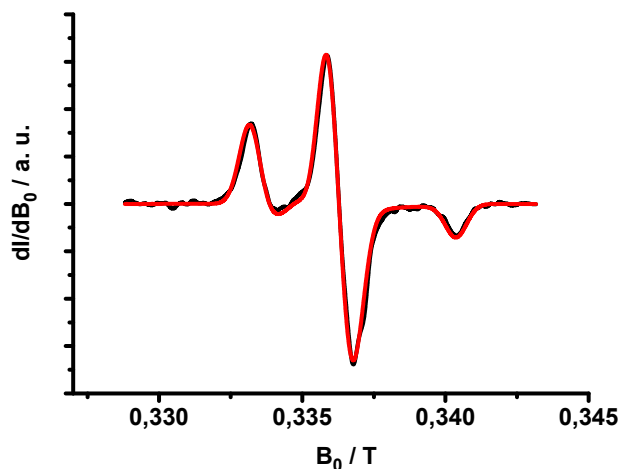


Abbildung 53: Cw-ESR-Spektrum ($T = 120$ K) von **21** bei einem Ligand/WGA-Verhältnis von 1 : 8 (schwarz) mit Simulation (rot). Der Spektrenfit lieferte die Hauptwerte des Hyperfeintensors der Komponente 1.

separiert wurde. Daher kann man diese Linien auch als die cw-ESR-Spektren eines quantitativ monovalent bindenden Liganden **24** auffassen. Der Spektrenfit ergab eine Rotationskorrelationszeit ($\tau_c = 0,48$ ns), die doppelt so groß ist wie die der Komponente 2 ($\tau_c = 0,24$ ns), während sich die Hyperfeinaufspaltungen der Komponenten 2 ($A_{zz} = 108,44$ MHz) und 3 ($A_{ZZ} = 108,85$ MHz) nur unwesentlich voneinander unterscheiden. Die Parameter A_{xx} , A_{yy} und lw wurden nicht bzw. nur zu Beginn des Fitprozesses angepasst (Tabelle 8). Verglichen mit dem Liganden **23** weist der Ligand **24** eine Rotationskorrelationszeit auf, die um 0,02 ns langsamer ist (vgl. Komponente 3 von Tabelle 5 und 8). Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen, da der nitroxidmarkierte Linker bei **24** um mehrere Atombindungen kürzer ist als für **23** und daher die rotatorische Mobilität mehr eingeschränkt wird.

Wie bereits erwähnt, ist die Bestimmung der Komponente 1 mit größerem Aufwand verbunden, da sie gemäß den Modellvorstellungen stets zusammen mit der Komponente 3 auftritt. Weiterhin muss man aufgrund der schwächeren Bindungsaffinität monovalenter WGA-Liganden selbst in Gegenwart eines WGA-Überschusses mit ungebundenen Liganden rechnen. Daher sind für die Simulation der Komponente 1 alle drei Komponenten notwendig, wobei die Komponenten 2 und 3 bereits ermittelt wurden (siehe oben).

In der Abbildung 54, oben sind die X-Band (links) und Q-Band (rechts) cw-ESR-Spektren (schwarz) mit einem **21**/WGA-Verhältnis von 1 : 1 dargestellt. Beide Spektren verfügen über de-

tailreiche Linienformen, die zum einen auf eine Dynamik schließen lassen, die nicht mit isotroper Rotationsdiffusion beschrieben werden kann, und zum anderen ist angesichts der sehr schmalen Linien bei 333,1 mT und 336,3 mT (X-Band) ein erheblicher Anteil an ungebundenen Liganden zu erwarten. Ähnlich wie für den Liganden **1₁** wird auch hier die Nitroxiddynamik durch die Stereochemie des WGA-Proteins eingeschränkt, was zur Folge hat, dass die Spinmarkerseitenkette nur bestimmte Konformationen annehmen kann. Deshalb wurde zur Beschreibung dieses Spinsystems das MOMD-Modell verwendet, wobei die Orientierungsabhängigkeiten der Spinmarkerseitenketten mit den drei Kugelflächenfunktionen λ_{20} , λ_{22} , λ_{40} entwickelt und die dynamischen Prozesse mit einem axialsymmetrischen Diffusionstensor (τ_{\perp} , τ_{\parallel}) charakterisiert wurden. Die Linienbreiten (lw) wurden, wenn nötig, als einzige Parameter für das X-Band bzw. Q-Band separat optimiert und bei dem anschließenden Fitprozesses konstant gehalten, während die g-Werte wie gewohnt der Literatur entnommen wurden.

Auch die Hyperfeinwechselwirkung musste nicht aus den X- und Q-Band Spektren in Abbildung 54, oben ermittelt werden, sondern ließ sich mit größerer Präzision in einem Vorexperiment bestimmen. Dazu wurde bei einem **2₁**/WGA-Verhältnis von 1 : 8 ein Tieftemperatur-cw-ESR-Spektrum im X-Band aufgenommen und eine Linienformanalyse durchgeführt. Festkörperspektren im X-Band eignen sich besonders gut zur Bestimmung des Hyperfeintensors, da sie eine maximale anisotrope Linienverbreiterung aufweisen, die von Hyperfeinwechselwirkungen dominiert wird. In der Abbildung 53 ist das entsprechende Festkörperspektrum (schwarz) mit Simulation (rot) dargestellt. Die Simulation ergab mit $A_{xx} = A_{yy} = 13,14$ MHz und $A_{zz} = 100,62$ MHz eine axialsymmetrische Hyperfeinwechselwirkung, die exakt mit dem Fitergebnis der Messung in Abbildung 43 übereinstimmt. Bei der simultanen Simulation der X- und Q-Band Spektren in Abbildung 54 und 55 wurden somit A-Tensor, g-Tensor und die Linienbreite als unveränderliche Input-Parameter vorgegeben, während die Orientierungsparameter, die Rotationskorrelationszeiten und die Anteile der drei Komponenten gefittet wurden.

Die Linienformanalyse in Abbildung 54, oben führte zu Fitparameter wie in Tabelle 8 aufgeführt. Analog zu Abschnitt 6.2 konnte die Komponente 1 mit zwei Parametersätzen beschrieben werden, was angesichts der acht Kohlenhydrat-erkennenden Domänen mit teilweise deutlich unterschiedlichen Stereochemien zu erwarten war. Die dynamischen Prozesse der Komponente 1 lassen sich mit einer axialsymmetrischen Rotationskorrelationszeit beschreiben, deren Diffusionskonstanten τ_{\perp} und τ_{\parallel} sich um einen Faktor zwei bzw. drei voneinander unterscheiden. Diese Differenz lässt sich mit der deutlich größeren Rotationsdiffusion entlang der Achse zwischen Makromolekül und Spinmarker erklären, da diese Richtung den effektiv kleinsten hydrodynamischen Radius aufweist. Verglichen mit der Komponente 1 aus Abschnitt 6.2 sind die Beträge der Koeffizienten λ_{20} , λ_{22} und λ_{40} deutlich niedriger und lassen auf eine geringere Restriktion

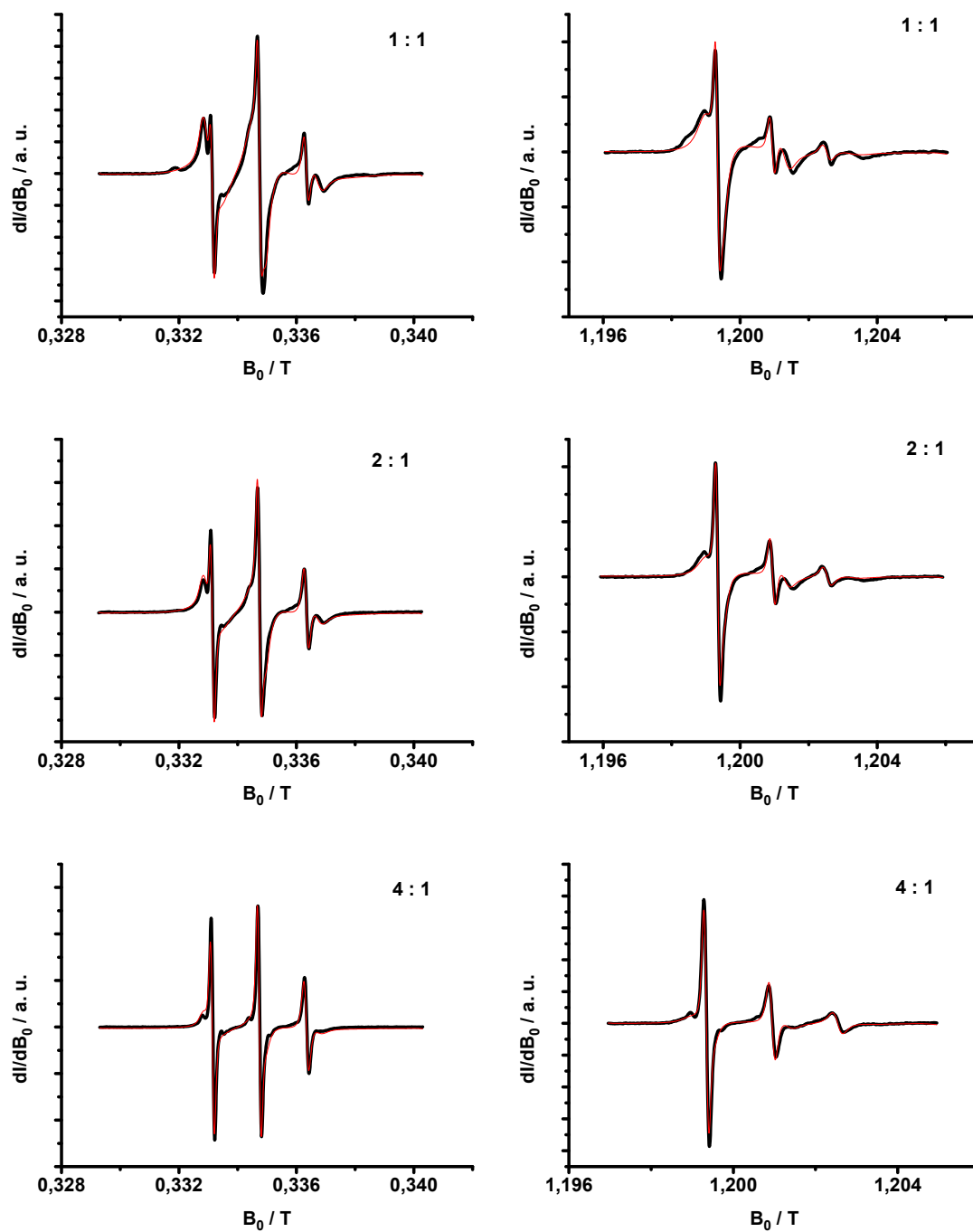


Abbildung 54: Cw-ESR-Spektren ($T = 295$ K) von $\mathbf{2}_1$ (schwarz) mit Simulation (rot) bei einem Ligand/WGA-Verhältnis von 1 : 1 (oben), 2 : 1 (mitte) und 4 : 1 (unten). Die simultane Simulation der X-Band (links) und Q-Band Spektren (rechts) erfolgte durch den Fit der prozentualen Anteile der drei Komponenten in Tabelle 8.

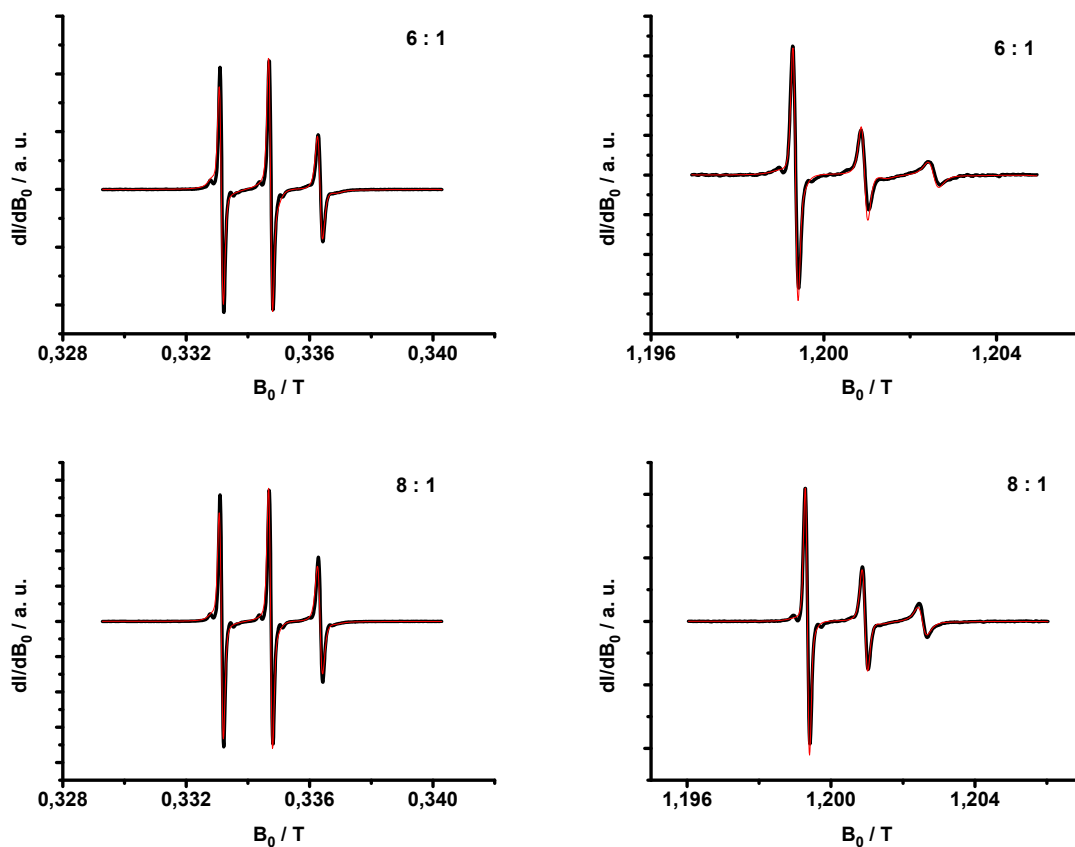


Abbildung 55: Cw-ESR-Spektren ($T = 295$ K) von $\mathbf{2_1}$ (schwarz) mit Simulation (rot) bei einem Ligand/WGA-Verhältnis von 6 : 1 (oben) und 8 : 1 (unten). Die simultane Simulation der X-Band (links) und Q-Band Spektren (rechts) erfolgte durch den Fit der prozentualen Anteile der drei Komponenten in Tabelle 8.

der Spinmarkerseitenketten durch die lokale Struktur des WGA-Proteins schließen. Weiterhin ist der Tabelle 9 zu entnehmen, dass selbst bei einem Ligand/Protein-Verhältnis von 1 : 1 der Anteil ungebundener Liganden 8,5 % beträgt, während die Komponente monovalent gebundener Ligand mit annähernd 0 % praktisch nicht vorkommt. Dieses Ergebnis entspricht nicht den Erwartungen des Modellsystems, da man hier von einem cw-ESR-Spektrum ausging, das sich zu gleich großen Anteilen aus dem Signal des gebundenen Ende (Komponente 1) und dem Signal des ungebundenen Ende (Komponente 3) der monovalent bindenden divalenten Liganden zusammensetzt.

Nach Abschluss der Vorexperimente waren die Parametersätze aller drei Komponenten be-

kannt. Mit diesen Parametersätzen konnten die prozentualen Anteile der drei Komponenten für eine cw-ESR-Messung mit unterschiedlichen Ligand/WGA-Mischungsverhältnissen bestimmt werden, indem lediglich die relativen Verhältnisse der Komponenten gefittet wurden. Insgesamt wurden vier Proben mit den Ligand/Protein-Verhältnissen 2 : 1, 4 : 1, 6 : 1 und 8 : 1 hergestellt und jeweils im X-Band (Abbildung 54 und 55, links) und im Q-Band (Abbildung 54 und 55, rechts) Mobilitätsmessungen durchgeführt. Die experimentellen Spektren wurden simuliert (rot).

	Komponente 1		Einheit
$[A_{xx} A_{yy} A_{zz}]$	[13,14 13,14 100,62]	[13,14 13,14 100,62]	MHz
$[\tau_{\perp} \tau_{\parallel}]$	[0,50 1,87]	[3,11 5,66]	ns
[lw]	0,275	0,107 (0,380)	mT
$[\lambda_{20} \lambda_{22} \lambda_{40}]$	[0,680 0,112 0,475]	[0,219 0,640 0,015]	/

	Komponente 2	Komponente 3	Einheit
$[A_{xx} A_{yy} A_{zz}]$	[13,14 13,14 108,44]	[13,14 13,14 108,85]	MHz
τ	0,24	0,48	ns
lw	0,132	0,104	mT

Tabelle 8: Parametersätze der drei Komponenten. Das Verhältnis der Parametersätze für Komponente 1 liegt bei 1 : 3,4 und in den runden Klammern ist die Linienbreite des Q-Band Spektrums angegeben.

Ligand/WGA	Komponente 1	Komponente 2	Komponente 3
1 : 0	1 %	98 %	1 %
1 : 1	92 %	8 %	0 %
2 : 1	82 %	16 %	2 %
4 : 1	63 %	35 %	2 %
6 : 1	47 %	50 %	3 %
8 : 1	36 %	63 %	1 %

Tabelle 9: Prozentuale Anteile der drei Komponenten für die Mischspektren mit unterschiedlichen Ligand/Protein-Verhältnissen. Das Ligand/WGA-Verhältnis von 1 : 0 entspricht der Messung Ligand in Abwesenheit von WGA.

Die Linienformen in Abhängigkeit von dem Ligand/Protein-Verhältnis ergeben ein ähnliches Bild wie in Abschnitt 6.2. Es ist deutlich zu sehen, dass die schmalen Linien des ungebundenen Liganden mit steigendem Ligand/Protein-Verhältnis intensiver werden und die breiten Linien des gebundenen Liganden schließlich vollständig überlagern. Schon ab einem Ligand/Protein-Verhältnis von 6 : 1 werden die Linienformen von dem Dreilinienspektrum der ungebundenen Liganden dominiert. Der hohe Anteil ungebundener Liganden bei vergleichsweise niedrigen Ligand/Protein-Verhältnissen spricht für eine niedrigere Bindungsaffinität des kürzeren Liganden. Diese Beobachtungen stehen in Übereinstimmung mit den ELLA-Werten des divalenten Liganden 1_1 ($IC_{50} = 57 \mu M$) und des divalenten Liganden 2_1 ($IC_{50} = 734 \mu M$)^[8].

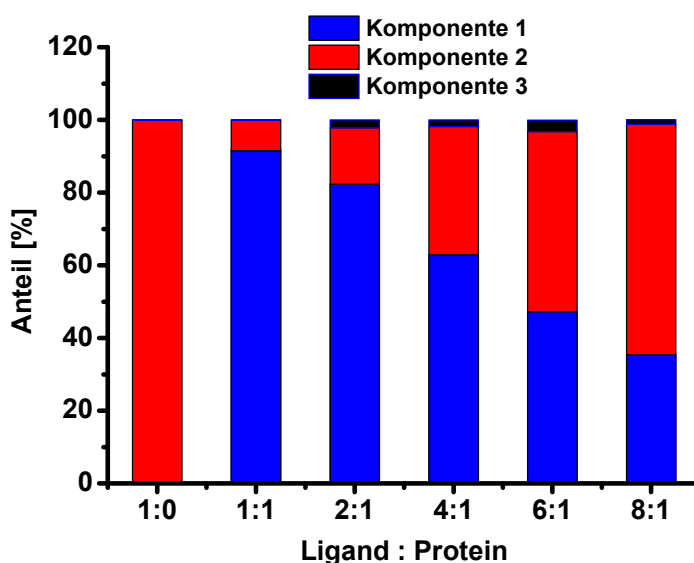


Abbildung 56: Prozentuale Anteile der drei Komponenten in Abhängigkeit vom Ligand/Protein-Verhältnis. Das Ligand/Protein-Verhältnis von 1 : 0 entspricht der Messung Ligand in Abwesenheit von WGA.

Das Ergebnis der simultanen Spektrensimulationen aller vier Proben ist in Tabelle 9 zusammengefasst. Es sind jeweils die prozentualen Anteile der drei Komponenten gebundenes Ende eines monovalent bindenden Liganden (Komponente 1), ungebundenes Ende eines monovalent bindenden Liganden (Komponente 3) und ungebundener Ligand (Komponente 2) aufgeführt. Bezüglich der Entwicklung der prozentualen Anteile in Abhängigkeit von dem Ligand/Protein-Verhältnis findet man eine vergleichbare Situation vor, wie für den Liganden mit dem längeren Linker (1_1). Während der Anteil von Komponente 1 mit steigendem Ligandenüberschuss auf bis zu 36 % sinkt, wächst der Anteil von Komponente 2 kontinuierlich an und erreicht bei einem

Ligand/Protein-Verhältnis von 8 : 1 etwa 63 %. Demgegenüber schwankt der Anteil von Komponente 3 auf einem niedrigen Niveau und ohne erkennbares Muster zwischen 1 % und 3 %. Den Daten zufolge setzen sich die Mischspektren aus dem Signal des gebundenen Ende eines monovalent bindenden Liganden und dem Signal des ungebundenen Liganden zusammen, wohingegen das Signal des freien Ende eines monovalent gebundenen Liganden praktisch nicht nachweisbar ist. Dieses interessante Ergebnis soll im späteren Teil dieses Abschnitts ausführlicher diskutiert werden. Für Proben mit einem Ligand/Protein-Verhältnis größer als 8 : 1 lieferten die Simulationen keine reproduzierbaren Fitparameter, da das starke Signal des ungebundenen Liganden eine Auswertung des schwachen Signals gebundener Liganden nicht mehr gestattet. Die Fitergebnisse in Tabelle 9 wurden in dem Säulendiagramm in Abbildung 56 zusammengefasst, wobei zur Kontrolle auch die X- und Q-Band-Spektren von **2₁** in Abwesenheit von WGA mit den drei Komponenten gefittet wurden (1 : 0 Säule).

Um die Fitergebnisse zu verifizieren, wurde untersucht, wie sich die Qualität der Spektrenfits verändert, wenn die geringen Anteile der Komponente 3 erhöht und die Anteile der Komponenten 1 und 2 entsprechend erniedrigt werden. Dazu wurde mit den Parametersätzen in Tabelle 8 mehrere Spektren simuliert und dabei nur die Anteile der Komponenten angepasst, während die Parametersätze selbst unverändert blieben. Der prozentuale Anteil von Komponente 3 wurde hier auf 0 %, 10 %, 30 % und 50 % festgelegt. Um zu prüfen wie sich die Fitqualität in Abhängigkeit von dem Anteil der Komponente 3 verändert, wurde die mittlere quadratische Fehlerabweichung (rmsd) zwischen diesen Simulationen und dem experimentellen Spektrum bestimmt. Nach diesem Prinzip wurde für alle experimentellen Spektren verfahren (Ligand/Protein-Verhältnisse 4 : 1, 6 : 1 und 8 : 1). In der Abbildung A74 ist zu sehen, dass für sämtliche Proben die Fehlerabweichung mit steigendem Anteil der Komponente 3 streng monoton ansteigt. Dieses Ergebnis zeigt, dass der Anteil monovalent bindender Liganden mit frei beweglichem Ende für die drei untersuchten Proben gegen Null geht.

Analog zu Abschnitt 6.2 wurden für die Fitergebnisse in Abbildung 56 die Fehlergrenzen der Fitparameter in Abhängigkeit von dem Signal-zu-Rausch-Verhältnis abgeschätzt. In Tabelle 10 sind die Fitergebnisse der drei Komponenten für alle vier Signal-zu-Rausch-Verhältnisse angegeben. Wie zu erwarten nimmt die Standardabweichung mit abnehmenden Signal-zu-Rausch-Verhältnis von rund 0,3 % ($S/N = 400$) auf rund 2 % - 7 % ($S/N = 50$) stark zu, während die Mittelwerte in allen Fällen erstaunlich gut mit den Input-Parametern übereinstimmen. Erst bei einem Signal-zu-Rausch-Verhältnis von 20/1 ist das Rauschen so groß, dass der Fitalgorithmus kein verlässliches Ergebnis mehr liefert. Gemäß dieser Abschätzung ist der Fitalgorithmus geeignet, um cw-ESR-Spektren mit einem Signal-zu-Rausch-Verhältnis größer als 50/1 auszuwerten.

Da das Signal-zu-Rausch-Verhältnis der *experimentellen* Spektren im X-Band 500/1 und im Q-

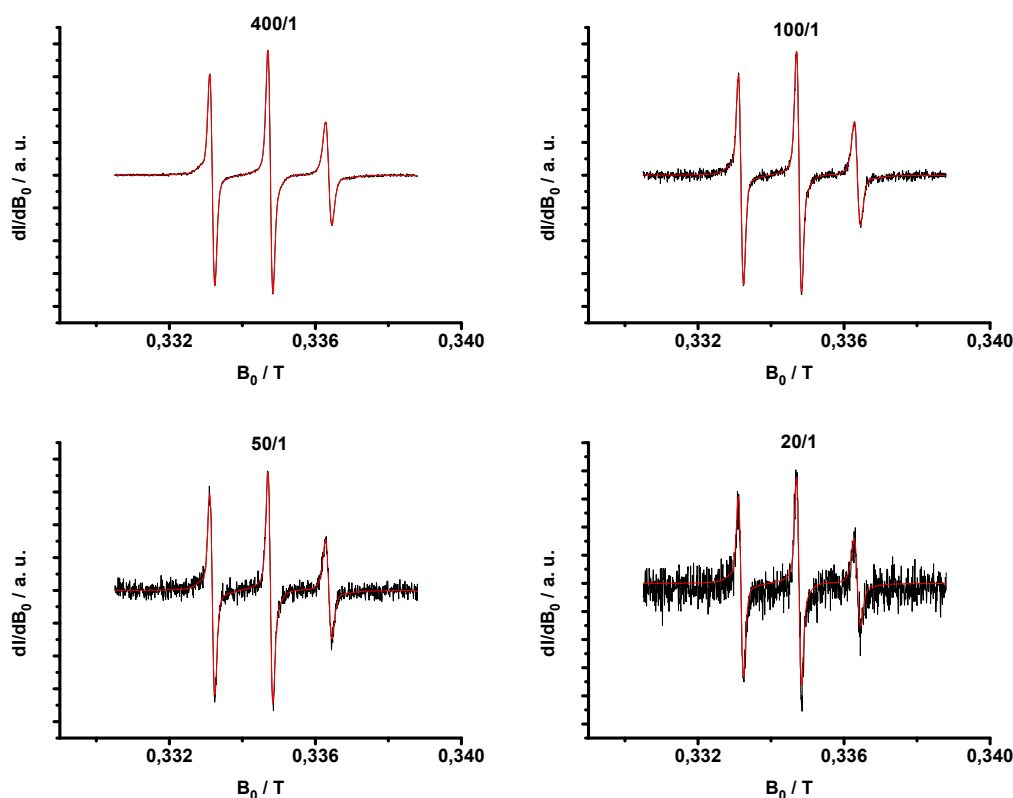


Abbildung 57: Simulierte Spektren mit künstlich erzeugtem Rauschen (schwarz) mit Simulation (rot). Die Signal-zu-Rausch-Verhältnisse betragen 400/1 (oben links), 100/1 (oben rechts), 50/1 (unten links) und 20/1 (unten rechts). Es ist zu beachten, dass sich die Angaben zum Signal-zu-Rausch-Verhältnis auf das Verhältnis zwischen der maximalen Signalintensität und der Standardabweichung der Rauschintensität bezieht.

Band 100/1 beträgt, erwartet man unter Berücksichtigung der Standardabweichungen in Tabelle 10 einen Fehler im Bereich von 2 % - 3 %. Somit liegt auch bei dem Liganden **2**₂ der Anteil von Komponente 3 weitestgehend innerhalb der Fehlertoleranz. Dieses Resultat spricht für einen äußerst geringen Anteil der Komponente 3.

Wie bereits erwähnt, entsprechen diese Ergebnisse nicht den Erwartungen an das Modellsystem, da man hier von einem monovalent gebundenen Liganden ausgeht, bei dem sich statistisch etwa genauso viele nitroxidmarkierte, wie nicht-nitroxidmarkierte GlcNAc-Reste in der gebundenen bzw. ungebundenen Position befinden. Diesem Modell zufolge würde man bei einer Spektrensimulation zwei gleich große Anteile des gebundenen (Komponente 1) und ungebundenen Ende (Komponente 3) monovalent gebundener Liganden erhalten.

Signal/Rauschen	Komponente 1	Komponente 2	Komponente 3
400 / 1	39,5 % ± 0,3 %	57,4 % ± 0,2 %	3,1 % ± 0,2 %
100 / 1	39,8 % ± 2,3 %	58,8 % ± 1,8 %	1,4 % ± 1,6 %
50 / 1	47,6 % ± 7,4 %	50,1 % ± 4,2 %	2,3 % ± 2,2 %
20 / 1	25 %	45 %	30 %

Tabelle 10: Abschätzung der Fehlergrenzen der Fitparameter in Abhängigkeit vom Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Die Fraktionen der verrauschten Simulationen betragen 40 %/ 57 %/ 3 % (siehe Text).

Stattdessen beobachtet man bei allen Experimenten, dass der prozentuale Anteil von Komponente 3 gegen Null geht. Um aufzuzeigen, wie deutlich der Unterschied zwischen dem theoretischen Modell und den Experimenten ist, wurde mit den Parametersätzen in Tabelle 8 ein Zweikomponentenspektrum mit Komponente 1 = 50 %, Komponente 2 = 0 % und Komponente 3 = 50 % simuliert. Zum Vergleich sind diese Simulationen (rot) mit den cw-ESR-Spektren von **2**₁ bei einem Ligand/Protein-Verhältnis von 1 : 1 (schwarz) in einem Schaubild dargestellt (Abbildung A73). Die roten und schwarzen Linien weisen sowohl im X-Band (links), als auch im Q-Band (rechts) signifikante Abweichungen auf.

Weiterhin ist zu prüfen, ob die Bindungsaffinitäten der Zuckereinheiten von der Nitroxidmarkierung beeinflusst wird. Eine Einflussnahme der Nitroxidmarker hätte zur Folge, dass sich die Bindungswahrscheinlichkeit für ein GlcNAc-Rest mit und ohne Nitroxidmarkierung unterscheidet und die prozentualen Anteile von Komponente 1 und 3 ungleich groß sind. Wird durch die Anwesenheit eines Nitroxidmarkers die Bindungsaffinität erhöht, kann dies zu einer signifikanten Erniedrigung der Komponente 3 und zu einer Zunahme von Komponente 1 führen. In diesem Fall wäre monovalentes Binden divalenter Liganden mit ESR-Spektroskopie nicht nachzuweisen, da man stets das Signal des gebundenen Ende detektieren würde. Es besteht jedoch die Möglichkeit festzustellen, ob die Bindungsaffinität von dem Nitroxidmarker beeinflusst wird, indem man die cw-ESR-Spektren eines einfach markierten **2**₁ und zweifach markierten Liganden **2**₂ in Anwesenheit von WGA vergleicht. Sind die Linienformen beider Spektren deckungsgleich, kann man den Einfluss der Spinmarkierung auf die Bindungsaffinität vernachlässigen. In Abbildung 58 sind die cw-ESR-Spektren von **2**₁ (rot) und **2**₂ (schwarz) bei einem Ligand/Protein-Verhältnis von 1 : 8 dargestellt. Zwischen den Linienformen beider Spektren sind nur geringfügige Abweichungen zu erkennen. Daraus folgt, dass die Bindungsaffinität der GlcNAc-Derivate von den Nitroxidspinsonden nur unwesentlich beeinflusst wird.

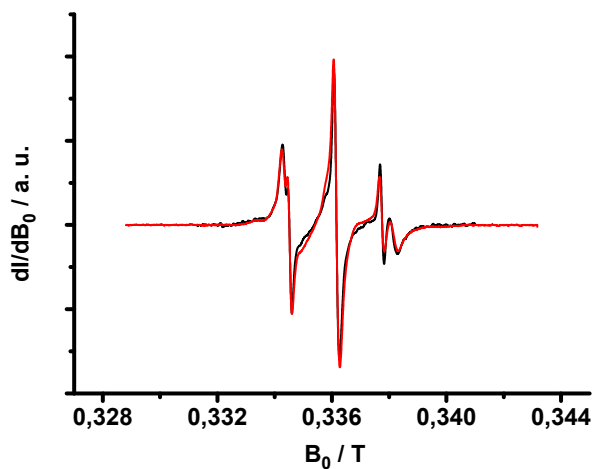


Abbildung 58: Cw-ESR-Spektren ($T = 295$ K) von **2**₁ (rot) und **2**₂ (schwarz) bei einem Ligand/WGA-Verhältnis von 1 : 8. Die Linien beider Spektren sind annähernd deckungsgleich.

Durch die ESR-Experimente konnte das Modellsystem eines monovalent bindenden WGA-Liganden **2**₁ wiederlegt werden. Aus den Daten ergibt sich, dass ein Binden des divalenten Liganden an WGA stattfindet und dabei das mutmaßlich ungebundene Ende eine deutlich geringere Mobilität aufweist als erwartet. Da ein bevorzugtes Binden des nitroxidmarkierten GlcNAc-Rests wiederlegt werden konnte, ist die plausibelste Erklärung für diese Beobachtung, dass die vermeintlich ungebundenen Zuckerreste eine Bindung mit einer Subbindungsstelle im WGA eingeht (Abbildung 59). Diese Subbindungsstellen befinden sich in direkter Nachbarschaft zu den primären Bindungsstellen und bieten gewöhnlich Di-, Tri- und Tetrasacchariden ausreichend Platz für eine Proteinbindung^[41]. Die Bindungsaffinität dieser Bindungsstellen ist zwar weitaus geringer einzuschätzen als die der primären oder sekundären Bindungsstellen, dennoch können selbst schwache Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen zu einer deutlichen Verlangsamung der rotatorischen Diffusion führen.

Der vorgeschlagene Bindungsmechanismus ist in Übereinstimmung mit den ESR-Experimenten in Kapitel 5: Die Abstandsmessungen in Abbildung 36 B und 37 B zeigen, dass der Interspinabstand von **2**₂ nach Zugabe von WGA kleiner wird. Diese Verringerung des Abstands spricht für die Stauchung des Liganden infolge einer gleichzeitigen Besetzung von WGA-Bindungsstellen und WGA-Subbindungsstellen.

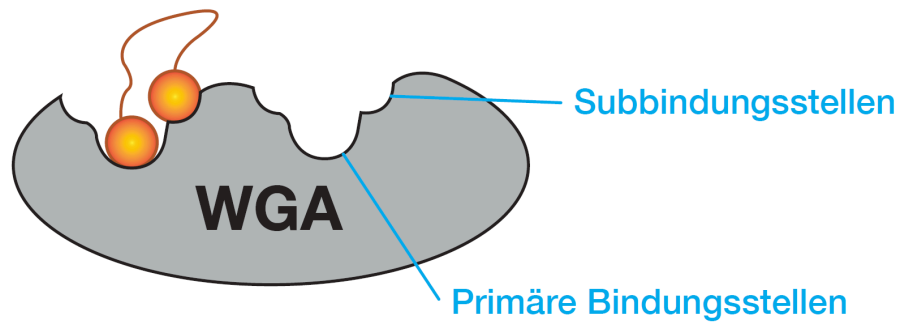


Abbildung 59: Vorgeschlagener Bindungsmechanismus des divalenten WGA-Liganden 2_1 .

7 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Charakterisierung von multivalenten Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen durch moderne ESR-spektroskopische Methoden. Erstmals gelang es, den molekularen Bindungsmechanismus mono- und divalenter spinmarkierter Liganden zu untersuchen und somit den Anwendungsbereich der ESR-Spektroskopie weiter auszudehnen. Die Anwendung von Abstandsmessungen im Nanometerbereich mittels Doppel Elektron-Elektron Resonanz (DEER) auf der einen Seite und Mobilitätsmessungen mittels Bifrequenz cw-ESR auf der anderen Seite erlaubten den Zugriff auf Informationen bezüglich den Bindungsmodi multivalenter Liganden, die bisher nicht zugänglich waren.

In Kapitel 5 dieser Arbeit konnte durch Kombination verschiedener ESR-Methoden gezeigt werden, dass das divalente GlcNAc-Derivat **1** chelatisierend an das WGA-Dimer bindet. Eine Auswertung der Abstandsverteilung unter Berücksichtigung der Kristallstruktur ergab, dass dieser divalente Ligand durch das gleichzeitige Binden mit beiden Zuckereinheiten getreckt wird und die benachbarten primären WGA-Bindungsstellen B1C2/C2B1 oder C1B2/B2C1 besetzt. Über ein Vergleich der Abstandsverteilungen des Liganden **1₂** in Gegenwart eines Überschusses an WGA und **1₂** in Abwesenheit von WGA ließ sich diese Chelatbindung direkt beobachten. Zudem ermöglichte die Messung der rotatorischen Beweglichkeit eine Bestimmung des Bindungszustands der Liganden.

Im Gegensatz dazu konnte bei dem Liganden **2** mit dem kürzeren Linker zwischen den GlcNAc-Resten ein überbrückendes Binden benachbarter primärer Bindungsstellen ausgeschlossen werden, da selbst bei einem Proteinüberschuss der für chelatisierendes Binden charakteristische Abstand ($r = 2,3$ nm) nicht auftrat. Stattdessen wurden die gleichen *intramolekularen* Abstände wie in Abwesenheit von WGA und *intermolekulare* Abstände bei 3 nm nachgewiesen, die Spinmarkerabständen verschiedener Liganden, die an dasselbe WGA-Dimer binden, zugeordnet werden konnten. Durch die Auswertung der intermolekularen Abstände zwischen den Ligandenmolekülen **2₂** oder **3₁** gelang es, die bevorzugten Bindungsstellen C1B2 und C2B1 zu identifizieren. Zudem lieferte die Abstandsmessung an **2₂** in Gegenwart von WGA einen ersten Hinweis auf die Besetzung von WGA-Subbindungsstellen.

In Kapitel 6 dieser Arbeit wurde ein neuer Ansatz zur Bestimmung der mikroskopischen effektiven Molarität EM mittels Bifrequenz-cw-ESR Messungen an einfach spinmarkierten multivalenten Proteinliganden vorgeschlagen. Dieser Ansatz wurde auf das bereits aus Kapitel 5 bekannte Modellsystem divalenter Ligand **1₁** und WGA-Protein angewendet. Durch die Verwendung von zwei verschiedenen Messfrequenzen konnte zwischen den Signalen der drei möglichen Bindungsmodi divalent gebundener Ligand (1), ungebundener Ligand (2) und monovalent gebundener Ligand (3) unterschieden werden. Weiterhin konnten die X-Band und Q-Band Spektren durch

Linienformanalysen quantitativ ausgewertet und die prozentualen Anteile der drei Komponenten in Abhängigkeit von dem Ligand/Protein-Verhältnis bestimmt werden. Aus der Entwicklung der drei Populationen konnte man schließen, dass bis zu einem Ligand/Protein-Verhältnis von 16 : 1 der Ligand **1**₁ fast ausschließlich chelatisierend bindet und kein monovalentes Binden stattfindet. Die Ermittlung des Umschlagspunkts der beiden Populationen mit $[BB]_U = EM/2$ war aus diesem Grund nicht möglich. Dennoch hat die vorgeschlagene Methode grundsätzlich das Potential, den mikroskopischen Parameter EM zu bestimmen.

Im zweiten Teil des Kapitel 6 konnte mit Hilfe des gleichen Ansatzes für den divalenten Liganden **2**₁ ein neuer Bindungsmodus an WGA-Protein vorgeschlagen werden.

8 Anhang zu Kapitel 5

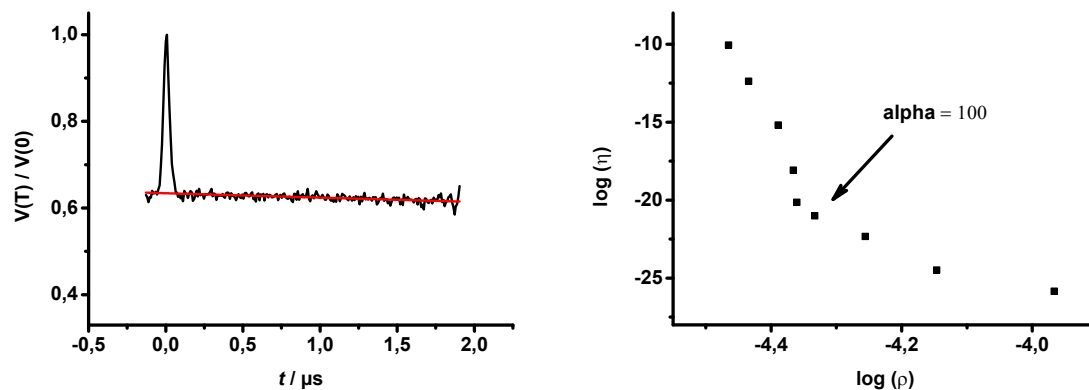


Abbildung A60: Links: Normiertes DEER-Spektrum von 1_2 in Abwesenheit von WGA (schwarz) mit Hintergrundsimulation (rot). Rechts: DEER-Datenanalyse mit Tikhonov-Regularisierung. Der optimale Regularisierungsparameter α ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

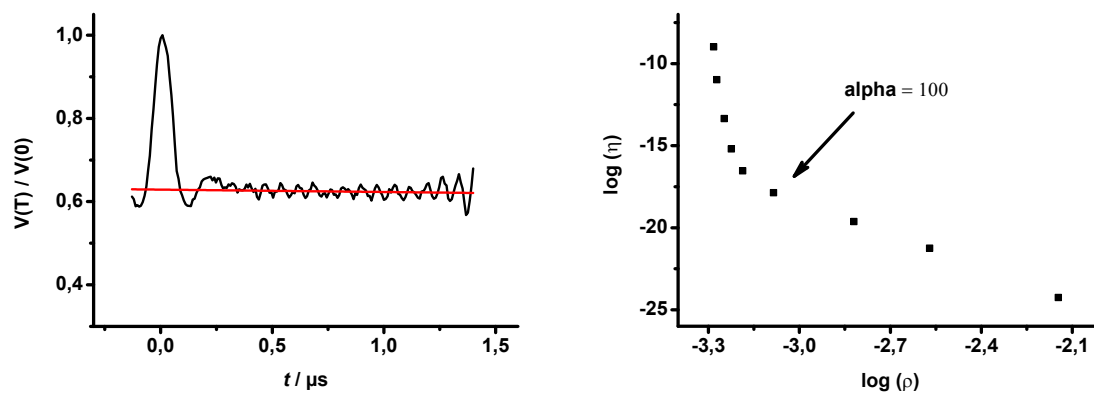


Abbildung A61: Links: Normiertes DEER-Spektrum von 1_2 bei einem WGA/Ligand-Verhältnis von 8 : 1 (schwarz) mit Hintergrundsimulation (rot). Rechts: DEER-Datenanalyse mit Tikhonov-Regularisierung. Der optimale Regularisierungsparameter α ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

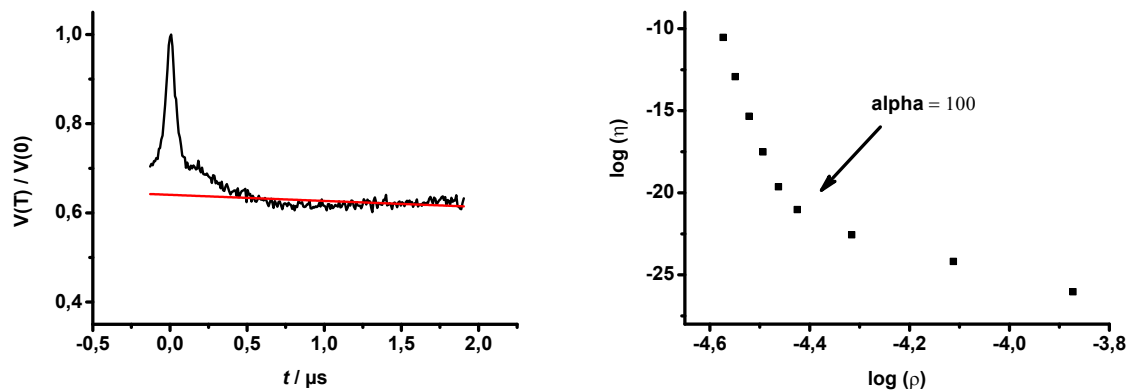


Abbildung A62: Links: Normiertes DEER-Spektrum von $\mathbf{1}_2$ bei einem WGA/Ligand-Verhältnis von 1 : 4 (schwarz) mit Hintergrundsimulation (rot). Rechts: DEER-Datenanalyse mit Tikhonov-Regularisierung. Der optimale Regularisierungsparameter α ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

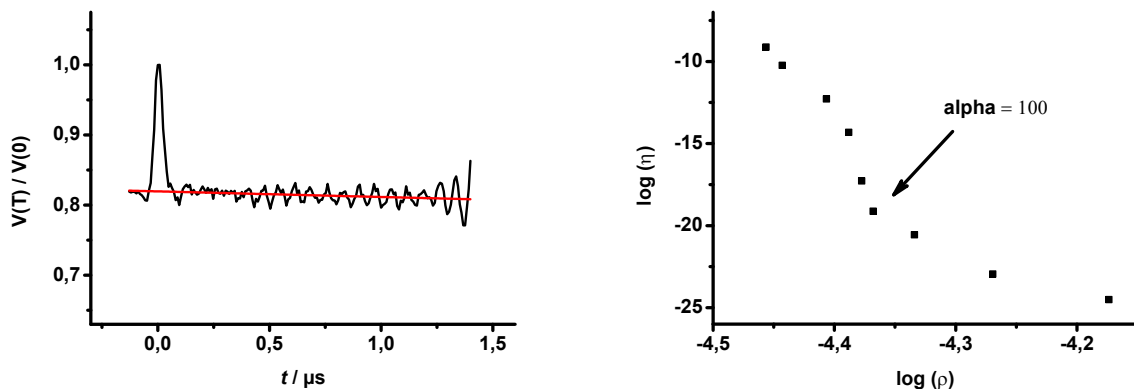


Abbildung A63: Links: Normiertes DEER-Spektrum von $\mathbf{2}_2$ in Abwesenheit von WGA (schwarz) mit Hintergrundsimulation (rot). Rechts: DEER-Datenanalyse mit Tikhonov-Regularisierung. Der optimale Regularisierungsparameter α ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

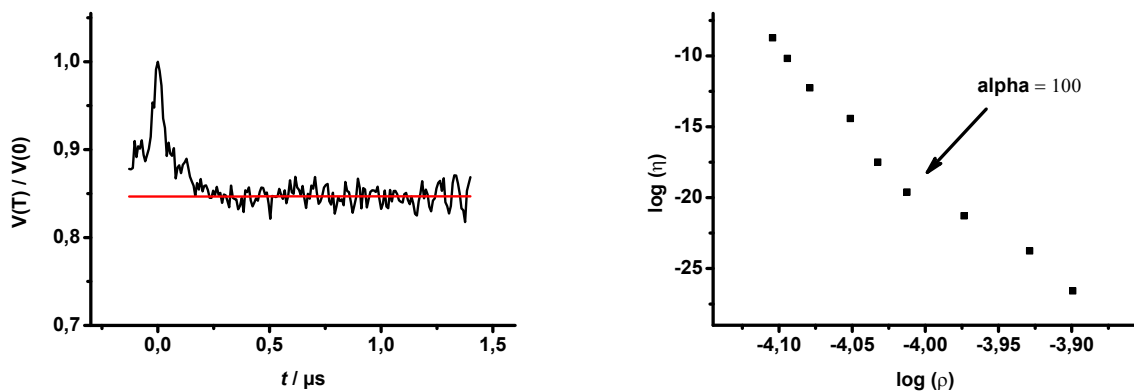


Abbildung A64: Links: Normiertes DEER-Spektrum von $\mathbf{2}_2$ bei einem WGA/Ligand-Verhältnis von 8 : 1 (schwarz) mit Hintergrundsimulation (rot). Rechts: DEER-Datenanalyse mit Tikhonov-Regularisierung. Der optimale Regularisierungsparameter α ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

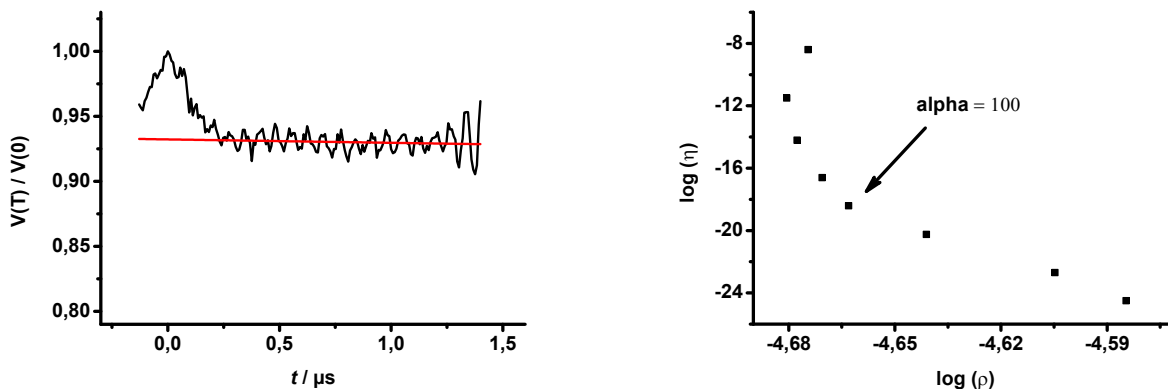


Abbildung A65: Links: Normiertes DEER-Spektrum von $\mathbf{3}_1$ bei einem WGA/Ligand-Verhältnis von 1 : 1 (schwarz) mit Hintergrundsimulation (rot). Rechts: DEER-Datenanalyse mit Tikhonov-Regularisierung. Der optimale Regularisierungsparameter α ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

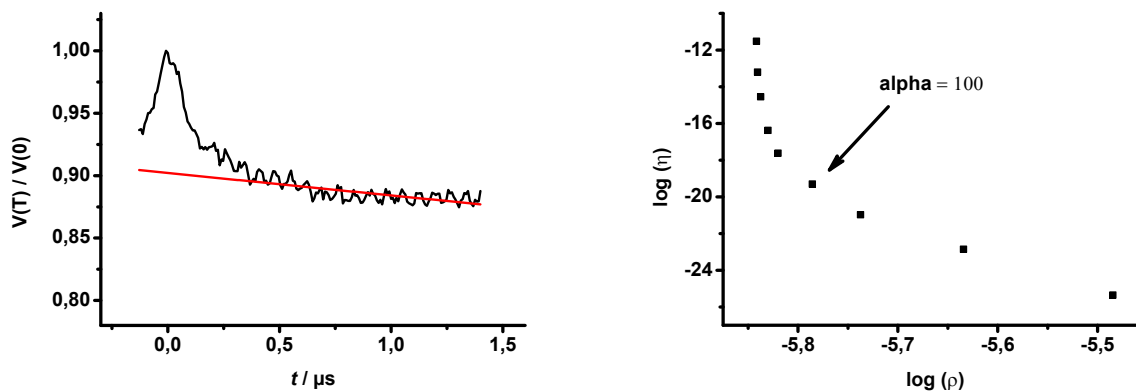


Abbildung A66: Links: Normiertes DEER-Spektrum von $\mathbf{3}_1$ bei einem WGA/Ligand-Verhältnis von 1 : 7 (schwarz) mit Hintergrundsimulation (rot). Rechts: DEER-Datenanalyse mit Tikhonov-Regularisierung. Der optimale Regularisierungsparameter α ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

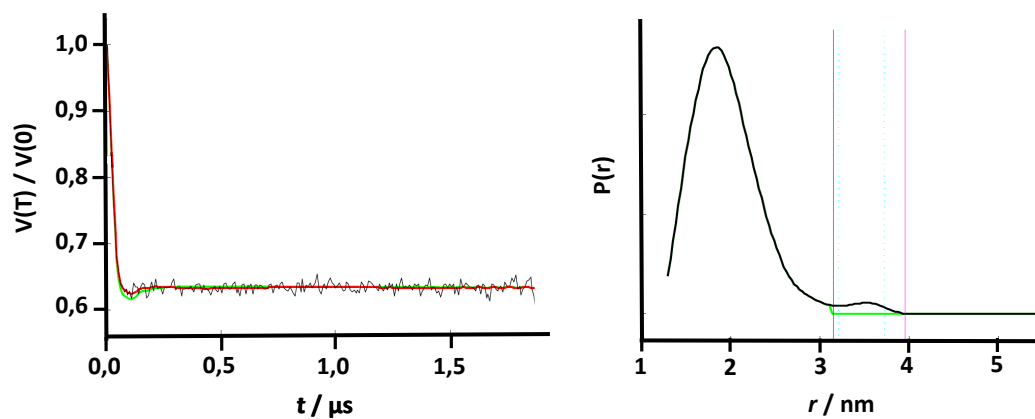


Abbildung A67: Validierung der DEER-Daten von $\mathbf{1}_2$ in Abwesenheit von WGA. Links: Simulation des hintergrundkorrigierten und normierten DEER-Spektrums (schwarz) unter Berücksichtigung der Abstände $r > 3$ nm (rot) und ohne Berücksichtigung der Abstände $r > 3$ nm (grün). Die Unterdrückung der Abstände $r > 3$ nm führt zu keiner signifikanten Veränderung der Simulation. Rechts: DEER-Abstandsverteilung von $\mathbf{1}_2$, die nach der Auswertung der dipolaren Entwicklung auf der linken Seite (rote Simulation) erhalten wurde.

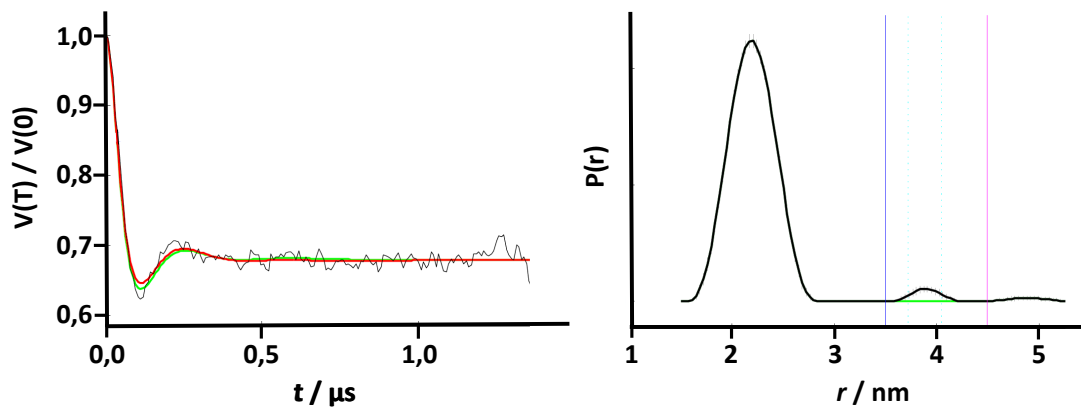


Abbildung A68: Validierung der DEER-Daten von $\mathbf{1}_2$ bei einem WGA/Ligand-Verhältnis von 8 : 1. Links: Simulation des hintergrundkorrigierten und normierten DEER-Spektrums (schwarz) unter Berücksichtigung des Peaks bei $r \approx 4$ nm (rot) und ohne Berücksichtigung des Peaks bei $r \approx 4$ nm (grün). Die Unterdrückung des Peaks bei $r \approx 4$ nm führt zu keiner signifikanten Veränderung der Simulation. Rechts: DEER-Abstandsverteilung von $\mathbf{1}_2$, die nach der Auswertung der dipolaren Entwicklung auf der linken Seite (rote Simulation) erhalten wurde.

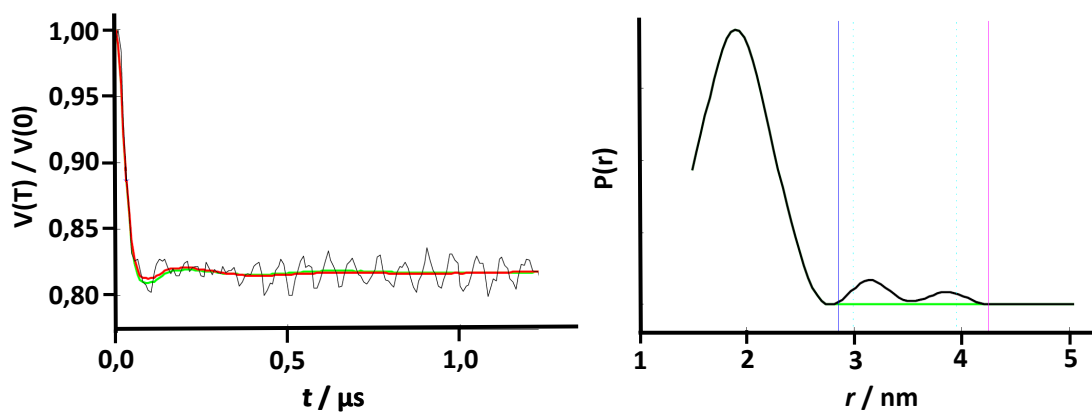


Abbildung A69: Validierung der DEER-Daten von $\mathbf{2}_2$ in Abwesenheit von WGA. Links: Simulation des hintergrundkorrigierten und normierten DEER-Spektrums (schwarz) unter Berücksichtigung der beiden Peaks zwischen 3 nm und 4 nm (rot) und ohne Berücksichtigung der Peaks zwischen 3 nm und 4 nm (grün). Die Unterdrückung dieser Peaks führt zu keiner signifikanten Veränderung der Simulation. Rechts: DEER-Abstandsverteilung von $\mathbf{2}_2$, die nach der Auswertung der dipolaren Entwicklung auf der linken Seite (rote Simulation) erhalten wurde.

9 Anhang zu Kapitel 6

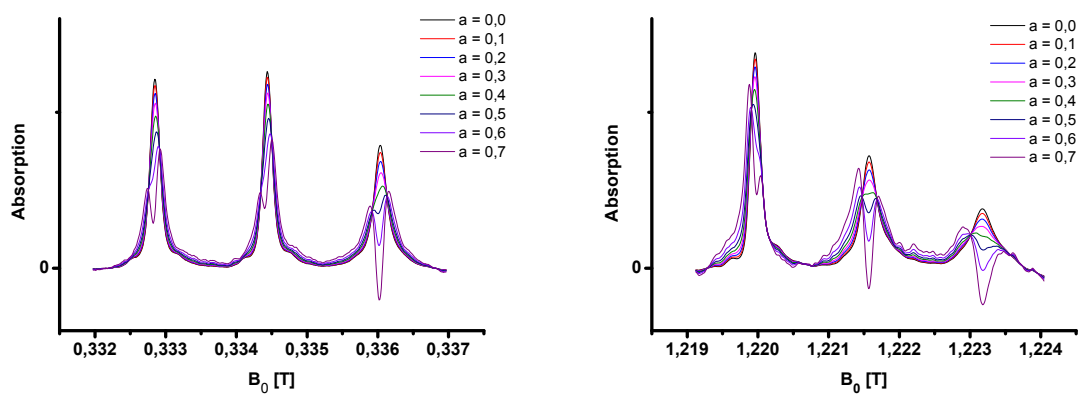


Abbildung A70: ESR-Absorptionsspektren der Linearkombinationen von Abbildung 49, Mitte. Für a -Parameter größer als 0,6 nehmen die Spektren im X-Band (links) und Q-Band (rechts) negative Werte an.

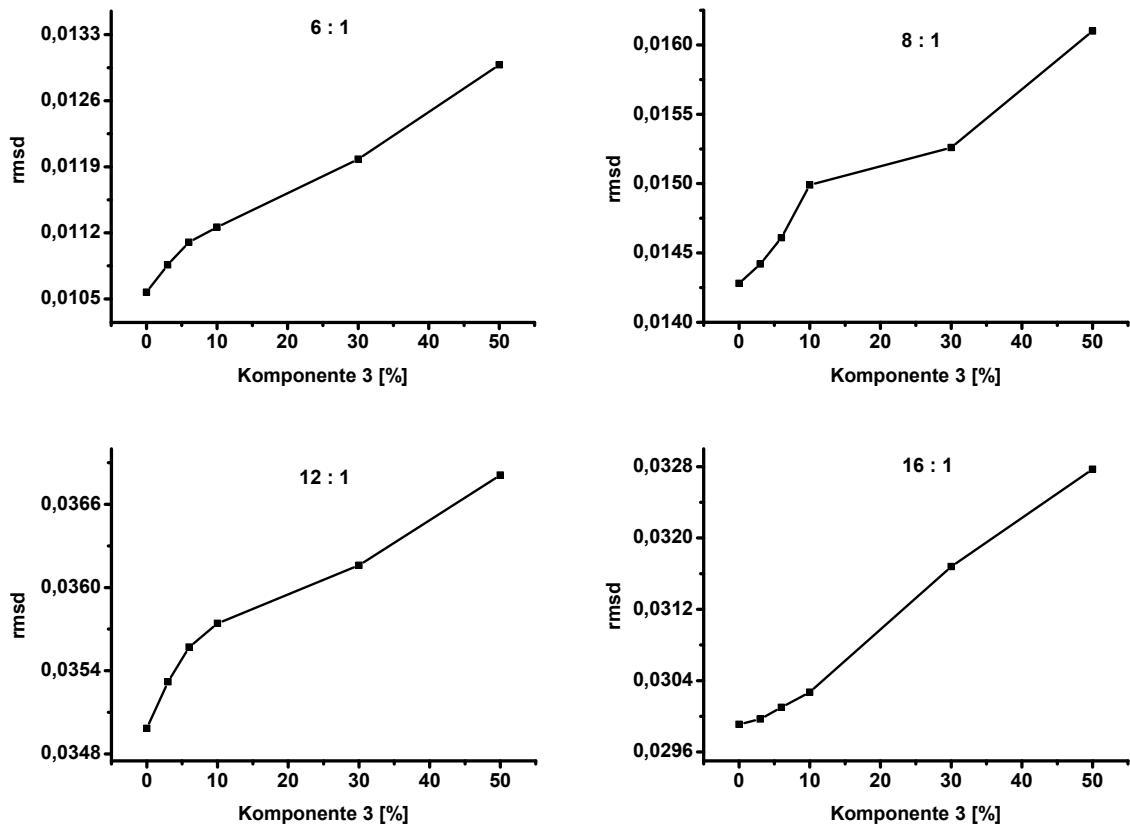


Abbildung A71: Fehlerabweichungen der Spektrenfits für die Messungen bei einem $1_1/WGA$ -Verhältnis von 6 : 1 (oben links), 8 : 1 (oben rechts), 12 : 1 (unten links) und 16 : 1 (unten rechts) in Abhängigkeit von dem prozentualen Anteil der Komponente 3.

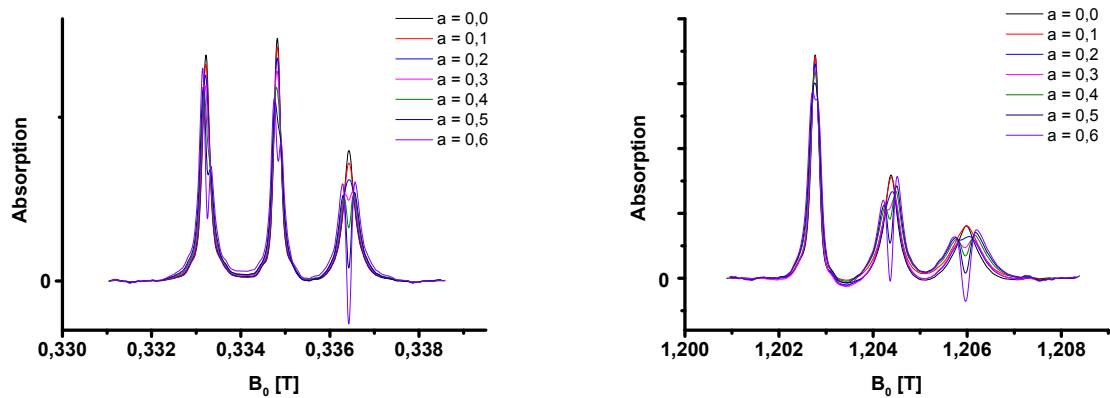


Abbildung A72: ESR-Absorptionsspektren der Linearkombinationen von Abbildung 56, mitte. Für a -Parameter größer als 0,5 nehmen die Spektren im X-Band (links) und Q-Band (rechts) negative Werte an.

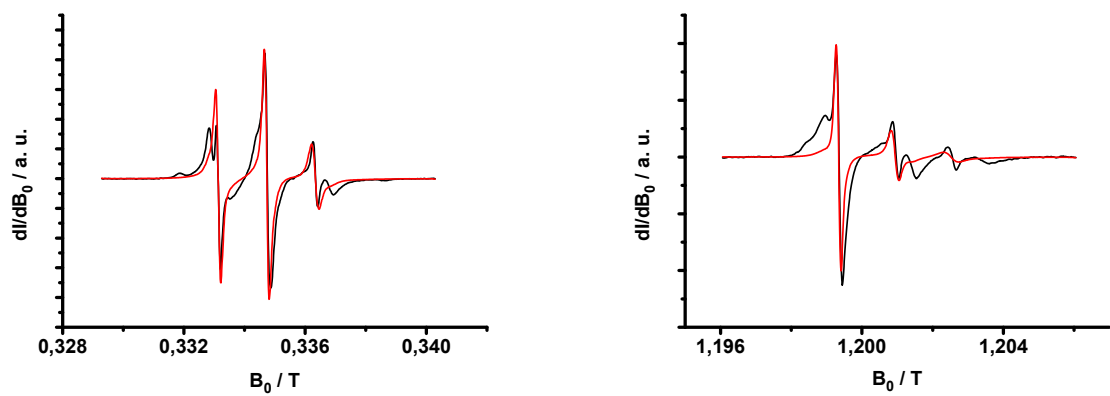


Abbildung A73: X-Band (links) und Q-Band (rechts) cw-ESR-Spektren ($T = 295$ K) von $\mathbf{2}_1$ (schwarz) bei einem Ligand/WGA-Verhältnis von 1 : 1. Die simulierten Spektren (rot) wurden aus den Parametersätzen in Tabelle 10 erzeugt, wobei die prozentualen Anteile der drei Komponenten 50 %, 0 % und 50 % betragen.

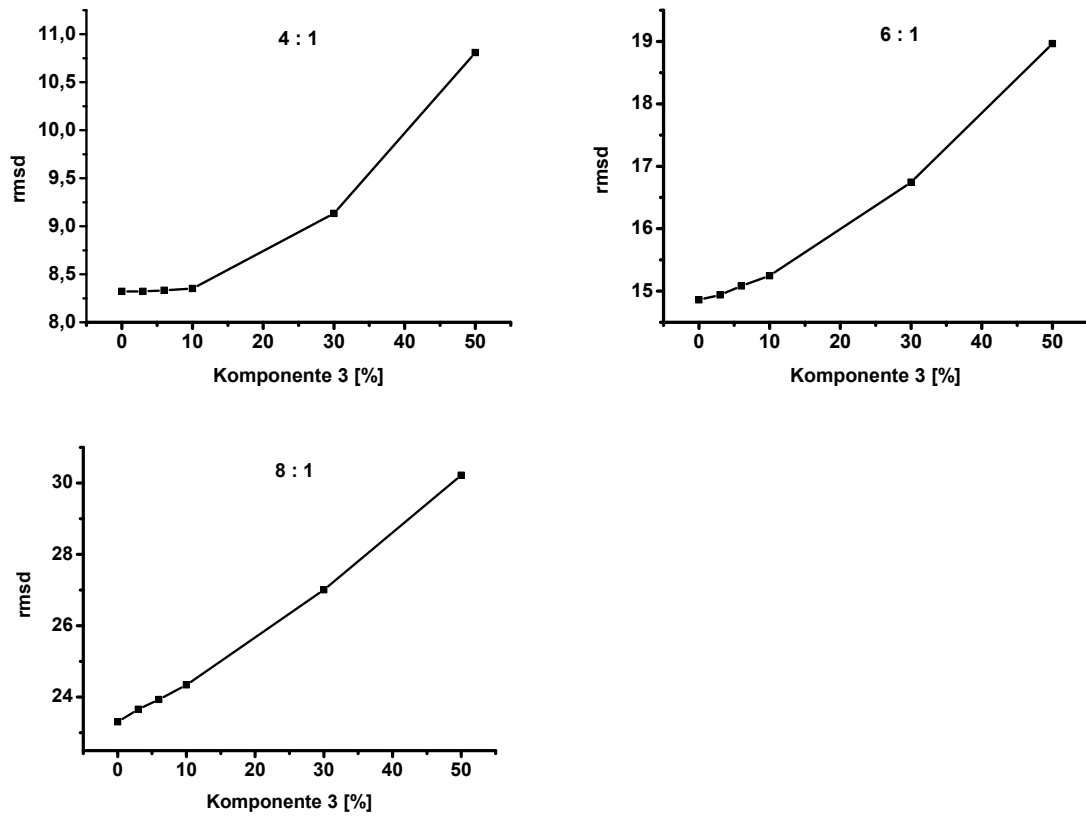


Abbildung A74: Fehlerabweichungen der Spektrenfits für die Messungen bei einem 2_1 /WGA-Verhältnis von 4 : 1 (oben links), 6 : 1 (oben rechts) und 8 : 1 (unten links) in Abhängigkeit von dem prozentualen Anteil der Komponente 3.

10 Literaturverzeichnis

- [1] Yuan C. Lee und Reiko T. Lee. »Carbohydrate-protein interactions: basis of glycobiology«. In: *Accounts of chemical research* 28.8 (1995), S. 321–327.
- [2] Gabriel A. Rabinovich, Natalia Rubinstein und Marta A. Toscano. »Role of galectins in inflammatory and immunomodulatory processes«. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1572.2 (2002), S. 274–284.
- [3] Moira Ambrosi, Neil R. Cameron und Benjamin G. Davis. »Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode«. In: *Organic & biomolecular chemistry* 3.9 (2005), S. 1593–1608.
- [4] Thisbe K. Lindhorst. *Essentials of carbohydrate chemistry and biochemistry*. Wiley-VCH Weinheim, Germany, 2000. ISBN: 3527295437.
- [5] Mathai Mammen, Seok-Ki Choi und George M. Whitesides. »Polyvalent interactions in biological systems: implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors«. In: *Angewandte Chemie International Edition* 37.20 (1998), S. 2754–2794.
- [6] Laura L. Kiessling, Jason E. Gestwicki und Laura E. Strong. »Synthetic multivalent ligands as probes of signal transduction«. In: *Angewandte Chemie International Edition* 45.15 (2006), S. 2348–2368.
- [7] Pavel I. Kitov u. a. »Shiga-like toxins are neutralized by tailored multivalent carbohydrate ligands«. In: *Nature* 403.6770 (2000), S. 669–672.
- [8] David Schwefel u. a. »Structural basis of multivalent binding to wheat germ agglutinin«. In: *Journal of the American Chemical Society* 132.25 (2010), S. 8704–8719.
- [9] Matthias JN Junk, Hans Wolfgang Spiess und Dariush Hinderberger. »The distribution of fatty acids reveals the functional structure of human serum albumin«. In: *Angewandte Chemie International Edition* 49.46 (2010), S. 8755–8759.
- [10] Christopher A. Hunter und Harry L. Anderson. »What is cooperativity?« In: *Angewandte Chemie International Edition* 48.41 (2009), S. 7488–7499.
- [11] Irwin J. Goldstein und R. D. Poretz. »Isolation, physicochemical characterization, and carbohydrate-binding specificity of lectins«. In: *The lectins: properties, functions and applications in biology and medicine* (1986), S. 33–248.
- [12] H. Rüdiger. »Preparation of plant lectins«. In: *Adv Lectin Res* 1 (1988), S. 26–72.

-
- [13] Kanji Hori, Kiminori Matsubara und Keisuke Miyazawa. »Primary structures of two hemagglutinins from the marine red alga, *Hypnea japonica*«. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1474.2 (2000), S. 226–236.
- [14] Hakon Leffler. »Galectins structure and function—a synopsis«. In: *Mammalian Carbohydrate Recognition Systems*. Springer, 2001, S. 57–83. ISBN: 3642536700.
- [15] Gerardo R. Vasta u. a. »Galectins from amphibian species: carbohydrate specificity, molecular structure, and evolution«. In: *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 9 (1997), S. 131–144.
- [16] T. Kubo u. a. »Insect lectins and epimorphosis«. In: *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 8 (1996), S. 357–364.
- [17] Itzhak Ofek und Ronald J. Doyle. *Bacterial adhesion to cells and tissues*. Chapman & Hall New York, 1994. ISBN: 041203011X.
- [18] Elizabeth E. Fry u. a. »The structure and function of a foot-and-mouth disease virus-oligosaccharide receptor complex«. In: *The EMBO journal* 18.3 (1999), S. 543–554.
- [19] Vivek Sharma und Avadhesh Surolia. »Analyses of carbohydrate recognition by legume lectins: size of the combining site loops and their primary specificity«. In: *Journal of molecular biology* 267.2 (1997), S. 433–445.
- [20] Alan Darvill u. a. »Oligosaccharins—oligosaccharides that regulate growth, development and defence responses in plants«. In: *Glycobiology* 2.3 (1992), S. 181–198.
- [21] Jean Denarie, Frederic Debelle und Jean-Claude Prome. »Rhizobium lipid chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis«. In: *Annual review of biochemistry* 65.1 (1996), S. 503–535.
- [22] Irvin E. Liener, Nathan Sharon und Irwin J. Goldstein. *The lectins: properties, functions, and applications in biology and medicine*. Academic press, 1986. ISBN: 0124499457.
- [23] Richard A. Dixon und Nancy L. Paiva. »Stress-induced phenylpropanoid metabolism.« In: *The Plant Cell* 7.7 (1995), S. 1085.
- [24] Willy J. Peumans und E. J. Van Damme. »Lectins as plant defense proteins.« In: *Plant physiology* 109.2 (1995), S. 347.
- [25] Bettina Nägele. *Multivalente Weizenkeimagglutininliganden-Synthese und biophysikalische Untersuchungen*. 2010.
- [26] Atsushi Mizoguchi. »Is the sugar always sweet in intestinal inflammation?« In: *Immunologic research* 37.1 (2007), S. 47–60.

-
- [27] Hans-Joachim Gabius. »Cell surface glycans: the why and how of their functionality as biochemical signals in lectin-mediated information transfer«. In: *Critical reviews in immunology* 26.1 (2006), S. 43–80.
- [28] Joseph D. Schrag u. a. »Lectin control of protein folding and sorting in the secretory pathway«. In: *Trends in biochemical sciences* 28.1 (2003), S. 49–57.
- [29] Irwin J. Goldstein, Harry C. Winter und Ronald D. Poretz. »Plant lectins: tools for the study of complex carbohydrates«. In: *New Comprehensive Biochemistry* 29 (1997), S. 403–474.
- [30] Hans-Joachim Gabius und Sigrun Gabius. *Lectins and glycobiology*. Springer-Verlag New York, 1993. ISBN: 3540562117.
- [31] J. Roth. »Cellular sialoglycoconjugates: a histochemical perspective«. In: *The Histochemical journal* 25.10 (1993), S. 687–710.
- [32] André Danguy u. a. »Applications of lectins and neoglycoconjugates in histology and pathology«. In: *Cells Tissues Organs* 161.1-4 (1998), S. 206–218.
- [33] P. E. Sawchenko und C. R. Gerfen. »Plant lectins and bacterial toxins as tools for tracing neuronal connections«. In: *Trends in Neurosciences* 8 (1985), S. 378–384.
- [34] Mark B. Plenderleith und Peter J. Snow. »Use of lectins as transganglionic neuronal tracers in the study of unmyelinated primary sensory neurons«. In: *Lectin Methods and Protocols*. Springer, 1998, S. 517–526. ISBN: 0896033961.
- [35] Mitsuo Nakashima u. a. »An anterograde and retrograde tract-tracing study on the projections from the thalamic gustatory area in the rat: distribution of neurons projecting to the insular cortex and amygdaloid complex«. In: *Neuroscience research* 36.4 (2000), S. 297–309.
- [36] Nathan Sharon. »Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view«. In: *Trends in biochemical sciences* 18.6 (1993), S. 221–226.
- [37] William I. Weis und Kurt Drickamer. »Structural basis of lectin-carbohydrate recognition«. In: *Annual review of biochemistry* 65.1 (1996), S. 441–473.
- [38] Sneha Sudha Komath, Mannem Kavitha und Musti J. Swamy. »Beyond carbohydrate binding: new directions in plant lectin research«. In: *Organic & biomolecular chemistry* 4.6 (2006), S. 973–988.
- [39] Nathan Sharon und Halina Lis. »How proteins bind carbohydrates: lessons from legume lectins«. In: *Journal of agricultural and food chemistry* 50.22 (2002), S. 6586–6591.

-
- [40] Hanqing Mo, Harry C. Winter und Irwin J. Goldstein. »Purification and Characterization of a Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4Glc/GlcNAc-specific lectin from the fruiting body of the polypore mushroom *Polyporus squamosus*«. In: *Journal of Biological Chemistry* 275.14 (2000), S. 10623–10629.
- [41] Nathan Sharon und Halina Lis. *Lectins*. Springer, 2003. ISBN: 1402011725.
- [42] Halina Lis und Nathan Sharon. »Affinity chromatography for the purification of lectins (a review)«. In: *Journal of Chromatography A* 215 (1981), S. 361–372.
- [43] Christine S. Wright. »Refinement of the crystal structure of wheat germ agglutinin isolectin 2 at 1.8 Å resolution«. In: *Journal of molecular biology* 194.3 (1987), S. 501–529.
- [44] Robert H. Rice und Marilyn E. Etzler. »Chemical modification and hybridization of wheat germ agglutinins«. In: *Biochemistry* 14.18 (1975), S. 4093–4099.
- [45] Christine S. Wright und S. Olafsdottir. »Structural differences in the two major wheat germ agglutinin isolectins.« In: *Journal of Biological Chemistry* 261.16 (1986), S. 7191–7195.
- [46] Max M. Burger. »A difference in the architecture of the surface membrane of normal and virally transformed cells«. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 62.3 (1969), S. 994–1001.
- [47] Christine Schubert Wright. »Crystal structure of a wheat germ agglutinin/glycophorin-sialoglycopeptide receptor complex. Structural basis for cooperative lectin-cell binding.« In: *Journal of Biological Chemistry* 267.20 (1992), S. 14345–14352.
- [48] Christine Schubert Wright, Francisco Gavilanes und Darrell L. Peterson. »Primary structure of wheat germ agglutinin isolectin 2. Peptide order deduced from X-ray structure«. In: *Biochemistry* 23.2 (1984), S. 280–287.
- [49] Caroline Maierhofer. »Synthese und Bindungsstudien von multivalenten Neoglycopeptiden als Weizenkeimagglutinin-Liganden«. Diss. Universität Konstanz, 2009.
- [50] Christine Schubert Wright und Glen E. Kellogg. »Differences in hydrophobic properties of ligand binding at four independent sites in wheat germ agglutinin-oligosaccharide crystal complexes«. In: *Protein science* 5.8 (1996), S. 1466–1476.
- [51] H. Tonie Wright, Gnanakaran Sandrasegaram und Christine S. Wright. »Evolution of a family of N-acetylglucosamine binding proteins containing the disulfide-rich domain of wheat germ agglutinin«. In: *Journal of molecular evolution* 33.3 (1991), S. 283–294.

-
- [52] Beat Ernst, Gerald W. Hart und Pierre Sinaÿ. *Carbohydrates in chemistry and biology: Chemistry of saccharides. Enzymatic synthesis of glycosides and carbohydrate-receptor interaction*. Bd. 2. Wiley-Vch, 2000. ISBN: 3527295119.
- [53] Raymond U. Lemieux. »How water provides the impetus for molecular recognition in aqueous solution«. In: *Accounts of chemical research* 29.8 (1996), S. 373–380.
- [54] Dudleyá Williams und Martiná Westwell. »Aspects of weak interactions«. In: *Chemical Society Reviews* 27.1 (1998), S. 57–64.
- [55] Norbert Muller. »Search for a realistic view of hydrophobic effects«. In: *Accounts of Chemical Research* 23.1 (1990), S. 23–28.
- [56] A. Ben-Naim und R. Mazo. »Size dependence of solvation Gibbs energies: a critique and a rebuttal of some recent publications«. In: *The Journal of Physical Chemistry B* 101.51 (1997), S. 11221–11225.
- [57] Alan D. McNaught und Andrew Wilkinson. *Compendium of chemical terminology*. Bd. 1669. Blackwell Science Oxford, 1997.
- [58] George A. Jeffrey und George A. Jeffrey. *An introduction to hydrogen bonding*. Bd. 12. Oxford University Press New York, 1997.
- [59] R. Eisenschitz und F. London. »Über das Verhältnis der van der Waalsschen Kräfte zu den homöopolaren Bindungskräften«. In: *Zeitschrift für Physik* 60.7-8 (1930), S. 491–527.
- [60] Brent A. Williams, Mary C. Chervenak und Eric J. Toone. »Energetics of lectin-carbohydrate binding. A microcalorimetric investigation of concanavalin A-oligomannoside complexation.« In: *Journal of Biological Chemistry* 267.32 (1992), S. 22907–22911.
- [61] Der-Ing Liao u. a. »Structure of S-lectin, a developmentally regulated vertebrate beta-galactoside-binding protein.« In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91.4 (1994), S. 1428–1432.
- [62] Nikki F. Burkhalter u. a. »Protein-Carbohydrate Interactions: Fundamental Considerations«. In: *Carbohydrates in Chemistry and Biology* (2000), S. 863–914.
- [63] R. O’Brien. In *Protein–Ligand Interactions: Hydrodynamics and Calorimetry; Harding SE, Chowdhry BZ, Eds.* Oxford University Press: Oxford, UK, 2001.
- [64] J. Philip McCoy Jr, James Varani und Irwin J. Goldstein. »Enzyme-linked lectin assay (ELLA): Use of alkaline phosphatase-conjugated Griffonia simplicifolia B isolectin for the detection of α -d-galactopyranosyl end groups«. In: *Analytical Biochemistry* 130.2 (1983), S. 437–444.

-
- [65] Bernd Meyer und Thomas Peters. »NMR-Techniken zum Screening und zur Identifizierung der Bindung von Liganden an Proteinrezeptoren«. In: *Angewandte Chemie* 115.8 (2003), S. 890–918.
- [66] Caroline Maierhofer, Katja Rohmer und Valentin Wittmann. »Probing multivalent carbohydrate–lectin interactions by an enzyme-linked lectin assay employing covalently immobilized carbohydrates«. In: *Bioorganic & medicinal chemistry* 15.24 (2007), S. 7661–7676.
- [67] Rene Roy u. a. »Effect of shape, size, and valency of multivalent mannosides on their binding properties to phytohemagglutinins«. In: *Glycoconjugate journal* 15.3 (1998), S. 251–263.
- [68] Hansjörg Streicher u. a. »Synthesis and binding to plant lectins of sulfur-containing analogues of β Gal1, 3 α GalNAc (T-antigen)«. In: *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 10.12 (2000), S. 1369–1371.
- [69] J. J. Lundquist und E. J. Toone. »See following reviews and references cited therein«. In: *Chem. Rev* 102 (2002), S. 555–578.
- [70] Friedrich Lottspeich Joachim W. Engels und F. Lottspeich. »Bioanalytik«. In: *Metabolomics* 979 (2006), S. 995.
- [71] Ernesto Freire, Obdulio L. Mayorga und Martin Straume. »Isothermal titration calorimetry«. In: *Analytical Chemistry* 62.18 (1990), 950A–959A.
- [72] George P. Privalov und Peter L. Privalov. »Problems and prospects in microcalorimetry of biological macromolecules«. In: *Methods in enzymology* 323 (2000), S. 31–62.
- [73] G. J. K. Praefcke und C. Herrmann. »Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) zur Charakterisierung biomolekularer Wechselwirkungen«. In: *BIOspektrum* 1 (2005), S. 44–47.
- [74] Oliver Krämer. »Theoretische und experimentelle Untersuchungen zur Inhibition des Enzyms Aldose Reduktase«. Diss. Universitätsbibliothek Marburg, 2003.
- [75] I. Connell u. a. »Type 1 fimbrial expression enhances Escherichia coli virulence for the urinary tract«. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93.18 (1996), S. 9827–9832.
- [76] Watson J. Lees u. a. »Polyacrylamides Bearing Pendant. alpha.-Sialoside Groups Strongly Inhibit Agglutination of Erythrocytes by Influenza A Virus: Multivalency and Steric Stabilization of Particulate Biological Systems«. In: *Journal of medicinal chemistry* 37.20 (1994), S. 3419–3433.

-
- [77] Leonard C. Norkin. »Virus receptors: implications for pathogenesis and the design of antiviral agents.« In: *Clinical microbiology reviews* 8.2 (1995), S. 293–315.
- [78] Neil W. Boyce, Peter G. Tipping und Stephen R. Holdsworth. »Glomerular macrophages produce reactive oxygen species in experimental glomerulonephritis«. In: *Kidney Int* 35.3 (1989), S. 778–782.
- [79] Steven K. Dower u. a. »Mechanism of binding of multivalent immune complexes to Fc receptors. 1. Equilibrium binding«. In: *Biochemistry* 20.22 (1981), S. 6326–6334.
- [80] Tarun K. Dam u. a. »Binding of Multivalent Carbohydrates to Concanavalin A and Diosa grandiflora Lectin thermodynamic analysis of the "multivalency effect"«. In: *Journal of Biological Chemistry* 275.19 (2000), S. 14223–14230.
- [81] Valentin Wittmann. »Synthetic Approaches to Study Multivalent Carbohydrate—Lectin Interactions«. In: *Highlights in Bioorganic Chemistry: Methods and Applications* (2004), S. 203–213.
- [82] Seiji Shinkai u. a. »Positive allosteric systems designed on dynamic supramolecular scaffolds: Toward switching and amplification of guest affinity and selectivity«. In: *Accounts of chemical research* 34.6 (2001), S. 494–503.
- [83] J. M. Berg, J. L. Tymoczko und L. Stryer. *Biochemistry (6th edn)*. New York: WH Freeman, 2006.
- [84] F. J. W. Roughton und R. L. J. Lyster. »Some combinations of the Scholander-Roughton syringe capillary and van Slyke's gasometric techniques, and their use in special haemoglobin problems«. In: (*Oslo*) *Hvalradets Skrifter Norske Videnskaps-Akad* 48 (1965), S. 185–198.
- [85] Masamichi Ikeguchi, Kunihiro Kuwajama und Shintaro Sugai. »Ca²⁺ Alteration in the Unfolding Behavior of α -Lactalbumin«. In: *Journal of biochemistry* 99.4 (1986), S. 1191–1201.
- [86] Adrian Whitty. »Cooperativity and biological complexity«. In: *Nature chemical biology* 4.8 (2008), S. 435–439.
- [87] Gianfranco Ercolani und Luca Schiaffino. »Allosteric, chelate, and interannular cooperativity: a mise au point«. In: *Angewandte Chemie International Edition* 50.8 (2011), S. 1762–1768.
- [88] Archibald Vivian Hill. »The combinations of haemoglobin with oxygen and with carbon monoxide. I«. In: *Biochemical Journal* 7.5 (1913), S. 471.

-
- [89] Kazuhisa Taketa und Burton M. Pogell. »Allosteric inhibition of rat liver fructose 1, 6-diphosphatase by adenosine 5'-monophosphate«. In: *Journal of Biological Chemistry* 240.2 (1965), S. 651–662.
- [90] Gianfranco Ercolani. »Thermodynamics of Metal-Mediated Assemblies of Porphyrins«. In: *Non-Covalent Multi-Porphyrin Assemblies*. Springer, 2006, S. 167–215. ISBN: 3540325425.
- [91] Carlo Galli und Luigi Mandolini. »The role of ring strain on the ease of ring closure of bifunctional chain molecules«. In: *European Journal of Organic Chemistry* 2000.18 (2000), S. 3117–3125.
- [92] Gianfranco Ercolani. »Assessment of cooperativity in self-assembly«. In: *Journal of the American Chemical Society* 125.51 (2003), S. 16097–16103.
- [93] Christopher A. Hunter, Maria Cristina Misuraca und Simon M. Turega. »Influence of H-Bond Strength on Chelate Cooperativity«. In: *Journal of the American Chemical Society* 133.50 (2011), S. 20416–20425.
- [94] Christopher A. Hunter u. a. »Cooperativity in multiply H-bonded complexes«. In: *Chemical Communications* 26 (2009), S. 3964–3966.
- [95] Wei Jiang u. a. »Chelate Cooperativity and Spacer Length Effects on the Assembly Thermodynamics and Kinetics of Divalent Pseudorotaxanes«. In: *Journal of the American Chemical Society* 134.3 (2012), S. 1860–1868.
- [96] Gertz Likhtenshtein u. a. *Nitroxides: applications in chemistry, biomedicine, and materials science*. Wiley-VCH, 2008. ISBN: 352762175X.
- [97] Lawrence J. Berliner und Jacques Reuben. *Spin labeling: theory and applications*. Bd. 8. Plenum Press New York: 1989.
- [98] Malte Drescher und Gunnar Jeschke. *EPR spectroscopy: applications in chemistry and biology*. Bd. 321. Springer Verlag, 2012. ISBN: 3642283462.
- [99] Tatyana I. Smirnova und Alex I. Smirnov. »High-field ESR spectroscopy in membrane and protein biophysics«. In: *ESR spectroscopy in Membrane Biophysics*. Springer, 2007, S. 165–251. ISBN: 0387250662.
- [100] A. Einstein. *Annalen der Physik und Chemie (1905)*, 17. S.
- [101] Dariush Hinderberger. »EPR Spectroscopy in Polymer Science«. In: *EPR Spectroscopy*. Springer, 2012, S. 67–89. ISBN: 3642283462.
- [102] Ivan Krstić u. a. »Structure and Dynamics of Nucleic Acids«. In: *EPR Spectroscopy*. Springer, 2012, S. 159–198. ISBN: 3642283462.

-
- [103] Jeschke Gunnar. »Kurze Einführung in die elektronenparamagnetische Resonanzspektroskopie«. In: (2007).
- [104] Larry R. Dalton. *EPR and advanced EPR studies of biological systems*. CRC press Boca Raton, 1985. ISBN: 0849366305.
- [105] David E. Budil, Keith A. Earle und Jack H. Freed. »Full determination of the rotational diffusion tensor by electron paramagnetic resonance at 250 GHz«. In: *The Journal of Physical Chemistry* 97.7 (1993), S. 1294–1303.
- [106] Gunnar Jeschke und Yevhen Polyhach. »Distance measurements on spin-labelled biomacromolecules by pulsed electron paramagnetic resonance«. In: *Physical Chemistry Chemical Physics* 9.16 (2007), S. 1895–1910.
- [107] Oleg Y. Grinberg und Lawrence J. Berliner. *Very High Frequency (VHF) ESR/EPR*. Bd. 22. Plenum Publishing Corporation, 2004. ISBN: 0306483165.
- [108] Michelina G. Finiguerra u. a. »High-field (275GHz) spin-label EPR for high-resolution polarity determination in proteins«. In: *Journal of Magnetic Resonance* 180.2 (2006), S. 197–202.
- [109] Ziwei Zhang u. a. »Multifrequency electron spin resonance study of the dynamics of spin labeled T4 lysozyme«. In: *The Journal of Physical Chemistry B* 114.16 (2010), S. 5503–5521.
- [110] Zhichun Liang und Jack H. Freed. »An assessment of the applicability of multifrequency ESR to study the complex dynamics of biomolecules«. In: *The Journal of Physical Chemistry B* 103.30 (1999), S. 6384–6396.
- [111] Boris Dzikovski u. a. »Multifrequency ESR study of spin-labeled molecules in inclusion compounds with cyclodextrins«. In: *Physical Chemistry Chemical Physics* 11.31 (2009), S. 6676–6688.
- [112] Zhichun Liang u. a. »A multifrequency electron spin resonance study of T4 lysozyme dynamics using the slowly relaxing local structure model«. In: *The Journal of Physical Chemistry B* 108.45 (2004), S. 17649–17659.
- [113] G. F. White u. a. »Analysis of nitroxide spin label motion in a protein–protein complex using multiple frequency EPR spectroscopy«. In: *Journal of Magnetic Resonance* 185.2 (2007), S. 191–203.
- [114] David J. Schneider und Jack H. Freed. »Calculating slow motional magnetic resonance spectra«. In: *Spin Labeling*. Springer, 1989, S. 1–76. ISBN: 1461280605.

-
- [115] Dariush Hinderberger und Gunnar Jeschke. »Site-Specific Characterization of Structure and Dynamics of Complex Materials by EPR Spin Probes«. In: *ChemInform* 39.34 (2008).
- [116] Eva Meirovitch, Akbar Nayeem und Jack H. Freed. »Analysis of protein-lipid interactions based on model simulations of electron spin resonance spectra«. In: *The Journal of Physical Chemistry* 88.16 (1984), S. 3454–3465.
- [117] Keith A. Earle und David E. Budil. »Calculating slow-motion ESR spectra of spin-labeled polymers«. In: *Advanced ESR methods in polymer research (ed. Schlick S)* (2006), S. 53–83.
- [118] Shulamith Schlick. *Advanced ESR methods in polymer research*. Wiley Online Library, 2006. ISBN: 0471731897.
- [119] Zhebo Ding, Andrea F. Gullá und David E. Budil. »Ab initio calculations of electric field effects on the g-tensor of a nitroxide radical«. In: *The Journal of Chemical Physics* 115 (2001), S. 10685.
- [120] Marina Brustolon, Anna Lisa Maniero und Carlo Corvaja. »EPR and ENDOR investigation of tempone nitroxide radical in a single crystal of tetramethyl-1, 3-cyclobutanedione«. In: *Molecular Physics* 51.5 (1984), S. 1269–1281.
- [121] Stefan Stoll und Arthur Schweiger. »EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR«. In: *Journal of Magnetic Resonance* 178.1 (2006), S. 42–55.
- [122] Gunnar Jeschke. »Einführung in die ESR-Spektroskopie«. In: *Skripta, Johannes Gutenberg Universität, Mainz* (1998).
- [123] Arthur Schweiger und Gunnar Jeschke. *Principles of pulse electron paramagnetic resonance*. Oxford University Press on Demand, 2001. ISBN: 0198506341.
- [124] A. D. Milov, K. M. Salikhov und M. D. Shirov. »Application of ELDOR in electron-spin echo for paramagnetic center space distribution in solids«. In: *Fiz. Tverd. Tela* 23 (1981), S. 975–982.
- [125] A. D. Milov, A. B. Ponomarev und Yu D. Tsvetkov. »Electron-electron double resonance in electron spin echo: model biradical systems and the sensitized photolysis of decalin«. In: *Chemical physics letters* 110.1 (1984), S. 67–72.
- [126] V. V. Kurshev, A. V. Astashkin und A. M. Raitsimring. »Modulation effects in a 2+1 electron spin echo pulse sequence«. In: *Journal of Structural Chemistry* 29.1 (1988), S. 62–68.

-
- [127] Piotr G. Fajer, Louise Brown und Likai Song. »Practical pulsed dipolar ESR (DEER)«. In: *ESR spectroscopy in membrane biophysics*. Springer, 2007, S. 95–128. ISBN: 0387250662.
- [128] M. Pannier u. a. »Dead-time free measurement of dipole–dipole interactions between electron spins«. In: *Journal of Magnetic Resonance* 142.2 (2000), S. 331–340.
- [129] G. Jeschke und H. W. Spiess. »Distance measurements in solid-state NMR and EPR spectroscopy«. In: *Novel NMR and EPR techniques*. Springer, 2006, S. 21–63. ISBN: 354032626X.
- [130] Gunnar Jeschke. »Distance measurements in the nanometer range by pulse EPR«. In: *ChemPhysChem* 3.11 (2002), S. 927–932.
- [131] G. Jeschke u. a. »DeerAnalysis2006—a comprehensive software package for analyzing pulsed ELDOR data«. In: *Applied Magnetic Resonance* 30.3-4 (2006), S. 473–498.
- [132] A. D. Milov, A. G. Maryasov und Yu D. Tsvetkov. »Pulsed electron double resonance (PELDOR) and its applications in free-radicals research«. In: *Applied Magnetic Resonance* 15.1 (1998), S. 107–143.
- [133] G. Jeschke u. a. »Sensitivity enhancement in pulse EPR distance measurements«. In: *Journal of Magnetic Resonance* 169.1 (2004), S. 1–12.
- [134] Rainer E. Martin u. a. »Bestimmung der Länge von bis zu 2.8 nm langen TEMPO-Diradikalen mit einem neuen Vier-Puls-Doppel-Elektron-Elektron-Resonanz-Experiment«. In: *Angewandte Chemie* 110.20 (1998), S. 2993–2998.
- [135] Bela E. Bode u. a. »Counting the monomers in nanometer-sized oligomers by pulsed electron-electron double resonance«. In: *Journal of the American Chemical Society* 129.21 (2007), S. 6736–6745.
- [136] G. Jeschke. »DeerAnalysis2013 User Manual«. In: (2013).
- [137] Wayne L. Hubbell und Christian Altenbach. »Investigation of structure and dynamics in membrane proteins using site-directed spin labeling«. In: *Current Opinion in Structural Biology* 4.4 (1994), S. 566–573.
- [138] Wayne L. Hubbell, David S. Cafiso und Christian Altenbach. »Identifying conformational changes with site-directed spin labeling«. In: *Nature Structural & Molecular Biology* 7.9 (2000), S. 735–739.
- [139] Janet E. Banham u. a. »Distance measurements in the borderline region of applicability of CW EPR and DEER: a model study on a homologous series of spin-labelled peptides«. In: *Journal of Magnetic Resonance* 191.2 (2008), S. 202–218.

-
- [140] Per Christian Hansen. »Analysis of discrete ill-posed problems by means of the L-curve«. In: *SIAM review* 34.4 (1992), S. 561–580.
- [141] A. N. Tikhonov und V. Ya Arsenin. »Solution of ill-posed problems«. In: *Winston, Washington. DC* (1977).
- [142] G. Jeschke u. a. »Data analysis procedures for pulse ELDOR measurements of broad distance distributions«. In: *Applied Magnetic Resonance* 26.1-2 (2004), S. 223–244.
- [143] Yun-Wei Chiang, Peter P. Borbat und Jack H. Freed. »The determination of pair distance distributions by pulsed ESR using Tikhonov regularization«. In: *Journal of Magnetic Resonance* 172.2 (2005), S. 279–295.
- [144] Marta Robotta u. a. »Direct Evidence of Coexisting Horseshoe and Extended Helix Conformations of Membrane-Bound Alpha-Synuclein«. In: *ChemPhysChem* 12.2 (2011), S. 267–269.
- [145] Brian M. Hoffman, Peter Schofield und Alexander Rich. »Spin-labeled transfer RNA«. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 62.4 (1969), S. 1195–1202.
- [146] Yoshiaki Motozato u. a. »Competitive inclusion of chloro-substituted acetic acids into β -cyclodextrin monitored by rotational correlation frequencies of 4-hydroxy-2, 2, 6, 6-tetramethylpiperidiny-1-oxy radical«. In: *Canadian Journal of Chemistry* 60.15 (1982), S. 1959–1961.
- [147] Francesco Scarpelli u. a. »Aggregation of transmembrane peptides studied by spin-label EPR«. In: *The Journal of Physical Chemistry B* 113.36 (2009), S. 12257–12264.
- [148] Gunnar Jeschke. »Determination of the nanostructure of polymer materials by electron paramagnetic resonance spectroscopy«. In: *Macromolecular rapid communications* 23.4 (2002), S. 227–246.
- [149] Gunnar Jeschke u. a. »Direct conversion of EPR dipolar time evolution data to distance distributions«. In: *Journal of Magnetic Resonance* 155.1 (2002), S. 72–82.
- [150] Stefan Steigmüller u. a. »Distances between the b-subunits in the tether domain of F₀-F₁-ATP synthase from *E. coli*«. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1708.2 (2005), S. 143–153.
- [151] Horst Kessler u. a. »Does a Molecule have the Same Conformation in the Crystalline State and in Solution? Comparison of NMR Results for the Solid State and Solution with those of the Structural Determination«. In: *Angewandte Chemie International Edition in English* 20.12 (1981), S. 1053–1055.

-
- [152] Yun-Wei Chiang u. a. »Determination of interspin distance distributions by cw-ESR is a single linear inverse problem«. In: *Biophysical journal* 97.3 (2009), S. 930–936.
- [153] Gunnar Jeschke u. a. »Three-spin correlations in double electron–electron resonance«. In: *Physical chemistry chemical physics* 11.31 (2009), S. 6580–6591.
- [154] Tona von Hagens u. a. »Suppression of ghost distances in multiple-spin double electron–electron resonance«. In: *Phys. Chem. Chem. Phys.* (2013).
- [155] J. Milton Harris. *Poly (ethylene glycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications*. Plenum Publishing Corporation, 1992. ISBN: 0306440784.

11 Danksagung

Nach mehrjähriger Arbeit zur Anfertigung der Dissertation ist es an der Zeit, mich bei denjenigen zu bedanken, die mich während dieses spannenden Lebensabschnitts begleitet haben:

Dr. Malte Drescher bin ich für die Überlassung eines aufregenden Themas und die exzellente Betreuung dieser Arbeit zu großem Dank verpflichtet.

Prof. Dr. Helmut Cölfen bin ich für die Übernahme des Zweitgutachtens dankbar.

Bei Prof. Dr. Wittmann möchte ich mich für die langjährige und erfolgreiche Kooperation bedanken.

Bettina Nägele und Torben Seitz bin ich für die hervorragende Synthesearbeit und freundschaftliche Zusammenarbeit dankbar.

Ich danke Christian Hintze, Martin Spitzbarth und Sebastian Wierer für die kritische Durchsicht meiner Arbeit. Ein ganz besonderer Dank gebührt Martin, der mir mit seinem Computerfachwissen ein ums andere Mal weitergeholfen hat.

Der gesamten Arbeitsgruppe Drescher möchte ich für die nette Arbeitsatmosphäre und die stetige Hilfsbereitschaft danken.

Meinen Freunden und Kollegen auch außerhalb des Labors bin ich für die tollen Erlebnisse und gemeinsamen sportlichen Aktivitäten zu großem Dank verpflichtet.

Nicht zuletzt gebührt meiner Familie, die mich allezeit während des Studiums und der Doktorarbeit mit jeder möglichen Unterstützung bedacht haben, ein herzliches Dankeschön.