

**Synthese und Bindungsstudien von
multivalenten Neoglycopeptiden
als Weizenkeimagglutinin-Liganden**

Dissertation

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

an der Universität Konstanz

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Sektion

Fachbereich Chemie

vorgelegt von

Caroline Maierhofer

aus Allensbach

Tag der mündlichen Prüfung: 06. November 2009

1. Referent: Prof. Dr. Valentin Wittmann
2. Referent: Prof. Dr. Andreas Marx

Konstanz 2009

Der praktische Teil dieser Arbeit wurde vom Februar 2005 bis Dezember 2008 am Fachbereich Chemie der Universität Konstanz in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Valentin Wittmann angefertigt.

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Valentin Wittmann für die Überlassung des interessanten Themas, der gewährten wissenschaftlichen Handlungsfreiheit und seinem Interesse am Verlauf der Arbeit meinen herzlichen Dank aussprechen.

Herrn Prof. Dr. Andreas Marx danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Weiterhin möchte ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit, die Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Ganz besonders möchte ich Henning Beckmann und Christian Risinger danken, die bei der Chip-Problematik immer ein offenes Ohr und so manchen Rat für mich hatten. In diesem Zusammenhang gilt mein Dank ebenso Ramon Kranaster (AG Marx), der mir einige Tipps zum Thema Chips geben konnte und der die weltbeste Klimaanlage für den Spotter gebastelt hat. Danken möchte ich auch Angelika Semmler und Dominik Gauss (AG Möller) für die Ratschläge zur Peptidsynthese. Ein ganz großer Dank gebührt Magnus Schmidt, der mich unermüdlich immer wieder mit meinem Mädchen-Computer versöhnt hat und der mir als Inhaber des „Schmiedel-Ladens“ das Uni-Leben versüßt hat. Monica Boldt danke ich für die Nachsynthesen einiger Verbindungen. Ein herzlicher Dank geht an meine Laborkollegin Andrea Niederwieser für die nette und unkomplizierte Laborgesellschaft. Unvergessen bleiben die Grill-Abende mit Euch allen auf dem Dach unter dem Motto: Fangen wir früher an, dann sind wir früher fertig.

Danken möchte ich auch der Kaffee-Runde von L8 für die lustigen und unterhaltsamen Pausen zwischendurch. Was hab ich Tränen gelacht!

Bei Anke Friemel bedanke ich mich für die Unterstützung bei den NMR-spektroskopischen Untersuchungen.

Für die kritische Durchsicht des Manuskripts danke ich Martin Dauner und Christian Risinger.

Vor allem möchte ich aber meinen Eltern für ihre Unterstützung danken, ohne die dieses Studium gar nicht erst möglich gewesen wäre.

Eine waghalsige Unternehmung aus Gründen des Forschungsdrangs
oder des Übermuts; mit lebensbedrohlichen Aspekten,
unberechenbaren Gefahren und manchmal fatalem Ausgang.

Zamonisches Wörterbuch: *Abenteuer*

(Walter Moers, Die Stadt der Träumenden Bücher)

1	Einleitung und Zielsetzung	1
2	Kenntnisstand	5
2.1	Lectine	5
2.1.1	Kurzer historischer Überblick.....	5
2.1.2	Definition	5
2.1.3	Vorkommen.....	6
2.1.4	Einteilung	6
2.1.5	Biologische Bedeutung und Anwendung	7
2.2	Weizenkeimagglutinin	8
2.3	Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen.....	10
2.4	Untersuchung von Protein-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen.....	12
2.4.1	Der Enzym-gekoppelte Lectinbindungstest.....	12
2.4.2	Mikroarray-Technik (Chip-Technik)	13
2.5	Multivalente Wechselwirkungen	22
2.6	Synthetische multivalente Liganden.....	25
3	Konzeption und Aufgabenstellung	34
4	Ergebnisse und Diskussion	38
4.1	Synthese der Zuckerbausteine.....	38
4.1.1	α -Glycosylcarbonat 13	38
4.1.2	β -Carbonat 12	39
4.2	Multivalente Lectinliganden.....	39
4.3	WGA-Bindungsstudien mittels eines Enzym-gekoppelten Lectinbindungstests (ELLA) ...	42
4.3.1	Allgemeines zum herkömmlichen Bindungstest	42
4.3.2	Entwicklung eines ELLAs mit einem kovalent immobilisierten Referenzliganden.....	45
4.4	NMR-basierte Konformationsanalyse	58
4.5	Kristallstrukturen	63
4.6	Synthese der tetravalenten linearen Neoglycopeptide 63 und 76	70
4.7	Bestimmung der Bindungsaffinität der linearen tetravalenten Glycopeptide 63 und 76	81
4.8	Synthese des bivalenten Dipeptids 77	83
4.9	Bestimmung der Bindungsaffinität des bivalenten Dipeptids 77	85

4.10	Strategie zur Darstellung von Kohlenhydrat-Mikroarrays	87
4.11	Synthese des Molenbruch-Partners 86	89
4.12	Synthese des bivalenten Peptids 95 zur kovalenten Immobilisierung.....	91
4.13	Synthese des tetravalenten Cyclopeptids 108 zur kovalenten Immobilisierung.....	93
4.14	Chipexperimente	103
4.14.1	Entwicklung geeigneter Immobilisierungsbedingungen.....	104
4.14.2	Quantitative Auswertung von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen bei unterschiedlichen Oberflächendichten.....	108
4.14.3	Bestimmung von $K_{D,surf}$ -Werten.....	121
4.14.4	Fazit.....	128
5	Zusammenfassung und Ausblick	129
6	Experimenteller Teil	139
6.1	Chemische Arbeiten	139
6.1.1	Allgemeine Angaben.....	139
6.1.2	Allgemeine Arbeitsvorschriften	141
6.1.3	Synthetisierte Kohlenhydrat-Derivate und Linker	147
6.1.4	Synthetisierte Glycopeptide.....	162
6.1.4.1	Synthese der linearen tetravalenten Peptide 63 und 76	162
6.1.4.2	Synthese des bivalenten Dipeptids 77	166
6.1.4.3	Synthese des divalenten Dipeptids 95 zur kovalenten Immobilisierung auf Glasoberflächen.....	169
6.1.4.4	Synthese des tetravalenten Cyclopeptids 108 zur kovalenten Immobilisierung auf Glasoberflächen.....	172
6.2	Biochemische Arbeiten	177
6.2.1	Verwendete spezielle Reagenzien und Geräte	177
6.2.2	Enzymgekoppelter Lectinbindungstest (ELLA)	178
6.2.2.1	Puffer und sonstige Lösungen	178
6.2.2.2	Protokoll zur Durchführung des nicht-kovalenten Bindungstests (PSM-Assay)	179
6.2.2.3	Protokoll zur Durchführung des kovalenten Bindungstests	181
6.2.2.4	Auswertung.....	181
6.2.3	Kohlenhydratarrays.....	182

7	Literaturverzeichnis	185
8	Anhang	197

Abkürzungen

A	Absorption
Å	Ångström
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
abs	absolut
ABTS	2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)-diammoniumsalz
Ac	Acetyl
Ac ₂ O	Acetanhydrid
Ala	Alanin
All	Allyl
Aloc	Allyloxycarbonyl
aromat.	aromatisch
ASGP-R	Asialoglycoprotein-Rezeptor
β	relative inhibitorische Potenz
Boc	<i>tert</i> -Butylmethoxycarbonyl
BOP	Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-(dimethylamino)-phosphonium-hexafluorophosphat
br.	breites Signal
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
CD	Cyclodextrine
Con A	Concanavalin A
CRD	<i>carbohydrate recognition domain</i> (Kohlenhydrat-Erkennungsdomäne)
d	Dublett, Tag(e)
dd	Doppeldublett
Da	Dalton
Dab	Diaminobuttersäure
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
Dde	1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxo-cyclohexyliden)ethyl
Ddv	1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxo-cyclohexyliden)isovaleryl

dest.	destilliert
d. h.	das heißt
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EE	Essigsäureethylester
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> (Enzym-gekoppelter Immunosorbent Test)
ELLA	<i>enzyme-linked lectin assay</i> (Enzym-gekoppelter Lectinbindungstest)
ELS	<i>evaporation light scattering</i> (Verdampfungs-Lichtstreuung)
ESI	Elektrospray-Ionisation
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
Fuc	L-Fucose
eq.	Äquivalent(e)
Gal	D-Galactose
GalNAc	N-Acetyl-D-galactosamin
Glc	D-Glucose
GlcNAc	N-Acetyl-D-glucosamin
Glu	Glutaminsäure
h	Stunde(n)
HBTU	O-Benzotriazolyl-1,1,3,3-tetramethyluronium-Hexafluorophosphat
HIA	<i>haemagglutination inhibition assay</i> (Hämagglutinations-Inhibierungs-Test)
His	Histidin
HMPT	Hexamethylphosphorsäuretriamid
HOAt	Hydroxyazabenzotriazol
HOBt	Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i> (Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie)
HR	<i>high resolution</i> (hochauflösend)
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
Hz	Hertz
i	iso

IC ₅₀	benötigte Konzentration, die eine Aktivität zu 50 % inhibiert
ID	Innendurchmesser
IR	Infrarot
ITC	<i>isothermal titration calorimetry</i> (Isotherme Titrationskalorimetrie)
J	Kopplungskonstante
K	Kelvin
K _D	Dissoziationskonstante
K _{D,surf}	Dissoziationskonstante für eine Bindung an eine Oberfläche
Lys	Lysin
m	Multipllett
M	Molar
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption ionisation</i>
Man	D-Mannose
Me	Methyl
MHz	Megahertz
min	Minute(n)
MS	Massenspektrometrie
Neu5Ac	N-Acetyl-D-neuraminsäure
NMP	N-Methylpyrrolidon
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernmagnetische Resonanz)
NTA	<i>nitrolo triacetic acid</i> (Nitriloessigsäure)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PBST	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung + Tween 20
PDA	Photodiodenarray
PDB	Proteindatenbank
PDITC	1,4-Phenylendiisothiocyanat
PE	Petrolether
PMT	<i>photomultiplier tube</i> (Sekundärelektronenvervielfacher)
ppm	<i>parts per million</i> (Millionstel)
Pr	Propyl
PSM	<i>porcine stomach mucin</i> (Schweinemagenmucin)

PyAOP	7-Azabenzotriazol-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium-hexafluoro-phosphat
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium-hexafluorophosphat
Pyr	Pyridin
q	Quadruplett
quart.	quartär
quin	Quintuplett
R	Rest
red.	reduzierend
R _f	Retentionsfaktor
ROMP	Ringöffnungs-Metathese-Polymerisation
RP	<i>reversed phase</i> (Umkehrphase)
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
SAMs	<i>self-assembled monolayers</i> (Selbstorganisierende Monoschichten)
SPPS	<i>solid phase peptide synthesis</i> (Festphasenpeptidsynthese)
SPR	<i>surface plasmon resonance</i> (Oberflächenplasmonresonanz)
t	Triplet
tert	tertiär
Tf	Trifluormethansulfonyl
TFA	<i>trifluoro acetic acid</i> (Trifluoressigsäure)
TFE	Trifluorethanol
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropylsilan
TMS	Trimethylsilyl
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure
TOF	<i>time of flight</i> (Flugzeit)
Trt	Trityl
Tyr	Tyrosin
ü. N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
Val	Valin

verd.

verdünnt

vgl.

vergleiche

WGA

wheat germ agglutinin (Weizenkeimagglutinin)

z. B.

zum Beispiel

1 Einleitung und Zielsetzung

Kohlenhydrate (Saccharide) sind, bezogen auf die Masse, die am häufigsten vorkommenden Biomoleküle.^[1] Sie bilden neben den Lipiden, den Nukleinsäuren und den Proteinen eine weitere Klasse an bedeutenden Naturstoffen. Das Vorkommen von Polysacchariden wie z. B. Cellulose, Chitin, Stärke und Glycogen sowohl in einzelligen als auch in höheren Organismen und deren Funktion als Bestandteil von Zellgerüsten oder als Energiespeicher sind seit langem bekannt. Die Erkenntnis, dass Glykokonjugate wie Glycoproteine oder Glycolipide in allen Organismen vorkommen und dass sie regulatorische Funktionen erfüllen, setzte sich jedoch erst später durch. In den Lipiddoppelschichten der Zellmembran findet sich eine Vielzahl von Glykokonjugaten, die ihre Glycanstrukturen in den extrazellulären Raum hinein präsentieren (Abbildung 1).

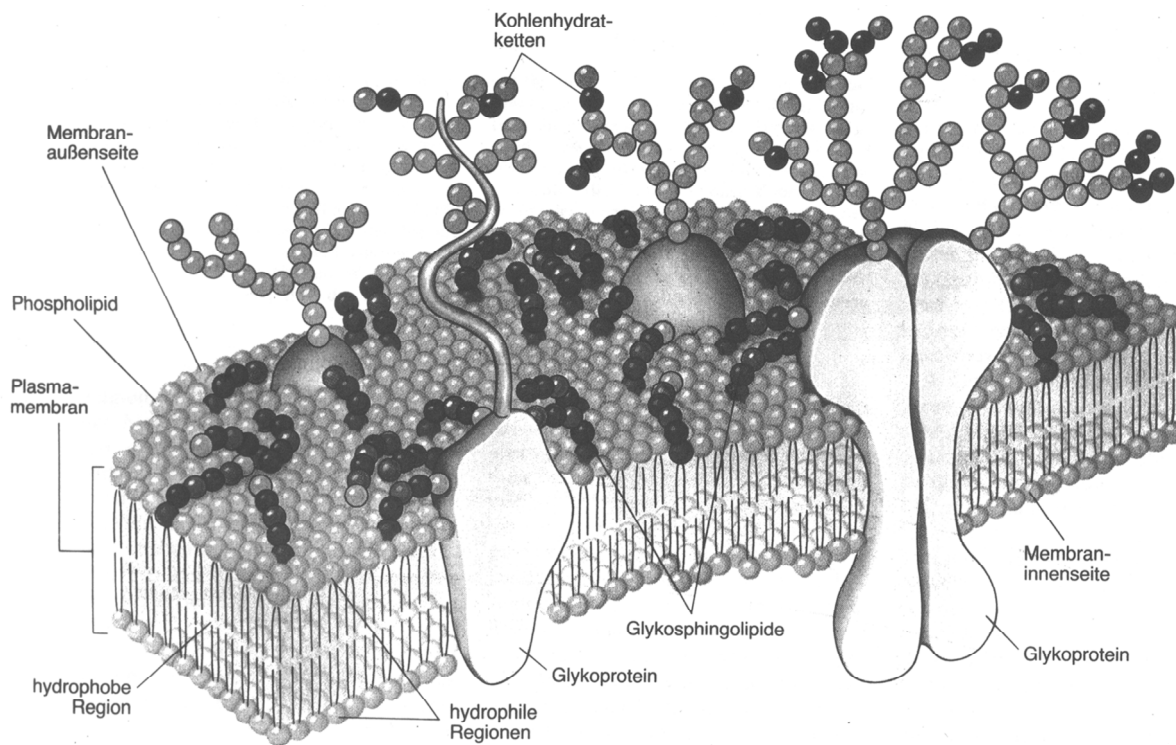


Abbildung 1. Schematische Darstellung der Zellmembran im Querschnitt.^[2]

Diese Kohlenhydratstrukturen auf der Zellmembran bilden die Glycocalix, einen Kohlenhydratmantel, der die Zelle umgibt. Die Glycocalix gibt jedem Zelltyp ein bestimmtes Aussehen und verändert sich während der Entwicklung, Differenzierung oder Zellerkrankung in charakteristischer Weise. Die Glycane zeichnen sich durch eine hohe strukturelle Vielfalt und

Komplexität aus, die zur Speicherung von (biologischer) Information genutzt wird.^[3,4] Oligosaccharide besitzen gegenüber anderen zur Informationsvermittlung verwendeten Biomolekülen wie Proteinen oder Nukleinsäuren den entscheidenden Vorteil, dass die Verknüpfungsmöglichkeiten zwischen ihren Monomeren sehr zahlreich sind.^[5,6] Auf Grund der mehrfach vorhandenen Alkoholfunktion können bei der Verknüpfung von Monosacchariden unterschiedliche Regioisomere und vor allem auch verzweigte Strukturen gebildet werden. Durch das Vorhandensein von stereogenen Zentren in den Monomereinheiten erhöht sich die Zahl der möglichen Isomeren durch Verknüpfung zusätzlich. Oligosaccharide können also pro Gewichtseinheit deutlich mehr Information speichern als unverzweigte Proteine und Nukleinsäuren.

Die Entschlüsselung dieser in den Glycanstrukturen der Glycocalix gespeicherten Information erfolgt durch nicht-kovalente Wechselwirkung mit anderen Biomolekülen, darunter z. B. Enzyme, Hormone, Antikörper, Lectine, Toxine sowie ganze Mikroorganismen wie Viren oder Bakterien (Abbildung 2).^[7-10]

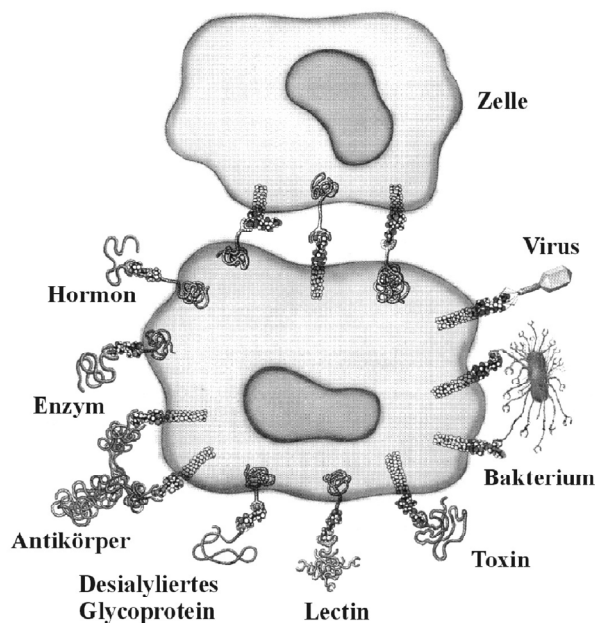


Abbildung 2. Molekulare Erkennung durch Glykokonjugate an Zelloberflächen.^[11]

Die spezifische Erkennung von Kohlenhydratstrukturen in biologischen Systemen durch Lectine (kohlenhydratbindende Proteine) ist die Grundlage zahlreicher intra- und interzellulärer Prozesse^[12] unter anderem beim Entzündungsvorgang, bei der Befruchtung oder bei der

Metastasierung von Krebszellen.^[13] Künstliche Lectinliganden sind daher von außerordentlichem medizinischem Interesse, weil sie als Inhibitoren oder Effektoren entsprechender biologischer Prozesse fungieren können.^[14]

Da viele Lectine die individuellen Kohlenhydratpitope nur mit geringer Affinität erkennen (Dissoziationskonstanten im millimolaren Bereich), spielt Multivalenz eine wichtige Rolle in lectinvermittelten Wechselwirkungen.^[15] Durch simultane Bindung mehrerer Liganden einer biologischen Einheit mit mehreren Rezeptoren einer anderen biologischen Einheit werden sowohl die Affinitäten (Avidität) als auch Spezifitäten in solchen Interaktionen erheblich verstärkt.^[16] Die Potenz eines multivalenten Lectinliganden hängt entscheidend von der räumlichen Präsentation der Kohlenhydrate und der damit verbundenen Möglichkeit, mehrere Bindungsstellen des Lectins gleichzeitig zu besetzen, ab.^[17] Seit kurzem beschäftigen sich daher entsprechende Untersuchungen immer mehr mit dem Einfluss der Ligandenarchitektur auf Bindungseigenschaften und biologische Funktionen.^[18,19]

Die Mikroarraytechnologie ist eine relativ neue Methode zur Analytik nicht-kovalenter Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen.^[20-22] Durch die orts aufgelöste Immobilisierung (definierte Beziehung zwischen Ort und Struktur) des einen Bindungspartners auf einem festen Träger kann man den anderen Bindungspartner in Lösung zugeben, der dann spezifisch an seinen immobilisierten Wechselwirkungspartner bindet. Das Array-Verfahren ist anderen Methoden zur Analytik von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen bezüglich Geschwindigkeit und Effizienz überlegen, da bei einem Array-Experiment viele Analysen parallel durchgeführt und in einem Schritt ausgewertet werden. Durch die Miniaturisierung werden zudem nur geringe Probenmengen benötigt.

Mit Kohlenhydrat-Mikroarrays kann man die natürliche Anordnung der gebundenen Oligosaccharide auf der Zelloberfläche nachahmen. Somit wird eine multivalente Wechselwirkung von Proteinen mit auf einer Oberfläche immobilisierten Kohlenhydraten ermöglicht. Kohlenhydrat-Arrays wurden bereits auf vielfältige Weise zur Untersuchung von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen eingesetzt.^[23,24] Neben dem Nachweis bekannter Wechselwirkungen gelang es mit ihrer Hilfe neue kohlenhydratbindende Proteine zu entdecken. Kohlenhydrat-Arrays werden nicht nur zur Bestimmung von Kohlenhydrat-Protein-Bindungsstärken und -spezifitäten genutzt, sondern z. B. auch zur Hochdurchsatzanalyse zum Auffinden neuer Inhibitoren von Glycan-Protein-Wechselwirkungen.

In dieser Arbeit sollte zum einen das Ziel verfolgt werden, durch die gezielte Synthese multivalenter Neoglycopeptide und deren Untersuchung auf Lectin-Bindungseigenschaften zu

einem tieferen Verständnis der Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkung beizutragen. Zum anderen sollte untersucht werden, wie die räumliche Präsentation von immobilisierten Kohlenhydraten die Affinität zu Lectinen beeinflusst. Als Lectin sollte das aus Weizen (*Triticum Vulgaris*) gewonnene Weizenkeimagglutinin (WGA), welches spezifisch *N*-Acetyl-D-glucosamin (GlcNAc) bindet, zum Einsatz kommen.

2 Kenntnisstand

2.1 Lectine

2.1.1 Kurzer historischer Überblick

S. Weir Mitchell entdeckte bereits 1860, dass Klapperschlangengift zur Verklumpung (Agglutination) von Taubenblut führt.^[25] Kurz darauf berichtete H. Stillmark, dass bestimmte Pflanzenextrakte eine „Zusammenballung der rothen Blutkörperchen“^[26] bewirkten. J. B. Sumner gelang es 1919 erstmals, ein Lectin, das Concanavalin A (Con A), zu kristallisieren.^[27] Sumner und Howell waren auch die ersten, die zeigen konnten, dass Saccharose die Agglutinationseigenschaften von Con A inhibiert und führten die beobachteten Phänomene auf eine Protein-Kohlenhydrat-Wechselwirkung zurück.^[28] Der Begriff „Lectin“ (lat. legere = lesen, auswählen) wurde aber erst 1954 von W. C. Boyd vorgeschlagen.^[29] Mit der Erkenntnis, dass Lectine als Moleküle für die Zellerkennung von praktischem Nutzen sein könnten, gaben die Studien von Sugishita, Jonsson, Boyd und Renkonen den Startschuss für die Lectinforschung.^[30] M. Funatsu isolierte das erste nicht-toxische Lectin aus *Ricinus communis* und konnte somit die weit verbreitete Meinung, dass Lectine notwendigerweise toxische Proteine seien, aus dem Weg räumen.^[31-33] Außerdem konnte gezeigt werden, dass verschiedene Lectine, z. B. das aus der Sojabohne, Glycoproteine sind.^[34] Durch die Beobachtung, dass Lectine Erythrozyten blutgruppenspezifisch agglutinieren, wurde die biochemische Basis des AB0-Blutgruppensystems gelegt, und der Lectinforschung gelang endgültig der Durchbruch.^[35] Das heutige Verständnis der Zelladhäsion und -wanderung, der Regulation des Wachstums sowie der Entstehung von Infektionen basiert auf den Erkenntnissen der funktionellen Lectinomie.^[36,37]

2.1.2 Definition

Um die heutige Version des Begriffs *Lectin* zu erreichen, musste seine Definition häufig verfeinert werden. Die aktuelle Definition lautet: „Alle Proteine mit kohlenhydratbindenden Domänen, die keine Enzyme oder Immunoglobuline sind, werden als Lectine bezeichnet.“^[4] Multivalenz ist keine Voraussetzung, wird aber von den meisten Lectinen erfüllt.

2.1.3 Vorkommen

Mittlerweile wurden Lectine in den meisten Organismen, sowohl in Viren und Bakterien als auch in Pflanzen, Pilzen und Tieren, nachgewiesen.^[38]

Die ergiebigste Quelle der pflanzlichen Lectine stellen Pflanzensamen dar. Aber auch aus Wurzeln, Knollen, Zwiebeln, Rinde oder Blättern wurden schon Lectine isoliert.^[39] Die meisten Pflanzengewebe enthalten nur ein einziges Lectin; es sind aber Beispiele von Samen bekannt, die zwei oder mehr Lectine enthalten, welche sich in ihren Zuckerspezifitäten und anderen Eigenschaften unterscheiden.^[40]

Das erste tierische Lectin wurde 1974 von Stockert et al. aus Kaninchenleber isoliert.^[41] Dennoch sind Lectine aus Tieren schon länger als pflanzliche Lectine bekannt, auch wenn sie damals noch nicht als kohlenhydratbindende Proteine erkannt wurden. Bereits 1853 beobachteten J. M. Charcot und C. Robin kristallähnliche Strukturen in pathologischem Gewebe, die erst später als Lectin-komplexe identifiziert wurden.^[25]

2.1.4 Einteilung

Aufgrund ihrer weiten Verbreitung werden Lectine oft nach ihrer Herkunft eingeteilt.^[42] Mikrobielle Lectine kommen auf Oberflächen von Bakterien, Viren und Protozoen vor. Pflanzliche Lectine werden weiter in die jeweiligen Familien unterteilt in denen sie gefunden werden, z. B. in Cerealien (Getreide), Leguminosen (Hülsenfrüchte) oder Solanaceae (Nachtschattengewächse). Tierische Lectine werden weiter nach strukturellen Eigenschaften unterteilt in Galectine (Galactose-spezifisch), P-Typ-Lectine (Mannose-6-Phosphat-spezifisch), I-Typ-Lectine (immunoglobulinartig), L-Typ-Lectine (sequenzhomolog zu Leguminosen-Lectinen) und C-Typ-Lectine (Ca²⁺-abhängig).

Eine Einteilung der Lectine nach ihrer Aminosäure-Sequenz-Homologie kann für das Verständnis der molekularen Mechanismen der Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkung von Vorteil sein.^[38] In vielen Fällen gleichen sich die Sequenzen innerhalb taxonomischer Kategorien; manchmal gibt es allerdings auch Ähnlichkeiten über phylogenetische Grenzen hinaus.

Da viele Lectine selbst Glycoproteine sind, bietet sich eine Einteilung nach Art des kovalent gebundenen Kohlenhydrats an.^[43] Man unterscheidet zwei Typen: Typ I enthält hauptsächlich

D-Mannose, *N*-Acetyl-D-glucosamin, manchmal auch L-Fucose und D-Xylose. Typ II enthält dagegen L-Arabinose und D-Galactose.

Bei Untersuchungen von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen hat sich jedoch die Klassifizierung der Lectine nach ihrer Bindungsspezifität durchgesetzt. Diese Einteilung in fünf Gruppen richtet sich nach dem Monosaccharid, für welches das Lectin die höchste Affinität besitzt: D-Mannose (Man), D-Galactose/*N*-Acetyl-D-galactosamin (Gal/GalNAc), *N*-Acetyl-D-glucosamin (GlcNAc), L-Fucose (Fuc) und *N*-Acetyl-D-neuraminsäure (Neu5Ac)^[9]. Dies sind zugleich die in Glycanstrukturen am häufigsten auftretenden Kohlenhydrate. Diese Einteilung hat allerdings den Nachteil, dass kein eindeutiger Zusammenhang mehr zwischen Spezifitätsklasse einerseits und molekularer Struktur andererseits besteht; Kohlenhydrat-erkennende Bindungsstellen mit derselben Bindungsspezifität können sich aus unterschiedlichen Strukturgerüsten unter Beteiligung verschiedener funktioneller Gruppen ihrer Aminosäuren zusammensetzen.^[44]

2.1.5 Biologische Bedeutung und Anwendung

Lectine kommen in Pflanzen am häufigsten vor, weshalb Pflanzenlectinen auch großes Interesse zu teil wurde. Verschiedene Eigenschaften der pflanzlichen Lectine wie z. B. antivirale, antibakterielle, fungizide und insektizide Aktivitäten wurden bereits beschrieben.^[38] Viele Lectine bieten Pflanzen somit unter anderem Schutz vor Fraßfeinden. Dies könnte der Grund sein, warum Lectine nicht nur in den Samen von Pflanzen, sondern auch in anderen peripheren Teilen wie z. B. Blättern gefunden werden. Weiterhin wird vermutet, dass Lectine als Ersatz für Stickstoff-Speicherproteine dienen, da Stickstoff ein essentielles Element ist, welches das Pflanzenwachstum limitiert. Vom Menschen werden pflanzliche Lectine über die unterschiedlichsten Nahrungsmittel aufgenommen. Das in Bohnen enthaltene Lectin ist in ungekochter Form für den Menschen giftig und führt durch die Bindung an Glycoproteine im Verdauungstrakt zu Verstimmungen im Magen-Darm-Bereich. Die meisten Lectine sind jedoch hitzeempfindlich und werden durch Kochen inaktiviert.^[40]

Obwohl ihre biologische Rolle immer noch weitgehend ungeklärt ist, haben Pflanzenlectine eine breite Anwendung. So werden sie in der Biochemie zum Auffinden, Isolieren und Charakterisieren

von Glykokonjugaten genutzt. In der Zellbiologie, Histochemie und in der Medizin werden Lectine für die unterschiedlichsten Tests herangezogen.^[45]

Lectine von Säugetieren finden sich in verschiedensten Gewebeformen. Sie treten nicht nur auf Zelloberflächen auf, sondern erfüllen auch intrazellulär wichtige Aufgaben^[46], wie z. B. bei der Gewährleistung, dass nur korrekt gefaltete Proteine aus dem Endoplasmatischen Reticulum in das Cytosol gelangen.^[47] Auf der Zelloberfläche spielen sie wie bereits erwähnt eine wichtige Rolle in der Zell-Zellkommunikation bei Entzündungsprozessen^[48,49], bei der Anheftung von Bakterien oder Viren an Wirtszellen^[50,51] oder auch beim Befruchtungsvorgang^[52]. Um das gezielte Eingreifen in diese Prozesse zu ermöglichen, bedarf es weiterer Forschung zur Aufklärung ihrer Funktionsweise.

2.2 Weizenkeimagglutinin

Weizenkeimagglutinin (WGA) gehört zu der Familie der Getreidelectine. Es ist eines der am besten untersuchten Mitglieder dieser Familie.^[53] Weizenkeimagglutinin war das erste Lectin, an dem gezeigt werden konnte, dass es an Tumorzellen stärker bindet als an normale Zellen.^[54,55] WGA gehört heute neben Concanavalin A zu den am meisten verwendeten Lectinen. Es bindet nicht-kovalent spezifisch terminale *N*-Acetyl-D-neuraminsäure und *N*-Acetyl-D-glucosamin. WGA benötigt für die Bindung seiner Kohlenhydratliganden keine Metallionen.

Weizenkeimagglutinin ist eine Mischung aus drei Isolectinen, die sich in ihrer Aminosäuresequenz leicht unterscheiden.^[53,56,57] Einige Kristallstrukturen von WGA mit Kohlenhydratliganden, z. B. mit zwei Chitobioseresten (D-GlcNAc- β -1,4-D-GlcNAc), sind bekannt (Abbildung 3).^[58]

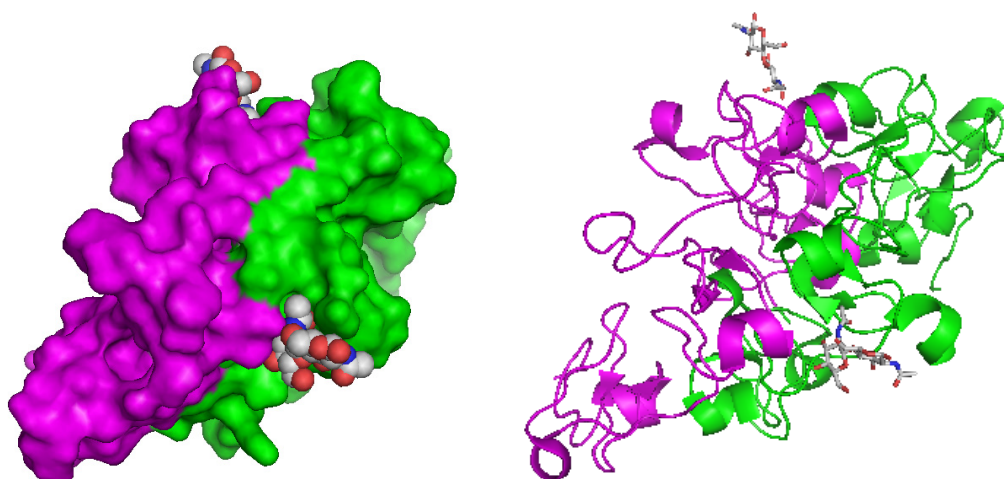


Abbildung 3. Röntgenstruktur von WGA mit zwei sichtbaren Liganden (Chitobiose), PDB-Code 1K7U.^[58]

WGA ist ein C_2 -symmetrisches Dimer aus zwei identischen glycin- und cysteinreichen 17-kDa-Untereinheiten. Jede Untereinheit ist aus vier homologen Subdomänen (A bis D), den sogenannten Hevein-Domänen, aufgebaut. Diese unregelmäßig gefalteten Peptidketten werden durch je vier Disulfidbrücken in eine kompakte und stabile Konfiguration gebracht. 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 so die Zucker-Bindungsstellen S (Abbildung 4).

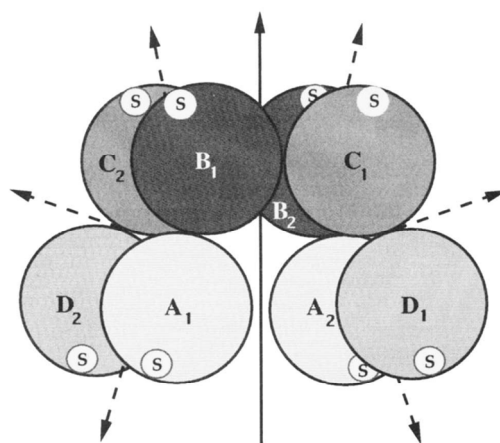


Abbildung 4. Schematisches WGA-Dimer.^[59]

WGA unterscheidet sich von anderen Lectinen dadurch, dass es pro Monomer mehr als eine Kohlenhydrat-Bindungsstelle besitzt. Bei jeder dieser vier Subdomänen pro Untereinheit

(Monomer) handelt es sich um eine Kohlenhydrat-erkennende Domäne (CRD). Somit besitzt das WGA-Dimer acht unabhängige Saccharid-Bindungsstellen.^[59-62] Um diese zu unterscheiden, werden jeder Bindungsstelle Abkürzungen, wie z. B. B1C2, zugeordnet. Der erste Buchstabe in dieser Zuordnung bezeichnet die Domäne, die die aromatische Bindungstasche und damit den Hauptteil für die Bindungsstelle zur Verfügung stellt. Der zweite Buchstabe bezeichnet die Helfer-Domäne, die die polare Region beisteuert. Die Zahlen bezeichnen die jeweilige Peptidkette des WGA-Dimers. Jede Bindungsstelle liegt wegen der C₂-Symmetrie zweimal vor (A1 und A2, B1C2 und B2C1, C1B2 und C2B1, D1A2 und D2A1). Da die D-Domäne keine polare Region besitzt, die zur Bindungsstelle beitragen kann, bestehen die Bindungsstellen der Domänen A1 und A2 nur aus den aromatischen Bindungstaschen. Bei den Bindungsstellen BxCy bzw. CxBy handelt es sich um primäre Bindungsstellen mit höherer Affinität und bei Ax bzw. DxAy um sekundäre Bindungsstellen mit geringerer Affinität.^[59]

Die Aminosäurereste, die eine wichtige Rolle in der Kohlenhydratbindung spielen, sind aromatische Aminosäuren. Tyr³⁰ tritt stark mit dem Carbonylsauerstoff der *N*-Acetylgruppe des Zuckers in Wechselwirkung und ist außerdem in der Lage, mit seiner OH-Gruppe eine Wasserstoffbrückenbindung zu der OH-Gruppe, die benachbart zu der *N*-Acetylgruppe ist, zu bilden. GlcNAc und Neu5Ac erfüllen beide die stereochemischen Voraussetzungen einer äquatorialen *N*-Acetylgruppe und einer dazu benachbarten äquatorialen OH-Gruppe.^[42,60,61]

Die WGA-Bindung zu GlcNAc-enthaltenden Oligosacchariden wurde durch NMR-Methoden und Mikrokalorimetrie untersucht^[63,64], aber auch Röntgenstrukturanalysen von den einzelnen Isolectinen und ihren Komplexen mit Zuckerderivaten sind vorhanden.^[58,61,65,66]

2.3 Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen

Zu den wichtigsten nicht-kovalenten intermolekularen Bindungen zwischen Protein und Substrat zählen Wasserstoffbrücken, ionische und hydrophobe Wechselwirkungen.

Bei den Wasserstoffbrücken fungiert der Bindungspartner, der ein Wasserstoffatom an einem elektronegativen Atom besitzt, als Donor und der Bindungspartner mit einem elektronenreichen Heteroatom als Akzeptor. Die Wasserstoffbrücken spielen eine wichtige Rolle in der Spezifitätskontrolle bei der Kohlenhydraterkennung.^[67] So zeigt sich diese Spezifitätskontrolle beispielsweise im Komplex von Galectin-1 mit *N*-Acetyllactosamin; das Protein verwendet

Arginin-, Asparagin- und Histidin-Reste, um Wasserstoffbrücken zur axialen 4-OH-Gruppe des Galactose-Rests auszubilden.^[68] Somit nutzt das Protein verschiedene Kontakte zu einer OH-Gruppe, um zwischen Galactose und anderen verwandten Zuckern, die eine äquatoriale Hydroxylgruppe an der 4-Position besitzen, zu unterscheiden. Die Hydroxylgruppen der Kohlenhydrate können sowohl als Donor als auch Akzeptor für Wasserstoffbrückenbindungen wirken. Die Stärke der Wasserstoffbrücke hängt von den teilnehmenden Atomen sowie vom Bindungswinkel ab.

Die ionische Wechselwirkung, auch Salzbrücke genannt, ist eine weitere Art der nicht-kovalenten Bindung zwischen polaren Gruppen. Salzbrücken treten bei Substrat-Protein-Wechselwirkungen häufig in der Form auf, dass eine Carboxylatgruppe mit einem Ammoniumion in Kontakt tritt. So besitzen bestimmte biologisch wichtige Saccharide wie z. B. Sialyl Lewis^X oder Heparin anionische Gruppen, die ionische Wechselwirkungen mit Seitenketten von Proteinen eingehen. Die Bindungsstärke dieser elektrostatischen Anziehung kann abhängig von ihrer Entfernung sehr unterschiedliche Werte annehmen.

Hydrophobe Wechselwirkungen zwischen unpolaren Molekülgruppierungen treten häufig auf, obwohl Kohlenhydrate sehr polare Moleküle sind. Die sterischen Anordnungen der OH-Gruppen bilden oft hydrophobe Bereiche, die dann mit hydrophoben Regionen in Proteinen wechselwirken können. So wurde auch beobachtet, dass Kohlenhydratderivate mit einem zusätzlichen aromatischen Aglycon oft mit einer signifikant höheren Affinität gebunden werden, als Kohlenhydrate, denen der hydrophobe Substituent fehlt.^[43] Trotz der geringen Anziehungskräfte tragen die hydrophoben Wechselwirkungen also häufig zu hohen Affinitäten bei. Für die thermodynamische Stabilität von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen ist der hydrophobe Effekt entscheidend.^[69,70]

Manchmal werden die Kontakte zwischen Protein und seinem Liganden durch Wassermoleküle ermöglicht. Wasser agiert dabei als „molekularer Mörtel“; seine geringe Größe und die Fähigkeit als Wasserstoffdonor und -akzeptor zu dienen sind ideale Eigenschaften für diese Funktion.^[9] So sind z. B. an der Bindung von *Lathyrus ochrus* Lectin an das Trisaccharid Man- α -1-3-Man- β -1-4-GlcNAc zwanzig Wassermoleküle beteiligt.^[71]

2.4 Untersuchung von Protein-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen

Die gebräuchlichsten Methoden zur Messung von Protein-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen sind der Hämagglutinations-Inhibitions-Test (*HLA*)^[72], der Enzym-gekoppelte Lectinbindungstest (*ELLA*)^[73], die Isotherme Titrationskalorimetrie (*ITC*)^[74], die Oberflächenplasmonresonanz (*SPR*)^[75] und moderne Kernresonanzexperimente^[76].

Ergebnisse dieser Methoden sind nur unter Vorbehalt miteinander vergleichbar, da die gewonnenen Bindungsdaten stark von Art und Aufbau der Untersuchung abhängen. Im Folgenden wird nur der in dieser Arbeit verwendete Enzym-gekoppelte Lectinbindungstest vorgestellt.

2.4.1 Der Enzym-gekoppelte Lectinbindungstest

Eine der ersten Methoden, um parallel mehrere Bindungsstudien durchzuführen, waren ELLA-Experimente (enzyme-linked lectin assay), die das gleichzeitige Testen mehrerer synthetisierter Inhibitoren oder modifizierter Liganden erlauben.^[72] Der Enzym-gekoppelte Lectinbindungstest ist eine Variation des ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).^[73] Liganden (Kohlenhydrat-derivate) konkurrieren mit hochmolekularen polymeren Sacchariden um Bindungsstellen auf enzymmarkierten Lectinen. Dabei wird die Bindung des Lectins an die Kohlenhydrate indirekt durch eine enzymatisch katalysierte Farbreaktion nachgewiesen. Mikrotiterplatten werden dazu mit den polymeren Sacchariden beschichtet. Ein Lectin-Enzym-Konjugat wird zusammen mit verschiedenen Konzentrationen des zu untersuchenden Liganden zugegeben.^[77-79] Nach einer bestimmten Inkubationszeit werden die Platten zur Entfernung des nicht-gebundenen Lectin-Enzym-Konjugats gewaschen. Die anschließende Zugabe des Enzymsubstrats bewirkt eine Färbung, die spektrometrisch verfolgbar ist. Die Intensität der Färbung ist dabei proportional zur Menge des gebundenen Lectins und nimmt mit zunehmender Bindung des löslichen Liganden an das Lectin ab. Aus den gemessenen Daten lässt sich der IC_{50} -Wert durch Angleichung der Inhibitionskurve ermitteln (Abbildung 5)^[75]. Der IC_{50} -Wert ist die Inhibitorkonzentration, bei der die Bindung des Lectins an den immobilisierten Liganden zu 50 % inhibiert wird.

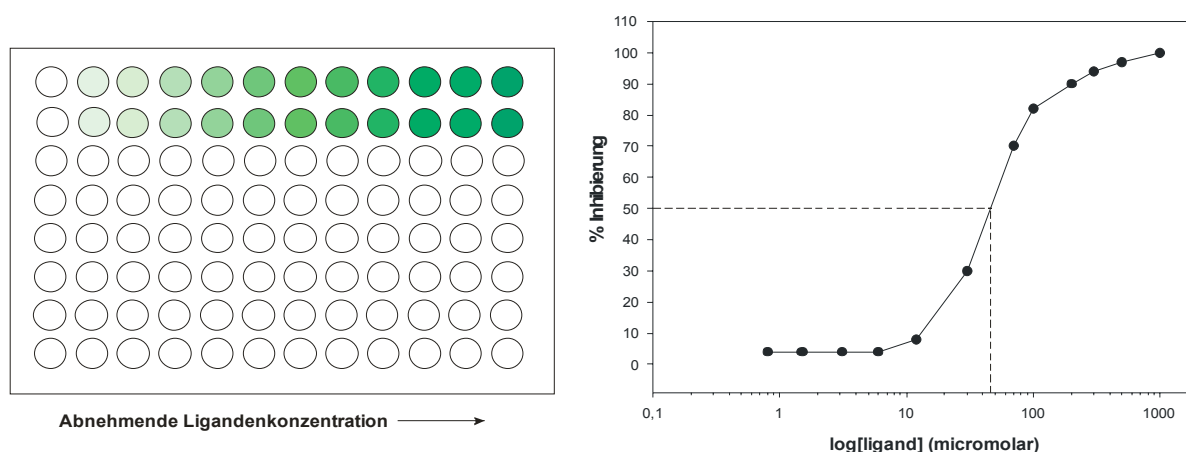


Abbildung 5. ELLA: Die Intensität der Farbe ist proportional zu der Konzentration des Lectin-Enzym-Konjugats in den *Wells*. Den IC_{50} -Wert erhält man anschließend durch Kurven-Fitting.

Der Enzym-gekoppelte Lectinbindungstest vermeidet einige Probleme, die z. B. bei dem Häm-agglutinations-Inhibitions-Test auftreten. Hier werden die IC_{50} -Werte nach einer spektrometrischen Bestimmung der Absorptionswerte durch ein Kurven-Fitting erhalten und dadurch die Genauigkeit verbessert. Es ist zwar weiterhin einer der beiden kompetitiven Liganden an die feste Phase gebunden, aber da es zu keiner Aggregation und Bildung von hochmolekularen Komplexen kommt, können Störfaktoren wie kinetische Beeinflussung bzw. Irreversibilität verringert werden. Es gibt jedoch einige Aspekte, die bei diesem Test nachteilig sind. Nur selten wird eine komplette Inhibition der Lectin-Bindung erreicht; des weiteren sind die entsprechenden Lectine nicht immer in einer enzymkonjugierten Form erhältlich.^[75]

Das ELLA-Verfahren kann als Vorläufermethode von Kohlenhydrat-Arrays betrachtet werden.

2.4.2 Mikroarray-Technik (Chip-Technik)

Die Mikroarraytechnologie ist eine relativ neue Methode zur Analytik nicht-kovalenter Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen.^[20-22] Der Begriff „Mikroarray“ leitet sich aus dem Griechischen (mikrós = klein) und dem Englischen (to array = anordnen) ab und bezeichnet eine ortsaufgelöste Anordnung von Substanzen auf einem planaren Substrat.^[80] Der immobilisierte Teil des Rezeptor-Ligand-Paares wird Sonde genannt; der Partner in Lösung, der an die Sonde bindet, wird Probe genannt. In den meisten Fällen ist die Probe markiert (Fluoreszenzfarbstoffe, Enzyme oder radioaktive Marker) und kann nach der Entfernung von nicht-gebundenen Probenmolekülen aufgrund ihrer spezifischen Bindung an die entsprechende Sonde ortsaufgelöst detektiert werden.

Das Array-Verfahren kann oftmals automatisiert werden und ermöglicht ein kostengünstiges und leistungsfähiges Screening nicht-kovalenter Wechselwirkungen.

Im Allgemeinen unterscheidet man zwischen Mikro- und Makroarrays. Makroarrays haben typischerweise Spots mit einem Durchmesser von mehr als 300 μm , Mikroarrays dagegen weniger als 200 μm .

Je nach Verwendungszweck werden unterschiedliche Träger zur Immobilisierung der Sonden verwendet. Neben Quarz- und Silizium-Wafern werden auch verschiedene Polymere wie Polypropylen, Polystyrol oder (Nitro-)Cellulose und Latex als Trägermaterialien verwendet. Glas wird aber wegen seiner chemischen und physikalischen Eigenschaften bevorzugt. Es ist chemisch inert, haltbar, erträgt hohe Temperaturen und ändert seine Eigenschaften bei Kontakt mit Wasser nicht. Zudem zeichnet sich Glas durch eine geringe Eigenfluoreszenz und hohe Eigensteifigkeit aus.^[81]

Mit der Array-Technik wurden bereits die unterschiedlichsten Verbindungen aus biologischen und biochemischen Quellen wie z. B. Proteine, isolierte DNA, ganze Zellen oder Gewebekomponenten immobilisiert (Bio-Chips).^[22,82,83] Bei chemischen Chips werden synthetisierte organische Verbindungen wie Peptide, Oligonukleotide, Kohlenhydrate oder sonstige kleine organische Moleküle immobilisiert. Die Immobilisierung kann auf zwei Arten geschehen: die Sonden werden entweder bereits auf dem Chip synthetisiert (*in situ*), oder die synthetisierten/isolierten Sonden werden direkt aufgebracht (*ex situ*). Weiterhin lassen sich die Arrays nach der Art der Verknüpfung zwischen der Trägermaterialoberfläche und den zu immobilisierenden Sondenmolekülen unterscheiden. Man differenziert dabei einerseits zwischen kovalenter und nicht-kovalenter, und andererseits zwischen spezifischer (chemoselektiver) und nicht-spezifischer (nicht-selektiver) Immobilisierung.

Bei der nicht-kovalenten/nicht-spezifischen Immobilisierung werden die Sondenmoleküle nur durch physikalische Adsorption (hydrophobe oder ionische Wechselwirkung) mit der Trägeroberfläche verbunden. So werden oft Proteine auf hydrophoben Plastikoberflächen^[84], auf Nitrocellulose-Membranen^[85] oder auf kationischen Oberflächen wie Aminosilanen^[86] oder Poly-L-Lysin^[87] adsorbiert.

Bei der nicht-kovalenten/spezifischen Immobilisierung werden die Sonden zuerst mit einem Anker-molekül („tag“) kovalent verknüpft, das wiederum spezifisch, aber nicht-kovalent, an seinen immobilisierten Partner auf der Trägeroberfläche bindet. Typische Beispiele hierfür sind Avidin-derivatisierte^[88-91] oder Ni-NTA-derivatisierte^[92] Oberflächen, an die biotinylierte bzw. mit einem His-Tag versehene Sonden nicht-kovalent aber spezifisch binden.

Bei den kovalenten Immobilisierungsmethoden muss die Trägeroberfläche mit passenden Funktionalitäten chemisch modifiziert werden, um eine kovalente Bindung zu bestimmten funktionellen Gruppen der Sondenmoleküle zu ermöglichen.

Bei der nicht-spezifischen Variante sind diese funktionellen Gruppen in den Sondenmolekülen mehrfach vorhanden, wobei eine davon mit der entsprechend komplementären Funktionalität auf der Trägeroberfläche reagiert und so die Sonde kovalent immobilisiert. So können z. B. Aminofunktionen in den Lysin-Seitenketten von Proteinen mit Aldehyd-^[92,93], Epoxy-^[94], Isothiocyanat-^[95] oder *N*-Hydroxy-succinimidylester-^[96] modifizierten Oberflächen reagieren.

Bei der spezifischen Variante dagegen wird die Verknüpfung durch die Reaktion zweier definierter funktioneller Gruppen auf der Sonde und der Trägeroberfläche unter Ausbildung einer kovalenten Bindung erreicht. Hierfür wurde eine große Vielfalt verschiedener Methoden eingesetzt, die auch zur Darstellung von Kohlenhydrat-Arrays verwendet werden. Einige davon werden später erläutert.

Die spezifischen Methoden benötigen zwar einen größeren Arbeitsaufwand, da die Sonden vor dem Immobilisierungsprozess erst passend mit einer definierten funktionellen Gruppe derivatisiert werden müssen. Dafür wird eine definierte Anordnung der Sonden auf dem Träger erhalten. Insbesondere kann somit vermieden werden, dass das Bindungsepitop der Sonde selbst mit der Trägeroberfläche reagiert bzw. sterisch unzugänglich präsentiert wird, sodass es nicht mehr mit seinem Probenpartner in Lösung interagieren kann.

Die kovalente Verknüpfungsschemie bietet zahlreiche Vorteile gegenüber der nicht-kovalenten Variante. Sie vermeidet die Gefahr, dass die Sonden im Verlauf von Waschprozessen unter Umständen wieder vom Träger entfernt werden. Durch die ermöglichten strengeren Waschbedingungen kann zudem die unspezifische Bindung sowohl der Sonde als auch der Probe an den Träger verringert werden.

Zur Detektion der Probenmoleküle nach ihrer spezifischen Bindung an die entsprechende Sonde werden in der Literatur verschiedene Verfahren beschrieben. Die Probenmoleküle sind meistens, wie bereits erwähnt, direkt markiert, z. B. mit einem Fluoreszenzfarbstoff^[92,93] (Cy3 oder Cy5) oder einem radioaktiven Isotop^[94,97] (³²P). Die Detektion der Bindung erfolgt in diesen Fällen durch Fluoreszenzmessung oder Autoradiographie. Viele fluoreszenzmarkierte Proteine, auch Lectine, sind inzwischen kommerziell erhältlich. Andererseits gibt es auch eine Vielzahl an indirekten Detektionsmethoden, bei denen das an der Sonde gebundene Probenmolekül spezifisch weitere markierte Konjugate bindet, die wiederum in der Regel spektroskopisch detektiert werden. Weitere

Nachweismöglichkeiten, die keine Marker benötigen, sind z. B. die Massenspektroskopie^[98] oder die SPR-Spektroskopie^[99-103].

Kohlenhydrat-Arrays

Neben den bereits etablierten DNA- und Protein-Arrays wurden in den letzten Jahren zunehmend auch Kohlenhydrat-Arrays entwickelt, um nicht-kovalente Wechselwirkungen mit diesen wichtigen Biomolekülen zu untersuchen. Für dieses Forschungsgebiet hat sich in Analogie zu den beiden anderen Gebieten (Genomik und Proteomik) der Begriff Glycomik eingebürgert.

Die Geschichte der Kohlenhydrat-Arrays geht wohl auf den Einsatz von Dünnschichtchromatographie zur Trennung komplexer Glycolipid-Mischungen zurück.^[104] Das Chromatogramm wurde anschließend mit Kohlenhydrat-erkennenden Proteinen (z. B. Antikörper oder Toxine) behandelt um zu bestimmen, welche Glycolipide erkannt werden.^[105] Feizi und Mitarbeiter griffen diese Idee auf und erweiterten diesen Ansatz zur Nutzung von Kohlenhydraten welche keine Glycolipide sind. Dazu wurden isolierte Glycane an ihrem reduzierenden Ende mit Lipid-Resten versehen; diese Neoglycolipide wurden dann auf Chromatogrammen oder 96-Well-Mikrotiterplatten immobilisiert.^[106,107]

In den vergangenen sieben Jahren nahm die Anzahl an Methoden zur Darstellung moderner Kohlenhydrat-Arrays explosionsartig zu. Die meisten hiervon nutzen die „state-of-the-art“-Array-Technologie, die für die Herstellung von DNA-Arrays auf Glas-Chips entwickelt wurde, d. h. mittels Pipettierroboter werden die Sondenmoleküle gezielt auf die Glasoberfläche aufgebracht.^[104] Die Darstellung eines Kohlenhydrat-Arrays und seine Verwendung zur Untersuchung von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen ist in Abbildung 6 schematisch aufgezeigt. Die zu immobilisierenden Kohlenhydrate müssen in der Regel funktionalisiert werden (a) bevor sie in räumlich getrennter Anordnung auf die funktionalisierte Trägeroberfläche gebracht werden (b). Nach der Hybridisierung mit einem markiertem Protein (c) und anschließenden Waschprozessen kann die spezifische Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkung aufgrund des sich ergebenden Hybridisierungsmusters detektiert werden.

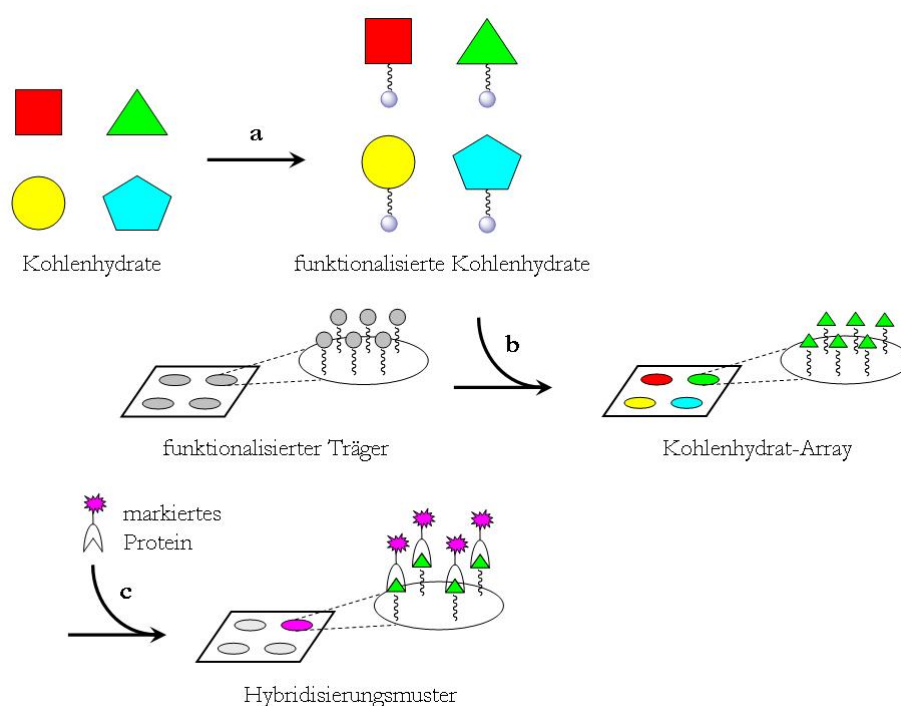


Abbildung 6. Schematischer Ablauf eines Kohlenhydrat-Chip-Experiments.

Mittlerweile sind zahlreiche Übersichtsartikel^[24,108-129] zu dem Thema Kohlenhydrat-Arrays erschienen, wobei sich die referierten Arbeiten im Wesentlichen in der Herkunft der zu immobilisierenden Kohlenhydrate, der Art der Immobilisierung und dem Nachweis der erfolgreichen Immobilisierung unterscheiden.

Die zu immobilisierenden Glycane werden oft aus Naturstoffen isoliert, da die chemische Synthese komplexer Kohlenhydratstrukturen mitunter sehr zeitaufwändig und kompliziert ist. Die fortschreitende Automatisierung bei der chemischen Synthese von Oligosacchariden lässt jedoch in naher Zukunft einen Zugang zu zahlreichen Kohlenhydratstrukturen auf synthetischem Weg erwarten.^[130-132]

Zur Detektion der immobilisierten Kohlenhydrate werden in der Literatur verschiedene Verfahren erwähnt. In den meisten Fällen wird der Immobilisationsschritt nicht direkt kontrolliert, sondern nur indirekt durch das folgende Hybridisierungsexperiment verfolgt. In einigen Fällen werden bereits fluoreszenzmarkierte Mono- oder Oligosaccharide^[121,133-136] oder derivatisierte Fluoreszenzfarbstoffe^[137-140] immobilisiert, um die Effizienz der Immobilisierungsstrategie zu überprüfen. Die direkte Kontrolle der Immobilisierung kann durch Massenspektrometrie^[141-143], IR-Spektroskopie^[144-146] oder Photoelektronenspektroskopie^[145] erfolgen.

Auf die in der Literatur beschriebenen Methoden zur Immobilisierung von Kohlenhydraten soll hier nun genauer eingegangen werden. Wie bereits erwähnt, unterscheidet man zwischen kovalenten und nicht-kovalenten und zwischen spezifischen und nicht-spezifischen Immobilisierungsmethoden.

Bei nicht-spezifischen/nicht-kovalenten Immobilisierungsstrategien werden z. B. nicht-modifizierte Kohlenhydratkonjugate wie Glycoproteine oder Polysaccharide an Nitrocellulose^[133] oder Polystyrol^[147] adsorbiert. Diese Art der Immobilisierung ist für kleine Oligosaccharide oder gar Monosaccharide ungeeignet, da diese bei Waschprozessen wieder von der Trägeroberfläche entfernt werden können.

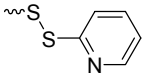

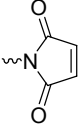
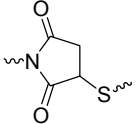
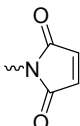
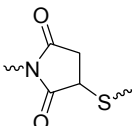
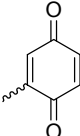

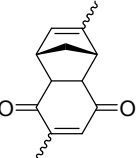

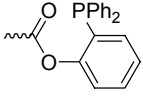

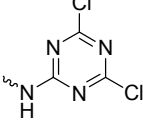
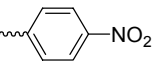
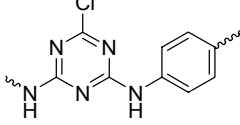






Bei spezifischen/nicht-kovalenten Verfahren wird oft die Adsorption modifizierter Kohlenhydratstrukturen wie Neoglycolipide, Glykokonjugate mit Alkylketten an Nitrocellulose, Polystyrol oder Polyvinylidenfluoride genutzt.^[111,116,148-150] So adsorbieren auch Glycane mit einem Fluor-Tag an Fluoralkylsilane oder Biotin-markierte Glycane an Streptavidin-modifizierte Oberflächen.^[151-155]

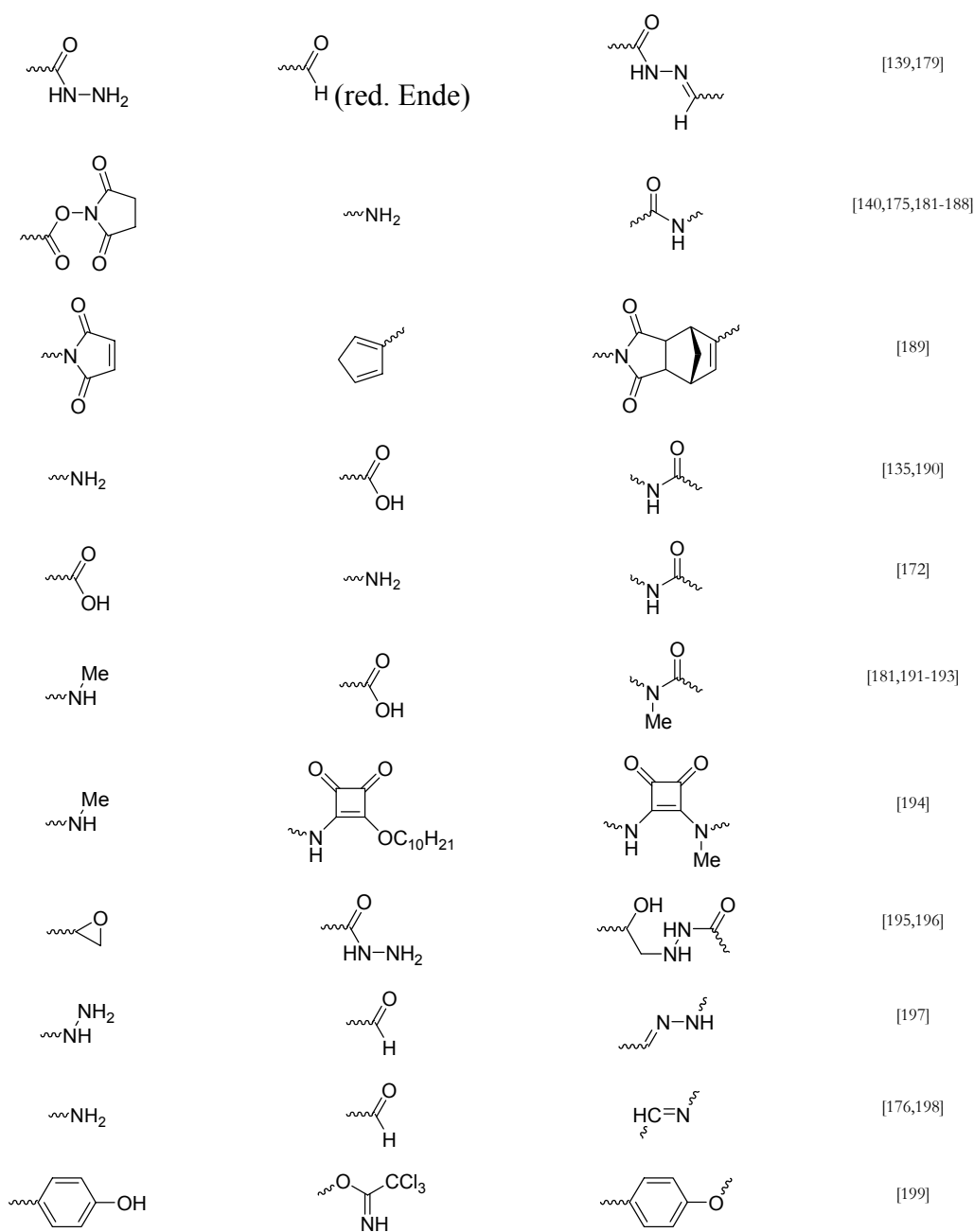
Die Methoden zur nicht-spezifischen/kovalenten Immobilisierung beruhen auf photochemischen Reaktionen von mit Phthalimid-^[136] oder Diazirin-Molekülen^[137,138,156] derivatisierten Oberflächen mit nicht-funktionalisierten Kohlenhydraten.

Für eine spezifische/kovalente Verknüpfung von Kohlenhydraten mit Trägeroberflächen steht eine Vielzahl an Methoden zur Verfügung.^[157] Die kovalente Immobilisierung erfolgt durch die gezielte Reaktion eines funktionalisierten Kohlenhydrats mit einer entsprechend derivatisierten Trägeroberfläche. Die Immobilisierungsreaktion sollte dabei möglichst unter milden Bedingungen spontan in einem Schritt ohne Zusatz weiterer Reagenzien ablaufen und eine möglichst stabile Bindung ergeben. Bei der Funktionalisierung der Kohlenhydrate und der Trägeroberfläche hat man zusätzlich die Möglichkeit ein Spacer-Molekül (z. B. Polyethylenglykol) einzuführen. Somit kann man einen größeren Abstand zwischen dem Kohlenhydrat und der Trägeroberfläche erzielen, sodass die molekulare Erkennung der Kohlenhydratstruktur durch Proteine gewährleistet wird.

Die gängigsten Methoden zur kovalenten/spezifischen Immobilisierung sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1. Kovalent/spezifische Immobilisierungsmethoden zur Darstellung von Kohlenhydrat-Arrays.

Funktionalität des Trägers	Funktionalität des Kohlenhydrats	Resultierende Bindung	Lit.
	$\sim\text{SH}$		[144]
$\sim\text{SH}$			[158,159]
	$\sim\text{SH}$		[160-165]
			[166]
$\sim\equiv$	$\sim\text{N}_3$		[143,148,167-170]
	$\sim\text{N}_3$		[171,172]
			[173,174]
	$\sim\text{NH}_2$	$\text{HC}=\text{N}$	[175,176]
$\sim\text{NH}_2$		$\text{HC}=\text{N}$	[177]
	$\text{O}-\text{NH}_2$	$\text{HC}=\text{N}-\text{O}$	[178]
$\text{O}-\text{NH}_2$		$\text{HC}=\text{N}-\text{O}$	[179,180]
	$\sim\text{NH}_2$	$\text{H}_2\text{C}-\text{NH}$	[135]
$\sim\text{NH}_2$		$\text{H}_2\text{C}-\text{NH}$	[135]



Kiessling und Mitarbeiter berichten von einem Disulfidaustausch, um Thiol-modifizierte Monosaccharide auf eine Goldoberfläche aufzubringen.^[144] Die Gruppen von Seeberger, Mrksich und Shin nutzen die Michael-Addition von Maleinimid-funktionalisierten Kohlenhydraten bzw. Trägeroberflächen mit Thiol-derivatisierten Glaträgern bzw. Kohlenhydraten.^[158-165] Die Thiol-basierten chemoselektiven Ligationsreaktionen haben jedoch den Nachteil, dass sie für den Einsatz im biologischen Bereich nur beschränkt nutzbar sind, da viele Biomoleküle Thiolgruppen

besitzen. Daher werden zur Darstellung von Kohlenhydrat-Arrays bevorzugt Ligationsreaktionen verwendet, die orthogonal zu den meisten funktionellen Gruppen von Biomolekülen sind. So setzen die Gruppen von Mirskich und Chaikof die Diels-Alder-Reaktion von Kohlenhydrat-Cyclopentadien-Konjugaten mit Benzochinon-derivatisierten Goldoberflächen bzw. mit Maleinimid-derivatisierten Trägern ein.^[166,189] Auch die Cu(I)-katalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition zwischen Azid-modifizierten Kohlenhydraten und Alkin-derivatisierten Trägeroberflächen findet sehr oft Verwendung.^[143,148,167-170] Eine weitere bioorthogonale Ligationsreaktion zwischen einem Azid-modifizierten Kohlenhydrat und einer Phosphan-derivatisierten Oberfläche (Staudinger-Ligation) wird in der Gruppe von Waldmann verwendet.^[171] Andere Möglichkeiten eine Amidbindung als Verknüpfung zu erhalten bestehen in der Reaktion von Amino-funktionalisierten Kohlenhydraten mit *N*-Hydroxysuccinimidester-derivatisierten Trägern^[140,175,181-188] oder durch Reaktion von Amino- oder Carboxyl-funktionalisierten Kohlenhydraten mit entsprechend komplementär derivatisierten Trägern unter Zusatz von Aktivierungsreagenzien.^[135,140,172,175,181-188,190-193] Des Weiteren wird oft ein Amino-modifizierter Kohlenhydrat mit einer Aldehyd-modifizierten Trägeroberfläche (oder *vice versa*) zur Schiffischen Base (Imin) umgesetzt^[175-177], wobei zu beachten ist, dass aufgrund der Reversibilität der Reaktion diese eigentlich nicht für eine Immobilisierung geeignet ist. Wird stattdessen jedoch eine reduktive Aminierung durchgeführt, wird ein irreversibel gebildetes Amin erhalten.^[135] Für die Immobilisierung von nicht-funktionalisierten Kohlenhydraten wird öfters die Tatsache genutzt, dass sie am reduzierenden Ende bereits eine Aldehydfunktion besitzen. So können nicht-funktionalisierte Kohlenhydrate auf Amin-^[177], Aminoxy-^[179,180] oder Hydrazid-^[139,179]derivatisierten Oberflächen immobilisiert werden. Ein Nachteil bei der Umsetzung von nicht-funktionalisierten Kohlenhydraten mit Aminoxy-Funktionen zu Oximen besteht darin, dass die Kohlenhydrateinheit am reduzierende Ende bevorzugt als offenkettige Form vorliegt.^[179] Ein einheitliches Kohlenhydratepitop auf der Arrayoberfläche ist somit nicht mehr gegeben. Dies kann in denjenigen Fällen ein Problem darstellen, in denen die Kohlenhydrateinheit am reduzierenden Ende für die molekulare Erkennung durch ein Protein erforderlich ist. Wird aber statt einer primären Aminoxy-Gruppe eine sekundäre Aminoxy-Gruppe eingesetzt, erhält man wie bei der Umsetzung mit Hydraziden bevorzugt die Ringform der Kohlenhydrateinheit am reduzierenden Ende.^[154]

Mittlerweile sind Kohlenhydrat-Arrays auf vielfältige Weise zur Untersuchung von Kohlenhydrat-Wechselwirkungen eingesetzt worden. Neben dem Nachweis bereits bekannter Kohlenhydrat-

Lectin-Wechselwirkungen gelang es neue Kohlenhydrat-erkennende Proteine zu entdecken. Kohlenhydrat-Arrays eignen sich daher zur Hochdurchsatzanalyse von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen und zur Identifikation bzw. Charakterisierung der Bindungseigenschaften von Lectinen. Neben der Bindungsspezifität wird auch die Bindungsstärke zwischen Kohlenhydrat und Lectin untersucht.^[140,154,155] Bei Inhibitionsexperimenten durch Zugabe löslicher Kohlenhydrate während des Hybridisierungsvorganges auf dem Kohlenhydrat-Array wurden zudem in einigen Fällen IC_{50} -Werte bestimmt.^[159,166,173,180,181,197] Kohlenhydrat-Arrays werden weiterhin zur Detektion von kohlenhydratspezifischen Antikörpern im menschlichen Serum eingesetzt.^[133,147] Verschiedene Berichte beschreiben ein verändertes Glycan-Antikörper-Profil im Serum von Krebs-Patienten, sodass Kohlenhydrat-Arrays Verwendung bei der Krankheitsdiagnose finden könnten.^[185,197,200,201] Weiterhin konnte die spezifische Bindung von Bakterien und ganzer Zellen auf Kohlenhydrat-Arrays nachgewiesen werden.^[174,182] Kohlenhydratspezifische Enzyme können ebenso mit Hilfe von Kohlenhydrat-Arrays untersucht werden. So kann z. B. die Substrat-Spezifität oder enzymatische Aktivität eines Kohlenhydrat-modifizierenden Enzyms bestimmt werden.^[159,196] Schließlich können mit der Kombination aus Kohlenhydrat-Array und massenspektrometrischen Methoden Sequenzanalysen von Glycanstrukturen durchgeführt werden.^[149] Inzwischen sind sogar einige Kohlenhydrat-Arrays kommerziell erhältlich.^[202,203]

2.5 Multivalente Wechselwirkungen

Multivalente Wechselwirkungen (auch polyvalente Wechselwirkungen genannt) zeichnen sich durch die gleichzeitige Bindung mehrerer Liganden einer biologischen Einheit an mehrere Rezeptoren einer anderen biologischen Einheit aus.^[204,205]

Die Bindigkeit (Valenz) eines Teilchens ist durch die Zahl der gleichartigen Verknüpfungen gegeben, die es mit anderen Teilchen im Sinne der Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung bilden kann (Abbildung 7). Viele Protein-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen sind multivalenter Natur. Auf diese Weise können die meist schwachen Affinitäten (Dissoziationskonstanten K_D im milli- bis mikromolaren Bereich) und häufig geringen Spezifitäten der monovalenten Wechselwirkungen kompensiert werden.^[206,207]

Viele membranständige Lectine besitzen mehrere Kohlenhydrat-Bindungsstellen, oder sie bilden Oligomere oder Cluster aus monovalenten Rezeptoren. Durch das Zusammenwirken vieler

gleichartiger Bindungspartner im passenden räumlichen Abstand lassen sich starke und selektive Wechselwirkungen erhalten, die viel stärker sein können als entsprechende monovalente Wechselwirkungen.

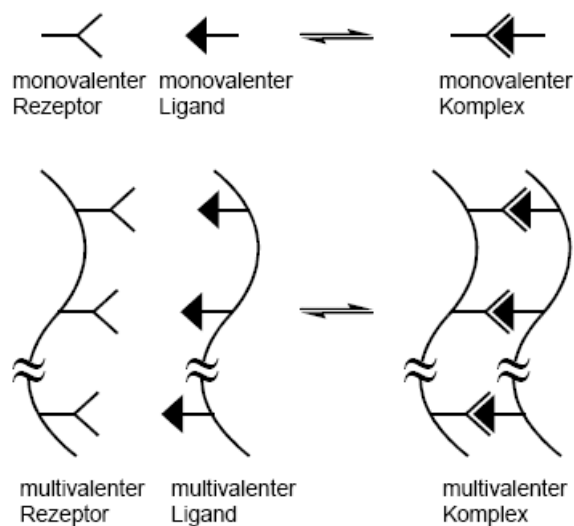


Abbildung 7. Vergleich monovalenter und multivalenter Wechselwirkungen.^[208]

Das Phänomen, dass die lineare Vergrößerung der Zuckerdichte häufig mit einem exponentiellen Anstieg der Bindungsaffinität einhergeht wird „*Cluster-Glycoside*“-Effekt^[206] genannt. Man bezeichnet die Affinität in Folge multivalenter Wechselwirkungen auch als Avidität.

Von Whitesides und Mitarbeitern wurde eine thermodynamische Betrachtung des einfachsten multivalenten Systems vorgestellt: die Wechselwirkung eines bivalenten Liganden mit einem bivalenten Rezeptor.^[204]

Die Gibbs-Bindungsenergie setzt sich aus enthalpischen und entropischen Beiträgen zusammen (Gleichung 1):

$$\Delta G^{\text{multi}} = \Delta H^{\text{multi}} - T\Delta S^{\text{multi}} \quad \text{Gleichung 1}$$

Bei der Bildung eines ungespannten Komplexes, bei dem sich die einzelnen Wechselwirkungen nicht gegenseitig beeinflussen (Abbildung 8), entspricht die Bindungsenthalpie ΔH^{bi} in erster Näherung dem Doppelten der Bindungsenthalpie ΔH^{mono} der monovalenten Wechselwirkung.

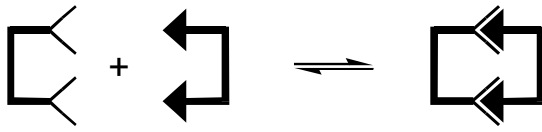


Abbildung 8. Bindung eines bivalenten Liganden mit einem rigiden, perfekt passenden Linker an einen bivalenten Rezeptor.

Die Gesamtentropie (ΔS^{multi}) einer multivalenten Wechselwirkung kann in Beiträge zerlegt werden, die von Änderungen der Translations- (ΔS_{trans}), Rotations- (ΔS_{rot}), und Konformationsentropie (ΔS_{konf}) der Rezeptoren und Liganden bei der Assoziation stammen, und einen Beitrag, der die Entropieänderung des umgebenden Wassers ($\Delta S_{\text{solvent}}$) berücksichtigt (Gleichung 2):

$$\Delta S^{\text{multi}} = \Delta S_{\text{trans}} + \Delta S_{\text{rot}} + \Delta S_{\text{konf}} + \Delta S_{\text{solvent}} \quad \text{Gleichung 2}$$

Zur Vereinfachung verzichtet man einerseits auf die Betrachtung der in allen Fällen ähnlichen Hydratisierungsentropie ($\Delta S_{\text{solvent}}$) und vernachlässigt die schwache logarithmische Abhängigkeit der Translations- und Rotationsentropie von der Masse und Größe der Teilchen.

Somit erhält man für den Fall, dass bivalenten Ligand und Rezeptor rigide sind und perfekt zusammenpassen, $\Delta S_{\text{konf}} = 0$ und die Wechselwirkung erfolgt mit dem gleichen Entropieaufwand wie für eine monovalente Wechselwirkung ($\Delta S^{\text{bi}} \approx \Delta S_{\text{(rot)}}^{\text{mono}} + \Delta S_{\text{(trans)}}^{\text{mono}}$).

Für die Bindungsenergie erhält man schließlich folgende Gleichungen:

$$\Delta G^{\text{bi}} \approx 2\Delta H^{\text{mono}} - T\Delta S^{\text{mono}} \quad \text{Gleichung 3}$$

$$\Delta G^{\text{bi}} \approx \Delta G^{\text{mono}} + \Delta H^{\text{mono}} \quad \text{Gleichung 4}$$

$$\Delta G^{\text{bi}} \approx 2\Delta G^{\text{mono}} + T\Delta S^{\text{mono}} \quad \text{Gleichung 5}$$

Aus Gleichung 5 folgt: $\Delta G^{\text{bi}} < 2\Delta G^{\text{mono}}$, da ΔS^{mono} in der Regel negativ ist, und weil gilt: $\Delta G = -RT\ln K$ ergibt sich: $K^{\text{bi}} > (K^{\text{mono}})^2$.^[208]

Zur empirischen Beschreibung multivalenter Wechselwirkungen wurde von Whitesides et al. der Verstärkungsfaktor β vorgeschlagen. Dieser Faktor definiert das Verhältnis aus der

Bindungskonstante für ein multivalentes System (K^{multi}) und der Bindungskonstante für ein monovalentes System (K^{mono}) (Gleichung 6).

$$\beta = K^{\text{multi}}/K^{\text{mono}} \quad \text{Gleichung 6}$$

Unter der Annahme dass $K^{\text{bi}} \approx (K^{\text{mono}})^2$, zeigt die folgende Gleichung, dass der Verstärkungsfaktor β ungefähr K^{mono} entspricht:

$$\beta = K^{\text{bi}}/K^{\text{mono}} \approx (K^{\text{mono}})^2/K^{\text{mono}} = K^{\text{mono}} \quad \text{Gleichung 7}$$

Aus Gleichung 7 wird deutlich, dass bei Multivalenz nicht nur die absoluten Bindungsaffinitäten, sondern ebenso die relativen β -Werte stark von der Bindungskonstanten für die monovalente Wechselwirkung abhängig sind.

2.6 Synthetische multivalente Liganden

Um zu hochaffinen Lectinliganden zu gelangen, ist die Erzeugung multivalenter Kohlenhydratderivate ein erfolgversprechender Ansatz. In der Vergangenheit wurden viele verschiedene Template für eine multivalente Präsentation von Kohlenhydraten herangezogen: niedermolekulare Linker, Peptide, Cyclodextrine, Dendrimere, Proteine, Polymere, Viren und Liposome. Die Struktur der resultierenden Glycocluster bestimmt dabei entscheidend deren Eigenschaften; nicht nur Abstand und räumliche Orientierung der Zuckerreste spielen eine wichtige Rolle, sondern auch das Templat selbst kann zu einer Affinitätssteigerung beitragen.^[209]

Polymere

Die Gruppe der Glycopolymere umfasst natürliche und synthetische mit Kohlenhydraten beladene Polymere. Vorteile dieser Template sind die einfache Darstellung und die hohe Beladungsdichte. Kiessling und Mitarbeiter synthetisierten kohlenhydrathaltige Polymere durch Ringöffnungs-Metathese-Polymerisation (ROMP).^[210-213] Die Herstellung einer Vielfalt multivalenter Liganden gelingt durch einfaches Variieren der Monomer-Bausteine und der Polymerisationsbedingungen.

So wurden beispielsweise α -D-glucose- und α -D-mannosehaltige Glycopolymere **1** (Abbildung 9) sowie die entsprechenden monovalenten Verbindungen auf ihre Inhibitions-Eigenschaften in einer durch Con A induzierten Hämagglutinationsreaktion untersucht. Während das monomere α -Methyl-D-mannopyranosid mit einer vierfach höheren Affinität als das α -Methyl-D-glycopyranosid von Con A gebunden wurde, zeigte das mannosehaltige Polymer eine 160-fach höhere Affinität als das glucosehaltige Polymer. Diese Ergebnisse führten zu der Schlussfolgerung, dass durch Multivalenz sowohl Affinität als auch Spezifität von Lectin-Liganden-Wechselwirkungen erhöht werden.^[214]

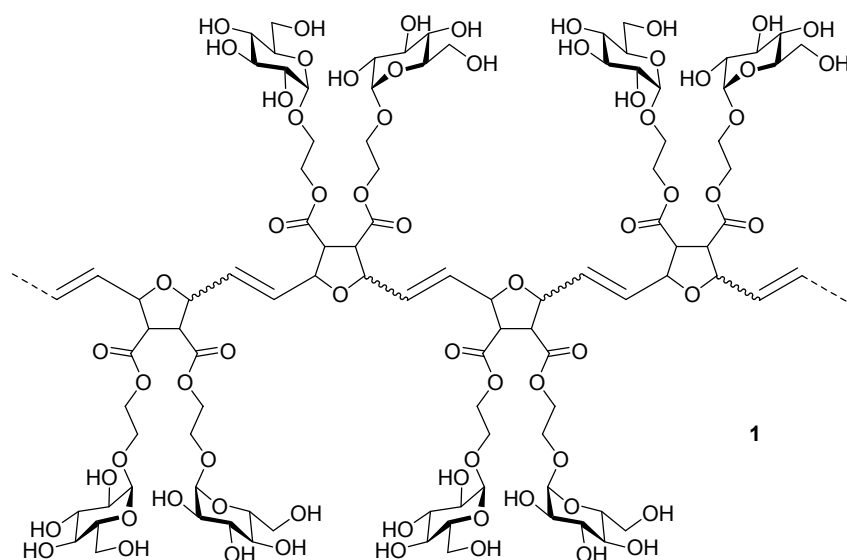


Abbildung 9. Ein in der Arbeitsgruppe von Kiessling synthetisiertes α -D-glucosehaltiges Polymer.

In der Arbeitsgruppe von Whitesides wurden Polyacrylamid-Derivate **2** mit Neuraminsäure-Seitenketten (Abbildung 10) synthetisiert, die eine Hämagglutinationsreaktion 10^4 - bis 10^5 -fach stärker inhibierten als die monovalente Neuraminsäure (bezogen auf einzelne Neuraminsäurereste).^[215]

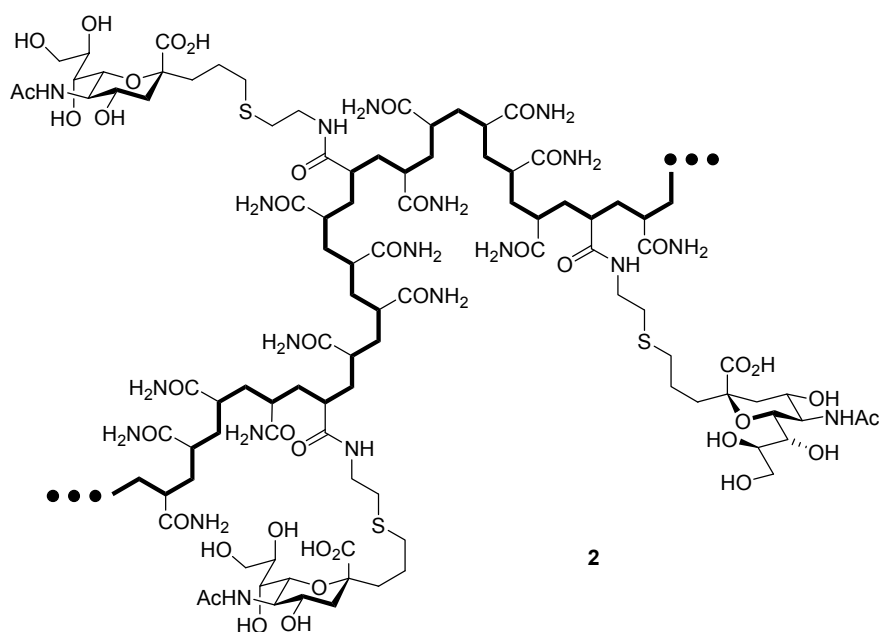


Abbildung 10. Ein in der Arbeitsgruppe von Whitesides hergestelltes Polyacrylamid-Derivat zur Inhibition des Hämaggglutinins.

Dendrimere

Dendrimere sind oligomere Strukturen. Ausgehend von einem multifunktionalen Kerngerüst verzweigt sich die Struktur eines Dendrimers in regelmäßigen Abständen, woraus ein Schichtaufbau resultiert, der in verschiedene Generationen unterteilt wird. Dendrimere sind von besonderem Interesse, da sie im Vergleich zu Polymeren dank ihrer Monodispersität und der definierten Anzahl funktioneller Gruppen hervorragend dazu geeignet sind, multivalente Liganden darzustellen. Die Glycodendrimere tragen die Kohlenhydrate zumeist an den Enden ihrer Verzweigungen. Dendrimere als Template zur multivalenten Präsentation von Liganden werden von einigen Arbeitsgruppen genutzt.^[216-219]

In der Arbeitsgruppe von Roy wurden Dendrimere aus Aminosäuren, die über die Aminogruppen von Lysin mit *N*-Acetyl-D-glucosamin-Einheiten verknüpft sind, untersucht.^[220] In einem durchgeführten ELLA zur Inhibition der WGA-Bindung an immobilisiertes Schweinemagenmucin wurde ein valenzabhängiger Anstieg der Inhibitionsfähigkeit der Liganden gefunden.

Corbell et al. synthetisierten mannosylierte Dendrimere als Con A-Liganden, die unterschiedlich flexible Linker besitzen.^[221] Die Lectin-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen wurden durch ITC, HIA und ELLA untersucht. Diese Studien ergaben, dass die Affinität eines Liganden stark von der Art

des Bindungstests abhängt. Außerdem hängt das Verhalten der multivalenten Liganden auch von dem Bau des Linkers ab. So zeigten multivalente Liganden mit einem semi-rigiden Linker in keinem der durchgeführten Bindungstests signifikante Steigerungen der Affinität. Liganden mit einem flexiblen Linker zeigten dagegen durch Erhöhung der Multivalenz deutliche Affinitätssteigerungen, wobei dies allerdings nur bei HIA- und ITC-Messungen gefunden wurde.

Minicluster

Die Gruppe der Glycominicluster repräsentiert eine große Gruppe von Verbindungen, die nur wenige Kohlenhydrat-Liganden auf kleinen Molekülgerüsten besitzen.

Die Untersuchungen von Lee et al. zeigten, dass Minicluster geeigneter Geometrie eine vielfach höhere Affinität im Vergleich zu den monovalenten Verbindungen aufweisen. Er beobachtete, dass eine lineare Vergrößerung der Zuckerdichte häufig zu einem exponentiellen Anstieg der Bindungsaffinität führt. In diesem Zusammenhang prägte er den Begriff „*Cluster-Glycoside*“-Effekt. Durch die Synthese einer Reihe von di- und trivalenten D-Galactosederivaten (Abbildung 11) gelang es, die für eine effiziente Bindung an ASGP-R (Asialoglycoprotein-Rezeptor) von Ratten notwendigen optimalen Abstände der Galactosereste zu ermitteln, die in einem Bereich von 15-25 Å liegen.^[206]

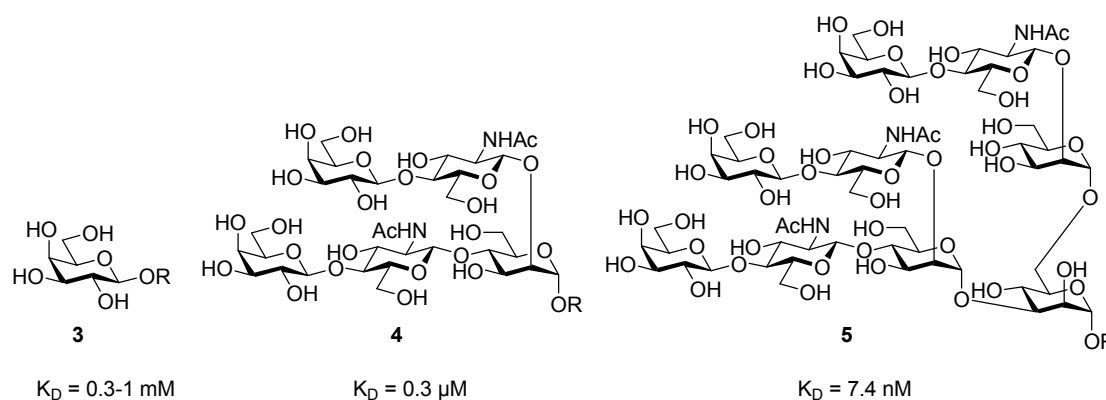


Abbildung 11. Im Arbeitskreis von Lee synthetisierte Beispiele von mono-, di- und trivalenten Galactosaminderivaten zur Bindung an den ASGP-R von Ratten.

Häufig werden als Template Cyclodextrine (CD), cyclische Oligosaccharide mit α -(1,4)-verknüpften D-Glucopyranosyl-Einheiten, eingesetzt. Sie besitzen ein hydrophiles Äußeres und einen hydrophoben Hohlraum, in dem kleine organische Moleküle gebunden werden können

(Gast-Moleküle). Diese Eigenschaft macht man sich beim Einsatz der Cyclodextrine als *Drug Carrier* zu nutzen.^[222]

In der Arbeitsgruppe von Nishimura wurden perglycosylierte Cyclodextrine mit D-Galactose-, N-Acetyl-D-glucosamin-, Lactose- und N-Acetyl-D-lactosamin-Resten synthetisiert. Diese Verbindungen wurden mittels des Hämagglutinations-Assays auf ihre Inhibitorwirkungen untersucht.^[223] Dabei wurde allgemein eine Zunahme an Inhibitoraktivität im Vergleich zum jeweiligen Monomer festgestellt. Besonders das heptavalente Cyclodextrin **6** mit R = N-Acetyl-D-glucosamin (Abbildung 12) zeigte eine starke Fähigkeit, die Agglutination von menschlichen Erythrozyten durch Weizenkeimagglutinin bei einer 280-fach niedrigeren Konzentration zu inhibieren als das monomere N-Acetyl-D-glucosamin.

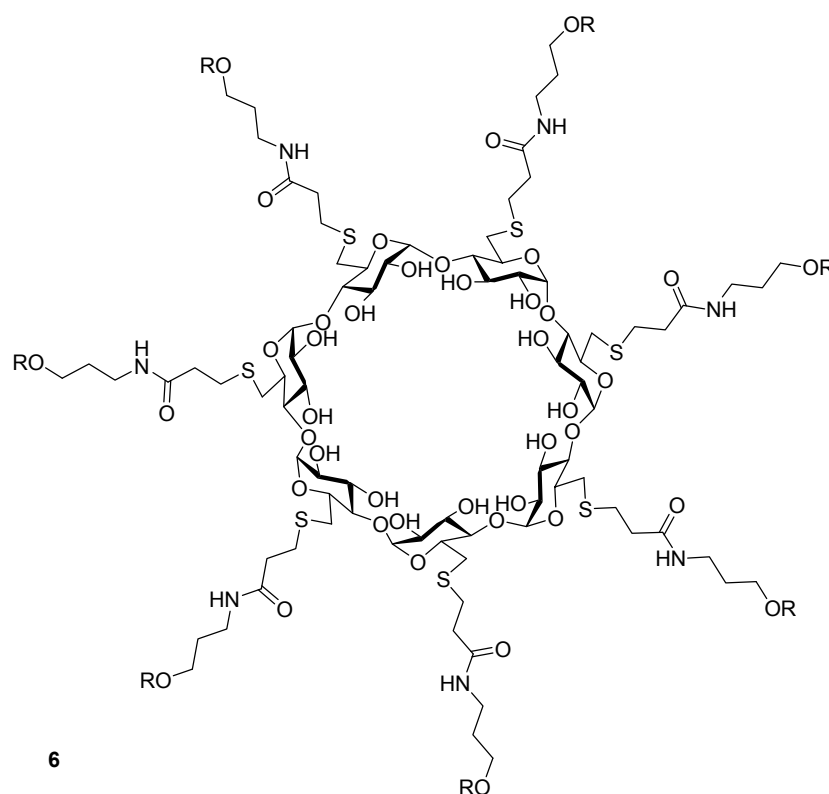
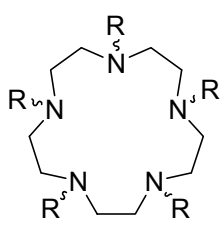


Abbildung 12. Ein in der Arbeitsgruppe von Nishimura synthetisierter heptavalenter Glycocluster.

Zwei Arbeitsgruppen nutzten die bekannten Röntgenstrukturen des hitzelabilen Enterotoxins und des Shiga-like Toxins von *E. coli*, um Inhibitoren für diese Mitglieder der AB₅-Familie bakterieller Toxine zu entwerfen.

Durch die Synthese einer Reihe pentavalenter Liganden mit variablen Linker-Längen erhielten Fan et al. Liganden (**7-10**) für das hitzelabile Enterotoxin mit signifikant erhöhten Affinitäten. Der potenteste Ligand mit $n = 4$ zeigte eine submikromolare Affinität zum Toxin, die 10^5 -fach besser war als die des entsprechenden monovalenten Liganden Galactose (Abbildung 13).^[224]

Verbindung	n	IC ₅₀ (μM)	β
Galactose		58000	1
7	1	242	240
8	2	16	3600
9	3	6	10000
10	4	0.56	104000



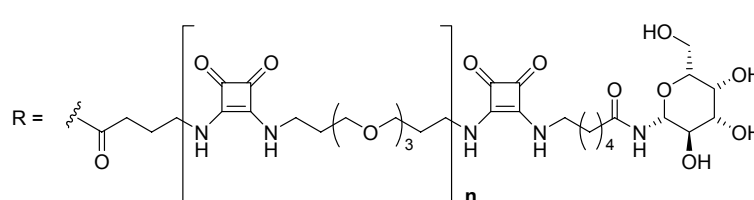


Abbildung 13. Strukturen pentavalenter Inhibitoren gegen das hitzelabile Enterotoxin.

Bundle und Mitarbeiter entwickelten den dekavalenten Glycocluster **11**, der den Namen Starfish erhielt (Abbildung 14).^[225] Dieser bindet an das Shiga-like Toxin, welches Lebensmittelvergiftungen auslöst, die häufig nach Verzehr von kontaminiertem Burger-Fleisch auftritt. Dabei ist die *in vitro* Stärke des Glycoclusters millionenfach höher als die entsprechende monovalente Wechselwirkung.

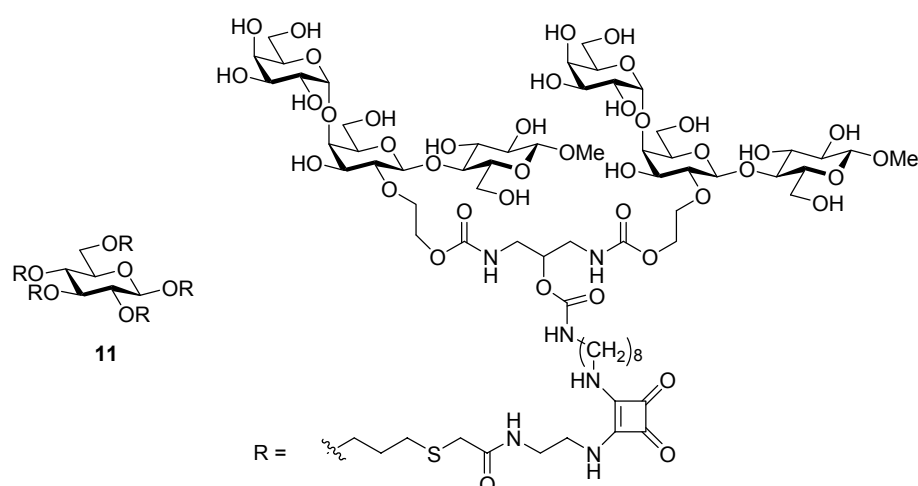


Abbildung 14. Struktur des dekaivalenten Inhibitors Starfish.

Im Arbeitskreis von Wittmann wurden cyclische Peptide als Grundgerüste für Glycocluster genutzt (Abbildung 15).^[17,226-228] Eine Bibliothek aus cyclischen Peptiden, die aus acht D- und L-Aminosäuren sowie D- und L-Diaminosäuren bestehen, wurde durch Fmoc-Festphasenpeptidsynthese^[229,230] nach der Split-mix-Strategie^[231] hergestellt.

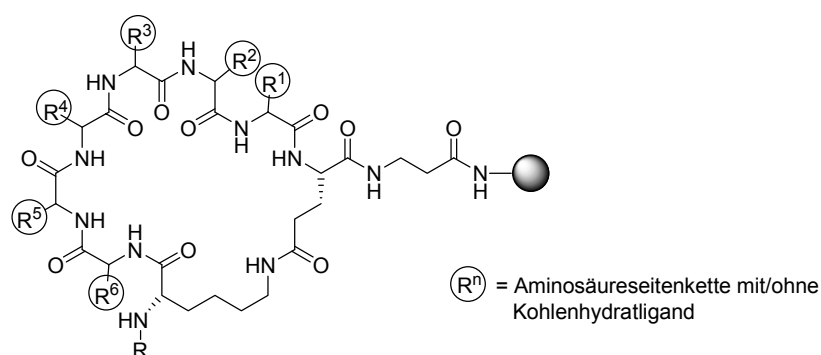


Abbildung 15. Cyclische Neoglycopeptide.

Die Seitenketten der Diaminosäuren dienen hierbei als Anknüpfungspunkte für das Carbonatderivatisierte GlcNAc **12** (Abbildung 16). So wurden Urethan-verknüpfte Neoglycopeptide unterschiedlicher Valenzen (0-6) erhalten, die durch die Verwendung von D- und L-Aminosäuren die Zuckerreste in verschiedenen räumlichen Anordnungen präsentieren.

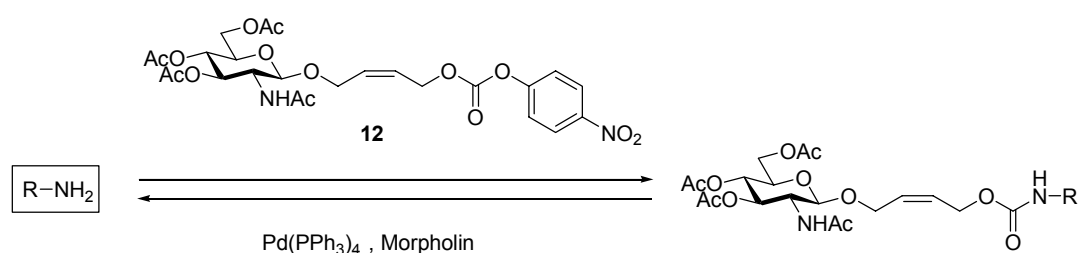


Abbildung 16. Anknüpfung der Zuckerreste an Seitenketten der Diaminosäuren.

Beim Screening der Bibliothek auf Bindungseigenschaften an WGA mittels Festphasen-Enzymimmuno-Lectinbindungstest und anschließender Edman-Sequenzierung der gefundenen Hit-beads wurden potente Liganden unterschiedlicher Valenz identifiziert. Einzelne dieser Liganden wurden nachsynthetisiert und durch einen enzymgekoppelten Lectinbindungstest wurden IC_{50} -Werte für die Inhibierung der Bindung von Peroxidase-markiertem WGA an immobilisiertes Schweinemagenmucin ermittelt. Die Ergebnisse dieser Versuche korrelierten mit dem Bindungsverhalten an fester Phase. Die Affinitäten der gefundenen tetra- bis hexavalenten Derivate waren um ca. 200- bis 600-fach höher als die von monomerem GlcNAc.

Um eine Verringerung der Flexibilität der Neoglycopeptide zu erreichen, wurde das GlcNAc-Derivat **13** synthetisiert, bei dem die Anzahl der Bindungen zwischen dem anomeren Sauerstoff und dem Phenolrest von sieben auf zwei reduziert ist (Abbildung 17).

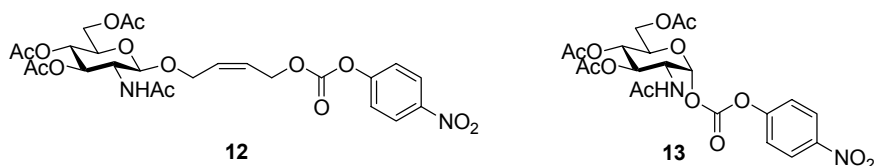


Abbildung 17. GlcNAc-Derivate **12** und **13** zur Darstellung von Neoglycopeptiden unterschiedlicher Flexibilität.

Wurde nun exemplarisch an die Gerüststruktur **14** des tetravalenten Derivats **15** das verkürzte GlcNAc-Derivat **13** angeknüpft, so zeigte das deacetylierte Neoglycopeptid **16** eine signifikante Affinitätssteigerung (Faktor 14) (Abbildung 18).^[226]

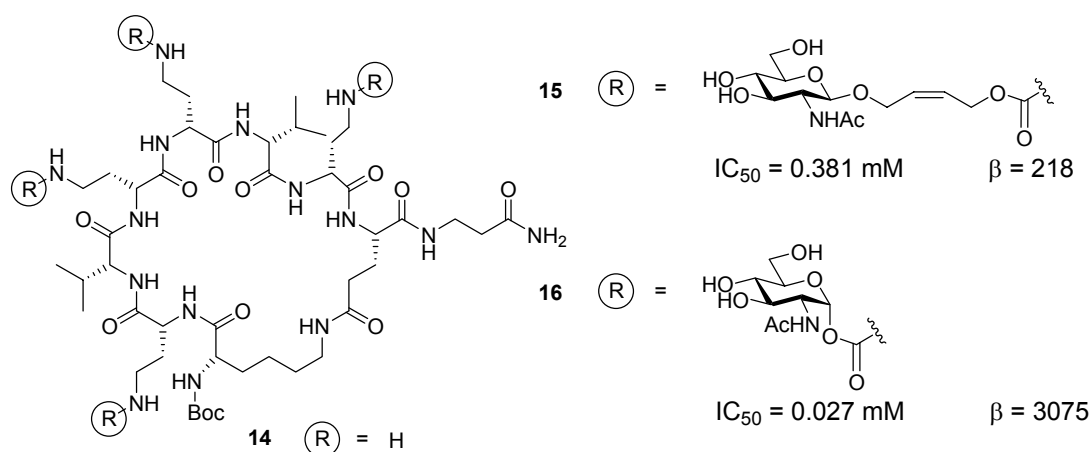


Abbildung 18. Einfluss des Kohlenhydrat-Peptid-Linkers auf die Bindung an WGA.

Ob sich diese Affinitätssteigerung auf die verringerte Flexibilität, den veränderten Abstand der GlcNAc-Reste zueinander oder die veränderte anomere Konfiguration und Konstitution zurückführen lässt, konnte jedoch noch nicht geklärt werden.

Ein kürzlich erschienener Artikel^[232] gibt eine ausführliche Übersicht über Synthese und Anwendung verschiedener cyclischer Glycopeptide als multivalente Protein-Liganden.

3 Konzeption und Aufgabenstellung

Voruntersuchungen in unserer Arbeitsgruppe^[226] zeigten, dass das tetravalente Neoglycopeptid **16** ($IC_{50} = 0.027 \text{ mM}$) rund 14-fach besser an WGA bindet, als das ebenfalls tetravalente Neoglycopeptid **15** (Abbildung 19).

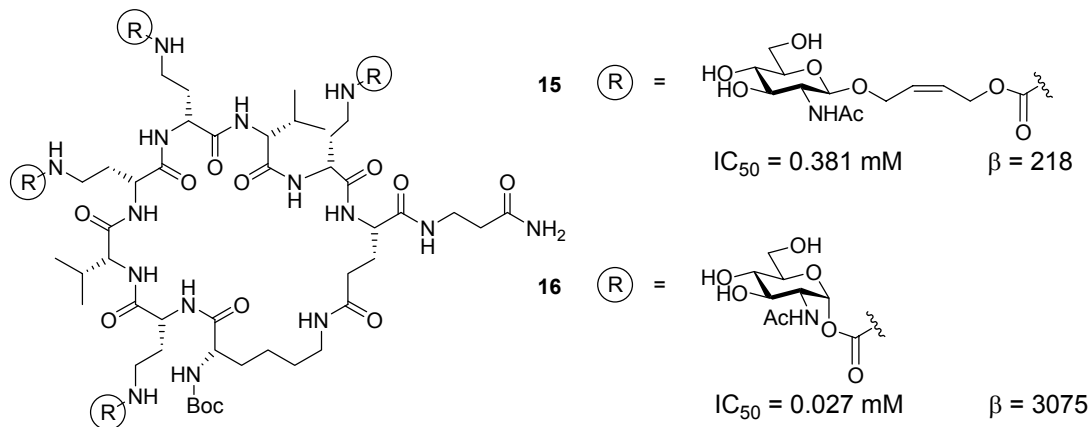


Abbildung 19. Neoglycopeptide **15** und **16**, synthetisiert von S. Seeberger.^[226]

Ein erstes Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, worauf die erhöhte Affinität des in Abbildung 19 gezeigten tetravalenten Neoglycopeptids **16** mit verkürztem Kohlenhydrat-Peptid-Linker zurückzuführen ist. Als mögliche Ursachen für die erhöhte Affinität von Verbindung **16** gegenüber **15** kommen in Betracht:

- 1) die veränderte Geometrie von **16** (kürzere Abstände zwischen den Zuckerresten);
- 2) die verringerte Flexibilität von **16**, die bei entsprechender Passgenauigkeit des Liganden zu einer entropischen Begünstigung der Lectin-Ligand-Wechselwirkung führen könnte;
- 3) die veränderte anomere Konfiguration der GlcNAc-Reste (α versus β);
- 4) die veränderte Konstitution am anomeren Zentrum (Glycosylurethan versus substituiertes Allyl-glycosid).

Zur Klärung dieser Fragestellung sollten mono-, di- und trivalente Derivate des *N*-Acetyl-D-glucosamins (GlcNAc) durch Anknüpfen der Carbonate **12** bzw. **13** an kommerziell erhältliche Amine mit unterschiedlicher Geometrie und Flexibilität synthetisiert werden. Diese Verbindungen sollten durch einen enzymgekoppelten Lectinbindungstest auf ihre Inhibierungsfähigkeit der Bindung von Peroxidase-markiertem Weizenkeimagglutinin an immobilisiertes Schweinemagenmucin untersucht werden. Damit sollten Aussagen darüber möglich sein, ob eine α -Glycosyl-

urethan-Struktur bereits auf monovalenter Ebene besser bindet als eine β -glycosidische Struktur und welche strukturellen Parameter der Liganden Voraussetzung für eine starke Bindung an WGA sind. Erste Untersuchungen hierzu wurden bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit^[233] angestellt. Beim Vergleich von α -Glycosylurethanen mit den entsprechenden β -Urethanen mit flexiblerem längeren Linker konnte die Tendenz beobachtet werden, dass die α -Glycosylurethane höhere IC_{50} -Werte besitzen und somit schlechter inhibieren als die β -Urethane. Dies deutet darauf hin, dass die räumliche Präsentation der GlcNAc-Reste in Neoglycopeptid **16** für dessen hohe Affinität verantwortlich ist.

Der im Rahmen meiner Diplomarbeit eingesetzte Lectinbindungstest weist jedoch deutliche Mängel auf, weshalb die damit erzielten Ergebnisse nur bedingt aussagekräftig sind. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher ein neuer Bindungstest entwickelt werden. Hierbei sollte anstelle des nicht-kovalent immobilisierten Schweinemagenmucins (PSM) ein definiertes synthetisches GlcNAc-Derivat, welches kovalent immobilisiert wird, als Referenzligand dienen.

Zur weiteren Aufklärung der starken Affinitätssteigerung sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob eventuell durch das cyclische Peptidrückgrat eine Präorganisation der Zuckerreste vorliegt, die eine optimale Bindung an WGA ermöglicht. Dazu sollte ein entsprechendes lineares Peptid synthetisiert werden, an welches dann zum einen das β -Carbonat **12** und zum anderen das verkürzte α -Glycosylcarbonat **13** geknüpft wird. Ein Vergleich der Bindungsaffinitäten der beiden linearen tetravalenten Neoglycopeptide gegenüber WGA sollte zeigen, ob bereits das lineare Neoglycopeptid mit dem verkürzten Linker eine höhere Affinität als das lineare Neoglycopeptid mit dem längeren Linker aufweist.

Die ultimative Antwort auf die Frage, wie die synthetisierten Liganden mit dem Lectin interagieren, stellt sicherlich eine Strukturaufklärung entsprechender Ligand-WGA-Komplexe dar. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. Welte sollte daher versucht werden, für eine Röntgenstrukturanalyse geeignete Kristalle zu erhalten. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe Möller sollte die Konformation des Neoglycopeptids **16** in Lösung aufgeklärt werden.

Kohlenhydrat-Arrays haben sich in den vergangenen Jahren als „state-of-the-art“-Methode zur Analyse der Affinität und Spezifität von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen etabliert. Eine wichtige Frage in diesem Zusammenhang ist, wie die Affinität zu Proteinen von der Art der Präsentation der Zucker auf der Chip-Oberfläche, die als multivalente Präsentation aufgefasst

werden kann, beeinflusst wird. Zu Beginn dieser Arbeit waren nur Publikationen vorhanden, bei denen monovalente Kohlenhydratderivate auf Oberflächen immobilisiert worden sind. Bereits 1997 beobachteten Kahne und Mitarbeiter, dass das Bindungsverhalten monovalenter Kohlenhydratliganden gegenüber Lectinen in Lösung nicht mit dem Bindungsverhalten von auf Harzkugeln immobilisierten monovalenten Liganden korreliert.^[234] Sie spekulierten, dass ihre Beobachtungen aus multivalenten Wechselwirkungen der immobilisierten monovalenten Liganden mit den kohlenhydratbindenden Proteinen resultierten. Daraufhin untersuchten sie den Einfluss verschiedener Kohlenhydratdichten, erzeugt durch SAMs der monovalenten Liganden, auf die Lectin-Bindung mittels SPR.^[235] Ihre Ergebnisse zeigten jedoch, dass auch bei einer geringen Kohlenhydratdichte eine multivalente Bindung des Lectins an die Oberflächen-immobilisierten Zucker noch ermöglicht ist.

In dem zweiten Teil dieser Arbeit sollte der Einfluss verschiedener Kohlenhydratdichten auf einer Glasoberfläche, erzeugt sowohl durch mono- als auch multivalente Verbindungen, auf die Lectinerkennung untersucht werden (Abbildung 20).

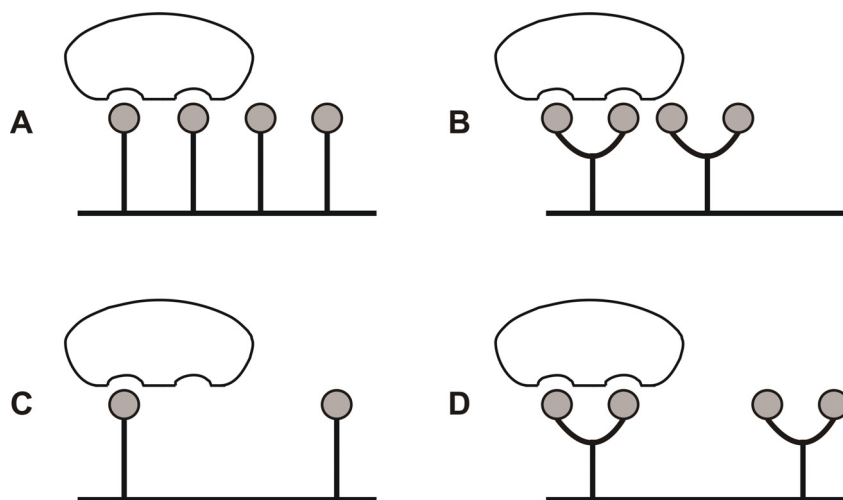


Abbildung 20. Schematische Darstellung unterschiedlicher Oberflächendichten und die daraus resultierende Lectin-Bindung. A, B) hohe Ligandendichte, C, D) geringere Dichte erzeugt durch A, C) monovalente und B, D) bivalente Liganden.

Wie Abbildung 20 zeigt, wurde erwartet, dass bei einer hohen Zuckerdichte auf der Glasoberfläche eine multivalente Bindung mit einem Lectin sowohl mit monovalenten als auch mit multivalenten Liganden ermöglicht ist (Abbildung 20, A, B). Bei einer Erniedrigung der Zuckerdichte sollte im Fall der monovalenten Verbindung ab einer bestimmten Dichte der Abstand zwischen zwei

Liganden größer sein als der Abstand zwischen den WGA-Bindungsstellen. Dadurch kann der Abstand zwischen den Liganden ab einer bestimmten Dichte nicht mehr „inter“-molekular von einem WGA-Molekül überbrückt werden. Die Affinität des Lectins gegenüber der Oberfläche sollte daher deutlich geringer werden (Abbildung 20, C). Im Fall einer multivalenten Verbindung auf der Oberfläche sollte dagegen eine Verringerung der Dichte keine gravierende Änderung der Bindungsaffinität des Lectins gegenüber der Oberfläche bewirken (Abbildung 20, D). Um diese Hypothese zu untersuchen, sollten mono- und multivalente Kohlenhydratderivate jeweils in verschiedenen Oberflächendichten kovalent auf Glaschips immobilisiert werden. Hierfür sollte zuerst ein geeignetes Chipsystem gefunden werden, um anschließend die Immobilisierungs- und Untersuchungsmethoden zu optimieren und zu etablieren. Zur Erzeugung unterschiedlicher Beladungsdichten sollte die jeweilige Kohlenhydrat-Lösung durch Zugabe eines weiteren Moleküls, welches zwar die gleiche funktionelle Gruppe zur kovalenten Immobilisierung trägt, aber keinen Zuckerrest besitzt, verdünnt werden. Somit wird die Beladungsdichte direkt gesteuert, und man kann den jeweiligen Molenbruch als Parameter für die Oberflächendichte heranziehen. Durch die Zugabe eines fluoreszenzmarkierten Lectins (WGA-Rhodamin-Konjugat) und der anschließenden Messung der Fluoreszenzintensität sollten $K_{D,surf}$ -Werte für die Bindung des Lectins an die in unterschiedlichen Oberflächendichten immobilisierten Zuckerreste bestimmt werden. Es wurde erwartet, dass die Erniedrigung der Zuckerdichte, erzeugt durch ein monovalentes Derivat, einen direkten Einfluss auf den $K_{D,surf}$ -Wert hat. Dagegen sollte die Erniedrigung der Zuckerdichte, erzeugt durch ein multivalentes Derivat, keinen signifikanten Einfluss auf den $K_{D,surf}$ -Wert zeigen.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Synthese der Zuckerbausteine

4.1.1 α -Glycosylcarbonat 13

Die Darstellung des α -Glycosylcarbonats **13**^[226] (Abbildung 21) erfolgte nach einer in meiner Diplomarbeit^[233] optimierten Methode. Ausgehend von Glucosamin-Hydrochlorid **17** wurde 2-Acetamido-1,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-glucopyranose **18** durch Peracetylierung unter Verwendung von Essigsäureanhydrid und Pyridin nach gängiger Methode^[236] hergestellt. Dann wurde eine selektive Deacetylierung am anomeren Zentrum von **18** mit Ethylendiamin/Eisessig^[237] durchgeführt. Man erhielt anomer ungeschützte 2-Acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy-D-glucopyranose **19** als ein Gemisch der α - und β -Anomeren in einem Verhältnis von α : β > 9:1. Die Umsetzung von 2-Acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy-D-glucopyranose **19** mit Chlorameisensäure-4-nitrophenylester **20** in Et₃N/DCM bei 0 °C, gefolgt von chromatographischer Aufreinigung an einer kurzen Kieselgelsäule, lieferte das α -Glycosylcarbonat **13** in einer Ausbeute von 92 %. Im Vergleich hierzu betrug die von S. Seeberger berichtete Ausbeute nur 47 %.^[226]

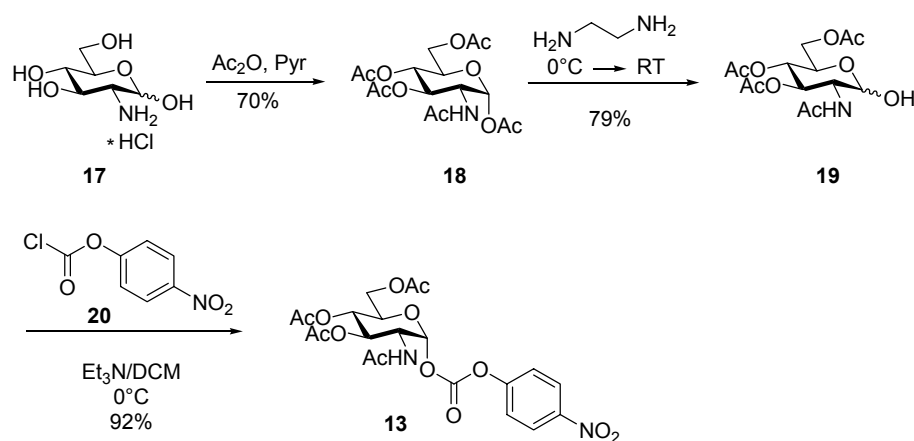


Abbildung 21. Synthese des α -Glycosylcarbonats **13**.

4.1.2 β -Carbonat **12**

Die Darstellung des *N*-Acetylglucosaminderivates **12** (Abbildung 22) erfolgte nach literaturbekannten Methoden. Ausgehend von peracetyliertem D-Glucosamin **18** wurde zunächst das Oxazolin **21** durch Reaktion mit Trimethylsilyltrifluormethansulfonat in absolutem 1,2-Dichloroethan synthetisiert.^[238] Dabei konnte das Oxazolin als gelblicher Schaum in einer Ausbeute von 97 % erhalten werden. Die folgende Kupplung des Oxazolins **21** an *cis*-2-Buten-1,4-diol durch Cu(II)-Aktivierung^[239] ergab das entsprechende Hydroxybutenylglycosid **22** in 54 % Ausbeute. Eine anschließende Umsetzung mit Chlorameisensäure-4-nitrophenylester **20** lieferte das gewünschte *N*-Acetylglucosaminderivat **12**^[227] als farblosen Feststoff in 84 % Ausbeute.

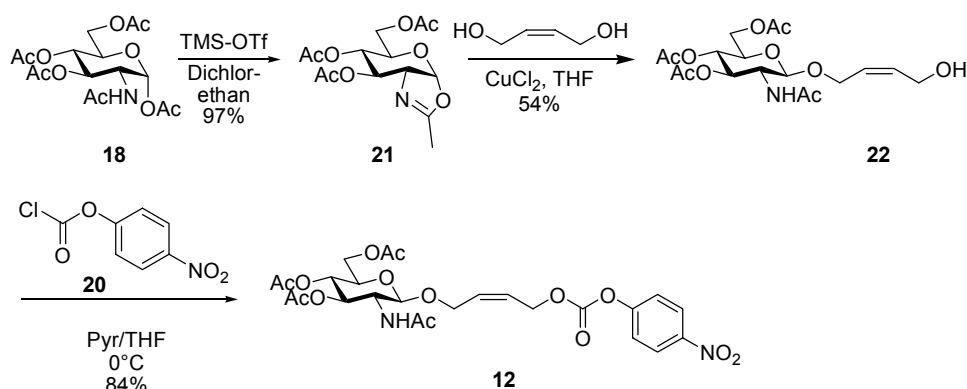


Abbildung 22. Synthese des *N*-Acetylglucosaminderivates **12**.

4.2 Multivalente Lectinliganden

Die beiden Zuckerbausteine, α -Glycosylcarbonat **13** und β -Carbonat **12**, wurden bereits in meiner Diplomarbeit genutzt, um zu multivalenten Lectinliganden zu gelangen,^[233] und ihre Synthese wurde im Rahmen dieser Arbeit wiederholt. Abbildung 23 zeigt die kommerziell erhältlichen Amine **23-30**, welche zur Darstellung der Liganden verwendet wurden.

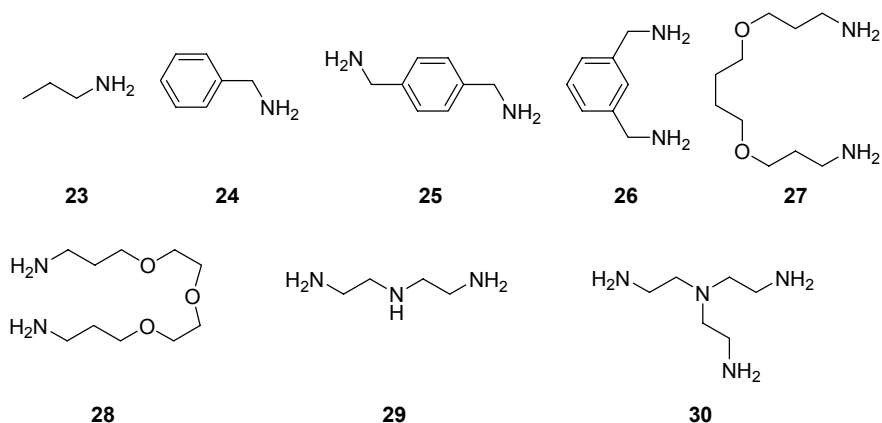


Abbildung 23. Amine zur Darstellung mono- bis trivalenter Lectin-Liganden.

Der jeweilige Zuckerbaustein wurde in geringem Überschuss vorgelegt, Amin und Hünig-Base wurden zugegeben und nach Beendigung der Reaktion wurde das Urethan säulenchromatographisch gereinigt. Da bei der Entfernung der Acetylschutzgruppen unter Zemplén-Bedingungen und anschließender Neutralisation mit einem sauren Ionenaustauscher das Problem auftrat, dass nicht nur die Liganden mit basischem Templat (**29**, **30**), sondern auch einige der neutralen Liganden am Harz anhafteten, wurde die *O*-Deacetylierung unter salzfreien Bedingungen durch Verwendung von *N*-Ethyldimethylamin in Methanol durchgeführt (Abbildung 24).

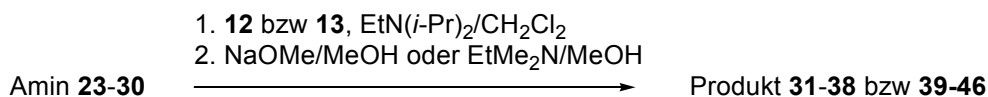
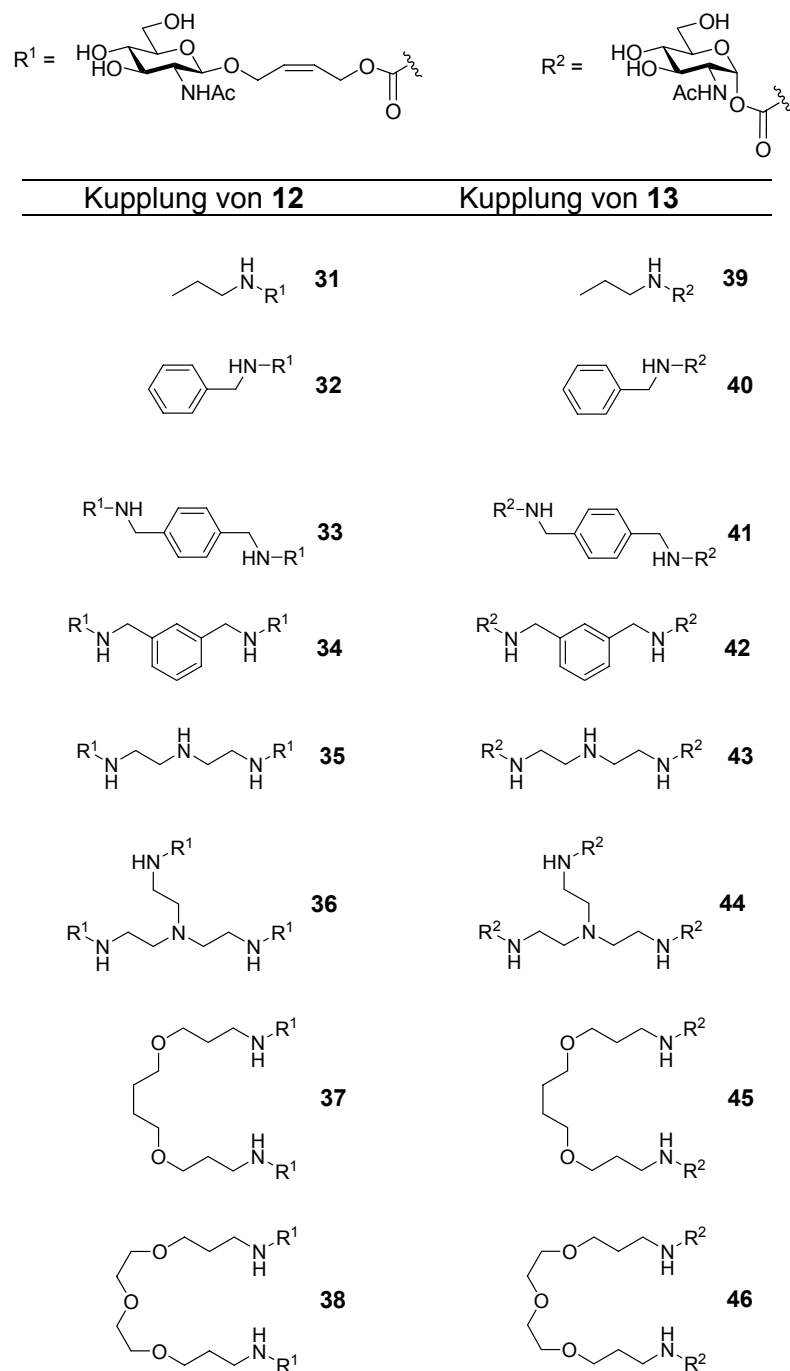
Abbildung 24. Darstellung der Liganden **31-38** und **39-46**.

Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die synthetisierten Verbindungen **31-38** bzw. **39-46**, die durch Verwendung der Carbonate **12** bzw. **13** erhalten wurden.

Zusätzlich wurden GlcNAc **47**, Allyl-2-acetamido-2-desoxy- α -D-glucopyranosid **48**, Allyl-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosid **49** und Verbindung **50**, die durch Deacetylierung des Hydroxybutenylglycosids **22** hergestellt wurde^[226], als monovalente Liganden eingesetzt (Abbildung 25).

Tabelle 2. Synthetisierte WGA-Liganden.^[233]

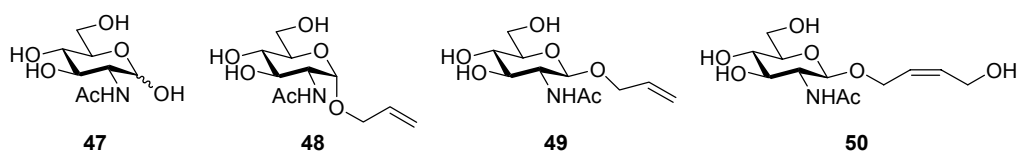


Abbildung 25. Weitere monovalente Liganden.

4.3 WGA-Bindungsstudien mittels eines Enzym-gekoppelten Lectinbindungstests (ELLA)

4.3.1 Allgemeines zum herkömmlichen Bindungstest

Die Bestimmung von IC_{50} -Werten der oben erwähnten WGA-Liganden **31-50** erfolgte in meiner Diplomarbeit durch einen Test (Abbildung 26), der bereits früher beschrieben wurde.^[17,220] Zunächst wurde die Oberfläche einer Polystyrol-Mikrotiterplatte mit einem natürlichen Glycoprotein (Schweinemagenmucin, kurz PSM) beschichtet (a). Nach gründlichem Waschen wurden zur Vermeidung von unspezifischen Wechselwirkungen unbesetzte Polystyrol-Flächen mit Rinderserumalbumin (BSA) blockiert (b). Dann wurde wieder gewaschen. Anschließend wurde das Lectin-Enzym-Konjugat (WGA-Meerrettichperoxidase) mit verschiedenen Konzentrationen des zu untersuchenden Liganden zugegeben (c). Nach einer bestimmten Inkubationszeit wurden die Platten zur Entfernung des nicht-gebundenen Lectin-Enzym-Konjugats gewaschen. Die Zugabe des Enzymsubstrats ABTS (2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)-diammoniumsalz) bewirkt eine Farbreaktion, welche spektrometrisch verfolgt wurde (d). Die Oxidation von ABTS wird durch die Peroxidase in Gegenwart von H_2O_2 bei einem pH von 4.0 katalysiert. Es bildet sich dabei aus der farblosen Substanz ABTS die blau-grünlich gefärbte radikalische Kationenform ($ABTS^{•+}$), deren Absorptionsmaximum bei 414 nm liegt.

Nach einer graphischen Auftragung der prozentualen Inhibition gegen den Logarithmus der Ligandenkonzentration erfolgte die Ermittlung des IC_{50} -Wertes, der erforderlichen Ligandenkonzentration, um 50 % der Lectin-Mucin-Bindung zu inhibieren.

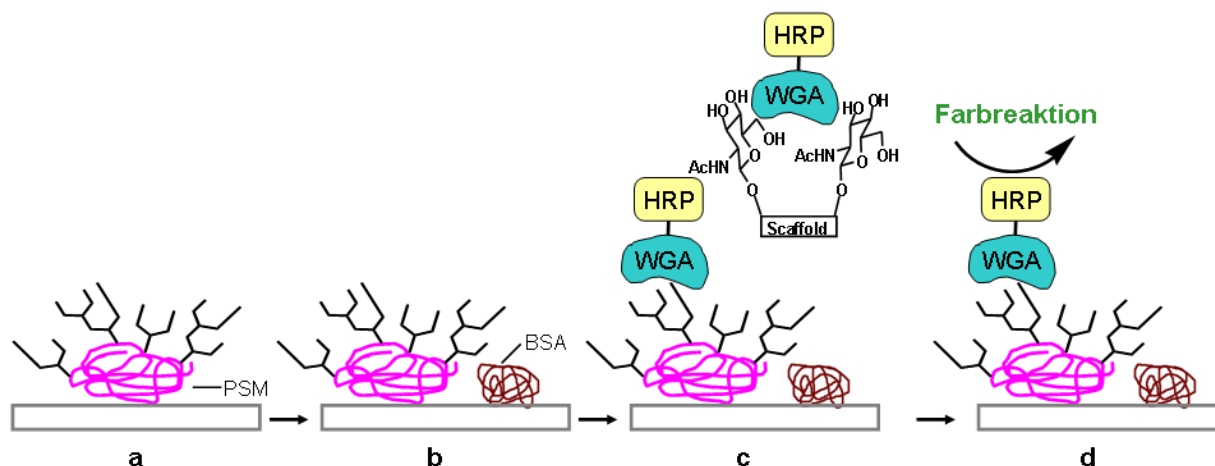
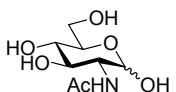
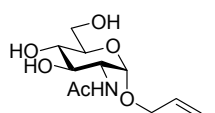
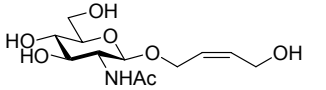
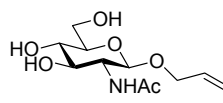
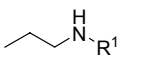
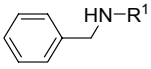
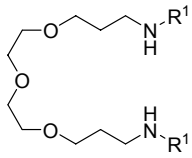
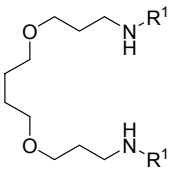
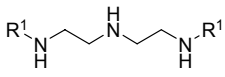
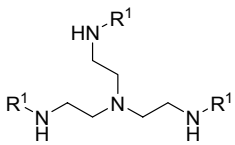
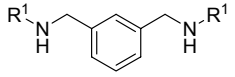
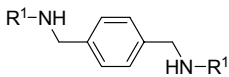


Abbildung 26. Durchführung eines ELLAs mit nicht-kovalent immobilisiertem Glycoprotein (vgl. Text).

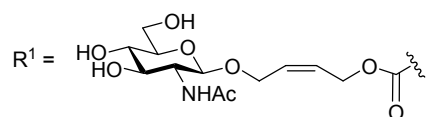
Tabelle 3 zeigt alle im Rahmen meiner Diplomarbeit bestimmten IC_{50} -Werte im Überblick. Die angegebenen relativen inhibitorischen Potenzen (β -Werte) beziehen sich auf GlcNAc **47** als Referenz ($\beta = 1$).

Tabelle 3. Ermittelte IC_{50} -Werte durch den ELLA mit nicht-kovalent immobilisiertem Glycoprotein.^[233]

Verbindung	IC_{50}	β^*
 47	~1000 mM	1
 48	720 mM	1.4
 50	500 mM	2
 49	280 mM	3.6
 31	240 mM	4.2

	32	100 mM	10
	38	75 mM	13
	37	60 mM	17
	35	40 mM	25
	36	25 mM	40
	34	20 mM	50
	33	15 mM	67

* β = relative inhibitorische Potenz



Die erhaltenen Inhibitionskurven der Verbindungen **31-38** und **47-50** zeigten jedoch keine 100 %ige Inhibition der Bindung von WGA-HRP an das immobilisierte Schweinemagenmucin. Die hohen Inhibitorkonzentrationen, die für eine 100 %ige Inhibition benötigt worden wären, konnten wegen ungenügender Löslichkeit in Wasser nicht hergestellt werden.

Von den meisten der Verbindungen **39-46** konnte kein IC₅₀-Wert bestimmt werden, da diese Verbindungen entweder wasserunlöslich (**40-42**) oder gering wasserlöslich (**39**) waren oder Mangel an Substanzmenge (**44-46**) dazu führte, dass keine genügend hohen Konzentrationen eingestellt werden konnten.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Reproduzierbarkeit des Tests begrenzt ist, sobald das experimentelle Setup z. B. durch Verwendung anderer Mikrotiterplatten oder anderer Bezugsquellen des Mucins geändert wird. Beispielsweise lag der von S. Seeberger bestimmte IC_{50} -Wert von GlcNAc bei 83 mM.^[226] Diese Probleme führten zur Entwicklung eines modifizierten ELLAs, bei dem statt des nicht-kovalent immobilisierten Schweinemagenmucins ein definiertes synthetisches GlcNAc-Derivat, welches kovalent immobilisiert wird, als Referenzligand dient. Dadurch sollten Nachteile des herkömmlichen ELLAs mit nicht-kovalent immobilisiertem Glycoprotein, wie z. B. eine maximale Inhibition von weniger als 100 %^[226] oder die schlechte Reproduzierbarkeit von IC_{50} -Werten, vermieden werden.

4.3.2 Entwicklung eines ELLAs mit einem kovalent immobilisierten Referenzliganden

Im Rahmen ihrer Bachelorarbeit in unserer Arbeitsgruppe versuchte K. Rohmer, das β -Carbonat **12** direkt auf kommerziell erhältliche Amin-modifizierte Mikrotiterplatten zu kuppeln.^[240] Dazu wurde die Platte **51** mit β -Carbonat **12** in DMSO in Gegenwart von Hünig-Base behandelt. Durch anschließende *O*-Deacetylierung unter Zemplén-Bedingungen wurde die modifizierte Platte **52** erhalten (Abbildung 27).

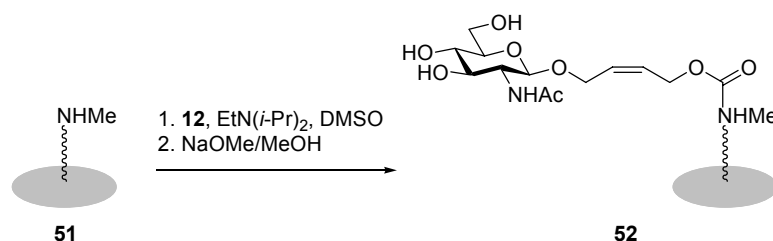


Abbildung 27. Direkte Immobilisierung des β -Carbonats **12** auf Amin-modifizierte Mikrotiterplatten.^[240]

Um die Eignung der Oberfläche **52** zu testen, wurde die Platte **51** mit verschiedenen Konzentrationen an β -Carbonat **12** versetzt (0.06-100 mM). Nach der Deacetylierung wurde mit BSA blockiert und anschließend mit einer Verdünnungsreihe an WGA-HRP ($0.2-25 \mu g mL^{-1}$) inkubiert. Durch Waschen wurde nicht-gebundenes WGA-Konjugat entfernt. Dann wurde das Enzymsubstrat ABTS zugesetzt und die Absorption bei 405 nm gemessen (Abbildung 28).

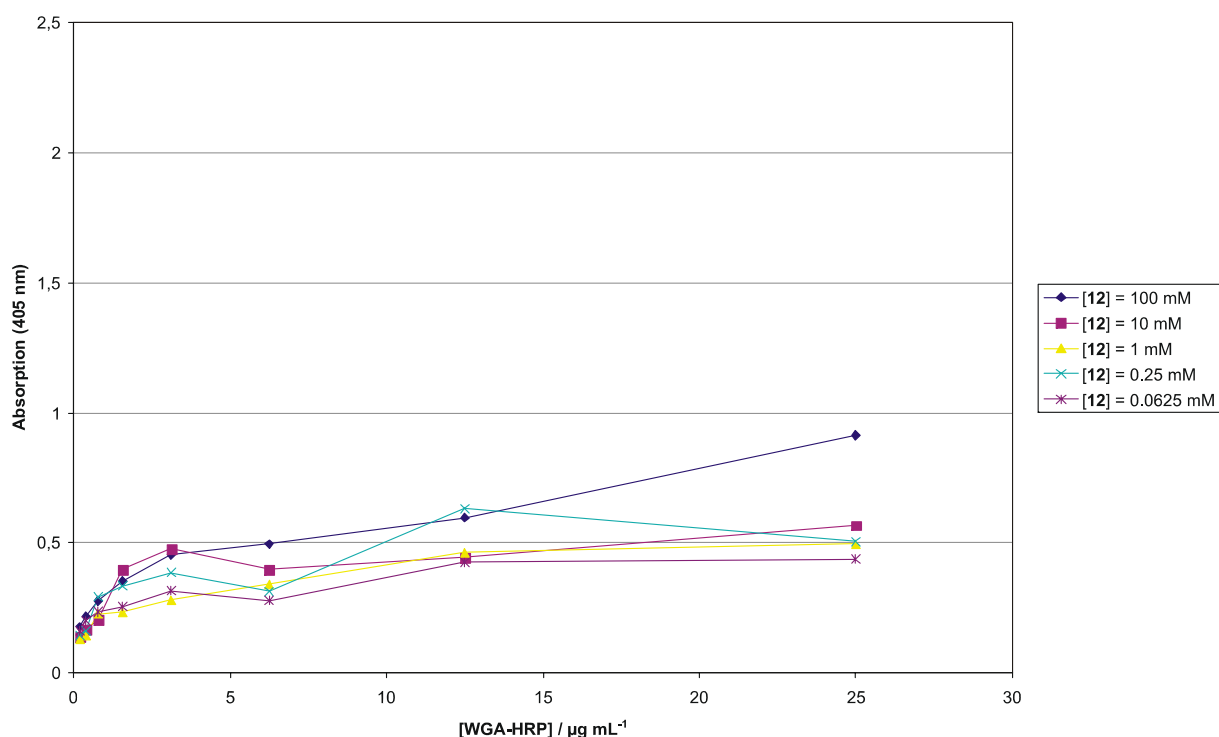
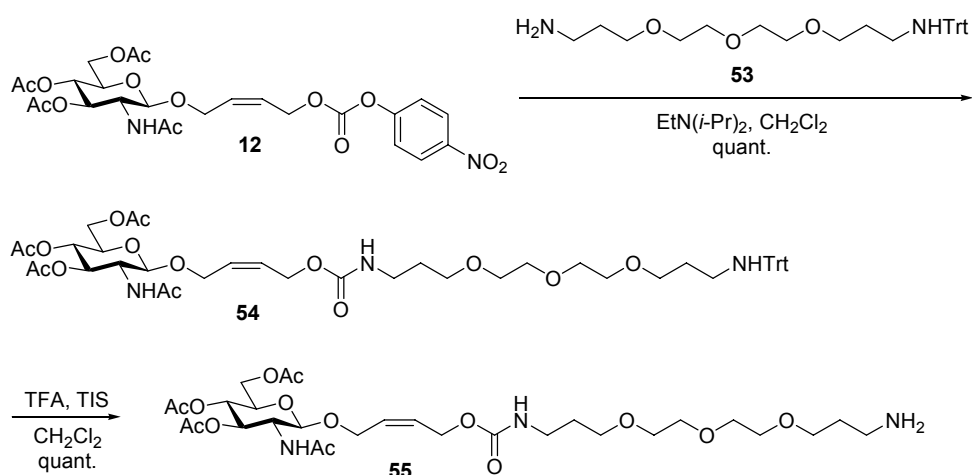


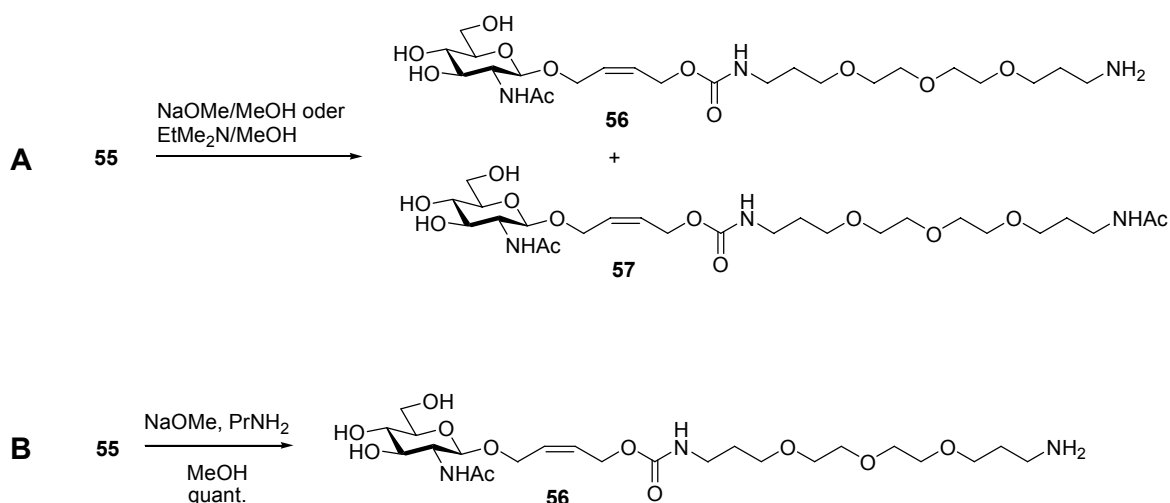
Abbildung 28. Bestimmung der erforderlichen Konzentration an **12** um die Oberfläche **51** zu sättigen.^[240]

Wie Abbildung 28 zeigt, ist die Menge an gebundenem WGA-HRP sehr gering und korreliert auch nicht mit der Konzentration an β -Carbonat **12**. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass die beobachtete Bindung von WGA-HRP nicht aus spezifischer Wechselwirkung mit den immobilisierten GlcNAc-Resten resultiert. Grund hierfür könnte der geringe Abstand zwischen der Platten-Oberfläche und den GlcNAc-Resten sein, der dafür sorgt, dass die Zugänglichkeit der Zuckerreste gegenüber den WGA-Bindungsstellen eingeschränkt ist. Daher sollte ein GlcNAc-Derivat synthetisiert werden, welches einen längeren Linker zwischen Zuckerrest und der Anknüpfungsstelle an die Oberfläche besitzt.

Dazu wurde das β -Carbonat **12** mit monotriplyliertem Diamin **53** in Dichlormethan in Gegenwart von Hünig-Base in quantitativer Ausbeute zum Urethan **54** umgesetzt. Die anschließende Entfernung der Trityl-Schutzgruppe geschah unter Verwendung von Trifluoressigsäure (TFA) und Triisopropylsilan (TIS) in Dichlormethan. Man erhielt Verbindung **55** in quantitativer Ausbeute als farbloses Öl (Abbildung 29).

Abbildung 29. Darstellung von Verbindung **55**.

Die folgende *O*-Deacetylierung von Verbindung **55** lieferte sowohl unter Zemplén-Bedingungen als auch unter Verwendung von *N*-Ethyl dimethylamin in Methanol neben dem gewünschten Produkt **56** auch die *N*-acetylierte Verbindung **57** (Abbildung 30 A). Die Wanderung einer Acetylgruppe während der Deacetylierung von **55** auf die primäre Aminogruppe konnte jedoch durch Zusatz von sechs Äquivalenten eines anderen primärenamins, Propylamin, erfolgreich verhindert werden (Abbildung 30 B).

Abbildung 30. Deacetylierung von Verbindung **55** durch Verwendung verschiedener Methoden.

Zur Herstellung von Mikrotiterplatten mit kovalent immobilisierter Verbindung **56** wurde zunächst die kommerziell erhältliche Amin-modifizierte Mikrotiterplatte **51** durch die Reaktion mit 1,4-Phenylendiisothiocyanat (PDITC) in die Amin-reaktive Isothiocyanat-Oberfläche **58**

überführt. Diese Prozedur wurde von Guo et al. zur Darstellung von DNA-Mikroarrays beschrieben.^[241] Die modifizierte Mikrotiterplatte **58** wurde dann mit Verbindung **56**, gelöst in Carbonat-Puffer pH 10.1, über Nacht inkubiert, und man erhielt Oberfläche **59**, die einen vergrößerten Abstand zum Zuckerrest bietet (Abbildung 31).

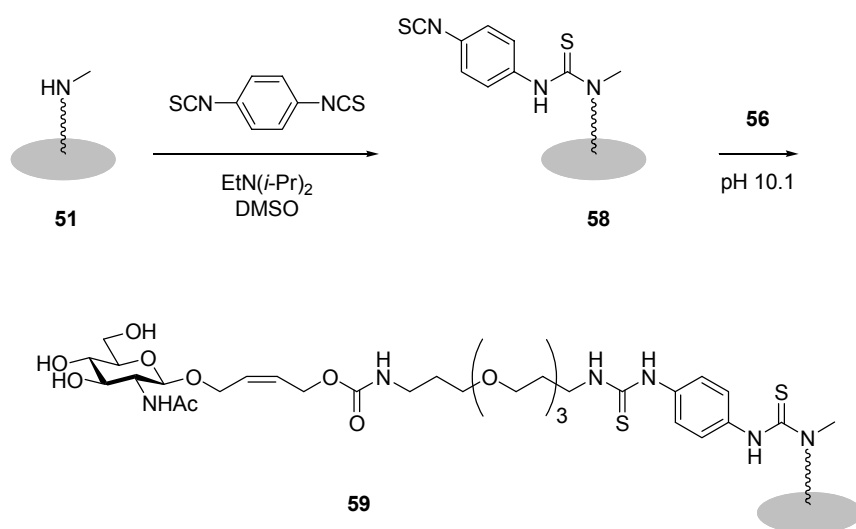


Abbildung 31. Darstellung der GlcNAc-modifizierten Mikrotiterplatte **59**.

Um nun wiederum die Eignung der Oberfläche **59** zu testen, wurde die Platte **58** mit verschiedenen Konzentrationen an Verbindung **56** versetzt (0.1 μM -10 mM). Dann wurde mit BSA blockiert und anschließend mit einer Verdünnungsreihe an WGA-HRP (0.01-10.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$) inkubiert. Durch Waschen wurde nicht-gebundenes WGA-Konjugat entfernt. Dann wurde das Enzymsubstrat ABTS zugesetzt und die Absorption bei 405 nm gemessen (Abbildung 32). Abbildung 32 zeigt ein komplett unterschiedliches Verhalten im Vergleich zur Oberfläche **52** mit dem geringeren Abstand zum Zuckerrest. Hier kann nun eine klare Beziehung zwischen der Konzentration des Zuckerderivats **56**, welches zur Derivatisierung der Isothiocyanat-Oberfläche **58** verwendet wird, und der Menge an Oberflächen-gebundenem WGA-HRP beobachtet werden. Ab einer Konzentration des Zuckerderivats **56** ≥ 1 mM ist die reaktive Isothiocyanat-Oberfläche der Platte gesättigt und es ergeben sich Bindungskurven, die im Einklang mit einer einfachen 1:1-Lectin-Ligand-Interaktion sind. Im Vergleich zu Oberfläche **52** zeigt sich, dass die absolute Menge WGA-HRP gebunden an Oberfläche **59** um ein Vielfaches größer ist.

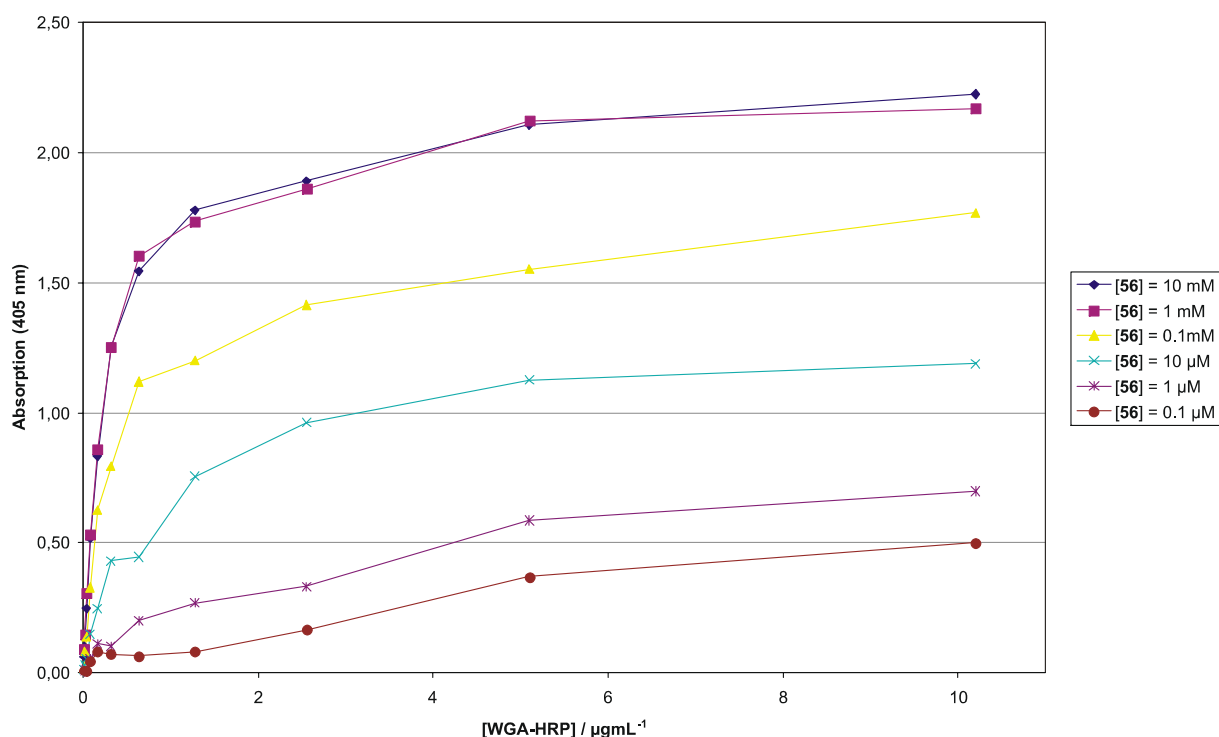


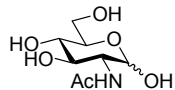
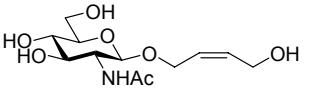
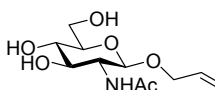
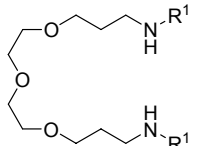
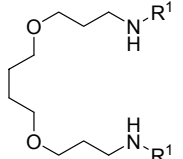
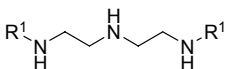
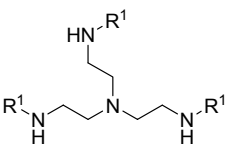
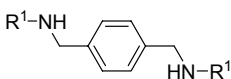
Abbildung 32. Bestimmung der erforderlichen Konzentration an **56**, um die Oberfläche zu sättigen.

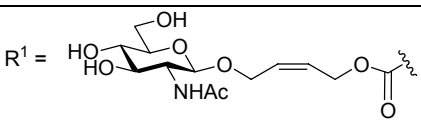
Im Folgenden wurden alle Experimente mit Mikrotiterplatten **59** durchgeführt, die durch Reaktion mit einer 1 mM Lösung des Zuckerderivats **56** hergestellt wurden.

Um einen Vergleich zwischen dem modifizierten ELLA mit kovalent immobilisiertem GlcNAc und dem herkömmlichen ELLA mit nicht-kovalent immobilisiertem Schweinemagenmucin (PSM) zu ermöglichen, wurden einige der Liganden aus meiner Diplomarbeit und zusätzlich das Cyclopeptid **15** mit längerem Linker mit dem modifizierten Assay getestet. Wie bei den Bindungstests in meiner Diplomarbeit wurde auch hier mit einer WGA-HRP-Konzentration von $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ gearbeitet.

Tabelle 4 zeigt die ermittelten IC_{50} -Werte im Vergleich zum herkömmlichen Assay mit nicht-kovalent immobilisiertem PSM. Im Vergleich wird sofort ersichtlich, dass die IC_{50} -Werte, die mit den kovalent modifizierten Platten bestimmt wurden, wesentlich niedriger sind als die mit den PSM-beschichteten Platten. Der IC_{50} -Wert von GlcNAc **47** beträgt jetzt 23 mM anstatt 1000 mM wie zuvor. Ebenso sind die IC_{50} -Werte der anderen beiden monovalenten Verbindungen **49** und **50** um einen vergleichbaren Faktor von ungefähr 30-40 geringer; die Werte der relativen inhibitorischen Potenzen bleiben somit in einem vergleichbaren Bereich.

Tabelle 4. Absolute und relative IC₅₀-Werte, bestimmt durch ELLA mit A) nicht-kovalent immobilisierten PSM und B) kovalent immobilisiertem GlcNAc-Derivat **56** als Referenzligand.

Verbindung	A) Referenz-Ligand: nicht-kovalent immobilisiertes PSM		B) Referenz-Ligand: kovalent immobilisiertes GlcNAc	
	IC ₅₀ (mM)	β	IC ₅₀ (mM)	β
 47	~1000	1	23	1
 50	500	2	12	1.9
 49	280	3.6	10	2.3
 38	75	13	0.288	80
 37	60	17	0.360	64
 35	40	25	0.140	164
 36	25	40	0.055	420
 33	15	67	0.088	260
Cyclopeptid 15	-	-	0.016	1440

R¹ = 

Die IC₅₀-Werte der bivalenten Liganden **33** und **37** sind um einen gleichen Faktor von 170 verringert, was zu entsprechend größeren β -Werten führt. Die IC₅₀-Werte der bivalenten Liganden

35 und **38** sind um einen noch höheren Faktor von 290 bzw 260 verringert. Der IC_{50} -Wert des trivalenten Liganden **36** ist sogar um einen Faktor von 455 verringert.

Durch Verwendung des modifizierten Assays erhält man also nicht nur niedrigere IC_{50} -Werte, sondern die deutlich bessere Differenzierung zwischen Liganden unterschiedlicher Valenz führt auch zu signifikant höheren relativen inhibitorischen Potenzen (β -Werten).

Abbildung 33 zeigt die Bindungskurven, die mit dem modifizierten Assay erhalten wurden.

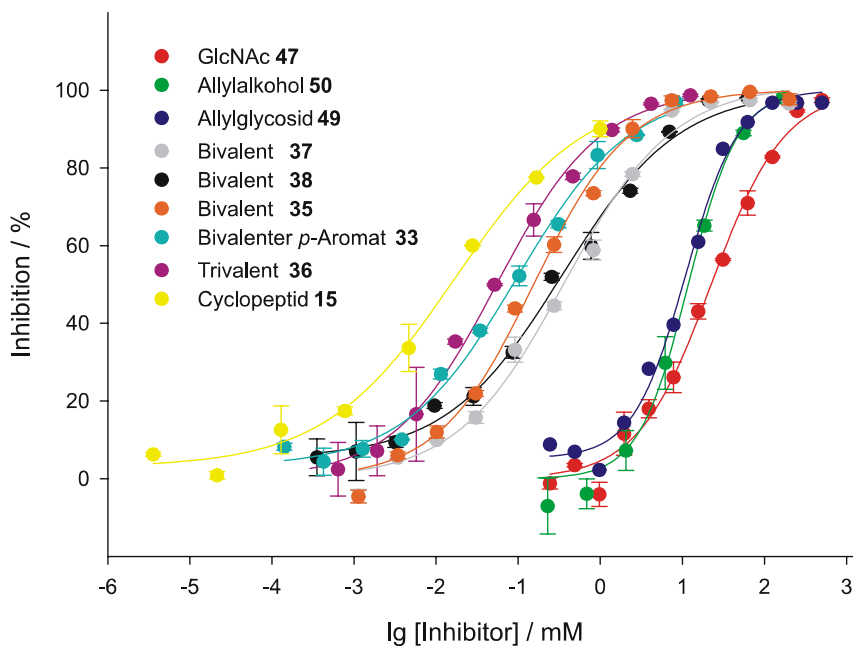


Abbildung 33. Bindungskurven verschiedener WGA-Liganden mit dem längeren Linker.

Wie Abbildung 33 zeigt, besitzen alle Bindungskurven ungefähr dieselbe Steigung. Der bivalente Ligand **33** mit dem aromatischen Spacer zeigte in meiner Diplomarbeit mit dem PSM-Assay einen steilen Anstieg; dies wird hier nicht beobachtet. Falls der steile Anstieg der Bindungskurve damals durch Aggregation verursacht wurde, dann kommt das offensichtlich bei den geringeren Konzentrationen, die für den modifizierten Assay erforderlich sind, nicht mehr zum Tragen.

Zudem wird mit dem neuen Assay bei allen Liganden eine maximale Inhibition von 100 % erreicht. Durch die viel geringeren Konzentrationen, die zur Bestimmung der IC_{50} -Werte benötigt werden, stellt die begrenzte Wasserlöslichkeit einiger Liganden nun kein Problem mehr dar. Auch das Cyclopeptid **15** zeigt unter Verwendung des modifizierten Assays mit einer Oberfläche, die einheitliche Kohlenhydratepitope präsentiert, eine nahezu 100%ige Inhibition. Unter Verwendung

des PSM-Assays wurde nur eine maximale Inhibition von 70 % erreicht; der IC_{50} -Wert lag bei 0.38 mM ($\beta = 218$).^{[17][242]} Die Gründe für diese Beobachtung sind unklar, könnten aber auf das Vorhandensein mehrerer unterschiedlicher Bindungsstellen auf PSM zurückgehen. PSM ist ein stark glycosyliertes Glycoprotein, das in verschiedenen Glycoformen vorliegt. Es ist bekannt, dass WGA auch an *N*-Acetylneuraminsäure bindet.^[243] Es könnte möglich sein, dass diese Wechselwirkung nicht durch GlcNAc-Derivate inhibiert wird und man somit keine 100 %ige Inhibition der Bindung von WGA an PSM erreichen kann.

Zudem ist es wohlbekannt, dass die Leistung multivalenter Liganden stark von der Art des Assays abhängt, mit dem sie getestet werden. Dies betrifft nicht nur absolute IC_{50} -Werte, sondern auch die beobachteten Multivalenz-Effekte, d. h. die relativen IC_{50} -Werte. So verglichen beispielsweise Toone und Mitarbeiter eine Reihe kompetitiver und nicht-kompetitiver Bindungsassays (ELLA, HIA und ITC)^[221] und Pieters et al. untersuchten multivalente Galectin-Liganden mittels Festphasen-Inhibitions-Assay und Fluoreszenz-Titration in Lösung^[244]. Es existieren zudem einige Berichte, die zeigen, dass die Verwendung eines ELLAs mit unterschiedlichen Matrices (Referenzliganden) zu unterschiedlichen relativen inhibitorischen Potenzen führen kann.^[245,246] Jedoch ist dieses Phänomen bisher nicht geklärt.

Eine mögliche Erklärung für unterschiedliche absolute IC_{50} -Werte, die mit verschiedenen Matrices erhalten werden, könnte sein, dass wie oben bereits erwähnt, die untersuchten Lectine eine unterschiedliche Bindungsaffinität an die verschiedenen immobilisierten Referenzliganden besitzen. Somit sind variierende Konzentrationen an Inhibitoren nötig, um die Interaktion zwischen Lectin und Referenzligand zu inhibieren. Um zu untersuchen, ob diese Hypothese die niedrigeren IC_{50} -Werte, die mit dem PSM-freien Assay erhalten wurden, erklären kann, wurde die Bindungsaffinität von WGA-HRP einerseits an die PSM-beschichteten Platten, und andererseits an die kovalent modifizierten Platten **59** bestimmt (Abbildung 34). Dabei wurde erwartet, dass die niedrigeren IC_{50} -Werte aus einer signifikant niedrigeren Bindungsaffinität des Lectins an die kovalent modifizierte Platte **59** resultieren. Die Dissoziationskonstante K_D^{ELLA} für die Wechselwirkung von WGA-HRP mit der Oberfläche **59**, die einer Konzentration an WGA-HRP entspricht, die nötig ist, um 50 % der Oberflächen-Bindungsstellen zu besetzen, ergibt sich aus den in Abbildung 32 gezeigten Bindungskurven. Die Daten für die PSM-beschichtete Oberfläche wurden aus einem analogen Experiment während meiner Diplomarbeit erhalten.

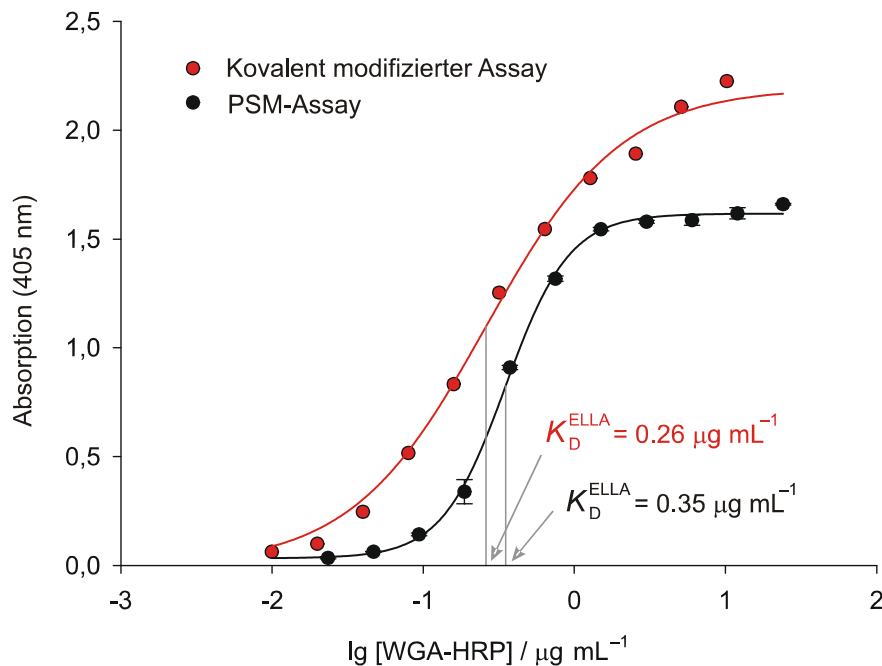


Abbildung 34. Bestimmung der Bindungsaffinität von WGA-HRP an die PSM-beschichteten Platten (schwarz) und an die kovalent modifizierten Platten **59** (rot). Die absoluten Absorptionswerte der beiden Experimente sind wegen unterschiedlicher Assay-Bedingungen nicht vergleichbar.

Wie Abbildung 34 zeigt, ist K_D^{ELLA} der kovalent modifizierten Platte **59** ($0,26 \mu\text{g mL}^{-1}$) sogar etwas geringer als K_D^{ELLA} der PSM-beschichteten Platte ($0,35 \mu\text{g mL}^{-1}$). Dies entspricht einer höheren Bindungsaffinität von WGA-HRP an die kovalent modifizierte Oberfläche **59** und erklärt somit nicht die beobachteten niedrigeren IC_{50} -Werte. Eine genauere Betrachtung der Bindungskurven ergibt zwei Unterschiede. Die Bindungskurve, die für die kovalent modifizierte Platte **59** erhalten wurde, entspricht perfekt einer Langmuir-Isotherme (Hill-Koeffizient = 1), wohingegen die Bindungskurve für die PSM-beschichtete Platte viel steiler ist (Hill-Koeffizient = 2). Gleichzeitig wurde abgeschätzt, dass die PSM-beschichtete Platte ungefähr doppelt so viel WGA-HRP pro Oberflächeneinheit bindet wie die kovalent modifizierte Platte **59**.

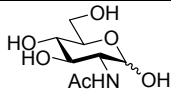
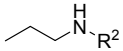
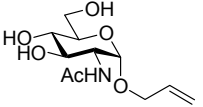
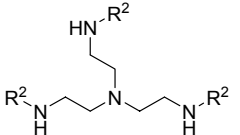
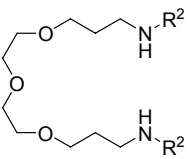
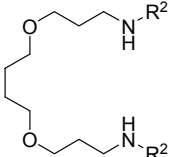
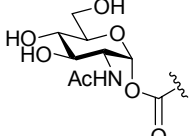
Diese Ergebnisse unterstreichen die Wichtigkeit der Topologie der Kohlenhydrat-Präsentation auf Oberflächen, wie z. B. Zellmembranen oder Kohlenhydrat-Mikroarrays, für die Affinität und Spezifität von Kohlenhydrat-Lectin-Wechselwirkungen.

Zudem bleibt hier noch zu erwähnen, dass der IC_{50} -Wert von GlcNAc, der mit dem modifizierten Assay bestimmt wurde (23 mM), viel näher beim K_D -Wert von GlcNAc liegt, der von mehreren Arbeitsgruppen unter Verwendung verschiedener Methoden^[63,247-250] bestimmt wurde (K_D : $1 - 5 \text{ mM}$).

Der Vorteil, dass die Liganden beim kovalent modifizierten Assay viel niedrigere IC_{50} -Werte besitzen, wurde genutzt, um einige α -Glycosylurethane zu testen, die für die Verwendung des PSM-Assays nicht genügend wasserlöslich waren, um die hohen erforderlichen Konzentrationen für eine Inhibition zu erreichen.

Tabelle 5 zeigt die bestimmten IC_{50} -Werte, die nun unter Verwendung des neuen Assays erhalten werden konnten.

Tabelle 5. Bestimmte IC_{50} -Werte durch ELLA mit kovalent immobilisiertem GlcNAc-Derivat **56** als Referenzligand.

Verbindung	IC_{50}	β
 47	23 mM	1
 39	8 mM	2.9
 48	6 mM	3.8
 44	0.812 mM	28
 46	0.057 mM	404
 45	0.0098 mM	2347
Cyclopeptid 16	0.0009 mM	25560
$R^2 =$ 		

Die beiden monovalenten Liganden **39** und **48** zeigen wiederum eine leicht erhöhte, aber dennoch vergleichbare Affinität wie GlcNAc. Der trivalente Ligand **44** mit dem kurzen Linker ($\beta = 28$) hat eine deutlich schlechtere inhibitorische Wirkung als die trivalente Verbindung **36** mit dem langen Linker ($\beta = 420$). Dagegen zeigt das bivalente Derivat **46** mit dem kurzen Linker ($\beta = 404$) eine stark erhöhte Affinität im Vergleich zum bivalenten Derivat **38** mit dem langen Linker ($\beta = 80$). Der gleiche Effekt wird noch stärker bei dem bivalenten Liganden **45** ($\beta = 2347$) im Vergleich zum bivalenten Liganden **37** mit langem Linker ($\beta = 64$) beobachtet. Diese Affinitätsminderung bzw. -steigerung ist sehr wahrscheinlich auf den Abstand der Zuckerreste zueinander zurückzuführen. So erreicht eventuell der trivalente Ligand **44** mit kurzem Linker nicht mehr so gut zwei Bindungsstellen, wohingegen die bivalenten Liganden **45** bzw. **46** durch den verringerten Abstand der Zuckerreste im Vergleich zu den bivalenten Verbindungen **37** bzw. **38** mit dem jeweils längeren Linker nun gut in zwei Bindungstaschen passen könnten. Das Cyclopeptid **16** zeigt auch unter Verwendung des neuen Assays weiterhin eine vergleichbare signifikant höhere Affinitätssteigerung ($\beta = 25560$) im Vergleich zu Cyclopeptid **15** mit dem langen Linker ($\beta = 1440$). Die Beobachtung, dass die Affinität des monovalenten α -Glycosylurethans **39** ($IC_{50} = 8$ mM) mit der des β -Allylglycosids **49** ($IC_{50} = 10$ mM) vergleichbar ist, legt nahe, dass nicht bereits die α -Glycosylurethan-Verknüpfung zu der hohen Affinitätssteigerung von Cyclopeptid **16** im Vergleich zu Cyclopeptid **15** führt, sondern die räumliche Präsentation der Zucker mit für dessen hohe Affinität verantwortlich ist.

Abbildung 35 zeigt, dass auch mit den α -Glycosylurethanen eine jeweilige maximale Inhibition von 100 % erreicht werden konnte.

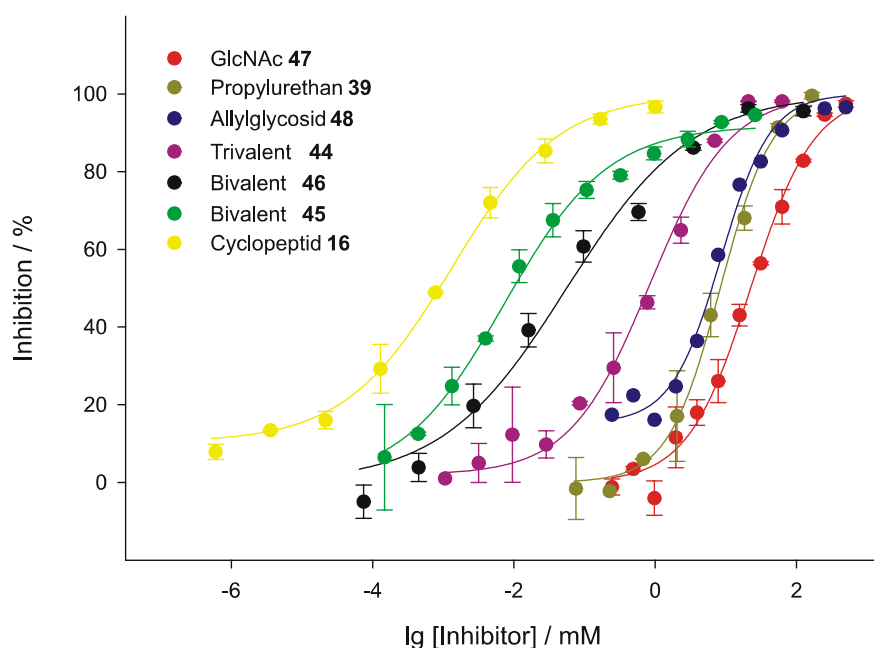
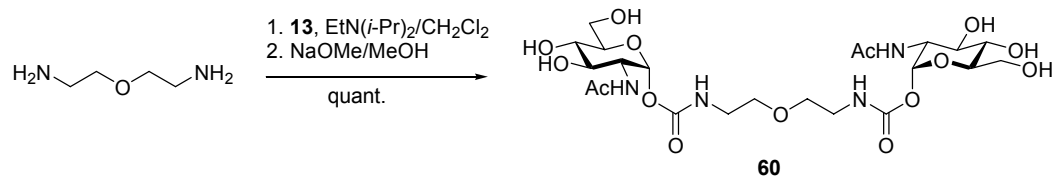


Abbildung 35. Bindungskurven verschiedener WGA-Liganden mit dem kürzeren Linker.

Da der bivalente Ligand **45**, trotz dem nur um ein Sauerstoffatom verkürzten Abstand der Zuckerreste, interessanterweise im Vergleich zum bivalenten Liganden **46** eine um einen Faktor sechs höhere Affinität zeigt, sollte ein weiterer bivalenter Ligand getestet werden, bei dem der Abstand zwischen den Zuckerresten noch geringer ist. Es wurde ausgehend von 1,5-Diamino-3-oxapentane die zu Ligand **44** analoge Verbindung **60** synthetisiert, bei der die sekundäre Aminogruppe durch ein Sauerstoffatom ersetzt ist.



Im anschließenden Bindungstest zeigte Verbindung **60** eine 31-fach höhere Affinität als GlcNAc ($\text{IC}_{50} = 0.734 \text{ mM}$) und inhibiert somit die Bindung von WGA an das Oberflächen-gebundene GlcNAc deutlich schlechter als die beiden bivalenten Liganden **45** und **46** mit größerem Abstand zwischen den beiden Zuckerresten. Wahrscheinlich ist bei Verbindung **60** der Abstand zu gering, um zwei Bindungsstellen überbrücken zu können. Interessanterweise hat **60** eine vergleichbare

Affinität gegenüber WGA wie die trivalente Verbindung **44**. Bei diesen beiden Verbindungen ist auch der Abstand zwischen zwei Zuckerresten in etwa vergleichbar.

Abbildung 36 zeigt die Bindungskurven von den bivalenten Liganden **60**, **45** und **46** im Vergleich mit GlcNAc.

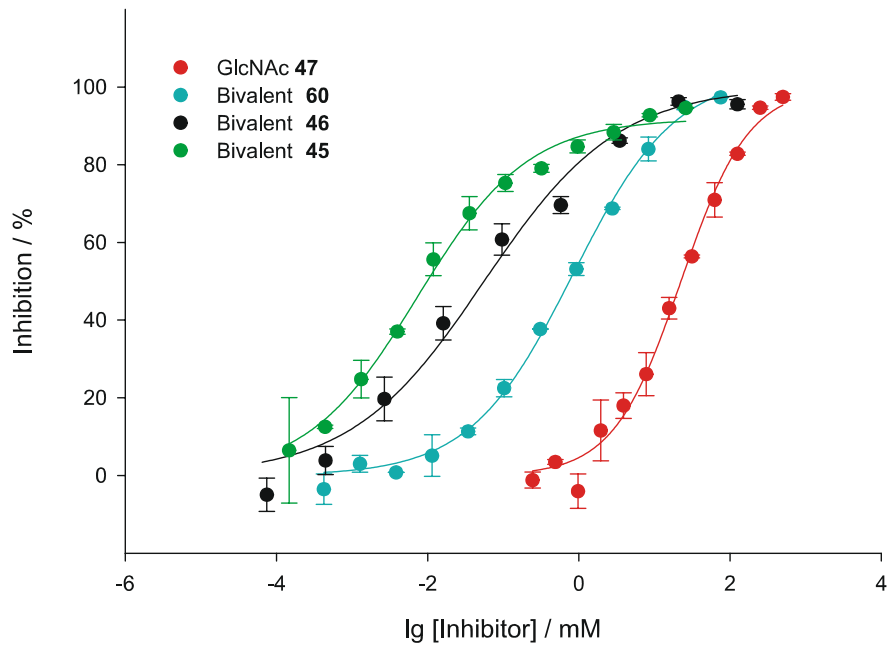


Abbildung 36. Bindungskurven der bivalenten WGA-Liganden im Vergleich zu GlcNAc.

4.4 NMR-basierte Konformationsanalyse

Zur weiteren Aufklärung der hohen Bindungsaffinität des cyclischen Neoglycopeptids **16** gegenüber WGA sollte eine NMR-basierte Konformationsanalyse beitragen. Diese wurde von J. Beck im Rahmen seiner Masterarbeit in der Arbeitsgruppe Möller durchgeführt.^[251]

Allen NMR-basierten Methoden zur Analyse von Vorzugskonformationen liegen NMR-spektroskopische Parameter zugrunde, die strukturelevante Informationen wie z. B. internukleare Abstände und Torsionswinkel enthalten. Jeder einzelne strukturelevante Parameter schränkt die Zahl der möglichen Konformationen eines untersuchten Moleküls auf eine andere Weise ein, sodass die Summe aller strukturelevanten Parameter im günstigsten Fall nur mit einer Konformation vereinbar ist.

Zur Konformationsanalyse wurden für das Neoglycopeptid **16** strukturelle *restraints* aus NMR-Experimenten gewonnen, die in Molekulardynamik-Simulationen (*simulated annealing*) mit dem Softwarepaket AMBER 8 eingingen. Die Konformation des Neoglycopeptids **16** wurde dabei durch 30 *distance restraints* und neun *torsion restraints* bestimmt. Somit ergaben sich für Neoglycopeptid **16** drei Strukturfamilien, die mit den NMR-basierten Strukturinformationen vereinbar sind.

Die meisten NMR-Spektren des Neoglycopeptids **16** wurden dabei von 600 μL einer 4.4 mM Lösung von **16** in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (95/5) bei pH 5 aufgezeichnet, in der zur Konservierung außerdem 0.05 % Natriumazid enthalten war.

Abbildung 37 zeigt die Sequenzpositionen, wie sie für die Zuordnungen verwendet wurden.

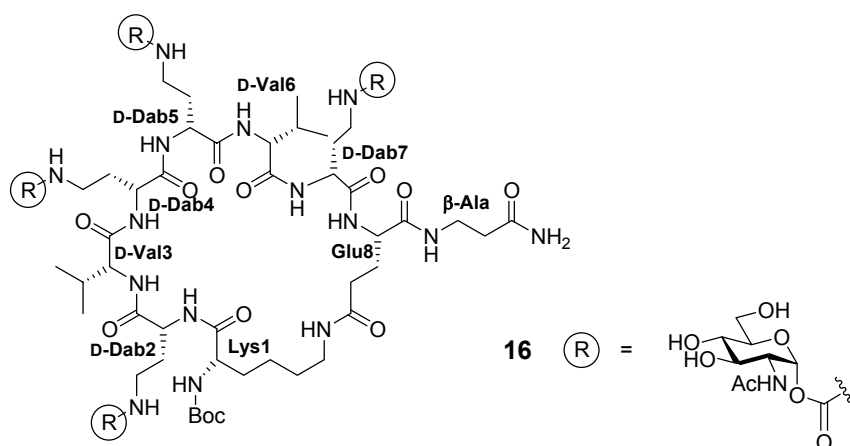


Abbildung 37. Sequenzpositionen des cyclischen Neoglycopeptids **16**.

Abbildung 38 zeigt die neun günstigsten Konformere der Struktur des Peptidrückgrates (oben) und des Neoglycopeptids **16** (unten) der energetisch günstigsten Strukturfamilie. Im unteren Teil der Abbildung sind zur besseren Übersichtlichkeit die D-Dab-Seitenketten und GlcNAc-Reste nach Sequenzpositionen wie folgt gefärbt: 2: blau, 4: rot, 5: grün, 7: magenta. Wasserstoffatome, Boc- und β -Ala-Reste, sowie die Val-Seitenketten sind nicht dargestellt.

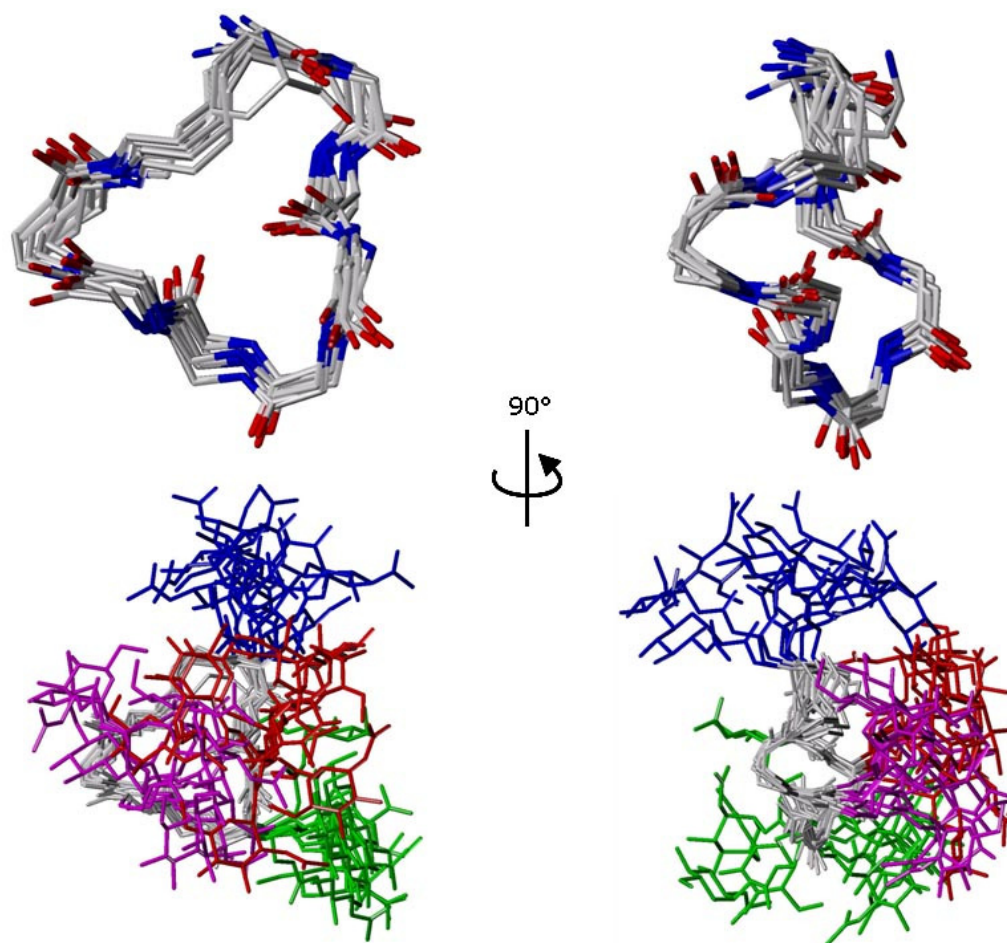


Abbildung 38. Die günstigsten Konformere der Struktur des Peptidrückgrates (oben) und des Neoglycopeptids **16** (unten).

In erster Näherung kann die peptidische Rückgratstruktur der dominierenden Konformationen (Abbildung 38 oben) als Dreieck beschrieben werden, wobei Turns bei D-Dab², der α -Position von D-Dab⁵ und im Bereich der Seitenkette von Glu⁸ die Ecken des Dreiecks bilden. Die drei Seiten des dreieckigen Rückgrats sind wellenförmig, wobei die Maxima und Minima der Wellen aus der Dreiecksebene herausragen. Die gute Übereinstimmung der neun günstigsten Konformationen

zeigt dennoch eine gewisse Flexibilität des Peptid-Rückgrats, auf welche Linienverbreiterungen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **16** hindeuten.

Die räumliche Anordnung der GlcNAc-Anknüpfungspunkte der vier D-Dab-Seitenketten ist durch die Rückgratstruktur des cyclischen Neoglycopeptids **16** definiert.

Die beiden Perspektiven der Abbildung 38 unten zeigen deutlich, dass die drei GlcNAc-Reste von D-Dab⁴ (rot), D-Dab⁵ (grün) und D-Dab⁷ (magenta) zur selben Seite hin orientiert sind. In der links dargestellten Ansicht ragen diese drei GlcNAc-Reste von der Dreiecksfläche des Peptid-Rückgrats auf den Betrachter zu und in der rechts dargestellten, um 90° verdrehten Ansicht, seitlich vom Betrachter weg. Der an D-Dab² geknüpfte GlcNAc-Rest (blau) ragt von der oberen Dreiecksspitze in beiden Perspektiven nach oben.

Auffallend ist die gegenüber den Rückgrat-Konformationen wesentlich weniger einheitliche Ausrichtung der GlcNAc-Reste. Sie ist auf die fehlende Definition von Torsionswinkeln der D-Dab-Seitenketten zurückzuführen. Darüber hinaus ist auch von Rotationen um die glycosidischen Bindungen und von E/Z-Isomerisierungen der Urethanbindungen auszugehen.

Ein gezielter Austausch von D- gegen L-Valin an Sequenzposition 3 sollte die Tertiärstruktur des Cyclopeptids **16** und damit auch die Orientierung der GlcNAc-Reste drastisch verändern und somit zu einer Beeinflussung der Avidität an WGA führen. Cyclopeptid **61** (Abbildung 39) wurde von J. Beck synthetisiert.

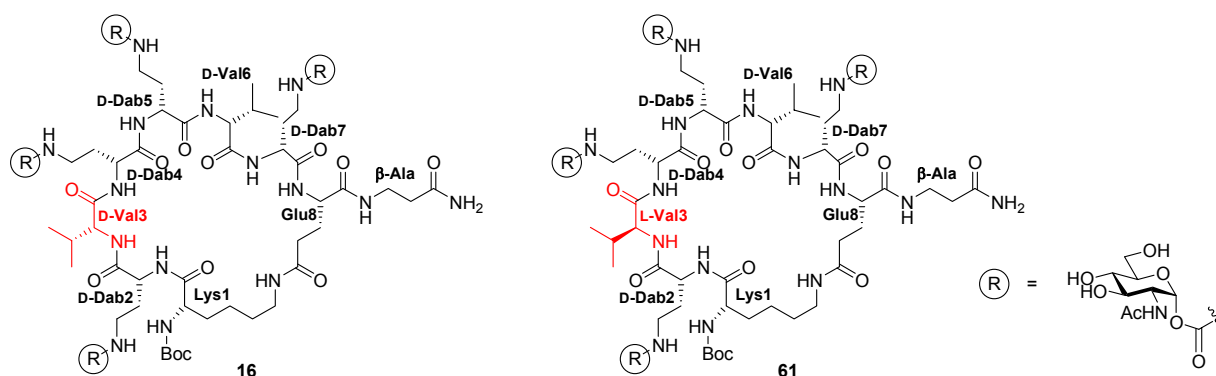


Abbildung 39. Cyclopeptid **16** und sein Epimer **61**.

In die Strukturberechnungen des Neoglycopeptids **61** gingen 35 *distance restraints* und acht *torsion restraints* ein. Tatsächlich führte die Konformationsanalyse des Neoglycopeptids **61** zu einem Struktur-Ensemble, das einer einzigen Vorzugskonformation des Peptid-Rückgrats zugeordnet

werden kann, während im Fall des Neoglycopeptids **16** drei Konformationsfamilien mit den NMR-basierten Strukturinformationen vereinbar waren.

Die meisten NMR-Spektren des cyclischen Neoglycopeptids **61** wurden von 200 μL einer 5 mM Lösung von **61** in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (95/5) bei pH 5 aufgezeichnet, in der zur Konservierung außerdem 0.05 % Natriumazid und zur Referenzierung 500 μM 3-(Trimethylsilyl)-propionsäure-2,2,3,3- d_4 (TSP) enthalten war.

Abbildung 40 zeigt die zwanzig günstigsten Konformere der Struktur des Peptidrückgrates (oben) und (nur 10 Konformere) des Neoglycopeptids **61** (unten). Im unteren Teil der Abbildung sind wiederum zur besseren Übersichtlichkeit die D-Dab-Seitenketten und GlcNAc-Reste nach Sequenzpositionen wie folgt gefärbt: 2: blau, 4: rot, 5: grün, 7: magenta. Wasserstoffatome, Boc- und β -Ala-Reste sowie die Val-Seitenketten sind nicht dargestellt.

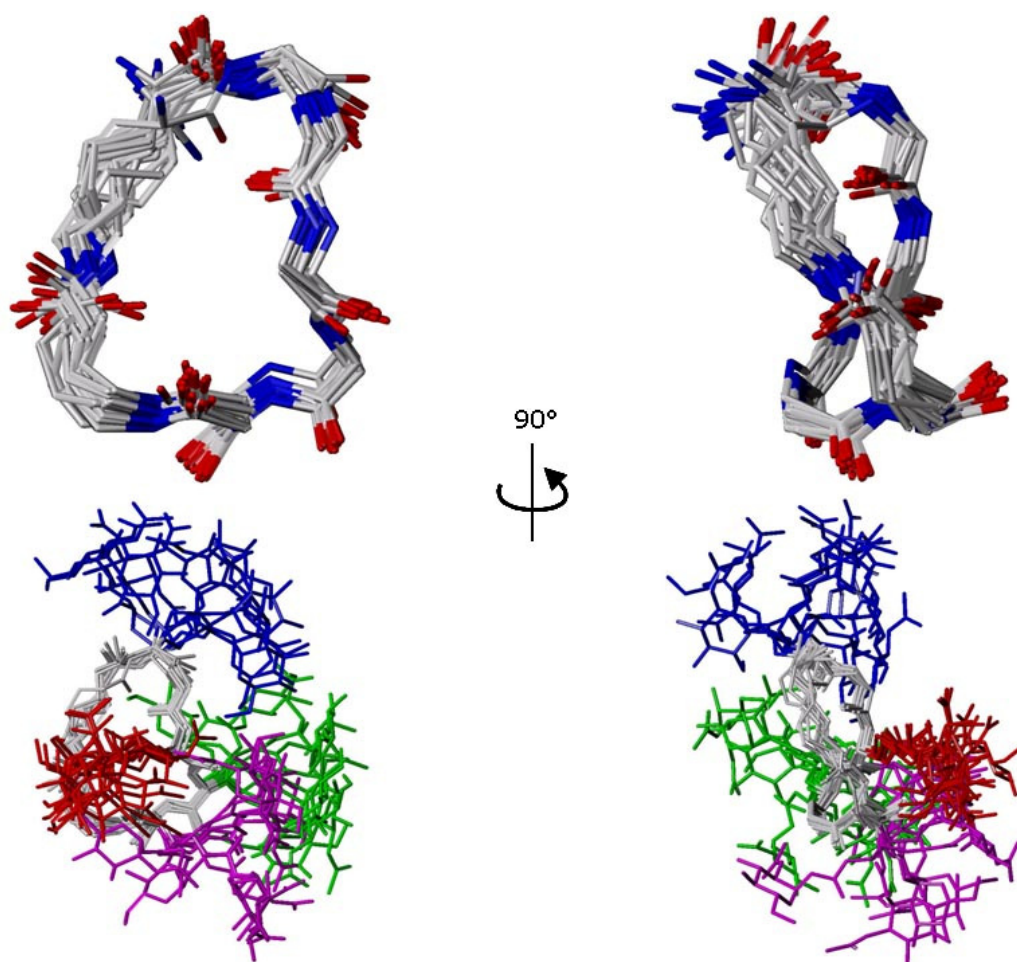


Abbildung 40. Die günstigsten Konformere der Struktur des Peptidrückgrats (oben) und des Neoglycopeptids **61** (unten).

Analog der Konformation des Peptid-Rückgrats von Neoglycopeptid **16** kann auch die Struktur des Peptid-Rückgrats von **61** als Dreieck beschrieben werden. Wie bei **16** bilden Turns in den Bereichen von D-Dab², D-Dab⁵ und Glu⁸ die Ecken der Rückgratstruktur von **61**. Im Gegensatz zur Rückgratstruktur von **16** steht der Turn bei D-Dab⁵ in der Rückgratstruktur von **61** jedoch aus der Dreiecksfläche heraus. Der räumlichen Ausrichtung der GlcNAc-Reste von Cyclopeptid **61** kommt im Hinblick auf die Bindung an WGA besonderes Interesse zu. Die Anordnung der GlcNAc-Anknüpfungspunkte der vier D-Dab-Seitenketten ist durch die klare Definition des Peptid-Rückgrats von **61** vorgegeben. Die Vorzugsorientierungen der GlcNAc-Reste sind gut zu erkennen, obwohl die Variationen der räumlichen Anordnungen der GlcNAc-Reste zwischen den Konformeren wesentlich größer sind als die Variationen zwischen den Konformeren des Peptid-Rückgrats. Die Variationen zwischen den Konformeren hinsichtlich des an D-Dab⁴ gebundenen GlcNAc-Rests sind jedoch wesentlich geringer, als hinsichtlich der übrigen GlcNAc-Reste. Dies kann auf eine besonders hohe strukturelle Definition dieses Strukturbereichs durch NMR-*restraints* zurückzuführen sein.

Zwischen der Konformation des Neoglycopeptids **61** und der dominierenden Strukturfamilie des Neoglycopeptids **16** besteht eine auffallende Ähnlichkeit, die sich auch auf die Präsentation der GlcNAc-Reste erstreckt. Dies könnte ähnliche Bindungsmodi der beiden Strukturen im Komplex mit WGA suggerieren.

Die Hypothese, dass die Bindung beider Strukturen an WGA ähnlich erfolgen könnte, wurde durch die Ergebnisse des kovalent modifizierten ELLAs gestützt. Nach diesem besitzt **61** eine um einen Faktor neun erhöhte WGA-Affinität gegenüber **16**.

Die Beobachtung einer höheren WGA-Affinität von **61** lässt sich möglicherweise durch eine gegenüber **16** verringerte Flexibilität des Peptid-Rückgrats erklären, auf welche, wie bereits erwähnt, Linienverbreiterungen im ¹H-NMR-Spektrum von **16** hindeuten. Dies könnte eine entropiebedingte Benachteiligung der WGA-Bindung von **16** gegenüber der WGA-Bindung von **61** bedingen.

4.5 Kristallstrukturen

Zur weiteren Aufklärung der hohen Bindungsaffinität des cyclischen Neoglycopeptids **16** gegenüber WGA sollten Kristallstrukturen beitragen. Diese Experimente wurden in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe Welte durch D. Schwefel durchgeführt.

In ersten Cokristallisationsexperimenten mit GlcNAc konnte gezeigt werden, dass sieben der acht Bindungsstellen im WGA 1-Dimer durch GlcNAc besetzt sind (B1C2, C1B2, D1A2, A2, B2C1, C2B1 and D2A1). Dies wird in Abbildung 41 ersichtlich, wobei zusätzlich zwei Glycerol-Moleküle zu erkennen sind.

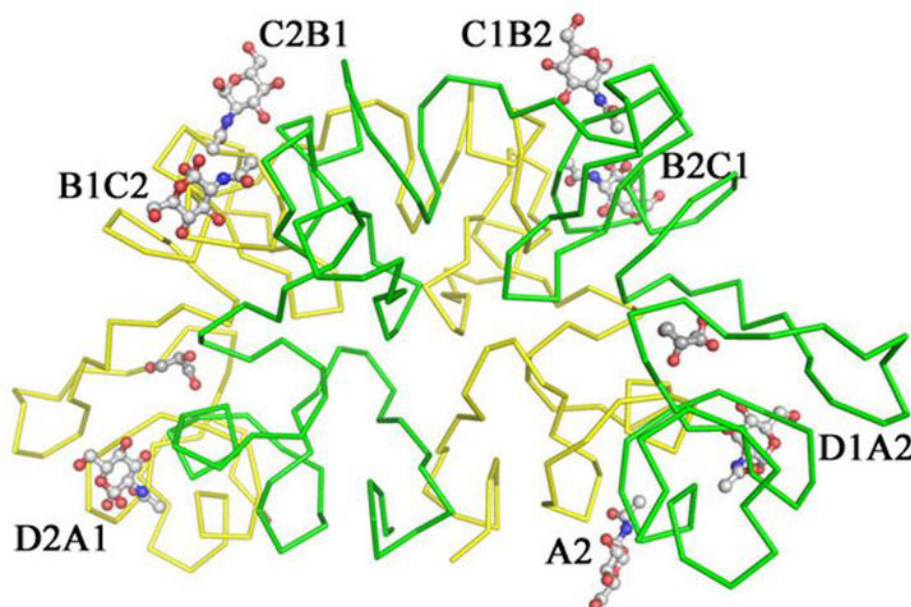


Abbildung 41. Kristallstruktur von WGA 1 mit sieben gebundenen GlcNAc-Molekülen (PDB-Code 2uvo).

Es konnte zudem gezeigt werden, dass bestimmte Bindungsstellen sowohl das α -Anomer als auch das β -Anomer von GlcNAc binden. Interessanterweise sind andere Bindungsstellen spezifisch für eines der beiden Stereoisomere. In den meisten dieser Fälle wird das jeweilige Anomere durch Kristall-Kontakte mit einem benachbartem WGA-Dimer stabilisiert.

Cokristallisationsexperimente mit α -Propylurethan **39** zeigten einen fast identischen Bindungsmodus hinsichtlich der Orientierung und Wasserstoffbrücken des Zuckerrings und der *N*-Acetylgruppe an WGA 1 wie GlcNAc. Alle Bindungsstellen außer A1 wurden besetzt vorgefunden

(PDB-Code 2uwg). Das α -Propylurethan **39** an der Bindungsstelle B1C2 zeigt jedoch eine zusätzliche Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Stickstoffatom des Urethans und Glu 115 der angrenzenden Hevein-Domäne. Bei allen anderen Bindungsstellen wurde diese zusätzliche Bindung nicht vorgefunden.

Abbildung 42 zeigt den Vergleich der Bindungsmodi von GlcNAc mit Urethan **39**. Die komplexen Strukturen wurden überlagert; es sind aber nur die Kohlenhydrat-Moleküle, die an Bindungsstelle B1C2 (links) und C2B1 (rechts) gebunden sind, gezeigt. GlcNAc-Kohlenstoffatome sind türkis gefärbt, Urethan-Kohlenstoffatome sind weiß dargestellt. Es zeigt sich, dass die Zuckerringe sehr gut überlagern. Die zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung von Urethan **39** an Bindungsstelle B1C2 ist grau gestrichelt dargestellt.

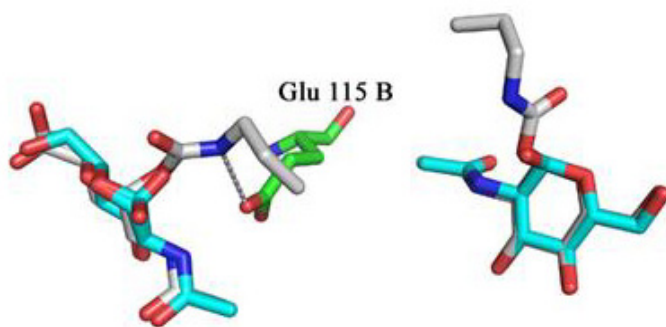


Abbildung 42. Vergleich der WGA-Bindungsmodi von GlcNAc mit Urethan **39**.

Der fast identische Bindungsmodus steht im Einklang mit der Beobachtung, dass α -Propylurethan **39** eine durch den ELLA bestimmte ähnliche Affinität gegenüber WGA-HRP wie GlcNAc zeigt. Auch deutet dies darauf hin, dass nicht bereits das Urethangerüst zu der hohen Bindungsaffinität des Cyclopeptids **16** führt.

Im nächsten Kristallisationsexperiment wurden der bivalente Ligand **46** mit kurzem Linker und WGA 3 kokristallisiert. Das bivalente Derivat **46** mit kurzem Linker ($\beta = 404$) zeigte im Vergleich zum bivalenten Derivat **38** mit langem Linker ($\beta = 80$) eine stark erhöhte Affinität gegenüber WGA-HRP.

Die erhaltene Kristallstruktur (Abbildung 43) zeigt, dass alle acht Kohlenhydrat-Bindungsstellen im WGA 3-Dimer durch vier bivalente Liganden **46** besetzt sind.

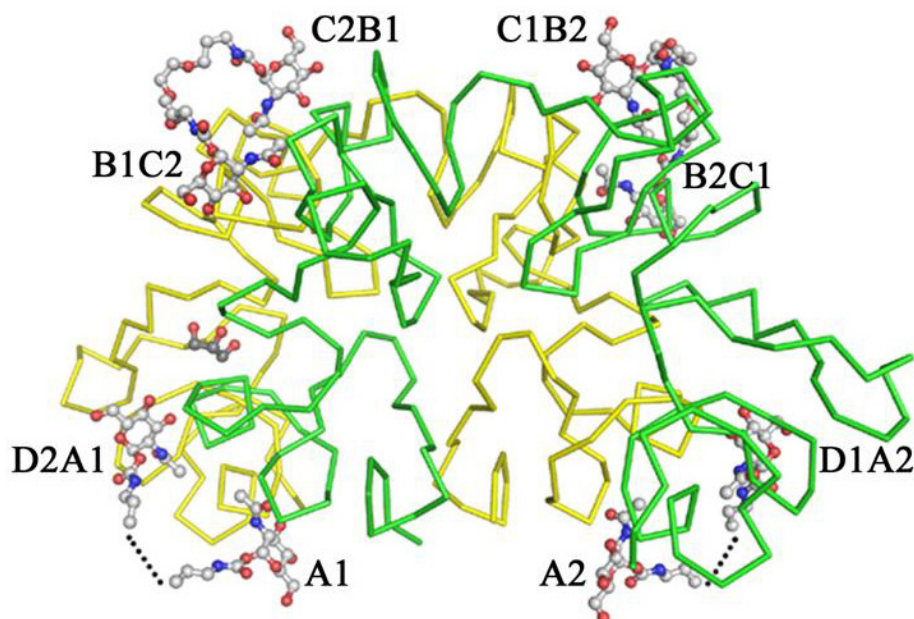


Abbildung 43. Kristallstruktur von WGA 3 mit komplett besetzten Bindungsstellen durch vier bivalente Liganden **46** (PDB-Code 2uwz).

Der Bindungsmodus des Kohlenhydrat-Anteils ist wiederum identisch zu dem von GlcNAc. Die Länge des Linkers zwischen den zwei Zuckerresten eignet sich sehr gut, um den Abstand zweier Bindungsstellen zu überbrücken.

An den primären Bindungsstellenpaaren B1C2 – C2B1 und B2C1 – C1B2 nimmt die komplette Linker-Region eine diskrete Konformation ein, welche von der klar abgegrenzten Elektronendichte abgeleitet werden kann (Abbildung 44).

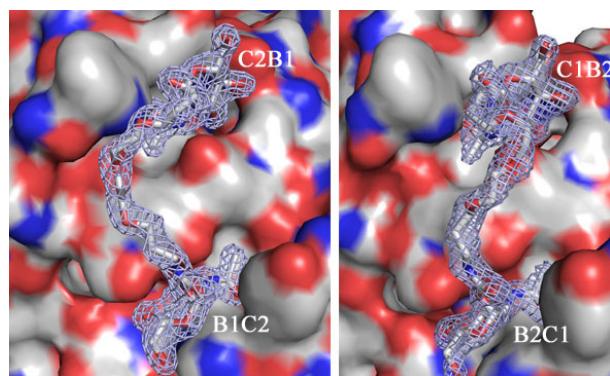


Abbildung 44. Diskrete Konformation des Linker-Anteils des bivalenten Liganden **46**.

Linkerregionen von den Liganden, die sekundäre Bindungsstellen überbrücken (A1 – D2A1, A2 – D1A2) zeigen nur eine geringe Elektronendichte; in diesem Fall wurde der Linkerteil ausgelassen (Abbildung 43, gepunktete Linien). Eine intermolekulare Überbrückung von zwei Bindungsstellen benachbarter WGA-Moleküle kann jedoch ausgeschlossen werden, da die Orientierung der Kristallnachbarn zueinander dies nicht erlaubt. Beim Vergleich der Liganden, die in primären bzw. sekundären Bindungsstellen gebunden sind, ergibt sich somit ein Unterschied in der Flexibilität des Linkerteils.

Es zeigt sich zudem, dass nur der GlcNAc-Teil des bivalenten Liganden **46** im direkten Kontakt mit WGA über Wasserstoffbrücken und π -Wechselwirkungen steht (Abbildung 45).

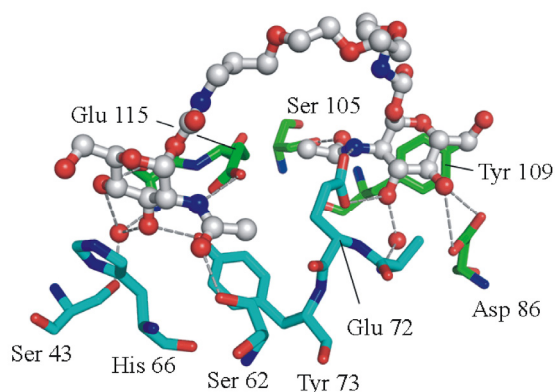


Abbildung 45. Kontakte des bivalenten Liganden **46** mit WGA.

Der Linker-Anteil interagiert nicht mit dem Lectin. Daher kann die hohe Bindungsaffinität des bivalenten Liganden **46** gegenüber WGA mit einer paarweisen Anordnung der GlcNAc-Reste erklärt werden, die sehr gut in die paarweise angeordneten Bindungsstellen des Lectins passen.

Dies ist die erste Kristallstruktur von WGA, bei der alle Bindungsstellen besetzt sind.

Um nun schlussendlich Kristalle von WGA mit dem tetravalenten Cyclopeptid **16** zu erhalten, wurden mit Glutaraldehyd quervernetzte WGA-Kristalle gewählt, die anschließend mit dem Liganden **16** getränkt wurden. Das entsprechende Soaking-Experiment mit nativen WGA-Kristallen schlug fehl, da die Kristalle bei der Zugabe des Liganden zerbrachen und sich auflösten. Die quervernetzten Kristalle waren jedoch für das Soaking-Experiment stabil genug.

Abbildung 46 zeigt die Kristallstruktur des WGA 1-Dimers mit zwei gebundenen tetravalenten Cyclopeptiden **16**. Es wird ersichtlich, dass nur die Zuckerreste an den Seitenketten von D-Dab⁴

und D-Dab⁵ und das D-Dab⁴-D-Dab⁵-Dipeptid-Fragment geordnet sind, wohingegen der Rest des jeweiligen Glycopeptids ungeordnet vorliegt.

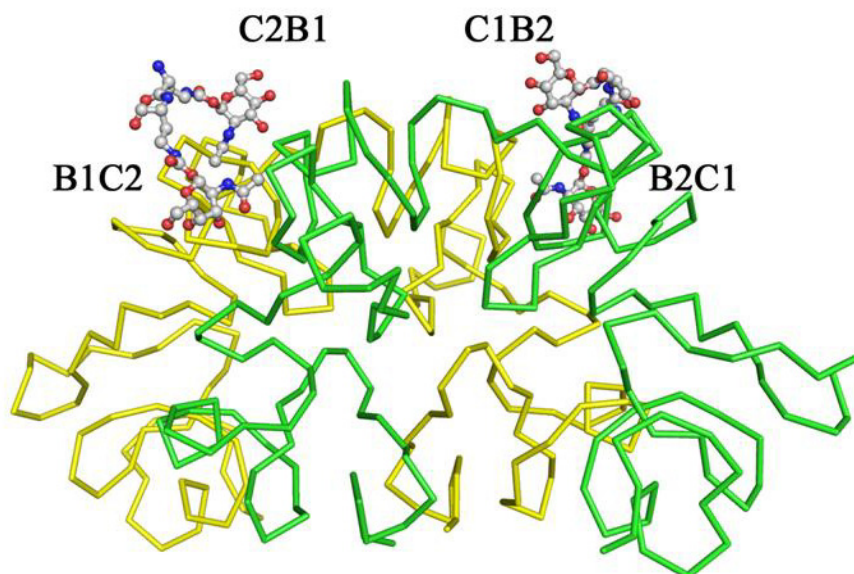


Abbildung 46. Kristallstruktur von WGA 1 mit Cyclopeptid **16**.

Der Bindungsmodus des Kohlenhydrat-Anteils des tetravalenten Liganden **16** ist identisch zu dem von GlcNAc bzw. dem des bivalenten Liganden **46** (Abbildung 47).

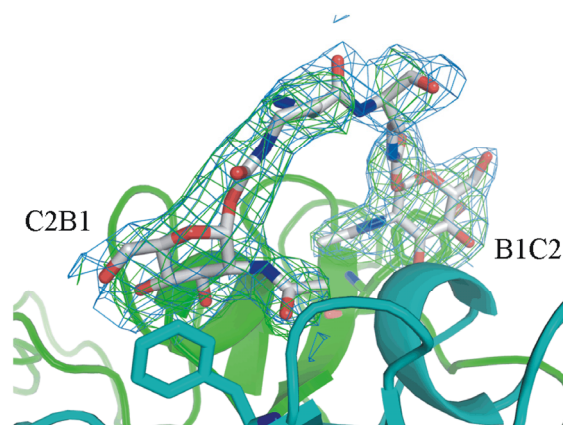


Abbildung 47. Zuckerreste an den Seitenketten von D-Dab⁴ und D-Dab⁵ und das D-Dab⁴-D-Dab⁵-Dipeptid-Fragment, die das Bindungsstellenpaar B1C2 - C2B1 überbrücken.

Es existieren wieder keine Wechselwirkungen zwischen der Linker-Region bzw. des D-Dab⁴-D-Dab⁵-Dipeptid-Fragments mit dem Lectin. Die Bindungsstellenpaare B1C2 – C2B1 und B2C1 – C1B2 werden jeweils durch die Zuckerreste an den Seitenketten von D-Dab⁴ und D-Dab⁵ in einer ähnlichen Weise wie durch den bivalenten Liganden **46** (Abbildung 43) überbrückt.

Beim Betrachten der Überlagerung der entsprechenden Lectin-Ligand-Strukturen wird offensichtlich, dass das D-Dab⁴-D-Dab⁵-Dipeptid-Fragment des Cyclopeptids **16** sogar noch besser in die Bindungsstelle passt als der Linker des bivalenten Liganden **46** (Abbildung 48, rechts). Diese Tatsache trägt sicherlich zu der hohen Affinität des Cyclopeptids bei. Zudem sind zwei zusätzliche Zuckerreste im Liganden **16** vorhanden, die nicht zugänglich sind für weitere Bindungsstellen des quervernetzten WGA-Kristalls. Diese könnten aber in Lösung mit zusätzlichen WGA-Molekülen interagieren und somit zu der hohen Affinität beitragen.

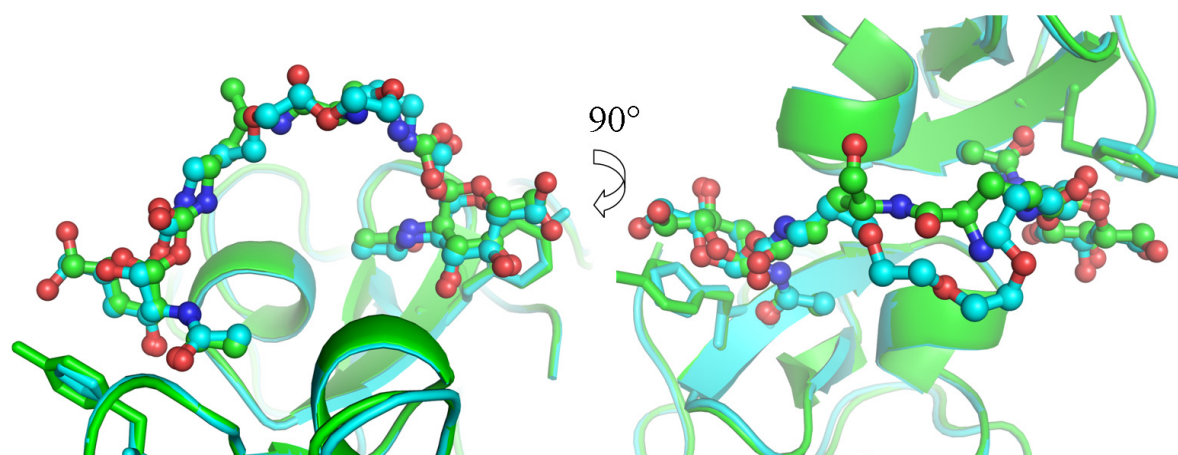


Abbildung 48. Vergleich der Bindungsmodi des bivalenten Liganden **46** (cyan) und des Cyclopeptids **16** (grün).

Abbildung 49 zeigt eine Überlagerung der Strukturen des tetravalenten cyclischen Glycopeptids **16**, die durch NMR bzw. Röntgenkristallographie erhalten wurden. Die Überlagerung zeigt, dass die Rückgratstruktur des Cyclopeptids **16** im Kristall sehr gut mit der Struktur in Lösung übereinstimmt. Die Zuckerreste sind bereits im freien Zustand präorganisiert. Die hohe Affinität des Cyclopeptids **16** gegenüber WGA stammt somit von der richtigen räumlichen Präsentation zweier benachbarter Zuckerreste und der daraus resultierenden perfekten Passform an die Bindungsstellen.

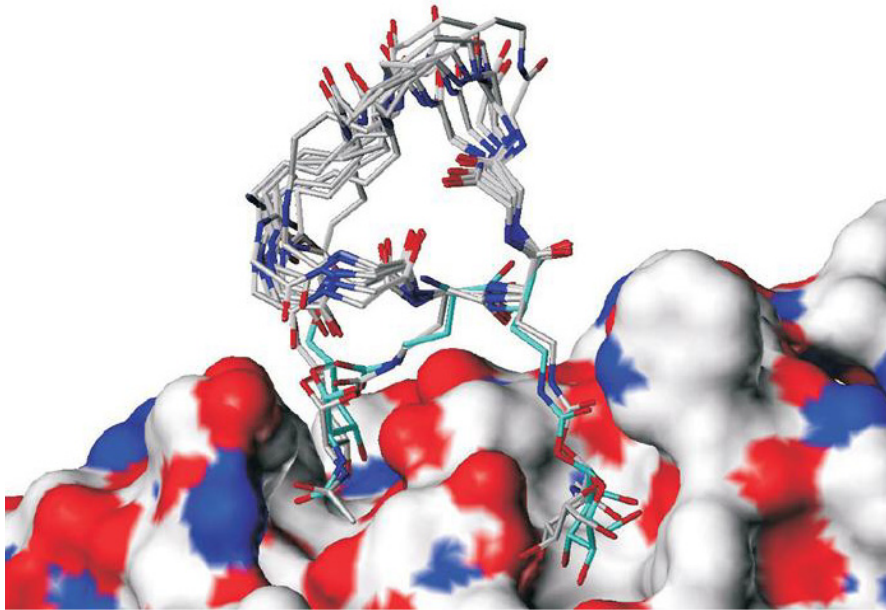


Abbildung 49. Überlagerung der Strukturen, die durch NMR (weiß) bzw. Röntgenkristallographie (cyan) erhalten wurden.

Diese Ergebnisse führten zu der Überlegung, ob die Präorganisation auch in einem entsprechenden tetravalenten linearen Peptid existiert und ob ebenso ein lineares Peptid mit kurzem Linker bereits eine höhere Affinität gegenüber WGA besitzt als ein lineares Peptid mit langem Linker.

4.6 Synthese der tetravalenten linearen Neoglycopeptide 63 und 76

Zur Darstellung von Glycopeptiden müssen geeignete Aminosäurederivate eingesetzt werden. Die Synthese sollte analog zu S. Seeberger^[226] an fester Phase unter Verwendung der Fmoc-Strategie erfolgen. Deshalb musste die Schutzgruppe für die Seitenkette der Diaminosäure D-Dab, die zur Anknüpfung der Zuckerderivate **12** bzw **13** dient, kompatibel zur Fmoc-Chemie sein. Hierfür wurde die Ddv-Schutzgruppe^[252] (Ddv = 1-[4,4-Dimethyl-2,6-dioxo-cyclohexyliden]isovaleryl-) verwendet, die sich leicht durch 4 % Hydrazinhydrat in DMF entfernen lässt. Die Ddv-Schutzgruppe ist eine Weiterentwicklung der Dde-Schutzgruppe (Abbildung 50).^[253]

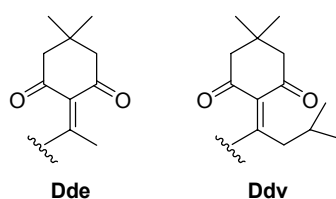


Abbildung 50. Dde- und Ddv-Schutzgruppe.

Bei Verwendung der Dde-Schutzgruppe wurde von Augustyns et al. während einer Fmoc-Abspaltung ein geringfügiger Verlust an Dde beobachtet und es zeigten sich intra- und intermolekulare $N \rightarrow N'$ -Wanderungen der Dde-Gruppe einer Seitenketten- oder α -Aminogruppe zu einer ϵ -Aminofunktion von Lysin.^[254] Durch eine geeignete Substitution an der exocyclischen Doppelbindung konnte die Migrationstendenz reduziert werden.^[252]

Die hydrazinolytische Abspaltung der Ddv-Schutzgruppe kann UV-spektrometrisch verfolgt werden, da sich das Tetrahydroindazolderivat **62** bildet, welches ein Absorptionsmaximum bei 290 nm besitzt (Abbildung 51). Somit ist auch eine quantitative Überprüfung der Abspaltung von Ddv möglich.

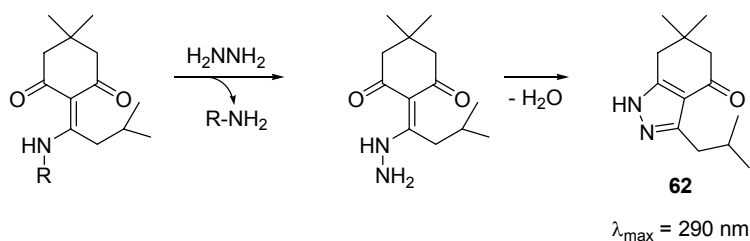


Abbildung 51. Abspaltung der Ddv-Schutzgruppe.

Als feste Phase sollte Fmoc-geschütztes aminofunktionalisiertes TentaGel mit Sieber-Amid-Linker^[255] (Abbildung 52) verwendet werden, der eine milde Abspaltung vom Harz ermöglicht (1 % TFA in Dichlormethan).

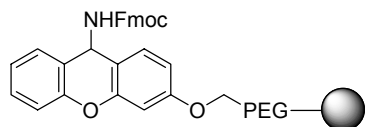


Abbildung 52. Sieber-Amid-Linker.

TentaGel^[256] ist ein Copolymer aus Polyethylenglycol und Polystyrol und besitzt sehr gute Quelleigenschaften, sowohl in organischen Lösungsmitteln als auch in Wasser.

Um zu überprüfen, ob eine Präorganisation der Zuckerreste, die zu der hohen Affinität des tetravalenten Cyclopeptids **16** gegenüber WGA führt, auch in einem entsprechenden tetravalenten linearen Peptid existiert, sollte das lineare Peptid **63** synthetisiert werden (Abbildung 53). Dieses unterscheidet sich von der Sequenz des Cyclopeptids **16** nur in den Aminosäuren, die bei S. Seeberger zur Cyclisierung verwendet wurden.

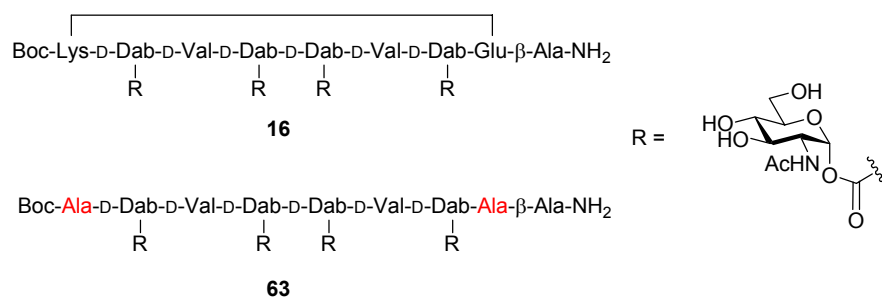
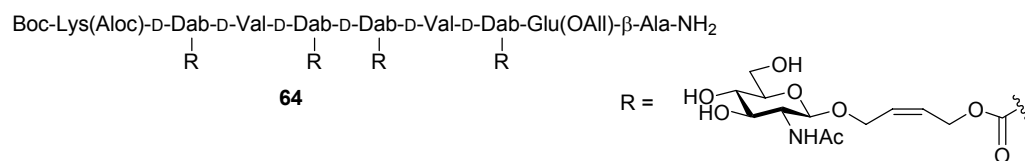


Abbildung 53. Cyclopeptid **16** und das entsprechende lineare Peptid **63**.

S. Seeberger synthetisierte bereits ein analoges lineares Glycopeptid **64**, allerdings mit langem Linker, das die geschützten Aminosäuren Lysin und Glutaminsäure, die sonst zur Cyclisierung benötigt werden, enthielt (Abbildung 54).^[226] Dieses lineare Peptid **64** war aber nur schlecht wasserlöslich und führte bei der Bestimmung der Affinität gegenüber WGA in dem PSM-Assay zu zweifelhaften Resultaten.

Abbildung 54. Lineares Peptid **64**, synthetisiert von S. Seeberger.

Durch das Ersetzen der Aminosäuren Lysin und Glutaminsäure mit ihren unpolaren Seitenketten-Schutzgruppen durch Alanin sollte das Löslichkeitsproblem umgangen werden.

Der Aufbau der Sequenz von Peptid **63** geschah sowohl durch automatisierte (Peptidsynthesizer 433A von Applied Biosystems) als auch durch manuelle Festphasenpeptidsynthese.

Vor der Kupplung der ersten Aminosäure β-Alanin wurde die Beladungsdichte des Sieberamid-funktionalisierten Harzes über Abspaltung der Fmoc-Gruppen durch Behandlung mit 20 % Piperidin in DMF bestimmt. Da das bei der Spaltung entstehende Dibenzofulven bzw. das Piperidinaddukt UV-aktiv ist, kann man durch Bestimmung der UV-Absorption bei definierter Menge an Harz Rückschlüsse auf die Beladungsdichte ziehen. Die Messung wurde beim Absorptionsmaximum der Fluorenyl-Gruppe von 301 nm durchgeführt. Anhand einer zuvor erstellten Eichgerade konnte die Beladung des Sieberamid-funktionalisierten TentaGels für die automatisierte Synthese auf 0.14 mmol/g (Hersteller-Angabe: 0.12 mmol/g) bzw. für die manuelle Synthese auf 0.19 mmol/g (Hersteller-Angabe: 0.2 mmol/g) bestimmt werden.

Die erste Aminosäure wird normalerweise nicht am Synthesizer an das Harz gekuppelt, da dies oftmals in schlechteren Ausbeuten funktioniert als alle weiteren Kupplungen. Das entschützte Harz **65** wurde mit 3.8 eq HBTU, 6 eq HOBt, 4 eq Fmoc-β-Ala-OH und 8 eq DIPEA in NMP über Nacht geschüttelt (Abbildung 55).

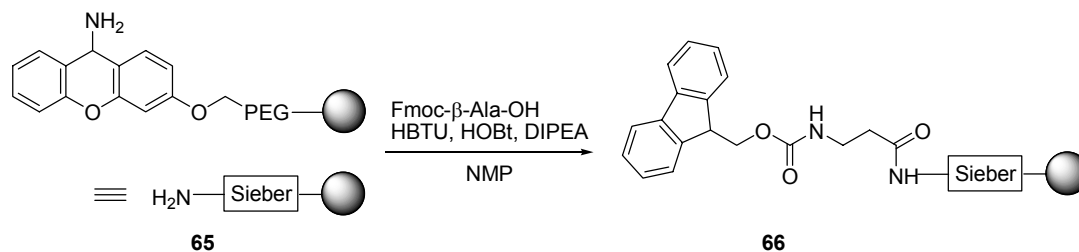


Abbildung 55. Anknüpfung der ersten Aminosäure an die feste Phase.

Nach der Kupplung wurde von Harz **66** ein Kaiser-^[257] und TNBS-Test^[258] auf noch freie Aminogruppen durchgeführt. Diese waren negativ, sodass auf einen Blockierungs-Schritt verzichtet wurde.

Anschließend wurde von den beiden mit Fmoc- β -Ala-beladenen Harzchargen **66** wieder die Beladungsdichte bestimmt. Für die Harzcharge für die weitere automatisierte Synthese ergab sich eine Beladungsdichte von 0.15 mmol/g und für die Harzcharge für die weitere manuelle Synthese wurde 0.20 mmol/g erhalten. Sowohl die bestimmten Beladungsdichten, als auch die negativen Tests auf freie Aminogruppen, ließen auf eine quantitative Kupplung schließen.

Für die weitere Synthese am Synthesizer (Abbildung 56) wurde der 20- μ mol-Ansatz (3-mL-Reaktionsgefäß) gewählt. Dazu wurden 5 eq der jeweiligen Aminosäure in NMP gelöst und die Synthese erfolgte durch die üblich eingesetzten Reagenzien und Lösungsmittel:^[259] Piperidin zur Abspaltung der Fmoc-Gruppe, 0.38 M HBTU/HOBt-Lösung als Kupplungsreagenz, 1.6 M DIPEA als Base, NMP als Lösungsmittel und Dichlormethan zum Waschen.



Abbildung 56. Peptidsynthesizer ABI 433A der Firma Applied Biosystems. Zu sehen sind: Eingespanntes 3-mL-Reaktionsgefäß aus Teflon (oben), Schlitten zum Einsetzen der Aminosäure-Kartuschen (Mitte), Vorratsflaschen mit Reagenzien (unten) und Vorratsflaschen mit Lösungsmitteln (rechts vom Gerät).

Der Synthesizer füllt passend zur gewählten Ansatzgröße die zuzugebende Menge an Kupplungsreagenz (0.250 mL) und Base (0.125 mL) über eine Maßschleife in das Reaktionsgefäß, in dem sich Harz **66** befindet, ein. Die Vollständigkeit der jeweiligen Fmoc-Abspaltung kann über

eine Leitfähigkeitsmesszelle verfolgt werden. Darüber kann man indirekt Rückschlüsse auf die Effizienz der vorhergehenden Kupplung schließen.

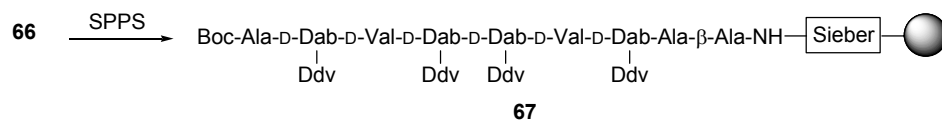


Abbildung 57. Aufbau der Sequenz durch Festphasenpeptidsynthese.

Nach erfolgter Synthese (Abbildung 57) wurde eine kleine Menge Harz **67** mit TFA/TIS/Dichlormethan = 1/1/98 behandelt (Abbildung 58). TIS (Triisopropylsilan) dient hierbei als Fänger der beim Spalten entstehenden langlebigen Kationen.

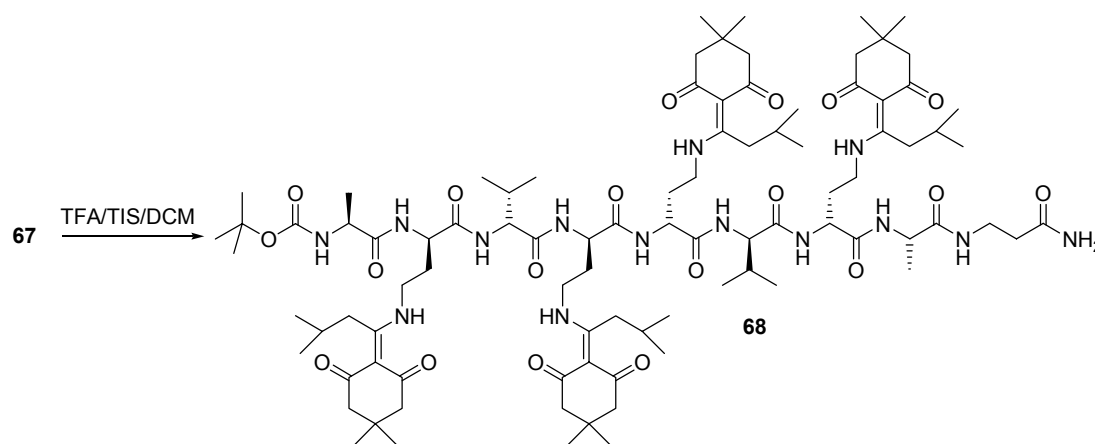


Abbildung 58. Abspaltung von **68** vom Harz **67**.

HPLC-Analyse der Abspaltlösung lieferte das in Abbildung 59 links dargestellte Chromatogramm. Die Massenanalyse mittels MALDI-MS ergab, dass der Peak bei einer Retentionszeit von 14.0 Minuten der Verbindung **68** entspricht.

Die analoge manuelle 0.4-mmol-Synthese von **67** erfolgte durch entsprechende Fmoc-Entschützungs-schritte und anschließende Kupplung für 3-4 h mit 4 eq der jeweiligen Fmoc-geschützten Aminosäure, 3.8 eq HBTU, 6 eq HOBT und 8 eq DIPEA in NMP. Bei Kupplung der teuren Aminosäure Fmoc-D-Dab(Ddv)-OH wurden alle Äquivalente halbiert, dafür die Kupplungszeit verdoppelt.

Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wurde jeweils per UV-Messung der Abspatlösung überprüft und die anschließende Kupplung durch Kaiser- und TNBS-Test auf Vollständigkeit überprüft.

Nach Beendigung der Synthese wurde auch von einer kleinen Menge Harz **67** durch Behandlung mit 1 % TFA abgespalten und die Abspatlösung per HPLC analysiert. Abbildung 59 rechts zeigt das erhaltene Chromatogramm. Die Massenanalyse mittels MALDI-MS ergab, dass der Peak bei einer Retentionszeit von 14.2 Minuten der Verbindung **68** und der kleine Peak bei einer Retentionszeit von 5.6 Minuten der Verbindung **68** ohne Boc-Schutzgruppe entspricht.

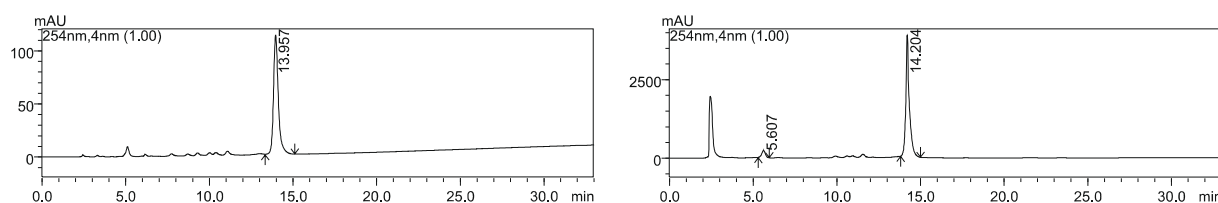


Abbildung 59. HPLC-Diagramme der Abspaltung von Harz **67** nach links) automatisierter und rechts) manueller Synthese. C18 Nucleosil 100-5, ID = 4 mm, Fluss = 0.9 mLmin⁻¹, Detektion bei 254 nm, Gradient: 60-100 % MeCN in 30 min (MeCN und H₂O mit 0.1 % TFA).

Der Vergleich der Chromatogramme zeigt, dass automatisierte und manuelle Synthese gleichermaßen effizient waren.

Zur anschließenden Entfernung der Ddv-Schutzgruppen wurde das Harz **67** mit 4 % Hydrazinhydrat in DMF behandelt (Abbildung 60). Die Abspaltung wurde über die Bildung des Tetrahydroindazolderivats **62** per UV-Messung verfolgt.

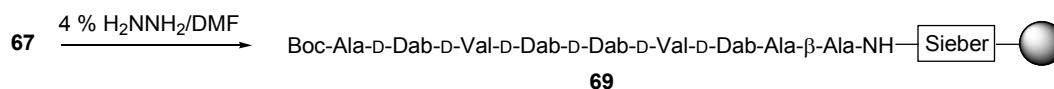
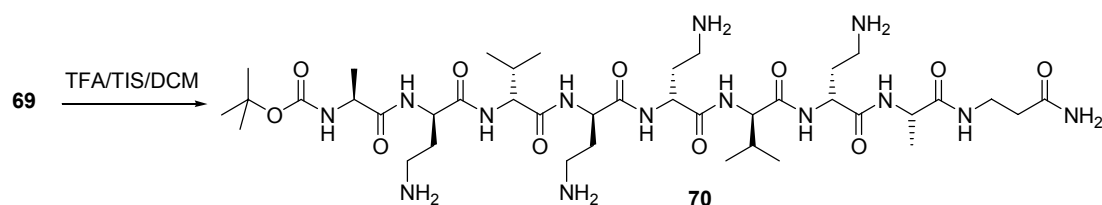


Abbildung 60. Abspaltung der Ddv-Schutzgruppen von **67**.

Nach Beendigung der Ddv-Abspaltung wurde zur Kontrolle von einer kleinen Menge Harz **69** durch Behandlung mit 1 % TFA abgespalten (Abbildung 61).

Abbildung 61. Abspaltung von **70** vom Harz **69**.

Die Analyse der Abspaltung per HPLC lieferte das in Abbildung 62 gezeigte Chromatogramm.

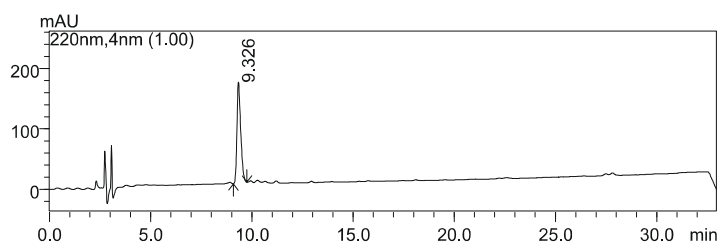
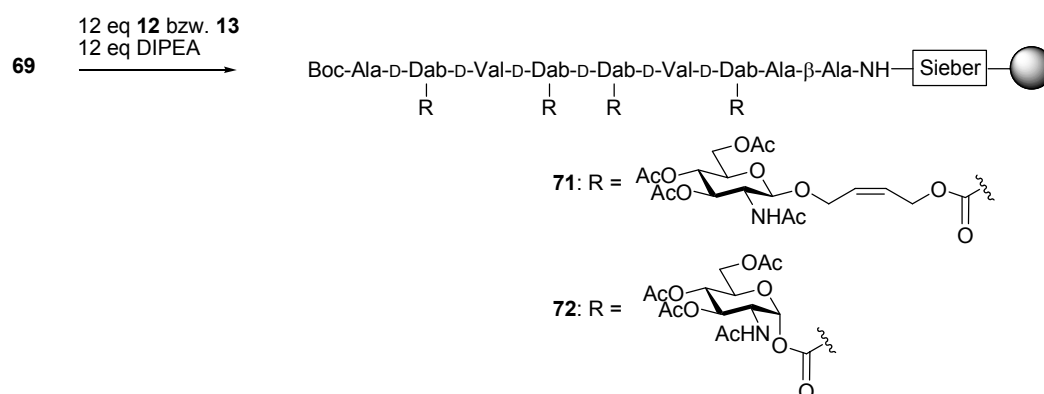


Abbildung 62. HPLC-Diagramm der Abspaltung von **70**. C18 Nucleosil 100-5, ID = 4 mm, Fluss = 0.9 mLmin⁻¹, Detektion bei 220 nm, Gradient: 10-60 % MeCN in 30 min (MeCN und H₂O mit 0.1 % TFA).

Die Massenanalyse mittels MALDI-MS ergab, dass der Peak bei einer Retentionszeit von 9.3 Minuten der Verbindung **70** entspricht.

Zur Darstellung der Glycopeptide **71** bzw. **72** sollten Zuckerderivat **12** bzw. **13** an die freien Aminogruppen der Ddv-Seitenketten von je 200 μmol **69** über eine Urethanbindung angeknüpft werden (Abbildung 63).

Abbildung 63. Anknüpfung der Zuckerderivate **12** bzw. **13** zur Darstellung der Glycopeptide **71** bzw. **72**.

Durch Testabspaltung von Harz **71** bzw. **72** (Abbildung 64) und anschließender HPLC- und Massenanalyse konnte nachgewiesen werden, dass die Durchführung der Kupplung von

Zuckerderivat **12** bzw. **13** in NMP über Nacht analog S. Seeberger^[226] jeweils nur zu geringer Produktbildung führte (Abbildung 65, A bzw. C).

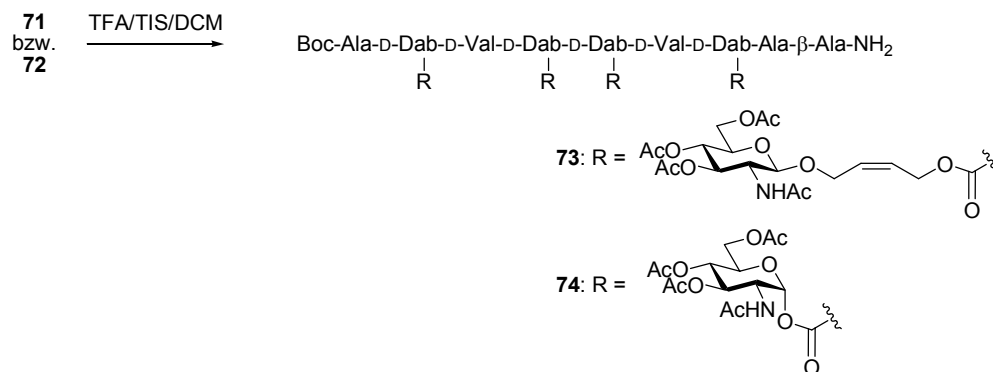


Abbildung 64. Abspaltung von **73** bzw. **74** vom Harz **71** bzw. **72**.

Eine erneute Kupplung über Nacht mit frischen Lösungen konnte zwar das Edukt/Produkt-Verhältnis etwas verbessern, brachte aber dennoch keine befriedigende Kupplungseffizienz. Durch Variation des Lösungsmittels sollte dessen Einfluss auf die Kupplung untersucht werden. Weder Dichlormethan noch Mischungen wie DMF/Dichlormethan = 1:1 oder Dichlormethan/TFE = 3:1 zeigten einen Einfluss auf die Kupplungseffizienz. Auch der Zusatz von DIPEA zum jeweiligen Lösungsmittel(-gemisch) während des Quellens des Harzes hatte keinen Effekt. Zusatz katalytischer Mengen an DMAP gestaltete die Kupplung auch nicht effizienter. Erst der Einsatz eines chaotropen Salzes (0.8 M LiClO₄ in DMF) bzw. von DMSO (25 % DMSO in DMF) (Abbildung 65, B bzw. D) führte zum Erfolg.

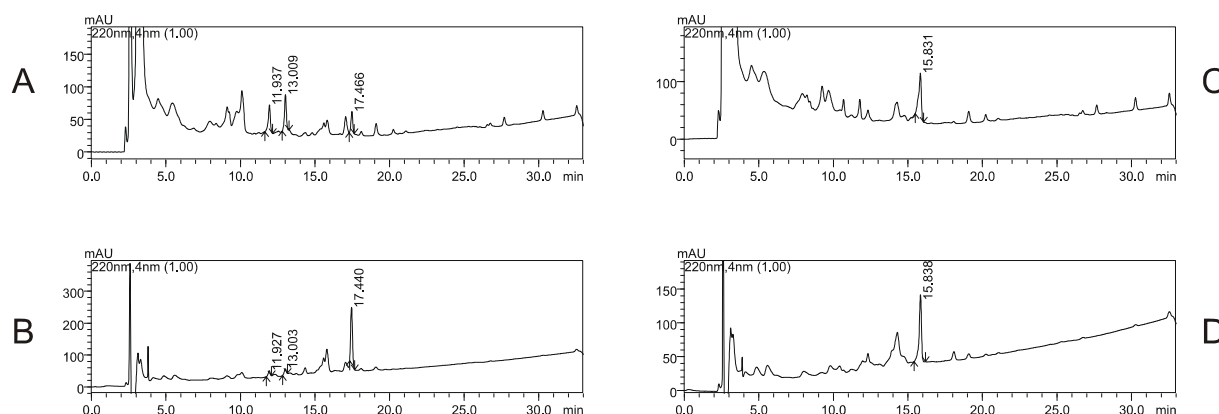


Abbildung 65. HPLC-Diagramme der Abspaltung von **73** (A, B) bzw. **74** (C, D). A) und C) Kupplung über Nacht in DMF. B) und D) Kupplung über Nacht in 25 % DMSO in DMF. C18 Nucleosil 100-5, ID = 4 mm, Fluss = 0.9 mL·min⁻¹, Detektion bei 220 nm, Gradient: 20-80 % MeCN in 30 min (MeCN und H₂O mit 0.1 % TFA).

Ein Vergleich der Chromatogramme zeigt deutlich, dass die Verwendung von DMSO die Kupplungseffizienz verbessert. Die Massenanalyse mittels MALDI-MS ergab, dass bei Abspaltung von **73** (Abbildung 65, A und B) der Peak bei einer Retentionszeit von 17.4 Minuten der Verbindung **73** entspricht. Den Peaks bei Retentionszeiten von 11.9 und 13.0 Minuten konnten Massen zugeordnet werden, bei denen jeweils zwei Zuckerreste von Verbindung **73** fehlen, die Kupplung also noch nicht vollständig war. Im Chromatogramm B ist der Peak bei 17.4 Minuten (Verbindung **73**) der Hauptpeak, die Peaks der unvollständigen Kupplung sind nur noch sehr klein.

Bei der Abspaltung von **74** (Abbildung 65, C und D) entspricht der Peak bei einer Retentionszeit von 15.8 Minuten der Verbindung **74**. Im Chromatogramm D (Kupplung mit 25 % DMSO) ist dieser Peak der Hauptpeak.

Zur Deacetylierung der Glycopeptide wurden zwei Wege beschrritten. Zum einen wurde an fester Phase deacetyliert (Abbildung 66) und zum anderen wurde in Lösung deacetyliert.

Zur Deacetylierung an fester Phase wurde Harz **71** mit 28 mM methanolischer Natriummethanolat-Lösung für vier Stunden geschüttelt. Dann wurde durch Behandlung von Harz **75** mit 1 % TFA das Peptid **76** vom Harz abgespalten und per HPLC und MALDI-MS analysiert.

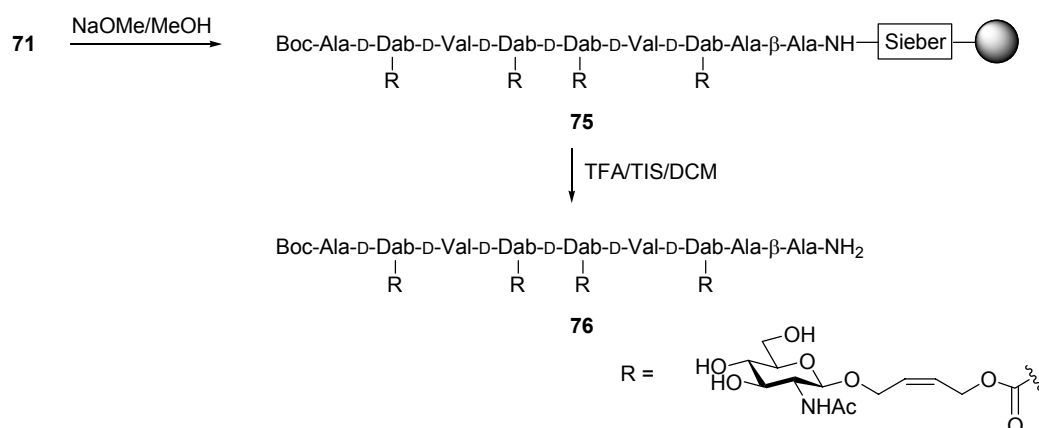


Abbildung 66. Deacetylierung an fester Phase und anschließender Abspaltung von **76**.

Zur Deacetylierung in Lösung wurde zuerst von Harz **71** durch Behandlung mit 1 % TFA das Peptid **73** abgespalten (siehe Abbildung 64). Dann wurde mit 28 mM Natriummethanolat in MeOH/CHCl₃ = 1:1 für vier Stunden gerührt, um Peptid **76** zu erhalten.

Abbildung 67 zeigt die Chromatogramme von Peptid **76**, welches durch Deacetylierung an fester Phase (links) bzw. durch Deacetylierung in Lösung (rechts) erhalten wurde.

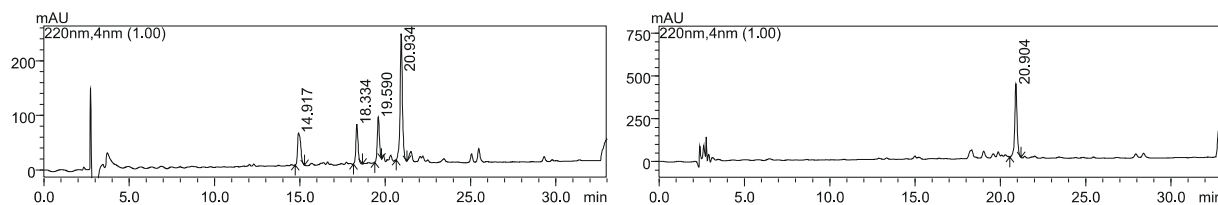


Abbildung 67. HPLC-Diagramme der Deacetylierung zu Peptid **76**. Links) Deacetylierung an fester Phase, rechts) Deacetylierung in Lösung, C18 Nucleosil 100-5, ID = 4 mm, Fluss = 0.9 mLmin⁻¹, Detektion bei 220 nm, Gradient: 5-40 % MeCN in 30 min (MeCN und H₂O mit 0.1 % TFA).

Beim Vergleich der Chromatogramme wird sofort ersichtlich, dass die Deacetylierung in Lösung (rechts) die Methode der Wahl darstellt. Die Massenanalyse mittels MALDI-MS ergab, dass der Peak mit einer Retentionszeit von 20.9 Minuten Peptid **76** entspricht. Der Peak bei 14.9 Minuten entspricht **76** ohne Boc-Schutzgruppe; den Peaks mit Retentionszeiten von 18.3 und 19.6 Minuten konnten Massen zugeordnet werden, bei denen jeweils zwei Zuckerreste mit Linker von Verbindung **76** fehlen. Es ist zwar bekannt, dass entschützte Zuckerreste gegenüber sauren Bedingungen (hier die Abspaltung vom Harz) nicht besonders stabil sind,^[260] warum jedoch auch der Hydroxybutenyloxycarbonyl-Rest abgespalten wurde, konnte nicht erklärt werden.

Mit diesem Ergebnis in der Hand wurde die Deacetylierung zu Peptid **63** in Lösung nach Abspaltung von Harz **72** durchgeführt.

Abbildung 68 zeigt die Chromatogramme von Peptid **76** (oben) bzw. **63** (unten), die durch präparative HPLC aufgereinigt wurden.

Ausgehend von 0.4 mmol Fmoc- β -Ala-Harz **66** wurde die lineare Sequenz **67** aufgebaut. Nach Abspaltung der Ddv-Gruppen wurde die Harzmenge geteilt und jeweils mit 200 μ mol weitergearbeitet. Von Glycopeptid **76** wurden nach Aufreinigung 42 mg erhalten was einer Ausbeute von 10 % entspricht. Von Glycopeptid **63** wurden 39 mg erhalten was ebenso einer Ausbeute von 10 % entspricht. Die angegebenen Ausbeuten geben jedoch nur das untere Limit an, da Harzmengen, die für Testabspaltungen oder Kaiser- und TNBS-Tests entnommen wurden, nicht berücksichtigt sind. Die wahren Ausbeuten sind somit höher.

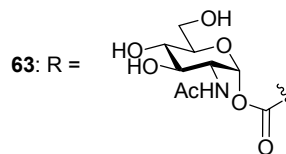
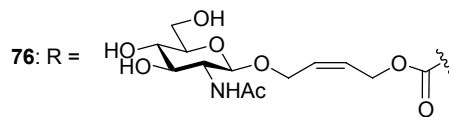
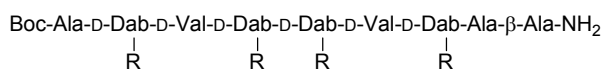
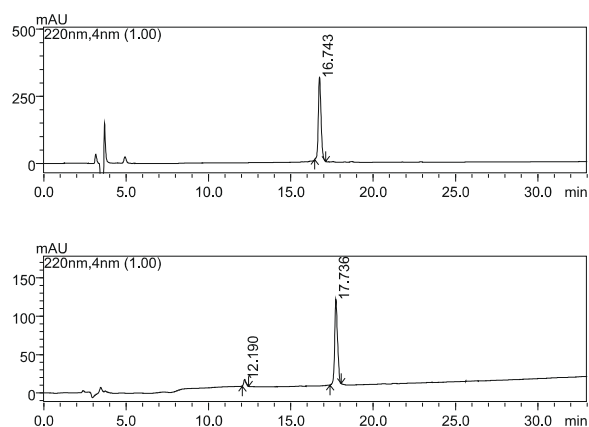


Abbildung 68. HPLC-Diagramme der aufgereinigten Peptide **76** und **63**. Oben) Peptid **76**, C18 Vydac 300-5, ID = 4 mm, Fluss = 0.9 mLmin⁻¹, Detektion bei 220 nm, Gradient: 15-35 % MeCN in 30 min (MeCN und H₂O mit 0.1 % TFA). Unten) Peptid **63**, C18 Nucleosil 100-5, ID = 4 mm, Fluss = 0.9 mLmin⁻¹, Detektion bei 220 nm, Gradient: 5-50 % MeCN in 30 min (MeCN und H₂O mit 0.1 % TFA).

4.7 Bestimmung der Bindungsaffinität der linearen tetravalenten Glycopeptide **63** und **76**

Zur Bestimmung der Bindungsaffinität der beiden linearen tetravalenten Neoglycopeptide **63** und **76** gegenüber WGA wurde der PSM-freie ELLA herangezogen. Es sollte untersucht werden, ob auch im linearen Glycopeptid **63** bereits eine Präorganisation der Zuckerreste vorliegt, die zu einer ähnlichen Affinität wie der des cyclischen Peptids **16** führen sollte. Zudem sollte ermittelt werden, ob das lineare Peptid **63** mit kurzem Linker ebenso bereits eine höhere Affinität als das lineare Peptid **76** mit langem Linker zeigt.

Abbildung 69 zeigt die erhaltenen Bindungskurven im Vergleich zu GlcNAc als Referenz. Es ist sofort ersichtlich, dass das lineare Peptid **63** mit kurzem Linker eine deutlich höhere Affinität gegenüber WGA-HRP besitzt als das entsprechende lineare Peptid **76** mit langem Linker.

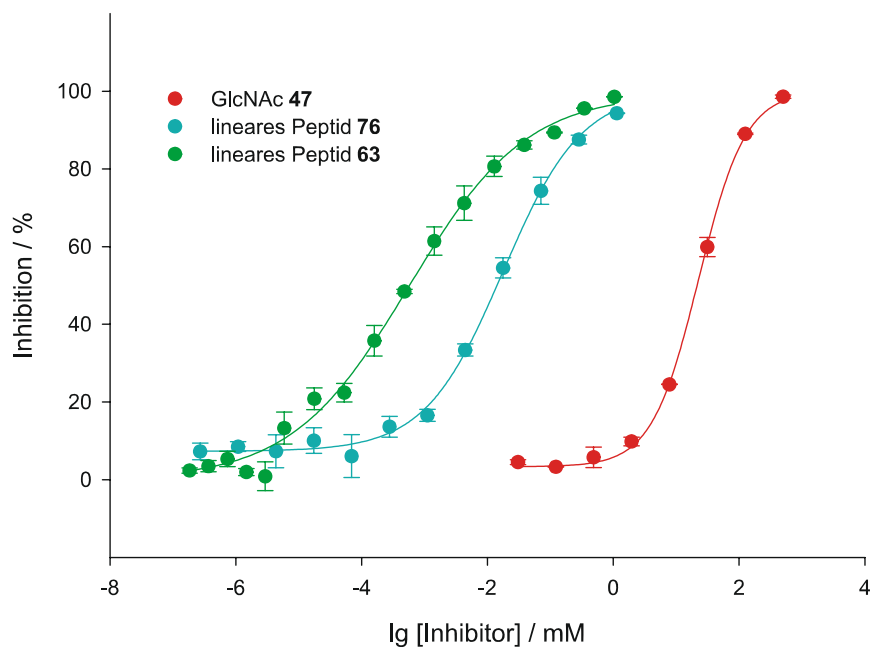
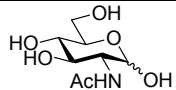
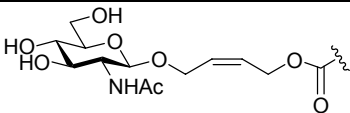


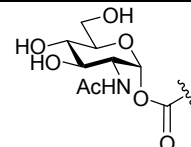
Abbildung 69. Bindungskurven der tetravalenten linearen Peptide **63** und **76** im Vergleich zu GlcNAc.

Tabelle 6 gibt eine Übersicht über die aus den Bindungskurven bestimmten IC_{50} -Werte. Zum Vergleich sind zusätzlich jeweils die Werte der entsprechenden cyclischen Peptide **15** bzw. **16** angegeben.

Tabelle 6. IC₅₀-Werte und relative inhibitorische Potenzen β der linearen Peptide **76** und **63** im Vergleich zu ihren cyclischen Analoga **15** und **16**.

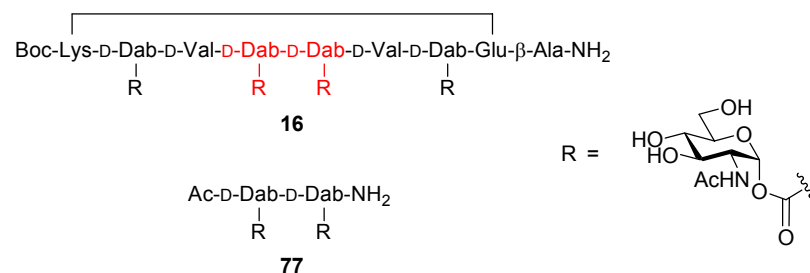
Verbindung	IC ₅₀	β
 47	23000 μ M	1
Boc-Ala-D-Dab-D-Val-D-Dab-D-Dab-D-Val-D-Dab-Ala- β -Ala-NH ₂ R ¹ R ¹ R ¹ R ¹	14 μ M	1640
Boc-Lys-D-Dab-D-Val-D-Dab-D-Dab-D-Val-D-Dab-Glu- β -Ala-NH ₂ R ¹ R ¹ R ¹ R ¹	16 μ M	1440
Boc-Ala-D-Dab-D-Val-D-Dab-D-Dab-D-Val-D-Dab-Ala- β -Ala-NH ₂ R ² R ² R ² R ²	0.6 μ M	38330
Boc-Lys-D-Dab-D-Val-D-Dab-D-Dab-D-Val-D-Dab-Glu- β -Ala-NH ₂ R ² R ² R ² R ²	0.9 μ M	25560

$R^1 =$


$R^2 =$


Überraschenderweise zeigen die linearen Peptide **76** bzw. **63** jeweils gleiche Affinitäten wie ihre cyclischen Analoga **15** bzw. **16**. Dies bedeutet dass auch im linearen Peptid **63** eine Präorganisation der Zuckerreste vorliegt, wodurch die signifikant höhere Affinität erreicht wird. Das lineare Peptidrückgrat scheint also die gleiche Konformation wie das cyclische einzunehmen, um somit ebenso die perfekte Überbrückung von zwei Bindungsstellen zu ermöglichen.

Da die Kristallstruktur von Cyclopeptid **16** mit WGA 1 zeigt, dass nur die Zuckerreste an den Seitenketten von D-Dab⁴ und D-Dab⁵ und das D-Dab⁴-D-Dab⁵-Dipeptid-Fragment geordnet sind, sollte das entsprechende Dipeptid **77** (Abbildung 70) synthetisiert werden, um zu überprüfen, ob bereits dieses Fragment für eine hohe Affinität ausreichend ist.

Abbildung 70. Dipeptid **77**, ein Fragment des Cyclopeptids **16**.

4.8 Synthese des bivalenten Dipeptids 77

Zur Synthese des Dipeptids **77** wurde als feste Phase Fmoc-geschütztes aminofunktionalisiertes Polystyrol mit Rink-Amid-Linker^[261] verwendet (Abbildung 71).

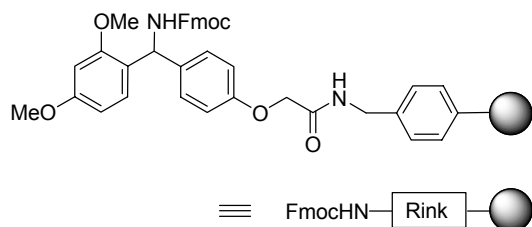
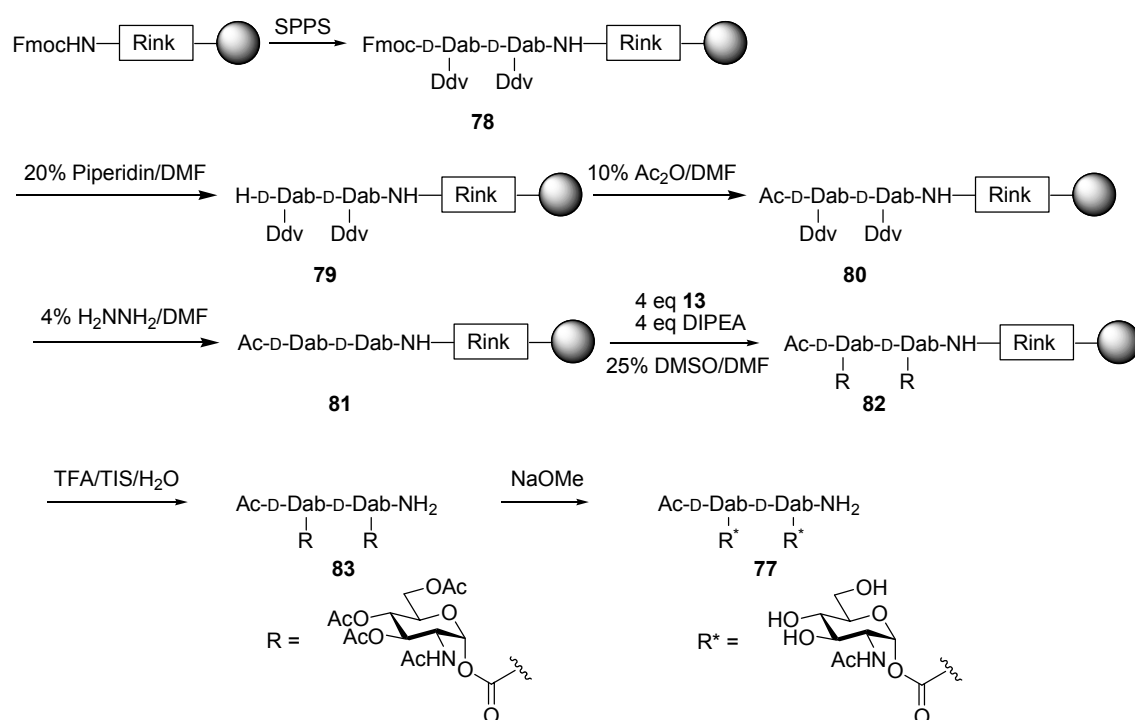


Abbildung 71. Rink-Amid-Linker.

Es wurde auf die Verwendung des teuren TentaGels verzichtet, das zusätzlich gut in Wasser quillt, was aber eigentlich nicht benötigt wird, da in dieser Arbeit keine On-bead-Assays durchgeführt wurden.

Nach Entschützung von 0.18 mmol des Harzes mit Piperidin wurde manuell die erste Aminosäure Fmoc-D-Dab(Ddv)-OH (2 eq) unter Verwendung von 1.9 eq HBTU, 3 eq HOBt und 4 eq DIPEA in NMP angeknüpft. Anschließend wurde die bereits von F. John in unserer Arbeitsgruppe ermittelte Beladungsdichte von 0.6 mmol/g des Rinkamid-funktionalisierten Harzes über Abspaltung der Fmoc-Gruppen verifiziert. Die Kupplung der zweiten Aminosäure Fmoc-D-Dab(Ddv)-OH wurde analog der ersten durchgeführt und man erhielt Harz **78**, bei dem sowohl Kaiser- als auch TNBS-Test negativ ausfielen. Nach Abspaltung der Fmoc-Gruppe durch Verwendung von Piperidin wurde die Harzmenge von **79** geteilt und nur mit der Hälfte (0.09 mmol) weitergearbeitet. Nach Acylierung des N-Terminus mit Essigsäureanhydrid zu **80** wurden die Ddv-Gruppen durch Behandlung mit Hydrazinhydrat abgespalten. Die Abspaltung wurde über die Bildung des Tetrahydroindazolderivats **62** per UV-Messung verfolgt. Anschließend wurde an Harz **81** das α -Glycosylcarbonat **13** unter Verwendung von DMSO erfolgreich angeknüpft, wie durch negative Kaiser- und TNBS-Tests gezeigt werden konnte. Da eine Deacetylierung in Lösung erfolgversprechender ist, wurde von Harz **82** durch eine dreistündige Behandlung mit TFA, die 2.5 % Wasser und 2.5 % TIS enthielt, Verbindung **83** abgespalten. Diese wurde durch Behandlung mit 27 mM Natriummethanolat in MeOH/CHCl₃ = 1:1 zum Glycopeptid **77** umgesetzt (Abbildung 72).

Abbildung 72. Darstellung von **77**.

Das bivalente Dipeptid **77** wurde durch präparative HPLC gereinigt. Abbildung 73 zeigt das Chromatogramm nach Aufreinigung.

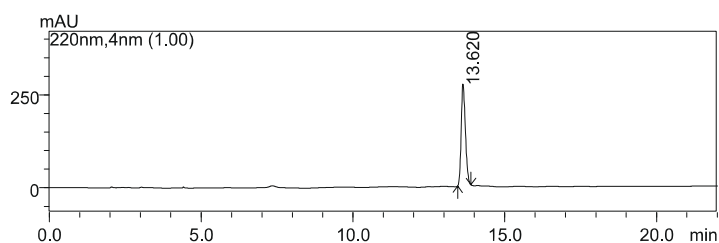


Abbildung 73. HPLC-Diagramm des aufgereinigten Peptids **77**. C18 Eurospher 100-5, ID = 4 mm, Fluss = 0.9 mLmin⁻¹, Detektion bei 220 nm, Gradient: 1-10 % MeCN in 20 min (MeCN und H₂O mit 0.1 % TFA).

Ausgehend von 0.09 mmol Harz **79** wurden 28 mg des gereinigten Peptids **77** erhalten, was einer Ausbeute von 41 % entspricht, wobei wiederum Harzverluste durch Kaiser- bzw. TNBS-Tests nicht berücksichtigt wurden.

4.9 Bestimmung der Bindungsaffinität des bivalenten Dipeptids 77

Zur Bestimmung der Bindungsaffinität des bivalenten Dipeptids **77** gegenüber WGA wurde der in dieser Arbeit etablierte PSM-freie ELLA herangezogen. Es sollte untersucht werden, ob bereits dieses Fragment für eine hohe Affinität ausreichend ist.

Abbildung 74 zeigt die erhaltene Bindungskurve von Verbindung **77** im Vergleich zu GlcNAc als Referenz.

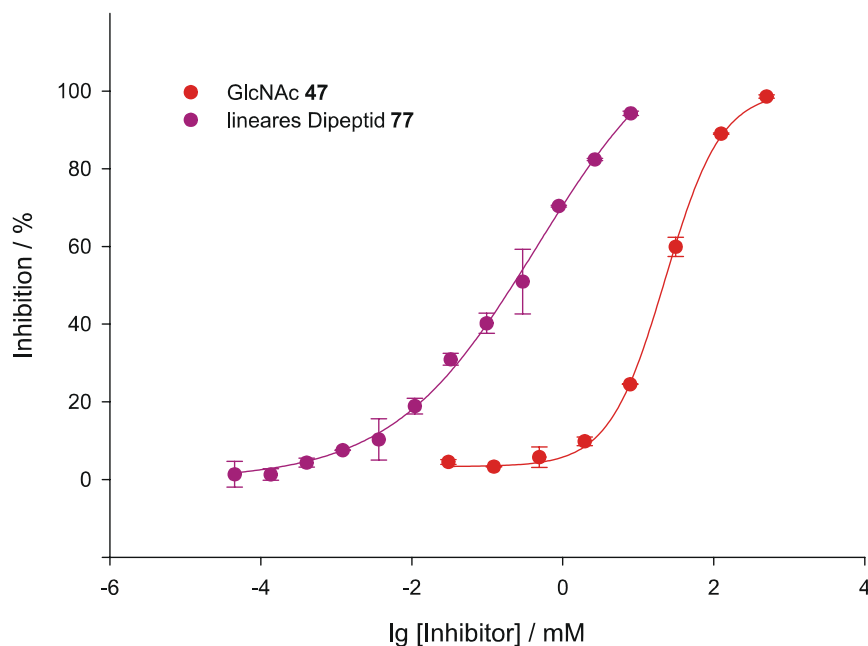


Abbildung 74. Bindungskurve des linearen Dipeptids **77** im Vergleich zu GlcNAc.

Man erkennt, dass das bivalente Dipeptid **77** die Bindung von WGA-HRP an die Oberflächen-immobilisierten Zucker deutlich besser als GlcNAc inhibiert. Aus der Bindungskurve wurde ein IC_{50} -Wert von 0,22 mM ($\beta = 105$) ermittelt. Somit besitzt das Dipeptid eine signifikant schlechtere Affinität gegenüber WGA als das lineare tetravalente Peptid **63** oder das entsprechende tetravalente Cyclopeptid **16**. Das bedeutet entweder, dass die Rückgratstruktur des Dipeptids **77** zu kurz und flexibel ist und somit keine bestimmte Präorganisation der beiden Zuckerreste ermöglicht, oder dass die beiden Zuckerreste an D-Dab² und D-Dab⁷ im linearen Peptid **63** und im Cyclopeptid **16** eine wichtige Rolle spielen. Obwohl diese beiden Zuckerreste samt Rest-Peptid im Kristall mit WGA völlig ungeordnet vorliegen, könnten sie in Lösung weitere WGA-Moleküle binden und somit zu der hohen Affinität beitragen. Auf eine möglicherweise wichtige Rolle der zusätzlichen Zuckerreste an D-Dab² und D-Dab⁷ könnten auch die oben erwähnten Probleme bei

der Kristallisation hinweisen. Bei der Zugabe des Cyclopeptids **16** zu nativen WGA-Kristallen brachen diese und lösten sich auf. Diese Beobachtung könnte darauf deuten, dass ein gebundenes Cyclopeptid tatsächlich an ein weiteres WGA-Molekül bindet und somit die vorherrschende Kristallstruktur zerstört. In diesem Lichte wäre es sehr interessant, die Affinität eines Cyclopeptids und/oder eines linearen Peptids, bei denen die beiden Zuckerreste an D-Dab² und D-Dab⁷ fehlen, zu bestimmen. Es wäre auch möglich zu überprüfen, ob eine schrittweise C- und N-terminale Anknüpfung der Aminosäuren am D-Dab⁴-D-Dab⁵-Dipeptid-Fragment ab einer bestimmten Sequenzlänge zu einer entsprechenden Erhöhung der Affinität führt. Es könnte aber durchaus sein, dass es nicht möglich ist, mit einem bivalenten linearen oder cyclischen Peptid die Affinität des tetravalenten linearen Peptids **63** bzw. des tetravalenten Cyclopeptids **16** zu erreichen.

4.10 Strategie zur Darstellung von Kohlenhydrat-Mikroarrays

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der Fragestellung nachgegangen, wie die Affinität zu Proteinen von der Art der Präsentation der Kohlenhydrate auf einer Chip-Oberfläche, die als multivalente Präsentation aufgefasst werden kann, beeinflusst wird. Wie bereits erwähnt, sollte die Annahme, dass bei einer hohen Zuckerdichte auf der Glasoberfläche eine multivalente Bindung mit einem Lectin, sowohl mit monovalenten, als auch mit multivalenten Liganden, ermöglicht ist, untersucht werden. Bei einer Erniedrigung der Zuckerdichte wird im Fall der monovalenten Verbindung erwartet, dass ab einer bestimmten Dichte der Abstand zwischen zwei Liganden größer ist als der Abstand zwischen den WGA-Bindungsstellen. Dadurch sollte keine „inter“-molekulare Überbrückung der Liganden durch ein WGA-Molekül mehr möglich sein, und die Affinität des Lectins gegenüber der Oberfläche sollte deutlich geringer werden. Im Fall einer multivalenten Verbindung auf der Oberfläche wird dagegen erwartet, dass eine Verringerung der Dichte keine gravierende Änderung der Bindungsaffinität des Lectins gegenüber der Oberfläche bewirkt (siehe Abbildung 20).

Zur Immobilisierung der verschiedenen Verbindungen auf Glasoberflächen wurde auf die bereits in dieser Arbeit etablierte Strategie zur kovalenten Immobilisierung des Zuckerderivats **56** auf Mikrotiterplatten zurückgegriffen. Analog sollten kommerziell erhältliche Amin-modifizierte Glaträger **84** mit PDITC modifiziert werden, um eine Amin-reaktive Oberfläche **85** zu erhalten. Anschließend kann das monovalente Zuckerderivat **56** oder andere multivalente Amin-modifizierte Zuckerderivate über Ausbildung einer Thioharnstoff-Bindung kovalent immobilisiert werden (Abbildung 75).

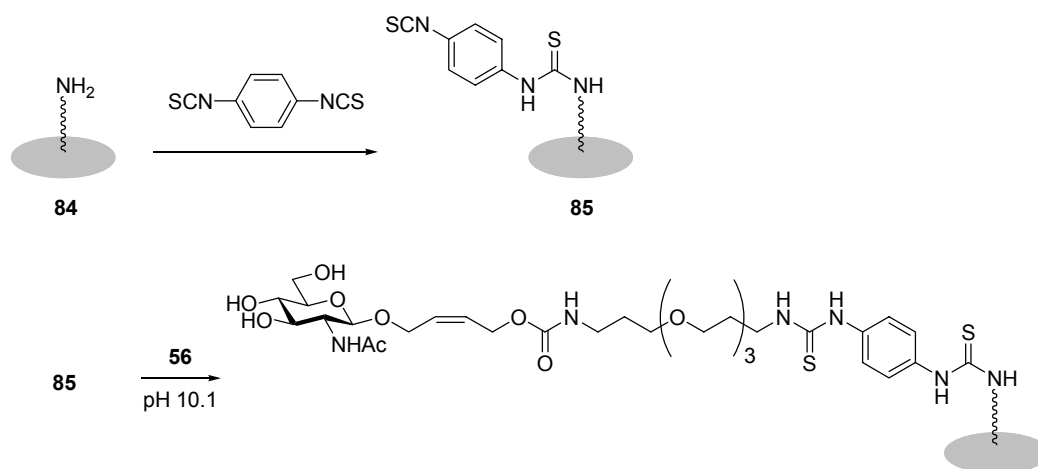


Abbildung 75. Strategie zur Darstellung von Kohlenhydrat-Arrays.

Zur Erzeugung unterschiedlicher Oberflächenbeladungsdichten wurde das Derivat **86** ausgewählt, welches zwar den gleichen Linker und somit auch die Aminogruppe zur kovalenten Immobilisierung wie Verbindung **56** besitzt, dem aber der Zuckerrest fehlt, um an einer Lectin-Erkennung teilzunehmen (Abbildung 76).

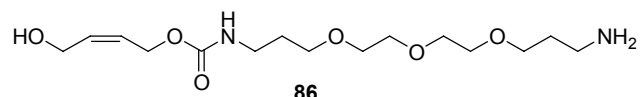


Abbildung 76. Verbindung **86** zur Steuerung der Beladungsdichte.

Somit wird die Beladungsdichte durch Verdünnung mit Derivat **86** direkt gesteuert und man kann den jeweiligen Molenbruch als Parameter für die Oberflächendichte heranziehen. Ein Vorteil dieser Molenbruchmethode gegenüber einer einfachen Verdünnung von Verbindung **56** sollte die Vermeidung ungleichmäßiger Beladung der Oberfläche beispielsweise durch Cluster-Bildung sein. Unter der Voraussetzung, dass die beiden Verbindungen **56** und **86** eine ähnliche Reaktivität gegenüber der Isothiocyanat-modifizierten Oberfläche **85** besitzen, ist somit eine einheitliche Beladung der Glasoberfläche möglich.

4.11 Synthese des Molenbruch-Partners **86**

Zur Darstellung von Verbindung **86** wurde zuerst *cis*-2-Buten-1,4-diol mit Chloroformiat **20** zum monofunktionalisierten Aktivcarbonat **87** umgesetzt (Abbildung 77).

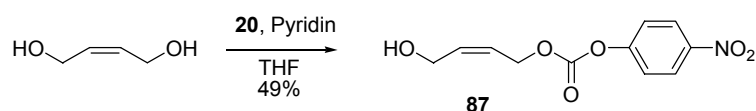


Abbildung 77. Darstellung des Aktivcarbonats **87**.

Bei dieser Reaktion entstand zusätzlich das bifunktionalisierte Nebenprodukt, was die mäßige Ausbeute von 49 % erklärt.

Urethan **89** wurde durch Reaktion von Verbindung **87** mit dem Boc-geschützten Linker **88** synthetisiert (Abbildung 78). Nach säulenchromatographischer Reinigung erhielt man Verbindung **89** als farbloses Öl in 76 % Ausbeute.

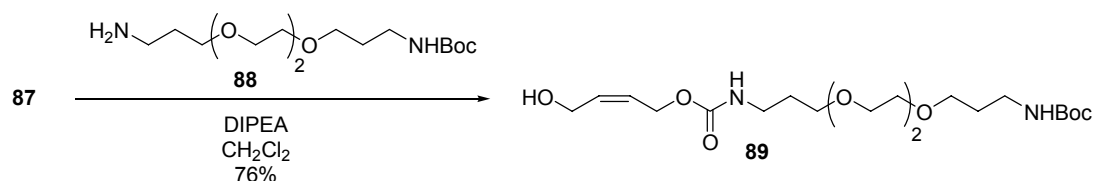


Abbildung 78. Darstellung von **89**.

Abbildung 79 zeigt das Chromatogramm nach säulenchromatographischer Reinigung von Verbindung **89**.

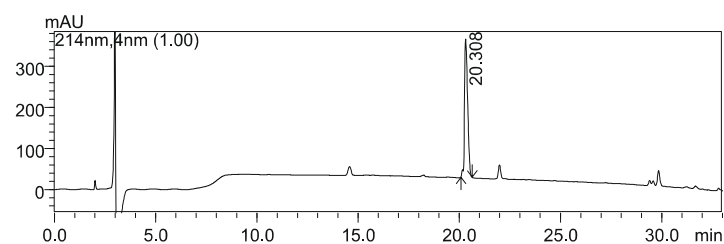


Abbildung 79. HPLC-Diagramm der säulenchromatographisch gereinigten Verbindung **89**. C18 Eurospher 100-5, ID = 4 mm, Fluss = 0.9 mLmin⁻¹, Detektion bei 214 nm, Gradient: 5-90 % MeCN in 30 min (MeCN und H₂O mit 0.1 % HCOOH).

Die anschließende Entfernung der Boc-Schutzgruppe von Verbindung **89** mittels TFA zu Verbindung **86** verlief quantitativ (Abbildung 80).

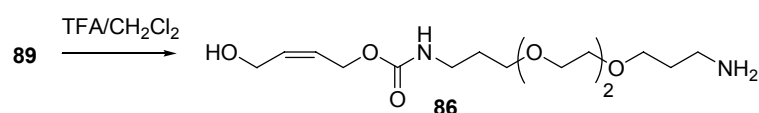
Abbildung 80. Darstellung von **86**.

Abbildung 81 zeigt das Chromatogramm einer HPLC-Analyse von Verbindung **86**. Zur Detektion wurde ein ELS-Detektor eingesetzt, da dieser im Gegensatz zum PDA alle nicht-flüchtigen Substanzen detektiert und die Detektion nicht von der Absorption der zu analysierenden Verbindung abhängt.

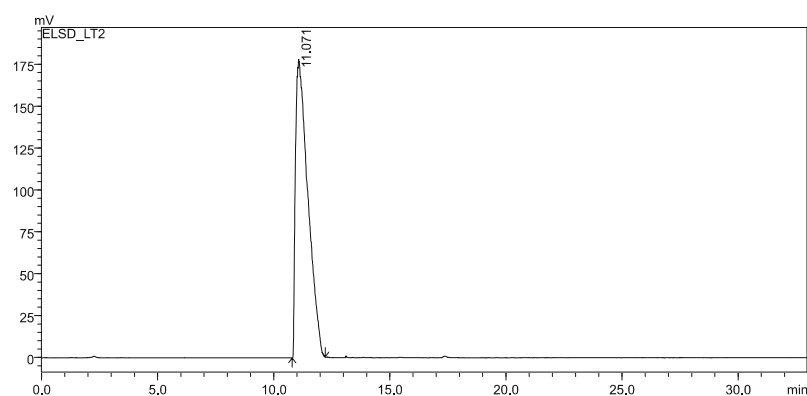


Abbildung 81. HPLC-Diagramm der Verbindung **86**. C18 Eurospher 100-5, ID = 4 mm, Fluss = 0.9 mLmin⁻¹, Detektion per ELS, Gradient: 5-90 % MeCN in 30 min (MeCN und H₂O mit 0.1 % HCOOH).

Aus dem Chromatogramm wird ersichtlich, dass das Edukt **89** mit einer Retentionszeit von 20.3 Minuten nicht mehr vorhanden ist. Bei einer Massenanalyse durch MALDI-MS und ESI-MS wurden ausschließlich Massen von $[\mathbf{86}+\text{H}]^+$, $[\mathbf{86}+\text{Na}]^+$ und $[\mathbf{86}+\text{K}]^+$ gefunden.

Somit gelang die Synthese des Molenbruch-Partners **86** in drei Stufen mit einer befriedigenden Gesamtausbeute von 37 %.

4.12 Synthese des bivalenten Peptids **95** zur kovalenten Immobilisierung

Zur Immobilisierung von Verbindungen unterschiedlicher Valenzen auf die mit PDITC-modifizierte Amin-reaktive Oberfläche **85** muss eine Aminogruppe im Molekül vorhanden sein. Da zur Immobilisierung einer bivalenten Verbindung das glycosylierte Dipeptid **77** verwendet werden sollte, musste eine Aminogruppe eingeführt werden. Der kommerziell erhältliche Linker **90** (Abbildung 82) sollte hierbei nicht nur der Einführung einer Aminogruppe dienen, sondern auch als Abstandshalter zwischen der Glasoberfläche und den Zuckerresten.

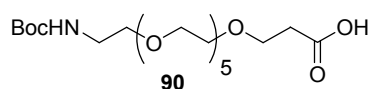


Abbildung 82. Linker **90** zur Einführung einer Aminogruppe.

Die zurückbehaltene Harzmenge von **79** (0.09 mmol) wurde analog einer Peptidkupplung mit dem Linker **90** zu Harz **91** umgesetzt (Abbildung 83). Da nach Kupplung für 4.5 Stunden sowohl Kaiser- als auch TNBS-Test nicht komplett negativ ausfielen, wurde erneut für weitere 3.5 Stunden gekuppelt. Anschließend wurden noch eventuell verbliebene Aminogruppen unter Verwendung von Essigsäureanhydrid in DMF acyliert. Die anschließende Abspaltung der Ddv-Gruppen zu Harz **92** durch Behandlung mit Hydrazinhydrat wurde über die Bildung des Tetrahydroindazolderivats **62** per UV-Messung verfolgt. Danach wurde an Harz **92** das α -Glycosylcarbonat **13** unter Verwendung von DMSO als Lösungsmittelzusatz erfolgreich angeknüpft, wie durch negative Kaiser- und TNBS-Tests gezeigt werden konnte. Die anschließende Behandlung von **93** mit TFA zur Abspaltung vom Harz führt gleichzeitig zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe. Die so erhaltene Verbindung **94** wurde dann unter Anwesenheit von Propylamin mit Natriummethanolat zum Glycopeptid **95** deacetyliert, um eine Wanderung einer Acetylgruppe auf den N-Terminus zu vermeiden.

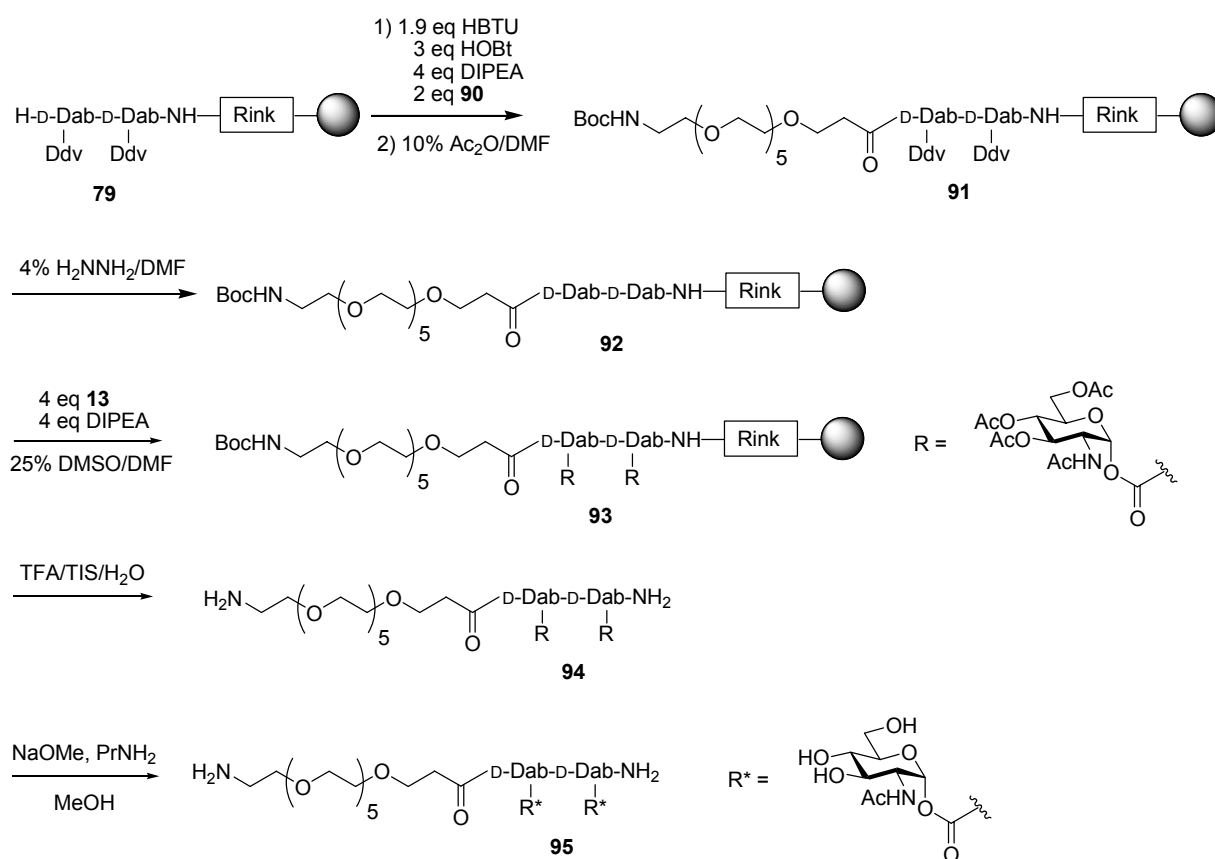
Abbildung 83. Darstellung von **95**.

Abbildung 84 zeigt das Chromatogramm von Verbindung **95** nach erfolgter Aufreinigung durch HPLC.

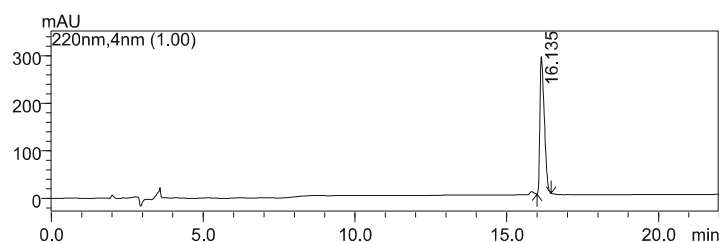


Abbildung 84. HPLC-Diagramm der gereinigten Verbindung **95**. C18 Eurospher 100-5, ID = 4 mm, Fluss = 0.9 mLmin⁻¹, Detektion bei 220 nm, Gradient: 5-20 % MeCN in 20 min (MeCN und H₂O mit 0.1 % TFA).

Ausgehend von 0.09 mmol von Harz **79** konnten 47 mg des gewünschten Produkts **95** erhalten werden, was einer Ausbeute von 45 % (bezogen auf das erhaltene TFA-Salz) entspricht. Bei Bestimmung der Ausbeute wurden Harzverluste durch Kaiser- und TNBS-Tests allerdings nicht berücksichtigt.

4.13 Synthese des tetravalenten Cyclopeptids 108 zur kovalenten Immobilisierung

Zur Immobilisierung eines tetravalenten Moleküls sollte analog Cyclopeptid **16** verwendet werden. Wiederum sollte durch Einführung des Linkers **90** eine Aminogruppe zur kovalenten Immobilisierung sowie ein Abstandshalter eingebaut werden.

Das Cyclopeptid sollte an Sieberamid-TentaGel synthetisiert werden, da dieses Harz durch seine geringe Beladungsdichte „inter“-molekulare Reaktionen vermeiden soll (Pseudo-Verdünnungsprinzip)^[262]. Als Cyclisierungspunkte dienen hierbei analog zu S. Seeberger^[226] die Seitenketten von Lysin und Glutaminsäure. Zur Differenzierung der Cyclisierungspositionen von den Zuckeranknüpfungspositionen sind die Seitenketten von Lysin und Glutaminsäure Allyloxycarbonyl (Aloc)- bzw Allyl-geschützt. Die Aloc- und die Allylschutzgruppe werden unter Pd-Katalyse durch Zugabe des Borankomplexes BH_3HNMe_2 abgespalten.^[263] Unter diesen Abspaltbedingungen ist die Ddv-Schutzgruppe der Zuckeranknüpfungspositionen stabil.

Ausgehend von 1.815 g (0.363 mmol) Fmoc- β -Ala-beladenem Harz **66** wurde manuell durch Fmoc-Entschützungs-schritte und anschließender Kupplung für 3 Stunden mit 4 eq der jeweiligen Fmoc-geschützten Aminosäure, 3.8 eq HBTU, 6 eq HOBT und 8 eq DIPEA in NMP die Sequenz **96** (Abbildung 85) aufgebaut. Bei Kupplung der teuren Aminosäure Fmoc-D-Dab(Ddv)-OH wurden alle Äquivalente halbiert, dafür die Kupplungszeit auf 4.5 Stunden erhöht.

Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wurde jeweils per UV-Messung der Abspaltung überprüft und die anschließende Kupplung durch Kaiser- und TNBS-Test auf Vollständigkeit überprüft.

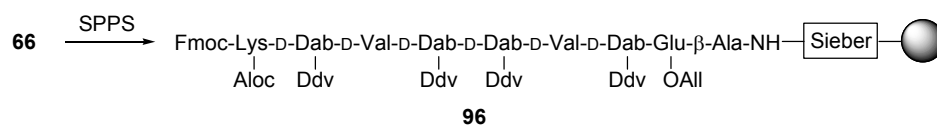


Abbildung 85. Darstellung von **96** durch Festphasenpeptidsynthese.

Nach Beendigung der Synthese wurde von einer kleinen Menge Harz **96** durch Behandlung mit 1 % TFA abgespalten (Abbildung 86) und die Abspaltung per HPLC analysiert.

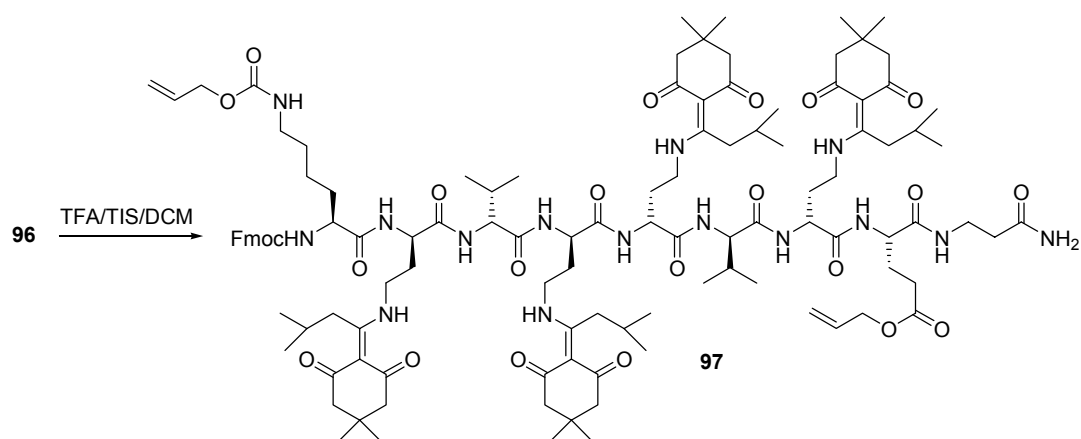
Abbildung 86. Abspaltung von **97** vom Harz **96**.

Abbildung 87 zeigt das erhaltene Chromatogramm. Die Massenanalyse mittels MALDI-MS ergab, dass der Peak bei einer Retentionszeit von 19.4 Minuten der Verbindung **97** entspricht.

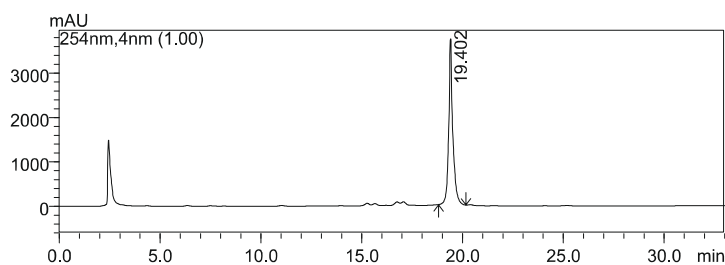
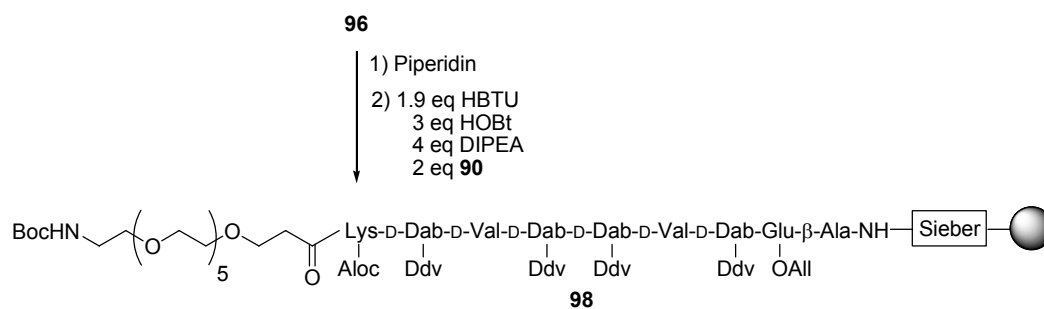


Abbildung 87. HPLC-Diagramm der Verbindung **97**. C18 Nucleosil 100-5, ID = 4 mm, Fluss = 0.9 mLmin⁻¹, Detektion bei 254 nm, Gradient: 60-100 % MeCN in 30 min (MeCN und H₂O mit 0.1 % TFA).

Der Linker **90** wurde nach Abspaltung der Fmoc-Gruppe von Harz **96** unter Verwendung des Kupplungsreagenzes HBTU/HOBt eingeführt (Abbildung 88).

Abbildung 88. Darstellung von **98**.

Es wurde wieder von einer kleinen Menge Harz **98** durch Behandlung mit 1 % TFA abgespalten (Abbildung 89) und die Abspaltungslösung per HPLC analysiert.

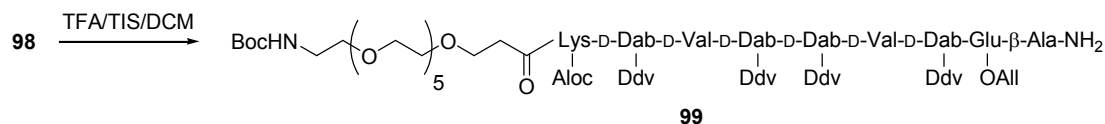


Abbildung 89. Abspaltung von **99** vom Harz **98**.

Das erhaltene Chromatogramm zeigt Abbildung 90.

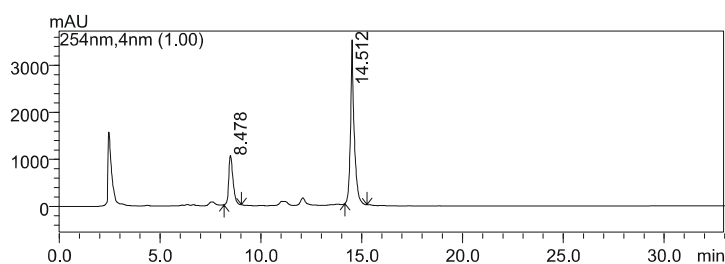


Abbildung 90. HPLC-Diagramm der Verbindung **99**. C18 Nucleosil 100-5, ID = 4 mm, Fluss = 0.9 mLmin⁻¹, Detektion bei 254 nm, Gradient: 60-100 % MeCN in 30 min (MeCN und H₂O mit 0.1 % TFA).

Es ist sofort ersichtlich, dass das Edukt **97** mit einer Retentionszeit von 19.4 Minuten nicht mehr vorhanden ist. Eine Massenanalyse mittels MALDI-MS ergab, dass der Peak bei einer Retentionszeit von 14.5 Minuten der Verbindung **99** und der Peak mit einer Retentionszeit von 8.5 Minuten der Verbindung **99** ohne Boc-Schutzgruppe entspricht.

Die anschließende Abspaltung der Aloc- und Allyl-Schutzgruppen von Harz **98** durch Zugabe von 1.6 eq Pd(PPh₃)₄ und 30 eq Boran-Dimethylamin-Komplex führte zu Harz **100** (Abbildung 91).

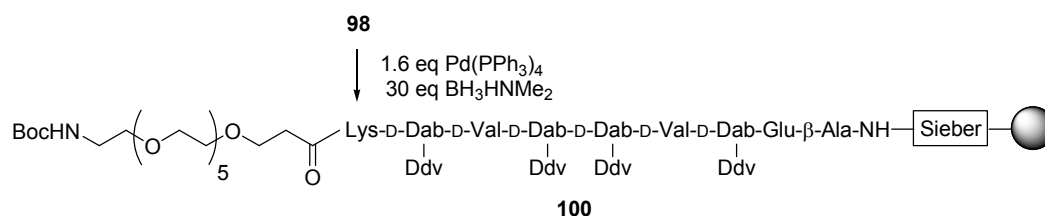


Abbildung 91. Darstellung von **100**.

Es wurde eine Testabspaltung von geringen Mengen Harz **100** durchgeführt (Abbildung 92) und die Abspaltung wurde mittels HPLC analysiert.

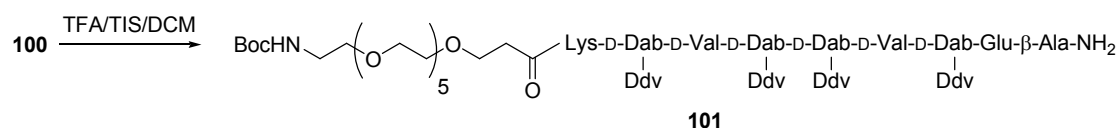


Abbildung 92. Abspaltung von **101** vom Harz **100**.

Abbildung 93 zeigt das erhaltene Chromatogramm.

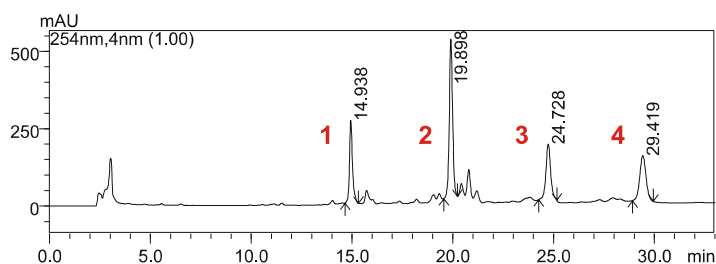


Abbildung 93. HPLC-Diagramm der Verbindung **101**. C18 Nucleosil 100-5, ID = 4 mm, Fluss = 0.9 mLmin⁻¹, Detektion bei 254 nm, Gradient: 30-90 % MeCN in 30 min (MeCN und H₂O mit 0.1 % TFA).

Aus dem einheitlichen Edukt **98** sind mehrere Peaks entstanden. Eine Massenanalyse mittels MALDI-MS ergab jedoch, dass Peak 1 mit einer Retentionszeit von 14.9 Minuten Verbindung **101** ohne Boc-Schutzgruppe entspricht und Peak 2, 3 und 4 mit Retentionszeiten von 19.9, 24.7 bzw. 29.4 Minuten jeweils die gleiche Masse wie Verbindung **101** aufweisen. Bei den Peaks 2, 3 und 4 mit gleicher Masse wurde davon ausgegangen, dass es sich um unterschiedliche Produkt-Addukte handelt, die im MALDI-TOF dissoziieren.

Um diese Vermutung näher zu untersuchen, wurde ein Teil von Harz **100** mit DMF/DMSO = 1:1 und ein anderer Teil mit 0.35 % Morpholin^[226] in DMF/DMSO = 1:1 über Nacht geschüttelt. Anschließend wurde von beiden Ansätzen eine geringe Menge Harz mit 1 % TFA behandelt und die Abspaltung mittels HPLC analysiert.

Abbildung 94 zeigt die erhaltenen Chromatogramme der beiden Wasch-Experimente mit DMF/DMSO = 1:1 (links) und 0.35 % Morpholin in DMF/DMSO = 1:1 (rechts).

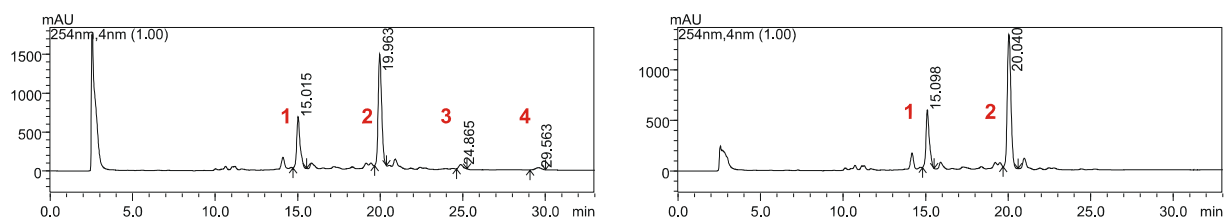


Abbildung 94. HPLC-Diagramme der Verbindung **101** nach Waschen des Harzes **100** über Nacht mit links) DMF/DMSO = 1:1 und rechts) 0.35 % Morpholin in DMF/DMSO = 1:1. C18 Nucleosil 100-5, ID = 4 mm, Fluss = 0.9 mLmin⁻¹, Detektion bei 254 nm, Gradient: 30-90 % MeCN in 30 min (MeCN und H₂O mit 0.1 % TFA).

Es wird sofort ersichtlich, dass Peak 3 und 4 durch Waschen mit DMF/DMSO = 1:1 fast und durch Waschen mit 0.35 % Morpholin in DMF/DMSO = 1:1 komplett verschwunden sind. Dies untermauert die Vermutung, dass es sich bei Peak 3 und 4 um Produkt-Addukte (Katalysator-Produkt- oder Borankomplex-Produkt-Addukte) handeln könnte, die durch längeres Waschen dissoziieren.

Die Cyclisierung der auf Harz **100** immobilisierten Verbindung unter Ausbildung eines Amids über die Seitenketten von Lysin und Glutaminsäure zu Harz **102** erfolgte analog zu S. Seeberger^[226] durch Aktivierung der Säuregruppe mit dem Aktivierungsreagenz HBTU in NMP. Dies führte jedoch zu keiner zufriedenstellenden Cyclisierungseffizienz. HBTU, ein als Uronium- bzw. Guanidiniumsalz vorliegendes Aktivierungsreagenz, kann zudem eine Reaktion mit der Aminogruppe eingehen, die zum Guanidiniumsalz der Aminogruppe führt.^[264] Daher wurden PyBOP^[265] und PyAOP^[266] (Abbildung 95) als Aktivierungsreagenzien, von denen bekannt ist, dass sie nicht mit dem N-Terminus reagieren, untersucht.

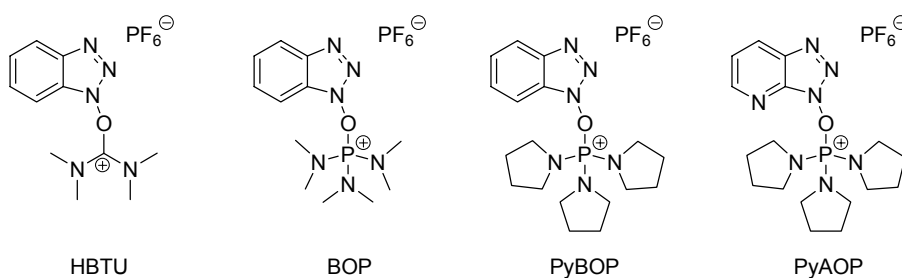


Abbildung 95. Kupplungsreagenzien zur Aktivierung der Säuregruppe (gezeigt ist jeweils die O-Form).

PyBOP ist ein Phosphoniumsalz, das im Gegensatz zu BOP kein cancerogenes HMPT freisetzt. PyAOP besitzt den gleichen Vorteil und ist zudem reaktiver als PyBOP.

Zuerst wurde zur Cyclisierung von der auf Harz **100** immobilisierten Verbindung zu **102** das reaktivere PyAOP unter Zusatz von HOAt eingesetzt (Abbildung 96).

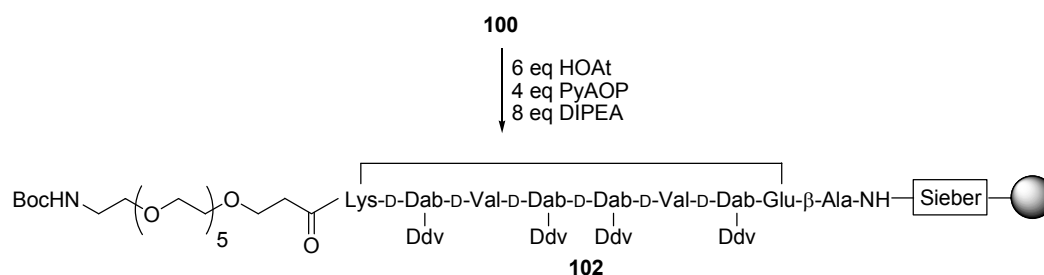


Abbildung 96. Darstellung von **102**.

Nach Cyclisierung über Nacht wurde von einer geringen Menge Harz **102** abgespalten (Abbildung 97) und die Abspaltlösung durch HPLC analysiert (Abbildung 98 links).

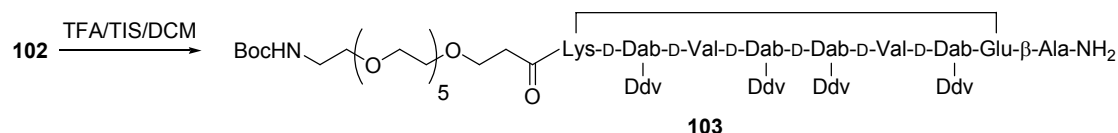


Abbildung 97. Abspaltung von **103** vom Harz **102**.

Da Kaiser- und TNBS-Tests von Harz **102** positiv waren, wurde das Harz weitere zwei Tage mit Cyclisierungslösung behandelt. Eine anschließende Testabspaltung geringer Mengen **103** vom Harz und anschließende Analyse per HPLC lieferte das Chromatogramm rechts in Abbildung 98.

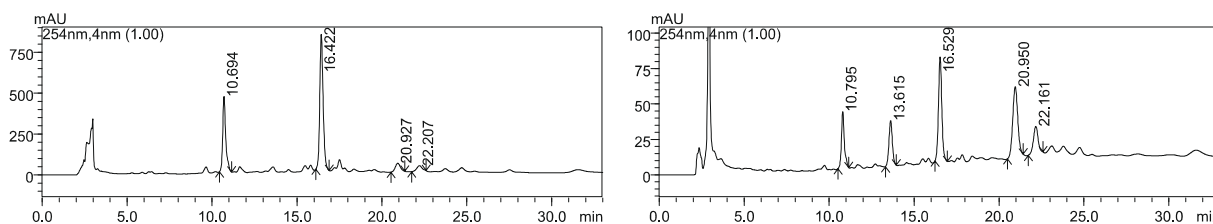


Abbildung 98. HPLC-Diagramm der Cyclisierung zu **103** mit PyAOP/HOAt nach links) Reaktion über Nacht und rechts) Reaktion über drei Tage. C18 Nucleosil 100-5, ID = 4 mm, Fluss = 0.9 mLmin⁻¹, Detektion bei 254 nm, Gradient: 40-90 % MeCN in 30 min (MeCN und H₂O mit 0.1 % TFA).

Die Massenanalyse per MALDI-MS ergab, dass der Peak mit einer Retentionszeit von 10.7 Minuten dem linearen Edukt **101** ohne Boc-Schutzgruppe entspricht. Der Peak mit einer Retentionszeit von 16.4 Minuten enthielt sowohl die Masse des linearen Edukts **101** als auch des cyclischen Produkts **103** ohne Boc-Schutzgruppe. Der Peak mit einer Retentionszeit von 22.2

Minuten entspricht dem gewünschten cyclischen Produkt **103**. Bei der Cyclisierung über Nacht haben sich somit nur geringe Mengen an Produkt gebildet; nach drei Tagen war etwas mehr Produkt vorhanden. Allerdings haben sich zusätzlich Nebenprodukte mit Retentionszeiten von 13.6 und 21.0 Minuten gebildet, deren Massen aber keinen möglichen Verbindungen zugeordnet werden konnten.

Da die Cyclisierung unter Verwendung des reaktiven PyAOP zu keinen befriedigendem Ergebnis führte, wurde auf HBTU zurückgegriffen. Als Lösungsmittel wurde statt NMP jedoch 25 % DMSO in DMF verwendet, welches bereits bei der Anknüpfung der Zuckerreste an die linearen Peptide zum Erfolg führte. Das Harz **100** wurde vor der eigentlichen Cyclisierungsreaktion mit 5 % HOBt, gelöst in 25 % DMSO in DMF, vorbehandelt. Dann wurde mit HOBt/HBTU einmal nur über Nacht und einmal für vier Tage cyclisiert. Nach Testabspaltungen und Analyse mittels HPLC wurden die Chromatogramme in Abbildung 99 erhalten.

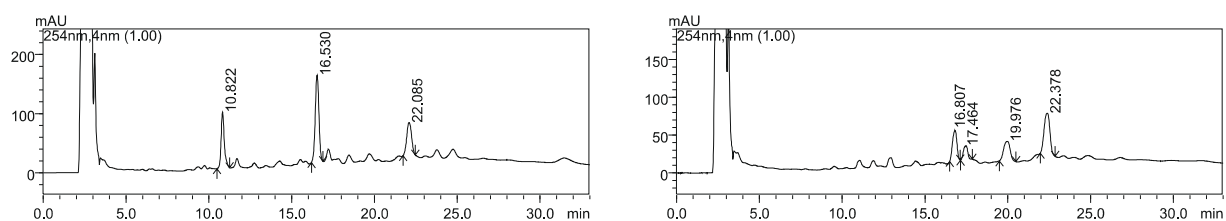


Abbildung 99. HPLC-Diagramme der Cyclisierung zu **103** mit HBTU/HOBt nach links) Reaktion über Nacht und rechts) Reaktion über vier Tage. C18 Nucleosil 100-5, ID = 4 mm, Fluss = 0.9 mLmin⁻¹, Detektion bei 254 nm, Gradient: 40-90 % MeCN in 30 min (MeCN und H₂O mit 0.1 % TFA).

Durch Verwendung von HBTU in 25 % DMSO in DMF ist zwar bereits nach Cyclisierung über Nacht der Produktpeak mit einer Retentionszeit von 22.1 Minuten vorhanden, aber die Kupplungseffizienz war nicht zufriedenstellend. Nach vier Tagen ist der Produktpeak der Hauptpeak, aber es bildeten sich auch Nebenprodukte, die nicht identifiziert werden konnten.

Da die Verwendung von DMSO auch einen positiven Einfluss auf die Cyclisierungseffizienz zu haben schien, wurde die Reaktion durch Aktivierung mit PyBOP in 25 % DMSO in DMF durchgeführt. Auf eine Vorbehandlung des Harzes **102** mit 5 % HOBt wurde verzichtet. Die Cyclisierungsreaktion wurde über einen längeren Zeitraum verfolgt. Nach einer Reaktionszeit von vier Tagen war der Kaiser-Test nicht mehr positiv, und es wurde eine geringe Menge **103** vom Harz abgespalten und durch HPLC analysiert. Abbildung 100 zeigt das erhaltene Chromatogramm.

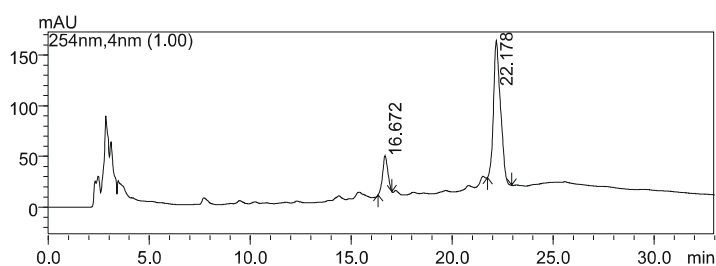
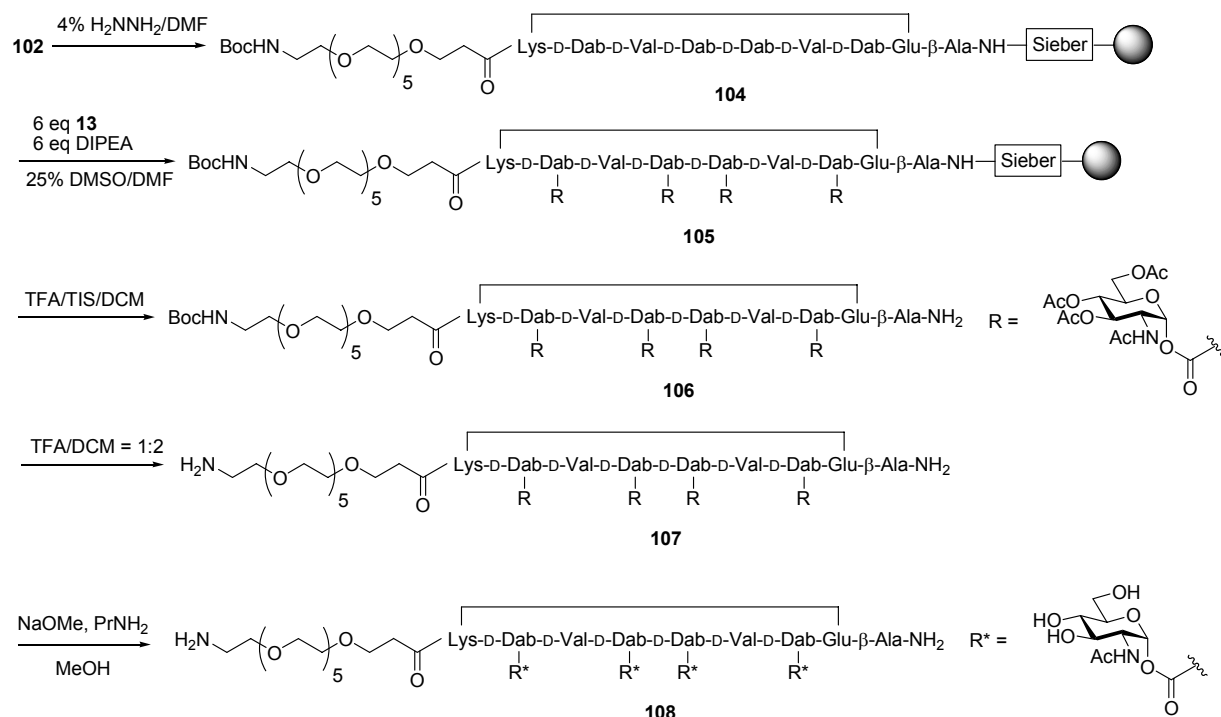


Abbildung 100. HPLC-Diagramm der Cyclisierung zu **103** mit PyBOP/HOBt nach Reaktion über vier Tage. C18 Nucleosil 100-5, ID = 4 mm, Fluss = 0.9 mLmin⁻¹, Detektion bei 254 nm, Gradient: 40-90 % MeCN in 30 min (MeCN und H₂O mit 0.1 % TFA).

Die Massenanalyse ergab, dass der Peak mit einer Retentionszeit von 16.7 Minuten nur noch der Masse des cyclischen Produkts **103** ohne Boc-Schutzgruppe entspricht. Die Masse des linearen Edukts **101** konnte nicht mehr detektiert werden.

Die Cyclisierung konnte also erfolgreich durch Verwendung von PyBOP in 25 % DMSO in DMF durchgeführt werden. Zwar ist die Reaktionsdauer mit vier Tagen sehr lang, aber durch die Verwendung von PyBOP besteht keine Gefahr der Nebenreaktion zum Guanidinium-blockierten Amin.

Die anschließende Abspaltung der Ddv-Gruppen zu Harz **104** durch Behandlung mit Hydrazinhydrat wurde über die Bildung des Tetrahydroindazolderivats **62** per UV-Messung verfolgt (Abbildung 101). Danach wurde an Harz **104** das α -Glycosylcarbonat **13** unter Verwendung von DMSO als Lösungsmittelzusatz erfolgreich angeknüpft, wie durch negative Kaiser- und TNBS-Tests gezeigt werden konnte. Die anschließende Behandlung mit 1 % TFA zur Abspaltung vom Harz **105** führte zu Verbindung **106**. Zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe wurde Verbindung **106** mit TFA/DCM = 1:2 behandelt und Produkt **107** wurde mit *tert*-Butylmethylether ausgefällt. Die anschließende Deacetylierung zum Glycopeptid **108** wurde in Anwesenheit von Propylamin mit Natriummethanolat durchgeführt, um eine Wanderung einer Acetylgruppe auf den N-Terminus zu vermeiden.

Abbildung 101. Darstellung von **108**.

Eine alternative Syntheseroute bestand in der Deacetylierung von Verbindung **106** zu Verbindung **109** und der anschließenden Abspaltung der Boc-Schutzgruppe zu Verbindung **108**, was ebenfalls erfolgreich durchgeführt wurde (Abbildung 102). Im HPLC-Diagramm nach der Boc-Abspaltung wurde nur ein Peak erhalten; die Massenanalyse ergab, dass dieser Peak die Masse des gewünschten Produkts **108** aufweist. Die anfänglichen Bedenken betreffend der Stabilität der glycosidischen Bindung bereits entschützter Zuckerreste unter den sauren Bedingungen zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe erwiesen sich in diesem Fall als unbegründet.

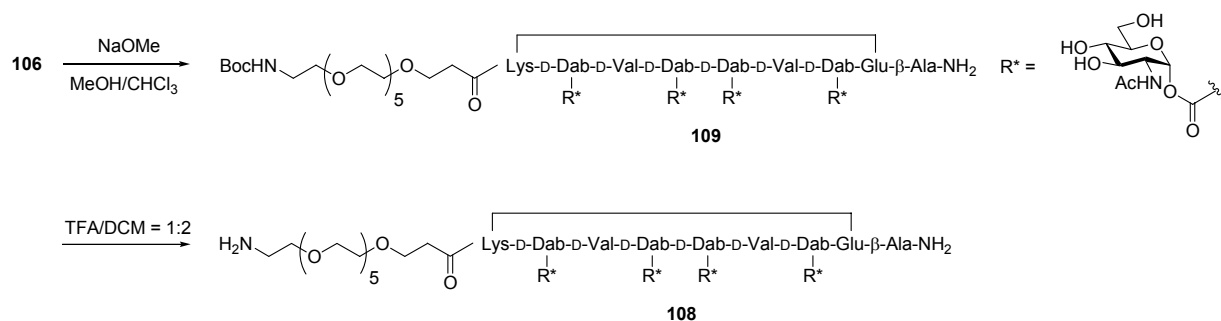
Abbildung 102. Alternative Darstellung von **108**.

Abbildung 103 zeigt das Chromatogramm des cyclischen Glycopeptids **108** nach Aufreinigung mittels präparativer HPLC.

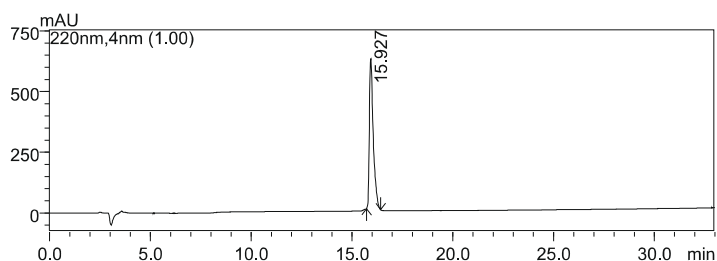


Abbildung 103. HPLC-Diagramm des cyclischen Glycopeptids **108** nach Aufreinigung. C18 Nucleosil 100-5, ID = 4 mm, Fluss = 0.9 mL \cdot min $^{-1}$, Detektion bei 220 nm, Gradient: 5-50 % MeCN in 30 min (MeCN und H₂O mit 0.1 % TFA).

Eine Bestimmung der Ausbeute ist in diesem Fall nur schlecht möglich, da oft Harzmengen für die unterschiedlichen Experimente entnommen wurden. So erhielt man bei Verwendung von 880 mg Harz **102**, was bei einer Beladungsdichte von 0.15 mmol/g etwa 0.13 mmol entspricht, 6 mg des gereinigten cyclischen Glycopeptids **108**, was einer Ausbeute von mindestens 2 % (bezogen auf das TFA-Salz) gleichkommt.

4.14 Chipexperimente

Zur Untersuchung, wie die räumliche Präsentation der Kohlenhydrate auf der Chipoberfläche die Affinität zu Lectinen beeinflusst, sollten die monovalente Verbindung **56**, das bivalente Dipeptid **95** und das tetravalente cyclische Peptid **108** jeweils in unterschiedlichen Oberflächendichten kovalent auf modifizierten Glaschips immobilisiert werden. Zur Erzeugung unterschiedlicher Beladungsdichten sollte die jeweilige Kohlenhydrat-Lösung durch Zugabe des Amin-modifizierten Derivats **86** verdünnt werden. Durch Zugabe von fluoreszenzmarkiertem Lectin (WGA-Rhodamin-Konjugat) und anschließender Messung der Fluoreszenzintensität sollte die Bindung des Lectins an die in unterschiedlichen Oberflächendichten immobilisierten Verbindungen **56**, **95** bzw. **108** untersucht werden. Für die Immobilisierung der Verbindungen **56**, **95** und **108** sollten jeweils gleiche Konzentrationen der Lösungen gewählt werden. Somit besitzen die Lösungen der drei zu immobilisierenden Verbindungen die gleiche Anzahl an Aminogruppen zur kovalenten Anknüpfung, was gleichzeitig bedeutet, dass die Anzahl an Zuckerresten auf der Oberfläche unterschiedlich ist (Abbildung 104).

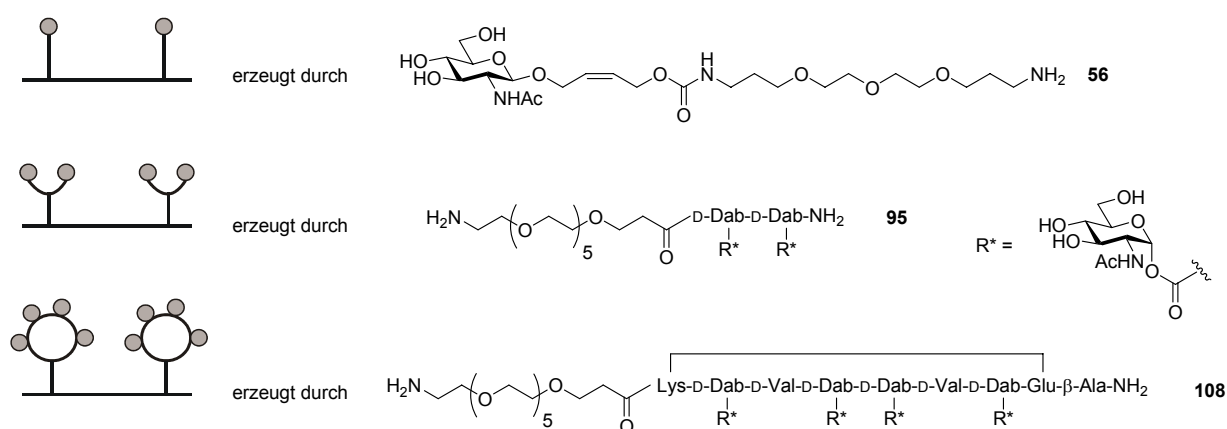


Abbildung 104. Schematische Darstellung der unterschiedlichen Oberflächen, erzeugt durch verschiedene Verbindungen (monovalent **56**, bivalent **95** und tetravalent **108**).

In einem kürzlich erschienenen Artikel von Pieters und Mitarbeitern wurde die Bindung von Con A an Glycodendrimere unterschiedlicher Valenzen untersucht.^[267] Die Glycodendrimere wurden jedoch jeweils nur in einer Oberflächendichte immobilisiert. Diese Dichte wurde so gewählt, dass pro Oberflächeneinheit jeweils die gleiche Anzahl individueller Bindungssepitope (Monosaccharide) präsent waren („Valenz-korrigierte“ Immobilisierung). In diesen Experimenten

zeigte Con A gegenüber der durch eine oktavalente Verbindung erzeugte Oberfläche nur eine um den Faktor drei erhöhte Affinität verglichen mit der Oberfläche, die durch eine monovalente Verbindung erzeugt wurde. Der Frage, ob eine multivalente Interaktion mit verschiedenen auf der Oberfläche immobilisierten Liganden möglich ist, wurde experimentell nicht nachgegangen.

4.14.1 Entwicklung geeigneter Immobilisierungsbedingungen

Zur Immobilisierung der Verbindungen auf Glasoberflächen wurde, wie bereits erwähnt, auf die in dieser Arbeit etablierte Strategie zur kovalenten Immobilisierung des Zuckerderivats **56** auf Mikrotiterplatten zurückgegriffen. Analog wurden kommerziell erhältliche Amin-modifizierte Glaträger **84** der Firma *Genetix* mit PDITC modifiziert, um eine Amin-reaktive Oberfläche **85** zu erhalten (Abbildung 105).

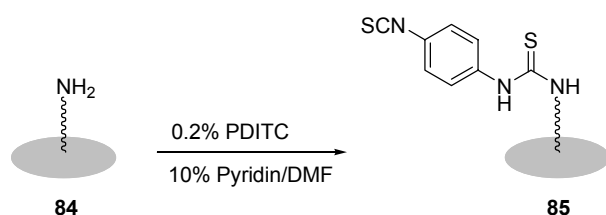


Abbildung 105. Derivatisierung von **84** zu **85**.

Anschließend können die Amin-modifizierten Zuckerderivate **56**, **95** bzw. **108** über eine Thioharnstoff-Bindung kovalent auf der Glasoberfläche **85** immobilisiert werden (Abbildung 106).

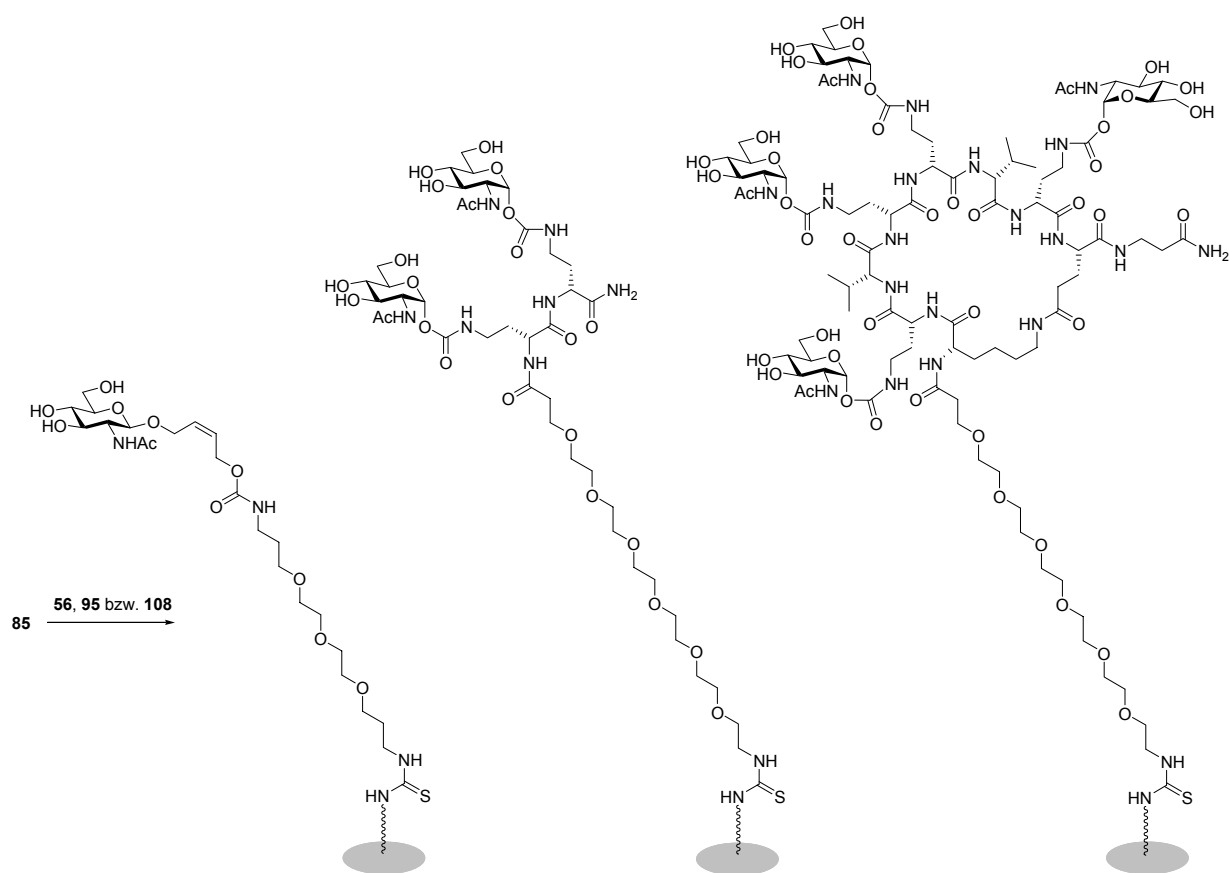


Abbildung 106. Erzeugung verschiedener Oberflächen.

Für die ersten Chip-Experimente und zur Optimierung der Bedingungen wurde mit dem monovalenten Derivat **56** gearbeitet.

Das Aufbringen der Proben auf die PDITC-modifizierte Glasträger **85** sollte mit Hilfe eines Computer-gesteuerten Spotters (*Nano-Plotter 2* der Firma *GeSiM*) durch piezoelektrisches Dosierprinzip mit Nano-Tips erfolgen.

In ersten Experimenten sollte die zur Sättigung der Glasoberfläche benötigte Konzentration an der monovalenten Verbindung **56** ermittelt werden. Dafür musste zuerst eine geeignete Pufferlösung gefunden werden, die beim Spotten gleichmäßige, homogene Spots, die nicht verlaufen und nicht verdunsten, liefert. Dabei spielt auch die Luftfeuchtigkeit während des Spottens und der anschließenden Immobilisierungsreaktion über Nacht eine wichtige Rolle.

Das monovalente Derivat **56** wurde in verschiedenen Konzentrationen in drei verschiedenen Puffern (150 mM Phosphat-Puffer pH 8,0, 100 mM Carbonat-Puffer pH 10,2, 20 % DMSO in

100 mM Carbonat-Puffer pH 10.2) gelöst und dann mittels des Spotters auf den Glasträger **85** aufgebracht. Jede Konzentration wurde dabei neun Mal gespottet.

Zur Vermeidung von Verdunstung wurde die Luftfeuchtigkeit im Spotter auf mind. 78 % gehalten. Zur Immobilisierungsreaktion über Nacht wurde der Glasträger in einer Feuchtigkeitskammer über gesättigter NaCl-Lösung aufbewahrt. Die Spots aller drei Spotting-Lösungen waren jedoch am nächsten Tag sichtbar eingetrocknet. Dennoch wurde der funktionalisierte Glasträger mit einer 10 %igen Ammoniumhydroxid-Lösung behandelt, um nicht abreagierte Isothiocyanat-Gruppen zu blockieren. Zur Inkubation mit WGA-Rhodamin ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$ in 10 mM Phosphat-Puffer pH 7.3 + 0.1 % Tween) wurde der Glasträger mit 55 μL Lectinlösung versetzt, mit einem Deckglas abgedeckt und für 90 Minuten stehengelassen. Anschließend wurde der Glasträger gewaschen und das gebundene WGA-Konjugat mittels eines Array-Scanners (*GenePix Personal 4100 A* der Firma *Axon Instruments*) bei einer Wellenlänge von 532 nm und einem geeigneten PMT-Gain detektiert. Eine Erhöhung des PMT-Werts resultiert in einer höheren Spannung und ermöglicht dadurch eine (allerdings nicht lineare) Erhöhung der Empfindlichkeit der Fluoreszenzmessung.

Wie aufgrund der Verdunstung der Spotting-Lösungen über Nacht bereits zu erwarten war, wurden ungleichmäßige und inhomogene Spots erhalten, die mit abnehmender Konzentration an **56** immer kleiner wurden (Abbildung 107).

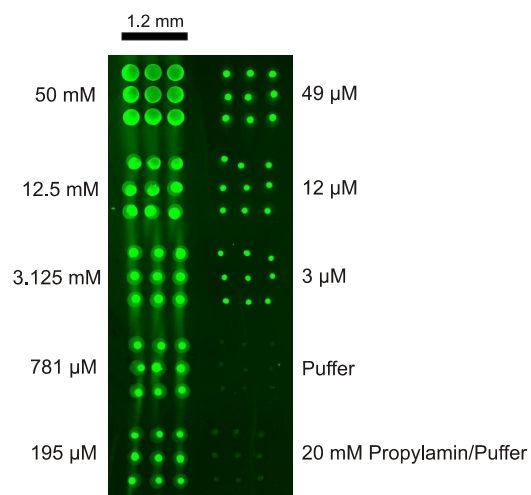


Abbildung 107. Immobilisierung von **56** in unterschiedlichen Konzentrationen (gelöst in 100 mM Carbonat-Puffer) in einer Feuchtigkeitskammer mit gesättigter NaCl-Lösung über Nacht und anschließender Inkubation mit 55 μL WGA-Rhodamin ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) für 90 Minuten.

Im nächsten Experiment wurden für die Immobilisierungsreaktion über Nacht verschiedene Feuchtigkeitskammern verwendet. Ein mit verschiedenen Konzentrationen an **56** modifizierter Glasträger wurde über halbgesättigter NaCl-Lösung gelagert, ein anderer über 20 % DMSO in 100 mM Carbonat-Puffer pH 10.2. Als Negativkontrollen wurden Carbonat-Puffer bzw. die *N*-acetylierte Verbindung **57** (2 mM) gespottet. Nach Inkubation mit WGA-Rhodamin ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) und Auslesen der Fluoreszenzintensitäten zeigte sich, dass die Lagerung des Glasträgers über DMSO/Carbonat-Puffer gleich große Spots für alle Konzentrationen an **56** ergab (Abbildung 108). Aus Abbildung 108 kann man bereits erkennen, dass die *N*-acetylierte Verbindung **57** auch immobilisiert und vom Lectin erkannt wird. Die Fluoreszenzintensität ist jedoch viel geringer ist als bei der entsprechenden Konzentration von Verbindung **56**.

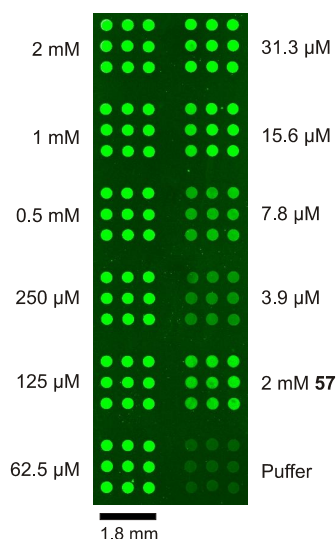


Abbildung 108. Chip, der zur Ermittlung der benötigten Konzentration an **56** zur Sättigung der Oberfläche bei einem PMT-Gain von 600 nach Inkubation mit 55 μL WGA-Rhodamin ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) für 90 Minuten verwendet wurde.

Die Auftragung der gemessenen Fluoreszenzintensität gegen die Konzentration von **56** und der Negativkontrolle **57** liefert die in Abbildung 109 gezeigte Kurve.

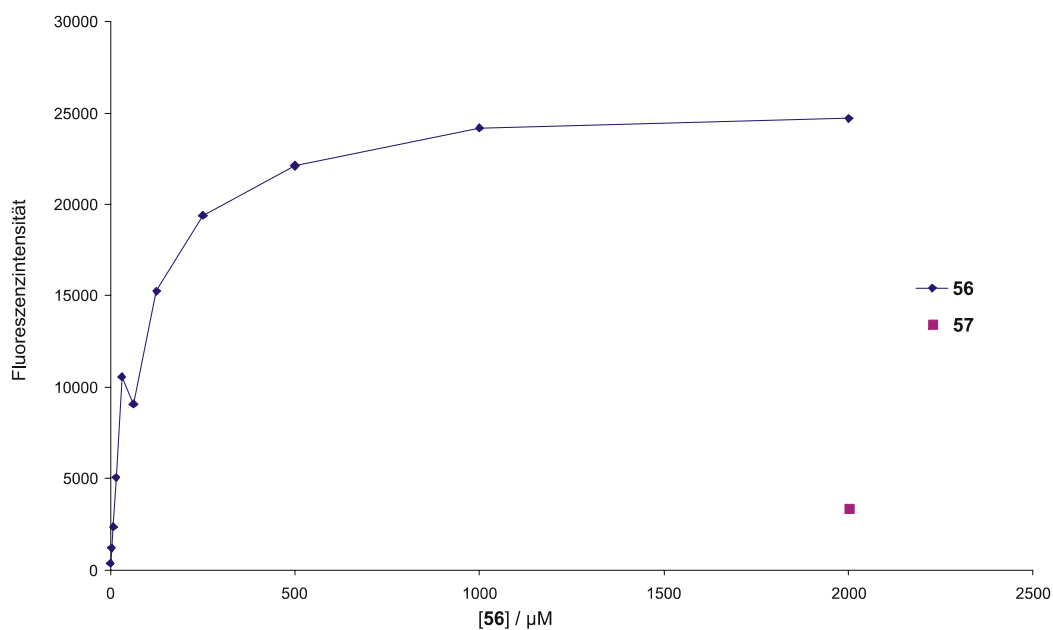


Abbildung 109. Bestimmung der zur Sättigung der Oberfläche benötigten Konzentration an **56** bei einem PMT-Gain von 600 nach Inkubation mit $55 \mu\text{L}$ WGA-Rhodamin ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) für 90 Minuten.

Da die Abweichung der Fluoreszenzintensitäten innerhalb der neun Replikate sowohl in diesen Messwerten als auch in allen folgenden maximal 10 % betrug, wurde auf die Darstellung von Fehlerbalken verzichtet. Die erhaltene Sättigungskurve steht in Analogie zum Sättigungsexperiment der Oberfläche der Mikrotiterplatte **58** mit Zuckerderivat **56** (Abschnitt 4.3.2). Ab einer Konzentration an **56** von etwa 1 mM scheint die Oberfläche gesättigt zu sein. Die *N*-acetylierte Verbindung **57**, die als Negativkontrolle dienen sollte, bindet wohl zu einem gewissen Teil unspezifisch an die Glasoberfläche; die Fluoreszenzintensität ist aber um den Faktor sechs geringer als die Fluoreszenzintensität bei gleicher Konzentration an **56**. Da die Fluoreszenzintensität der Pufferspots um den Faktor 10 geringer war als die Fluoreszenzintensität der *N*-acetylierten Verbindung **57** wurde darauf verzichtet, sie bei allen Messwerten abzuziehen.

4.14.2 Quantitative Auswertung von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen bei unterschiedlichen Oberflächendichten

Aus der erhaltenen Sättigungskurve wurde nun die Konzentration ausgewählt, die für die Herstellung der Molenbrüche aus Verbindung **56** und dem Amin-modifizierten Derivat **86** verwendet werden sollte. Es sollte eine Gesamtkonzentration an reaktiven Aminogruppen von **56**

bzw. **86** benutzt werden, die ausreichend ist, um alle Isothiocyanatgruppen der Glasoberfläche zu sättigen. Um den Substanzverbrauch gering zu halten wurde eine Gesamtkonzentration von $400\ \mu\text{M}$ gewählt, die im Anfangsbereich der Sättigung liegt.

In einem ersten Versuch wurden verschiedene Molenbrüche X (immer bezogen auf das entsprechende Zuckerderivat) durch Mischen von Lösungen von **56** und **86** (jeweils $400\ \mu\text{M}$) hergestellt und dann auf die Glasoberfläche **85** gespottet. Nach der Immobilisierungsreaktion für 23 Stunden wurde mit Ammoniumhydroxid-Lösung blockiert und anschließend mit $55\ \mu\text{L}$ WGA-Rhodamin ($1\ \mu\text{g}\text{mL}^{-1}$) für 90 Minuten inkubiert. Nach Entfernen des ungebundenen WGA-Rhodamin-Konjugats wurde die Fluoreszenz gemessen. Die Auftragung der gemessenen Fluoreszenzintensitäten gegen die Molenbrüche zeigt, dass die Fluoreszenzintensität linear mit zunehmender Beladung der Glasoberfläche mit **56** zunimmt (Abbildung 110).

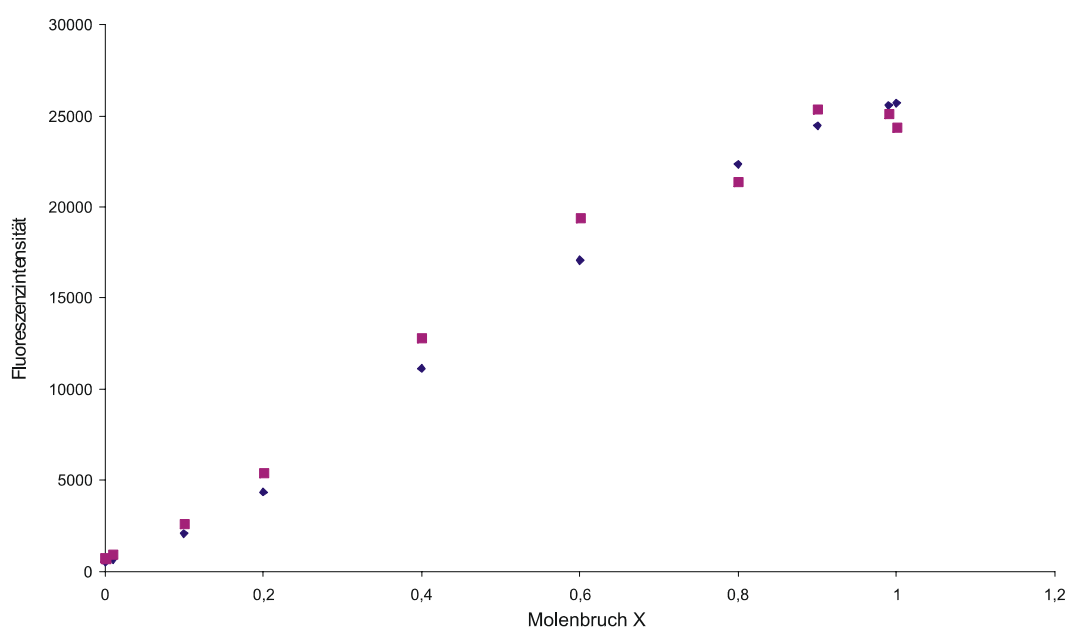


Abbildung 110. Auftragung der Fluoreszenzintensität bei einem PMT-Gain von 600 gegen den Molenbruch $[\mathbf{56}]/[\mathbf{86}]$ bei einer Gesamtkonzentration von $400\ \mu\text{M}$ nach Inkubation mit $55\ \mu\text{L}$ WGA-Rhodamin ($1\ \mu\text{g}\text{mL}^{-1}$) für 90 Minuten (aus einer Doppelbestimmung).

Um nun scheinbare Dissoziationskonstanten $K_{D,\text{surf}}$ für die Bindung des Lectins an die mit unterschiedlichen Dichten von **56** beladenen Glasoberflächen zu bestimmen, müssen verschiedene Konzentrationen des Lectins eingesetzt werden. Durch geeignete Wahl des Chip-Layouts

(Abbildung 111) war es möglich, auf einem einzelnen Chip die Molenbrüche mit unterschiedlichen Lectin-Konzentrationen zu inkubieren.

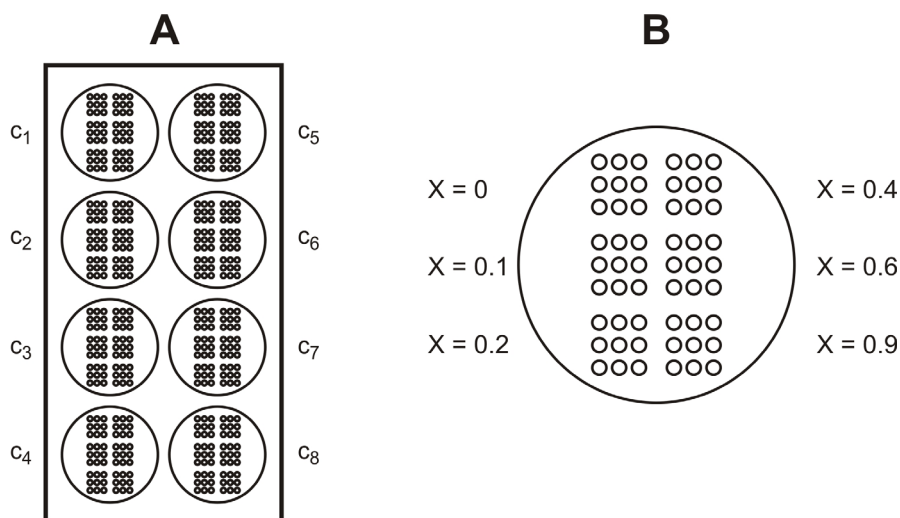


Abbildung 111. Chip-Layout zur Bestimmung von $K_{D,surf}$ -Werten (vgl. Text).

Abbildung 111 A zeigt, dass pro Chip acht Lectin-Konzentrationen (c_1 - c_8) verwendet werden können. Innerhalb jeder Lectin-Konzentration werden sechs unterschiedliche Molenbrüche X gespottet, wobei jeder Molenbruch in neunfacher Ausführung aufgebracht wird (Abbildung 111 B). Zur Inkubation mit der jeweiligen Lectin-Lösung werden $3.4 \mu\text{L}$ der Lösung auf die jeweilige Position auf dem Chip pipettiert und mit einem runden Deckglas abgedeckt.

In einem ersten Experiment mit verschiedenen Konzentrationen an WGA-Rhodamin wurden unterschiedliche Molenbrüche bei einer Gesamtkonzentration von $400 \mu\text{M}$ aus Verbindung **56** und **86** gespottet. Nach der Immobilisierungsreaktion für 23 Stunden wurde mit Ammoniumhydroxid-Lösung blockiert. Dann wurde mit je $3.4 \mu\text{L}$ unterschiedlich konzentrierter WGA-Rhodamin-Lösungen für 90 Minuten inkubiert. Nach Entfernen des ungebundenen WGA-Rhodamin-Konjugats durch Waschen des Glaträgers wurde die Fluoreszenz gemessen. Da aus diesem Experiment nur die vier höchsten der insgesamt acht Lectin-Konzentrationen ausgelesen werden konnten, wurde vermutet, dass die verwendeten Lectin-Konzentrationen nicht ausreichend waren, um die Zucker auf der Oberfläche abzusättigen. Daher wurden in nächsten Versuchen zum einen die Gesamtkonzentration der Lösung aus **56** und **86** von $400 \mu\text{M}$ auf $200 \mu\text{M}$ verringert und zum anderen die Lectin-Konzentration erhöht.

Nach der Immobilisierungsreaktion von verschiedenen Molenbrüchen aus **56** und **86**, nun bei einer Gesamtkonzentration von $200\ \mu\text{M}$, und der Blockierung mit Ammoniumhydroxid-Lösung wurde mit verschiedenen Lectin-Konzentrationen (je $3.4\ \mu\text{L}$) für 90 Minuten inkubiert. Das WGA-Rhodamin-Konjugat wurde statt wie bisher in PBS-Puffer mit $0.1\ \%$ Tween nun in PBS-Puffer mit $1\ \%$ BSA gelöst. Durch diese Änderung wurde ein besseres Signal-zu-Rauschen-Verhältnis erhofft. Nach Entfernen des ungebundenen WGA-Rhodamin-Konjugats wurde die Fluoreszenz gemessen (Abbildung 112).

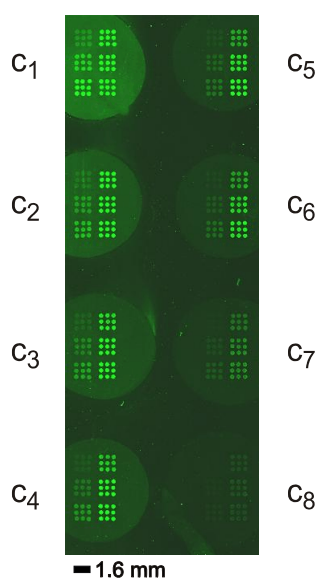


Abbildung 112. Immobilisierung von Mischungen aus **56** und **86** unterschiedlicher Molenbrüche (Gesamtkonzentration $200\ \mu\text{M}$) und Inkubation mit je $3.4\ \mu\text{L}$ Lectin-Lösung ($c_1 = 40\ \mu\text{g mL}^{-1}$, $c_2 = 20\ \mu\text{g mL}^{-1}$, $c_3 = 10\ \mu\text{g mL}^{-1}$, $c_4 = 5\ \mu\text{g mL}^{-1}$, $c_5 = 2.5\ \mu\text{g mL}^{-1}$, $c_6 = 1.25\ \mu\text{g mL}^{-1}$, $c_7 = 0.625\ \mu\text{g mL}^{-1}$, $c_8 = 0.156\ \mu\text{g mL}^{-1}$) für 90 Minuten.

Die Auftragung der gemessenen Fluoreszenzintensität gegen die WGA-Rhodamin-Konzentration bei unterschiedlichen Molenbrüchen X liefert die in Abbildung 113 gezeigten Messpunkte. Da vom Hersteller keine Angaben zum Molekulargewicht des Lectin-Konjugats erhalten werden konnten, wurde bei der Umrechnung der Konzentrationen der WGA-Rhodamin-Lösungen von $\mu\text{g mL}^{-1}$ in nM davon ausgegangen, dass die Masse des Rhodamin-Labels sehr klein im Vergleich zum WGA-Dimer und somit vernachlässigbar ist. Eine Konzentration von $1\ \mu\text{g mL}^{-1}$ entspricht daher $28\ \text{nM}$.

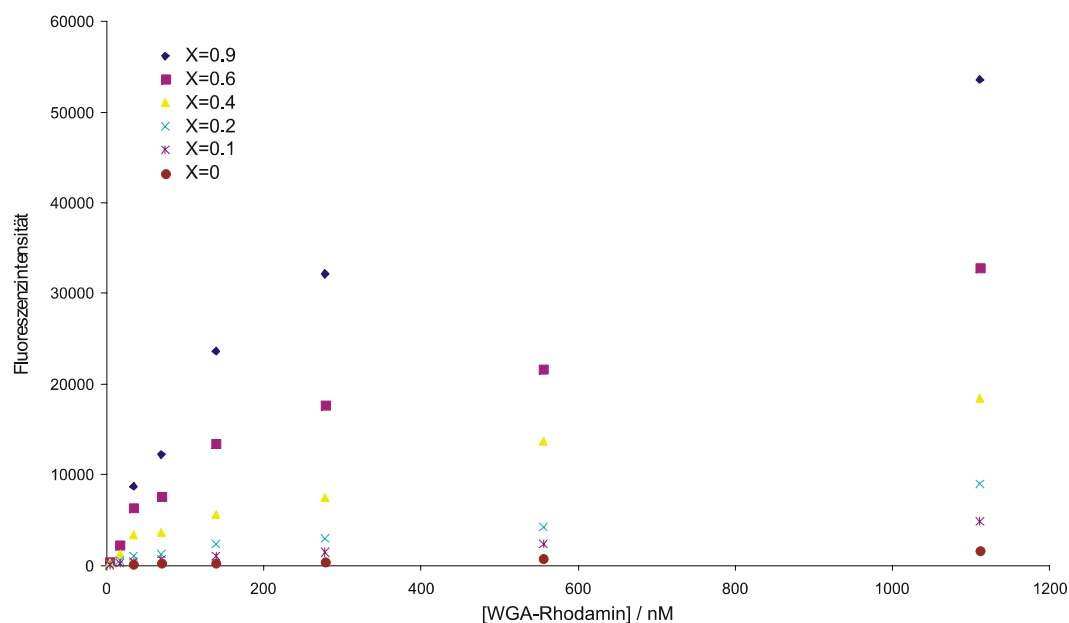


Abbildung 113. Auftragung der gemessenen Fluoreszenzintensität bei einem PMT-Gain von 580 gegen die WGA-Rhodamin-Konzentration bei unterschiedlichen Molenbrüchen X bei einer Gesamtkonzentration von $200 \mu\text{M}$ aus **56** und **86**.

Diese Auftragung liefert nun annähernd Sättigungskurven für den jeweiligen Molenbruch, wobei die Fluoreszenzintensitäten für die kleinen Molenbrüche sehr gering sind. Bei näherer Betrachtung der Spot-Morphologie zeigte sich jedoch eine Inhomogenität, die sich verschlimmerte, je größer der Molenbruch (bezogen auf **56**) und desto geringer die verwendete Lectin-Konzentration wurde (Abbildung 114). Aus diesem Grund wurde von einer Bestimmung der $K_{D,\text{surf}}$ -Werte aus diesen Kurven abgesehen.

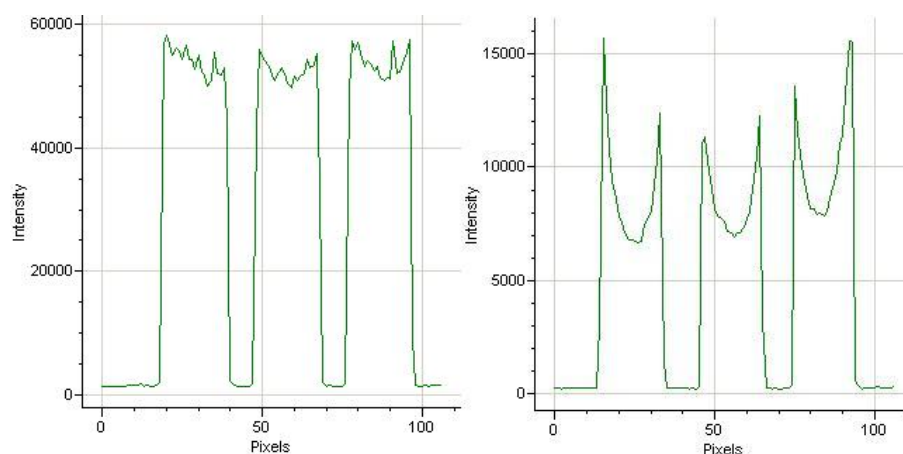


Abbildung 114. Fluoreszenzintensitäten bei einem Querschnitt durch je drei Spots der neun Replikate mit einer Pixel-Größe von $20 \mu\text{m}$. Links) $X=0.9$ bei $40 \mu\text{g/L}$, rechts) $X=0.9$ bei $2.5 \mu\text{g/L}$ WGA-Rhodamin.

Parallel zu den ersten Experimenten mit dem monovalenten Derivat **56** wurde mit dem tetravalenten Cyclopeptid **108** gearbeitet. In einem ersten Experiment wurde wieder die zur Sättigung der Glasoberfläche benötigte Konzentration an **108** ermittelt. Dafür wurde eine Verdünnungsreihe von **108** auf den Glaträger **85** gespottet. Nach Immobilisierung für 23 Stunden und anschließender Blockierung mit Ammoniumhydroxid-Lösung wurde der Glaträger für 90 Minuten mit 55 μL WGA-Rhodamin-Lösung ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$ in 1 % BSA/PBS) inkubiert. Nach Waschen wurde die Fluoreszenzintensität ausgelesen. Abbildung 115 zeigt die Auftragung der Fluoreszenzintensitäten gegen die Konzentration des tetravalenten Cyclopeptids **108**, die aus einer Doppelbestimmung erhalten wurden.

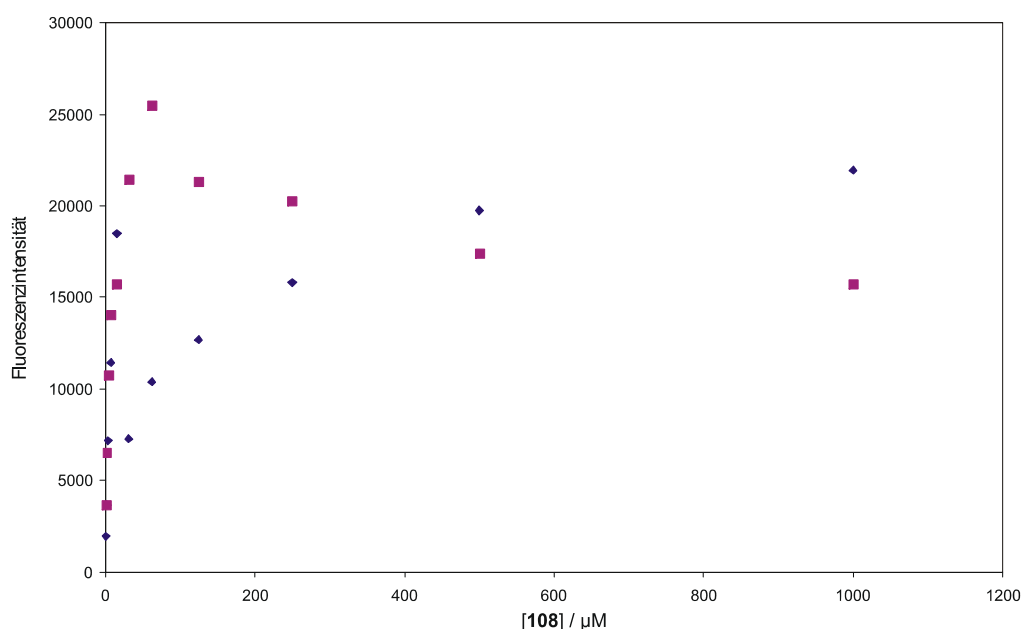


Abbildung 115. Auftragung der Fluoreszenzintensität bei einem PMT-Gain von 630 gegen die Konzentration von **108** nach Inkubation mit $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ WGA-Rhodamin ($55 \mu\text{L}$).

Wie Abbildung 115 zeigt, ergeben die gemessenen Fluoreszenzintensitäten der Doppelbestimmung keinen Sinn. Die erhaltenen Intensitäten bei einem PMT-Gain von 630 sind geringer als erwartet und die Spots zeigten wieder keine homogene Morphologie.

Daher wurde das Experiment wiederholt; jedoch wurde der Glaträger mit einer $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ WGA-Rhodamin-Lösung inkubiert. Abbildung 116 zeigt die Auftragung der Fluoreszenzintensitäten gegen die Konzentration des tetravalenten Cyclopeptids **108**, die wieder aus einer Doppelbestimmung erhalten wurden.

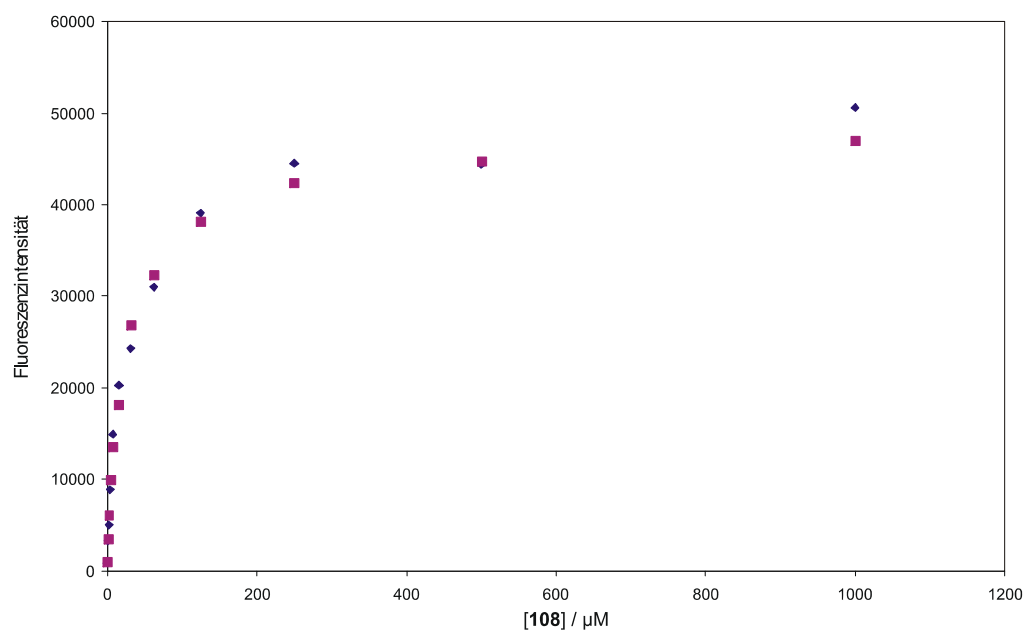


Abbildung 116. Auftragung der Fluoreszenzintensität bei einem PMT-Gain von 500 gegen die Konzentration von **108** nach Inkubation mit $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ WGA-Rhodamin ($55 \mu\text{L}$).

Wie aus Abbildung 116 ersichtlich, ergeben die gemessenen Fluoreszenzintensitäten der Doppelbestimmung nun schöne Sättigungskurven. Die Intensitäten sind im Vergleich zur Verwendung von nur $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ WGA-Rhodamin-Lösung jetzt trotz eines niedrigeren PMT-Gains in etwa doppelt so hoch und die Spots weisen eine homogene Morphologie auf. Daraus wurde abgeleitet, dass eine WGA-Rhodamin-Konzentration von $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ nicht ausreicht, um alle Zuckerreste zu sättigen. Um eine eventuelle Störung der Kohlenhydrat-WGA-Wechselwirkung bei niedrigen Lectin-Konzentrationen durch BSA, welches sich im Puffer befindet, auszuschließen, wurden beide Experimente mit den beiden Lectin-Konzentrationen wiederholt. Zur Inkubation mit der jeweiligen Konzentration wurde das WGA-Rhodamin-Konjugat nun in PBS-Puffer mit 0.1 % Tween gelöst. Abbildung 117 zeigt die Auftragung der Fluoreszenzintensitäten bei den beiden Lectin-Konzentrationen ohne BSA-Zusatz gegen die Konzentration des tetravalenten Cyclopeptids **108**, wobei wiederum Doppelbestimmungen durchgeführt wurden.

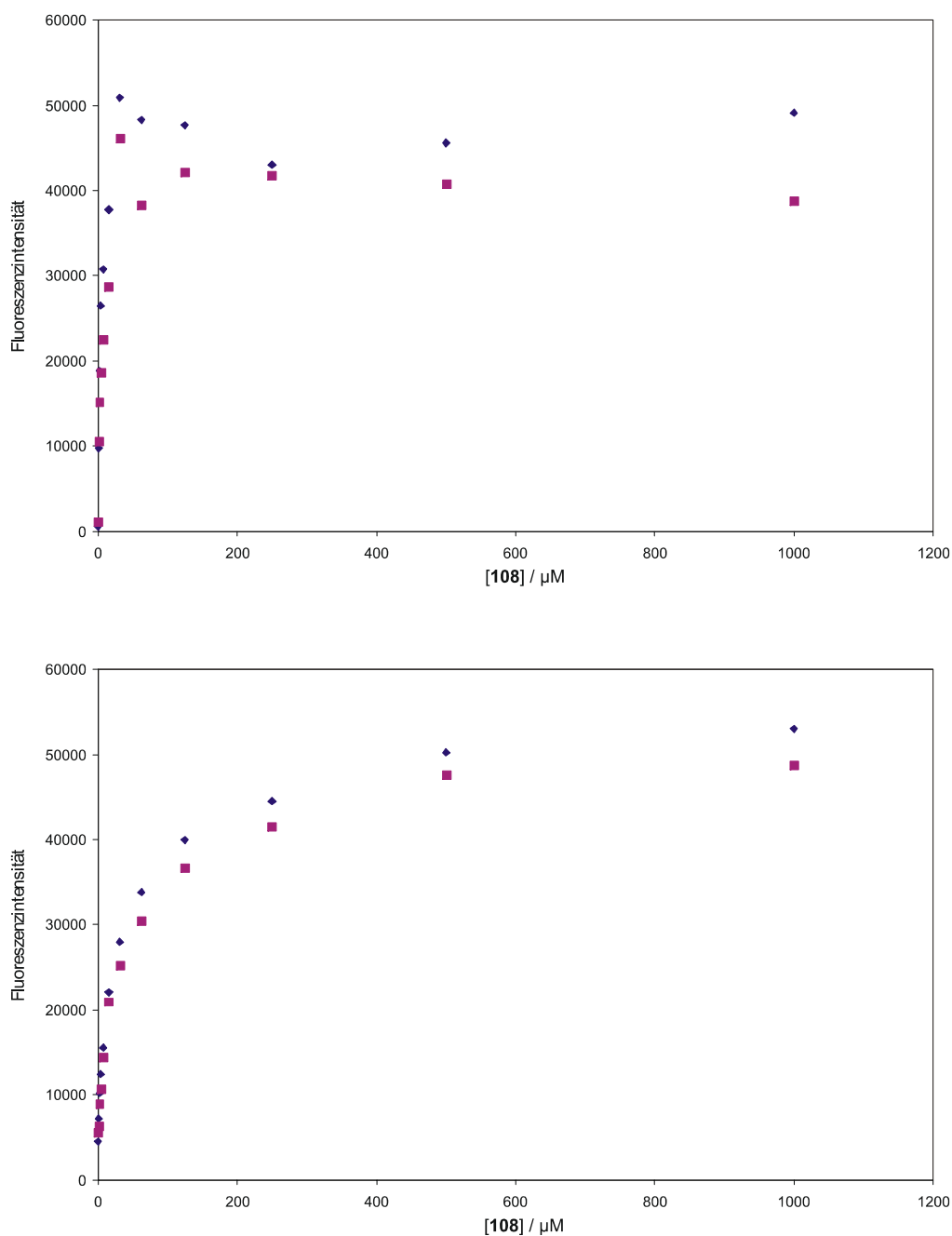


Abbildung 117. Auftragung der Fluoreszenzintensitäten gegen die Konzentration von **108** nach Inkubation mit $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ WGA-Rhodamin ($55 \mu\text{L}$) bei einem PMT-Gain von 660 (oben) und nach Inkubation mit $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ WGA-Rhodamin ($55 \mu\text{L}$) bei einem PMT-Gain von 500 (unten) (ohne BSA-Zusatz).

Wie Abbildung 117 zeigt, untermauern die beiden Experimente die Vermutung, dass eine Lectin-Konzentration von $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ nicht ausreicht, um alle Zuckerreste zu sättigen. Bei Verwendung dieser Konzentration musste wieder ein viel höherer PMT-Gain eingestellt werden, um eine ähnliche Maximalfluoreszenzintensität wie bei Verwendung einer Lectin-Lösung mit einer

Konzentration von $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ zu erreichen. Es konnte wiederum eine perfekte Spot-Morphologie bei Verwendung der hohen Lectin-Konzentration und eine sehr inhomogene Spot-Morphologie bei der geringen Lectin-Konzentration beobachtet werden. Der Zusatz von BSA hat dagegen keinen Einfluss auf die Spot-Morphologie; ohne BSA ist wie erwartet das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis etwas schlechter.

Da die bisherigen Chip-Experimente bei Verwendung geringer Lectin-Konzentrationen keine befriedigende Spot-Morphologie lieferten, wurde der Einfluss des Volumens der verwendeten Lectin-Lösung untersucht. Während der Inkubation mit $55 \mu\text{L}$ Lösung befindet sich nur ein sehr dünner Flüssigkeitsfilm auf den Spots und enthält möglicherweise nicht genug Lectin, um alle Zucker zu erreichen. Daher wurde ein mit verschiedenen Konzentrationen an monovalentem Derivat **56** modifizierter Glasträger für 90 Minuten mit $55 \mu\text{L}$ WGA-Rhodamin-Lösung ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$ in 1 %BSA/PBS) inkubiert. Nach Waschen wurde die Fluoreszenzintensität ausgelesen. Anschließend wurde der Glasträger für 90 Minuten in 20 mL der WGA-Rhodamin-Lösung in einer Petrischale geschwenkt, wieder gewaschen und die Fluoreszenz erneut gemessen. Abbildung 118 zeigt jeweils eine Auftragung der gemessenen Fluoreszenzintensitäten gegen die Konzentration von **56** beider aufeinander folgender Inkubationen als Doppelbestimmungen.

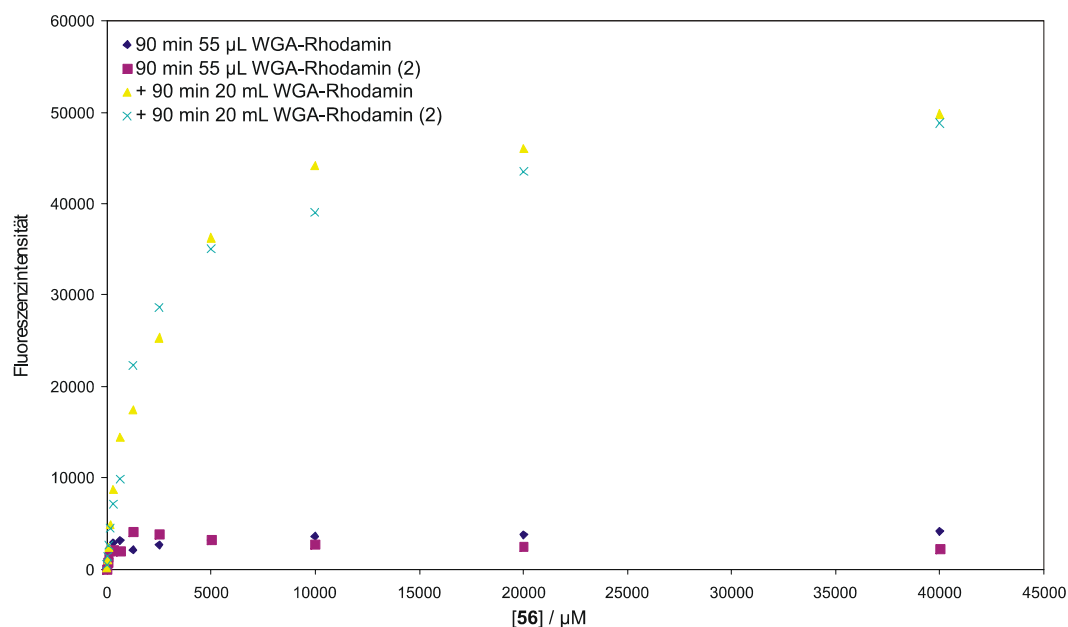


Abbildung 118. Auftragung der Fluoreszenzintensität bei einem PMT-Gain von 530 gegen die Konzentration von **56** nach Inkubation mit verschiedenen Volumina einer WGA-Rhodamin-Lösung von $1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Wie aus Abbildung 118 ersichtlich wird, ist eine Inkubation mit nur 55 μL Lectin-Lösung für 90 Minuten nicht ausreichend; zudem ist die Spot-Morphologie nicht einheitlich. Nach erneuter Inkubation für weitere 90 Minuten in 20 mL WGA-Rhodamin-Lösung sind die Spots homogen und die Fluoreszenzintensität nimmt beträchtlich zu. Im Gegenteil zum ersten Sättigungsexperiment (oben, Abbildung 109) wird nun eine Sättigung der Glasträger-Oberfläche ab einer Konzentration von etwa 10 mM an **56** erreicht. Eine Maximalfluoreszenz von etwa 50000 wird nun bereits bei einem PMT-Gain von 530 erreicht, wohingegen beim ersten Sättigungsexperiment ein höherer PMT-Gain verwendet wurde, mit dem aber nur eine Maximalfluoreszenz von 25000 erreicht werden konnte. Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass der dünne Flüssigkeitsfilm bei Verwendung von 55 μL Lectin-Lösung nicht genug Lectin zur Verfügung stellt, um die Zucker zu sättigen. Aus diesem Experiment wird zudem offensichtlich, dass die bisher verwendete Gesamtkonzentration von 200 μM aus Verbindung **56** und **86** zur Herstellung verschiedener Beladungsdichten nicht wie gewünscht im Sättigungsbereich liegt. Diese Konzentration liegt im steilen Anfangsbereich der Kurve und daher bewirken schon kleinste Pipettierungenauigkeiten große Änderungen in der Fluoreszenzintensität.

Bisher konnten bei der Inkubation eines mit verschiedenen Konzentrationen an tetravalentem Cyclopeptid **108** modifizierten Glasträgers mit nur 55 μL einer Lectin-Lösung der Konzentration von 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ keine befriedigenden Ergebnisse erhalten werden (siehe oben). Daher wurde die Erkenntnis, dass ein Lectin-Volumen von 55 μL nicht ausreicht, genutzt und auch hier ein Volumen von 20 mL verwendet. Cyclopeptid **108** wurde in unterschiedlichen Konzentrationen auf den Glasträger **85** gebracht. Nach Immobilisierung für 23 Stunden und anschließender Blockierung mit Ammoniumhydroxid-Lösung wurde der Glasträger für drei Stunden mit 20 mL WGA-Rhodamin-Lösung (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in 1 % BSA/PBS) in einer Petrischale geschwenkt. Nach Waschen wurde die Fluoreszenzintensität ausgelesen. Abbildung 119 zeigt die Auftragung der Fluoreszenzintensitäten gegen die Konzentration des tetravalenten Cyclopeptids **108**, die aus einer Doppelbestimmung erhalten wurden.

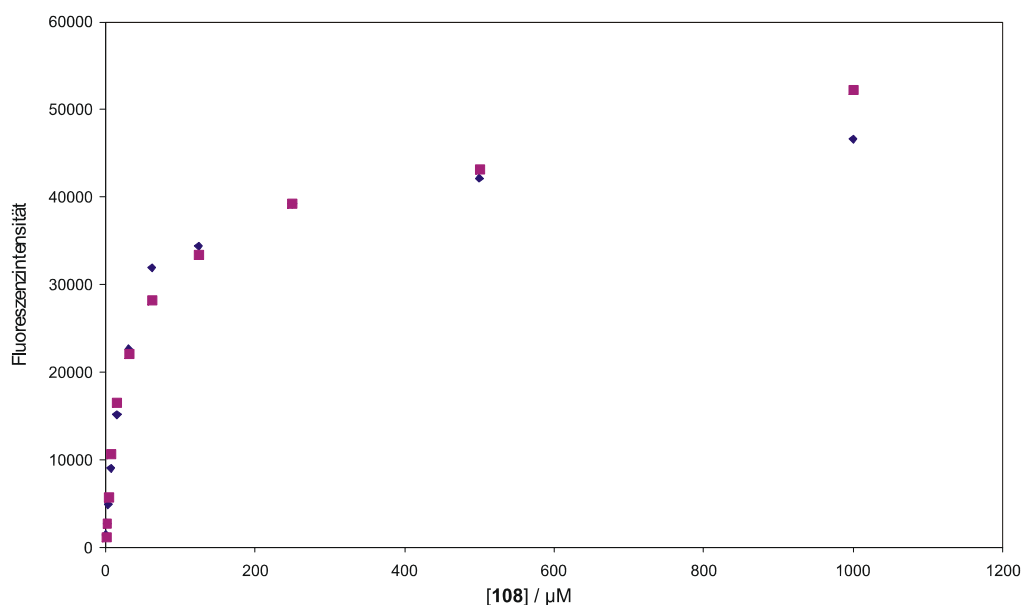


Abbildung 119. Auftragung der Fluoreszenzintensität bei einem PMT-Gain von 500 gegen die Konzentration von **108** nach Inkubation für drei Stunden mit 20 mL einer $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ Lectin-Lösung.

Wie Abbildung 119 zeigt, konnte nun auch mit der geringeren Lectin-Konzentration die Sättigungskurve, die durch Verwendung der hohen WGA-Konzentration erhalten wurde (siehe Abbildung 116), bestätigt werden. Das Volumen der Lectin-Lösung, und damit die Stoffmenge an WGA, ist für die Kohlenhydrat-Protein-Interaktion entscheidend; ist nicht genug Lectin vorhanden, erhält man weder richtige Sättigungskurven noch gute Spot-Morphologien. Um für die Bestimmung von $K_{D,\text{surf}}$ -Werten mit unterschiedlichen Lectin-Konzentrationen auf einem Chip zu inkubieren, wurden bisher kleine, runde Glasplättchen verwendet, unter die ein Volumen von $3.4 \mu\text{L}$ pipettiert wurde. Da dieses Volumen bei geringen Lectin-Konzentrationen nicht ausreichend ist, um vor allem bei großen Molenbrüchen (hohen Zuckerdichten) alle Zuckerreste zu sättigen, musste die Durchführung der Inkubation mit verschieden konzentrierten WGA-Rhodamin-Lösungen abgeändert werden. Damit man größere Volumina auf den Glasträger geben kann, sollte eine 2.5 mm dicke Silikonmaske mit acht Löchern (9 mm Durchmesser) zum Einsatz kommen, die auf den Chip geklebt wird und man somit ein verwendbares Reaktionsvolumen von bis zu $100 \mu\text{L}$ erhalten kann. Da bei allen bisherigen Chip-Versuchen die verwendeten *Genetix*-Glasträger qualitativ nicht überzeugten (Längsstreifen und keine einheitliche Hintergrund-Fluoreszenz innerhalb eines Glasträgers), wurden zum Vergleich Amin-modifizierte Glasträger der Firma *Schott* (Nexterion Aplus) mit PDITC modifiziert, um eine Amin-reaktive Oberfläche **85** zu erhalten.

Zunächst wurde mit den *Schott*-Glasträgern die zur Sättigung der Glasoberfläche benötigte Konzentration an der monovalenten Verbindung **56** unter Verwendung der optimierten Bedingungen ermittelt. Ein mit verschiedenen Konzentrationen an **56** modifizierter Glasträger wurde nach 23 Stunden Immobilisierung und anschließender Blockierung mit Ammoniumhydroxid-Lösung für drei Stunden in 20 mL WGA-Rhodamin-Lösung ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$ in 1 % BSA/PBS) geschwenkt. Nach Waschen wurde die Fluoreszenzintensität ausgelesen. Die Auftragung der gemessenen Fluoreszenzintensität gegen die Konzentration von **56** liefert die in Abbildung 120 gezeigte Kurve.

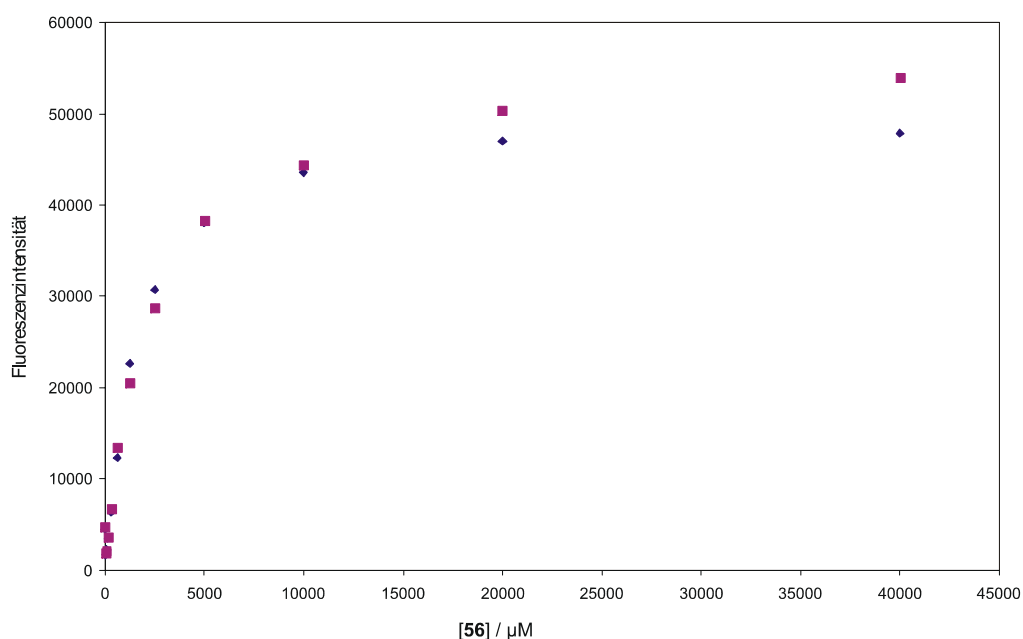


Abbildung 120. Doppelbestimmung des Sättigungsexperiments für **56** bei einem PMT-Gain von 530 nach Inkubation mit 20 mL WGA-Rhodamin ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) für drei Stunden mit *Schott*-Glasträgern.

Interessanterweise zeigt der *Schott*-Glasträger eine Sättigung der Oberfläche mit **56** ab einer Konzentration von 10 mM, die auch in dem entsprechenden Experiment für den *Genetix*-Glasträger erhalten wurde (Abbildung 118). Die Übertragung der optimierten Bedingungen auf den *Schott*-Glasträger führte auch hier zu einheitlichen Spots und es wurde bei dem gleichen PMT-Gain für beide Glasträger jeweils eine Maximalfluoreszenz von 50000 erhalten. Aus diesem Vergleich wurde geschlossen, dass beide Glasträger eine sehr ähnliche Oberfläche besitzen und bei gleicher Behandlung zu ähnlichen Resultaten führen. Der teurere *Schott*-Glasträger wies jedoch, im Gegensatz zum *Genetix*-Glasträger, eine einheitliche Hintergrund-Fluoreszenz über die ganze Träger-Fläche auf und wurde daher für die weiteren Experimente verwendet. Zur Erzeugung

unterschiedlicher Beladungsdichten wurde nun eine Gesamtkonzentration an Verbindung **56** und **86** von 5 mM gewählt, die zwar im unteren Anfangsbereich der Sättigung liegt, aber im Hinblick auf den Substanzverbrauch noch akzeptabel ist.

Wie bereits oben erwähnt sollte nun zur Inkubation der Molenbrüche mit den verschiedenen Lectin-Konzentrationen eine Silikonmaske verwendet werden, die es ermöglicht, mit größeren Volumina zu arbeiten. Daher wurde ein mit unterschiedlichen Molenbrüchen von Verbindung **56** und **86** (bei einer Gesamtkonzentration von 5 mM) modifizierter Glasträger nach Blockierung mit Ammoniumhydroxid-Lösung mit der Maske versehen. Dann wurde mit verschiedenen Lectin-Konzentrationen (je 80 μL pro *Well*) für 24 Stunden unter Schwenken inkubiert. Nach Entfernen des ungebundenen WGA-Rhodamin-Konjugats wurde die Fluoreszenz gemessen (Abbildung 121, A).

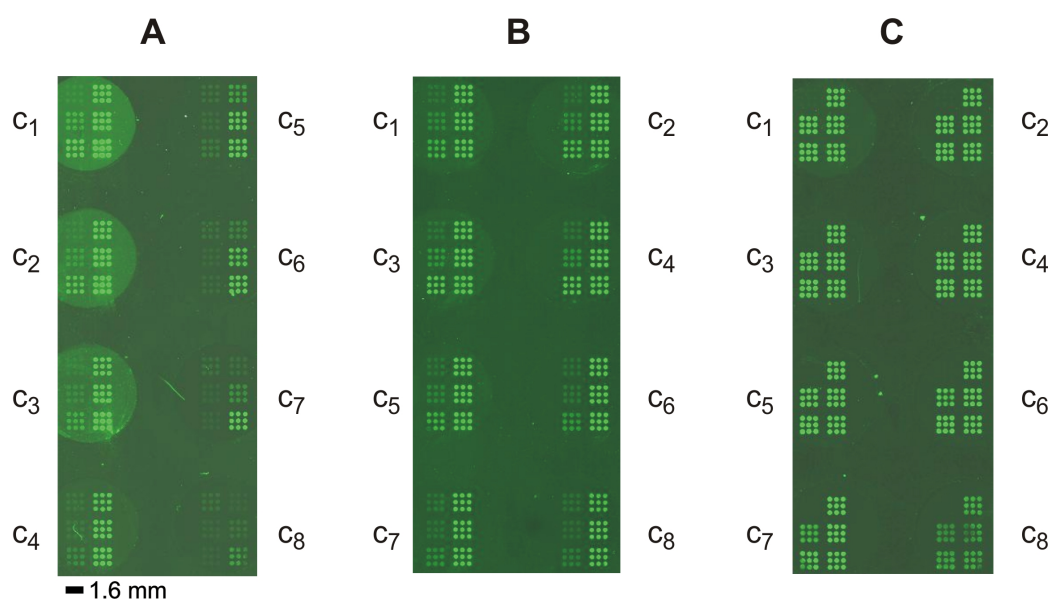


Abbildung 121. Immobilisierung der Molenbrüche

A) aus **56** und **86** (Gesamtkonzentration 5 mM) und Inkubation mit je 80 μL der Lectin-Lösung ($c_1 = 100 \mu\text{g mL}^{-1}$, $c_2 = 50 \mu\text{g mL}^{-1}$, $c_3 = 25 \mu\text{g mL}^{-1}$, $c_4 = 6.25 \mu\text{g mL}^{-1}$, $c_5 = 1.56 \mu\text{g mL}^{-1}$, $c_6 = 0.39 \mu\text{g mL}^{-1}$, $c_7 = 0.098 \mu\text{g mL}^{-1}$, $c_8 = 0.0244 \mu\text{g mL}^{-1}$) bzw.

B) aus **95** und **86** (Gesamtkonzentration 5 mM) und Inkubation mit je 80 μL der Lectin-Lösung ($c_1 = 10 \mu\text{g mL}^{-1}$, $c_2 = 6.67 \mu\text{g mL}^{-1}$, $c_3 = 3.33 \mu\text{g mL}^{-1}$, $c_4 = 1.66 \mu\text{g mL}^{-1}$, $c_5 = 0.83 \mu\text{g mL}^{-1}$, $c_6 = 0.208 \mu\text{g mL}^{-1}$, $c_7 = 0.104 \mu\text{g mL}^{-1}$, $c_8 = 0.052 \mu\text{g mL}^{-1}$) bzw.

C) aus **108** und **86** (Gesamtkonzentration 200 μM) und Inkubation mit je 80 μL der Lectin-Lösung ($c_1 = 2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$, $c_2 = 1.25 \mu\text{g mL}^{-1}$, $c_3 = 0.625 \mu\text{g mL}^{-1}$, $c_4 = 0.313 \mu\text{g mL}^{-1}$, $c_5 = 0.156 \mu\text{g mL}^{-1}$, $c_6 = 0.078 \mu\text{g mL}^{-1}$, $c_7 = 0.039 \mu\text{g mL}^{-1}$, $c_8 = 0.020 \mu\text{g mL}^{-1}$) für 24 Stunden.

4.14.3 Bestimmung von $K_{D,surf}$ -Werten

Die Auftragung der gemessenen Fluoreszenzintensität gegen den Molenbruch X bei unterschiedlichen WGA-Rhodamin-Konzentrationen liefert die in Abbildung 122 gezeigten Messpunkte.

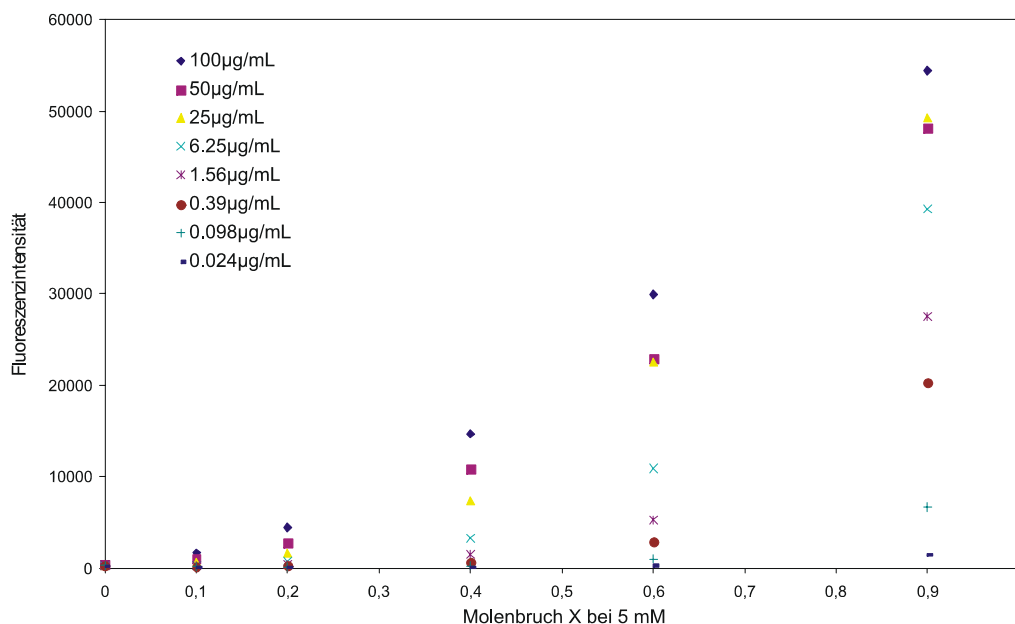


Abbildung 122. Auftragung der Fluoreszenzintensität bei einem PMT-Gain von 540 gegen den Molenbruch bei einer Gesamtkonzentration von 5 mM an **56** und **86** nach Inkubation mit je 80 µL WGA-Rhodamin-Lösung unterschiedlicher Konzentrationen für drei Stunden.

Interessanterweise steigt die Fluoreszenzintensität bei einer Gesamtkonzentration von 5 mM an **56** und **86** nicht linear, sondern exponentiell mit zunehmender Zuckerdichte an. Die monovalente Verbindung **56** scheint also bei höheren Beladungsdichten eine multivalente Bindung des Lectins zu ermöglichen.

Zur Bestimmung von $K_{D,surf}$ -Werten wurde die Fluoreszenzintensität gegen die Lectin-Konzentrationen c_1 – c_8 innerhalb eines Molenbruchs aufgetragen. Durch Kurven-Fitting mittels des Programms SigmaPlot an die in Gleichung 8 dargestellte Funktion ergeben sich die in Abbildung 123 gezeigten Kurven.

$$F = \frac{F_{\max} - [P]}{[P] + K_{D,surf}} \quad \text{Gleichung 8}$$

In dieser Gleichung steht F_{\max} für die maximale Fluoreszenzintensität und $[P]$ für die Gesamtlectinkonzentration. Der $K_{D,\text{surf}}$ -Wert ist die scheinbare Gleichgewichtsdissoziationskonstante für die Oberflächen-immobilisierten Kohlenhydrate und das Lectin.

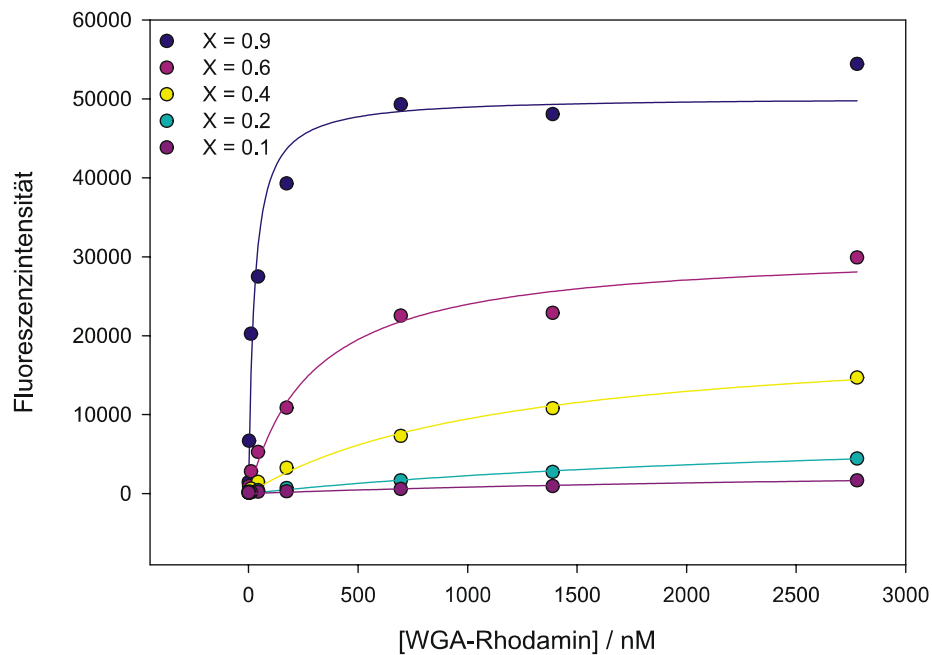


Abbildung 123. Fits der Auftragung der Fluoreszenzintensität bei einem PMT-Gain von 540 gegen die Lectin-Konzentration innerhalb eines Molenbruchs bei einer Gesamtkonzentration von 5 mM an **56** und **86**.

Aus diesen Kurven lassen sich die in Tabelle 7 aufgeführten $K_{D,\text{surf}}$ -Werte bestimmen, wobei sich der R^2 -Wert auf die Güte des jeweiligen Fits bezieht (im Idealfall: $R^2 = 1$).

Tabelle 7. $K_{D,\text{surf}}$ -Werte für verschiedene Oberflächendichten an **56**.

X	$K_{D,\text{surf}}$ / nM	R^2
0.9	26 ± 7	0.97
0.6	295 ± 73	0.98
0.4	1170 ± 220	0.99
0.2	3100 ± 1000	0.99
0.1	3827 ± 2800	0.94

Tabelle 7 zeigt, dass die $K_{D,surf}$ -Werte für die Bindung des Lectins an die Oberfläche vom Molenbruch $X = 0.9$ bis $X = 0.1$, d. h. mit abnehmender Oberflächendichte an **56**, um den Faktor 147 zunehmen. Das bedeutet, dass, wie erwartet, bei einer hohen Zuckerdichte auf der Glasoberfläche eine multivalente Bindung zwischen WGA und monovalenten Liganden möglich ist. Die Chip-Oberfläche kann somit tatsächlich als multivalente Präsentation aufgefasst werden. Bei Erniedrigung der Zuckerdichte wird der Abstand zwischen zwei monovalenten Liganden immer größer, sodass der Abstand zwischen den WGA-Bindungsstellen nicht mehr überbrückt werden kann. Dadurch nimmt die Affinität des Lectins gegenüber der Oberfläche deutlich ab. Bei unseren ELLA-Experimenten in Lösung wurden im Vergleich von GlcNAc mit verschiedenen bivalenten Liganden (d. h. bei einer Verdopplung der Zuckerdichte) relative inhibitorische Potenzen β zwischen 31 (Verbindung **60**) und 2347 (Verbindung **45**) gefunden. Für die Veränderung der $K_{D,surf}$ -Werte bei erhöhter Zuckerdichte der monovalenten Verbindung **56** sollte daher ein Faktor in diesem Bereich erwartet werden. Der beobachtete Faktor von mehr als zwei Größenordnungen liegt somit im Rahmen der Erwartungen. Im Gegensatz hierzu wurden von Wong und Mitarbeitern lediglich Faktoren von maximal 2-3 berichtet.^[140] Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass die in ihren Arbeiten eingesetzte Methode die Erzeugung ausreichend niedriger Oberflächendichten nicht gestattete.

Um nun zu untersuchen, wie die Präsentation einer multivalenten Verbindung in verschiedenen Oberflächendichten die Lectin-Bindung beeinflusst, wurde das Dipeptid **95** herangezogen. In einem ersten Experiment sollte analog zu **56** die zur Sättigung der Glasoberfläche benötigte Konzentration an **95** bestimmt werden. Dafür wurde ein mit verschiedenen Konzentrationen an **95** modifizierter Glasträger nach 23 Stunden Immobilisierung und anschließender Blockierung mit Ammoniumhydroxid-Lösung für drei Stunden in 20 mL WGA-Rhodamin-Lösung ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$ in 1 % BSA/PBS) geschwenkt. Nach Waschen wurde die Fluoreszenzintensität ausgelesen. Die Auftragung der gemessenen Fluoreszenzintensität gegen die Konzentration von **95** liefert die in Abbildung 124 gezeigte Kurve.

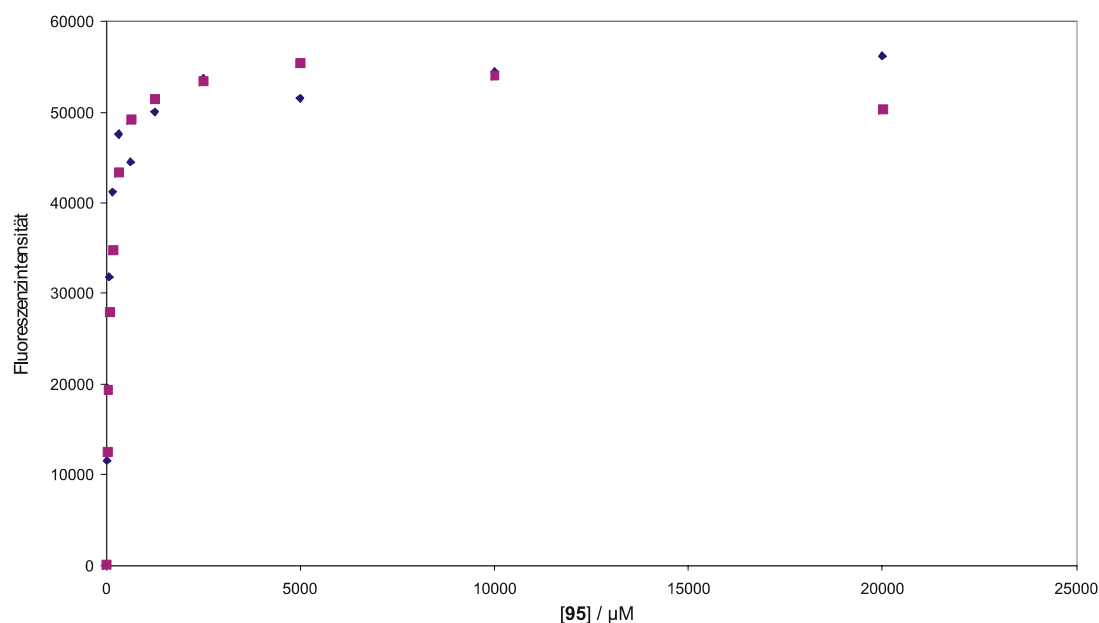


Abbildung 124. Doppelbestimmung des Sättigungsexperiments für **95** bei einem PMT-Gain von 510 nach Inkubation mit 20 mL WGA-Rhodamin ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) für drei Stunden.

Abbildung 124 zeigt, dass bei einer Konzentration von 5 mM an Verbindung **95** der Sättigungsbereich der Glasoberfläche gut erreicht ist. Interessanterweise würde hier im Gegensatz zu Verbindung **56** zur Sättigung bereits eine Konzentration von etwa 1.3 mM ausreichen. Für eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse, die sich mit dem monovalenten Derivat **56** und dem bivalenten Derivat **95** ergeben, wurde hier dennoch eine Gesamtkonzentration von 5 mM an Verbindung **95** und **86** zur Erzeugung verschiedener Beladungsdichten verwendet. Es wurde ein mit unterschiedlichen Molenbrüchen von Verbindung **95** und **86** (bei einer Gesamtkonzentration von 5 mM) modifizierter Glasträger nach Blockierung mit Ammoniumhydroxid-Lösung mit einer Maske versehen. Dann wurde mit verschiedenen Lectin-Konzentrationen (je $80 \mu\text{L}$ pro *Well*) für 24 Stunden unter Schwenken inkubiert. Nach Entfernen des ungebundenen WGA-Rhodamin-Konjugats wurde die Fluoreszenz gemessen (Abbildung 121, B).

Zur Bestimmung von $K_{D,\text{surf}}$ -Werten wurde die Fluoreszenzintensität bei unterschiedlichen Molenbrüchen gegen die Lectin-Konzentrationen aufgetragen. Durch Kurven-Fitting an die in Gleichung 8 dargestellte Funktion ergeben sich die in Abbildung 125 gezeigten Kurven.

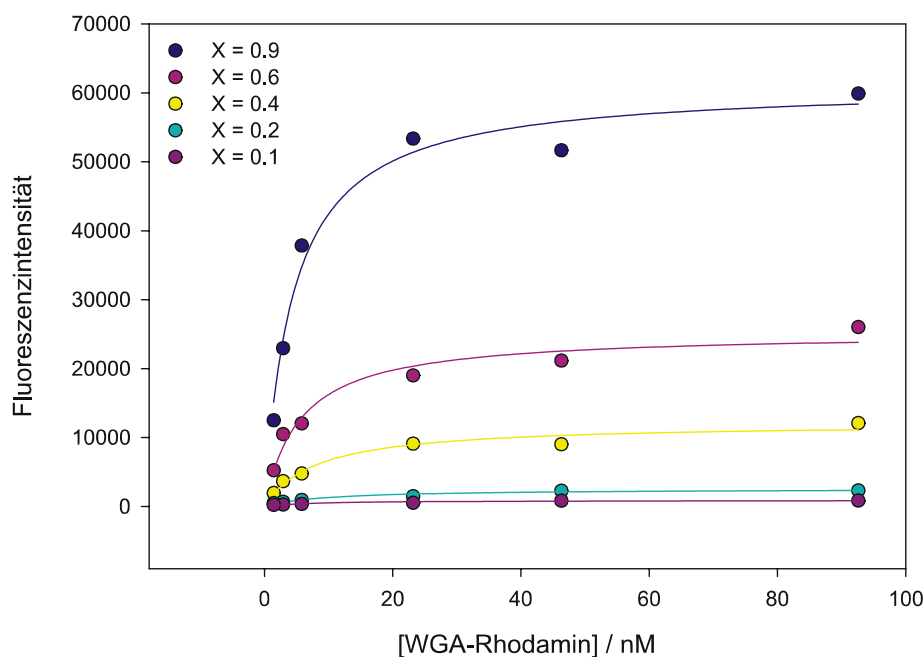


Abbildung 125. Fits der Auftragung der Fluoreszenzintensität bei einem PMT-Gain von 540 gegen Lectin-Konzentration innerhalb eines Molenbruchs bei einer Gesamtkonzentration von 5 mM an **95** und **86**.

Aus diesen Kurven lassen sich die in Tabelle 8 aufgelisteten $K_{D,surf}$ -Werte bestimmen.

Tabelle 8. $K_{D,surf}$ -Werte für verschiedene Oberflächendichten an **95**.

X	$K_{D,surf}$ / nM	R^2
0.9	4.4 ± 0.8	0.98
0.6	5.6 ± 1.3	0.96
0.4	8.1 ± 2.2	0.96
0.2	9.6 ± 3.0	0.95
0.1	7.1 ± 2.5	0.92

Tabelle 8 zeigt, dass die $K_{D,surf}$ -Werte für die Bindung des Lectins an die Oberfläche mit abnehmender Oberflächendichte an **95** im Gegensatz zu **56** kaum zunehmen (etwa Faktor zwei). Dieses Ergebnis bestätigt somit die in Kapitel 3 formulierte Hypothese. Eine Erniedrigung der Zuckerdichte der bivalenten Verbindung **95** bewirkt zwar ebenso, dass der Abstand zwischen zwei bivalenten Liganden größer wird. Dadurch kann der Abstand zwischen den Liganden ab einer bestimmten Dichte nicht mehr „inter“-molekular von einem WGA-Molekül überbrückt werden.

Wie erwartet kann WGA aber weiterhin „intra“-molekular in bivalenter Weise mit dem Liganden interagieren. Dadurch nimmt die Affinität des Lectins gegenüber der Oberfläche nur geringfügig ab. Der beobachtete Unterschied der $K_{D,surf}$ -Werte bei einem Molenbruch $X = 0.1$ bis 0.2 für die monovalente Verbindung **56** ($K_{D,surf} = 3100-3827$ nM) bzw. für die bivalente Verbindung **95** ($K_{D,surf} = 7.1-9.6$ nM) spiegelt die Situation in Lösung wesentlich besser wider. Dort zeigte das bivalente Dipeptid **77** eine um einen Faktor von 55 höhere inhibitorische Potenz als das monovalente Hydroxybutenylglycosid **50**.

Schlussendlich wurde untersucht, welchen Einfluss eine in unterschiedlichen Oberflächendichten immobilisierte tetravalente Verbindung auf die Lectin-Bindung hat. Dafür wurde die tetravalente Verbindung **108** herangezogen. Wie Abbildung 119 zeigt, ist die Glasträger-Oberfläche bereits ab einer Konzentration an **108** von etwa $500 \mu\text{M}$ gesättigt. Zur Erzeugung verschiedener Beladungsdichten konnte aber eine Gesamtkonzentration von 5 mM, wie sie für die mono- und bivalente Verbindung verwendet wurde, im Hinblick auf den Substanzverbrauch nicht hergestellt werden. Es wurde daher eine Gesamtkonzentration von $200 \mu\text{M}$ an Verbindung **108** und **86** gewählt, die im Anfangsbereich der Sättigung liegt. Ein mit unterschiedlichen Molenbrüchen von Verbindung **108** und **86** (bei einer Gesamtkonzentration von $200 \mu\text{M}$) modifizierter Glasträger wurde nach Blockierung mit Ammoniumhydroxid-Lösung mit einer Maske versehen. Dann wurde mit verschiedenen Lectin-Konzentrationen (je $80 \mu\text{L}$ pro *Well*) für 24 Stunden unter Schwenken inkubiert. Nach Entfernen des ungebundenen WGA-Rhodamin-Konjugats wurde die Fluoreszenz gemessen (Abbildung 121, C).

Zur Bestimmung von $K_{D,surf}$ -Werten wurden die bei verschiedenen Molenbrüchen gemessenen Fluoreszenzintensitäten gegen die Lectin-Konzentrationen aufgetragen. Durch Kurven-Fitting mittels des Programms SigmaPlot an die in Gleichung 8 dargestellte Funktion ergeben sich die in Abbildung 126 gezeigten Kurven.

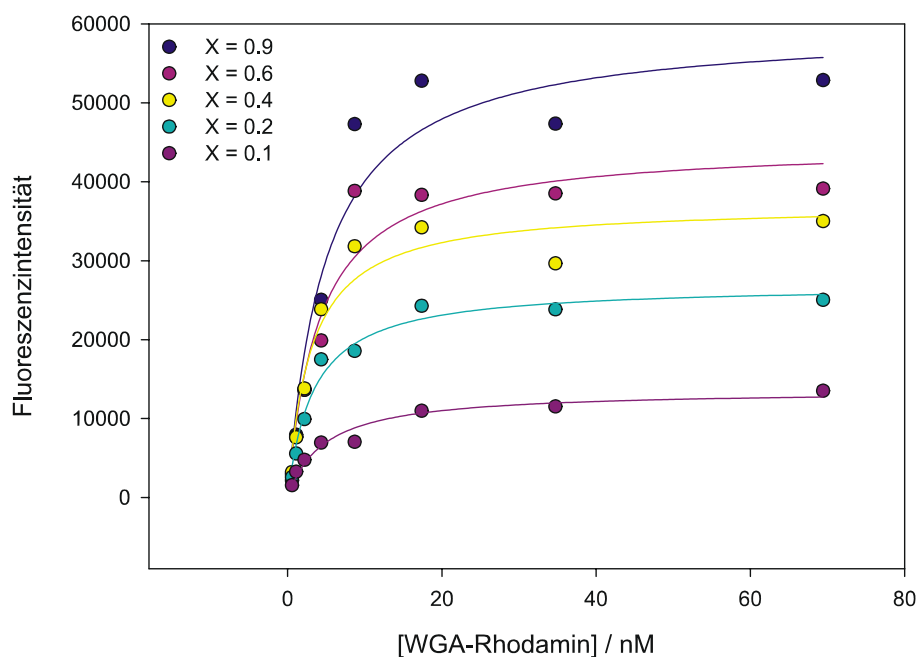


Abbildung 126. Fits der Auftragung der Fluoreszenzintensität bei einem PMT-Gain von 520 gegen die Lectin-Konzentration innerhalb eines Molenbruchs bei einer Gesamtkonzentration von 200 μM an **108** und **86**.

Aus diesen Kurven lassen sich die in Tabelle 9 aufgeführten $K_{D,\text{surf}}$ -Werte bestimmen.

Tabelle 9. $K_{D,\text{surf}}$ -Werte für verschiedene Oberflächendichten an **108**.

X	$K_{D,\text{surf}}$ / nM	R^2
0.9	4.9 ± 1.5	0.94
0.6	4.1 ± 1.2	0.93
0.4	3.0 ± 0.8	0.94
0.2	3.3 ± 0.6	0.98
0.1	4.7 ± 1.0	0.96

Tabelle 9 zeigt, dass die $K_{D,\text{surf}}$ -Werte für die Bindung des Lectins an die Oberfläche mit abnehmender Oberflächendichte an **108** nicht zunehmen. Bei einer Gesamtkonzentration von nur 200 μM (im Vergleich zu 5 mM bei **56** bzw. **96**) scheint auch bei Erniedrigung der Zuckerdichte eine multivalente Bindung immer noch möglich zu sein. Da für die tetravalente Verbindung **108** eine geringere Gesamtkonzentration verwendet wurde als für die mono- und bivalente Verbindung **56** bzw. **96**, ist es in diesem Fall schwierig, die Ergebnisse untereinander zu vergleichen. Es ist

nicht abschätzbar, ob oder wie sich die $K_{D,surf}$ -Werte für Verbindung **108** bei einer höheren Gesamtkonzentration von 5 mM ändern würden.

4.14.4 Fazit

Mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass das in dieser Arbeit entwickelte Chipsystem und die zugehörigen etablierten Methoden eine kontrollierte Einstellung der Beladungsdichte ermöglichen. Dies ermöglicht quantitative Analysen von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen. Es konnte gezeigt werden, dass monovalente Liganden eine multivalente Bindung des Lectins an die Glasoberfläche herbeiführen, wenn die Zuckerdichte auf der Oberfläche ausreichend groß ist. Bei Unterschreitung einer bestimmten Zuckerdichte wird der Abstand zwischen den Liganden größer als der Abstand zwischen den WGA-Bindungsstellen. Dadurch ist die Überbrückung immobilisierter Liganden durch das Protein nicht mehr möglich und die Affinität des Lectins gegenüber der Oberfläche wird deutlich geringer. Im Fall einer multivalenten Verbindung auf der Oberfläche konnte dagegen gezeigt werden, dass eine Verringerung der Dichte keine gravierende Änderung der Bindungsaffinität des Lectins gegenüber der Oberfläche bewirkt. Bei der Anwendung von Kohlenhydrat-Chips in der Glycobiologie („Glycomics“) sollte der Oberflächendichte als kritischer Parameter in Zukunft verstärkte Aufmerksamkeit geschenkt werden. Diese lässt sich- wie hier gezeigt wurde- bequem durch Zusatz eines „Verdünners“ wie z. B. Verbindung **86** in unterschiedlichen Anteilen einstellen.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die spezifische Erkennung von Kohlenhydratstrukturen in biologischen Systemen durch kohlenhydratbindende Proteine (Lectine) ist die Basis zahlreicher intra- und interzellulärer Prozesse. Besonders in der Krebs- und Infektionstherapie versucht man deshalb, solche lectinvermittelten Funktionen gezielt zu beeinflussen. Synthetische multivalente Lectin-Liganden können durch eine geeignete räumliche Präsentation der Kohlenhydrate eine außerordentlich hohe Bindungsaffinität erreichen. So zeigte das in unserer Arbeitsgruppe von S. Seeberger synthetisierte tetravalente Neoglycopeptid **16** mit verkürztem Kohlenhydrat-Peptid-Linker eine um einen Faktor 14 höhere Affinität gegenüber WGA als das tetravalente Neoglycopeptid **15** mit längerem Kohlenhydrat-Peptid-Linker (Abbildung 127).^[226]

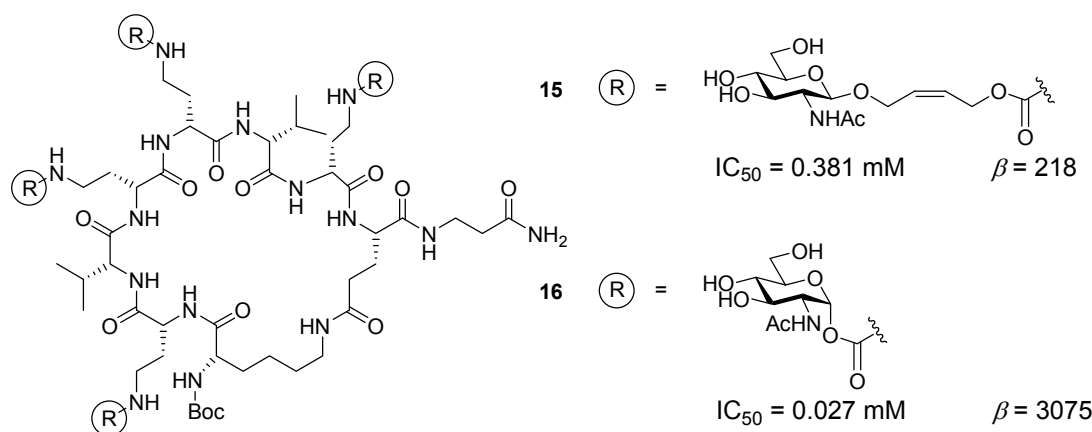


Abbildung 127. Neoglycopeptide **15** und **16**.^[226]

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, worauf diese Affinitätssteigerung zurückzuführen ist. Als mögliche Ursachen für die erhöhte Affinität kommen die veränderte Geometrie, die verringerte Flexibilität von **16** und die veränderte Konfiguration und Konstitution am anomeren Zentrum in Betracht. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden mono-, di- und trivalente Derivate des *N*-Acetyl-D-glucosamins (GlcNAc) durch Anknüpfen der Carbonate **12** bzw. **13** an kommerziell erhältliche Amine mit unterschiedlicher Geometrie und Flexibilität synthetisiert. Diese Verbindungen sollten durch einen enzymgekoppelten Lectinbindungstest auf ihre Inhibierungsfähigkeit der Bindung von immobilisiertem Schweinemagenmucin an Peroxidase-markiertes Weizenkeimagglutinin untersucht werden. Damit sollten Aussagen darüber möglich sein, ob eine α -Glycosylurethan-Struktur bereits auf monovalenter Ebene besser bindet als eine

β -glycosidische Struktur und welche strukturellen Parameter der Liganden Voraussetzung für eine starke Bindung an WGA sind. Erste Untersuchungen hierzu wurden bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit^[233] angestellt. Beim Vergleich von α -Glycosylurethanen mit den entsprechenden β -Urethanen mit flexiblerem längeren Linker konnte die Tendenz beobachtet werden, dass die α -Glycosylurethane höhere IC_{50} -Werte besitzen und somit schlechter inhibieren als die β -Urethane. Dies deutet darauf hin, dass die räumliche Präsentation der GlcNAc-Reste in Neoglycopeptid **16** für dessen hohe Affinität verantwortlich ist.

Der im Rahmen meiner Diplomarbeit eingesetzte Lectinbindungstest weist jedoch deutliche Mängel auf, weshalb die damit erzielten Ergebnisse nur bedingt aussagekräftig sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher ein neuer Bindungstest entwickelt. Anstelle des nicht-kovalent immobilisierten Schweinemagenmucins (PSM) dient hierbei das GlcNAc-Derivat **56**, welches kovalent immobilisiert wird, als Referenzligand. Die Synthese von Verbindung **56** gelang ausgehend von Glucosaminhydrochlorid in sieben Schritten. Zur kovalenten Immobilisierung wurde Verbindung **56** unter Ausbildung einer Thioharnstoff-Bindung mit 1,4-Phenylendiisothiocyanat-modifizierten Mikrotiterplatten **58** umgesetzt. Dabei konnte gezeigt werden, dass ab einer Konzentration an GlcNAc-Derivat **56** von 1 mM die reaktiven Isothiocyanatgruppen der Platte **58** abgesättigt sind. Auf einige WGA-Liganden, die bereits in meiner Diplomarbeit mit dem herkömmlichen PSM-Assay untersucht wurden, wurde nun der modifizierte Assay angewandt, damit man Aussagen über die Eignung des modifizierten Assays treffen kann. Ein Vergleich der Ergebnisse, die durch die beiden Assays erhalten wurden, zeigte, dass die IC_{50} -Werte, die mit den kovalent modifizierten Platten bestimmt wurden, wesentlich niedriger sind als die mit den PSM-beschichteten Platten. Die deutlich bessere Differenzierung zwischen Liganden unterschiedlicher Valenz führt zudem auch zu signifikant höheren relativen inhibitorischen Potenzen (β -Werten). Zusätzlich konnte nun mit allen Liganden im Gegensatz zum PSM-Assay eine maximale Inhibition von 100 % erreicht werden. Durch die viel geringeren Konzentrationen, die zur Bestimmung der IC_{50} -Werte erforderlich sind, stellte auch die begrenzte Wasserlöslichkeit einiger Liganden nun kein Problem mehr dar. Um zu untersuchen, ob die niedrigeren IC_{50} -Werte, die mit dem modifizierten Assay erhalten wurden, aus einer unterschiedlichen Bindungsaffinität von WGA an die verschiedenen immobilisierten Referenzliganden resultiert, wurde die Bindungsaffinität von WGA-HRP einerseits an die PSM-beschichteten Platten und andererseits an die kovalent modifizierten Platten bestimmt. Dabei wurde erwartet, dass die niedrigeren IC_{50} -Werte aus einer

signifikant niedrigeren Bindungsaffinität des Lectins an die kovalent modifizierte Platte resultieren. Überraschenderweise wurde jedoch erhalten, dass die Bindungsaffinität von WGA-HRP an die kovalent modifizierte Oberfläche geringfügig höher ist als an die PSM-beschichtete Platte. Dieser Befund erklärt somit nicht die beobachteten niedrigeren IC_{50} -Werte.

Diese Ergebnisse unterstreichen die Wichtigkeit der Topologie der Kohlenhydrat-Präsentation auf Oberflächen wie z. B. Zellmembranen oder Kohlenhydrat-Mikroarrays für die Affinität und Spezifität von Kohlenhydrat-Lectin-Wechselwirkungen.

Die ultimative Antwort auf die Frage, wie ein Ligand mit einem Protein interagiert, stellt sicherlich eine räumliche 3D-Struktur des entsprechenden Ligand-Protein-Komplexes dar. Ein kombinierter Ansatz aus Röntgenkristallographie und NMR-Spektroskopie ist für diese Fragestellung sehr wertvoll, da man neben der Kristallstruktur auch Informationen über die Dynamik des Komplexes in Lösung erhält. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe Möller wurde die Konformation des Neoglycopeptids **16** in Lösung durch eine NMR-basierte Konformationsanalyse aufgeklärt.^[251] Die räumliche Anordnung der GlcNAc-Anknüpfungspunkte der vier D-Dab-Seitenketten ist durch die Rückgratstruktur des cyclischen Neoglycopeptids **16** definiert (Abbildung 40). Es wurde eine gute Übereinstimmung der neun günstigsten Konformationen der peptidischen Rückgratstruktur gefunden, die aber dennoch eine gewisse Flexibilität des Peptid-Rückgrats zeigen. Die Vorzugsorientierungen der GlcNAc-Reste sind gut zu erkennen. Durch das cyclische Peptidrückgrat wird somit eine bestimmte Präorganisation der Zuckerreste vorgegeben, die eine effiziente Bindung an WGA ermöglicht.

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe Welte wurde zur Strukturaufklärung der Interaktion des bivalenten Liganden **46** mit kurzem Linker sowie des cyclischen Neoglycopeptids **16** mit WGA eine Röntgenstrukturanalyse entsprechender Komplexe durchgeführt. Die erhaltene Kristallstruktur der bivalenten Verbindung **46** im Komplex mit WGA 3 (Abbildung 43) zeigt bemerkenswerterweise, dass alle acht Kohlenhydrat-Bindungsstellen im WGA 3-Dimer durch vier bivalente Liganden **46** besetzt sind. Dies ist die erste Kristallstruktur von WGA, bei der alle Bindungsstellen besetzt sind. Eine intermolekulare Überbrückung von zwei Bindungsstellen benachbarter WGA-Moleküle kann ausgeschlossen werden, da die Orientierung der Kristallnachbarn zueinander dies nicht erlaubt. Es zeigt sich zudem, dass nur der GlcNAc-Teil des bivalenten Liganden **46** im direkten Kontakt mit WGA über Wasserstoffbrücken und π -Wechsel-

wirkungen steht (Abbildung 45). Der Linker-Anteil interagiert nicht mit dem Lectin. Die Länge des Linkers zwischen den zwei Zuckerresten eignet sich sehr gut, um den Abstand zweier Bindungsstellen zu überbrücken. Daher kann die hohe Bindungsaffinität des bivalenten Liganden **46** gegenüber WGA mit einer paarweisen Anordnung der GlcNAc-Reste erklärt werden, die sehr gut in die paarweise angeordneten Bindungsstellen des Lectins passen.

Die Röntgenstrukturanalyse der Kristalle von WGA mit dem tetravalenten Cyclopeptid **16** ergab, dass das WGA 1-Dimer zwei gebundene Liganden **16** enthält (Abbildung 46). Die Kristallstruktur zeigt, dass nur die Zuckerreste an den Seitenketten von D-Dab⁴ und D-Dab⁵ und das D-Dab⁴-D-Dab⁵-Dipeptid-Fragment geordnet sind, wohingegen der Rest des jeweiligen Glycopeptids ungeordnet vorliegt. Der Bindungsmodus des Kohlenhydrat-Anteils des tetravalenten Liganden **16** ist identisch zu dem des bivalenten Liganden **46**. Es existieren wieder keine Wechselwirkungen zwischen der Linker-Region bzw. des D-Dab⁴-D-Dab⁵-Dipeptid-Fragments mit dem Lectin. Die Bindungsstellenpaare B1C2 – C2B1 und B2C1 – C1B2 werden jeweils durch die Zuckerreste an den Seitenketten von D-Dab⁴ und D-Dab⁵ in einer ähnlichen Weise wie durch den bivalenten Liganden **46** überbrückt. Beim Betrachten der Überlagerung der entsprechenden Lectin-Ligand-Strukturen wird offensichtlich, dass das D-Dab⁴-D-Dab⁵-Dipeptid-Fragment des Cyclopeptids **16** sogar noch besser in die Bindungsstelle passt als der Linker des bivalenten Liganden **46** (Abbildung 48, rechts). Diese Tatsache trägt sicherlich zu der hohen Affinität des Cyclopeptids bei. Zudem sind zwei zusätzliche Zuckerreste im Liganden **16** vorhanden, die nicht zugänglich sind für weitere Bindungsstellen des quervernetzten WGA-Kristalls. Diese könnten aber in Lösung mit zusätzlichen WGA-Molekülen interagieren und somit zu der hohen Affinität beitragen.

Eine Überlagerung der Strukturen, die durch NMR bzw. Röntgenkristallographie erhalten wurden, zeigte, dass die Rückgratstruktur des Cyclopeptids **16** im Kristall sehr gut mit der Struktur in Lösung übereinstimmt. Die Zuckerreste sind bereits im freien Zustand präorganisiert. Die hohe Affinität des Cyclopeptids **16** gegenüber WGA stammt somit von der richtigen räumlichen Präsentation der zwei benachbarten Zuckerreste von D-Dab⁴ und D-Dab⁵ und der daraus resultierenden perfekten Passform an die Bindungsstellen.

Diese Ergebnisse führten zu der Fragestellung, ob die Präorganisation auch in einem entsprechenden linearen tetravalenten Peptid existiert und welche Rolle die Länge des Linkers in einem solchen spielt. Daher wurde ein tetravalentes lineares Peptid sowohl mit verkürztem (**63**) als auch mit längerem Kohlenhydrat-Peptid-Linker (**76**) synthetisiert (Abbildung 128). Dabei konnten die Reaktionsbedingungen zur Zuckeranknüpfung optimiert werden und es wurde gezeigt, dass die

anschließende Deacetylierung der Glycopeptide in Lösung der Entschützung an fester Phase vorzuziehen ist.

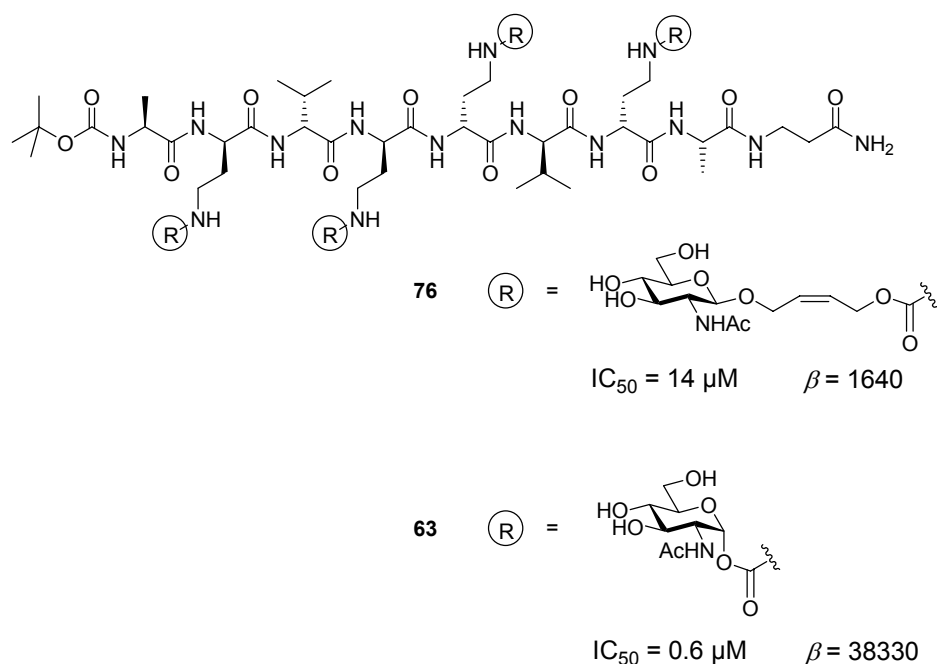


Abbildung 128. Synthetisierte lineare Neoglycopeptide **76** und **63**.

Bei der Bestimmung der Bindungsaffinitäten der tetravalenten cyclischen Peptide **15** und **16** mit dem in dieser Arbeit etablierten PSM-freien ELLA konnte die höhere Bindungsaffinität des cyclischen Peptids mit verkürztem Linker **16** ($\text{IC}_{50} = 0.9 \mu\text{M}$, $\beta = 25560$) gegenüber der des cyclischen Peptids mit längerem Linker **15** ($\text{IC}_{50} = 16 \mu\text{M}$, $\beta = 1440$) bestätigt werden. Bei der anschließenden Bestimmung der Bindungsaffinitäten der linearen Peptide **76** und **63** wurden erstaunlicherweise jeweils fast gleiche Affinitäten wie für die cyclischen Analoga **15** bzw. **16** erhalten. Dies bedeutet, dass auch das lineare Peptid mit verkürztem Linker **63** besser bindet als das lineare mit längerem Linker **76**. Da das lineare Peptid mit kurzem Linker **63** die gleiche Affinität wie sein cyclisches Analogon **16** besitzt, liegt vermutlich auch im linearen Peptid eine Präorganisation der Zuckerreste vor, wodurch die signifikant höhere Affinität erreicht wird. Das lineare Peptidrückgrat scheint also die gleiche Konformation wie das cyclische einzunehmen und ermöglicht somit eine ebenso perfekte Anordnung der Zuckerreste für die Bindung an WGA.

Da die Kristallstruktur von Cyclopeptid **16** mit WGA 1 zeigt, dass nur die Zuckerreste an den Seitenketten von D-Dab⁴ und D-Dab⁵ und das D-Dab⁴-D-Dab⁵-Dipeptid-Fragment geordnet

vorliegen, wurde das entsprechende Dipeptid **77** synthetisiert, um zu überprüfen, ob bereits dieses Fragment für eine hohe Affinität ausreichend ist (Abbildung 129).

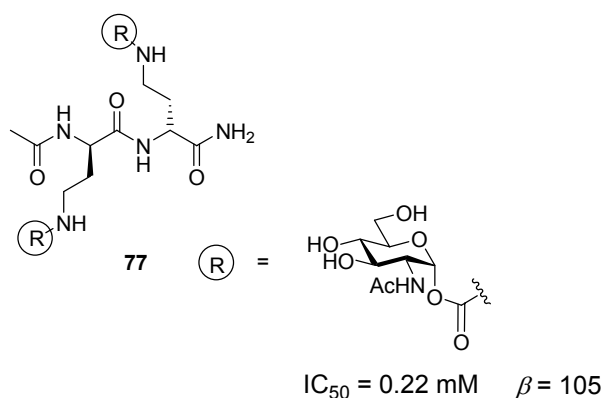


Abbildung 129. Synthetisiertes D-Dab-D-Dab-Dipeptid **77**.

Bei Bestimmung der Bindungsaffinität wurde ein IC_{50} -Wert von 0.22 mM ($\beta = 105$) ermittelt. Somit inhibiert das bivalente Dipeptid **77** die Bindung von WGA-HRP an die Oberflächen-immobilisierten Zucker deutlich besser als GlcNAc, aber es besitzt eine signifikant schlechtere Affinität gegenüber WGA als das lineare tetravalente Peptid **63** oder das entsprechende tetravalente Cyclopeptid **16**. Das bedeutet entweder, dass die Rückgratstruktur des Dipeptids **77** zu kurz und flexibel ist und somit keine bestimmte Präorganisation der beiden Zuckerreste ermöglicht, oder dass die beiden Zuckerreste an D-Dab² und D-Dab⁷ im linearen Peptid **63** bzw. im Cyclopeptid **16** eine wichtige Rolle spielen. Obwohl diese beiden Zuckerreste wie auch der gesamte Peptidrest im Kristall mit WGA völlig ungeordnet vorliegen, könnten sie in Lösung weitere WGA-Moleküle binden und somit zu der hohen Affinität beitragen. Ein Hinweis hierauf ergibt sich möglicherweise aus der Beobachtung, dass native WGA-Kristalle nach der Zugabe des Cyclopeptids **16** brachen und sich auflösten. Ein Cyclopeptid könnte demnach zwei WGA-Moleküle verbrücken und somit die vorherrschende Kristallstruktur zerstören. Diese Beobachtung könnte darauf deuten, dass ein gebundenes Cyclopeptid tatsächlich an ein weiteres WGA-Molekül bindet und somit die vorherrschende Kristallstruktur zerstört. Vor diesem Hintergrund wäre es sehr interessant, die Affinität eines cyclischen und eines linearen Peptids, bei denen die beiden Zuckerreste an D-Dab² und D-Dab⁷ fehlen, zu bestimmen. Es wäre auch interessant zu überprüfen, ob eine schrittweise C- und N-terminale Anknüpfung der Aminosäuren am D-Dab⁴-D-Dab⁵-Dipeptid-Fragment ab einer bestimmten Sequenzlänge zu einer Erhöhung der Affinität führt, oder sogar die Affinität des tetravalenten linearen Peptids **63** bzw. des tetravalenten

Bei der Synthese des Cyclopeptids **108** konnten die Reaktionsbedingungen zur Cyclisierung verbessert werden. Analog zu den modifizierten Mikrotiterplatten wurden kommerziell erhältliche Amin-modifizierte Glasträger **84** mit 1,4-Phenylendiisothiocyanat funktionalisiert, um eine Amin-reaktive Oberfläche **85** zu erzeugen. Das Aufbringen der Proben **56**, **95** bzw. **108** auf die Glasträger **85** geschah mit Hilfe eines Computer-gesteuerten Spotters. Für diesen Vorgang und die anschließende Immobilisierungsreaktion über Nacht konnten die Bedingungen (Lösungsmittel, Luftfeuchtigkeit) so optimiert werden, dass homogene Spots mit einheitlicher Größe erhalten wurden. Bei den anschließenden Inkubationsexperimenten mit dem fluoreszenten WGA-Rhodamin-Konjugat wurde beobachtet, dass vor allem bei Verwendung von kleinen Lectin-Konzentrationen und geringen Lösungsvolumina die Spots keine homogene Morphologie zeigten. Es wurde vermutet, dass dieses Ergebnis durch unzureichende Mengen an Lectin verursacht wurde, sodass nicht alle Zuckerreste abgesättigt wurden. Durch einige Experimente mit größeren Volumina an Lectin-Lösung und verlängerten Inkubationszeiten konnte die Vermutung bestätigt und das Problem behoben werden.

Zur Erzeugung unterschiedlicher Zucker-Beladungsdichten auf der Glasoberfläche wurde die jeweilige Lösung von **56**, **95** bzw. **108** durch Zugabe des Derivats **86** verdünnt. Dieses Derivat besitzt den gleichen Linker und somit auch die Aminogruppe zur kovalenten Immobilisierung wie Verbindung **56**, ihm fehlt aber der Zuckerrest, um an einer Lectin-Erkennung teilzunehmen. Verbindung **86** wurde ausgehend von *cis*-2-Buten-1,4-diol in drei Stufen synthetisiert. Somit wurde die Beladungsdichte direkt durch Verdünnung mit Derivat **86** gesteuert und der jeweilige Molenbruch als Parameter für die Oberflächendichte herangezogen. Durch Zugabe des fluoreszenten WGA-Rhodamin-Konjugats wurde die Bindung des Lectins an die in unterschiedlicher Oberflächendichte immobilisierten Zuckerreste untersucht. Tabelle 10 gibt eine Übersicht über die ermittelten $K_{D,surf}$ -Werte für die Bindung von WGA-Rhodamin an die unterschiedlichen Oberflächen. Tabelle 10 zeigt, dass der $K_{D,surf}$ -Wert für die Bindung des Lectins an die durch die monovalente Verbindung **56** erzeugte Oberfläche vom Molenbruch $X = 0.9$ bis $X = 0.1$, d. h. mit abnehmender Oberflächendichte an **56**, um den Faktor 147 zunimmt. Das bedeutet, dass wie erwartet bei einer hohen Zuckerdichte auf der Glasoberfläche eine multivalente Bindung zwischen WGA und monovalenten Liganden möglich ist. Die Chip-Oberfläche kann somit tatsächlich als multivalente Präsentation aufgefasst werden.

Tabelle 10. $K_{D,surf}$ -Werte für verschiedene Oberflächendichten an **56**, **95** und **108**.

X	56: $K_{D,surf}$ / nM ($c_{ges} = 5$ mM)	95: $K_{D,surf}$ / nM ($c_{ges} = 5$ mM)	108: $K_{D,surf}$ / nM ($c_{ges} = 200$ μ M)
0.9	26 ± 7	4.4 ± 0.8	4.9 ± 1.5
0.6	295 ± 73	5.6 ± 1.3	4.1 ± 1.2
0.4	1170 ± 220	8.1 ± 2.2	3.0 ± 0.8
0.2	3100 ± 1000	9.6 ± 3.0	3.3 ± 0.6
0.1	3827 ± 2800	7.1 ± 2.5	4.7 ± 1.0

Bei Erniedrigung der Zuckerdichte wird der Abstand zwischen zwei monovalenten Liganden immer größer, sodass dieser nicht mehr durch ein WGA-Molekül überbrückt werden kann. Dadurch nimmt die Affinität des Lectins gegenüber der Oberfläche deutlich ab. Bei unseren ELLA-Experimenten in Lösung wurden im Vergleich von GlcNAc mit verschiedenen bivalenten Liganden (d. h. bei einer Verdopplung der Zuckerdichte) relative inhibitorische Potenzen β zwischen 31 (Verbindung **60**) und 2347 (Verbindung **45**) gefunden. Für die Veränderung der $K_{D,surf}$ -Werte bei erhöhter Zuckerdichte der monovalenten Verbindung **56** sollte daher ein Faktor in diesem Bereich erwartet werden. Der beobachtete Faktor von mehr als zwei Größenordnungen liegt somit im Rahmen der Erwartungen. Im Gegensatz hierzu wurden von Wong und Mitarbeitern lediglich Faktoren von maximal 2-3 berichtet.^[140] Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass die in ihren Arbeiten eingesetzte Methode die Erzeugung ausreichend niedriger Oberflächendichten nicht gestattete.

Tabelle 10 zeigt, dass die $K_{D,surf}$ -Werte für die Bindung des Lectins an die Oberfläche mit abnehmender Oberflächendichte an **95** im Gegensatz zu **56** kaum zunehmen (etwa Faktor zwei). Dieses Ergebnis bestätigt somit die in Kapitel 3 formulierte Hypothese. Eine Erniedrigung der Zuckerdichte der bivalenten Verbindung **95** bewirkt zwar ebenso, dass der Abstand zwischen zwei bivalenten Liganden größer wird. Dadurch kann der Abstand zwischen den Liganden ab einer bestimmten Dichte nicht mehr „inter“-molekular von einem WGA-Molekül überbrückt werden. Wie erwartet kann WGA aber weiterhin „intra“-molekular in bivalenter Weise mit dem Liganden interagieren. Dadurch nimmt die Affinität des Lectins gegenüber der Oberfläche nur geringfügig ab. Der beobachtete Unterschied der $K_{D,surf}$ -Werte bei einem Molenbruch $X = 0.1$ bis 0.2 für die monovalente Verbindung **56** ($K_{D,surf} = 3100$ - 3827 nM) bzw. für die bivalente Verbindung **95** ($K_{D,surf} = 7.1$ - 9.6 nM) spiegelt die Situation in Lösung wesentlich besser wider. Dort zeigte das

bivalente Dipeptid **77** eine um einen Faktor von 55 höhere inhibitorische Potenz als das monovalente Hydroxybutenylglycosid **50**.

Bei Betrachtung der ermittelten $K_{D,surf}$ -Werte für die Bindung des Lectins an die durch das tetravalente Glycopeptid **108** erzeugte Oberfläche zeigt sich, dass sich die Bindungsaffinität bei abnehmender Oberflächendichte an **108** nicht ändert. Bei einer Gesamtkonzentration von nur 200 μ M (im Vergleich zu 5 mM bei **56** bzw. **96**) scheint auch bei Erniedrigung der Zuckerdichte eine multivalente Bindung immer noch möglich zu sein. Da für die tetravalente Verbindung **108** eine geringere Gesamtkonzentration verwendet wurde als für die mono- und bivalente Verbindung **56** bzw. **96**, ist es in diesem Fall schwierig, die Ergebnisse untereinander zu vergleichen. Es ist nicht abschätzbar, ob oder wie sich die $K_{D,surf}$ -Werte für Verbindung **108** bei einer höheren Gesamtkonzentration von 5 mM ändern würden.

Mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass man mit der Wahl eines geeigneten Chipsystems Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen quantitativ analysieren kann. Die Chip-Oberfläche kann als multivalente Präsentation aufgefasst werden, die je nach Beladungsdichte des monovalenten Kohlenhydratderivats **56** mit dem Lectin sowohl eine monovalente als auch eine multivalente Bindung eingehen kann. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Versuchen von Kahne und Mitarbeitern, die den Einfluss verschiedener Kohlenhydratdichten, erzeugt durch SAMs von monovalenten Liganden, auf die Lectin-Bindung mittels SPR untersuchten.^[235] Sie zogen den Schluss, dass auch bei einer geringen Kohlenhydratdichte noch eine multivalente Bindung des Lectins an die Oberflächen-immobilisierten Zucker ermöglicht ist. Die Erzeugung von SAMs führt offensichtlich zu sehr hohen Beladungsdichten, die auch bei starker Verdünnung möglicherweise keine rein monovalente Interaktion mit dem Lectin ermöglichen.

Das in dieser Arbeit entwickelte Chipsystem ermöglicht eine umfassende Untersuchung von Kohlenhydrat-Lectin-Wechselwirkungen. Die kontrollierte Einstellung der Beladungsdichte der festen Phase ist hierbei als besonderer Vorteil zu erwähnen. So wäre es zum Beispiel interessant zu untersuchen, wie sich unterschiedliche Oberflächendichten mono- oder multivalenter Liganden auf die IC_{50} -Werte löslicher Liganden auswirken. Es ist anzunehmen, dass durch entsprechende Experimente weitere Einsichten in biologische Erkennungsvorgänge, wie sie z. B. auf Zelloberflächen stattfinden, erhalten werden können.

6 Experimenteller Teil

6.1 Chemische Arbeiten

6.1.1 Allgemeine Angaben

Zur analytischen **Dünnschichtchromatographie** wurden Kieselgel 60 F₂₅₄ DC-Alufolien der Firma Merck verwendet. UV-aktive Substanzen wurden mit einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 254 nm detektiert. Zur Anfärbung wurden folgende Tauchreagenzien verwendet:

1 %ige Kaliumpermanganat-Lösung in 1 M wässriger Na₂CO₃-Lösung

15 %ige Schwefelsäure

Die DC-Folien wurden nach Behandlung mit einem dieser Tauchreagenzien durch Wärmebehandlung visualisiert. Alle R_F-Werte wurden bei Kammersättigung ermittelt.

Zur **Flash-Chromatographie** wurde Kieselgel 60 mit der Korngröße 0.04-0.063 mm von der Firma Merck als Trennmaterial verwendet. Die technischen Lösungsmittel wurden vor Benutzung destilliert.

RP-HPLC-Analytik und **-Trennung** erfolgte an einer LC-20A prominence-Anlage (Hochdruckpumpen LC-20AT, Autosampler SIL-20A, Säulenofen CTO-20AC, Detektor SPD-M20A, Controller CBM-20A und Software LC-Solution) der Firma Shimadzu.

Analytische Säulen:

Eurospher 100-5 C18, 250 x 4 mm Knauer

Nucleosil 100-5 C18, 250 x 4 mm Knauer

Vydac 300-5 C18, 250 x 4.6 mm Vydac

Semi-präparative Säulen:

Eurospher 100-5 C18, 250 x 8 mm Knauer

Nucleosil 100-5 C18, 250 x 8 mm Knauer

Präparative Säulen:

Eurospher 100-5 C18, 250 x 16 mm Knauer

Vydac 300-5 C18, 250 x 22 mm Vydac

Eluenten:

- a) A: 0.1 % TFA in H₂O; B: 0.1 % TFA in MeCN
b) A: 0.1 % HCOOH in H₂O B: 0.1 % HCOOH in MeCN

Die **Synthese einzelner Peptide** erfolgte an einem automatisierten Peptidsynthesizer ABI 433A von Applied Biosystems unter Verwendung der FastMoc-Chemistry-Datei.

Die gemessenen **Kernresonanzspektren** wurden auf den Geräten AC 250, Avance 400 und Avance DRX 600 der Firma Bruker aufgenommen. Als interner Standard dienten die Resonanzsignale der nicht vollständig deuterierten Lösungsmittel. Die Zuordnung der Signale wurde durch zweidimensionale NMR-Aufnahmetechniken (DQF-COSY, HMQC, ROESY, TOCSY) erleichtert bzw. erst ermöglicht. Alle Spektren wurden bei 300 K aufgenommen. Für die Angabe der Multiplizität wurden folgende Abkürzungen verwendet: br. = breites Signal, s = Singulett, d = Dublett, dd = Doppeldublett, t = Triplett, q = Quadruplett, quin = Quintuplett, m = Multiplett. Geminale Protonen wurden durch Buchstaben unterschieden.

MALDI-TOF-Massenspektren wurden mit einem Bruker Biflex III Spektrometer im positiven Modus mit einem gepulsten Stickstofflaser (337 nm) aufgenommen. Es wurde Cyanohydroxy-Zimtsäure als Matrix verwendet. Zur Probenpräparation wurden je 0.5 µL der Matrixlösung und 0.5 µL der Probenlösung (ca. 1 mg/mL) auf das Target pipettiert und bei Raumtemperatur kristallisiert.

ESI-Massenspektren wurden an einem Esquire 3000 plus der Firma Bruker Daltonics im positiven Modus gemessen. Die Proben (ca. 1 µg/mL) wurden dabei mit einer Flussrate von 3 µL/min eingespritzt.

Hochaufgelöste Massenspektren (ESI-TOF) wurden an einem micrOTOF II der Firma Bruker Daltonics im positiven Modus gemessen.

UV-Absorptionsspektren wurden mit einem Cary 50-Einstrahlspektrometer von Varian in Präzisions-Küvetten aus Quarzglas Suprasil aufgenommen.

Elementaranalysen wurden im mikroanalytischen Labor der Universität angefertigt.

6.1.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften

AAV 1: Bestimmung der Harzbeladungsdichte

Für die photometrische Bestimmung der Harzbeladung wird zuerst eine Eichgerade erstellt. Dafür wird von Fmoc- β -Ala-OH eine Verdünnungsreihe in 20 % Piperidin in DMF hergestellt (257 μ M, 123 μ M, 59 μ M) und die Absorption der jeweiligen Lösung bei 301 nm bestimmt. Durch Auftragung der Konzentration gegen die gemessene Absorption wird die Eichgerade $A = 0.0081 \times c$ mit $A =$ Absorption (bei 301 nm), $c =$ Konzentration in μ M erhalten.

Zur anschließenden Bestimmung der Beladungsdichte des Harzes wird eine kleine Menge Harz (3 - 4 mg) exakt eingewogen, mit 20 % Piperidin in DMF (3 mL) behandelt und dann die Absorption bei 301 nm gemessen. Über die Gleichung der Eichgeraden wird die Konzentration der Abspaltung und darüber die Beladungsdichte (mmol/g) berechnet.

AAV 2: Peptidkupplung an fester Phase

Das Harz wird in eine Einwegspritze mit eingesetzter Fritte eingewogen. Zunächst lässt man das Harz 10 Minuten in DMF quellen. Dann saugt man ab und zieht eine Lösung aus 20 % Piperidin in DMF auf und schüttelt für drei Minuten. Es wird abgesaugt und noch einmal für 15 Minuten mit Piperidin-Lösung geschüttelt. Die Vollständigkeit der Fmoc-Abspaltung wird hierbei durch Absorptionsmessung des entstehenden Dibenzofulvens bzw. des Piperidin-Adduktes im Wellenlängenbereich von 280 – 330 nm der jeweiligen Abspaltung detektiert. Nach Absaugen wird achtmal je eine Minute mit DMF und zweimal eine Minute mit NMP gewaschen. Die anzukuppelnde Aminosäure (4 eq), HBTU (3.8 eq), HOBt (6 eq) und DIPEA (8 eq) (bzw. jeweils die Hälfte, falls Xaa= Fmoc-D-Dab(Ddv)-OH) werden in NMP gelöst und aufgezogen. Nach 3-6 h Kupplungszeit (bzw. über Nacht wenn es sich um die Ankupplung der ersten Aminosäure Fmoc- β -Ala-OH handelt) wird abgesaugt und zehnmal eine Minute mit DMF und zweimal drei Minuten mit CH_2Cl_2 gewaschen. Das Harz wird im Vakuum getrocknet und die Überprüfung der Vollständigkeit der Kupplung mit Kaiser-Test nach **AAV 5** und TNBS-Test nach **AAV 6** überprüft. Falls eine Nachkupplung nötig ist, wird die Kupplung analog oben erneut durchgeführt.

AAV 3: Kaiser-Test^[257]

Die bei unvollständiger Kupplung verbleibenden primären Aminogruppen können mit Hilfe des Kaiser-Tests detektiert werden. Man gibt eine Spatelspitze Harz in ein Eppendorf-Gefäß. Durch Zugabe von je drei Tropfen der folgenden Lösungen A-C und anschließender Erwärmung für 5 Minuten auf 100°C im Wasserbad, färben sich die Harzkugeln und/oder die Lösung bei unvollständiger Kupplung blau.

Lösung A: 5 g Ninhydrin in 100 mL Ethanol

Lösung B: 2 mL 0.001 M KCN (aq) in 98 mL Pyridin

Lösung C: 80 g Phenol in 20 mL Ethanol

AAV 4: TNBS-Test^[258]

Die bei unvollständiger Kupplung verbleibenden primären Aminogruppen können mit Hilfe des TNBS-Tests detektiert werden. Man gibt wenige Kugeln Harz in eine Petrischale. Durch Zugabe von je einem Tropfen der folgenden Lösungen A und B färben sich die Harzkugeln bei unvollständiger Kupplung gelb-orange. Die Färbung ist durch Betrachten der Kugeln unter dem Mikroskop besonders gut erkennbar.

Lösung A: 1 % TNBS in DMF

Lösung B: 10 % DIPEA in DMF

AAV 5: Acetylierung des N-Terminus an fester Phase

Man lässt das Harz für 10 Minuten in DMF quellen, saugt ab und schüttelt zweimal für 15 Minuten mit einer Lösung von 10 % Ac₂O in DMF. Dann wird abgesaugt und zehnmal für eine Minute mit DMF gewaschen. Nach Überprüfung der Vollständigkeit der Acetylierung mit Kaiser-Test nach **AAV 3** und TNBS-Test nach **AAV 4** wird noch zweimal für drei Minuten mit gewaschen und das Harz anschließend im Vakuum getrocknet.

AAV 6: Abspaltung der Ddv-Schutzgruppe an fester Phase

Man lässt das Harz 10 Minuten in DMF quellen. Nach Absaugen wird mindestens sechsmal 5 Minuten mit 4 %iger Hydrazinhydrat-Lösung in DMF geschüttelt. Die Vollständigkeit der Abspaltung wird durch Absorptionsmessung des entstehenden Tetrahydroindazol-Derivats **62** im

Wellenlängenbereich von 250 – 350 nm der jeweiligen Abspalllösung detektiert. Anschließend wird zehnmal eine Minute mit DMF gewaschen und das Harz im Vakuum getrocknet.

AAV 7: Kohlenhydrat-Ankupplung an fester Phase

Man lässt das Harz in einer Lösung von DIPEA (1.5 eq pro freie Aminogruppe) in 25 % DMSO in DMF für 10 Minuten quellen. Man saugt ab und zieht eine Lösung des Carbonat-funktionalisierten Zuckerderivats **12** oder **13** (1.5 eq pro freie Aminogruppe) und DIPEA (1.5 eq pro freie Aminogruppe) in 25 % DMSO in DMF auf und schüttelt über Nacht. Nach Absaugen wird zehnmal für eine Minute mit DMF und fünfmal für zwei Minuten mit CH₂Cl₂ gewaschen. Anschließend wird die Vollständigkeit der Reaktion durch Test auf freie Aminogruppen nach **AAV 3** und **AAV 4** geprüft und gegebenenfalls erneut bis zur Vollständigkeit der Reaktion analog oben mit Carbonat-funktionalisiertem Zuckerderivat **12** bzw. **13** versetzt. Anschließend wird das Harz im Vakuum getrocknet.

AAV 8: Deacetylierung an fester Phase

Das Harz wird mit einer 27 mM NaOMe-Lösung in abs. MeOH versetzt und 3-4 Stunden geschüttelt. Nach Absaugen wird fünfmal für eine Minute mit MeOH, fünfmal für eine Minute mit DMF und dreimal für drei Minuten mit CH₂Cl₂ gewaschen und das Harz anschließend im Vakuum getrocknet.

AAV 9: Abspaltung vom Sieber-Amid-Harz

Man lässt das Harz für 10 Minuten in CH₂Cl₂ quellen. Nach Absaugen wird mit einer Lösung von TFA/TIS/CH₂Cl₂ = 1:1:98 einmal für zehn Minuten geschüttelt, abgesaugt und dann noch dreimal für zwei Minuten geschüttelt und abgesaugt. Danach wird mit einer Lösung von TFA/TIS/Mix = 1:1:98 (Mix: CH₂Cl₂/TFE = 3:1) einmal für fünf Minuten geschüttelt, abgesaugt und dann noch zweimal für zwei Minuten geschüttelt und abgesaugt. Anschließend wird das Harz je zweimal für je zwei Minuten mit TFE, Mix, MeOH und CH₂Cl₂ gewaschen und abgesaugt. Die vereinigten Filtrate werden mit Pyridin neutralisiert, im Vakuum aufkonzentriert und durch RP-HPLC aufgereinigt.

AAV 10: Abspaltung der Boc-Schutzgruppe in Lösung

Das acetylierte Glycopeptid wird mit abs. CH_2Cl_2 (2 Teile) versetzt und auf 0°C gekühlt. Dann wird TFA (1 Teil) zugegeben und für zehn Minuten bei 0°C gerührt. Danach wird für 30 Minuten bei Raumtemperatur weitergerührt; die Lösung wird anschließend in das 10fache Volumen eiskalten *tert*-Butylmethylethers getropft, wobei das Peptid ausfällt. Die Lösung wird über Nacht in den Eisschrank gestellt. Dann zentrifugiert man bei 4500 U/min für 30 Minuten bei 4°C und kippt die überstehende Lösung ab. Der Rückstand wird in Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Die Mutterlauge wird eingengt und zur eventuellen weiteren Fällung wieder in den Eisschrank gestellt. Anschließend wird das Produkt mittels RP-HPLC aufgereinigt.

AAV 11: Deacetylierung in Lösung mit/ohne freier Aminogruppe

Das acetylierte Glycopeptid wird mit einer 27 mM NaOMe-Lösung in abs. $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3 = 1:1$ versetzt und 3-4 Stunden gerührt. Falls eine freie Aminogruppe vorhanden ist, wird zur Vermeidung der Acetylwanderung auf die Aminogruppe zusätzlich Propylamin (2 eq pro zu entschützender *O*-Acetylgruppe) während der Deacetylierung zugesetzt. Anschließend wird mit 30 % Essigsäure neutralisiert, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Produkt per RP-HPLC aufgereinigt.

AAV 12: Abspaltung vom Rink-Amid-Harz (und gleichzeitige Abspaltung der Boc-Schutzgruppe falls vorhanden)

Das Harz wird mit einer Lösung von TFA/TIS/Wasser = 95:2.5:2.5 für drei Stunden geschüttelt. Die Lösung wird dann in das 10fache Volumen eiskalten *tert*-Butylmethylethers getropft, wobei das Peptid ausfällt. Dann wird das Harz noch ein weiteres Mal mit der Abspalllösung für eine Stunde geschüttelt und die Lösung anschließend in *tert*-Butylmethylethers getropft. Dann schüttelt man zweimal für zwei Minuten mit TFA und gibt sie ebenfalls in den Ether. Die vereinigte organische Phase wird über Nacht in den Eisschrank gestellt. Dann zentrifugiert man bei 4500 U/min für 30 Minuten bei 4°C , kippt die überstehende Lösung ab, resuspendiert das Pellet in *tert*-Butylmethylether und zentrifugiert erneut. Danach wird der Rückstand in Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Anschließend wird das Produkt mittels RP-HPLC aufgereinigt.

AAV 13: Abspalten der Aloc-Schutzgruppe und des Allylesters an fester Phase

Zunächst lässt man das Harz 10 Minuten in CH_2Cl_2 quellen. Man saugt ab und zieht eine Lösung von $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4]$ (0.8 eq pro Aloc- bzw Allyl- Schutzgruppe) und BH_3HNMe_2 (15 eq pro Aloc- bzw Allyl- Schutzgruppe) in CH_2Cl_2 auf und schüttelt unter Lichtausschluss für 20 Minuten. Es wird abgesaugt und noch einmal mit frischer Abspalt-Lösung für 20 Minuten geschüttelt. Nach Absaugen wird zehnmal für zwei Minuten mit DMF, dreimal für eine Minute mit 0.5 %iger Natriumdiethyldithiocarbamat-Lösung in DMF, zehnmal für eine Minute mit DMF und viermal für zwei Minuten mit CH_2Cl_2 gewaschen. Anschließend wird das Harz im Vakuum getrocknet.

AAV 14: Cyclisierung an fester Phase

Das Harz lässt man zuerst in 25 % DMSO in DMF für 10 Minuten quellen. Nach Absaugen zieht man eine Lösung von PyBOP (4 eq), HOBt (4 eq) und DIPEA (8 eq) in 25 % DMSO in DMF auf und schüttelt mindestens über Nacht. Man saugt ab und wäscht sechsmal für zwei Minuten mit DMF und dreimal für zwei Minuten mit CH_2Cl_2 . Nach dem Test auf freie Aminogruppen nach **AAV 3** und **AAV 4** wird gegebenenfalls erneut analog oben bis zur Vollständigkeit cyclisiert. Anschließend wird das Harz im Vakuum getrocknet.

AAV 15: Synthese am Peptidsynthesizer ABI 433A

Am Synthesizer werden für einen 20 μmol -Ansatz folgende Lösungen verwendet:

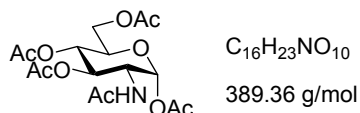
- a) Piperidin (biotech grade)
- b) 0.38 M HBTU in DMF (peptide grade)
- c) 1.60 M DIPEA in DMF (peptide grade)
- d) CH_2Cl_2 (peptide grade)
- e) NMP (peptide grade)

Es wird das Programm „PrPK Fmoc Depro/Single“ verwendet. Vor der Synthese werden zur Kontrolle der Liefermengen an Reagenzien die entsprechenden Flow-Tests durchgeführt. Anschließend werden die erstellten sequence-, run- und chemistry-files auf den Synthesizer geladen. Die entsprechende Harzmenge (20 μmol) wird in das Reaktionsgefäß eingewogen und die Aminosäuren werden gelöst in NMP (1 mmol in 4 mL) in die jeweiligen Kartuschen gegeben (440 μL) und in die Schiene eingespannt. Nach Fixieren des Reaktionsgefäßes wird die Synthese

gestartet. Nach erfolgter Synthese wird das Harz in eine mit einer Fritte versehene Spritze umgefüllt.

6.1.3 Synthetisierte Kohlenhydrat-Derivate und Linker

2-Acetamido-1,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-glucopyranose **18**^[236]



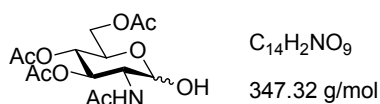
50 g (0.232 mol) Glucosamin-Hydrochlorid **17** wurden in 220 ml (2.34 mol) Essigsäureanhydrid gelöst, zu dieser Lösung 190 ml (2.33 mol) Pyridin zugesetzt und der Ansatz bei Raumtemperatur über 4 Tage gerührt. Dabei trat eine Verfärbung der Lösung nach rotbraun auf. Anschließend wurden das Pyridin und Essigsäureanhydrid am Rotationsverdampfer entfernt, das erhaltene Öl in 400 ml CH_2Cl_2 aufgenommen und mehrfach mit 200 ml 1 M HCl gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden nochmals mit CH_2Cl_2 extrahiert, die organischen Phasen vereinigt, mit gesättigter $NaHCO_3$ -Lösung und anschließend mit Wasser gewaschen. Nach Trocknung über Na_2SO_4 wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der farblose Schaum wurde durch Zusatz von wenig Essigsäureethylester bei leichter Wärmezufuhr gelöst und mit n-Hexan zum Kristallisieren gebracht. Man erhielt 63 g (70 %) **18** als ein farbloses fein-kristallines Pulver.

DC: $R_f = 0.35$ ($CH_2Cl_2/MeOH = 95:5$)

1H -NMR (250.1 MHz, $CDCl_3$):

$\delta = 6.17$ (d, $J = 3.6$ Hz, 1 H; H-1), 5.53 (d, $J = 9.2$ Hz, 1 H; NH), 5.25-5.17 (m, 2 H; H-3, H-4), 4.53-4.44 (m, 1 H; H-2), 4.26 (dd, $J = 12.5, 4.0$ Hz, 1 H; H-6a), 4.06 (dd, $J = 12.5, 2.4$ Hz, 1 H; H-6b), 4.02-3.99 (m, 1 H; H-5), 2.20 (s, 3 H; $C(O)CH_3$), 2.09 (s, 3 H; $C(O)CH_3$), 2.06 (s, 3 H; $C(O)CH_3$), 2.05 (s, 3 H; $C(O)CH_3$), 1.94 ppm (s, 3 H; $C(O)CH_3$).

2-Acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α/β -D-glucopyranose **19**^[237]



3.09 ml (46.23 mmol) Ethylendiamin wurden mit 200 ml frisch destilliertem THF vermischt und auf $0^\circ C$ abgekühlt. Zu dieser Lösung wurden langsam 3.08 ml (53.93 mmol) Eisessig zugetropft, woraufhin sich sofort ein Niederschlag bildete. 15.0 g (38.52 mmol) peracetyliertes GlcNAc **18**

wurden in 200 ml frisch destilliertem THF gelöst und innerhalb von 30 min zur Suspension zugetropft. Im Anschluss wurde das Reaktionsgemisch unter Reaktionskontrolle per Dünnschichtchromatographie 96 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurden 150 ml 1 M HCl und 150 ml CHCl₃ zugesetzt und die organische Phase abgetrennt. Da das Produkt wasserlöslich ist, wurde die wässrige Phase fünfmal mit je 50 ml CHCl₃ extrahiert und die organischen Phasen vereinigt. Diese wurden anschließend mit gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen und die wässrige Phase nochmals zweimal mit 50 ml CHCl₃ extrahiert. Nach dem Trocknen der vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Nach Flash-Chromatographie mit Essigsäureethylester erhielt man 13.38 g (79 %) des Anomerengemischs **19** in einem Verhältnis von α : β > 9:1 als einen farblosen Feststoff.

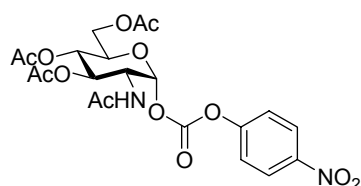
DC: $R_f = 0.37$ (CH₂Cl₂/MeOH = 9:1)

¹H-NMR (250.1 MHz, CDCl₃): α -Anomer

$\delta = 5.92$ (d, $J = 9.3$ Hz, 1 H; NH), 5.31-5.21 (m, 2 H; H-1, H-3), 5.11 (t, $J = 9.5$ Hz, 1 H; H-4), 4.31-4.25 (m, 1 H; H-2), 4.22-4.11 (m, 3 H; H-5, H-6a, H-6b), 2.07 (s, 3 H; C(O)CH₃), 2.01 (s, 3 H; C(O)CH₃), 2.00 (s, 3 H; C(O)CH₃), 1.94 ppm (s, 3 H; C(O)CH₃).

(*p*-Nitrophenoxycarbonyl)-2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-gluco-pyranosid

13^[233]



C₂₁H₂₄N₂O₁₃

512.43 g/mol

1042 mg (3 mmol) 2-Acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy-D-glucopyranose **19** wurden in 10 ml abs. DCM gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Anschließend wurden 832 μ l (6 mmol) Et₃N zugegeben. Danach wurde eine Lösung aus 1.33 g (6.6 mmol) Chloroformiat **20**, gelöst in 1 ml abs. CH₂Cl₂, zugetropft, woraufhin sich sofort ein Niederschlag bildete. Nach 3 h Reaktionszeit wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde in Essigsäureethylester

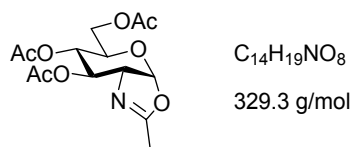
aufgenommen und mit 10 %iger Zitronensäure und anschließend mit dest. Wasser gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden nochmals mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden dann über MgSO_4 getrocknet und nach dem Abfiltrieren bis zur Trockene eingengt. Mittels Lösungsmittelgradienten wurde durch Flash-Chromatographie (~ 40 g Kieselgel, ~ 30 -45 min Säulzeit) erst das Nebenprodukt *p*-Nitrophenol entfernt (EE/PE=2:1) und dann das Produkt eluiert (EE). Man erhielt 1.41 g (92 %) **13** als farblosen Feststoff.

DC: $R_f = 0.51$ (EE)

$^1\text{H-NMR}$ (250.1 MHz, CDCl_3):

$\delta = 8.32$ -8.26 (m, 2 H, H_{ar}), 7.46-7.41 (m, 2 H, H_{ar}), 6.14 (d, $J = 3.6$ Hz, 1 H; H-1), 5.82 (d, $J = 8.6$ Hz, 1 H; NH), 5.34-5.24 (m, 2 H), 4.56-4.51 (m, 1 H; H-2), 4.28 (dd, $J = 12.6, 4.0$ Hz, 1 H; H-6a), 4.16-4.07 (m, 2 H; H-6b, H), 2.07 (s, 3 H; $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.05 (s, 3 H; $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.04 (s, 3 H; $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 1.96 ppm (s, 3 H; $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$).

2-Methyl-(3,4,6-tri-*O*-acetyl-1,2-dideoxy- α -D-glucopyrano)-[2,1-*d*]-2-oxazolin **21**^[238]



In einer ausgeheizten Apparatur wurden 18.2 g (46.7 mmol) gut getrocknetes peracetyliertes GlcNAc **18** in 250 mL abs. 1,2-Dichlorethan gelöst und 11 mL (60.8 mmol) Trifluormethansulfonsäuretrimethylsilylester zugetropft. Es wurde bei 50-55°C über Nacht gerührt, wobei sich die Lösung rotbraun färbte. Nach Zugabe von 20 mL Et_3N bis zum Neutralpunkt wurde das Lösungsmittel entfernt. Flash-Chromatographie mit Essigsäureethylester ergab 14.97 g (97 %) **21** als gelben Schaum.

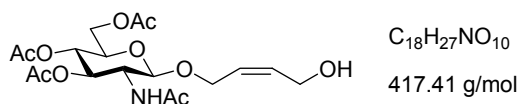
¹H-NMR (250.1 MHz, CDCl₃):

δ = 5.96 (d, J = 7.2 Hz, 1 H; H-1), 5.26 (t, J = 2.4 Hz, 1 H; H-3), 4.95-4.90 (m, 1 H; H-4), 4.18-4.15 (m, 3 H; H-2, H-6a, H-6b), 3.64-3.56 (m, 1 H; H-5), 2.11 (s, 3 H; C(O)CH₃), 2.10 (s, 3 H; C(O)CH₃), 2.09 (s, 3 H; C(O)CH₃), 2.08 ppm (s, 3 H; C(O)CH₃).

DC: R_f = 0.20 (CH₂Cl₂/MeOH = 95:5)

4-Hydroxy-(*Z*)-but-2-enyl-2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosid

22^[239]



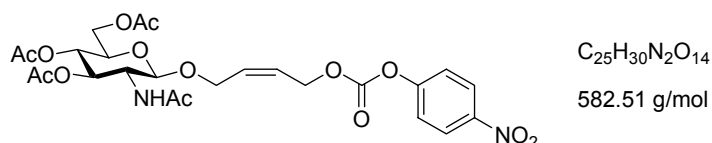
14.97 g (45.5 mmol) Oxazolin **21** und 17.6 mL (213.9 mmol) *cis*-2-Buten-1,4-diol wurden in 300 mL abs. THF gelöst. Nach Zugabe von 6 g (43.2 mmol) Kupfer(II)-chlorid wurde die blaugrün gefärbte Lösung bei 50-55°C über Nacht gerührt. Der Ansatz wurde mit 110 mL ges. NaHCO₃-Lösung versetzt und danach wurde der blaue Niederschlag über Celite abfiltriert, welches dann mit Aceton nachgewaschen wurde. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Rohprodukt mit Toluol coevaporiert, wobei ein grünlicher öliger Rückstand erhalten wurde. Flash-Chromatographie mit CH₂Cl₂/MeOH = 10:1 ergab 10.21 g (54 %) **22** als leicht gelblichen Feststoff.

¹H-NMR (250.1 MHz, CDCl₃):

δ = 5.92-5.80 (m, 1 H; H_{vinyl}), 5.67-5.57 (m, 1 H; H_{vinyl}), 5.28 (t, J = 9.8 Hz, 1 H; H-3), 5.05 (t, J = 9.7 Hz, 1 H; H-4), 4.75 (d, J = 8.3 Hz, 1 H; H-1), 4.40-4.12 (m, 6 H; H-6a, H-6b, H_{allyl}), 3.91-3.80 (m, 1 H; H-2), 3.76-3.70 (m, 1 H; H-5), 2.09 (s, 3 H; C(O)CH₃), 2.03 (s, 3 H; C(O)CH₃), 2.02 (s, 3 H; C(O)CH₃), 1.95 ppm (s, 3 H; C(O)CH₃).

DC: R_f = 0.44 (CH₂Cl₂/MeOH = 9:1)

[(*Z*)-4-(*p*-Nitrophenoxycarbonyloxy)-but-2-en-1-yl]-2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosid **12^[227]**



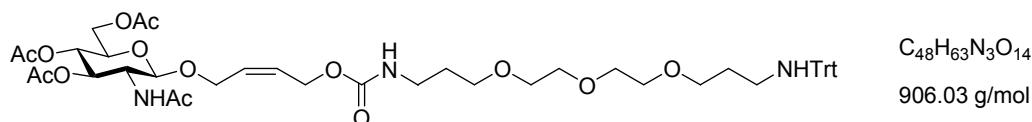
5 g (11.98 mmol) des Hydroxybutenylglycosids **22** wurden in 55 mL abs. THF gelöst und auf 0°C gekühlt. Nach Zugabe von 1060 μ L (13.18 mmol) Pyridin wurde eine Lösung von 2.66 g (13.18 mmol) Chloroformiat **20** in 4 mL abs. THF zugetropft wobei sich ein Niederschlag bildete. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand in Essigsäureethylester aufgenommen. Es wurde einmal mit verdünnter Zitronensäure und zweimal mit dest. Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und nach dem Abfiltrieren bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in wenig warmem Essigsäureethylester aufgenommen, Petrolether zugegeben, angeimpft und im Kühlschrank zur Kristallisation gebracht. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit kaltem PE/EE = 3:1 gewaschen und getrocknet. Man erhielt 5.85 g (84 %) von **12** als farblosen Feststoff.

DC: $R_f = 0.26$ (CH₂Cl₂/MeOH = 95:5)

¹H-NMR (250.1 MHz, CDCl₃):

$\delta = 8.31$ - 8.28 (m, 2 H; H_{ar}), 7.41 - 7.38 (m, 2 H; H_{ar}), 5.84 - 5.79 (m, 2 H; H_{vinyl}), 5.48 (d, $J = 9.3$ Hz, 1 H; NH), 5.30 (t, $J = 9.6$ Hz, 1 H; H-3), 5.07 (t, $J = 9.7$ Hz, 1 H; H-4), 4.93 - 4.83 (m, 2 H; H_{allyl}), 4.75 (d, $J = 8.2$ Hz, 1 H; H-1), 4.47 - 4.29 (m, 2 H; H_{allyl}), 4.24 (dd, $J = 4.4, 12.4$ Hz, 1 H; H-6a), 4.15 (dd, $J = 12.4, 2.4$ Hz, 1 H; H-6b), 3.84 (dt, $J = 10.4, 8.5$ Hz, 1 H; H-2), 3.72 - 3.65 (m, 1 H; H-5), 2.08 (s, 3 H; C(O)CH₃), 2.03 (s, 3 H; C(O)CH₃), 2.02 (s, 3 H; C(O)CH₃), 1.94 ppm (s, 3 H; C(O)CH₃).

4-(2-Acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy- β -D-glucopyranosyloxy)-(Z)-but-2-enyloxycarbonyl-(3-(2-(2-(3-(trityl-amino)-propoxy)-ethoxy)-ethoxy)propyl)-amin **54**



1.36 g (2.335 mmol) des Aktivcarbonats **12** wurden in 20 mL absolutem CH₂Cl₂ gelöst. Nach Zugabe von 900 mg 3-(2-(2-(3-(Trityl-amino)-propoxy)-ethoxy)-ethoxy)-propylamin **53** (1.946 mmol), gelöst in 2 mL CH₂Cl₂, und 340 μ L (1.946 mmol) EtN(*i*-Pr)₂ färbte sich die Lösung gelb. Nach Rühren über Nacht wurde das Lösungsmittel entfernt. Flash-Chromatographie mit Essigsäureethylester ergab **54** in quantitativer Ausbeute als farblosen Schaum.

DC: $R_f = 0.18$ (EE)

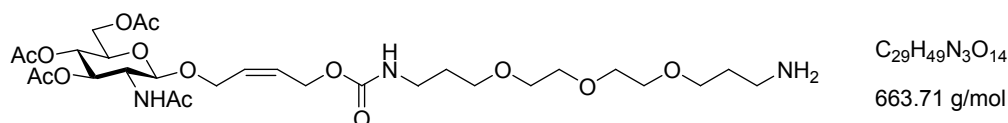
¹H-NMR (600.1 MHz, CDCl₃):

$\delta = 7.38$ -7.36 (m, 6 H; H_{ar}), 7.15-7.12 (m, 6 H; H_{ar}), 7.06-7.03 (m, 3 H; H_{ar}), 5.65 (br. s, 1 H; NH), 5.59 (br. s, 2 H, H_{vinyl}), 5.26 (‘t’, $J = 9.9$ Hz, 1 H; H-3), 4.98 (‘t’, $J = 9.6$ Hz, 1 H; H-4), 4.75 (d, $J = 7.8$ Hz, 1 H; H-1), 4.54-4.47 (m, 2 H; H_{allyl}), 4.29-4.18 (m, 3 H; H_{allyl}, H-6a), 4.05 (‘d’, 1 H, $J = 10.8$ Hz; H-6b), 3.84 (‘q’, $J = 9.2$ Hz, 1 H; H-2), 3.72-3.70 (m, 1 H; H-5), 3.50-3.48 (m, 2 H; CH₂), 3.45-3.43 (m, 6 H; CH₂), 3.39-3.38 (m, 4 H; CH₂), 3.15 (‘d’, $J = 6.0$ Hz, 2 H; CH₂), 2.14 (br. s, 2 H; CH₂), 1.95 (s, 3 H; C(O)CH₃), 1.90 (s, 3 H; C(O)CH₃), 1.89 (s, 3 H; C(O)CH₃), 1.83 (s, 3 H; C(O)CH₃), 1.66-1.63 ppm (m, 4 H; CH₂CH₂CH₂).

¹³C-NMR (150.9 MHz, CDCl₃):

$\delta = 170.8, 170.7, 170.5, 169.5$ (C(O)CH₃), 156.4 (OC(O)NH), 129.0, 128.7, 128.6, 128.1, 127.7, 126.2 (C_{ar}, C_{vinyl}), 99.5 (C-1), 72.7 (C-3), 71.6 (C-5), 70.9, 70.5, 70.4, 70.2, 70.0, 69.9, 69.4 (CH₂), 69.0 (C-4), 64.5 (C_{allyl}), 62.2 (C-6), 60.3 (C_{allyl}), 54.4 (C-2), 41.1, 39.03 (CH₂), 30.4 (CH₂CH₂CH₂), 29.4 (CH₂CH₂CH₂), 23.1, 21.0, 20.9, 20.6 ppm (C(O)CH₃).

4-(2-Acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy- β -D-glucopyranosyloxy)-(Z)-but-2-enyloxycarbonyl-(3-(2-(2-(3-amino-propoxy)-ethoxy)-ethoxy)propyl)-amin **55**



265 mg (0.292 mmol) der Tritel-geschützten Verbindung **54** wurden in 3 mL absolutem CH₂Cl₂ gelöst. Nach Zugabe von 360 μ L (4.7 mmol) Trifluoressigsäure und 180 μ L (0.877 mmol) Tri-*iso*-propylsilan wurde für 1.5 h gerührt und dann das Lösungsmittel entfernt. Nach Flash-Chromatographie (CHCl₃/MeOH = 6:1) erhielt man **55** in quantitativer Ausbeute als farbloses Öl.

DC: $R_f = 0.06$ (CH₂Cl₂/MeOH = 9:1)

¹H NMR (600.1 MHz, CDCl₃):

$\delta = 6.89$ (br. s, 1 H; NHAc), 5.80 (br. s, 1 H; NH), 5.60 (br. s, 2 H, H_{vinyl}), 5.19 (‘t’, $J = 9.9$ Hz, 1 H; H-3), 4.96 (‘t’, $J = 9.0$ Hz, 1 H; H-4), 4.68 (d, $J = 8.4$ Hz, 1 H; H-1), 4.58-4.50 (m, 2 H; H_{allyl}), 4.32-4.16 (m, 3 H; H_{allyl}, H-6a), 4.04 (‘d’, $J = 12.6$ Hz, 1 H; H-6b), 3.93 (‘q’, $J = 9.2$ Hz, 1 H; H-2), 3.76 (br. s, 1 H; H-5), 3.55-3.46 (m, 12 H; OCH₂), 3.25-3.18 (m, 2 H; CH₂N), 2.80 (br. s, 2 H; CH₂N), 1.99 (s, 3 H; C(O)CH₃), 1.93 (s, 6 H; C(O)CH₃), 1.85 (s, 3 H; C(O)CH₃), 1.69 ppm (br. s, 4 H; CH₂CH₂CH₂).

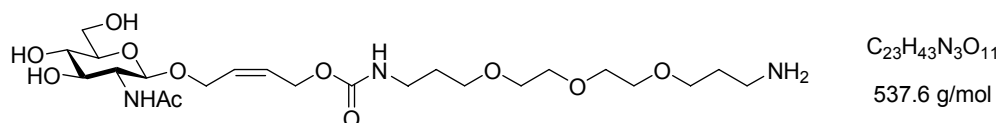
¹³C-NMR (150.9 MHz, CDCl₃):

$\delta = 170.7, 170.6, 170.3, 169.4$ (C(O)CH₃), 156.6 (OC(O)NH), 128.7 (C_{olefin}), 128.6 (C_{olefin}), 99.6 (C-1), 72.7 (C-3), 71.6 (C-5), 70.4, 70.3, 70.0, 69.9, 69.6, 69.3 (OCH₂), 68.8 (C-4), 64.6 (C_{allyl}), 62.2 (C-6), 60.3 (C_{allyl}), 54.3 (C-2), 39.6 (CH₂N), 38.9 (CH₂N), 31.6 (CH₂CH₂CH₂), 29.4 (CH₂CH₂CH₂), 23.2, 23.1, 21.0, 20.9 ppm (C(O)CH₃).

MALDI-MS für C₂₉H₄₉N₃O₁₄:

[$M + H$]⁺ berechnet 664.3, gefunden 664.4, [$M + Na$]⁺ berechnet 686.3, gefunden 686.3.

4-(2-Acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyloxy)-(Z)-but-2-enyloxycarbonyl-(3-(2-(2-(3--amino-propoxy)-ethoxy)-ethoxy)propyl)-amin **56**



Analog AAV 11 wurden 259 mg (0.39 mmol) der acetylierten Verbindung **55** in 8 mL absolutem MeOH gelöst. Nach Zugabe von 192 μ L (2.34 mmol) Propylamin und 450 μ L einer 0.5 M methanolischen Natriummethanolat-Lösung (225 μ mol) wurde 2.5 h gerührt und anschließend das Lösungsmittel entfernt. Verbindung **56** wurde in quantitativer Ausbeute als farbloses Öl erhalten, welches per RP-HPLC isoliert wurde.

RP-HPLC:

$t_R = 7.3$ min (Knauer Nucleosil 4 mm, 0.9 mL/min, 5-100 % MeCN in 30 min, H₂O und MeCN mit 0.1 % TFA), $t_R = 10.6$ min (Knauer Eurospher 16 mm, 9.6 mL/min, 5-50 % MeCN in 20 min, H₂O und MeCN mit 0.1 % TFA)

¹H-NMR (600.1 MHz, CD₃OD):

$\delta = 5.71$ - 5.65 (m, 2 H; H_{vinyl}), 4.67 - 4.61 (m, 2 H; H_{allyl}), 4.45 - 4.41 (m, 2 H; H-1, H_{allyl}), 4.26 - 4.23 (m, 1 H; H_{allyl}), 3.89 (dd, $J = 11.7, 1.8$ Hz, 1 H; H-6a), 3.71 - 3.63 (m, 10 H; H-6b, H-2, CH₂CH₂CH₂, 2 OCH₂CH₂O, OCH₂CH₂O), 3.60 - 3.58 (m, 2 H; OCH₂CH₂O), 3.52 (t', $J = 6.0$ Hz, 2 H; CH₂CH₂CH₂), 3.45 (t', $J = 8.6$ Hz, 1 H; H-3), 3.31 (m, H-4), 3.29 - 3.26 (m, 1 H; H-5), 3.19 (t', $J = 6.8$ Hz, 2 H; CH₂CH₂CH₂), 3.10 (t', $J = 6.3$ Hz, 2 H; CH₂CH₂CH₂), 1.90 (s, 3 H; C(O)CH₃), 1.93 (quin, $J = 5.9$ Hz, 2 H; CH₂CH₂CH₂), 1.75 ppm (quin, $J = 6.5$ Hz, 2 H; CH₂CH₂CH₂).

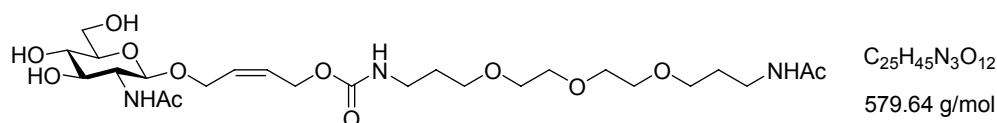
¹³C-NMR (150.9 MHz, CD₃OD):

$\delta = 173.8$ (C(O)CH₃), 158.9 (OC(O)NH), 130.3 (C_{olefin}), 129.3 (C_{olefin}), 101.7 (C-1), 78.1 (C-5), 76.2 (C-3), 72.1 (C-4), 71.4 , 71.2 , 71.1 , 71.0 , 70.4 , 69.7 (CH₂), 65.4 (C_{allyl}), 62.8 (C-6), 61.7 (C_{allyl}), 57.3 (C-2), 40.2 (CH₂CH₂CH₂), 39.2 (CH₂CH₂CH₂), 31.0 (CH₂CH₂CH₂), 28.1 (CH₂CH₂CH₂), 23.0 ppm (C(O)CH₃).

MALDI-MS für $C_{23}H_{43}N_3O_{11}$:

$[M + H]^+$ berechnet 538.3, gefunden 538.3, $[M + Na]^+$ berechnet 560.3, gefunden 560.3, $[M + K]^+$ berechnet 576.4, gefunden 576.3.

Acetyl-(4-(2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyloxy)-(Z)-but-2-enyloxycarbonyl-(3-(2-(2-(3-amino-propoxy)-ethoxy)-ethoxy)propyl))-amin 57



Verbindung **57** wurde bei der Deacetylierung von **55** mit NaOMe/MeOH ohne Zusatz von Propylamin als Nebenprodukt erhalten. Aufreinigung mittels HPLC ergab **57** als farbloses Öl.

1H -NMR (600.1 MHz, CD_3OD):

δ = 5.71-5.66 (m, 2 H; H_{vinyl}), 4.64-4.59 (m, 2 H; H_{allyl}), 4.45 (d, J = 8.5 Hz, 1 H; H-1), 4.41-4.38 (m, 1 H; H_{allyl}), 4.28-4.25 (m, 1 H; H_{allyl}), 3.89 (dd, J = 12.0, 1.8 Hz, 1 H; H-6a), 3.71-3.67 (m, 1 H; H-6b), 3.65-3.62 (m, 5 H; OCH_2CH_2O , H-2), 3.59-3.57 (m, 4 H; OCH_2CH_2O), 3.53-3.51 (m, 4 H; $CH_2CH_2CH_2$), 3.45 (t, J = 9.6 Hz, 1 H; H-3), 3.32 (t, J = 9.4 Hz, 1 H; H-4), 3.29-3.27 (m, 1 H; H-5), 3.25 (t, J = 7.0 Hz, 2 H; $CH_2CH_2CH_2$), 3.18 (t, J = 6.7 Hz, 2 H; $CH_2CH_2CH_2$), 1.98 (s, 3 H; $C(O)CH_3$), 1.93 (s, 3 H; $C(O)CH_3$), 1.75 ppm (sext, J = 6.7 Hz, 4 H; $CH_2CH_2CH_2$).

^{13}C -NMR (150.9 MHz, CD_3OD):

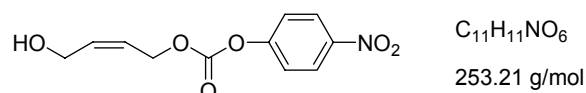
δ = 173.8 ($\underline{C}(O)CH_3$), 173.3 ($\underline{C}(O)CH_3$), 158.7 ($OC(O)NH$), 130.3 (C_{olefin}), 129.3 (C_{olefin}), 101.5 (C-1), 78.0 (C-5), 76.2 (C-3), 72.2 (C-4), 71.6 (OCH_2CH_2O), 71.3 (OCH_2CH_2O), 69.9 ($CH_2CH_2CH_2$), 69.8 ($CH_2CH_2CH_2$), 65.3 (C_{allyl}), 62.8 (C-6), 61.6 (C_{allyl}), 57.3 (C-2), 39.2 ($\underline{CH_2CH_2CH_2}$), 38.0 ($\underline{CH_2CH_2CH_2}$), 30.9 ($CH_2CH_2CH_2$), 30.4 ($CH_2CH_2CH_2$), 23.0 ($C(O)CH_3$), 23.7 ppm ($C(O)CH_3$).

ESI-MS für $C_{25}H_{45}N_3O_{12}$:

$[M + H]^+$ berechnet 580.3, gefunden 580.3, $[M + Na]^+$ berechnet 602.3, gefunden 602.3, $[M + K]^+$ berechnet 618.3, gefunden 618.3.

RP-HPLC:

$t_R = 8.7$ min (Knauer Nucleosil 4 mm, 0.9 mL/min, 5-100 % MeCN in 30 min, H₂O und MeCN mit 0.1 % TFA), $t_R = 11.6$ min (Knauer Eurospher 16 mm, 9.6 mL/min, 5-50 % MeCN in 20 min, H₂O und MeCN mit 0.1 % TFA)

(Z)-4-(p-Nitrophenoxycarbonyloxy)-but-2-en-1-ol 87

3.3 mL (39.6 mmol) *cis*-2-Buten-1,4-diol wurden in 50 mL abs. THF vorgelegt. Eine Lösung von 2 g (9.9 mmol) Chloroformiat **20** in 12 mL abs. THF wurde sehr langsam zugetropft. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösungsmittel entfernt. Flash-Chromatographie mit EE/PE = 1:1 ergab 1.233 g (49 %) von **87** als leicht gelblichen Feststoff.

DC: $R_f = 0.3$ (EE/PE = 1:1)

¹H-NMR (399.8 MHz, CDCl₃):

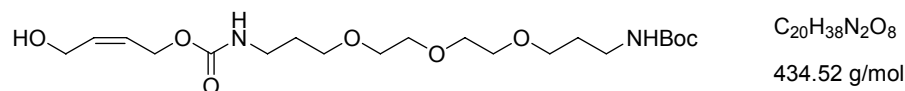
$\delta = 8.28$ - 8.24 (m, 2 H; H_{ar}), 7.38 - 7.34 (m, 2 H; H_{ar}), 5.98 - 5.91 (m, 1 H; H_{allyl}), 5.76 - 5.67 (m, 1 H; H_{allyl}), 4.89 - 4.87 (m, 2 H; H_{vinyl}), 4.30 - 4.28 (m, 2 H; H_{vinyl}), 2.01 ppm (br. s, 1 H; OH).

¹³C-NMR (100.5 MHz, CDCl₃):

$\delta = 153.3$ (C_{quart}), 152.5 (C(O)), 145.4 (C_{quart}), 134.9 (C_{olefin}), 125.3 (C_{ar}), 123.8 (C_{olefin}), 121.7 (C_{ar}), 64.5 (C_{allyl}), 58.4 ppm (C_{allyl}).

ESI-MS für C₁₁H₁₁NO₆:

[M + Na]⁺ berechnet 276.1, gefunden 276.0.

tert.-Butyloxycarbonyl-(4-hydroxy-(Z)-but-2-enyloxycarbonyl-(3-(2-(2-(3-amino-propoxy)-ethoxy)-ethoxy)propyl))-amin **89**

1000 mg (3.95 mmol) des Aktivcarbonats **87** wurden in 15 mL abs. CH₂Cl₂ gelöst. Bei Zugabe von 1392 mg (4.344 mmol) 3-(2-(2-(3-(tert.-Butyloxycarbonyl-amino)-propoxy)-ethoxy)-ethoxy)-propylamin **88**, gelöst in 5 mL abs. CH₂Cl₂, und 740 µL (4.344 mmol) DIPEA färbte sich die Lösung sofort gelb. Nach 2 h Rühren wurde das Lösungsmittel entfernt. Mittels Lösungsmittelgradienten wurde durch Flash-Chromatographie erst das Nebenprodukt *p*-Nitrophenol entfernt (EE/PE=1:1) und dann das Produkt erst mit EE und dann mit EE/MeOH = 12:1 eluiert. Man erhielt 1300 mg (76 %) **89** als farbloses Öl.

DC: $R_f = 0.4$ (EE/MeOH = 12:1)

RP-HPLC:

$t_R = 20.4$ min (Knauer Eurospher 4 mm, 0.9 mL/min, 5-90 % MeCN in 30 min, H₂O und MeCN mit 0.1 % HCOOH)

¹H-NMR (600.1 MHz, CDCl₃):

$\delta = 5.87$ -5.83 (m, 1 H; H_{vinyl}), 5.64-5.60 (m, 1 H; H_{vinyl}), 5.42 (br. s, 1 H; NH), 4.98 (br. s, 1 H; NH), 4.70-4.60 (m, 2 H; H_{allyl}), 4.24-4.22 (m, 2 H; H_{allyl}), 3.65-3.63 (m, 4 H; OCH₂CH₂O), 3.60-3.58 (m, 4 H; OCH₂CH₂O), 3.56-3.52 (m, 4 H; HNCH₂CH₂CH₂O), 3.30-3.27 (m, 2 H; HNCH₂CH₂CH₂O), 3.23-3.20 (m, 2 H; HNCH₂CH₂CH₂O), 2.70 (br. s, 1 H; OH), 1.78-1.73 (m, 4; CH₂CH₂CH₂), 1.43 ppm (s, 9 H; C(CH₃)₃).

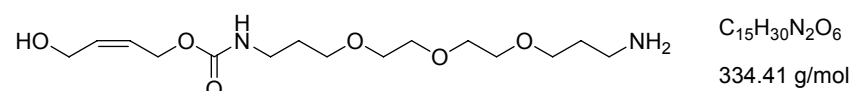
¹³C-NMR (150.9 MHz, CDCl₃):

$\delta = 156.6$ (OC(O)NH), 156.0 (OC(O)NH), 133.3 (C_{olefin}), 126.3 (C_{olefin}), 70.5 (OCH₂CH₂O), 70.2 (OCH₂CH₂O), 69.8 (HNCH₂CH₂CH₂O), 69.6 (HNCH₂CH₂CH₂O), 60.1 (C_{allyl}), 58.2 (C_{allyl}), 39.4 (HNCH₂CH₂CH₂O), 38.5 (HNCH₂CH₂CH₂O), 29.6 (CH₂CH₂CH₂), 29.2 (CH₂CH₂CH₂), 28.4 ppm (C(CH₃)₃).

ESI-MS für $C_{20}H_{38}N_2O_8$:

$[M + H]^+$ berechnet 435.3, gefunden 435.0, $[M + Na]^+$ berechnet 457.3, gefunden 457.0, $[M + K]^+$ berechnet 473.2, gefunden 473.0.

4-Hydroxy-(Z)-but-2-enyloxycarbonyl-(3-(2-(2-(3-amino-propoxy)-ethoxy)-ethoxy)propyl)-amin **86**



10 mg (0.023 mmol) der Boc-geschützten Verbindung **89** wurden in 2 mL abs. CH_2Cl_2 gelöst und auf $0^\circ C$ gekühlt. Nach Zugabe von 1 mL TFA wurde 10 Minuten bei $0^\circ C$ gerührt und anschließend noch weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur. Das Lösungsmittel wurde entfernt, der Rückstand in 1 mL Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Das Produkt **86** wurde in quantitativer Ausbeute als farbloses Öl erhalten.

RP-HPLC:

$t_R = 11.1$ min (Knauer Eurospher 4 mm, 0.9 mL/min, 5-90 % MeCN in 30 min, H_2O und MeCN mit 0.1 % HCOOH)

1H -NMR (600.1 MHz, $CDCl_3$):

$\delta = 7.88$ (br. s, 2 H; NH_2), 5.84-5.80 (m, 1 H; H_{vinyl}), 5.62-5.58 (m, 1 H; H_{vinyl}), 4.64-4.62 (m, 2 H; H_{allyl}), 4.22-4.21 (m, 2 H; H_{allyl}), 3.68 (t, $J = 5.4$ Hz, 2 H; $H_2NCH_2CH_2CH_2O$), 3.64-3.60 (m, 6 H; OCH_2CH_2O), 3.57-3.55 (m, 2 H; OCH_2CH_2O), 3.53-3.51 (m, 2 H; $HNCH_2CH_2CH_2O$), 3.25 (q, $J = 6.2$ Hz, 2 H; $HNCH_2CH_2CH_2O$), 3.17 (br. s, 2 H; $H_2NCH_2CH_2CH_2O$), 1.98-1.94 (m, 2 H; $H_2NCH_2CH_2CH_2O$), 1.74 ppm (quin, $J = 6.1$ Hz, 2 H; $HNCH_2CH_2CH_2O$).

^{13}C -NMR (150.9 MHz, $CDCl_3$):

$\delta = 157.0$ ($OC(O)NH$), 133.2 (C_{olefin}), 126.1 (C_{olefin}), 70.3 ($H_2NCH_2CH_2CH_2O$), 70.1 (OCH_2CH_2O), 69.8 (OCH_2CH_2O), 68.9 ($HNCH_2CH_2CH_2O$), 60.4 (C_{allyl}), 57.9 (C_{allyl}), 39.8 ($H_2NCH_2CH_2CH_2O$), 38.5 ($HNCH_2CH_2CH_2O$), 29.5 ($HNCH_2CH_2CH_2O$), 26.4 ppm ($H_2NCH_2CH_2CH_2O$).

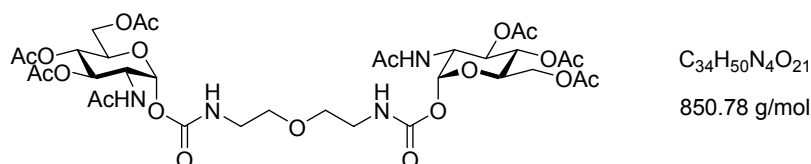
ESI-MS für $C_{15}H_{30}N_2O_6$:

$[M + H]^+$ berechnet 335.2, gefunden 335.0, $[M + Na]^+$ berechnet 357.2, gefunden 357.0, $[M + K]^+$ berechnet 373.2, gefunden 373.0.

HR-ESI-TOF:

$[M + H]^+$ berechnet 335.21766, gefunden 335.2174, $[M + Na]^+$ berechnet 357.19961, gefunden 357.1978.

N,N*-Bis-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-glucopyranosyloxycarbonyl)-3-oxa-1,5-pentandiamin **60(OAc)*



307 mg (0.6 mmol) des Aktivcarbonats **13**, gelöst in 5.5 mL abs. CH_2Cl_2 , 29 μ L (0.27 mmol) 1,5-Diamino-3-oxapentan und 94 μ L (0.55 mmol) DIPEA wurden für 2 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt. Flash-Chromatographie mit $CH_2Cl_2/MeOH = 20:1$ ergab 230 mg **60(OAc)** in quantitativer Ausbeute als farblosen Feststoff.

DC: $R_f = 0.29$ ($CH_2Cl_2/MeOH = 15:1$)

1H -NMR (400.1 MHz, $CDCl_3$):

$\delta = 6.85$ (d, $J = 6.8$ Hz, 2 H, $NHAc$), 6.15 (d, $J = 3.5$ Hz, 2 H, H-1), 6.10 (t, $J = 5.3$ Hz, 2 H, NH), 5.20 (t, $J = 10.0$ Hz, 2 H, H-3), 5.13 (t, $J = 9.6$ Hz, 2 H, H-4), 4.54 (dt, $J = 9.7, 3.7$ Hz, 2 H, H-2), 4.21 (dd, $J = 12.4, 3.5$ Hz, 2 H, H-6a), 4.10 - 4.07 (m, 2 H, H-5), 4.03 (d, $J = 12.2$ Hz, 2 H, H-6b), 3.58 (t, $J = 4.4$ Hz, 4 H, $NHCH_2CH_2O$), 3.44 - 3.27 (m, 4 H, $NHCH_2CH_2O$), 2.01 (s, 6 H, $C(O)CH_3$), 1.97 (s, 12 H, $C(O)CH_3$), 1.91 ppm (s, 6 H, $C(O)CH_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3):

$\delta = 170.8, 170.6, 170.5, 169.4$ ($\underline{\text{C}}(\text{O})\text{CH}_3$), 154.9 ($\text{O}\underline{\text{C}}(\text{O})\text{NH}$), 91.4 (C-1), 70.4 (C-3), 69.6 ($\text{NHCH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{O}$), 69.2 (C-5), 68.0 (C-4), 61.8 (C-6), 50.7 (C-2), 40.4 ($\text{NH}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\text{O}$), $22.6, 20.6, 20.5, 20.4$ ppm ($\text{C}(\text{O})\underline{\text{C}}\text{H}_3$).

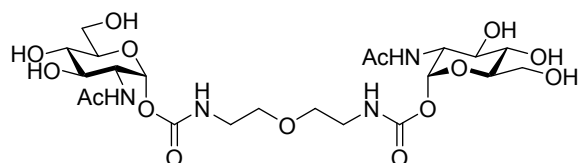
ESI-MS für $\text{C}_{34}\text{H}_{50}\text{N}_4\text{O}_{21}$:

$[M + \text{Na}]^+$ berechnet 873.3, gefunden 873.3, $[M + \text{K}]^+$ berechnet 889.3, gefunden 889.2.

Elementaranalyse für $\text{C}_{34}\text{H}_{50}\text{N}_4\text{O}_{21}$:

(%) berechnet: C: 48.00; H: 5.92; N: 6.59; gefunden: C: 47.62; H: 6.07; N: 6.44.

N,N'*-Bis-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-gluco-pyranosyloxycarbonyl)-3-oxa-1,5-pentandiamin **60*



$\text{C}_{22}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_{15}$

598.55 g/mol

200 mg (0.235 mmol) der acetylierten Verbindung **60(OAc)** wurden in 5 mL abs. MeOH gelöst. Nach Zugabe von 275 μL (138 μmol) einer 0.5 M methanolischen NaOMe-Lösung wurde 1.5 h gerührt und die Reaktionslösung anschließend mit saurem Ionenaustauscher (Amberlite IRC-86, H^+ -Form) neutralisiert. Filtration und Entfernung des Lösungsmittels ergaben 140 mg **60** in quantitativer Ausbeute als farblosen Feststoff.

DC: $R_f = 0.19$ (MeCN/ $\text{H}_2\text{O} = 4:1$)

$^1\text{H-NMR}$ (400.1 MHz, D_2O):

$\delta = 5.93$ (d, $J = 2.9$ Hz, 2 H; H-1), 4.03 (dd, $J = 10.3, 3.3$ Hz, 2 H; H-2), 3.81 - 3.70 (m, 8 H; H-3, H-5, H-6a, H-6b), 3.62 - 3.53 (m, 6 H; H-4, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2$), 3.32 (br s, 4 H; $\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 1.99 ppm (s, 6 H; $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$).

¹³C-NMR (100.6 MHz, D₂O):

δ = 175.6 (C(O)CH₃), 157.5 (OC(O)NH), 92.6 (C-1), 74.8 (C-5), 71.7 (C-3), 70.4 (C-4), 70.1 (CH₂CH₂), 61.3 (C-6), 53.7 (C-2), 41.1 (CH₂CH₂), 22.8 ppm (C(O)CH₃).

ESI-MS für C₂₂H₃₈N₄O₁₅:

[M+Na]⁺ berechnet 621.2, gefunden 621.1, [M+K]⁺ berechnet 637.2, gefunden: 637.1.

HR-ESI-TOF:

[M + H]⁺ berechnet 599.24064, gefunden 599.2381, [M + Na]⁺ berechnet 621.22259, gefunden 621.2200.

6.1.4 Synthetisierte Glycopeptide

6.1.4.1 Synthese der linearen tetravalenten Peptide 63 und 76

Fmoc- β -Ala-NH-Sieber-TG 66

Es wurde nach AAV 2 mit Sieberamid-TentaGel **65** vorgegangen. Die nach AAV 3 und AAV 4 durchgeführten Tests waren negativ.

Boc-Ala-D-Dab(Ddv)-D-Val-D-Dab(Ddv)-D-Dab(Ddv)-D-Val-D-Dab(Ddv)-Ala- β -Ala-NH₂ 68

C₉₂H₁₄₈N₁₄O₁₉

1754.24 g/mol

Harz **66** wurde manuell analog AAV 2 bzw. mittels Peptidsynthesizer nach AAV 15 zu Harz **67** umgesetzt. Eine Testabspaltung nach AAV 9 lieferte jeweils Verbindung **68**.

RP-HPLC:

t_R = 14.2 min (Knauer Nucleosil 4 mm, Flussrate = 0.9 mL/min, 60-100 % MeCN in 30 min, H₂O und MeCN mit 0.1 % TFA)

MALDI-MS für C₉₂H₁₄₈N₁₄O₁₉:

[M + H]⁺ berechnet 1754.1, gefunden 1754.3, [M + Na]⁺ berechnet 1776.1, gefunden 1776.3

[M + K]⁺ berechnet 1792.1, gefunden 1792.3.

Boc-Ala-D-Dab-D-Val-D-Dab-D-Dab-D-Val-D-Dab-Ala- β -Ala-NH₂ 70

C₄₀H₇₆N₁₄O₁₁

929.12 g/mol

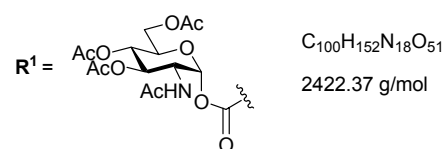
Harz **67** wurde nach AAV 6 zu Harz **69** umgesetzt. Eine Testabspaltung analog AAV 9 ergab Verbindung **70**.

RP-HPLC:

$t_R = 9.1$ min (Knauer Nucleosil 4 mm, Flussrate = 0.9 mL/min, 10-60 % MeCN in 30 min, H₂O und MeCN mit 0.1 % TFA)

MALDI-MS für C₄₀H₇₆N₁₄O₁₁:

[M + H]⁺ berechnet 929.6, gefunden 929.9, [M + Na]⁺ berechnet 951.6, gefunden 951.9, [M + K]⁺ berechnet 967.6, gefunden 967.8.

Boc-Ala-D-Dab(R¹)-D-Val-D-Dab(R¹)-D-Dab(R¹)-D-Val-D-Dab(R¹)-Ala-β-Ala-NH₂ 74

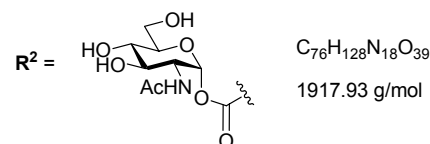
Harz **69** wurde analog AVV 7 mit Zuckerderivat **13** zu Harz **72** umgesetzt. Die Abspaltung vom Harz analog AVV 9 ergab Verbindung **74**.

RP-HPLC:

$t_R = 15.9$ min (Knauer Nucleosil 4 mm, Flussrate = 0.9 mL/min, 20-80 % MeCN in 30 min, H₂O und MeCN mit 0.1 % TFA)

MALDI-MS für C₁₀₀H₁₅₂N₁₈O₅₁:

[M + Na]⁺ berechnet 2444.0, gefunden 2443.9, [M + K]⁺ berechnet 2460.0, gefunden 2459.9.

Boc-Ala-D-Dab(R²)-D-Val-D-Dab(R²)-D-Dab(R²)-D-Val-D-Dab(R²)-Ala-β-Ala-NH₂ 63

Verbindung **74** wurde nach AVV 11 in Lösung zu Neoglycopeptid **63** umgesetzt.

RP-HPLC:

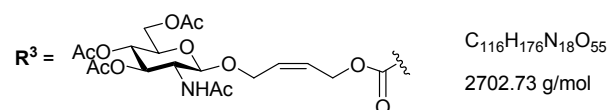
$t_R = 17.7$ min (Knauer Nucleosil 4 mm, Flussrate = 0.9 mL/min, 5-50 % MeCN in 30 min, H₂O und MeCN mit 0.1 % TFA), $t_R = 14.5$ min (Knauer Eurospher 16 mm, Flussrate = 9.6 mL/min, 15-21.7 % MeCN in 20 min, H₂O und MeCN mit 0.1 % TFA)

MALDI-MS für C₇₆H₁₂₈N₁₈O₃₉:

[M + Na]⁺ berechnet 1939.8, gefunden 1939.7, [M + K]⁺ berechnet 1955.8, gefunden 1955.7.

HR-ESI-TOF:

[M + H]⁺ berechnet 1917.86588, gefunden 1917.8539, [M + Na]⁺ berechnet 1939.84783, gefunden 1939.8204.

Boc-Ala-D-Dab(R³)-D-Val-D-Dab(R³)-D-Dab(R³)-D-Val-D-Dab(R³)-Ala-β-Ala-NH₂ 73

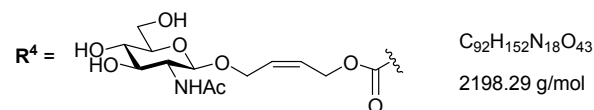
Harz **69** wurde analog AVV 7 mit Zuckerderivat **12** zu Harz **71** umgesetzt. Eine Testabspaltung lieferte Verbindung **73**.

RP-HPLC:

$t_R = 17.6$ min (Knauer Nucleosil 4 mm, Flussrate = 0.9 mL/min, 20-80 % MeCN in 30 min, H₂O und MeCN mit 0.1 % TFA)

MALDI-MS für C₁₁₆H₁₇₆N₁₈O₅₅:

[M + Na]⁺ berechnet 2724.1, gefunden 2724.4, [M + K]⁺ berechnet 2740.1, gefunden 2740.3.

Boc-Ala-D-Dab(R⁴)-D-Val-D-Dab(R⁴)-D-Dab(R⁴)-D-Val-D-Dab(R⁴)-Ala-β-Ala-NH₂ 76

Verbindung **76** wurde sowohl durch Deacetylierung von Harz **71** nach AAV 8 zu Harz **75** und anschließender Abspaltung vom Harz nach AAV 9 als auch durch Abspaltung vom Harz **71** nach AAV 9 und anschließender Deacetylierung in Lösung nach AAV 11 erhalten.

RP-HPLC:

$t_R = 16.7$ min (Vydac 4.6 mm, Flussrate = 0.9 mL/min, 15-35 % MeCN in 30 min, H₂O und MeCN mit 0.1 % TFA), $t_R = 17.7$ min (Vydac 22 mm, Flussrate = 9.6 mL/min, 18-19 % MeCN in 30 min, H₂O und MeCN mit 0.1 % TFA)

MALDI-MS für C₉₂H₁₅₂N₁₈O₄₃:

[M + Na]⁺ berechnet 2220.0, gefunden 2219.5, [M + K]⁺ berechnet 2236.0, gefunden 2235.4.

HR-ESI-TOF:

[M + 2 H]²⁺ berechnet 1099.52031, gefunden 1099.5254, [M + H + Na]²⁺ berechnet 1110.51128, gefunden 1110.5167, [M + 2 Na]²⁺ berechnet 1121.502254, gefunden 1121.5086.

6.1.4.2 Synthese des bivalenten Dipeptids 77

Fmoc-D-Dab(Ddv)-D-Dab(Ddv)-Rink-PS 78

300 mg Polystyrol-Harz mit Rink-Amid-Linker (0.18 mmol) wurden analog AAV 2 zu Harz **78** umgesetzt.

H-D-Dab(Ddv)-D-Dab(Ddv)-Rink-PS 79

Nach Quellen für 10 Minuten in DMF wurde Harz **78** einmal für drei Minuten und einmal für 15 Minuten mit 20 % Pyridin/DMF behandelt. Anschließend wurde zehnmal je eine Minute mit DMF und zweimal je drei Minuten mit Dichlormethan gewaschen und man erhielt Harz **79**.

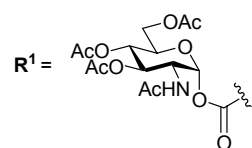
Ac-D-Dab(Ddv)-D-Dab(Ddv)-Rink-PS 80

Harz **80** wurde durch Acylierung nach AAV 5 von 0.09 mmol Harz **79** erhalten.

Ac-D-Dab-D-Dab-Rink-PS 81

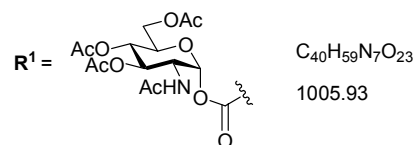
Harz **81** wurde nach AAV 6 aus Harz **80** erhalten.

Ac-D-Dab(R¹)-D-Dab(R¹)-Rink-PS 82



Harz **82** wurde durch Reaktion von Harz **81** mit Zuckerderivat **13** nach AAV 7 erhalten.

Ac-D-Dab(R¹)-D-Dab(R¹)-NH₂ 83

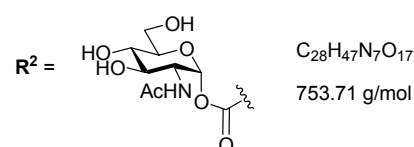


Verbindung **83** wurde durch Abspaltung vom Harz **82** nach AAV 12 erhalten.

MALDI-MS für $C_{40}H_{59}N_7O_{23}$:

$[M + Na]^+$ berechnet 1028.4, gefunden 1028.3, $[M + K]^+$ berechnet 1044.3, gefunden 1044.3.

Ac-D-Dab(R²)-D-Dab(R²)-NH₂ 77



Verbindung **77** wurde durch Deacetylierung in Lösung von Verbindung **83** nach AAV 11 erhalten.

¹H-NMR (600.1 MHz, d₆-DMSO):

δ = 8.13-8.08 (1 H; NHAc D-Dab1), 8.02-7.94 (1 H; NH D-Dab2), 7.74-7.66 (2 H; NHAc GlcNAc), 7.33-7.29 (1 H; NH₂), 7.12-6.81 (3 H; 1 H von NH₂, 2 H von NH-Urethan), 5.81-5.79 (2 H; H-1), 4.37-4.18 (2 H; C ^{α} H von D-Dab1 und D-Dab2), 3.73-3.70 (2 H; H-2), 3.58-3.43 (8 H + H₂O; H-6a, H-6b, H-3, H-5), 3.35-3.21 (2 H; H-4), 3.08-2.92 (4 H; C ^{γ} H₂ von D-Dab1 und D-Dab2), 1.89-1.81 (11 H; 9 von C(O)CH₃, C ^{β} H-a von D-Dab1 und D-Dab2), 1.69-1.58 ppm (2 H; C ^{β} H-b von D-Dab1 und D-Dab2).

¹³C-NMR (150.9 MHz, d₆-DMSO):

δ = 172.6, 171.0 (C(O)CH), 169.3 (C(O)CH₃), 154.4 (OC(O)NH), 90.6 (C-1), 74.4 (C-5), 70.1 (C-3), 70.0 (C-4), 60.4 (C-6), 52.8 (C-2), 50.4 (C ^{α} von D-Dab1), 50.1 (C ^{α} von D-Dab2), 36.9 (C ^{γ} von D-Dab1 und D-Dab2), 31.7 (C ^{β} von D-Dab1 und D-Dab2), 22.4, 22.3 ppm (C(O)CH₃).

RP-HPLC:

t_R = 13.6 min (Knauer Eurospher 4 mm, Flussrate = 0.9 mL/min, 1-10 % MeCN in 20 min, H₂O und MeCN mit 0.1 % TFA), t_R = 12.7 min (Knauer Eurospher 16 mm, Flussrate = 9.6 mL/min, 1-10 % MeCN in 20 min, H₂O und MeCN mit 0.1 % TFA)

MALDI-MS für $C_{28}H_{47}N_7O_{17}$:

$[M + Na]^+$ berechnet 776.3, gefunden 776.3, $[M + K]^+$ berechnet 792.3, gefunden 792.3.

HR-ESI-TOF:

$[M + H]^+$ berechnet 754.31012, gefunden 754.3080, $[M + Na]^+$ berechnet 776.29206, gefunden 776.2896.

6.1.4.3 Synthese des divalenten Dipeptids **95** zur kovalenten Immobilisierung auf Glasoberflächen

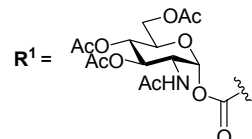
Boc-21-amino-hexaaxahenikosansäureamid-D-Dab(Ddv)-D-Dab(Ddv)-Rink-PS **91**

0.09 mmol von Harz **79** wurden nach Quellen für 10 Minuten in NMP mit 1.9 eq HBTU, 3 eq HOBt, 2 eq Verbindung **90** und 4 eq DIPEA in NMP für 4.5 Stunden geschüttelt. Nach Absaugen wurde zehnmal je eine Minute mit NMP und zweimal je drei Minuten mit Dichlormethan gewaschen. Da die Tests nach AAV 3 und AAV 4 nicht komplett negativ ausfielen wurde erneut für 3.5 Stunden gekuppelt. Anschließend wurde zehnmal je eine Minute mit DMF gewaschen und dann nach AAV 5 eventuell verbliebene Aminogruppen acyliert.

Boc-21-amino-hexaaxahenikosansäureamid-D-Dab-D-Dab-Rink-PS **92**

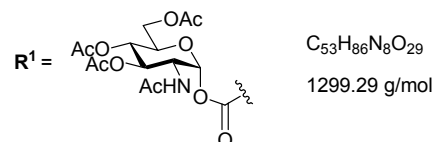
Harz **91** wurde nach AAV 6 zu Harz **92** umgesetzt.

Boc-21-amino-hexaaxahenikosansäureamid-D-Dab(R¹)-D-Dab(R¹)-Rink-PS **93**



Harz **92** wurde nach AAV 7 mit Zuckerderivat **13** zu Harz **93** umgesetzt.

21-Amino-hexaaxahenikosansäureamid-D-Dab(R¹)-D-Dab(R¹)-NH₂ **94**



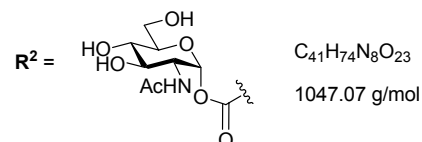
Von Harz **93** wurde nach AAV 12 Verbindung **94** abgespalten.

MALDI-MS für $C_{53}H_{86}N_8O_{29}$:

$[M + H]^+$ berechnet 1299.6 gefunden 1299.4, $[M + Na]^+$ berechnet 1321.5, gefunden 1321.4,
 $[M + K]^+$ berechnet 1337.5, gefunden 1337.3.

RP-HPLC:

$t_R = 11.0$ min (Vydac 4.6 mm, Flussrate = 0.9 mL/min, 20-80 % MeCN in 30 min, H₂O und MeCN mit 0.1 % TFA)

21-Amino-hexaaxahenikosansäureamid-D-Dab(R²)-D-Dab(R²)-NH₂ 95

Verbindung **94** wurde nach AAV 11 zu Verbindung **95** deacetyliert.

¹H-NMR (600.1 MHz, d₆-DMSO):

$\delta = 8.15$ -8.10 (1 H; NH D-Dab1), 8.02-7.94 (1 H; NH D-Dab2), 7.76-7.70 (5 H; NHAc GlcNAc, NH₃⁺), 7.36-7.32 (1 H; NH₂), 7.12-6.81 (3 H; 1 H von NH₂, 2 H von NH-Urethan), 5.82-5.80 (2 H; H-1), 4.30 (q, $J = 7.3$ Hz, 1 H; C ^{α} H von D-Dab1), 4.21 (q, $J = 7.2$ Hz, 1 H; C ^{α} H von D-Dab2), 3.74-3.70 (m, 2 H; H-2), 3.61-3.48 (m; H-6a, H-6b, H-3, H-5, 12 CH₂), 3.26-3.22 (m, 2 H; H-4), 3.08-2.93 (m, 6 H; CH₂, C ^{γ} H₂ von D-Dab1 und D-Dab2), 2.45-2.34 (m, 2 H; CH₂), 1.84-1.80 (8 H; 6 von C(O)CH₃, C ^{β} H-a von D-Dab1 und D-Dab2), 1.71-1.59 ppm (m, 2 H; C ^{β} H-b von D-Dab1 und D-Dab2).

¹³C-NMR (150.9 MHz, d₆-DMSO):

$\delta = 172.9$, 171.2, 170.4 (C(O)CH), 169.7, 169.6 (C(O)CH₃), 154.7 (OC(O)NH), 90.9, 90.8 (C-1), 74.5, 74.4 (C-5), 70.1, 69.7, 69.6, 69.5, 69.4, 69.3 (C-3, C-4, CH₂), 60.5, 60.4 (C-6), 52.9 (C-2), 50.5, 50.2 (C ^{α}), 38.6 (CH₂), 37.2, 37.1 (C ^{γ}), 35.8 (CH₂), 31.9 (C ^{β}), 22.5, 22.4 ppm (C(O)CH₃).

RP-HPLC:

$t_R = 13.4$ min (Knauer Eurospher 4 mm, Flussrate = 0.9 mL/min, 5-40 % MeCN in 30 min, H₂O und MeCN mit 0.1 % TFA), $t_R = 14.3$ min (Knauer Eurospher 16 mm, Flussrate = 9.6 mL/min, 5-20 % MeCN in 20 min, H₂O und MeCN mit 0.1 % TFA)

MALDI-MS für $C_{41}H_{74}N_8O_{23}$:

$[M + H]^+$ berechnet 1047.5, gefunden 1047.4, $[M + Na]^+$ berechnet 1069.5, gefunden 1069.4,
 $[M + K]^+$ berechnet 1085.5, gefunden 1085.3.

HR-ESI-TOF:

$[M + H]^+$ berechnet 1047.49396, gefunden 1047.4966, $[M + Na]^+$ berechnet 1069.4759, gefunden
1069.4789.

6.1.4.4 Synthese des tetravalenten Cyclopeptids 108 zur kovalenten Immobilisierung auf Glasoberflächen

Fmoc-Lys(Aloc)-D-Dab(Ddv)-D-Val-D-Dab(Ddv)-D-Dab(Ddv)-D-Val-D-Dab(Ddv)-Glu(OAll)- β -Ala-NH₂ 97

C₁₁₄H₁₆₇N₁₅O₂₃

2115.63 g/mol

Harz **66** wurde nach AAV 2 zu Harz **96** umgesetzt. Eine Testabspaltung analog AAV 9 ergab Verbindung **97**.

RP-HPLC:

t_R = 19.4 min (Knauer Nucleosil 4 mm, Flussrate = 0.9 mL/min, 60-100 % MeCN in 30 min, H₂O und MeCN mit 0.1 % TFA)

MALDI-MS für C₁₁₄H₁₆₇N₁₅O₂₃:

[M + H]⁺ berechnet 2115.2, gefunden 2114.4, [M + Na]⁺ berechnet 2137.2, gefunden 2136.4, [M + K]⁺ berechnet 2153.2, gefunden 2152.3.

Boc-21-amino-hexaoxahenikosansäureamid-Lys(Aloc)-D-Dab(Ddv)-D-Val-D-Dab(Ddv)-D-Dab(Ddv)-D-Val-D-Dab(Ddv)-Glu(OAll)- β -Ala-NH₂ 99

C₁₁₉H₁₉₄N₁₆O₃₀

2328.9 g/mol

Harz **96** wurde nach AA V 2 zu Harz **98** umgesetzt. Eine Testabspaltung nach AAV 9 ergab Verbindung **99**.

RP-HPLC:

t_R = 14.5 min (Knauer Nucleosil 4 mm, Flussrate = 0.9 mL/min, 60-100 % MeCN in 30 min, H₂O und MeCN mit 0.1 % TFA)

MALDI-MS für C₁₁₉H₁₉₄N₁₆O₃₀:

[M + Na]⁺ berechnet 2350.4, gefunden 2349.9, [M + K]⁺ berechnet 2366.4, gefunden 2365.8.

Boc-21-amino-hexaoxahenikosansäureamid-Lys-D-Dab(Ddv)-D-Val-D-Dab(Ddv)-D-Dab(Ddv)-D-Val-D-Dab(Ddv)-Glu- β -Ala-NH₂ 101C₁₁₂H₁₈₆N₁₆O₂₈

2204.77 g/mol

Harz **98** wurde analog AAV 13 zu Harz **100** umgesetzt. Eine Testabspaltung nach AAV 9 ergab Verbindung **101**.

RP-HPLC:

t_R = 20.0 min (Knauer Nucleosil 4 mm, Flussrate = 0.9 mL/min, 30-90 % MeCN in 30 min, H₂O und MeCN mit 0.1 % TFA)

MALDI-MS für C₁₁₂H₁₈₆N₁₆O₂₈:

[M + H]⁺ berechnet 2204.4, gefunden 2203.7 [M + Na]⁺ berechnet 2226.4, gefunden 2225.7,

[M + K]⁺ berechnet 2242.3, gefunden 2241.6.

Boc-21-amino-hexaoxahenikosansäureamid-cyclo[Lys-D-Dab(Ddv)-D-Val-D-Dab(Ddv)-D-Dab(Ddv)-D-Val-D-Dab(Ddv)-Glu]- β -Ala-NH₂ 103C₁₁₂H₁₈₄N₁₆O₂₇

2186.75 g/mol

Harz **100** wurde nach AAV 14 zu Harz **102** umgesetzt. Eine Testabspaltung nach AAV 9 ergab Verbindung **103**.

RP-HPLC:

t_R = 22.2 min (Knauer Nucleosil 4 mm, Flussrate = 0.9 mL/min, 40-90 % MeCN in 30 min, H₂O und MeCN mit 0.1 % TFA)

MALDI-MS für C₁₁₂H₁₈₄N₁₆O₂₇:

[M + Na]⁺ berechnet 2208.3, gefunden 2208.0, [M + K]⁺ berechnet 2223.9, gefunden 2223.9.

Boc-21-amino-hexaoxahenikosansäureamid-cyclo[Lys-D-Dab-D-Val-D-Dab-D-Dab-D-Val-D-Dab-Glu]- β -Ala-NH₂ 104-A

C₆₀H₁₁₂N₁₆O₁₉

1361.63 g/mol

Harz **102** wurde analog AAV 6 zu Harz **104** umgesetzt. Eine Testabspaltung analog AAV 9 lieferte Verbindung **104-A**.

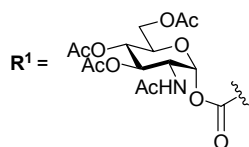
RP-HPLC:

t_R = 18.1 min (Knauer Nucleosil 4 mm, Flussrate = 0.9 mL/min, 5-50 % MeCN in 30 min, H₂O und MeCN mit 0.1 % TFA)

MALDI-MS für C₆₀H₁₁₂N₁₆O₁₉:

[M + Na]⁺ berechnet 1383.8, gefunden 1383.7, [M + K]⁺ berechnet 1399.8, gefunden 1399.7.

Boc-21-amino-hexaoxahenikosansäureamid-cyclo[Lys-D-Dab(R¹)-D-Val-D-Dab(R¹)-D-Dab(R¹)-D-Val-D-Dab(R¹)-Glu]- β -Ala-NH₂ 106



C₁₂₀H₁₈₈N₂₀O₅₉

2854.88 g/mol

Harz **104** wurde analog AAV 7 zu Harz **105** umgesetzt. Eine Abspaltung vom Harz nach AAV 9 lieferte Verbindung **106**.

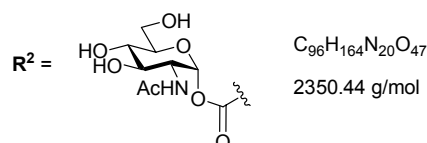
RP-HPLC:

t_R = 16.7 min (Knauer Nucleosil 4 mm, Flussrate = 0.9 mL/min, 20-80 % MeCN in 30 min, H₂O und MeCN mit 0.1 % TFA)

MALDI-MS für C₁₂₀H₁₈₈N₂₀O₅₉:

[M + Na]⁺ berechnet 2876.2, gefunden 2875.4, [M + K]⁺ berechnet 2892.1, gefunden 2891.3.

Boc-21-amino-hexaoxahenikosansäureamid-cyclo[Lys-D-Dab(R²)-D-Val-D-Dab(R²)-D-Dab(R²)-D-Val-D-Dab(R²)-Glu]-β-Ala-NH₂ 109



Verbindung **106** wurde nach AAV 11 zu Verbindung **109** deacetyliert.

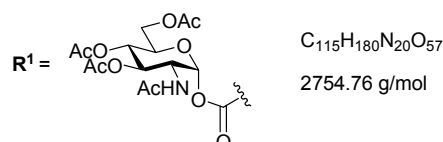
RP-HPLC:

$t_R = 17.4$ min (Knauer Nucleosil 4 mm, Flussrate = 0.9 mL/min, 5-50 % MeCN in 30 min, H₂O und MeCN mit 0.1 % TFA), $t_R = 15.2$ min (Knauer Nucleosil 8 mm, Flussrate = 3.6 mL/min, 15-28.3 % MeCN in 20 min, H₂O und MeCN mit 0.1 % TFA)

MALDI-MS für C₉₆H₁₆₄N₂₀O₄₇:

[M + Na]⁺ berechnet 2372.1, gefunden 2372.0, [M + K]⁺ berechnet 2388.1, gefunden 2387.9.

21-Amino-hexaoxahenikosansäureamid-cyclo[Lys-D-Dab(R¹)-D-Val-D-Dab(R¹)-D-Dab(R¹)-D-Val-D-Dab(R¹)-Glu]-β-Ala-NH₂ 107



Verbindung **106** wurde nach AAV 10 zu Verbindung **107** umgesetzt.

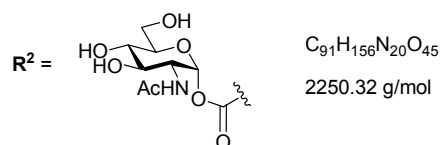
RP-HPLC:

$t_R = 13.3$ min (Knauer Nucleosil 4 mm, Flussrate = 0.9 mL/min, 20-80 % MeCN in 30 min, H₂O und MeCN mit 0.1 % TFA), $t_R = 12.3$ min (Knauer Nucleosil 8 mm, Flussrate = 3.6 mL/min, 20-56 % MeCN in 18 min, H₂O und MeCN mit 0.1 % TFA)

MALDI-MS für C₁₁₅H₁₈₀N₂₀O₅₇:

[M + H]⁺ berechnet 2754.2, gefunden 2753.6, [M + Na]⁺ berechnet 2776.2, gefunden 2775.6, [M + K]⁺ berechnet 2792.1, gefunden 2791.6.

21-Amino-hexaoxahenikosäureamid-cyclo[Lys-D-Dab(R²)-D-Val-D-Dab(R²)-D-Dab(R²)-D-Val-D-Dab(R²)-Glu]-β-Ala-NH₂ 108



Verbindung **108** wurde entweder durch Deacetylierung von Verbindung **107** nach AAV 11 oder durch Entfernung der Boc-Schutzgruppe von Verbindung **109** nach AAV 10 erhalten.

RP-HPLC:

$t_R = 16.0$ min (Knauer Nucleosil 4 mm, Flussrate = 0.9 mL/min, 5-50 % MeCN in 30 min, H₂O und MeCN mit 0.1 % TFA), $t_R = 12.7$ min (Knauer Nucleosil 8 mm, Flussrate = 3.6 mL/min, 5-30 % MeCN in 20 min, H₂O und MeCN mit 0.1 % TFA)

MALDI-MS für $C_{91}H_{156}N_{20}O_{45}$:

$[M + Na]^+$ berechnet 2272.0, gefunden 2271.7, $[M + K]^+$ berechnet 2288.0, gefunden 2287.6.

HR-ESI-TOF:

$[M + 2 H]^{2+}$ berechnet 1125.53395, gefunden 1125.5284, $[M + H + Na]^{2+}$ berechnet 1136.52492, gefunden 1136.5188.

6.2 Biochemische Arbeiten

6.2.1 Verwendete spezielle Reagenzien und Geräte

Reagenzien:

2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)- diammoniumsalz (ABTS)	Sigma A-1888
H ₂ O ₂ (30 %)	Sigma H-1009
Peroxidase-markiertes WGA	Sigma L-7017
Schweinemagen-Mucin (Typ III)	Sigma M-1778
Rhodamin-markiertes WGA	Vector
Rinderserumalbumin (BSA)	Serva 11930
Tween 20	Fluka 93773

Geräte:

- BMG Labtech Fluostar Optima
- Plate-Washer (Nunc, Cat. Nr. 470 175)
- Klebefolien für MikroWell Platten - Polyester (Nunc, Cat. Nr. 236366)
- Polypropylen-Platten (96 Wells, Nunc, Cat. Nr. 442587)
- Falcon ProBind-Platten (96 Wells, Becton Dickinson, Cat. No. 353915)
- Aminofunktionalisierte Platten (96 Wells, Nunc, CovaLink NH modules, Cat. No. 478042)
- Aminopropylsilanierte Glasträger (Genetix, Amine Arraying Slides, Cat. No. K2615)
- Aminopropylsilanierte Glasträger (Schott, Nexterion Slide Aplus, Cat. No. 1064875)
- *Nano-Plotter 2* der Firma GeSiM
- Array-Scanner *GenePix Personal 4100 A* der Firma Axon Instruments

6.2.2 Enzymgekoppelter Lectinbindungstest (ELLA)

6.2.2.1 Puffer und sonstige Lösungen

Phosphatgepufferte NaCl-Lösung (PBS), pH 7.3 (10 mM Phosphat, 150 mM NaCl)

362 mg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ (2.32 mmol), 2.751 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ (7.68 mmol) und 8.750 g NaCl (150 mmol) wurden in 800 mL Reinstwasser gelöst, der pH-Wert (mit NaOH bzw. HCl) auf 7.3 eingestellt und auf 1000 mL Endvolumen aufgefüllt.

PBS, pH 7.3 + 0.05 Vol-% Tween 20 (PBST)

0.5 mL Tween 20 wurden auf 1000 mL Gesamtvolumen mit PBS-Puffer pH 7.3 aufgefüllt.

100 mM Carbonat/Bicarbonat-Puffer, pH 10.2

1.325 g (12.5 mmol) Na_2CO_3 und 1.050 g NaHCO_3 (12.5 mmol) wurden in 250 mL Reinstwasser gelöst. Der Puffer wurde immer unmittelbar vor Gebrauch hergestellt.

200 mM Citrat-Phosphat-Puffer, pH 4.0

17.67 g wasserfreie Citronensäure (92 mmol) und 38.68 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ (108 mmol) wurden in 800 mL Reinstwasser gelöst. Der pH-Wert wurde auf 4.0 eingestellt und die Lösung auf ein Gesamtvolumen von 1000 mL mit Reinstwasser aufgefüllt.

ABTS-Lösung, pH 4.0 mit 0.015 % H_2O_2

In einem 100 mL Messkolben wurden 25 mg ABTS eingewogen, in Citrat-Phosphat-Puffer pH 4.0 gelöst, 50 μL Wasserstoffperoxid (30 %) zugesetzt und mit Citrat-Phosphat-Puffer zur Marke aufgefüllt (1 mg ABTS pro 4 mL Lösung). Die ABTS-Lösung wurde unmittelbar vor Gebrauch frisch angesetzt und im Dunkeln aufbewahrt, da der Farbstoff lichtempfindlich ist.

Mucin-Stammlösung

20.6 mg Schweinemagen-Mucin wurden in einen 50 mL Messkolben eingewogen. Dann wurde mit PBS-Puffer bis zur Marke aufgefüllt ($c = 0.412 \mu\text{g}/\mu\text{L}$). Die Stammlösung kann im Kühlschrank einige Tage aufbewahrt werden.

Verdünnte Mucin-Lösung

1000 μL der Mucin-Stammlösung ($0.412 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) wurden in einen 100 mL Messkolben pipettiert und mit PBS-Puffer bis zur Marke aufgefüllt ($c = 4.12 \mu\text{g}/\text{mL}$). Diese Lösung wurde vor Gebrauch frisch angesetzt.

1 % BSA in PBS-Puffer

Hierzu wurden 500 mg Rinderserumalbumin (BSA) in einen 50 mL Messkolben eingewogen und mit PBS-Puffer bis zur Marke aufgefüllt. Auch diese Lösung wurde vor Benutzung frisch angesetzt.

Lectin-Lösungen

Das gelieferte **Weizenkeimagglutinin-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat** (WGA-HRP-Konjugat) (0.5 mg) wurde in 10 mL Reinstwasser gelöst ($c = 50 \mu\text{g}/\text{mL}$). Dann wurden $480 \mu\text{L}$ -Aliquote entnommen, auf Schraubdeckelgläschen verteilt und lyophilisiert. Die jeweils gewünschten Lectin-Konzentrationen wurden dann unmittelbar vor den Tests durch Verdünnungen mit PBS-Puffer hergestellt.

Das gelieferte **Rhodamin-markierte Weizenkeimagglutinin** (WGA-Rhodamin) ($5 \text{ mg}/\text{mL}$ in HEPES-Puffer) wurde direkt vor Verwendung auf die gewünschte Konzentration mit PBS-Puffer inkl. 0.1 % Tween oder mit PBS-Puffer inkl. 1 % BSA verdünnt.

6.2.2.2 Protokoll zur Durchführung des nicht-kovalenten Bindungstests (PSM-Assay)

Beschichten der Mikrotiterplatten mit Schweinemagenmucin

Zum Beschichten der Polystyrol-Mikrotiterplatten (Falcon ProBind) wurden die *Wells* mit $100 \mu\text{L}/\text{Well}$ verdünnter Mucinlösung ($4.12 \mu\text{g}/\text{mL}$) mit Hilfe einer Mehrkanalpipette befüllt. Dann wurden die Mikrotiterplatten mit Klebefolie zur Vermeidung von Verdunstungen verschlossen und bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Im Anschluss wurden die Platten fünfmal mit PBST-Puffer gewaschen (plate-washer), kurz ausgeklopft und umgekehrt auf ein Papierwischtuch gelegt, um anhaftende restliche Waschlösung zu entfernen.

Blockieren der Mikrotiterplatten mit Rinderserumalbumin

Die mit Mucin beschichteten Platten wurden dann zur Vermeidung unspezifischer Wechselwirkungen mit 1 % Rinderserumalbumin (BSA) in PBS-Puffer (150 $\mu\text{L}/\text{Well}$) bei 37°C für 90 min im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Platten erneut fünfmal mit PBST-Puffer gewaschen, ausgeklopft und kurz umgedreht getrocknet.

Ansetzen der Inhibitorlösungen

Die jeweiligen Inhibitoren wurden eingewogen und in PBS-Puffer gelöst. Von diesen Stammlösungen wurden die entsprechenden Verdünnungen in die Polypropylen-Platten (Nunc) pipettiert.

Vorinkubation von Inhibitor und Lectinlösung

Zur Vorinkubation wurden zu den Inhibitorverdünnungsreihen in den Polypropylenplatten (60 μL Inhibitorlösung pro *Well*) je 60 μL WGA-HRP-Lösung pipettiert. Dann wurde 60 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Eine Reihe der *Wells* wurde als *Blank* (120 μL PBS-Puffer) und eine weitere Reihe zur Inkubation mit dem WGA-HRP-Konjugat ohne Inhibitorzusatz (60 μL Lectin-Lösung + 60 μL PBS-Puffer) zur Bestimmung der maximalen Absorption $A_{(\text{ohne Inhibitor})}$ verwendet.

Inkubation und Anfärbung

Nach der Vorinkubation wurden je 100 μL der Inhibitor-Lectin-Peroxidase-Lösungen mit einer 12-Kanalpipette in die mit Mucin beschichteten Falcon ProBind-Mikrotiterplatten überführt und 90 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Dann wurden die Platten fünfmal mit PBST-Puffer gewaschen, ausgeklopft und kurz umgedreht getrocknet. Im Anschluss wurden pro *Well* jeweils 50 μL der ABTS-Lösung zupipettiert. Die Farbentwicklung erfolgte 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln.

Abstoppung der Farbentwicklung und Messung

Die Abstoppung der Farbentwicklung erfolgte durch Zugabe von je 50 μL 1 M H_2SO_4 pro *Well*. Nach 5 min Reaktionszeit im Dunkeln erfolgte die sofortige Messung mit einem ELISA-Reader bei 405 nm. Bei jeder Inhibitorkonzentration wurden in der Regel zwei unabhängige Experimente durchgeführt und im Anschluss aus diesen Daten ein Mittelwert gebildet.

6.2.2.3 Protokoll zur Durchführung des kovalenten Bindungstests

Modifizierung der aminofunktionalisierten Mikrotiterplatten 51

Die aminofunktionalisierten Mikrotiterplatten **51** (Nunc, CovaLink NH modules, Cat. No. 478042) wurden mit einer Lösung aus 0.5 % 1,4-Diphenylendiisothiocyanat (PDITC) in DMSO mit 0.4 % EtN(*i*-Pr)₂ für 3 h bei Raumtemperatur behandelt (100 µL pro *Well*). Die Mikrotiterplatten wurden dabei mit Klebefolie zur Vermeidung von Verdunstungen verschlossen. Dann wurden die Platten je zweimal mit Isopropanol, Wasser und Carbonat/Bicarbonat-Puffer (100 mM, pH 10.2) gewaschen, ausgeklopft und kurz umgedreht getrocknet.

Kovalente Immobilisierung von Verbindung 56 auf die PDITC-modifizierten Mikrotiterplatten 58

Die PDITC-modifizierten Mikrotiterplatten **58** wurden mit einer 1 mM Lösung von Verbindung **56** in Carbonat/Bicarbonat-Puffer (100 mM, pH 10.2) behandelt (100 µL pro *Well*). Dann wurden die Mikrotiterplatten mit Klebefolie zur Vermeidung von Verdunstungen verschlossen und bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Die Platten wurden danach einmal mit Isopropanol und zweimal mit PBST-Puffer (pH 7.3) gewaschen.

Die weitere Vorgehensweise (Blockieren mit BSA, Inkubation mit Lectin, Anfärbung und Messung) wurde analog dem oben beschriebenen Assay mit den PSM-Mikrotiterplatten durchgeführt, außer dass sowohl für die Anfärbung 100 µL pro *Well* von der ABTS-Lösung als auch für die Abstopfung der Farbentwicklung 100 µL pro *Well* von der H₂SO₄ verwendet wurden.

6.2.2.4 Auswertung

Die Subtraktion des Mittelwertes der *Blank*reihe von den gemittelten maximalen Absorptionswerten ohne Inhibitorzusatz lieferte den Messwert $A_{(\text{ohne Inhibitor})}$. Durch die Subtraktion des Mittelwertes der *Blank*reihe von den gemittelten Messwerten mit Inhibitorzusätzen erhielt man die Werte $A_{(\text{mit Inhibitor})}$. Die Berechnung der prozentualen Inhibition *I* erfolgte nach Gleichung 9, in der *A* für die gemessene Absorption bei 405 nm steht.

$$I = \left(\frac{A_{(\text{ohne Inhibitor})} - A_{(\text{mit Inhibitor})}}{A_{(\text{ohne Inhibitor})}} \right) \times 100 \quad \text{Gleichung 9}$$

Zur Auswertung wurde die prozentuale Inhibition I gegen den Logarithmus der Inhibitor-konzentration x aufgetragen und ein Kurvenfitting mithilfe des Programms SigmaPlot 8.0 an die in Gleichung 10 dargestellte Funktion (sigmoidale dose response) durchgeführt.

$$I = I_{\min} + \frac{I_{\max} - I_{\min}}{1 + 10^{(\lg EC_{50} - x)}} \quad \text{Gleichung 10}$$

In dieser Gleichung steht EC₅₀ für den Wendepunkt der Kurve. Als IC₅₀-Wert wurde die Konzentration angegeben, bei der eine Inhibition der WGA-Oberflächen-Assoziation von 50 % vorliegt.

6.2.3 Kohlenhydratarrays

Aktivierung von aminopropylsilanisierten Glaträgern

Die aminopropylsilanisierten Glaträger der Firma *Genetix* (Amine Arraying Slides) bzw. der Firma *Schott* (Nexterion Slide Aplus) wurden in einer Lösung aus 0.2 % 1,4-Diphenylendiisothiocyanat (PDITC) in 10 % Pyridin/DMF über Nacht auf einem Schüttler leicht geschwenkt.

Die Glaträger wurden im Anschluss dreimal mit DMF, zweimal mit Dichlormethan und einmal mit Aceton für je 10 Minuten gewaschen. Danach wurden sie im Stickstoff-Gasstrom getrocknet und im Exsikkator über CaCl₂ aufbewahrt.

Funktionalisierung von aktivierten Glaträgern

Die Proben wurden in Carbonat/Bicarbonat-Puffer (100 mM, pH 10.2) inkl. 20 % DMSO gelöst. Das Aufbringen der Proben auf die aktivierten Glaträger mit Hilfe des Computer-gesteuerten Spotters (*Nano-Plotter 2* der Firma *GeSiM*) wurde bei einer Luftfeuchtigkeit von ca. 80 % und einer Untergrundflächentemperatur von 10 °C durchgeführt. Es wurden 4 nL Proben-Lösung pro Spot auf den Glaträger gegeben. Im Anschluss wurde für 23 h in einer Carbonat/Bicarbonat-Puffer-Feuchtigkeitskammer inkubiert.

Blockierung störender funktioneller Gruppen

Die funktionalisierten Glaträger wurden in einer 10 %igen Ammoniumhydroxid-Lösung einmal 25 Minuten auf einem Schüttler geschwenkt und dann im Ultraschall-Bad bei 50 % Power für 5 Minuten behandelt.

Anschließend wurden die Glasträger 5 Minuten mit Wasser im Ultraschallbad (50 % Power) gewaschen. Dann wurden sie dreimal 5 Minuten mit Wasser und einmal 5 Minuten mit MeOH auf dem Schüttler geschwenkt. Danach wurden die Glasträger im Stickstoff-Gasstrom getrocknet und direkt weiterverwendet.

Inkubation mit farbstoffmarkiertem Lectin

Je nach Chip-Layout wurde mit unterschiedlichen Lectinvolumina gearbeitet. Bei Verwendung einer Lectin-Konzentration für den ganzen Chip wurden anfangs 55 μL Lösung auf den Chip gegeben, dann wurde mit einem großen Deckglas (24 x 60 mm) abgedeckt und in der PBS-Puffer-Feuchtigkeitskammer für 90 Minuten inkubiert. Später (optimierte Bedingungen) wurde der ganze Glasträger in 20 mL Lectin-Lösung für drei Stunden im Dunkeln geschwenkt. Bei Verwendung von acht Lectin-Konzentrationen pro Chip wurden anfangs 3.4 μL Lösung auf die dafür vorgesehene Stelle auf dem Glasträger gegeben, dann wurde jeweils mit einem kleinen, runden Deckglas (10 mm Durchmesser) abgedeckt und in der PBS-Puffer-Feuchtigkeitskammer für 90 Minuten inkubiert. Später (optimierte Bedingungen) wurde der Glasträger mit einer selbstklebenden Silikonmaske versehen und 80 μL Lectin-Lösung wurden pro *Well* zupipettiert. Dann wurde der Glasträger für 24 Stunden im Dunkeln in der Carbonat-Puffer-Feuchtigkeitskammer geschwenkt.

Anschließend wurden die Glasträger zweimal 5 Minuten mit PBS-Puffer inkl. 0.1 % Tween (kalt) auf dem Schüttler gewaschen, dann mit Wasser kurz abgespült und im Stickstoff-Gasstrom getrocknet.

Messung

Die auf den Glasträgern immobilisierten Lectin-Liganden wurden am Array-Scanner *GenePix Personal 4100 A* der Firma *Axon Instruments* bei einer Wellenlänge von 532 nm detektiert. Der Träger wurde bei einer Pixelgröße von 20 μm bei einem geeigneten PMT-Gain zweimal gescannt. Es wurde dann automatisch der Mittelwert aus den beiden Fluoreszenzmessungen gebildet.

Auswertung

Zur Auswertung wurden die Mittelwerte (Median) der gemessenen Fluoreszenzintensitäten *F* (neun Replikate) gegen die WGA-Rhodamin-Konzentrationen aufgetragen und die Kurven als

Langmuir-Isothermen analysiert. Es wurde ein Kurvenfitting mithilfe des Programms SigmaPlot 8.0 an die in Gleichung 11 dargestellte Funktion (one site saturation) durchgeführt.

$$F = \frac{F_{\max} \cdot [P]}{[P] + K_{D, \text{surf}}}$$

Gleichung 11

In dieser Gleichung steht F_{\max} für die maximale Fluoreszenzintensität und $[P]$ für die Gesamtlektinkonzentration. Der $K_{D, \text{surf}}$ -Wert ist die scheinbare Gleichgewichtsdissoziationskonstante für die Oberflächen-immobilisierten Kohlenhydrate und das Lectin.

7 Literaturverzeichnis

- [1] D. Voet, J. G. Voet, *Biochemie*, Wiley-VCH, Weinheim, **1992**.
- [2] S.-I. Hakomori, *Spektrum der Wissenschaft* **1986**, Juli, 90-101.
- [3] H.-J. Gabius, *Naturwissenschaften* **2000**, 87, 108-121.
- [4] H.-J. Gabius, H.-C. Siebert, S. Andre, J. Jimenez-Barbero, H. Rüdiger, *ChemBioChem* **2004**, 5, 740-764.
- [5] R. R. Schmidt, *Angew. Chem.* **1986**, 98, 213-236.
- [6] A. Ehnsen, Dissertation, Universität Konstanz **1986**.
- [7] R. A. Dwek, *Chem. Rev.* **1996**, 683-720.
- [8] Y. C. Lee, R. T. Lee, *Acc. Chem. Res.* **1995**, 28, 321-327.
- [9] H. Lis, N. Sharon, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 637-674.
- [10] N. Sharon, H. Lis, *Spektrum der Wissenschaft* **1993**, März, 66-74.
- [11] *BioCarb Chemicals Katalog* **1990**.
- [12] H. Lis, N. Sharon, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 637-674.
- [13] T. K. Lindhorst, *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.
- [14] Y. C. Lee, R. T. Lee, *J. Biomed. Sci.* **1996**, 3, 221-237.
- [15] V. Wittmann, in *Glycoscience: Chemistry and Chemical Biology*, 2. Aufl. (Hrsg.: J. Thiem), Springer-Verlag, Berlin, **2008**, S. 1771-1793.
- [16] R. Loris, *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, 1572, 198-208.
- [17] V. Wittmann, S. Seeberger, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 918-921.
- [18] S. André, R. J. Pieters, I. Vrasidas, H. Kaltner, I. Kuwabara, F.-T. Liu, R. M. J. Liskamp, H.-J. Gabius, *ChemBioChem* **2001**, 2, 822-830.
- [19] M. Köhn, J. M. Benito, C. Ortiz Mellet, T. K. Lindhorst, J. M. García Fernández, *ChemBioChem* **2004**, 5, 771-777.
- [20] S. Choudhuri, *J. Biochem. Mol. Tox.* **2004**, 18, 171-179.
- [21] D. N. Howbrook, A. M. van der Valk, M. C. O'Shaughnessy, D. K. Sarker, S. C. Baker, A. W. Lloyd, *Drug Discovery Today* **2003**, 8, 642-651.
- [22] Q. Xu, K. S. Lam, *J. Biomed. Biotechnol.* **2003**, 257-266.
- [23] I. Shin, S. Park, M.-R. Lee, *Chem. Eur. J.* **2005**, 11, 2894-2901.
- [24] N. Laurent, J. Voglmeir, S. L. Flitsch, *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **2008**, 4400-4412.

- [25] D. C. Kilpatrick, *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, 1572, 187-197.
- [26] H. Stillmark, *Inaugural-Dissertation*, Schnakenburgs Buchdruckerei, Dorpat **1888**.
- [27] J. B. Sumner, *J. Biol. Chem.* **1919**, 37, 137-142.
- [28] J. B. Sumner, *J. Bacteriol.* **1936**, 32, 227-237.
- [29] W. C. Boyd, in *The Proteins, Band 2* (Hrsg.: K. Bailey), Academic Press, New York, **1954**, S. 756-844.
- [30] J. Kocourek, in *The Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine* (Hrsg.: I. E. Liener, N. Sharon, I. J. Goldstein), Academic Press, New York, **1986**.
- [31] T. Takahashi, G. Funatsu, M. Funatsu, *J. Biochem. (Tokyo, Jpn.)* **1962**, 52, 50-53.
- [32] M. Ishiguro, T. Takahashi, G. Funatsu, K. Hayashi, M. Funatsu, *J. Biochem. (Tokyo, Jpn.)* **1964**, 55, 587-592.
- [33] M. Ishiguro, T. Takahashi, K. Hayashi, M. Funatsu, *J. Biochem. (Tokyo, Jpn.)* **1964**, 56, 325-327.
- [34] H. Lis, N. Sharon, E. Katchalski, *Biochim. Biophys. Acta* **1964**, 83, 376-378.
- [35] W. T. J. Morgan, W. M. Watkins, *Glycoconjugate J.* **2000**, 17, 501-530.
- [36] H. Rüdiger, H.-C. Siebert, D. Solis, J. Jimenez-Barbero, A. Romero, C.-W. von der Lieth, T. Diaz-Maurino, H.-J. Gabius, *Curr. Med. Chem.* **2000**, 7, 389-416.
- [37] H.-J. Gabius, S. André, H. Kaltner, H.-C. Siebert, *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, 1572, 165-177.
- [38] S. S. Komath, M. Kavitha, M. J. Swamy, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4, 973-988.
- [39] H. Rüdiger, *Acta Anat.* **1998**, 161, 130-152.
- [40] N. Sharon, H. Lis, *Lectins*, Chapman and Hall, London, **1989**.
- [41] R. J. Stockert, *Science* **1974**, 186, 365-366.
- [42] W. I. Weis, K. Drickamer, *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, 65, 441-473.
- [43] H. Lis, N. Sharon, *Annu. Rev. Biochem.* **1986**, 55, 35-67.
- [44] K. Drickamer, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 9557-9560.
- [45] H.-J. Gabius, *Glycoconjugate J.* **2001**, 30, 3-31.
- [46] F.-T. Liu, R. J. Patterson, J. L. Wang, *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, 1572, 263-273.
- [47] J. D. Schrag, D. O. Procopio, M. Cygler, D. Y. Thomas, J. J. M. Bergeron, *Trends Biochem. Sci.* **2003**, 28, 49-57.
- [48] G. A. Rabinovich, N. Rubinstein, M. A. Toscano, *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, 1572, 274-284.

- [49] E. Mizoguchi, A. Mizoguchi, *Immunol. Res.* **2007**, *37*, 47-60.
- [50] M. Ambrosi, N. R. Cameron, B. G. Davis, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 1593-1608.
- [51] H.-J. Gabius, *Crit. Rev. Immunol.* **2006**, *26*, 43-79.
- [52] K. J. Mengerink, V. D. Vacquier, *Glycobiology* **2001**, *11*, 37R-43R.
- [53] C. S. Wright, S. Olafsdottir, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 7191-7195.
- [54] J. C. Aub, C. Tieslau, A. Lankester, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1963**, *50*, 613-619.
- [55] M. Burger, *Biochemistry* **1969**, *62*, 994-1001.
- [56] R. H. Rice, M. E. Etzler, *Biochemistry* **1975**, *14*, 4093-4099.
- [57] C. S. Wright, N. Raikhel, *J. Mol. Evol.* **1989**, *28*, 327-336.
- [58] M. Muraki, M. Ishimura, K. Harata, *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **2002**, *1569*, 10-20.
- [59] C. S. Wright, G. E. Kellogg, *Protein Sci.* **1996**, *5*, 1466-1476.
- [60] H. T. Wright, G. Sandrasegaram, C. S. Wright, *J. Mol. Evol.* **1991**, *33*, 283-294.
- [61] C. S. Wright, *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*, 635-651.
- [62] C. S. Wright, *J. Mol. Biol.* **1987**, *194*, 501-529.
- [63] G. Bains, R. T. Lee, Y. C. Lee, E. Freire, *Biochemistry* **1992**, *31*, 12624-12628.
- [64] J. F. Espinosa, J. L. Asensio, J. L. Garcia, J. Laynez, M. Bruix, C. Wright, H.-C. Siebert, H.-J. Gabius, F. J. Canada, J. Jiménez-Barbero, *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 1-15.
- [65] C. S. Wright, J. Jaeger, *J. Mol. Biol.* **1993**, *232*, 620-638.
- [66] K. Harata, H. Nagahora, Y. Jigami, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **1995**, *D51*, 1013-1019.
- [67] B. A. Williams, M. C. Chervenak, E. J. Toone, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 22907-22911.
- [68] D. I. Liao, G. Kapadia, H. Ahmed, G. R. Vasta, O. Herzberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91*, 1428-1432.
- [69] R. U. Lemieux, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 373-380.
- [70] D. H. Williams, M. S. Westwell, *Chem. Soc. Rev.* **1998**, *27*, 57-64.
- [71] Y. Bourne, P. Rouge, C. Cambillau, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 18161-18165.
- [72] N. F. Burkhalter, S. M. Dimick, E. J. Toone, in *Carbohydrates in Chemistry and Biology, Band 2* (Hrsg.: P. Sinay), Wiley-VCH, Weinheim, **2000**, S. 863-914.
- [73] J. P. McCoy, J. Varani, I. J. Goldstein, *J. Cell Res.* **1983**, *151*, 96-103.
- [74] *Protein-Ligand Interactions: hydrodynamics and calorimetry* (Hrsg.: S. E. Harding, B. Z. Chowdhry), Oxford University Press, Oxford, **2001**.
- [75] J. J. Lundquist, E. J. Toone, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 555-578.

- [76] B. Meyer, T. Peters, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 864-890.
- [77] R. Roy, D. Pagé, S. Figueroa Perez, V. Verez Bencomo, *Glycoconjugate J.* **1998**, *15*, 251-263.
- [78] H. Streicher, W. Schmid, I. Wenzl, C. Fiedler, H. Kahlig, F. M. Unger, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1369-1371.
- [79] M. Duk, E. Lisowska, J. H. Wu, A. M. Wu, *Anal. Biochem.* **1994**, *221*, 266-272.
- [80] C. Heise, F. F. Bier, *Top. Curr. Chem.* **2006**, *261*, 1-25.
- [81] M. Schena, D. Shalon, R. W. Davis, P. O. Brown, *Science (Washington, D. C.)* **1995**, *270*, 467-470.
- [82] K.-y. Tomizaki, K. Usui, H. Mihara, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 782-799.
- [83] L. Bonetta, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 571-578.
- [84] G. Walter, K. Büssow, D. Cahill, A. Lueking, H. Lehrach, *Curr. Opin. Microbiol.* **2000**, *3*, 298-302.
- [85] T. O. Joos, M. Schrenk, P. Hopfl, K. Kroger, U. Chowdhury, D. Stoll, D. Schorner, M. Durr, K. Herrick, S. Rupp, K. Sohn, H. Hämmerle, *Electrophoresis* **2000**, *21*, 2641-2650.
- [86] B. D. Martin, B. P. Gaber, C. H. Patterson, D. C. Turner, *Langmuir* **1998**, *14*, 3971-3975.
- [87] B. B. Haab, M. J. Dunham, P. O. Brown, *Genome Biol* **2001**, *2*, research 0004.0001-0004.0013.
- [88] C. A. Rowe, L. M. Tender, M. J. Feldstein, J. P. Golden, S. B. Scruggs, B. D. MacCraith, J. J. Cras, F. S. Ligler, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 3846-3852.
- [89] M.-L. Lesaichere, R. Y. P. Lue, G. Y. J. Chen, Q. Zhu, S. Q. Yao, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8768-8769.
- [90] P. Pavlickova, N. M. Jensen, H. Paul, M. Schaeferling, C. Giammasi, M. Kruschina, W.-D. Du, M. Theisen, M. Ibba, F. Ortigao, D. Kambhampati, *J. Proteome Res.* **2002**, *1*, 227-231.
- [91] M. Schaeferling, M. Riepl, P. Pavlickova, H. Paul, D. Kambhampati, B. Liedberg, *Microchim. Acta* **2003**, *142*, 193-203.
- [92] H. Zhu, M. Bilgin, R. Bangham, D. Hall, A. Casamayor, P. Bertone, N. Lan, R. Jansen, S. Bidlingmaier, T. Houfek, T. Mitchell, P. Miller, R. A. Dean, M. Gerstein, M. Snyder, *Science (Washington, DC, U. S.)* **2001**, *293*, 2101-2105.
- [93] G. MacBeath, S. L. Schreiber, *Science (Washington, D. C.)* **2000**, *289*, 1760-1763.
- [94] H. Zhu, J. F. Klemic, S. Chang, P. Bertone, A. Casamayor, K. G. Klemic, D. Smith, M. Gerstein, M. A. Reed, M. Snyder, *Nat. Genet.* **2000**, *26*, 283-289.
- [95] R. Benters, C. M. Niemeyer, D. Wöhrle, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 686-694.

- [96] S. C. Lin, F. G. Tseng, H. M. Huang, C. Y. Huang, C. C. Chieng, *Fresenius' J. Anal. Chem.* **2001**, *371*, 202-208.
- [97] B. T. Houseman, J. H. Huh, S. J. Kron, M. Mrksich, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 270-274.
- [98] D. Heintz, V. Wurtz, A. A. High, A. Van Dorselaer, R. Reski, E. Sarnighausen, *Electrophoresis* **2004**, *25*, 1149-1159.
- [99] L. Nieba, S. E. Nieba-Axmann, A. Persson, M. Hamalainen, F. Edebratt, A. Hansson, J. Lidholm, K. Magnusson, A. F. Karlsson, A. Pluckthun, *Anal. Biochem.* **1997**, *252*, 217-228.
- [100] Z. Salamon, M. F. Brown, G. Tollin, *Trends Biochem. Sci.* **1999**, *24*, 213-219.
- [101] D. G. Myszka, R. L. Rich, *Pharm. Sci. Technol. Today* **2000**, *3*, 310-317.
- [102] R. L. Rich, Y. S. N. Day, T. A. Morton, D. G. Myszka, *Anal. Biochem.* **2001**, *296*, 197-207.
- [103] J. M. McDonnell, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 572-577.
- [104] J. C. Paulson, O. Blixt, B. E. Collins, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 238-248.
- [105] J. L. Magnani, D. F. Smith, V. Ginsburg, *Anal. Biochem.* **1980**, *109*, 399-402.
- [106] P. W. Tang, H. C. Gooi, M. Hardy, Y. C. Lee, T. Feizi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1985**, *132*, 474-480.
- [107] P. W. Tang, T. Feizi, *Carbohydr. Res.* **1987**, *161*, 133-143.
- [108] L. L. Kiessling, C. W. Cairo, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 234-235.
- [109] C. O. Mellet, J. M. G. Fernandez, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 819-822.
- [110] K. R. Love, P. H. Seeberger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3583-3586.
- [111] T. Feizi, F. Fazio, W. Chai, C.-H. Wong, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, *13*, 637-645.
- [112] D. Wang, *Proteomics* **2003**, *3*, 2167-2175.
- [113] S. L. Flitsch, R. V. Ulijn, *Nature* **2003**, *421*, 219-220.
- [114] J. Hirabayashi, *Trends Biotechnol.* **2003**, *21*, 141-143.
- [115] D. M. Ratner, E. W. Adams, M. D. Disney, P. H. Seeberger, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 1375-1383.
- [116] T. Feizi, W. Chai, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 582-588.
- [117] I. Shin, J. W. Cho, D. W. Boo, *Comb. Chem. High Throughput Screening* **2004**, *7*, 565-574.
- [118] M. D. Disney, P. H. Seeberger, *Drug Discovery Today: Targets* **2004**, *3*, 151-158.
- [119] I. Khan, D. V. Desai, A. Kumar, *J. Biosci. Bioeng.* **2004**, *98*, 331-337.
- [120] I. Shin, S. Park, M.-r. Lee, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 2894-2901.
- [121] R. Wang, S. Liu, D. Shah, D. Wang, *Methods Mol. Biol. (Totowa, NJ, U. S.)* **2005**, *310*, 241-252.

- [122] W. G. T. Willats, *Protein Microarrays* **2005**, 57-69.
- [123] V. I. Dyukova, N. V. Shilova, O. E. Galanina, A. Y. Rubina, N. V. Bovin, *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **2006**, *1760*, 603-609.
- [124] K. Larsen, M. B. Thygesen, F. Guillaumie, W. G. T. Willats, K. J. Jensen, *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 1209-1234.
- [125] N. L. Pohl, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 125-126.
- [126] J. L. de Paz, P. H. Seeberger, *QSAR Comb. Sci.* **2006**, *25*, 1027-1032.
- [127] I. Shin, J. Tae, S. Park, *Curr. Chem. Biol.* **2007**, *1*, 187-199.
- [128] T. Horlacher, P. H. Seeberger, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1414-1422.
- [129] S. Park, M.-R. Lee, I. Shin, *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **2008**, 4389-4399.
- [130] S. Jonke, K.-g. Liu, R. R. Schmidt, *Chem.-Eur. J.* **2006**, *12*, 1274-1290.
- [131] O. J. Plante, E. R. Palmacci, P. H. Seeberger, *Science* **2001**, *291*, 1523-1527.
- [132] P. Sears, C.-H. Wong, *Science* **2001**, *291*, 2344-2350.
- [133] D. Wang, S. Liu, B. J. Trummer, C. Deng, A. Wang, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 275-281.
- [134] Y. Fang, A. G. Frutos, J. Lahiri, *Langmuir* **2003**, *19*, 1500-1505.
- [135] M. B. Biskup, J. U. Müller, R. Weingart, R. R. Schmidt, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1007-1015.
- [136] G. T. Carroll, D. Wang, N. J. Turro, J. T. Koberstein, *Langmuir* **2006**, *22*, 2899-2905.
- [137] N. Kanoh, S. Kumashiro, S. Simizu, Y. Kondoh, S. Hatakeyama, H. Tashiro, H. Osada, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 5584-5587.
- [138] S. Angeloni, J. L. Ridet, N. Kusy, H. Gao, F. Crevoisier, S. Guinchard, S. Kochhar, H. Sigrist, N. Sprenger, *Glycobiology* **2005**, *15*, 31-41.
- [139] Z.-L. Zhi, A. K. Powell, J. E. Turnbull, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 4786-4793.
- [140] P.-H. Liang, S.-K. Wang, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11177-11184.
- [141] J. Su, M. Mrksich, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 4715-4718.
- [142] F. Fazio, M. C. Bryan, H.-K. Lee, A. Chang, C.-H. Wong, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 2689-2692.
- [143] M. C. Bryan, F. Fazio, H.-K. Lee, C.-Y. Huang, A. Chang, M. D. Best, D. A. Calarese, O. Blixt, J. C. Paulson, D. Burton, I. A. Wilson, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8640-8641.
- [144] E. A. Smith, W. D. Thomas, L. L. Kiessling, R. M. Corn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6140-6148.

- [145] L. C. P. M. De Smet, G. A. Stork, G. H. F. Hurenkamp, Q.-Y. Sun, H. Topal, P. J. E. Vronen, A. B. Sieval, A. Wright, G. M. Visser, H. Zuilhof, E. J. R. Sudhoelter, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13916-13917.
- [146] H. Uzawa, H. Ito, M. Izumi, H. Tokuhisa, K. Taguchi, N. Minoura, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 5895-5905.
- [147] W. G. T. Willats, S. E. Rasmussen, T. Kristensen, J. D. Mikkelsen, J. P. Knox, *Proteomics* **2002**, *2*, 1666-1671.
- [148] F. Fazio, M. C. Bryan, O. Blixt, J. C. Paulson, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14397-14402.
- [149] S. Fukui, T. Feizi, C. Galustian, A. M. Lawson, W. Chai, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 1011-1017.
- [150] M. C. Bryan, O. Plettenburg, P. Sears, D. Rabuka, S. Wacowich-Sgarbi, C.-H. Wong, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 713-720.
- [151] O. E. Galanina, M. Mecklenburg, N. E. Nifantiev, G. V. Pazynina, N. V. Bovin, *Lab on a Chip* **2003**, *3*, 260-265.
- [152] K.-S. Ko, F. A. Jaipuri, N. L. Pohl, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13162-13163.
- [153] B. S. Bochner, R. A. Alvarez, P. Mehta, N. V. Bovin, O. Blixt, J. R. White, R. L. Schnaar, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 4307-4312.
- [154] G.-S. Chen, N. L. Pohl, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 785-788.
- [155] F. A. Jaipuri, B. Y. M. Collet, N. L. Pohl, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 1731-1734.
- [156] Y. Chevolut, J. Martins, N. Milosevic, D. Leonard, S. Zeng, M. Malissard, E. G. Berger, P. Maier, H. J. Mathieu, D. H. G. Crout, H. Sigrist, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2943-2953.
- [157] J. M. Langenhan, J. S. Thorson, *Curr. Org. Synth.* **2005**, *2*, 59-81.
- [158] S. Park, I. Shin, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3312-3314.
- [159] S. Park, M.-r. Lee, S.-J. Pyo, I. Shin, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4812-4819.
- [160] E. W. Adams, J. Ueberfeld, D. M. Ratner, B. R. O'Keefe, D. R. Walt, P. H. Seeberger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5317-5320.
- [161] B. T. Houseman, E. S. Gawalt, M. Mrksich, *Langmuir* **2003**, *19*, 1522-1531.
- [162] D. M. Ratner, E. W. Adams, J. Su, B. R. O'Keefe, M. Mrksich, P. H. Seeberger, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 379-382.
- [163] E. W. Adams, D. M. Ratner, H. R. Bokesch, J. B. McMahon, B. R. O'Keefe, P. H. Seeberger, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 875-881.

- [164] Y.-U. Kwon, R. L. Soucy, D. A. Snyder, P. H. Seeberger, *Chem.--Eur. J.* **2005**, *11*, 2493-2504.
- [165] M. A. Brun, M. D. Disney, P. H. Seeberger, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 421-424.
- [166] B. T. Houseman, M. Mrksich, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 443-454.
- [167] T. Feizi, F. Fazio, W. Chai, C.-H. Wong, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, *13*, 637-645.
- [168] J. K. Lee, Y. S. Chi, I. S. Choi, *Langmuir* **2004**, *20*, 3844-3847.
- [169] Y. Zhang, S. Luo, Y. Tang, L. Yu, K.-Y. Hou, J.-P. Cheng, X. Zeng, G. Wang Peng, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 2001-2008.
- [170] X.-L. Sun, C. L. Stabler, C. S. Cazalis, E. L. Chaikof, *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 52-57.
- [171] M. Köhn, R. Wacker, C. Peters, H. Schröder, L. Soullère, R. Breinbauer, C. M. Niemeyer, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 6010-6014.
- [172] T. Sato, S. Fujita, M. C. Z. Kasuya, K. Hatanaka, T. Yamagata, *Chem. Lett.* **2004**, *33*, 580-581.
- [173] M. Schwarz, L. Spector, A. Gargir, A. Shtevi, M. Gortler, R. T. Altstock, A. A. Dukler, N. Dotan, *Glycobiology* **2003**, *13*, 749-754.
- [174] L. Nimrichter, A. Gargir, M. Gortler, R. T. Altstock, A. Shtevi, O. Weisshaus, E. Fire, N. Dotan, R. L. Schnaar, *Glycobiology* **2004**, *14*, 197-203.
- [175] M. D. Disney, P. H. Seeberger, *Chem.--Eur. J.* **2004**, *10*, 3308-3314.
- [176] J. L. de Paz, P. H. Seeberger, *Mol. BioSyst.* **2008**, DOI: 10.1039/b802217h.
- [177] E. A. Yates, M. O. Jones, C. E. Clarke, A. K. Powell, S. R. Johnson, A. Porch, P. P. Edwards, J. E. Turnbull, *J. Mater. Chem.* **2003**, *13*, 2061-2063.
- [178] S. E. Tully, M. Rawat, L. C. Hsieh-Wilson, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7740-7741.
- [179] M.-r. Lee, I. Shin, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4269-4272.
- [180] X. Zhou, J. Zhou, *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *21*, 1451-1458.
- [181] M. Mizuno, M. Noguchi, M. Imai, T. Motoyoshi, T. Inazu, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 485-490.
- [182] M. D. Disney, P. H. Seeberger, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1701-1707.
- [183] O. Blixt, S. Head, T. Mondala, C. Scanlan, M. E. Huflejt, R. Alvarez, M. C. Bryan, F. Fazio, D. Calarese, J. Stevens, N. Razi, D. J. Stevens, J. J. Skehel, I. van Die, D. R. Burton, I. A. Wilson, R. Cummings, N. Bovin, C.-H. Wong, J. C. Paulson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 17033-17038.

- [184] B. Xia, Z. S. Kawar, T. Ju, R. A. Alvarez, G. P. Sachdev, R. D. Cummings, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 845-850.
- [185] C.-Y. Huang, D. A. Thayer, A. Y. Chang, M. D. Best, J. Hoffmann, S. Head, C.-H. Wong, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 15-20.
- [186] J. L. de Paz, C. Noti, P. H. Seeberger, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2766-2767.
- [187] O. Blixt, S. Han, L. Liao, Y. Zeng, J. Hoffmann, S. Futakawa, J. C. Paulson, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6680-6681.
- [188] O. Bohorov, H. Andersson-Sand, J. Hoffmann, O. Blixt, *Glycobiology* **2006**, *16*, 21C-27C.
- [189] X.-L. Sun, L. Yang, E. L. Chaikof, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 2510-2513.
- [190] F. K. Wallner, H. A. Norberg, A. I. Johansson, M. Mogemark, M. Elofsson, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 309-315.
- [191] U. Nilsson, R. T. Striker, S. J. Hultgren, G. Magnusson, *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 1809-1817.
- [192] U. Nilsson, R. Johansson, G. Magnusson, *Chem.-Eur. J.* **1996**, *2*, 295-302.
- [193] H. C. Hansen, G. Magnusson, *Carbohydr. Res.* **1998**, *307*, 233-242.
- [194] A. Bergh, B. G. Magnusson, J. Ohlsson, U. Wellmar, U. J. Nilsson, *Glycoconjugate J.* **2001**, *18*, 615-621.
- [195] M.-r. Lee, I. Shin, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 2881-2884.
- [196] S. Park, I. Shin, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1675-1678.
- [197] Y.-G. Kim, D.-S. Shin, Y.-H. Yang, G.-C. Gil, C.-G. Park, Y. Mimura, D. K. C. Cooper, P. M. Rudd, R. A. Dwek, Y.-S. Lee, B.-G. Kim, *Chem. Biol. (Cambridge, MA, U. S.)* **2008**, *15*, 215-223.
- [198] J. L. de Paz, D. Spillmann, P. H. Seeberger, *Chem. Commun.* **2006**, 3116-3118.
- [199] L. Ban, M. Mrksich, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 3444-3447.
- [200] J. C. Manimala, Z. Li, A. Jain, S. VedBrat, J. C. Gildersleeve, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 2229-2241.
- [201] C. H. Lawrie, T. Marafioti, C. S. R. Hatton, S. Dirnhofer, G. Roncador, P. Went, A. Tzankov, S. A. Pileri, K. Pulford, A. H. Banham, *Int. J. Cancer* **2006**, *118*, 3161-3166.
- [202] www.lundonia.com
- [203] www.glycominds.com
- [204] M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, *37*, 2755-2794.

- [205] J. D. Badjic, A. Nelson, S. J. Cantrill, W. B. Turnbull, J. F. Stoddart, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 723-732.
- [206] Y. C. Lee, R. T. Lee, *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 321-327.
- [207] R. A. Dwek, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683-720.
- [208] V. Wittmann, in *Highlights in Bioorganic Chemistry: Methods and Applications* (Hrsg.: H. Wennemers), Wiley-VCH, Weinheim, **2004**, S. 203-213.
- [209] L. L. Kiessling, T. Young, T. D. Gruber, K. H. Mortell, in *Glycoscience: Chemistry and Chemical Biology*, 2. Aufl. (Hrsg.: B. Fraser-Reid, K. Tatsuta, J. Thiem), Springer-Verlag, Heidelberg, **2008**, S. 2483-2523.
- [210] M. Kanai, K. H. Mortell, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9931-9932.
- [211] M. C. Schuster, K. H. Mortell, A. D. Hegeman, L. L. Kiessling, *J. Mol. Catal. A: Chem.* **1997**, *116*, 209-216.
- [212] W. J. Sanders, E. J. Gordon, O. Dwir, P. J. Beck, R. Alon, L. L. Kiessling, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 5271-5278.
- [213] N. L. Pohl, L. L. Kiessling, *Synthesis* **1999**, 1515-1519.
- [214] K. H. Mortell, R. V. Weatherman, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2297-2298.
- [215] S.-K. Choi, M. Mammen, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 4103-4111.
- [216] R. Roy, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, *6*, 692-702.
- [217] P. R. Ashton, E. F. Hounsell, N. Jayaraman, T. M. Nilsen, N. Spencer, J. F. Stoddart, M. Young, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 3429-3437.
- [218] M. Dubber, T. K. Lindhorst, *Chem. Commun. (Cambridge)* **1998**, 1265-1266.
- [219] M. L. Wolfenden, M. J. Cloninger, *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 958-966.
- [220] D. Zanini, R. Roy, *Bioconjugate Chem.* **1997**, *8*, 187-192.
- [221] J. B. Corbell, J. J. Lundquist, E. J. Toone, *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 95-111.
- [222] C. Ortiz Mellet, J. Defaye, J. M. García Fernández, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 1982-1990.
- [223] T. Furuike, S. Aiba, S.-I. Nishimura, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 9909-9915.
- [224] E. Fan, Z. Zhang, W. E. Minke, Z. Hou, C. L. M. J. Verlinde, W. G. J. Hol, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2663-2664.
- [225] P. I. Kitov, J. M. Sadowska, G. Mulvery, G. D. Armstrong, H. Ling, N. S. Pannu, R. J. Read, D. R. Bundle, *Nature* **2000**, *403*, 669-672.
- [226] S. Seeberger, *Dissertation*, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main **2004**.
- [227] V. Wittmann, S. Seeberger, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 4508-4512.

- [228] V. Wittmann, S. Seeberger, H. Schägger, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 9243-9246.
- [229] L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3403-3409.
- [230] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.
- [231] Á. Furka, F. Sebestyén, M. Asgedom, G. Dibó, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, *37*, 487-493.
- [232] O. Renaudet, *Mini-Rev. Org. Chem.* **2008**, *5*, 274-286.
- [233] C. Maierhofer, *Diplomarbeit*, Universität Konstanz, Konstanz **2004**.
- [234] R. Liang, J. Loebach, N. Horan, M. Ge, C. Thompson, L. Yan, D. Kahne, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 10554-10559.
- [235] N. Horan, L. Yan, H. Isobe, G. M. Whitesides, D. Kahne, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 11782-11786.
- [236] R. Takeda, S. Y. Ryu, J. H. Park, K. Nakanishi, *Tetrahedron* **1990**, *46*, 5533-5542.
- [237] J. Zhang, P. Kovac, *J. Carbohydr. Chem.* **1999**, *18*, 461-469.
- [238] S. Nakabayashi, C. D. Warren, R. W. Jeanloz, *Carbohydr. Res.* **1986**, *150*, C7-C10.
- [239] V. Wittmann, D. Lennartz, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 1363-1367.
- [240] K. Rohmer, *Bachelorarbeit*, Universität Konstanz, Konstanz **2005**.
- [241] Z. Guo, R. A. Guilfoyle, A. J. Thiel, R. Wang, L. M. Smith, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 5456-5465.
- [242] In diesem Experiment lag der IC₅₀-Wert von GlcNAc bei 83 mM ($\beta = 1$).
- [243] C. S. Wright, *J. Mol. Biol.* **1980**, *141*, 267-291.
- [244] I. Vrasidas, S. André, P. Valentini, C. Böck, M. Lensch, H. Kaltner, R. M. J. Liskamp, H.-J. Gabius, R. J. Pieters, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 803-810.
- [245] S. André, R. J. Pieters, I. Vrasidas, H. Kaltner, I. Kuwabara, F.-T. Liu, R. M. J. Liskamp, H.-J. Gabius, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 822-830.
- [246] R. J. Pieters, *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2004**, *16*, 243-254.
- [247] A. Kristiansen, Å. Nysæter, H. Grasdalen, K. M. Vårum, *Carbohydr. Polym.* **1999**, *38*, 23-32.
- [248] F. Jordan, E. Bassett, W. R. Redwood, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1977**, *75*, 1015-1021.
- [249] Y. Nagata, M. M. Burger, *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 3116-3122.
- [250] J.-P. Privat, F. Delmotte, G. Mialonier, P. Bouchard, M. Monsigny, *Eur. J. Biochem.* **1974**, *47*, 5-14.
- [251] J. Beck, *Masterarbeit*, Universität Konstanz, Konstanz **2006**.
- [252] S. R. Chhabra, B. Hothi, D. J. Evans, P. D. White, B. W. Bycroft, W. C. Chan, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 1603-1606.

-
- [253] B. W. Bycroft, W. C. Chan, S. R. Chhabra, N. D. Hone, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1993**, 778-779.
- [254] K. Augustyns, W. Kraas, G. Jung, *J. Peptide Res.* **1998**, *51*, 127-133.
- [255] P. Sieber, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 2107-2110.
- [256] E. Bayer, W. Rapp, *Chem. Pept. Proteins* **1986**, *3*, 3-8.
- [257] E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P. I. Cook, *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595-598.
- [258] W. S. Hancock, J. E. Battersby, *Anal. Biochem.* **1976**, *71*, 260-264.
- [259] Novabiochem Catalog **2006/2007**
- [260] H. Kunz, C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 1763-1765.
- [261] H. Rink, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 3787-3790.
- [262] P. Li, P. P. Roller, J. C. Xu, *Curr. Org. Chem.* **2002**, *6*, 411-440.
- [263] P. Gomez-Martinez, M. Dessolin, F. Guibe, F. Albericio, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1999**, 2871-2874.
- [264] S. C. Story, J. V. Aldrich, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1994**, *43*, 292-296.
- [265] J. Coste, D. Le-Nguyen, B. Castro, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 205-208.
- [266] F. Albericio, M. Cases, J. Alsina, S. A. Triolo, L. A. Carpino, S. A. Kates, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 4853-4856.
- [267] H. M. Branderhorst, R. Ruijtenbeek, R. M. J. Liskamp, R. J. Pieters, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1836-1844.

8 Anhang

Kernresonanzspektren

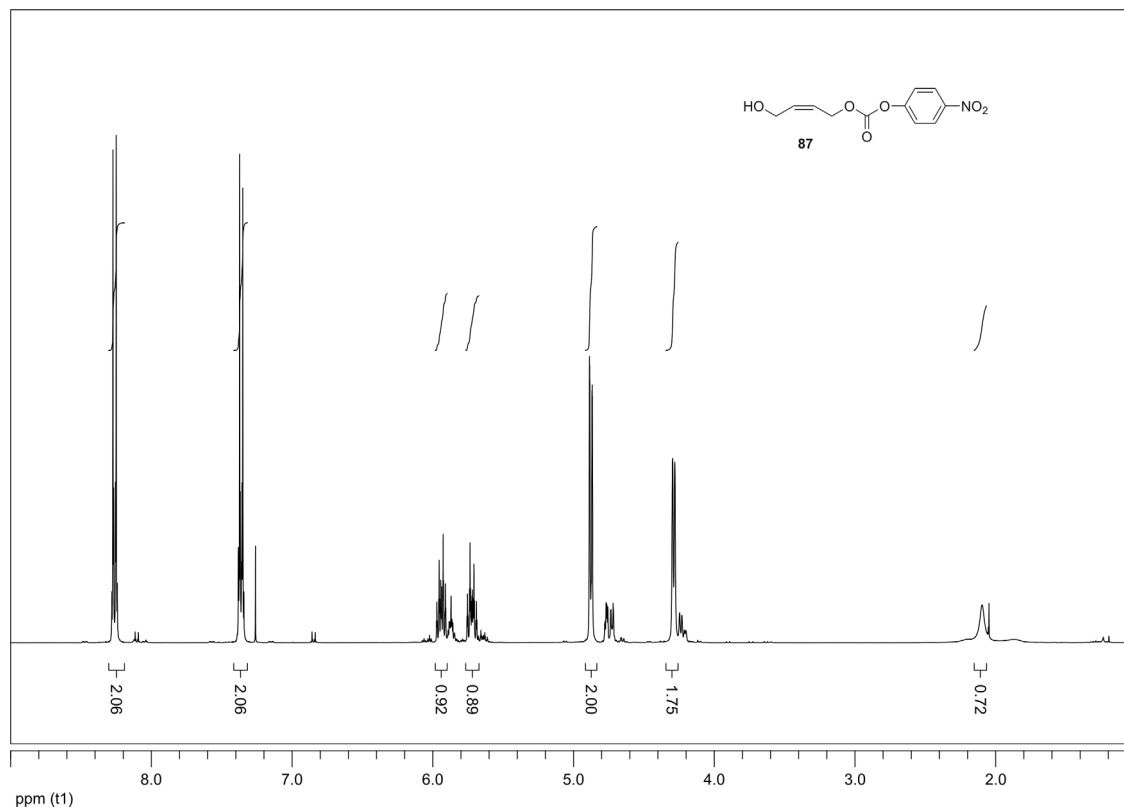
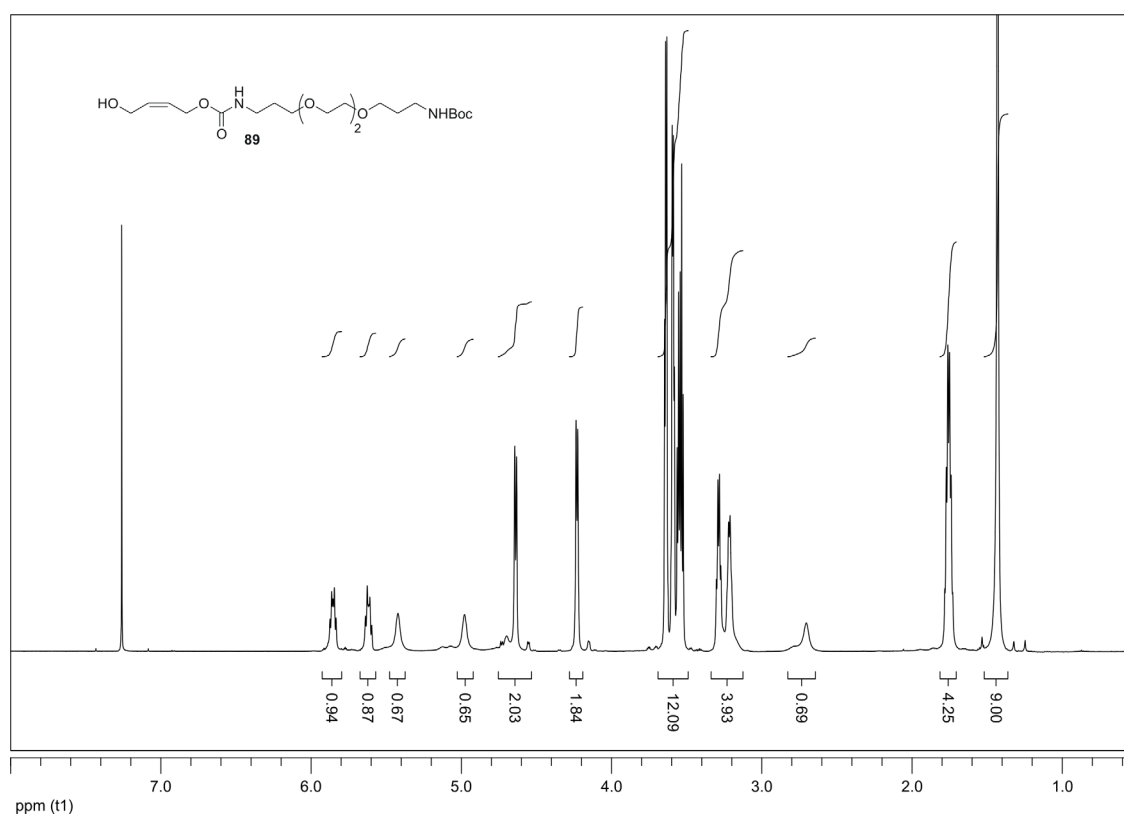
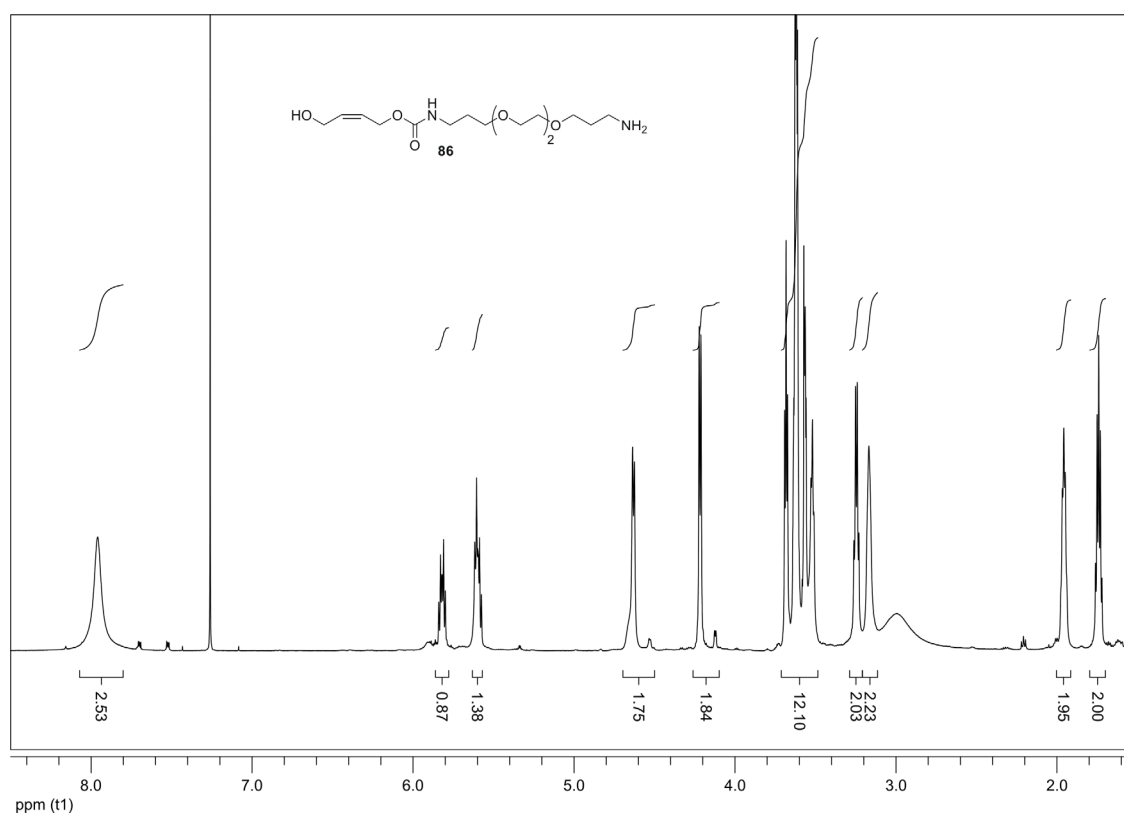
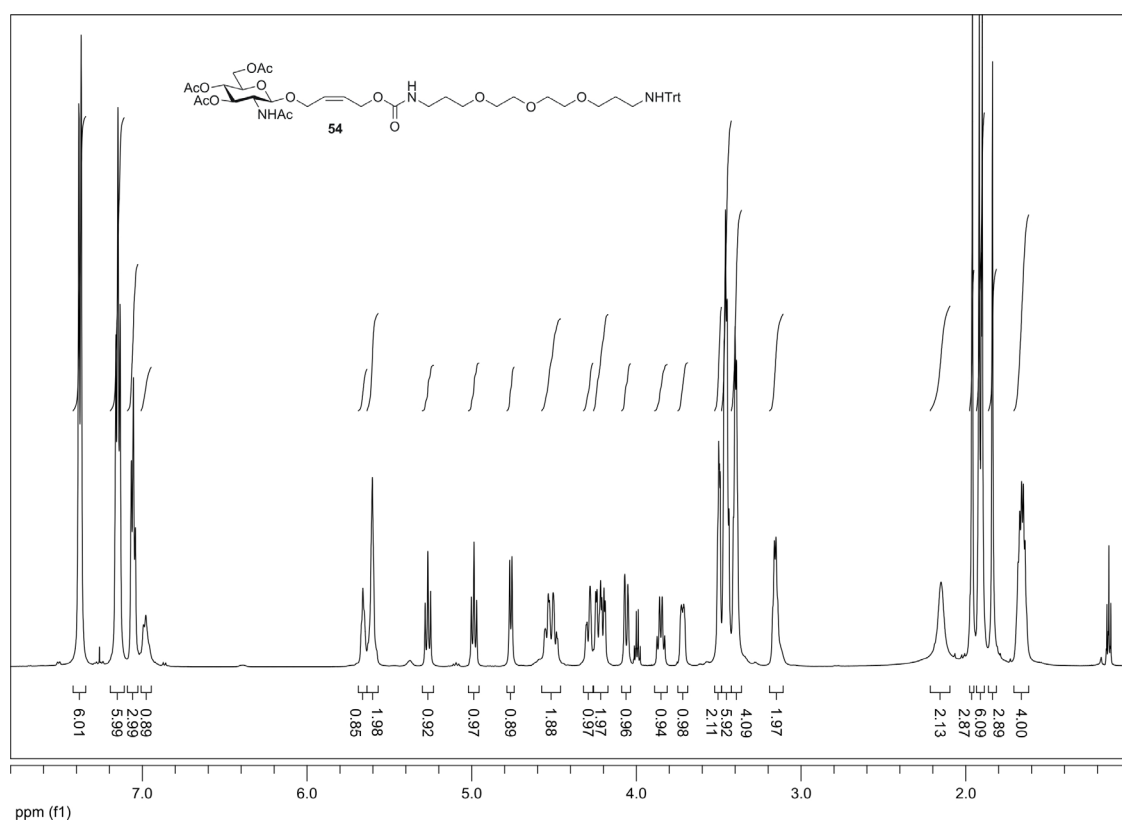
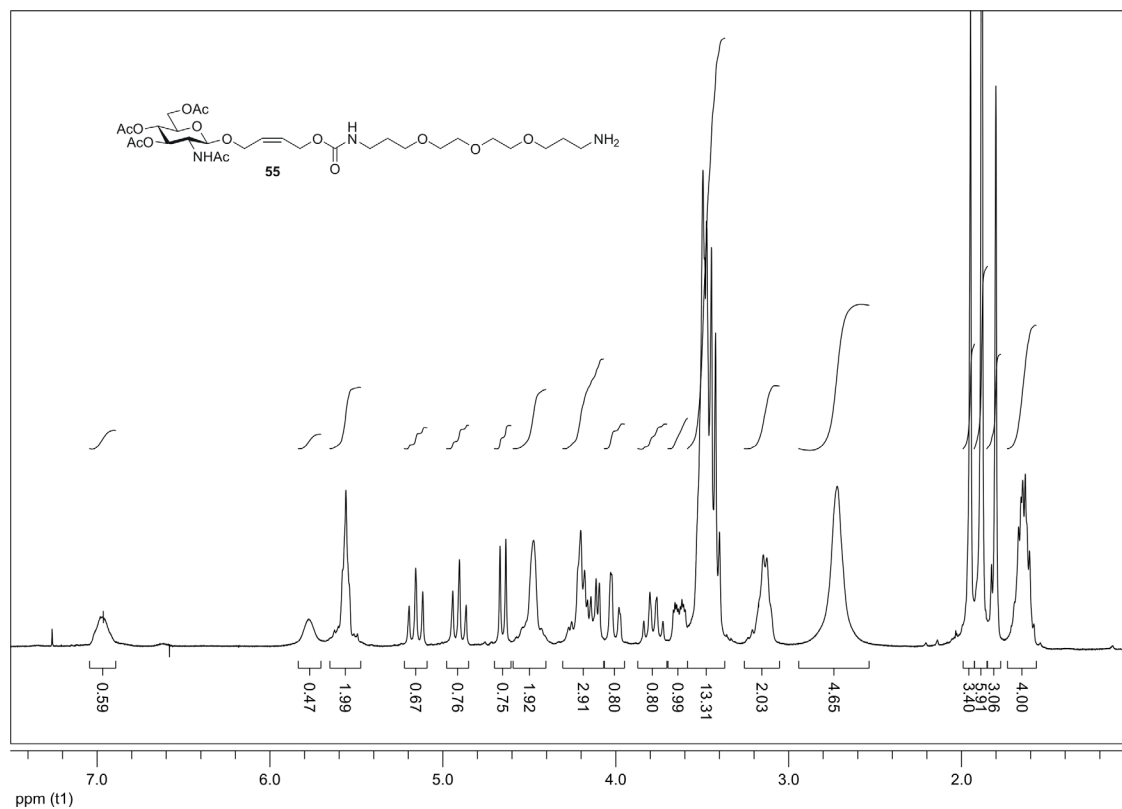
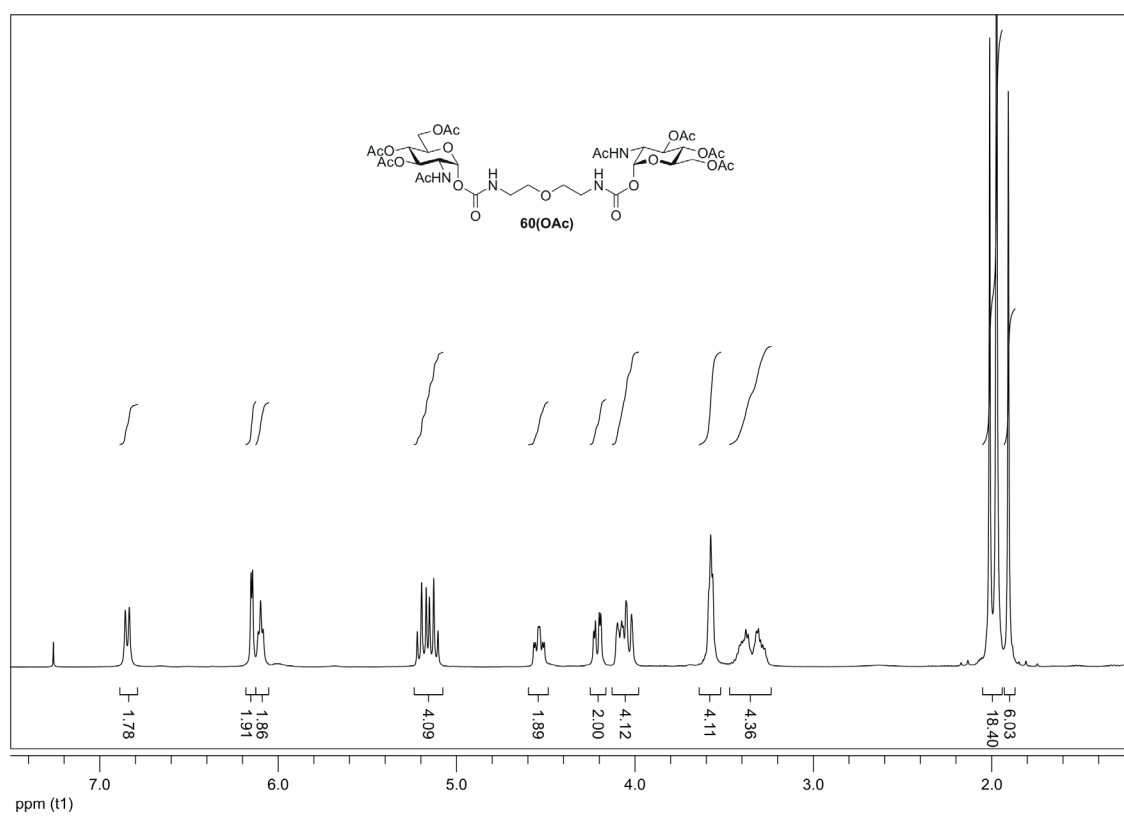
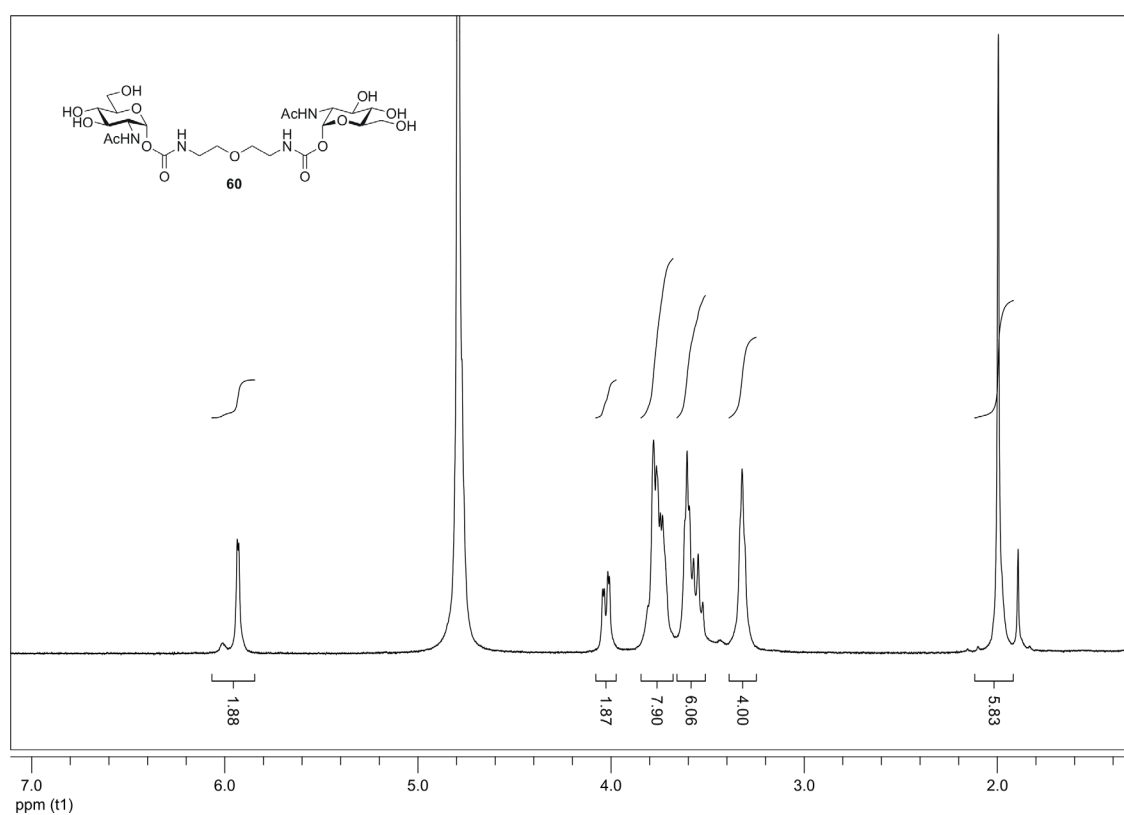
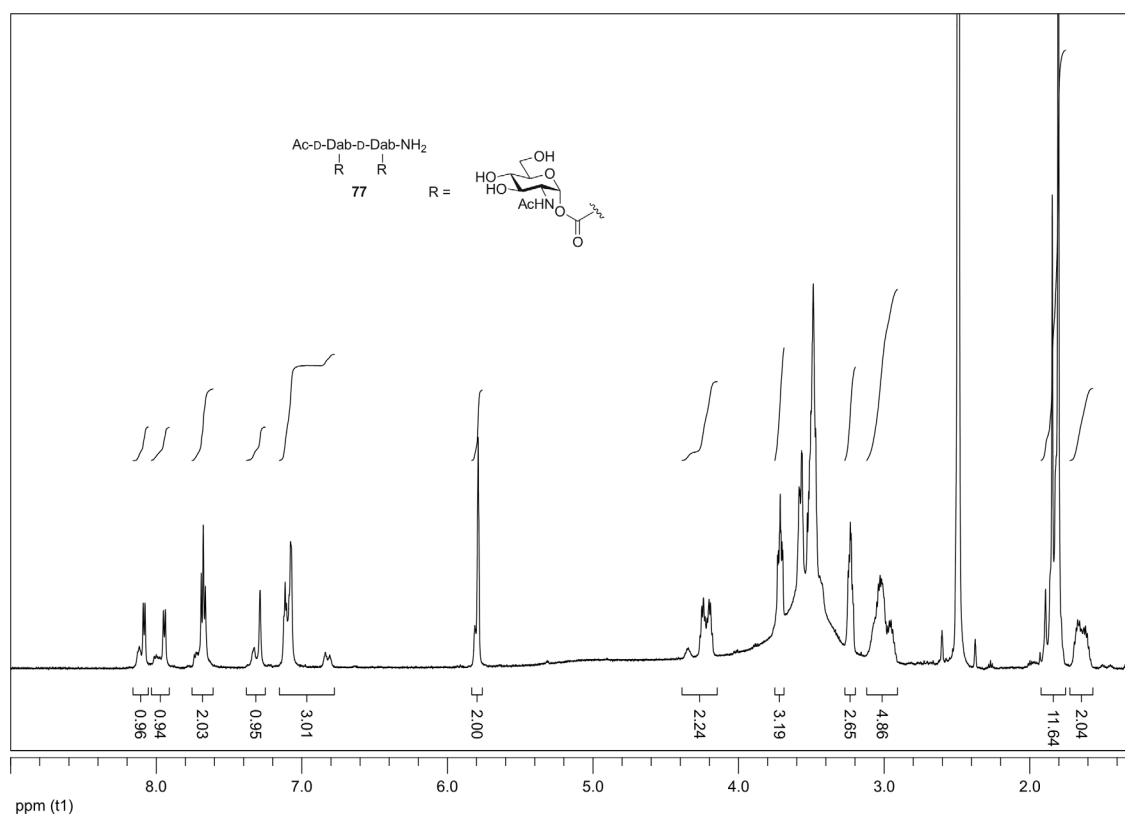
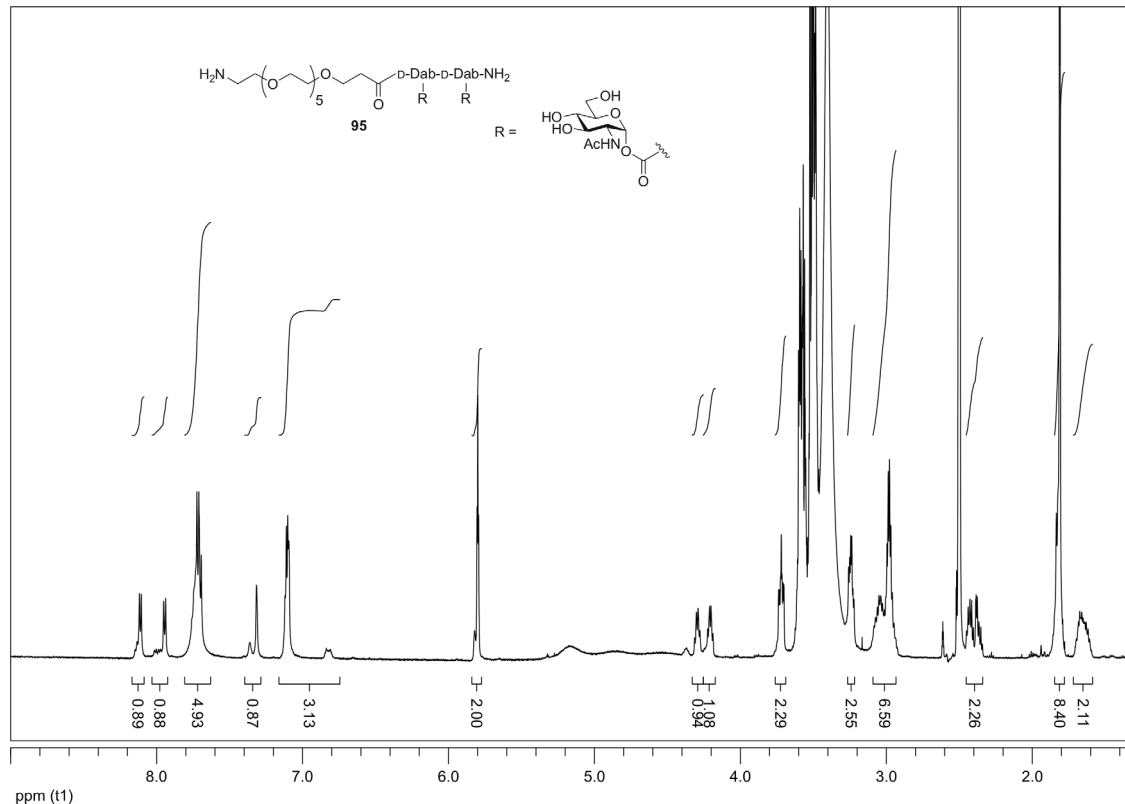


Abbildung 131. $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **87** bei 600 MHz in CDCl_3 .

Abbildung 132. ¹H-NMR-Spektrum von **89** bei 600 MHz in CDCl₃.Abbildung 133. ¹H-NMR-Spektrum von **86** bei 600 MHz in CDCl₃.

Abbildung 134. $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **54** bei 600 MHz in CDCl_3 .Abbildung 135. $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **55** bei 250 MHz in CDCl_3 .

Abbildung 138. $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **60(OAc)** bei 400 MHz in CDCl_3 .Abbildung 139. $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **60** bei 400 MHz in D_2O .

Abbildung 140. ¹H-NMR-Spektrum von **77** bei 600 MHz in d₆-DMSO.Abbildung 141. ¹H-NMR-Spektrum von **95** bei 600 MHz in d₆-DMSO.