

**Synthese von fluoreszenten Glycankonjugaten zur
Erkennung und Quantifizierung
multivalenter Glycan-Protein-Wechselwirkungen**

Dissertation

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

eingereicht im

Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
Institut für Chemie und Biochemie

vorgelegt von

Dipl. Chem. Aileen Justies

Januar 2013

Diese Arbeit wurde unter der Anleitung von Prof. Dr. Rainer Haag im Zeitraum von Februar 2008 bis Januar 2013 am Institut für Chemie und Biochemie der Freien Universität Berlin angefertigt.

Gutachter: 1. Prof. Dr. Rainer Haag
2. Priv.-Doz. Dr. Kai Licha

Datum der Einreichung: 31.01.2013

Datum der Promotion: 05.03.2013

DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei Professor Rainer Haag für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die interessante Fragestellung und seine Unterstützung in den letzten Jahren bedanken. Des Weiteren danke ich Privatdozent Dr. Kai Licha, dass er sich als Zweitgutachter für diese Arbeit zur Verfügung gestellt hat und jederzeit für wissenschaftliche Diskussionen zur Verfügung stand.

Ich danke dem SFB 765 und dem dazugehörigen Graduiertenkolleg namentlich Professor Christian Hackenberger und Katrin Wittig, für einen großartigen Rahmen für meine Dissertation sowie die finanzielle Unterstützung.

Ich möchte der mivenion GmbH für die Bereitstellung der hier verwendeten Farbstoffe danken und meinem Kollegen M. Sc. Florian Paulus für die Bereitstellung des hochverzweigten Polyglycerols.

Jutta Hass gilt besonderer Dank für die unglaublich reibungslose Erledigung aller administrativen Angelegenheiten und dass es im Büro immer ein offenes Ohr von Dir und Dr. Pamela Winchester gab. Auch möchte ich Gaby Hertel für ihre Unterstützung bei der Bestellung von Chemikalien und allerlei anderer Dinge danken.

Großer Dank geht an die Messabteilungen des Hauses um Herrn Dr. Andreas Schäfer und Dr. Andreas Springer, sowie Frau Anja Peuker, ohne sie alle wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Ich danke für die zeitintensiven Diskussionen, die letztendlich immer zum erfolgreichen Lösen der Probleme führte. Auch den Mitarbeitern der Materialverwaltung und den Werkstätten um Herrn Binkovsky, Herrn Mühlbrandt und Herrn Busold danke ich dafür, dass sie mir in den letzten fünf Jahren viele Wünsche erfüllt haben und mir so meine Arbeit erleichterten.

Allen aktiven und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich für die Unterstützung während meiner Arbeit danken. Dr. Juliane Keilitz möchte ich insbesondere für die Korrektur dieser Arbeit danken, aber auch für konstruktive Kritik während der gesamten Zeit. Dr. Marie Weinhart für aufbauende und manchmal weniger aufbauende Durchhalteformeln und ihren kompetenten wissenschaftlichen Rat insbesondere zu den proteinresistenten Oberflächen. Ich danke Euch Beiden dafür, dass ihr neben den sehr kompetenten wissenschaftlichen Kollegen, auch zu guten Freundinnen geworden seid auf deren Unterstützung ich auch weiterhin bauen kann. Dies gilt auch für meine Bürokollegin M. Sc. Katja Neuthe und die Mittagsrunde: Dr. Florian Mummy, meinen hochgeschätzter Laborkollegen M. Sc. Dominic Gröger. M. Sc. Emanuel Fleige und Dipl. Chem. Timm Heek, der mich seit meinem ersten Studientag begleitete, möchte ich im

speziellen für die Unterstützung bei jeglicher Computerfragen danken. Euch allen danke ich für Diskussionen, Ratschläge und dass ihr mir immer hilfsbereit zur Seite standet und mir eure Zeit geschenkt habt.

Ich danke der Surface Subgroup unter der Leitung von Dr. Chris Popeney und Dr. Carlo Fasting, dass sie mir einen Rahmen geboten hat, meine Ergebnisse zeitnah zu präsentieren und zu diskutieren. Insbesondere Dr. Ying Luo und M. Sc. Christian Kördel für Ratschläge zu den Goldoberflächen. Hier gilt auch M. Sc. Tobias Becherer besonderer Dank für die Unterstützung bei der Herstellung der Goldoberflächen und der Benutzung des Biacore 3000.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Carlo Fasting für mein Wissen über HPLC und MPLC. Dr. Jens Dervede, Dr. Paul Servin und Professor Christoph Tzschucke danke ich für die vielen fruchtbaren wissenschaftlichen, aber auch privaten Diskussionen und Ratschläge aus der erfahreneren Perspektive.

Auch den Menschen aus meinem privaten Umfeld, die mir eine Stütze waren, möchte ich herzlichst danken. Denen die mich glücklicherweise dank meines Studiums begleiten: Dr. Daniel Aicher, Dr. Fabian Pfrengle, Dipl. Chem. Nils Kahlcke und Dipl. Chem. Jonas Müller oder denen, die anders meinen Weg kreuzten wie Sami Haddaji, Anna Krischak und Bettina Geier. Sylvain de Guyon möchte ich dafür danken, dass ich die vorliegende Arbeit endlich geschrieben habe.

Mein ganz besonderer Dank gilt selbstverständlich meinen Eltern für die riesengroße bedingungslose Unterstützung in den letzten 10 Jahren in privater und beruflicher Hinsicht.

INHALT

Danksagung	v
Abkürzungen	ix
KURZZUSAMMENFASSUNG	xi
ABSTRACT	xiii
1 Einleitung	1
1.1 Glycan-Protein-Wechselwirkungen	1
1.2 Glycosylierungsreaktionen	12
1.3 Fluoreszenz und Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer	19
2 Wissenschaftliche Ziele	25
3 Ergebnisse und Diskussion	27
3.1 Die Synthese von verschiedenen Zuckerbausteinen	27
3.2 Die Synthese von Biotin-Derivaten	32
3.3 Die Synthese und Derivatisierung von Cyaninfarbstoffen	33
3.4 Die Synthese von funktionalisierten Polyglycerolmolekülen	41
3.5 FRET in Lösung mit dem Streptavidin—Biotin-System	48
3.6 Glasoberflächen — Beschichtung und Inkubation	51
3.7 SPR-Messungen von Protein-Ligand-Interaktionen	59
4 Zusammenfassung	73
5 Experimenteller Teil	77
5.1 Synthese der Zuckerderivate	79
5.2 Synthese der Biotinderivate	91
5.3 Synthese der Cyanin-Farbstoffderivate	93

5.4	Synthese anderer Moleküle _____	106
5.5	Synthese der Polyglycerolderivate _____	111
5.6	Glasoberflächen _____	121
5.7	SPR-Messungen _____	156
6	Literatur _____	171

ABKÜRZUNGEN

ABP	L-Arabinose bindendes Protein
AG	Abgangsgruppe
AS	Aminoobjekträger
Asp	Asparagin
BSA	Serumprotein, bovine serum albumin
CDI	1,1-Carbonyldiimidazol
CRD	Carbohydrate Recognition Domain
CS	Carboxylatobjekträger
CuAAC	kupferkatalysierte Alkin-Azid-Cycloaddition
DCM	Dichlormethan
DBU	1, 8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin, Hünig-Base
DMF	<i>N, N</i> -Dimethylformamid
EDA	Ethylendiamin
ES	Epoxidobjekträger
Et ₂ O	Diethylether
Fib	Fibrinogen
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
GAG	Glykosaminoglykan
GS	Goldoberfläche (SPR-Chip)
HDT	Hexadecanthiol
HOSu	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
hPG	hochverzweigtes Polyglycerol
HSTU	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl- <i>O</i> -(<i>N</i> -succinimidyl)uroniumhexafluorophosphat
MeOH	Methanol
NEt ₃	Triethylamin
NMWCO	Nominal molecular weight cut-off
NP	Normalphase
OTf	Triflat, CF ₃ SO ₃ ⁻
PBS	Phosphat Puffer Saline
PG	hochverzweigtes Polyglycerol (in den detaillierten Kurzbezeichnungen)
PM	Polymethin
PNA	Lectin, peanut agglutinin
RCA I	Lectin, ricinus communis agglutinin I
RP	Umkehrphase (<i>engl.</i> reversed phase)
RT	Raumtemperatur
SA	Streptavidin
Ser	Serin
SG	Schutzgruppe
TA	Thioctinsäure, Liponsäure (<i>engl.</i> thioctic acid)
TAA	<i>N</i> -(2-Aminoethyl)-5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanamid
TBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumtetrafluoroborat

TFA
Thr
TMS
WGA

Trifluoressigsäure
Threonin
Trimethylsilylgruppe $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$
Lectin, wheat germ agglutinin

KURZZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Identifizierung und Quantifizierung der Wechselwirkungen von Proteinen mit spezifischen Liganden sowie nichtspezifischen Molekülen. Im ersten Teil der Arbeit wurde die Wechselwirkung von fluoreszenten Biotin- und Galactose-Derivaten mit verschiedenen fluoreszenten Proteinen in Lösung und auf Glasoberflächen untersucht. Hierfür wurden die entsprechenden Fluorophore synthetisiert und charakterisiert. Desweiteren wurde die Immobilisierung dieser Derivate auf Glasoberflächen optimiert und die Wechselwirkung der spezifischen Liganden mit verschiedenen Proteinen mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die markierten und gebundenen Liganden weiterhin zur Bindung mit dem für sie spezifischen Protein in der Lage sind. In Lösung konnte dies durch einen erfolgreichen Energietransfer zwischen fluoreszentmarkiertem Biotin und streptavidinbeschichteten QDot 605 nachgewiesen werden. Auf den Glasoberflächen konnte eindeutig eine Bindung des QDot 605 auf einer biotinbeschichteten Oberflächen durch Fluoreszenzmessungen bewiesen werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden dieselben Ligand-Protein-Systeme verwendet. Hier wurde hochverzweigtes Polyglycerol (hPG) als Gerüstarchitektur zur Präsentation der Liganden genutzt, um eine Verbesserung der Proteinresistenz von Oberflächen zu erreichen. Verschiedene Biotin- und Galactose-hPG-Derivate wurden hergestellt und charakterisiert. Diese Systeme wurden dann unter optimierten Bedingungen auf Glas- und Goldoberflächen immobilisiert und ihre proteinbindenden Eigenschaften mit Hilfe von Fluoreszenz- und Oberflächenresonanzmessungen untersucht. Auch hier konnte gezeigt werden, dass die an hPG gebundenen Liganden weiterhin zur Bindung mit dem jeweiligen Protein befähigt sind. Auf den Goldoberflächen konnte eine ligandendichteabhängige Bindung für galactose- bzw. biotinfunktionalisiertes hPG mittels Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) gezeigt werden. Lectine und Zucker bilden bekanntlich nur schwache Bindungen aus und so konnte für die Galactoseoberfläche kein eindeutiger Nachweis der Bindung erbracht werden. Für die biotinpräsentierenden Glasoberflächen konnte die Bindung von FITC-markiertem Streptavidin mittels Fluoreszenzmessungen eindeutig nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte eine deutliche Reduzierung der Wechselwirkungen von unspezifischen Proteinen mit den hPG-Ligand- im Vergleich zu den Ligand-funktionalisierten Oberflächen nachgewiesen werden.

ABSTRACT

This work deals with the qualitative and quantitative investigation of the interactions of proteins and their specific ligands and other nonspecific molecules. In the first part, the interactions between fluorescent biotin and galactose derivatives and different fluorescent proteins in solution and on glass surfaces were investigated. For this purpose, fluorescent biotin and galactose derivatives were synthesized and characterized. Furthermore, the immobilization of these derivatives was optimized and the interactions of specific ligands with different proteins were examined via fluorescence measurements. We were able to show that the labeled and covalently bound ligands still exhibit binding activity towards their specific proteins. This was proven by a successful energy transfer in solution between fluorescently labelled biotin and streptavidin coated QDot 605. At the glass surfaces we could clearly show the binding of streptavidin coated QDot 605 to a biotin presenting surface by using fluorescence measurements. In the second part of this thesis, the same ligand-protein systems were used. Here we wanted to introduce hyperbranched polyglycerol (hPG) as a scaffold for ligand presentation to improve the protein resistance of surfaces. Biotin- and galactose-hPG derivatives with different degrees of functionalization were synthesized and characterized. The hPG-derivatives were immobilized under optimized conditions onto glass and gold surfaces. Their behavior towards different proteins was investigated with fluorescence measurements and surface plasmon resonance (SPR) spectroscopy. Herein we were also able to prove that covalently bound ligand-hPG derivatives still exhibit binding activity to their specific protein. At the gold surfaces we could verify ligand density dependent protein binding for galactose and biotin presenting surfaces with the help of surface plasmon resonance (SPR). It is known that lectines and sugars interact only weakly and therefore we were not able to prove protein binding to the lactose-functionalized glass surfaces. In case of biotin-functionalized glass surfaces, we were able to detect a strong binding of FITC-streptavidin by fluorescence microscopy. Furthermore, we were able to demonstrate a significant reduction of the interactions of unspecific proteins with hPG-ligand-functionalized compared to ligand-functionalized surfaces.

1 EINLEITUNG

Der Nachweis von Wechselwirkungen zwischen einem Liganden und einem Rezeptor ist die wesentliche Grundlage, um biologische Prozesse zu verstehen. Die Identifikation spezifischer Liganden für den jeweiligen Rezeptor kann zum besseren Verständnis von Stoffwechselprozessen, der Zellkommunikation und vieler Krankheiten beitragen. Somit wird deutlich, dass die Entwicklung neuer Nachweismethoden zur Identifikation, sowie auch zur Quantifizierung dieser Wechselwirkungen, eine Grundlage zur Bekämpfung von Krankheiten wie Krebs, dem HI Virus oder auch Allergien bedeuten kann. Da gerade bei diesen Krankheiten die relativ schwache Wechselwirkung zwischen Kohlenhydraten (Ligand) und Lectinen (Protein) eine Rolle spielen, müssen besonders empfindliche Nachweismethoden entwickelt werden. Neben ihrer Schwäche, zeichnen sich diese Wechselwirkungen durch ihre Spezifität aus und machen sie dadurch für den pharmakologischen Bereich sehr attraktiv. Denn ein spezifisches Binden an eine Zielstruktur bedeutet auch, dass es zu einer Verringerung der unerwünschten Nebenwirkungen im biologischen System kommt. Zuckerstrukturen ermöglichen ein aktives Ansteuern der Zielmoleküle, da auf jeder Zelloberfläche Zucker und deren Rezeptoren aufzufinden sind.^[128-130]

1.1 GLYCAN-PROTEIN-WECHSELWIRKUNGEN

1.1.1 Die Prinzipien von Glycan-Protein-Wechselwirkungen

Eine entscheidende Komponente der Zucker-Protein-Wechselwirkungen sind die Wasserstoffbrückenbindungen. Wegen ihrer Eigenschaften sind sie wie geschaffen dafür, bei dieser Molekülwechselwirkung eine wichtige Rolle zu spielen. Zum einen sind sie stabil genug, um effektiv zur Ligandenbindungsaffinität beizutragen, zum anderen aber auch schwach genug, um eine schnelle Dissoziation des Liganden zuzulassen, und verleihen so der Wechselwirkung zwischen Protein und Zucker eine große Dynamik. Wasserstoffbrückenbindungen wirken zudem gerichtet. Dies ist wichtig für die Spezifität der Wechselwirkung. Die Hydroxylgruppen sind die wesentliche funktionelle Gruppe von Kohlenhydraten, sie werden stereospezifisch sehr exponiert vom Zucker präsentiert und sind entscheidend für die Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindungen.^[1] Am Beispiel der L-Arabinose im Komplex mit dem L-Arabinose-Bindungsprotein (ABP) in Abbildung 1 sieht man, dass in diesem Komplex eine Vielzahl von verschiedenen Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet werden. Als kooperative Wasserstoffbrückenbindung werden die Bindungen bezeichnet, in denen die Hydroxylgruppe gleichzeitig als Donor und Akzeptor fungiert. In Abbildung 1 bilden die Hydroxylgruppen in Position 3 und 4 jeweils eine

solche kooperative Wasserstoffbrücke aus. Durch kooperative Wasserstoffbrückenbindungen kommt es zu einer verstärkten Ladungsdelokalisation, die diese Bindungen nochmals effektiv verstärkt.^[2] Des Weiteren können auch zwei Hydroxylgruppen eines Zuckers mit unterschiedlichen Atomen der gleichen polaren Seitenkette des Proteins wechselwirken. Dann spricht man von einer zweizähligen Wasserstoffbrückenbindung. In dem abgebildeten Komplex sieht man zwei solcher Bindungen: der endocyclische Pyranosesauerstoff und die Hydroxylgruppe in Position 4 bilden zur Guanidinfunktionalität des Arg 151 eine zweizählige Wasserstoffbrückenbindung aus. Ihrerseits bildet die Hydroxylgruppe an Position 4, zusammen

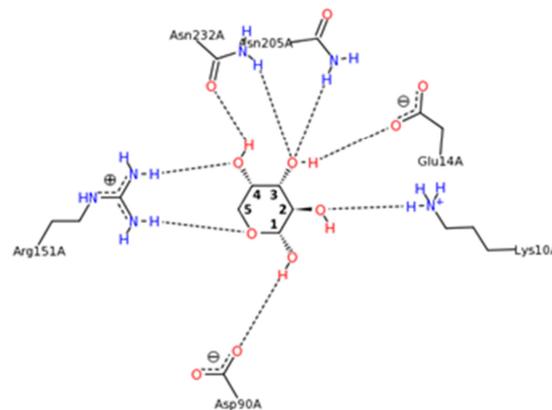


Abbildung 1: Der Komplex von ABP und Arabinose. Protein Data Base-Code: 1abe.^[3]

mit der Hydroxylgruppe an Position 3, eine weitere zweizählige Bindung mit der Amidfunktion des Asn 232 aus. Aus dem komplexen Zusammenwirken dieser beiden Arten der Wasserstoffbrückenbindung, ergibt sich die dritte Art: die Netzwirkbildung. Aufgrund ihrer Komplexität ist sie nicht in der Abbildung dargestellt, der interessierte Leser sei hier an die Originalliteratur verwiesen.^[1, 4] Aufgrund der Vielzahl an Wasserstoffbrückenbindungen werden weitere Atome der Proteinseitenkette in den van-der-Waals-Radius des Zuckermoleküls gezwungen. Diese van-der-Waals-Wechselwirkungen tragen als zweite Komponente einen signifikanten Teil zur Zucker-Protein-Wechselwirkung bei. Man erkennt in der Röntgenstruktur des L-Arabinose (Abbildung 1) Komplexes ein Stapeln der Kohlenstoffatome in Position 3 und 4 des Pyranoseringes mit der aromatischen Seitenkette des Proteins Tryptophan Trp 16.^[4] Auch befindet sich Asn 232 im van-der-Waals-Kontakt zum Pyranosering. Sowohl durch Wasserstoffbrückenbindungen, als auch durch die van-der-Waals-Kräfte wird die Bindungstasche des Proteins komplett verschlossen, dies führt zu einer Freisetzung von Wassermolekülen aus der Bindungstasche und der Solvathülle des Zucker. Dadurch kommt es zu einem positiven entropischen Effekt. Es werden alle Hydroxylgruppen des Liganden genutzt, um eine

ungewöhnlich hohe Anzahl an Wasserstoffbrücken auszubilden. Jede nicht gebundene polare Gruppe schwächt den Komplex, sowohl die Effizienz der Wasserstoffbrückenbindungen, als auch die der van-der-Waals-Kontakte müssen optimal sein.^[1] Diese optimierten Bindungsverhältnisse zwischen Substrat und Protein postulierte auch schon Emil Fischer im Jahr 1894 auf eine ähnliche Weise mit seinem Schlüssel-Schloss-Prinzip: „Um ein Bild zu gebrauchen, will ich sagen, dass Enzym und Glucosid wie Schloss und Schlüssel zu einander passen müssen, um eine chemische

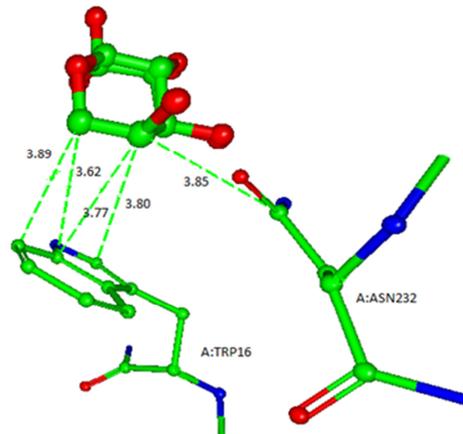


Abbildung 2: Die Darstellung der van-der-Waals-Kontakte im ABP-Arabinose-Komplex.^[5]

Wirkung auf einander ausüben zu können.“^[6] Teilweise kommt es durch den Bindungsprozess zu einer Konformationsänderung des Proteins, um ein vollständiges Schließen der Bindungstasche zu ermöglichen. Das können kleine lokale Konformationsänderungen^[7] oder auch große Änderungen, wie bei der Bildung des Glucose-Hexokinase-Komplexes, sein.^[8]

1.1.2 Glycobiologie

Nachdem die Grundprinzipien der Zucker-Protein-Wechselwirkungen beleuchtet wurden, können die biologischen Prozesse betrachtet werden, bei denen diese Wechselwirkungen zum Tragen kommen. Dafür greift man Beispiele heraus, in denen Kohlenhydrate von Bedeutung sind. Wirft man einen Blick auf ein beliebiges biologisches System und versucht dort die Kohlenhydrate zu lokalisieren stößt man beispielsweise auf die Photosynthese, mit der Pflanzen aus CO_2 Zucker synthetisieren. Aus Zucker-Monomeren wie D-Glucose, D-Galactose und D-Fructose können dann Oligo- und Polysaccharide, wie zum Beispiel die Disaccharide Maltose, Lactose und Saccharose oder auch Polymere wie Stärke,^[9] Cellulose^[10] und Chitin^[11] hergestellt werden. Die eben aufgezählten Formen von Zucker sind Vielen als Energiespeicher oder biologisches Baumaterial in der Tier- und Pflanzenwelt bekannt.^[12] Neben diesen offensichtlich bedeutenden Kohlenhydraten

gibt es aber auch noch andere hochkomplexe Zuckerstrukturen, die sich in jedem biologischen System wiederfinden. Jede Zelle ist mit einer Schicht aus unterschiedlichen Oligosacchariden bedeckt, die in der Membrandoppelschicht verankert sind und die sogenannte Glycocalix bilden.^[12] Im Blut und in den Sekreten befinden sich lösliche Zucker, aber auch gebundene Zucker: auf Viren, an Proteinen und Lipiden.^[13] Warum sind diese Moleküle omnipräsent? Was ist ihr Nutzen, ihre Bedeutung? Die Antwort liegt in der dreidimensionalen Struktur. Durch sie bieten sie der Natur nahezu unendlich viele Möglichkeiten, Informationen zu verschlüsseln. Die Auslesung dieser Informationen erfolgt durch die Ausbildung von nicht-kovalenten Zucker-Protein-Komplexen nach den bereits in Abschnitt 1.1.1 erläuterten Prinzipien. Im Abschnitt über die Glycobiologie wird es vor allem um den Informationsgehalt einer Zucker-Protein-Wechselwirkung gehen und wie diese Information in biologischen Prozessen verarbeitet wird. Zellkommunikation und Zelladhäsion stehen im Mittelpunkt der Betrachtung.

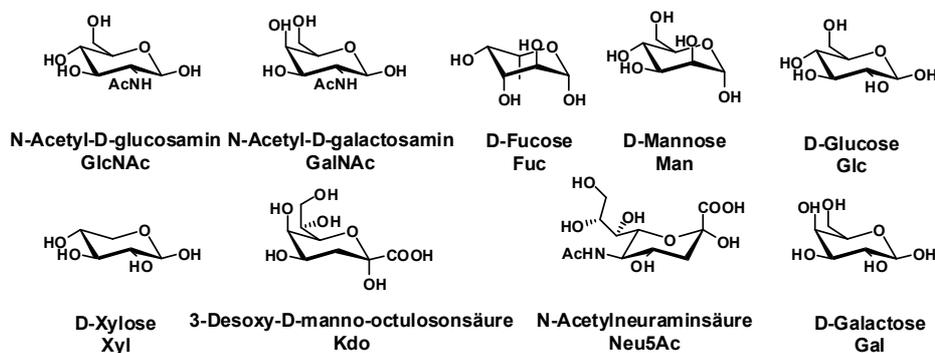


Abbildung 3: Übersicht der häufigsten Monosaccharide in Glycanen.

Die Glycane, die wir in Organismen finden, bestehen hauptsächlich aus neun verschiedenen Monosacchariden, die in Abbildung 3 dargestellt sind. Aus diesen Bausteinen werden alle Oligosaccharide aufgebaut. Werden diese Oligosaccharide dann mit anderen Molekülen

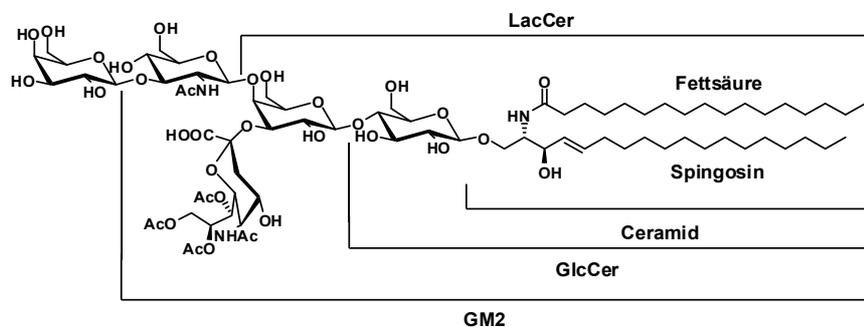


Abbildung 4: Die Struktur des GM1-Gangliosids.

verknüpft, so sprechen wir von einem Glykokonjugat. Man unterscheidet die Glycolipide, Glycoproteine und Proteoglycane. Die entstehende Zuckerschicht auf der Zelloberfläche, die aus den Oligosacchariden dieser verankerten Glykokonjugate besteht, wird als Glycocalix bezeichnet.

Im Falle der Glycolipide sind die Zucker an ein Lipid gebunden. Diese Glykokonjugate sind Bestandteil der Zellmembran. Über den Lipidteil sind sie in der Membran verankert, so dass der Oligosaccharidanteil in den extrazellulären Raum hinein ragt. Der häufigste Anker ist das Ceramid, das beispielsweise Bestandteil des GM1-Gangolisids ist (Abbildung 4).^[14]

Die Glycoproteine verankern sich ebenfalls mit ihrem Proteinanteil in der Zellmembran. Die Zucker werden bei Glycopeptiden meist posttranslatorisch an das Protein gebunden und ihr Anteil am Protein kann bis zu 85% betragen.^[13] Wir unterscheiden *N*- und *O*-Glycoproteine anhand ihrer Verknüpfungsart. Die Oligosaccharide werden entweder *N*-glycosidisch an die Seitenkette eines Asparagin (Asp) gebunden oder *O*-glycosidisch über die Hydroxylgruppe des Serins (Ser) oder des Threonins (Thr).^[15] Die Kernregion der *N*-Glycoproteine ist immer identisch, sie wird als Kern bezeichnet. *N*-Acetyl-D-Glucosamin ist an den Amidrest des Asparagins der Proteinkette gebunden. Der Kern ist ein Pentasaccharid und wird als Trimannosyl-Kern bezeichnet.^[16] In Abbildung 5 ist dieser Kern in drei verschiedenen Schreibweisen dargestellt. Abbildung 5a zeigt die ausführliche Schreibweise. Die Schreibweise b ist die modifizierte Form der IUPAC-Schreibweise und entspricht den Empfehlungen des USA Consortium for Functional Glycomics.^[17] Eine noch kürzere Form ist in Abbildung 5c dargestellt. Es werden nur noch die graphischen Symbole verwendet, um die verschiedenen Monosaccharide darzustellen. Die Art der Verbindungslinien gibt Auskunft darüber, wie die Monomere untereinander verknüpft

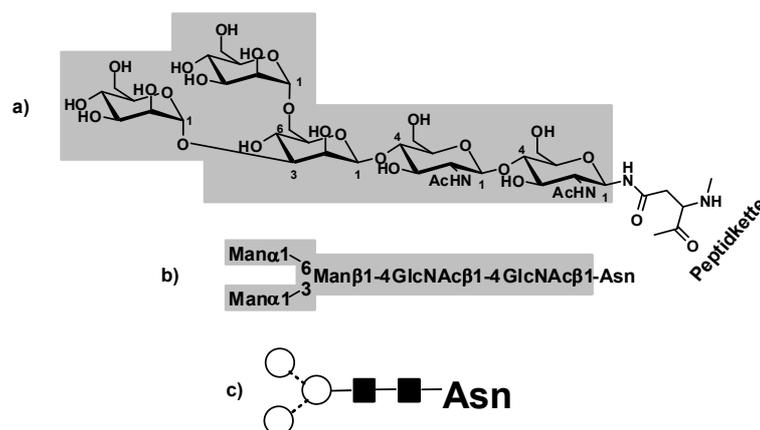


Abbildung 5: Der Trimannosyl-Kerns (grau unterlegt) der *N*-Glycoproteine in verschiedenen Darstellungsarten.

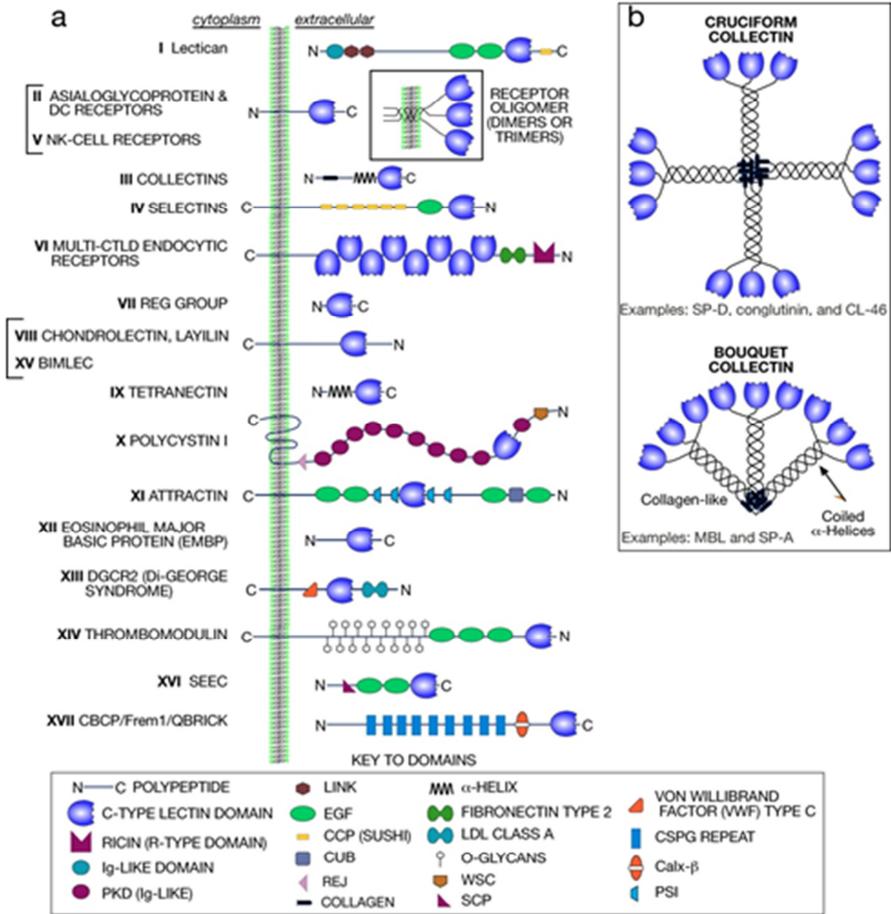
sind. So beschreibt der Winkel die Position der Verknüpfung (beispielsweise C-3 bei 220° und C-6 bei 260°) und die Orientierung der glycosidischen Bindung wird durch die Beschaffenheit der Linie dargestellt (α : gestrichelt, β : solide).^[18] Der in Abbildung 5 dargestellte Trimannosyl-Kern bildet die Grundlage aller *N*-Glycoproteine. Der Grund dafür liegt in ihrer Biosynthese.^[19] Vom Kern zweigen in unterschiedlichster Komplexität weitere Oligosaccharidketten ab und je nachdem wie viele Oligosaccharidketten an die äußeren beiden Mannosemoleküle geknüpft werden, erhalten wir mono-, di- bis hin zu pentaantennäre Strukturen.^[15, 20] Diese antennenartigen Motive sind der Hauptgrund für die häufig multivalente Natur von Zucker-Protein-Wechselwirkungen.

Die *O*-Glycoproteine folgen weniger strengen Strukturregeln als die *N*-Glycoproteine. Sie sind in der Regel über *N*-Acetyl-D-Galactosamin mit der Hydroxylgruppe des Serins oder Threonins der Peptidkette verbunden, aber es kommen auch Verknüpfungen über D-Xylose (in Proteoglycanen)^[21], D-Mannose, D-Galactose und D-Fucose vor. Es wurden auch Verknüpfungen an einige andere Seitenkettenreste wie 5-Hydroxy-L-Lysin, 4-Hydroxy-L-Prolin und Cystein beschrieben.^[22] Die *O*-Glycoproteine weisen somit unterschiedliche Kernstrukturen auf und werden teilweise auch nach diesen klassifiziert. Auch die Größe der angehängten Ketten variiert sehr stark: sie reicht von nur einem Glycan, bis zu einer Größe von bis zu zwanzig angehängten Zuckern.^[20]

Die letzte Gruppe ist die der Proteoglycane. Wie der Name schon impliziert, handelt es sich hierbei um Proteine mit einem sehr hohen Zuckeranteil. Das Protein bildet den Kern an dem ein oder mehrere Glycosaminoglycane (GAG) kovalent gebunden sind. Zu diesen GAGs gehören beispielsweise Chondroitinsulfat (CS), Dermatan sulfat (DS), Hyaluronsäure (HA), Heparin und Heparinsulfat (HS),^[23] die sich durch die enthaltenen Disaccharid-Einheiten unterscheiden.^[24] Die Disaccharid-Einheiten sind linear zu Makromolekülen verbunden.^[15]

Lectine, Enzyme oder Immunglobuline sind in der Lage, diese drei Klassen der Glykokonjugate zu erkennen. Lectine sind kohlenhydratbindende Proteine, die nicht immunologischen Ursprungs sind.^[25] Sie verfügen über mindestens eine, in der Regel aber meist mehrere, zuckerbindende Domänen (*engl.* carbohydrate recognition domain, CRD).^[26] Der Bindungsprozess von Zuckern mit Lectinen unterscheidet sich nicht von dem der Enzyme, im Gegensatz zum Bindungsprozess mit Enzymen werden keine Bindungen des Substrats gespalten oder gebildet. Tierische Lectine wurden anfänglich in zwei,^[27] später in vier unterschiedliche Gruppen eingeteilt, in die C-, S- und P-Typ- und in andere Lectine.^[28] Aktuell werden acht solcher Klassen beschrieben.^[29] Ursprünglich erfolgte die Klassifizierung der Lectine aufgrund ihres Bindungsverhaltens. Die C-Typ-Lectine wurde so benannt, weil ihre Fähigkeit zur Bindung mit Zuckerliganden nur in Anwesenheit von

Calciumionen möglich ist. Die S-Typ-Lectine erhielten ihren Namen, weil sie die Gegenwart Thiol-reduzierender Reagenzien zur Bindung benötigen.^[27] Die neueren Klassifizierungen basieren auf Strukturmerkmalen und konzentrieren sich auf die Polypeptid-Sequenz der zuckerbindenden Domäne. Innerhalb eines Typs findet man eine sehr ähnliche Struktur der Bindungsdomäne (CRD). Dadurch kommt es auch zu einer spezifischen Affinität gegenüber bestimmten Zuckern. Die Calciumionen-abhängigen C-Typ-Lectine wurden von Drickamer *et al.* aufgrund ihrer Aminosäuresequenz anfangs in sieben Gruppen eingeteilt,^[30] aktuell zählt man 17 Untergruppen (Abbildung 6).^[29] Einige dieser Proteine sind lösliche Proteine, bei anderen handelt es sich um Transmembranproteine und man findet sie nur extrazellulär.^[31] Sie alle weisen mindestens eine CRD mit etwa 100 bis 130 Aminosäureresten auf, die eine sehr kompakte globuläre Struktur aufweist. Diese Struktur ist sehr ungewöhnlich für Proteine und erhielt daraufhin den Namen



Copyright © 2009, The Consortium of Glycobiology Editors, La Jolla, California.

Abbildung 6: Schematische Darstellung der 18 C-Typ-Lectine.^[29]

C-Typ-Lectin-Domäne oder C-Typ-CRD. Wie sich erst später herausstellte, haben nicht alle diese Domänen, und somit auch nicht alle Proteine, die diese Domänen enthalten, die Eigenschaft Zucker zu binden.^[32] Die Gruppen, die von diesen 17 verschiedenen C-Typ-Lectinen am besten erforscht sind, sind die Asialoglycoproteine (II), die Collectine (III), die endocytischen Rezeptoren (VI) und die Selektine (IV).^[29]

Die S-Typ-Lectine haben eine sehr hohe Affinität zu β -Galactosiden, was zu ihrer modernen Bezeichnung der Galectine geführt hat.^[33] Wir finden drei strukturell verschiedene Untergruppen bei den Galectinen: (a) die prototypischen Galectine, (b) die chimären Galectine und (c) die bivalenten Tandem-Repeat-Galectine (Abbildung 7). Alle drei weisen eine CRD auf, die aus etwa 130 Aminosäureresten besteht (hellgrau dargestellt).

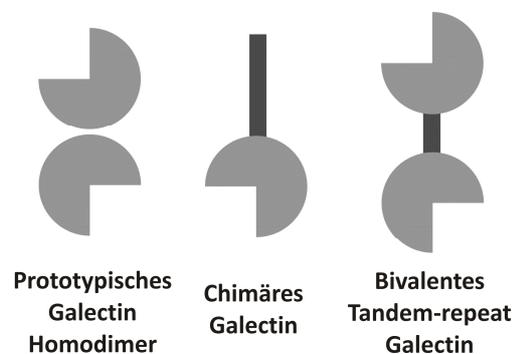


Abbildung 7: Schematische Darstellung der drei Galectintypen.^[33]

Die prototypischen Galectine bestehen aus monovalenten Galectinen, die eine einzige CRD enthalten. Sie können Dimere bilden und so bivalentes Bindungsverhalten zeigen. Zu dieser Gruppe gehören Gal-1, Gal-2, Gal-7, Gal-10, Gal-13 und Gal-14. Chimäre Galectine haben ebenfalls nur eine CRD und eine ca. 100 Aminosäure lange Domäne mit *N*-Terminus. Diese Struktur zeigt nur Gal-3. Die Tandem-Repeat-Galectine, zu denen strukturell Gal-4, Gal-8, Gal-9 und Gal-12 gehören, weisen dagegen zwei nicht identische CRDs auf, die durch eine kurze Aminosäuresequenz verbunden sind.^[34]

R-Typ-Lectine enthalten eine CRD, die der im Ricin gleicht. Zu dieser Gruppe gehören die Agglutinine aus den Samen des Wunderbaumes (*Ricinus Communis*): RCA I und RCA II, von denen das letztere hoch toxisch ist.

Die I-Typ Lectine gehören zur Immunoglobulin-Superfamilie, deren bekannteste Vertreter die Siglecs sind. Bei diesen Molekülen handelt es sich um Typ I transmembrane Glycoproteine, die Sialinsäuren binden. Vertreter dieser Gruppe müssen mindestens eine immunogloblinartige Domäne aufweisen, die als Spacer fungiert.^[29] Auch die drei letztgenannten Lectin-Typen:

Galectine, R-Typ und I-Typ, befinden sich, wie auch die C-Typ-Lectine, nur im extrazellulären Raum. Dort sind sie entweder lokalisiert in der Zellmembran oder gelöst in den Körperflüssigkeiten zu finden. Die nachfolgenden Lectine werden dagegen grundsätzlich nur intrazellulär gefunden.

Die L-Lectine haben eine domartige Struktur, an dessen Spitze sich die CRD befindet und zeigen als spezifische Tertiärstruktur die „jelly-roll“-Faltung, die auch ihr Klassifizierungsmerkmal ist. Sie kommen hauptsächlich in Hülsenfrüchten vor und benötigen Calcium und ein Übergangsmetallion, meist Mangan, damit sie binden können. Zu den L-Lectinen gehören: Concanavalin A (Con A), ein aus der Jackbohne (*Canavalia ensiformis*) erhaltenes Protein und das Peanut Agglutinin (PNA) aus der Erdnuss (*Arachis hypogaea*).

P-Typ-Lectine sind Typ I-Membran-Glycoproteine, die eine einzigartige Bindungsfähigkeit gegenüber D-Mannose-6-Phosphat zeigen. Sie weisen sehr große extrazelluläre Domänen, eine einfache Transmembran-Domäne und eine sehr kurze C-terminale cytoplasmatische Domäne auf. Beispiele sind der kationenunabhängige Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (*engl.* cation-independent; CI-MPR) und der kationenabhängige Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (*engl.* cation-dependent; CD-MPR).

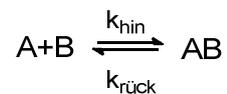
Eine alternative Klassifizierung wurde von Sharon *et al.* vorgeschlagen. Dort existieren drei verschiedene Gruppen: die einfachen Lectine, die Mosaik- bzw. die Multidomänen-Lectine und die makromolekularen Anordnungen.^[35]

Bei der Betrachtung von Beispielen der Zucker-Protein-Wechselwirkung, wird klar, dass diese Wechselwirkungen sehr vielseitig sind. Im Fall des einzigen chimären Galectins Galectin-3, das nur eine Bindungsdomäne aufweist (siehe Abbildung 7), finden wir eine Vielzahl von Prozessen an denen das Protein beteiligt ist. Viele Beispiele für die Rolle von Galectin-3 konnten im Bereich der Zell-Substrat-Adhäsion, der homotypischen und der heterotypischen Zell-Zell-Adhäsion zu Endothelzellen und auch bei der Zellmigration gefunden werden.^[34] Da diese Zusammenhänge sehr komplex sind, wird der interessierte Leser an die weiterführende Literatur verwiesen.^[34, 36]

1.1.3 Evaluierungsmethoden von Zucker-Protein-Wechselwirkungen

Um Kohlenhydrat-Protein-Bindungen quantitativ zu untersuchen, gibt es eine Vielzahl von Experimenten, die alle ihre Vor- und Nachteile aufweisen. Der älteste Test ist der Hämagglutinationshemmtest (HHT, HAHT, Hirst Test; *engl.*: Hemmagglutination inhibition assay: HIA). Sehr häufig zum Einsatz kommen auch Enzym-Immuntests (*engl.*: enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA), Enzym-Lectintests (*engl.*: enzyme-linked lectin Assay; ELLA), die

isotherme Titrationskalorimetrie (ITC),^[37] Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (*engl.*: surface plasmon resonance; SPR), die Quarzkristall-Mikrowaage (*engl.*, quartz crystal microbalance; QCM) und die Verwendung von Microarrays,^[38] die schon seit geraumer Zeit in der Erforschung von DNS und Proteinen Anwendung gefunden haben. Des Weiteren werden 2D-Immunodiffusionstests (*engl.* double diffusion agar; DDA), sowie auch turbidimetrische Tests mittels UV-Messungen (bei Untersuchungen im Zusammenhang mit Glycopolymeren) zur Untersuchung der Wechselwirkung genutzt.^[39] Ziel aller dieser Tests ist es die Bindungskonstanten der folgenden Reaktion zu ermitteln:



um Struktur-Aktivitätsuntersuchungen durchzuführen. In einer realen Mischung ist die Bindungskonstante K definiert als der Quotient aus der Aktivität a_i des Produktes a_{AB} und den Edukt-Aktivitäten a_A und a_B (1). Für verdünnte Lösungen kann man vereinfacht annehmen, dass sich der Stoff ideal verhält und die Aktivität des Stoffes der Konzentration äquivalent ist.

$$K = \frac{k_{\text{hin}}}{k_{\text{rück}}} = \frac{a_{AB}}{a_A a_B} \approx \frac{c_{AB}}{c_A c_B} \quad a_i = \gamma_i c_i \quad (1)$$

Dies ist praktikabel, da man Aktivitäten von Stoffen schwierig bestimmen kann und sie häufig unbekannt sind. Definiert man nun die Bindungskonstante K nicht über die Aktivitäten der beteiligten Stoffe, sondern vereinfacht die Gleichung, indem man deren Konzentration verwendet, dann handelt es sich bei K nicht mehr um eine Konstante. Der Aktivitätskoeffizient ist stark von der Konzentration und auch von Temperatur und Druck abhängig. Er beschreibt das Verhalten gelöster Stoffe. Dieser Sachverhalt muss bei der Betrachtung und Beurteilung von verschiedenen Tests stets klar sein, vor allem weil es sich bei den oben aufgezählten Tests oft um heterogene oder Festphasentests handelt. Im Folgenden wird kurz auf die für diese Arbeit relevanten Test ausführlicher eingegangen.

SPR: Bei der Oberflächenplasmonenresonanz werden in der Regel die kleineren Liganden auf einer Goldoberfläche, die sehr dünn auf Glas aufgedampft ist, immobilisiert. Diese Goldoberfläche stellt dann eine Fläche einer Flusskammer aus Polydimethylsiloxan (PDMS) dar, durch die das gelöste Protein fließt. Kommt es zu einer Bindung, so bewirkt dies eine Veränderung des Brechungsindex, die aufgezeichnet wird. Diese Technik ermöglicht die Erfassung des Assoziations- sowie des Dissoziationsprozesses unter Verwendung relativ geringer Substanzmengen. Dennoch sind auch hier einige kritische Aspekte zu nennen. Die Oberflächenimmobilisierung der Liganden ist aufwendig und eine Steuerung der Konzentration an

der Oberfläche ist äußerst schwierig. Auch das Auffinden der besten Ligandkonzentration bedarf oft erst einer Optimierung. Das Problem bei einer zu dicht beladenen Oberfläche ist eine mögliche Verfälschung der Bindungs- sowie auch der Dissoziationkinetik. Ein zu schwach beladener Goldchip zeigt dagegen eine zu geringe Sensitivität.^[40]

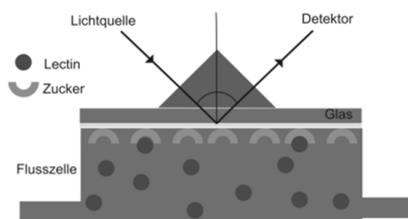


Abbildung 8: Prinzip der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie.

Microarrays: Der Mikroarraybereich ist das Verfahren, das der in dieser Arbeit entwickelten Methode technisch am nächsten ist. Die entscheidenden Vorteile sind hier, dass nur geringen Substanzmengen notwendig sind und dass die Möglichkeit besteht, sehr viele verschiedene Glycane zeitgleich zu immobilisieren und zu untersuchen. Dies führt zur Anwendbarkeit der Methode als Hochdurchsatztechnologie. Die Immobilisierung auf der Oberfläche führt zu einer multivalenten Präsentation der zu untersuchenden Zucker. Diese Art der Präsentation kann als Mimik einer Zelloberfläche aufgefasst werden und zeigt im Gegensatz zu Tests in Lösung eine verbesserte Bindung gegenüber den Lectinen.^[38] Durch die Immobilisierung können hochkomplexe Zucker auch mehrfach untersucht werden.

Die Anbindung der Zucker auf Oberflächen kann auf sehr unterschiedliche Weisen effektiv erfolgen. Grundsätzlich gibt es vier verschiedene Methoden, ein Kohlenhydrat auf einer Oberfläche zu immobilisieren. Die erste und einfachste Möglichkeit bietet sich für große hydrophobe Polysaccharide (3.3-2000 kDa) an. Aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen, wie z. B. mit Nitrocellulose oder schwarzem Polystyrol, ist es möglich, solche Moleküle nicht-kovalent und ungerichtet auf diesen Oberflächen zu immobilisieren.^[41] Für kleinere Saccharide funktioniert diese Methode nicht, da die Moleküle durch Waschprozesse sukzessive von der Oberfläche entfernt werden. Stattdessen muss der Zucker kovalent und definiert auf eine chemisch veränderte Oberfläche gebracht werden. Hierfür müssen sowohl die Zucker als auch die Oberfläche vorrangig chemisch modifiziert werden. Hier stehen sehr unterschiedliche chemische Linker-Techniken zur Verfügung: z. B. können an Thiooberflächen Maleimid-Zucker gebunden werden^[42] oder eine Glasoberfläche wird mit Cyanurchlorid beschichtet und anschließend mit *p*-Aminophenylglycosiden zur Reaktion gebracht.^[43] Auch die Staudinger-Ligation,^[44] die Diels-Alder-Reaktion^[45] und die kupferkatalysierte Alkin-Azid-Cycloaddition

(CuAAC)^[46] werden zur Immobilisierung auf Microarrays genutzt. Eine dritte Methode ist die Umsetzung von Oligosacchariden mit einem Aminolipid. Das daraus entstehende Neoglycolipid^[47] kann dann wiederum nicht-kovalent aufgrund der hydrophoben Wechselwirkungen und mit definierter Orientierung auf Nitrocellulosechips absorbiert werden.^[48] Eine letzte Variante ist die kovalente und orientierte Bindung eines nicht-modifizierten Zuckers über seine freie anomere Hydroxylgruppe an einer Aminooxy- oder Hydrazid-modifizierten Oberfläche.^[49]

Auch wenn es eine Vielzahl von Nachweismethoden gibt, wird die Notwendigkeit nicht geringer weitere hochsensitive Tests zur Untersuchung der Zucker-Protein-Wechselwirkung zu entwickeln. Neben ihrer Schwäche, zeichnen sich diese Wechselwirkungen durch ihre Spezifität aus und machen sie dadurch für den pharmakologischen Bereich sehr attraktiv. Denn ein spezifisches Binden an eine Zielstruktur bedeutet auch, dass es zu einer Verringerung der unerwünschten Nebenwirkungen im biologischen System kommt. So ermöglichen Zuckerstrukturen ein aktives Ansteuern der Zielmoleküle, da auf jeder Zelloberfläche Zucker und deren Rezeptoren aufzufinden sind.^[50] Sie müssen nur identifiziert und ihre Bedeutung erkannt werden.

1.2 GLYCOSYLIERUNGREAKTIONEN

1.2.1 Die Struktur eines Glycosids

Als Glycosylierungsreaktionen werden alle Reaktionen zusammengefasst, in denen das Produkt ein Glycosid ist.^[17a] Wie in Abbildung 9 ersichtlich ist, besteht ein Glycosid aus einem Zucker (Z), der nach der Reaktion mit einem Nucleophil als Vollacetal vorliegt. Glycoside lassen sich zum einen durch das verknüpfende Heteroatom X kategorisieren, man spricht dann beispielsweise von *O*-, *S*-, *C*-, oder *N*-Glycosiden, oder aber auch anhand der eingeführten Einheit (R) benennen. So können beispielsweise durch die Reaktion eines Monosaccharids mit einem anderen Monosaccharid Di-, Oligo- oder komplexe Polysaccharide als Produkt erhalten werden.

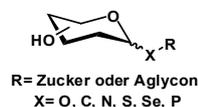


Abbildung 9: Grundstruktur eines Glycosids.

Auch aus der Reaktion eines Monosaccharids mit einem Aglycon erhält man ein Glycosid. In diesem Fall werden durch die Verknüpfung des Zuckers mit Peptiden, Fetten oder anderen organischen Molekülen sogenannte Glycopeptide, Glycolipide sowie andere Glycane erhalten.

In der Natur werden diese Reaktionen im Sekundentakt stereoselektiv ausgeführt. Für den Chemiker im Labor ist diese Reaktion immer noch beschwerlich. Auch nach etwa 30 Jahren

intensiver Forschung ist es schwierig, den stereochemischen Ausgang einer Glycosylierungsreaktion ausreichend zu steuern. Die Entwicklung neuer Abgangsgruppen, neuer Promotoren und auch die Optimierung der Reaktionsbedingungen haben bis jetzt nicht den gewünschten Erfolg erzielt. Wie man in Abbildung 10 sieht kann ein Glycosid grundsätzlich, wie

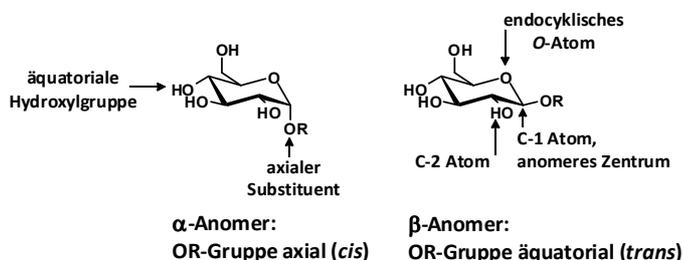


Abbildung 10: Die zwei verschiedenen Konfigurationen des D-Glucopyranosids.

jeder Zucker, in zwei verschiedenen Konfigurationen vorliegen. Als α -Anomer, in dem der Substituent axial am C-1 Atom orientiert ist, und als β -Anomer mit einer äquatorialen Ausrichtung des Substituenten. Das α -Anomer der D-Glucose ist aufgrund des anomeren Effektes in wässriger Lösung weitaus stabiler als man nach Summierung der sterischen Wechselwirkungen erwarten würde. Der anomere Effekt wird generell bei allen Molekülen beobachtet, bei denen zwei oder mehrere Heteroatome an ein tetraedrisches Zentrum gebunden sind.^[51] Die Ausprägung und somit die Gewichtung der verschiedenen Konfigurationen im Gleichgewicht hängt stark von der Elektronegativität des Substituenten X ab (Abbildung 11). Für unsubstituierte D-Glucose (X=OH) erhalten wir in Wasser ein α/β -Verhältnis von 36/64. Dieses kehrt sich durch Substitution am anomeren Zentrum rasch um, wie aus Abbildung 11a) deutlich ersichtlich ist.

Es gibt grundsätzlich zwei unterschiedliche Erklärungsansätze, um dieses Phänomen zu verstehen.

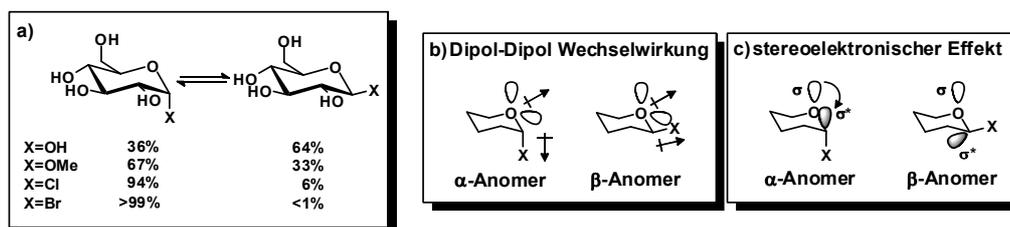


Abbildung 11: Der anomere Effekt.

Die Dipol-Dipol-Wechselwirkung (Abbildung 11b) und die $n\text{-}\sigma^*$ -Hyperkonjugation (Abbildung 11c). In beiden Theorien spielen die nicht-bindenden Elektronen des *endo*-cyclischen Sauerstoffs eine entscheidende Rolle. Bei der Variante b) kommt das resultierende Dipolmoment dieser sp^3 -hybridisierten Elektronen ins Spiel. Im β -Anomer steht es parallel zum Dipolmoment der *exo*-

cyclischen Kohlenstoff-Heteroatom-Bindung und wirkt so additiv. Diese Art der Wechselwirkung ist energetisch sehr ungünstig. Im Falle des α -Anomers zeigen die Dipole in verschiedene Richtungen, die resultierende Wechselwirkung ist somit klein und dieses Anomer energetisch begünstigt. Nach der Hyperkonjugationstheorie ist das α -Anomer energetisch begünstigt, weil die nicht-bindenden Elektronen des *endo*-cyclischen Sauerstoffatoms sich in dessen axialen p-Orbital befinden. Dies befindet sich räumlich *syn*-periplanar zum antibindenden σ^* -Orbital der *exo*-cyclischen C-X-Bindung (Abbildung 11c). Diese räumliche Anordnung erlaubt eine p- σ^* -Wechselwirkung. Diese Theorie kann experimentell, durch Kristallstrukturaufnahmen die eine Verkürzung der C-O-Bindung im Ring zeigen gestützt, werden.^[52] Im β -Anomer ist eine solche Wechselwirkung aufgrund der Orbitalsymmetrien nicht möglich.

Im letzten Abschnitt wurde die Bildung verschiedener Konfigurationen einzig in Hinblick auf die energetischen und sterischen Aspekte betrachtet. Es kommen Schutzgruppen, das Lösungsmittel

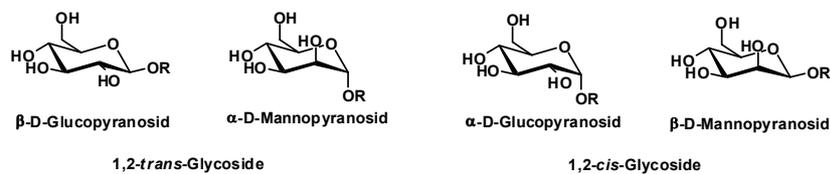


Abbildung 12: Beispiele für 1,2-*trans*- und 1,2-*cis*-Glycoside.

und die Temperatur zum Tragen. Das Hauptaugenmerk wurde auf die O-C-1-X-Bindung gelegt. Eine entscheidende Rolle für die Struktur eines Glycosids spielen jedoch auch die Substituenten am C-2-Atom, genauer gesagt das Zusammenspiel von C-1- und C-2-Atom. Die stereochemischen Aspekte, spielen während der Glycosidbildung eine entscheidende Rolle und sind somit für den Ausgang der Reaktion von Bedeutung. Kurz die Klärung einiger Begrifflichkeiten. Bei der stereoselektiven Synthese von 1, 2-*trans*- oder 1, 2-*cis*-Glycosiden (Abbildung 12) drückt die Bezeichnung *cis/trans* die räumliche Beziehung der glycosidischen Bindung zum Substituenten am

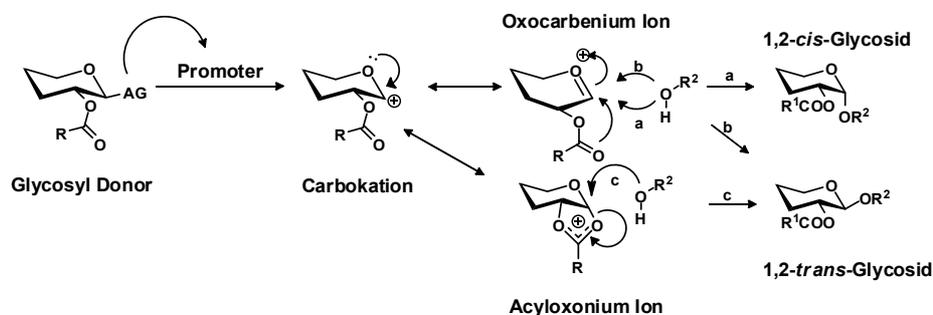


Abbildung 13: Synthese von 1,2-*trans*-Glycosiden durch Nachbargruppenbeteiligung.

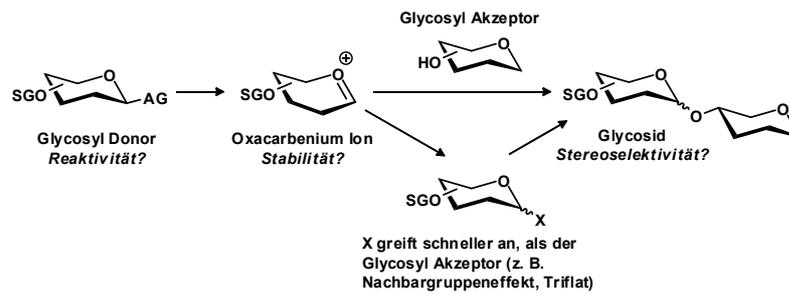
benachbarten C-Atom aus. Man sieht in Abbildung 12 auf der linken Seite zwei 1,2-*trans*-Glycoside, die Hydroxylgruppen am C-1 und C-2 stehen *trans* zueinander (oben/unten β -D-Glucopyranosid; unten/oben α -D-Mannopyranosid). In 1,2-*cis*-Glycosiden hingegen zeigen die benachbarten Substituenten entweder beide nach oben oder beide nach unten (α -D-Glucopyranosid, β -D-Mannopyranosid). 1,2-*trans*-Glycoside sind durch den Nachbargruppeneffekt verhältnismäßig einfach zu erhalten. Betrachten wir hierzu den Mechanismus in Abbildung 13. Nachdem mit Hilfe des Promotors die Abgangsgruppe den Glycosyl-Donor verlassen hat, erhalten wir ein Carbokation, das sich durch Mesomerie in Form eines Oxocarbeniumions stabilisieren kann. Dieses Oxocarbeniumion kann dann von einem Glycosyl-Akzeptor (R^2 -OH) sowohl von der Unter- (Weg a), als auch der Oberseite (Weg b) angegriffen werden. Befindet sich jedoch am benachbarten C-2-Atom des Pyranosids ein nachbargruppenaktiver Substituent, das heißt ein Substituent der intramolekular das Kation angreifen kann, so ist auch ein anderer Reaktionsweg möglich. Durch den intramolekularen Angriff des Substituenten wird die α -Position abgeschirmt und der Glycosyl-Akzeptor kann nur von oben angreifen (Weg c), wodurch ausschließlich das 1,2-*trans*-Glycosid erhalten wird. Solche aktiven Gruppen sind *O*-Acetyl, *O*-Benzoyl, *O*-Pivaloyl, *N*-Phthaloyl oder *N*-Trichloroethoxycarbonyl.

Die Synthese der entsprechenden 1,2-*cis*-Glycoside, ist weniger einfach. Als erstes ist darauf zu achten, dass sich keine aktiven Nachbargruppen im Molekül befinden. Deshalb sollte man zur Synthese Ether-Schutzgruppen oder die Maskierung der Aminofunktion durch eine Azidofunktionalität in Betracht ziehen. Dies allein ist jedoch kein Garant dafür, 1,2-*cis*-Glycoside zu erhalten. Zwar hat Lemieux im Jahr 1975 mit seiner Arbeit über die Halogenid-katalysierte *in situ*-Anomerisierung einen wichtigen Beitrag zu dieser Problematik geliefert,^[53] aber auch diese Methode erfordert eine mühselige Optimierungen der Schutzgruppen, des Katalysators, des Lösungsmittels und der Konzentration. Zusätzlich spielt auch die Reihenfolge der Zugabe der Edukte hier eine entscheidende Rolle.

1.2.2 Mechanismen und Methoden

Dieser Abschnitt soll, ausgehend von grundlegenden Überlegungen zum Mechanismus, einen kurzen Überblick über generelle Glycosylierungskonzepte geben (Schema 1).^[54]

Spricht man von einem Glycosyl-Donor, so ist ein Zucker gemeint, der über eine Abgangsgruppe (AG) verfügt. Hierbei kann es sich z. B. um Halogenide (z. B. Michael-Glycosylierung^[55], Koenigs-Knorr-Glycosylierung^[56]), Thioglycoside, Imidate (z. B. Schmidt-Donor) oder Acetate handeln, aber es können auch nicht modifizierte, ungeschützte Zucker verwendet werden (Fischer-

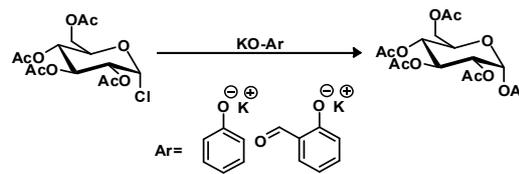


Schema 1: Allgemeine Betrachtung des Glycosylierungsmechanismus.

Glycosylierung^[57]). Eine entscheidende Rolle für den stereoselektiven Ausgang der Reaktion spielt auch die Wahl der Schutzgruppen am Donor und dessen Konformation. Der Glycosyl-Akzeptor verfügt im Falle eines *O*-Glycosids über eine freie OH-Gruppe und reagiert mit dem Donor zum Glycosid. Aus dem bisherigen Überblick wird bereits deutlich, dass bei der Synthese von Zielstrukturen viele Aspekte in Betracht gezogen werden müssen. Eine Variation von Schutzgruppen, Promotoren, Lösungsmitteln, der Konformation der beteiligten Zucker, die Wahl der Abgangsgruppen sowie auch die Reaktionstemperatur entscheiden, ob das gewünschte Glycosid erhalten wird.

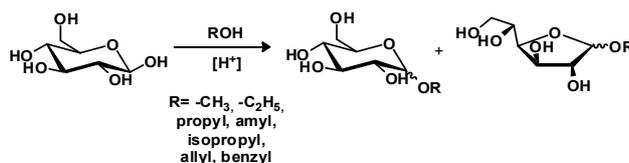
Im Folgenden wird detailliert auf die verschiedenen Glycosylierungsmethoden eingegangen, wobei wir die verschiedenen Glycosyldonoren historisch abhandeln werden.

Die Fischer-Glycosylierung, ist die älteste der hier verwandten Methoden. Historisch gesehen ist diese nach der von Arthur Michael im Jahr 1879^[55] publizierten Methode die zweite entwickelte Glycosylierungsreaktion. Michael konnte aus 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-glucopyranosylchlorid durch die Umsetzung mit Kaliumphenolat und -salicylal Glycoside (Schema 2) herstellen.



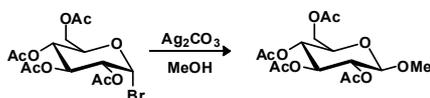
Schema 2: Die Michael-Glycosylierung.

Fischer folgte in der ersten Hälfte der 1890er mit seiner säurekatalysierten Glycosylierungsmethode von ungeschützten Zuckern.^[57] In seiner ersten Veröffentlichung zu diesem Thema beschreibt er die Glycosylierung von Traubenzucker (*D*-Glucose, Dextrose) indem er durch verschiedene alkoholische Traubenzuckerlösungen Chlorwasserstoff leitete.^[57a] Auch war er in der Lage, die Reaktion durch Verwendung stark verdünnter Salzsäure zu optimieren.^[57c]



Schema 3: Die Fischer-Glycosylierung.

Fischer konnte neben der in Schema 3 gezeigten α -D-Glucose, auch α -D-Maltose, α -D-Arabinose, α -D-Xylose, α -D-Glucoheptose, α -D-Rhamnose umsetzen und führte neben den bereits erwähnten Alkoholen auch Ethylenglycol, Glycerin und Milchsäure erfolgreich ein. Er war nicht der Erste, der auf diese doch recht einfache Art Glycoside erhielt, aber er war der Erste der erkannte, was er nach saurer Behandlung einer alkoholischen Zuckerlösung in den Händen hielt. Problematisch an der Fischer-Glycosylierung ist der Erhalt einer Mischung verschiedener Produkte. Beide Pionieransätze von Arthur Michael sowie auch von Emil Fischer waren somit in ihrer Anwendung noch stark begrenzt, sie zeigten aber schon deutlich drei grundsätzliche Dinge auf, die für die spätere Methodenentwicklung von großer Bedeutung waren. Um eine definierte Ringgröße zu erhalten, boten Schutzgruppen anscheinend eine Lösung. Eine anionische Abgangsgruppe so wie Michael sie verwendete, wurde in vielen späteren Glycosylierungsmethoden Standard und man sah, dass es sich bei der Glycosylierung nicht um eine einfache Acetalbildung handelte.^[54] 1901 wurde von Wilhelm Koenigs und Eduard Knorr aus 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-glucopyranosylbromid und Methanol unter Zugabe von Silbercarbonat das β -Glycosid (Schema 4) erhalten. Diese Glycosylierung war die erste Methode, die auch für die Synthese von komplexen Glycosiden geeignet war.^[56] Wie man in Schema 4 deutlich erkennen kann, erhält man aus dem peracetylierten α -Glucosebromid nach der Reaktion ein peracetyliertes β -Glucosemethylglycosid. Während der Reaktion findet eine Inversion am anomeren Kohlenstoff der α -D-Glucose statt. Über



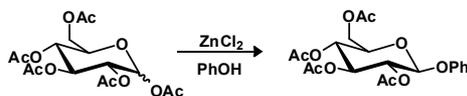
Schema 4: Die Koenigs-Knorr-Glycosylierung.

die letzten Jahre wurden viele neue Promotoren für die Koenigs-Knorr Glycosylierung entwickelt. Zusätzlich zu den ursprünglich verwendeten Silbersalzen Ag_2O und Ag_2CO_3 wurden andere Schwermetallsalze als Promotoren verwendet, wie z. B. CdCO_3 ^[58] oder HgI_2 .^[59] Lewisäuren wie SnCl_4 , BF_3 -Etherat^[60] oder InCl_3 ^[61] wurden auch zur Glycosylierung eingesetzt. Des Weiteren wurden elektrochemische^[62], thermische^[63] und Hochdruckglycosylierungen^[64] beschrieben.^[51] Trotz vielfältiger Weiterentwicklungen hat diese Form der Glycosylierung einige Schwächen. Die

Promotoren sind oft teuer, toxisch, teilweise lichtempfindlich und müssen unter sehr trockenen Bedingungen gehandhabt werden. Auch die Glycosyldonoren sind nicht sonderlich stabil.

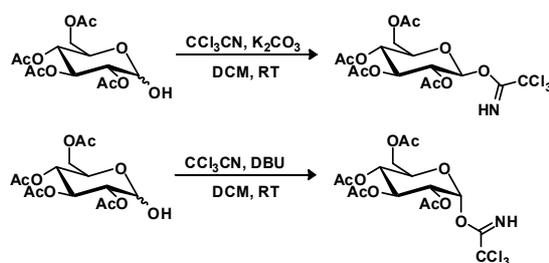
In dieser Arbeit wurden auch Glycoside aus *O*-Derivaten synthetisiert. Es wurden Acetate und Glycosyl-Trichloroacetimidate verwendet. Zuerst sollen die Glycosylester erläutert werden. Der Vorteil dieser Glycosyldonoren liegt eindeutig in ihrer einfachen Herstellung und Stabilität. Ein Nachteil ist, dass es sich bei der Acyloxy-Gruppe um keine hervorragende Abgangsgruppe handelt. Darum müssen hier zur Aktivierung harschere Bedingungen angewendet werden. Aus peracetylierter *D*-Glucose erhielten Burckhardt Helferich und Ernst Schmitz-Hillebrecht im Jahr 1933 unter Einwirkung saurer Katalysatoren das Phenol-*D*-glycosid (Schema 1). Als besonders tauglich stellten sich hier *para*-Toluolsulfonsäure und $ZnCl_2$ als Promotoren heraus.^[65] Die Weiterentwicklungen in den darauffolgenden Jahren zeigten, dass auch eine Vielzahl anderer Lewisäuren die Acetylgruppe als Abgangsgruppe aktivieren können, wie z. B. $SnCl_4$,^[66] $FeCl_3$,^[67] BF_3 -Etherat,^[68] Trimethylsilyltrifluorsulfonat (TMSOTf)^[69] und $Cu(OTf)_2$.^[70] Am weitesten verbreitet ist die Verwendung von TMSOTf zur Glycosylierung von peracetylierten Zuckern.

Das Trichloroacetimidat stellt eine weitaus bessere Abgangsgruppe dar. Zuckermoleküle, die diese Abgangsgruppe tragen, werden als Schmidtdonor bezeichnet, da dieser im Jahr 1980 von Richard R. Schmidt und Josef Michel entwickelt wurde.^[71] Die Herstellung erfolgt unter basischen



Schema 5: Die Glycosylierung von peracetylierten Zuckern unter Zuhilfenahme einer Lewisäure.

Bedingungen, durch die Addition von Trichloroacetonitril an die freie Hydroxylgruppe des Lactols. Über die Stärke der eingesetzten Base lässt sich die Stereochemie des Schmidtdonors steuern. Unter Einwirkung einer schwachen Base wie Kaliumcarbonat wird das β -Anomer erhalten, wohingegen eine starke Base wie 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) oder Natriumhydrid die Entstehung des α -Anomers bevorzugt (Schema 6). Diese Moleküle sind unter neutralen und



Schema 6: Die Synthese des Schmidtdonors.

basischen Bedingungen relativ stabil, unter sauren Bedingungen jedoch sehr reaktiv. Im Gegensatz zu den Acetaten genügen hier katalytische Mengen von Lewis- oder Brønstedt-Säuren, um die Reaktionen mit *O*-Nucleophilen herbeizuführen. Saure Glycosyl-Akzeptoren reagieren sogar ohne zusätzlichen Katalysator.^[71-72] Auch hier werden meist als Katalysatoren *p*-TsOH, BF₃-Etherat^[71] und TMSOTf^[73] verwendet. Diese Methode findet unter sehr milden Bedingungen und bei niedrigen Temperaturen statt, was sie zur Anwendung bei der Synthese komplexer Naturstoffe wie beispielsweise Vancomycin^[74] befähigt. Die Trichloracetimidate sind heutzutage die am häufigsten genutzten Glycosyl-Donoren.

1.3 FLUORESZENZ UND FLUORESZENZ-RESONANZENERGIETRANSFER

1.3.1 Grundlagen

Absorbiert ein Fluorophor Licht seiner Anregungswellenlänge, so strahlt es Licht einer größeren Wellenlänge ab. Dieses Phänomen der Absorption kurzwelligen Lichtes, verbunden mit der Emission längerwelligen Lichtes, nennt man Fluoreszenz.^[75] Der physikalische Prozess ist in

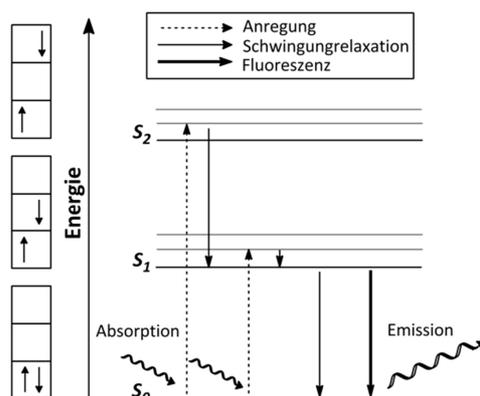


Abbildung 14: Die schematische Darstellung der Fluoreszenz im Jablonski-Diagramm.^[76]

Abbildung 14 dargestellt. Durch die Energie des eingestrahelten Lichts, wird das Elektron in einen angeregten Zustand (beispielsweise S_1 oder S_2) angehoben. Hier kann es die Energie durch Wechselwirkung mit der Umgebung strahlungslos als Schwingungsenergie verlieren oder aber durch Emission von Strahlung in den Grundzustand S_0 zurückkehren. Erfolgt die Abgabe der Energie durch Emission, sprechen wir von Fluoreszenz. Die abgestrahlte Energie ist im Allgemeinen durch die zuvor erfolgten strahlungslosen Energieverluste, kleiner als die absorbierte Energie. Dadurch kommt es im Fluoreszenzspektrum zu einer Stokes-Verschiebung gegenüber dem Absorptionsspektrum.^[75] Diese Verschiebung ist die Voraussetzung für die Fluoreszenz

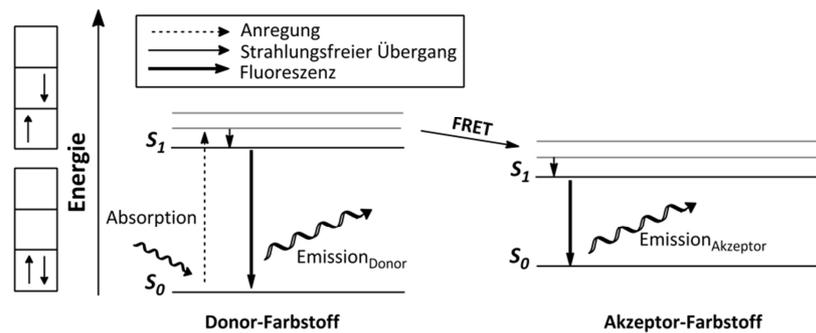


Abbildung 15: Das vereinfachte Jablonski-Diagramm des FRET-Prozesses.^[77]

mikroskopie, da so eine Unterscheidung und Trennung des Anregungslichtes vom emittierten Licht möglich ist.

Der Energieübergang von angeregten Molekülen auf Akzeptormoleküle durch strahlungslose Dipol-Dipol-Wechselwirkung (Abbildung 15) wurde als physikalisches Phänomen von Förster 1948 diskutiert und als Fluoreszenz- oder Förster-Resonanzenergietransfer bezeichnet.^[78]

Diese Art des Energietransfers ist für Farbstoffe nur unter bestimmten Voraussetzungen möglich. Es muss zur Überlappung des Emissionsspektrums (Donor) mit dem Absorptionsspektrum (Akzeptor) kommen, ihre Dipole dürfen keinesfalls senkrecht zueinander stehen und Donor und Akzeptor müssen sich ausreichend nah sein. Die erste Bedingung, die Überlappung des Emissionsspektrums des Donors mit der Absorption des Akzeptors, kann unterschiedlich ausgeprägt sein. Der Grad der Überlappung wird als Überlappungsintegral J bezeichnet.

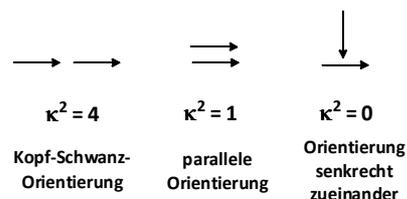


Abbildung 16: Die drei Grenzfälle des Orientierungsparameters κ^2 .

Das zweite Kriterium ist, dass die Dipole von Donor und Akzeptor möglichst parallel, jedoch auf keinen Fall senkrecht zueinander ausgerichtet sein dürfen. Dies ist am Orientierungsparameter κ^2 in Gleichung (2) zu erkennen.^[79] κ^2 kann Werte zwischen 0 und 4 annehmen. In Abbildung 16 ist die Orientierung der Dipole für die Werte 4, 1 und 0 dargestellt. Als Näherung wird meist von $\kappa^2 = 2/3$ für ein System ausgegangen, in dem Donor und Akzeptor sich zufällig durch Rotationsdiffusion bewegen, bevor der Energietransfer stattfindet.^[80]

Das letzte Kriterium, das letztendlich FRET zu einem einzigartigen Werkzeug macht, ist die Distanzabhängigkeit. Um einen effizienten FRET zu erhalten sollten Donor und Akzeptor sich in

einem Radius von ca. 0.5-10 nm befinden. Der Förster-Abstand R_0 ist der kritische Molekülabstand, bei dem die Hälfte der Energie vom Donor- auf den Akzeptor-Farbstoff übergegangen ist.

$$R_0^6 = 8.79 \cdot 10^{23} (\kappa^2 n^{-4} Q_D J(\lambda)) [\text{\AA}^6] \quad (2)$$

Dieser Abstand R_0 ist abhängig: (i) vom Orientierungsparameter κ , der die Orientierung der Dipolmomente des Akzeptor und Donors zueinander beschreibt, (ii) von der Fluoreszenzquantenausbeute des Donors in Abwesenheit des Akzeptors Q_D und (iii) vom Überlappungsintegral des Donor-Emissionsspektrums und des Akzeptor-Absorptionsspektrums. Alle zuvor erläuterten Bedingungen fließen hier mit ein.

Die Transferrate k_T für diesen Energieübergang ist gegeben durch die Formel (3):

$$k_T = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \quad (3)$$

Hier ist τ_D die Fluoreszenzlebensdauer des Donors in Abwesenheit des Akzeptors, und r der Akzeptor-Donor-Abstand. Die Transferrate k_T entspricht der Geschwindigkeit der Fluoreszenzabnahme $1/\tau_D$ des Donors an dem Punkt, an dem der Donor-Akzeptor-Abstand r gleich dem Försterabstand R_0 ist. Die Intensität der Donor-Emission ist unter diesen Umständen halb so groß wie in Abwesenheit des Akzeptors.

Die Effizienz des Energietransfers E ergibt sich aus dem Verhältnis der vom Donor absorbierten Photonen (Nenner) und dem Elektronentransfer vom Donor auf den Akzeptor (Zähler):^[81]

$$E = \frac{k_T(r)}{\tau_D^{-1} + k_T(r)} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (4)$$

Anhand der Gleichung (3) erkennen wir eine starke Donor-Akzeptor-Abstandsabhängigkeit, da

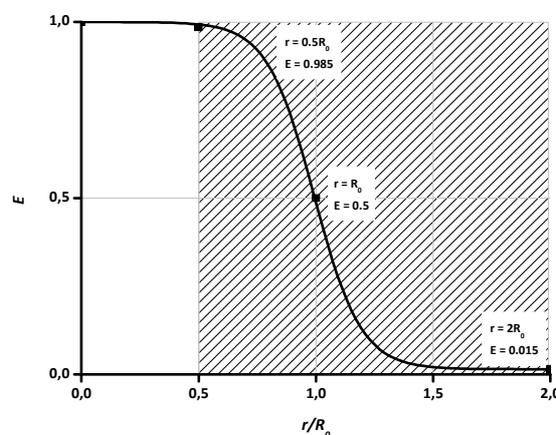


Abbildung 17: Die Abhängigkeit der Effizienz E vom Donor-Akzeptor-Abstand r .

sich die Effizienz E antiproportional zu r^6 verhält. Die nochmals in Abbildung 17 graphisch dargestellt wird. Wie man im Graph sieht, ist eine Messung eines Resonanzenergietransfers unterhalb von Distanzen $r = 0.5R_0$ ($E = 98.5\%$) oder oberhalb von Distanzen $r = 2R_0$ ($E = 1.5\%$) wenig sinnvoll (schraffierter Bereich).^[80] Ein tieferen Einblick in die theoretischen Grundlagen bietet die Originalliteratur^[78] sowie eine ausführliche Übersicht von Lakowicz^[80].

Experimentell wird der Energietransfer E durch die Messung der relativen Fluoreszenzintensitäten des Donors in Abwesenheit des Akzeptors F_D und in Anwesenheit des Akzeptor F_{DA} bestimmt^[82] oder über die Messung der entsprechenden Lebenszeiten τ_D und τ_{DA} ^[80].

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} \quad (5)$$

Diese Gleichung findet ihre Anwendung nach einer Reihe von Annahmen und Vereinfachungen, die hauptsächlich von einer definierten Distanz zwischen Donor und Akzeptor ausgehen.

1.3.2 Anwendung

FRET kann durch seine Abstandsabhängigkeit als molekulares Lineal verwendet werden. So kann beispielsweise der Abstand zwischen zwei verschiedenen Stellen in einem Protein gemessen oder seine Konformation bestimmt werden. Oft wird dazu ein intrinsisches Fluorophor wie Tryptophan oder Tyrosin genutzt und zusätzlich ortsspezifisch extrinsisch mit einem Fluorophor markiert.^[81] Lakowicz benutzte das einzige Tryptophan (Trp 19) des Proteins Mellitin, das aus 26 Aminosäuren besteht, als Donor. Der Akzeptor war Dansyl, dieses wurde an den *N*-Terminus des Proteins gebunden. Das fluoreszenzmarkierte Protein wurde dann in einer Wasser-Methanol-Mischung (1:4) vermessen, weil es unter diesen Bedingungen nicht mehr als Knäuel sondern als Monomer in einer sehr steifen α -Helix vorliegt (erkennbar aus seinem CD-Spektrum) und man von einem einzigen Abstand zwischen Donor und Akzeptor ausgehen kann. Das Verhältnis F_{DA}/F_D wurde durch Fluoreszenzmessungen von Melittin und Dansyl-Melittin von 0.55 bestimmt. Laut Gleichung (5) entspricht dies einer Transfereffizienz E von 0.45, somit muss der Donor-Akzeptor-Abstand größer als R_0 sein (siehe Abbildung 17).

Mit einem $R_0 = 23.6 \text{ \AA}$ (in einer 80%ige Methanollösung), erhält man mit Gleichung (4) einen Abstand zwischen Tryptophan und Dansyl von 24.4 \AA , ein völlig gestrecktes Mellitin hätte eine Länge von 54 \AA .^[83]

Auch die Veränderung eines Abstands zwischen zwei Fluorophoren kann gemessen werden. Miki *et al.* hat dies anhand von Untersuchungen an fluoreszenzmarkiertem Troponin-I und Actin, die als Proteinkomplex den beweglichen Teil der Muskulatur bilden, gezeigt. Durch Untersuchungen

der Änderung der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration konnten sie zeigen, dass die Proteinkonformation sich in Abhängigkeit der Konzentration der Calciumionen ändert.^[84] Der Resonanzenergietransfer kann auch in der lebenden Zelle gemessen werden. Xu *et al.* haben mit Hilfe zweier Varianten des grün-fluoreszierenden Proteins (*engl.* green fluorescent protein, GFP) die Protein-Faltung in lebenden neuronalen Zellen untersucht. Sie markierten die Apolipoproteine E4 und E3 am N-Terminus mit YFP (Emission = 530 nm) und am C-Terminus mit CFP (Emission = 490 nm). Beide bestehen aus zwei Domänen mit ähnlicher Aminosäuresequenz, zeigen jedoch sehr unterschiedliche physiologische Effekte, die höchstwahrscheinlich auf unterschiedliche Wechselwirkungen zwischen ihren beiden Domänen beruhen. Apo E3 steht in Verdacht bei der Entwicklung von Alzheimer eine entscheidende Rolle zu spielen. Für Apo E3 konnte von den Autoren gezeigt werden, dass es nach Anregung des CFP zu keinerlei FRET kommt, wohingegen bei Apo E4 eine Wechselwirkung der beiden Domänen und somit ein FRET zwischen CFP und YFP zustande kam und durch die Detektion der YFP-Emission nachgewiesen werden konnte (Abbildung 18).^[85]

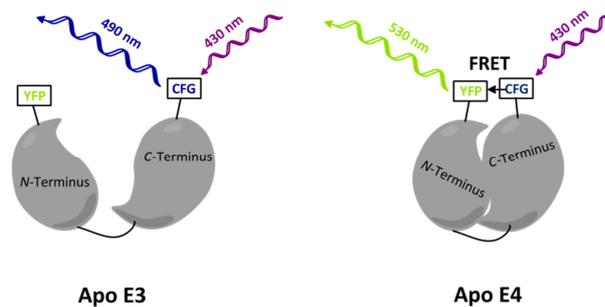


Abbildung 18: Schematische Darstellung der Konformationsänderung und des daraus resultierenden FRETs zweier Apolipoproteine.

Zeitaufgelöste FRET-Messungen (*engl.* time resolved-FRET, tr-FRET^[86]) ermöglichen tiefere Einblicke in die vorübergehenden intramolekularen Abstandsverteilungen (im Millisekunden-Bereich), wie beispielsweise von Ratner *et al.* für den Kernbereich der Adenylatkinase (*Escherichia coli*) gezeigt wurde.^[87]

Als Fluorophore werden wie bereits zuvor erwähnt verschiedenste Moleküle verwendet. Es gibt intrinsische Fluorophore (z.B. Tryptophan oder Tyrosin), aber auch organische Farbstoffe wie Dansyl oder Cyaninfarbstoffe oder Varianten des grün fluoreszierenden Proteins finden Anwendung. Eine weitere Klasse stellen die Quantendots (QDots) dar, die durch ihre hervorragenden optischen Eigenschaften hervortreten. Sie haben ein sehr breites Absorptionsspektrum, hohe molare Extinktionskoeffizienten, ein sehr schmales und

symmetrisches Emissionsspektrum vom UV bis zum nah-Infrarotbereich, hohe Stabilität gegen Ausbleichen und eine sehr große Stokes-Verschiebung.^[88] Kagan *et al.* haben als erste QDots als Donor ($\varnothing \approx 39 \text{ \AA}$) und Akzeptor ($\varnothing \approx 62 \text{ \AA}$) für einen FRET benutzt. Sie beobachteten einen Intensitätsabfall für die kleineren QDots und eine Lebenszeitverlängerung für die größeren Akzeptor-QDots.^[89] Die erste biologische Anwendung erfolgte durch Experimente von Willats *et al.*, bei der Untersuchung von wasserlöslichen QDots die mit biotinyliertem BSA (≈ 11 BSA Moleküle/QDot) beschichtet waren. Als Akzeptor wurde Tetramethylrhodamin (TMR) an Streptavidin gebunden. In einer Pufferlösung wurde dann der Biotin-Streptavidin-Komplex gebildet und der QDot konnte die Energie auf das Rhodaminderivat übertragen.^[90] Danach wurden noch viele weitere Anwendungen von QDots im biologischem Feld beschrieben. Einen guten Überblick liefert der Minireview von Clapp *et al.*^[88]

Neben der Entwicklung neuer Markierungstechniken, mit GFP, QDots oder anderen Farbstoffen, spielte auch die Entwicklung im optisch-technischen Bereich eine entscheidende Rolle, um die breite Nutzung von FRET interessant für biologische Anwendungen zu machen.^[91] Beispielsweise die Ende der 1980er Jahre für die Biowissenschaften entwickelten Lebenszeitmessungen (*engl.* fluorescence lifetime imaging microscopy, FLIM^[92]) haben einen entscheidenden Vorteil gegenüber der konventionellen Methode, die das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten in Ab- und Anwesenheit des Akzeptors bestimmt: sie sind konzentrationsunabhängig. Die FLIM-Methode ermöglicht eine Messung der unterschiedlichen Lebensdauern in jedem Pixel des Bildes. Diese Unterschiede in der Lebensdauer kommen zum einen durch die photophysikalischen Eigenschaften des Farbstoffes zustande, zum anderen aber auch durch ihre unterschiedliche Umgebung.^[93]

Eine andere Option sind die Donor- bzw. Akzeptor-Bleichmethoden pbFRET (*engl.* photo bleaching, Ausbleichen). Hierbei wird ein Bereich der Probe vor und nach dem Bleichen gemessen und aus dem Anstieg der Donorfluoreszenz (im Falle der Donor-Bleichmethode) kann ein Maß für die FRET-Effizienz E ermittelt werden. Eine Übersicht und Kategorisierung der derzeitigen Techniken haben Jares-Erijman und Jovin zusammengestellt.^[94]

2 WISSENSCHAFTLICHE ZIELE

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines empfindlichen Tests zur Untersuchung schwacher Zucker-Protein-Wechselwirkungen. Der erste Ansatz beruht auf dem Phänomen des Fluoreszenz-Resonanzenergietransfers — FRET (Abbildung 19).

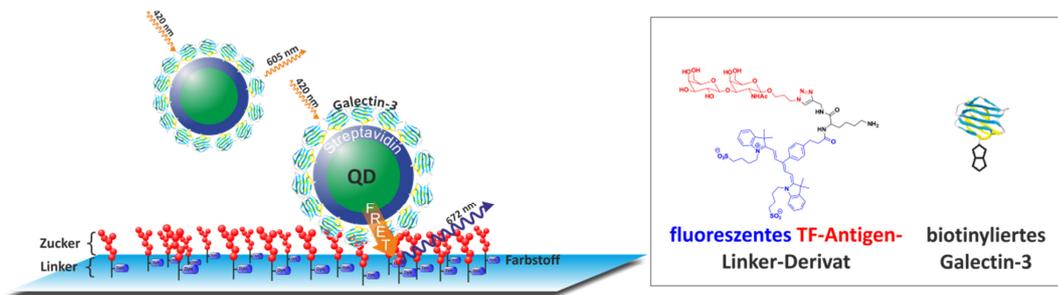


Abbildung 19: Konzeptioneller Aufbau eines Tests zur Identifizierung und Quantifizierung von Zucker-Protein-Wechselwirkungen unter Nutzung von FRET.

Hierzu werden fluoreszente Kohlenhydrat- und Biotinderivate als Ligandsysteme benötigt. Eine erste Untersuchung des FRET-Systems soll in Lösung erfolgen. Parallel ist die Entwicklung eines Systems geplant, das die Möglichkeit zur Kupplung von Liganden auf Glasoberflächen bietet, um eine Anwendung in mikrofluidischen Systemen zur Nutzung in Hochdurchsatzverfahren zu ermöglichen. Als Referenzsysteme werden Biotinderivate benötigt, da sie sehr stark an Streptavidin binden ($K_D = 10^{-15}$ M) und wir somit sicher sein können, dass Ligand und Rezeptor interagieren.^[95] Mit Lösungsexperimenten soll gezeigt werden, dass die ausgewählten Fluorophore für diesen Test geeignet sind und einen Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer zeigen. Die fluoreszenten Ligandsysteme sollen kovalent auf Oberflächen immobilisiert werden. Dazu wird ein Linkersystem benötigt, das neben der Kupplung des Liganden und der Fluoreszenzmarkierung, auch eine Bindung zur Glasoberfläche ermöglicht. Aufgrund der drei funktionellen Gruppen, die unabhängig voneinander funktionalisiert werden können, eignet sich D-Lysin besonders gut als Linkersystem. Die Anbindung der Farbstoffe und Liganden soll über Amidkupplung bzw. kupferkatalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition erfolgen. Die verbleibende Aminogruppe kann dann zur Kupplung auf den präfunktionalisierten Carboxy- oder Epoxid-Glasobjektträgern genutzt werden. Für die Kupplung müssen geeignete Reaktionsbedingungen gefunden werden und es muss ein Aufbau für das Fluoreszenzmikroskop zur Messung des FRETs auf der Oberfläche entwickelt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollen die proteinresistenten Eigenschaften von hPG^[96] für die Unterdrückung unspezifischer Wechselwirkungen eingesetzt werden. Hierzu soll untersucht

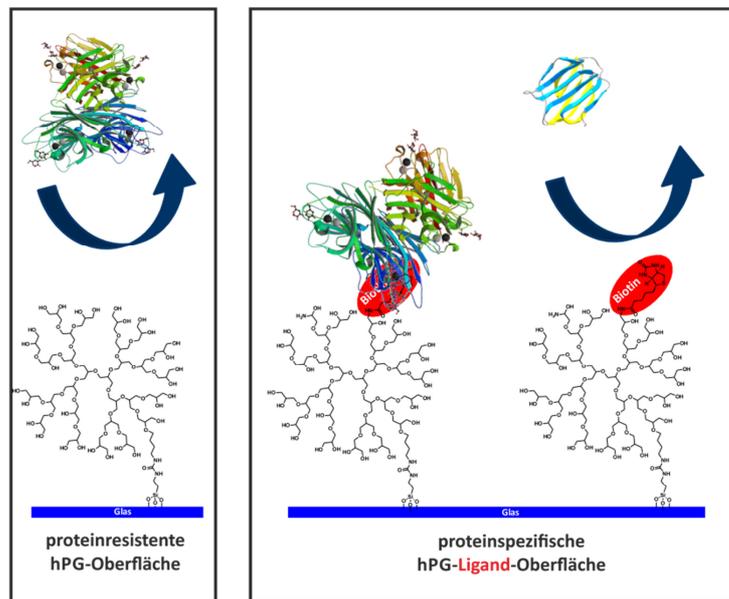


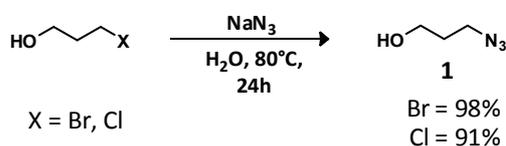
Abbildung 20: Die Nutzung von hPG zur Herstellung intelligenter Oberflächen am Beispiel streptavidinaffiner hPG-Biotin-Oberflächen.

werden, ob die Verwendung von Polyglycerol als ligandpräsentierende Gerüstarchitektur die unerwünschten Wechselwirkungen mit unspezifischen Proteinen minimieren oder sogar vollständig unterdrücken kann. Dadurch wäre es möglich, die Spezifität der Oberflächen für die gewünschten Protein-Wechselwirkungen zu erhöhen (Abbildung 20). Für diese Untersuchung werden verschiedene ligandtragende carboxylat- und aminfunktionalisierte Polyglycerolderivate hergestellt, die auf Glas- sowie auf Goldoberflächen immobilisiert werden sollen. Die Kupplung auf Gold erfolgt mit Liponsäure als Anker-molekül. Für die Bindung an präfunktionalisierte Glasoberflächen sollen verbleibende Amin- oder Carboxylatgruppen des hPGs genutzt werden. Die Untersuchung der Proteinresistenz soll durch Oberflächenplasmonenresonanz- und Fluoreszenz-Messungen nach Inkubation mit verschiedenen Proteinen erfolgen.

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1 DIE SYNTHESE VON VERSCHIEDENEN ZUCKERBAUSTEINEN

Das primäre Ziel bei der Herstellung der verschiedenen Zuckerderivate war die Synthese von 3-Azidopropylglycosiden, da die β -O-glycosidische Bindung entscheidend für die Bindung mit Galectinen ist.^[34] Die Azidofunktionalität dient zur Einführung des fluoreszenten Farbstoffes durch kupferkatalysierte Alkin-Azid-Cycloaddition (CuAAC). Des Weiteren kann sie auch als Synthon für primäre Amine genutzt werden und nach Reduktion zur Knüpfung von Amiden genutzt werden. Die Synthese von 3-Azidopropanol (**1**) erfolgte nach leicht abgewandelter Literaturvorschrift (Schema 7).^[97] Anfänglich wurde 3-Bromopropanol als Edukt verwendet. Auch mit dem deutlich

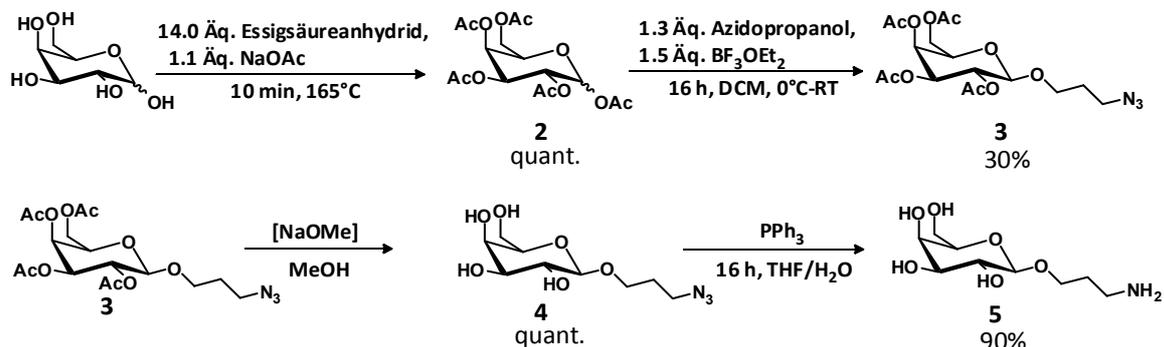


Schema 7: Synthese von Azidopropanol.

preiswerteren 3-Chloropropanol konnten sehr gute Ausbeuten des gewünschten 3-Azidopropanols erhalten werden. Das 3-Halogenopropanol wurde in Wasser [$c = 0.5 \text{ M}$] mit 1.7 Äquivalenten Natriumazid für 24 Stunden bei 80°C erhitzt. Das Produkt wurde durch mehrfache Extraktion mit Diethylether erhalten, eine anschließende Reinigung durch Destillation war nicht nötig, da das 3-Azidopropanol in sehr guter Ausbeute und Reinheit erhalten wurde.

Der Modellzucker für unser System ist die D-Galactose. Sie ist der erste Glycosyl-Donor, den wir mit Azidopropanol (**1**) umsetzten. Da eine von Roy *et al.* modifizierte Fischer-Glycosylierungsmethode, in der die ungeschützte D-Galactose mit Hilfe SiO_2 -geträgerter Schwefelsäure glycosyliert wird, nicht zum gewünschten Produkt führte,^[98] wurde die Glycosylierung stattdessen mit der peracetylierten Verbindung durchgeführt. Dies ist in Schema 8 dargestellt. Die Herstellung des Pentaacetats der Galactose erfolgte in sehr guten Ausbeuten durch das Kochen des Zuckers in Essigsäureanhydrid. Zu Beachten war hier, dass nur eine möglichst kurze Erhitzung der D-Galactose zu einer hohen Ausbeute führt. Dies wurde durch die Zugabe des Zuckers zum bereits siedenden Essigsäureanhydrid erreicht. Das Hauptprodukt, das β -Anomer **2** (53%), wurde durch Ausfällen in Eiswasser erhalten. Aus der wässrigen Phase konnte das Anomerengemisch durch Ausfällen und Extrahieren in quantitativer Ausbeute erhalten werden. Das Produkt **2** wurde dann mit 3-Azidopropanol (**1**), unter Zusatz verschiedener Lewissäuren umgesetzt, um das β -O-

Galactosid **3** zu erhalten. Ohne Optimierung der Reaktionsbedingungen wurden die besten



Schema 8: Die Synthese von Gal-Azido- und Aminopropanol.

isolierbaren Ausbeuten von 30% unter der Verwendung von BF₃·OEt₂ als Lewisäure erhalten. Die Verwendung von SnCl₄ lieferte 21% des β-GalAc₄-Azidopropanol (**3**) und mit FeCl₃ konnten nur 13% Produkt erhalten werden. Eine Verbesserung der Ausbeute wäre durch Reinigung des Produktgemisches mit Hilfe der HPLC zu erreichen gewesen, da die säulenchromatographische Trennung auf SiO₂ unter konventionellen Bedingungen unzureichend war und viele Mischfraktionen erhalten wurden. Die Analytik des Produktes erfolgte über ¹H und ¹³C NMR-Spektroskopie, aber auch mit ESI-TOF-Massenspektrometrie. Hier konnte neben dem Massepeak für C₁₇H₂₅N₃NaO₁₀⁺ auch eine Molmasse gefunden werden, die durch Abspaltung eines Moleküls Stickstoff (N₂) und Bildung eines metastabilen Nitrens entsteht (Abbildung 21). Dies wurde bereits von Oliveira *et al.* für EI-Spektren von aliphatischen Aziden,^[99] von der Arbeitsgruppe um Grayson in den Maldi-TOF-Massenspektren verschiedener azidtragender Polymere^[100] und von der Arbeitsgruppe um Schubert an azidofunktionalisiertem Polyethylenimin (PEI) beobachtet.^[101]

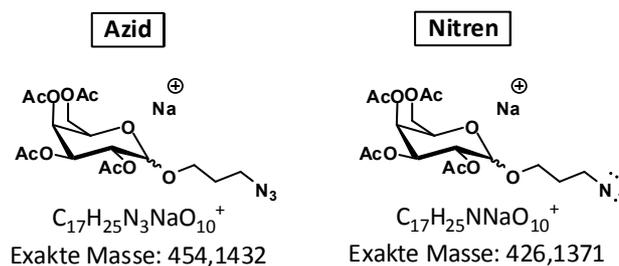


Abbildung 21: Moleküle im ESI-TOF-MS von GalAc₄-Azidopropanol (**3**).

Das Glycosid wurde quantitativ mit katalytischen Mengen Natriummethanolat entschützt, um den gewünschten Zucker **4** für die CuAAC zu erhalten. Dieser konnte dann mit Triphenylphosphin in sehr guten Ausbeuten von 90% zum Gal-Aminopropanol **5** reduziert werden.

Das Thomson-Friedensreich-Antigen (TF-Ag) spielt, wie bereits in der Einleitung erwähnt, eine Rolle bei verschiedenen Krebsarten und die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen diesem Antigen und Galectin-3 könnte zum Verständnis dieser Krebsarten beitragen. Bei der Synthese des Thomson-Friedensreich-Antigens werden nun unterschiedliche Strategien (Abbildung 22) angewendet. Als erstes wurde ein Linker eingeführt, der die kovalente Bindung an Oberflächen sowie zu anderen Molekülen ermöglichen sollte. In dieser Arbeit wurde 3-Azidopropanol (**1**) verwendet. Dieser primäre Alkohol ist der Glycosyl-Akzeptor. Er wird mit dem Donor, dem peracetylierten

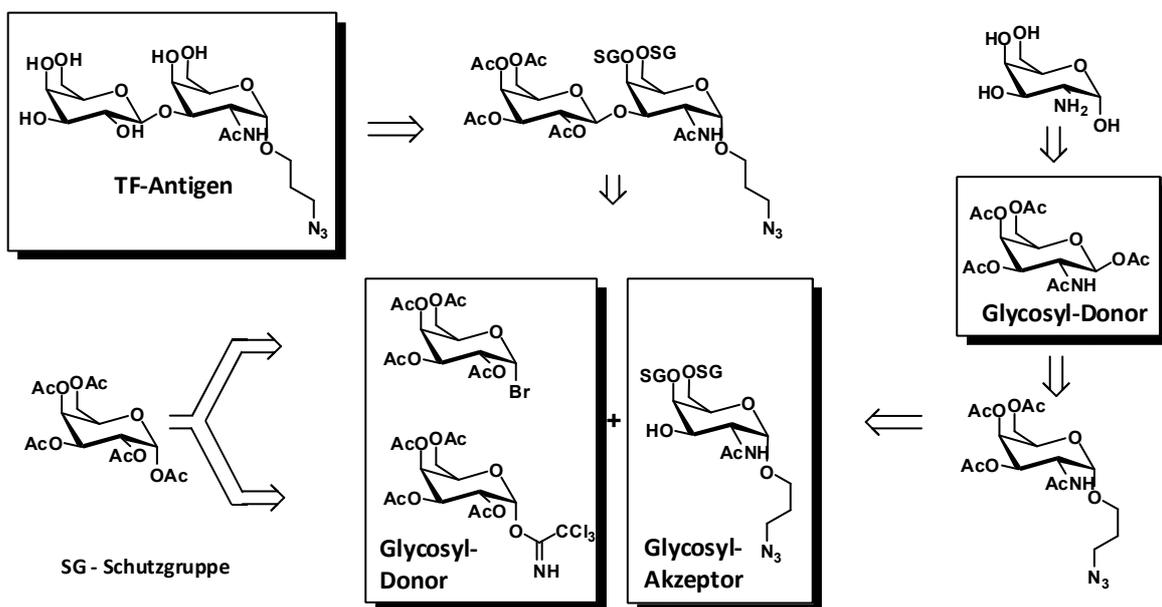
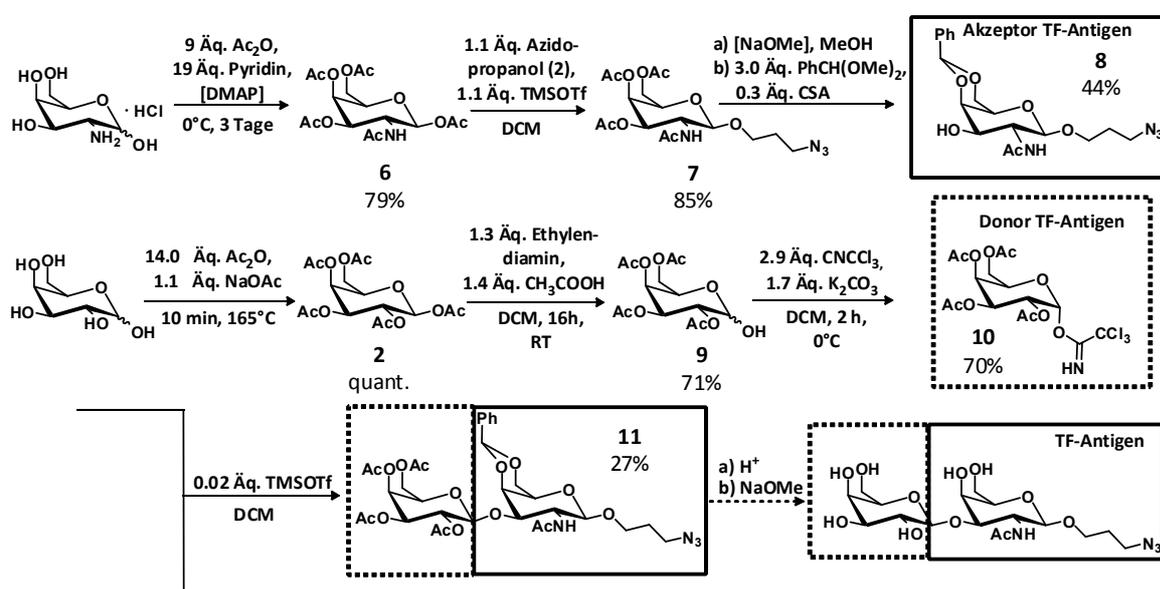


Abbildung 22: Die Retrosynthese von TF-Antigen.

N-Acetylgalactosamin, umgesetzt und ist somit ein perfektes Beispiel für die Bildung eines Glycosids aus einem Aglycon (3-Azidopropanol (**1**)) und *D*-Galactosamin. Mit Hilfe orthogonaler Schutzgruppenchemie erfolgt die Umsetzung des Zuckers von einem Glycosyl-Donor zu einem Akzeptor mit freier OH-Gruppe am C-4-Atom der Hexose. Diese soll dann wiederum mit dem Galactose-Donor umgesetzt werden, der eine peracetylierte Galactose, ein Halogenid oder auch das Trichloracetimidat-Derivat sein kann. Als Produkt erhält man ein Disaccharid mit zwei verschiedenen glycosidischen Bindungen: 3-Azidopropyl-(β -*D*-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-2-acetamido-2-deoxy- α -*D*-galacto-pyranosid. Wichtig ist also, dass das Aglycon α -glycosidisch eingeführt und die 2-(Acetylamino)-2-deoxy-*D*-galactose (GalNAc) über eine β -glycosidische Bindung an die Galactose gebunden wird.

Es wurde versucht, das TF-Antigen nach der in Abbildung 22 gezeigten Retrosynthese herzustellen. Dazu muss Galactose, wie schon in Schema 8 gezeigt, als Glycosyl-Donor agieren. Der in Schema 9 verwendete Akzeptor bedeutete jedoch einen erheblich höheren Syntheseaufwand, als beim 3-Azidopropanol (**1**), weshalb direkt ein aktivierter Glycosyl-Donor als das Acetat ausgewählt wurde. Zur Herstellung des Schmidt-Donors der Galactose wurde die peracetylierte Galactose am anomeren Zentrum unter Verwendung der milden Base 2-Aminoethanacetat, in moderaten Ausbeuten deacetyliert und als α/β -Gemisch **9** weiter verwendet. Die Einführung des Trichloroacetimidats erfolgte unter basischen Bedingungen bei 0°C



Schema 9: Die Synthese des β -Anomers des TF-Antigens.

mit Trichloroacetonitril. Das Produkt **10** wurde als α -Anomer mit einer Ausbeute von 70% erhalten.

Der Glycosyl-Akzeptor musste vollständig, bis auf das OH-3 geschützt werden, um dann mittels TMSOTf-Katalyse mit dem Donor umgesetzt zu werden. Die Synthese der GalNac-Derivate erforderte auf jeder Stufe eine aufwendige Optimierung. Der erste Schritt der Peracetylierung (**6**) konnte durch die Optimierung von anfänglichen Spurenausbeuten auf gute Ausbeuten von 79% gebracht werden. Entscheidend waren hierbei eine lange Reaktionsdauer von drei Tagen bei 0°C und die Verwendung hochreinen Pyridins. Die *O*-Glycosylierung erfolgte durch den Nachbargruppeneffekt der *N*-Acetylgruppe in den GalNac-Derivaten viel spezifischer als bei Galactose. Somit wurde auch eine gute Ausbeute von 85% erhalten. Problematisch hierbei war, dass aufgrund des Nachbargruppeneffektes der *N*-Acetylgruppe das gewünschte α -Anomer nicht

erhalten werden konnte. Da aber auch der Einfluss der Orientierung der glycosidischen Verknüpfung auf das Bindungsverhalten des Zuckers mit dem Lectin untersucht werden sollte, war auch dieses Derivat von potentiellern Nutzen. Das β -GalNAc₄-Azidopropanol (**7**) wurde nun wieder entschützt, wie es in Schema 8 nach der Methode von Zemplén dargestellt ist. Um selektiv nur das OH-3 umzusetzen, mussten OH-4 und OH-6 geschützt werden. Zur Schützung solcher 1,3-Diole eignen sich Benzylidenacetale. Unter saurer Katalyse wurde Benzaldehyddimethylacetal mit 44% Ausbeute eingeführt. Dieser Glycosyl-Donor konnte nun unter TMSOTf-Katalyse mit dem Glycosyl-Accepter umgesetzt werden und in 27% Ausbeute wurde das vollständig geschützte β -TF-Antigen-Derivat **11** erhalten.

Die Optimierung Zuckerderivatsynthesen ist nicht zu unterschätzen. Allein jede hier beschriebene Peracetylierung erforderte andere Bedingungen. Die Acetylierung von Galactose, Glucose und Lactose erfolgte bei sehr niedrigen Temperaturen (Eisbad: 0°C) und über große Zeiträume

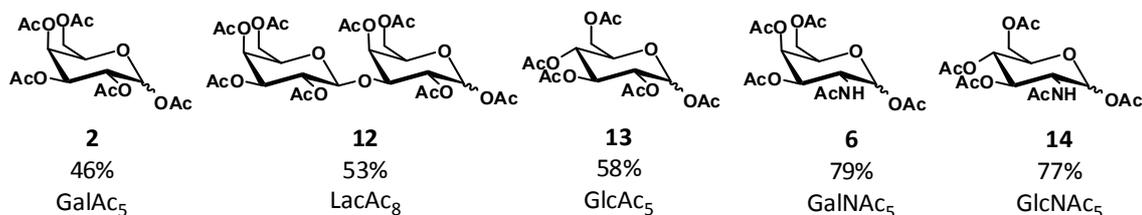


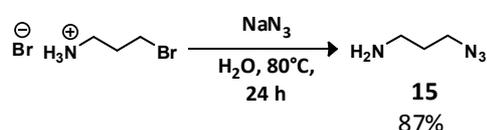
Abbildung 23: Ausbeuten der peracetylierten Zucker.

(bis zu drei Tagen im Falle von GalNAc₅ (**6**)). Die Acetylierung von D-Galactose, D-Glucose und D-Lactose erfolgte hingegen innerhalb von 10 Minuten in siedendem Essigsäureanhydrid (140°C). Während man bei der Reaktionsführung noch zwischen den Kategorien Aminozucker und reine Hydroxyzucker unterscheiden kann, so wird bei der Aufarbeitung deutlich, dass jeder Zucker einer individuellen Behandlung bedarf. GalNAc₅ (**6**) konnte sehr gut in Eiswasser ausgefällt werden. Dieses war für GlcNAc₅ (**14**) wegen seiner sehr guten Wasserlöslichkeit nicht möglich; hier musste zur Produktgewinnung auf Extraktion zurückgegriffen werden. Für Galactose, Glucose und Lactose konnte das Produkt durch die Ausfällung aus Eiswasser erhalten werden. So konnten peracetylierte D-Galactose (**2**) und D-Glucose (**13**) nach etwa einstündigem Rühren in Eiswasser als weißer Feststoff abfiltriert werden. Für die Gewinnung von LacAc₈ (**12**) musste das Wasser mehrmals ausgetauscht werden und 24 Stunden in Eiswasser gerührt werden, um den weißen Feststoff zu erhalten.

3.2 DIE SYNTHESE VON BIOTIN-DERIVATEN

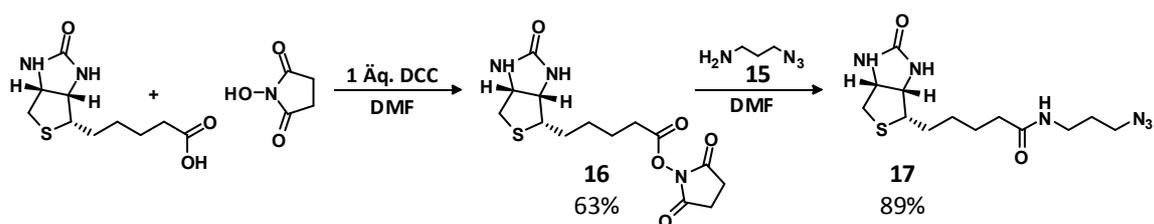
Unser Modell der Protein-Ligand-Wechselwirkung ist das Streptavidin-Biotin-System. Der Vorteil dieses Systems ist die extrem starke Wechselwirkung zwischen Ligand und Protein, die einer kovalenten Bindung sehr ähnelt.^[95] Die Validierung unserer Idee sollte also zumindest mit diesen beiden Molekülen positiv verlaufen.

Hierfür mussten fluoreszente Biotin-Derivate für die Lösungsexperimente sowie für die Experimente auf der Oberfläche hergestellt werden. Da in dieser Arbeit eine generelle Methode entwickelt werden sollte, sollten die verschiedenen Liganden möglichst spät und unter möglichst identischen Bedingungen eingeführt werden. Für die Einführung des Biotins in das lösliche sowie das Linkersystem wurde die CuAAC als angemessene Kupplungsmethode ausgewählt. Hierfür



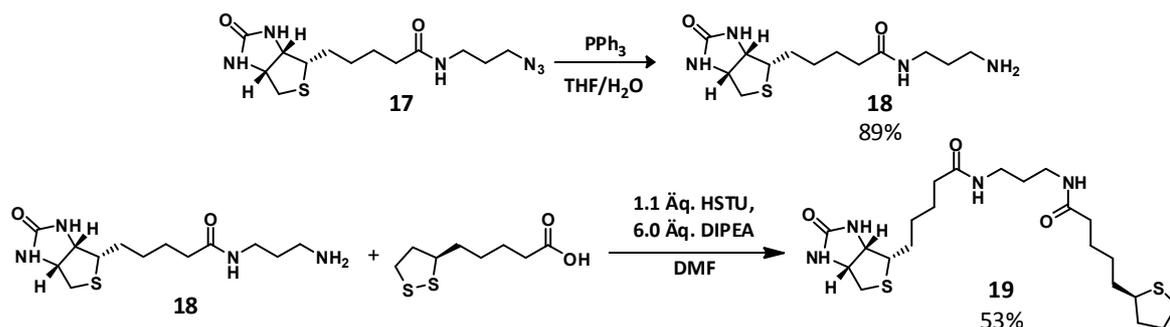
Schema 10: Die Synthese von 3-Azidopropylamin (**15**).

benötigten wir Biotin-Derivate, die über eine Azid-Funktionalität zur Einführung in Alkylsysteme durch CuAAC verfügten. Das Azid-Derivat wurde durch Amidkupplung von D-Biotin mit 3-Azidopropylamin (**15**) erhalten. 3-Azidopropylamin (**15**) wurde durch Umsetzung von 3-Bromopropan-1-aminhydrobromid mit Natriumazid in guten Ausbeuten von 87% erhalten (Schema 10). Die Amidkupplung erfolgte durch Herstellung des Biotin-NHS-Esters **16** und anschließender Umsetzung mit 3-Azidopropylamin (**15**), wie in Schema 11 dargestellt.



Schema 11: Die Synthese des Biotin-Azids **17**.

Die Ausbeute von **17** liegt mit 76% über zwei Schritte im moderaten Bereich. Bei der Charakterisierung des Produktes durch ¹³C NMR-Spektroskopie wurde für die drei C-Atome in Nachbarschaft zur Amidbindung jeweils ein Dublett gefunden, das durch Amidresonanz hervorgerufen wird. Diese fielen bei Messung unter höherer Temperatur jeweils zu einem Singulett zusammen. Eine Verbesserung der Ausbeuten könnte durch eine Vergrößerung des Ansatzes erreicht werden. Vor allem die schlechte Löslichkeit des Biotin-NHS-Esters **16** führte zu



Schema 12: Die Reduktion des Biotin-Azids (**17**) und die anschließende Kupplung mit Liponsäure.

geringen Ausbeuten im ersten Schritt der Synthese.

Das Biotin-Amin **18** wurde durch Staudinger-Reduktion des Biotin-Azids **17** hergestellt. In Schema 12 ist die Reduktion dargestellt, die mit guten Ausbeuten von 89% verlief. Die Aminfunktion soll ermöglichen, das Biotin auch über eine Amidkupplung an den symmetrischen CyKai zu binden. Eine Amidkupplung mit Liponsäure (TA) bietet die Möglichkeit das Biotin-Derivat **18** kovalent auf Goldoberflächen zu binden. Die anschließende Amidkupplung ist nur für das Liponsäure-Derivat **19** gezeigt, wo sie unter nicht optimierten Bedingungen mit moderaten Ausbeuten von 53% verlief. Die Amidkupplung mit dem symmetrischen CyKai erfolgte mit einer Ausbeute von 33% und wird im nachfolgenden Abschnitt 3.3 näher erläutert.

3.3 DIE SYNTHESE UND DERIVATISIERUNG VON CYANINFARBSTOFFEN

Zur Markierung der verschiedenen Liganden wurde ein wasserlöslicher Cyanin-Fluoreszenzfarbstoff verwendet. Bei dieser Farbstoffklasse handelt es sich um konjugierte Polyene, die über

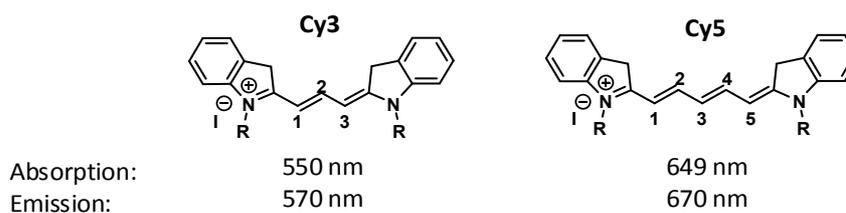


Abbildung 24: Das Grundgerüst zweier Indocarbocyanine Cy3 und Cy5.^[102]

eine ungerade Anzahl von Methingruppen einen Elektronen-Akzeptor (eine quartäre Ammoniumgruppe) mit einem Elektronen-Donor (eine tertiäre Aminogruppe) verbinden.^[103] Die hier verwendeten Cyanine sind kationische, geschlossenkettige Polymethine, deren Donor- und Akzeptor-Teil eines Heteroaromaten sind. Der Name leitet sich von ihrer Farbe, dem Cyan (für Cy5) ab, jedoch lässt sich die Wellenlänge des Adsorptionsmaximums linear mit der Anzahl N der Elektronen des π -Systems zu anderen Farben durchstimmen (Abbildung 24). Mit wachsender

Anzahl der Polymethin-Gruppen absorbiert der Farbstoff zunehmend im längerwelligen Bereich.^[104] Der in dieser Arbeit genutzte Cy5-Farbstoff wurde als freie Carbonsäure von der

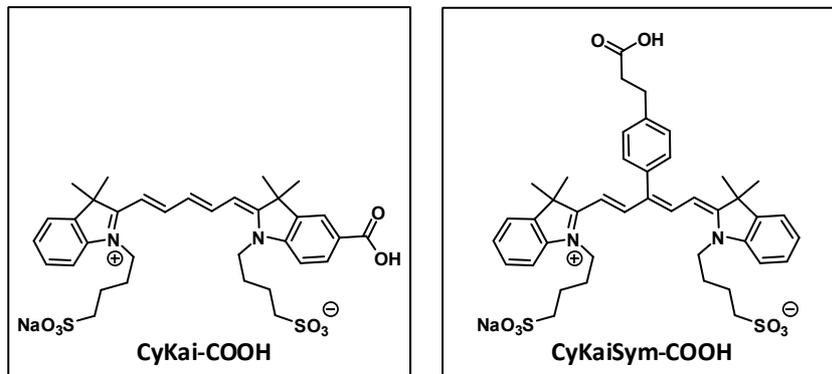
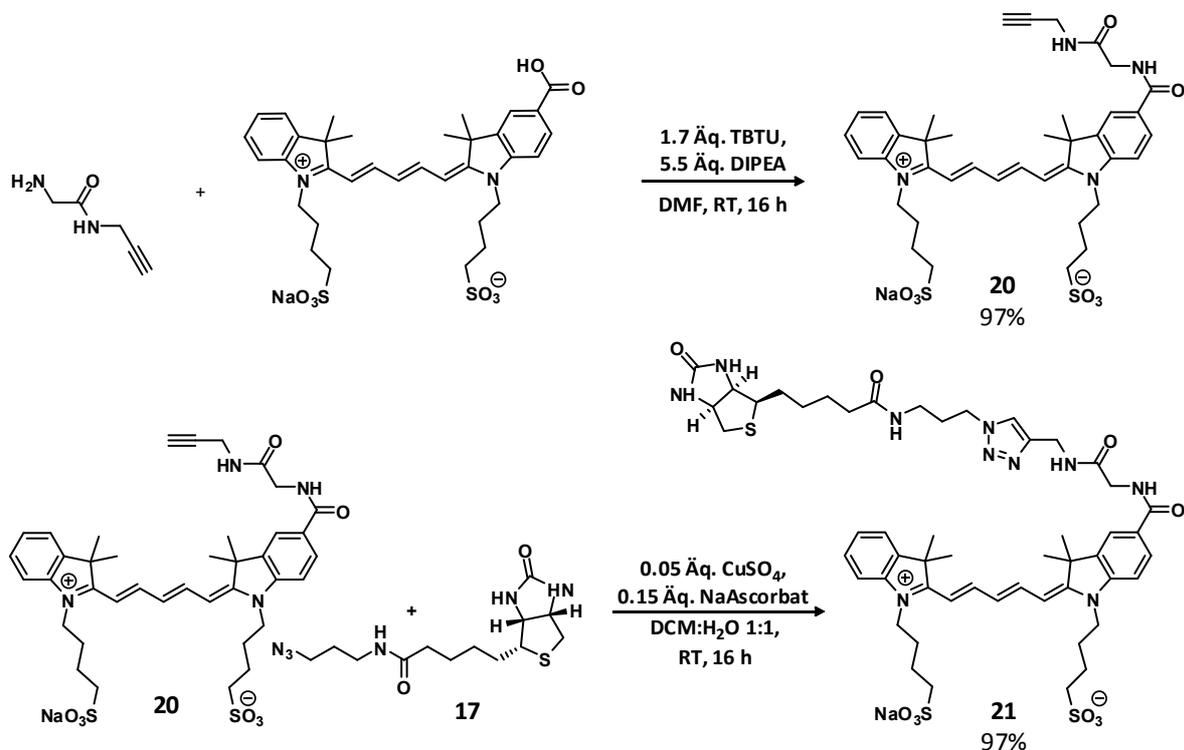


Abbildung 25: Der Grundkörper des symmetrischen und des unsymmetrischen Cyanin-Farbstoffs.

mivenion GmbH^[105] erhalten. Anfänglich wurde von dem in Abbildung 25 links dargestellten, nicht symmetrischen Farbstoff CyKai-COOH Derivate dargestellt.^[106] Da während der Synthese der symmetrischen Variante jedoch weniger Nebenprodukte entstehen und die Aufreinigung des Produktes um ein Vielfaches einfacher war, wurde parallel zu dieser Arbeit der symmetrische

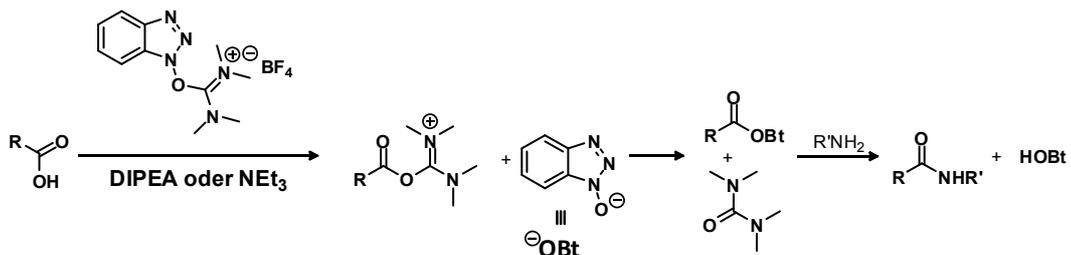


Schema 13: Die Synthese von CyKai-G-Linker-Biotin (**21**).

Farbstoff CyKaiSym-COOH von mivenion entwickelt und letztlich zur Markierung der Liganden verwendet.

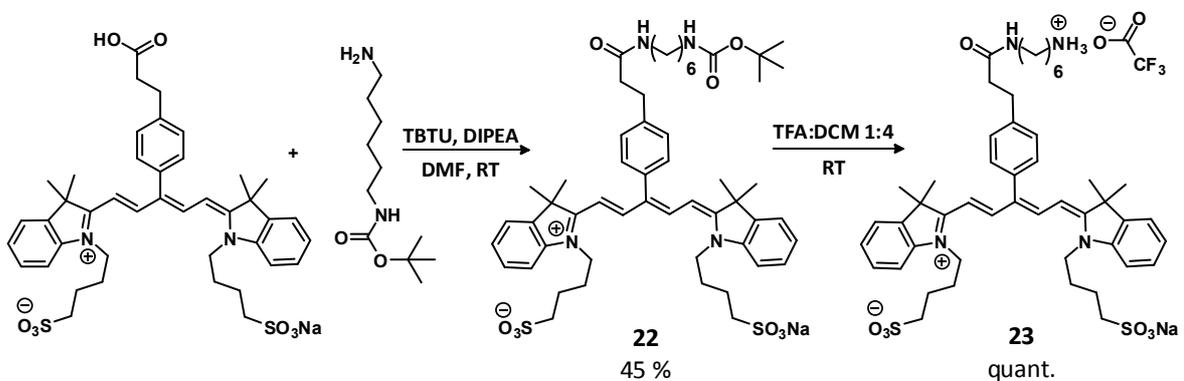
Für die ersten FRET-Experimente wurde mit dem unsymmetrischen CyKai-COOH gearbeitet. Um Biotin als Liganden einzuführen, wurde mit einer durch *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumtetrafluorborat (TBTU) vermittelten Eintopf-Amidkupplung das Propargyl-Glycinderivat eingeführt und CyKai-G-Linker-Alkin **20** in sehr guten Ausbeuten erhalten. Daraufhin konnte Biotin-Azid (**17**) durch CuAAC eingeführt werden. Die Synthese des löslichen CyKai-G-Linker-Biotins (**21**) erfolgte mit einer sehr guten Gesamtausbeute von 94% über zwei Schritte.

Die Verwendung von TBTU als Kupplungsreagenz wurde 1989 von Knorr *et al.*^[107] eingeführt und hat den Vorteil, dass die Kupplungsreaktion in einem Topf durchgeführt werden kann. In Schema 14 ist der Mechanismus dargestellt. Selbstverständlich kann bereits die Uronium-Verbindung mit dem Amin zum Amid reagieren und es muss nicht erst der Aktivester gebildet werden.^[108]



Schema 14: Der Mechanismus der Eintopf-Amidkupplung mit Hilfe von TBTU.^[108]

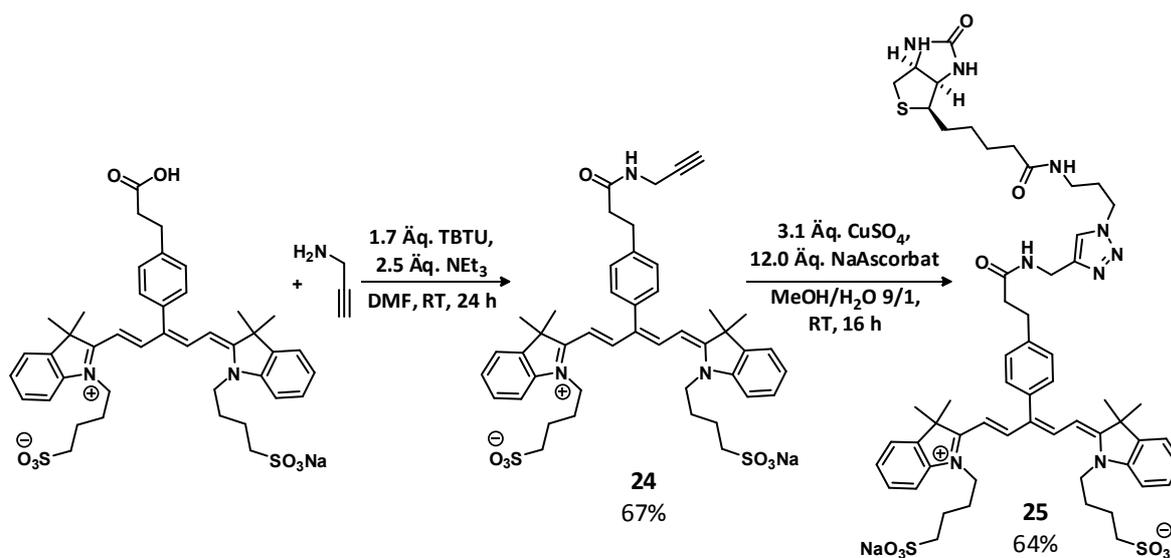
Dieses Kupplungsreagenz wurde in der vorliegenden Arbeit fast ausschließlich verwendet und lieferte gerade bei den Kupplungsreaktionen mit den Farbstoffen oft sehr gute, aber immer moderate Ausbeuten.



Schema 15: Die Synthese von CyKaiSym-Hex-NH₃⁺-TFA-Salz (**23**).

Mittels Amidkupplungsreaktionen wurden verschiedene Farbstoffderivate von CyKaiSym-COOH hergestellt. Um die Optimierung zur Beschichtung der Glasoberflächen durchzuführen, synthetisierten wir ein einfaches Derivat, das eine freie Aminogruppe zur Kupplung auf präfunktionalisierten Epoxid- oder Carboxy-Glasoberflächen enthalten sollte. Diese erhielten wir durch die von TBTU vermittelte Amidkupplung mit einer einseitig Boc-geschützten Diaminohexylverbindung (Schema 15). Das Carbamat der *tert*-Butyl-Schutzgruppe wurde nach der erfolgreichen Amidkupplung mit TFA abgespalten und als TFA-Ammoniumverbindung gelagert und verwendet. Das CyKaiSym-Hex-NH₃⁺-TFA-Salz (**23**) wurden über zwei Schritte in einer moderaten Ausbeute von 45% erhalten.

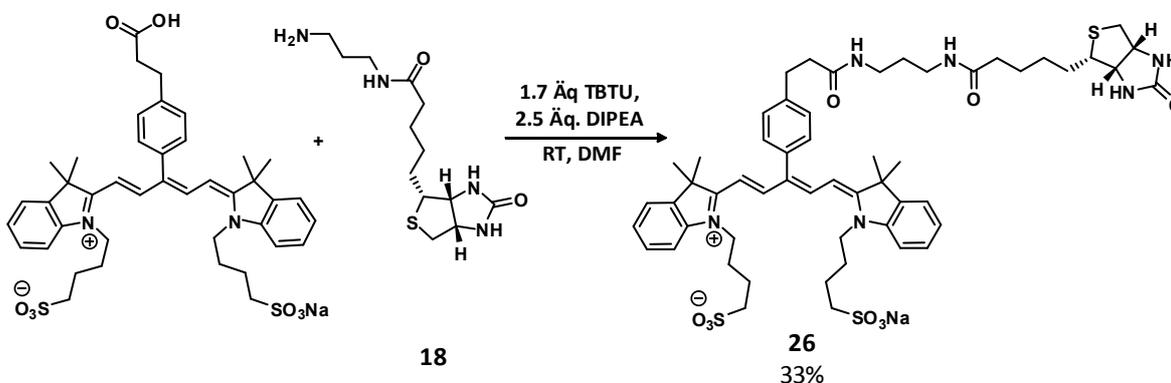
Auch die Synthesen der CyKaiSym-Derivate für die Wechselwirkungsstudien in Lösung sowie für die Oberflächen, wurden unter diesen Amidkupplungsbedingungen durchgeführt. Erst wurde ein Alkinlinker durch Amidkupplung eingeführt und dann der jeweilige Ligand über die kupferkatalysierte Alkin-Azid-Cycloaddition (CuAAC) gekuppelt. Für die Experimente in Lösung wurde keine weitere Funktionalität neben dem Alkin benötigt und so wurde CyKaiSym-COOH mit Propargylamin umgesetzt. Auch hier erbrachte die Verwendung von TBTU eine gute Ausbeute von 67% des CyKaiSym-Alkins (**24**). Die Verwendung der CuAAC stellte sich in Zusammenhang mit dem Farbstoff als problematisch heraus. Viele Optimierungen waren notwendig, bis auch hier zufriedenstellende Ausbeuten erhalten werden konnten. Die Äquivalente des verwendeten Kupfersulfates mussten von den üblichen katalytischen Mengen im Bereich von 10-30 mol%,^[109] auf über drei Äquivalente pro Farbstoffmolekül erhöht werden, was selbstverständlich auch zu



Schema 16: Die Synthese des CyKaiSym-Biotins (**25**) für die FRET-Experimente in Lösung.

einer Erhöhung der Menge an Natriumascorbat führte. Durch die schlechte Löslichkeit des Produktes sowie vermutlich auch des Kupfersalzes des Eduktes, musste auf einen möglichst geringen Volumenanteil Wasser im Lösungsmittelgemisch geachtet werden. Das Arbeiten unter sauerstofffreien Bedingungen sowie die primäre Bildung des aktiven Kupferkomplexes in reinem Wasser und nachträgliche Zugabe der methanolischen Farbstofflösung führte zur Produktbildung. In Schema 16 sind die optimierten Bedingungen für die CuAAC-Reaktionen mit dem CyKaiSym-Farbstoff dargestellt, die im nachfolgenden immer verwendet wurden. Die Problematik der Bildung des schwarzblauen schwerlöslichen Kupferkomplexes wurde durch langes intensives Rühren mit gesättigter Natriumchloridlösung und Chloroform (+5% Methanol) direkt nach der Reaktion zufriedenstellend gelöst. Auch das anschließende Ausschütteln erfolgte mit denselben Lösungsmitteln. Die Reaktionszeiten sollten einen Tag nicht überschreiten. Das fluoreszente wasserlösliche Biotin-Derivat CyKaiSym-Biotin (**25**) wurde unter diesen Bedingungen in einer moderaten Ausbeute von 43% über zwei Schritte erhalten.

Aufgrund der Problematik mit der CuAAC-Kupplung, wurde das fluoreszente Biotin-Derivat **26** für die Experimente in Lösung auch über eine Amidkupplungsreaktion mit der freien Säure von CyKaiSym-COOH und Biotin-Amin (**18**) in Ausbeuten von 33% hergestellt (Schema 17).



Schema 17: Die Synthese der alternativen CyKaiSym-Biotin Verbindung **26**.

Der Grund für die schlechten Ausbeuten war vor allem die geringe Löslichkeit des Produktes **26**, die das Auftragen des Rohproduktes auf das Säulenmaterial erheblich. Dies wurde für diese Reaktion jedoch nicht weiter optimiert.

Für die Untersuchungen an der Oberfläche musste der verwendete Linker neben dem Alkin für die Kupplung mit dem Liganden noch eine weitere Funktionalität aufweisen, um das fluoreszente Ligandensystem kovalent an eine präfunktionalisierte Oberfläche zu binden. Hierfür wurde die Aminosäure D-Lysin verwendet. Diese Aminosäure verfügt über drei funktionelle Gruppen und ist mit den unterschiedlichsten orthogonalen Schutzgruppen kommerziell erhältlich (Abbildung 26).

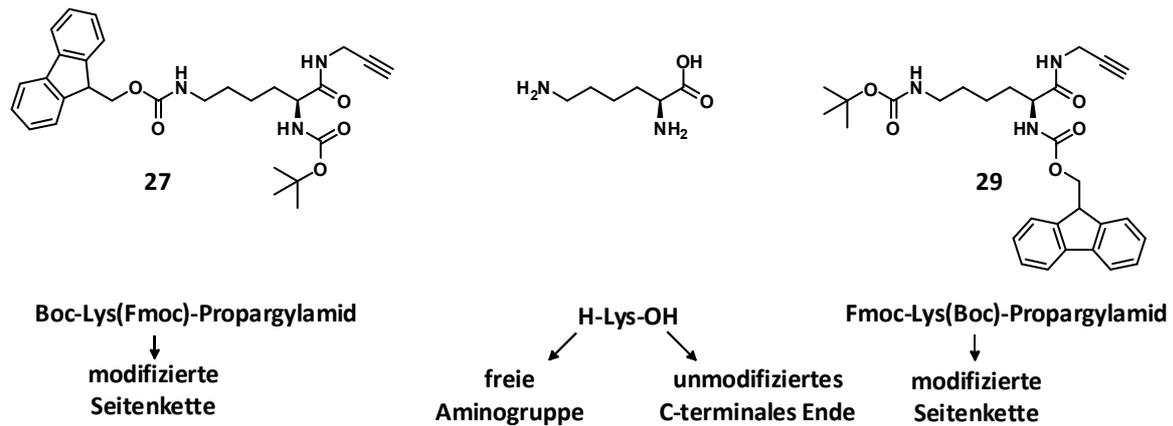
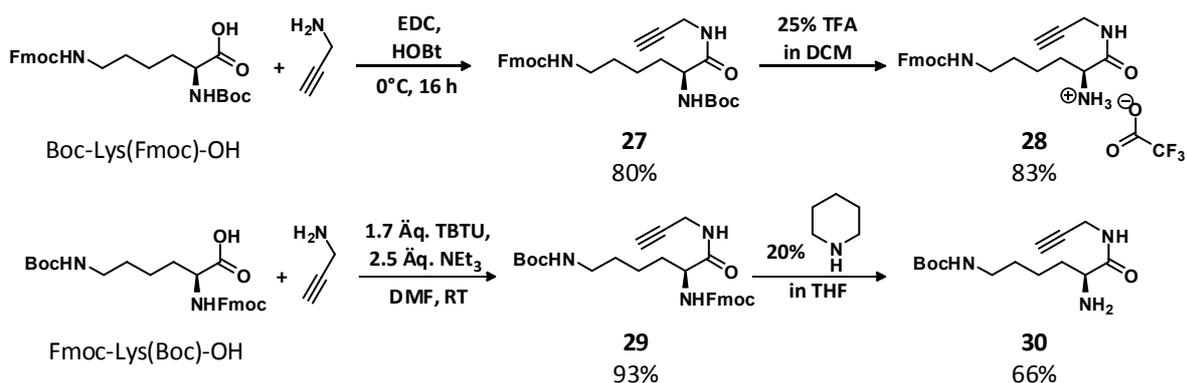


Abbildung 26: D-Lysin als Linkergrundstruktur und Peptidnomenklatur.^[110]

Um die beiden in Abbildung 26 dargestellten Varianten zu synthetisieren, wurden die jeweiligen freien Carbonsäuren der geschützten D-Lysin-Derivate mit Propargylamin umgesetzt. Die Synthese von zwei verschiedenen Linkern wurde nötig, da beide Schutzgruppen im weiteren Verlauf der Synthese Schwierigkeiten bereiteten, auf die an entsprechender Stelle eingegangen wird. Die



Schema 18: Die Synthese beider Varianten der Oberflächenlinker.

erste Variante (Schema 18, erste Zeile) des Linkers wurde aus Boc-Lys(Fmoc)-Propargylamid (**27**) erhalten, das von Tim Gebauer zur Verfügung gestellt wurde. Durch die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe am α -Amin des D-Lysins mit TFA konnte $\text{CF}_3\text{COO}^-\text{H}_3\text{N}^+$ -Lys(Fmoc)-Propargylamid

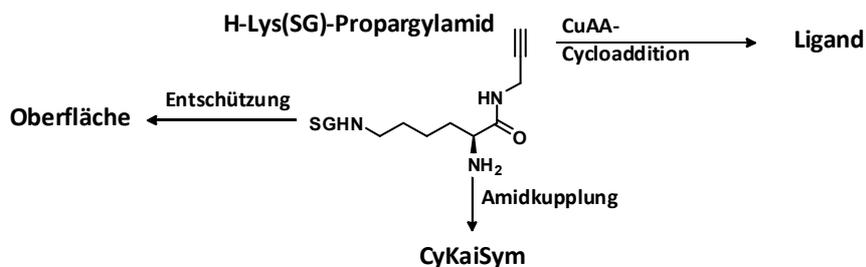
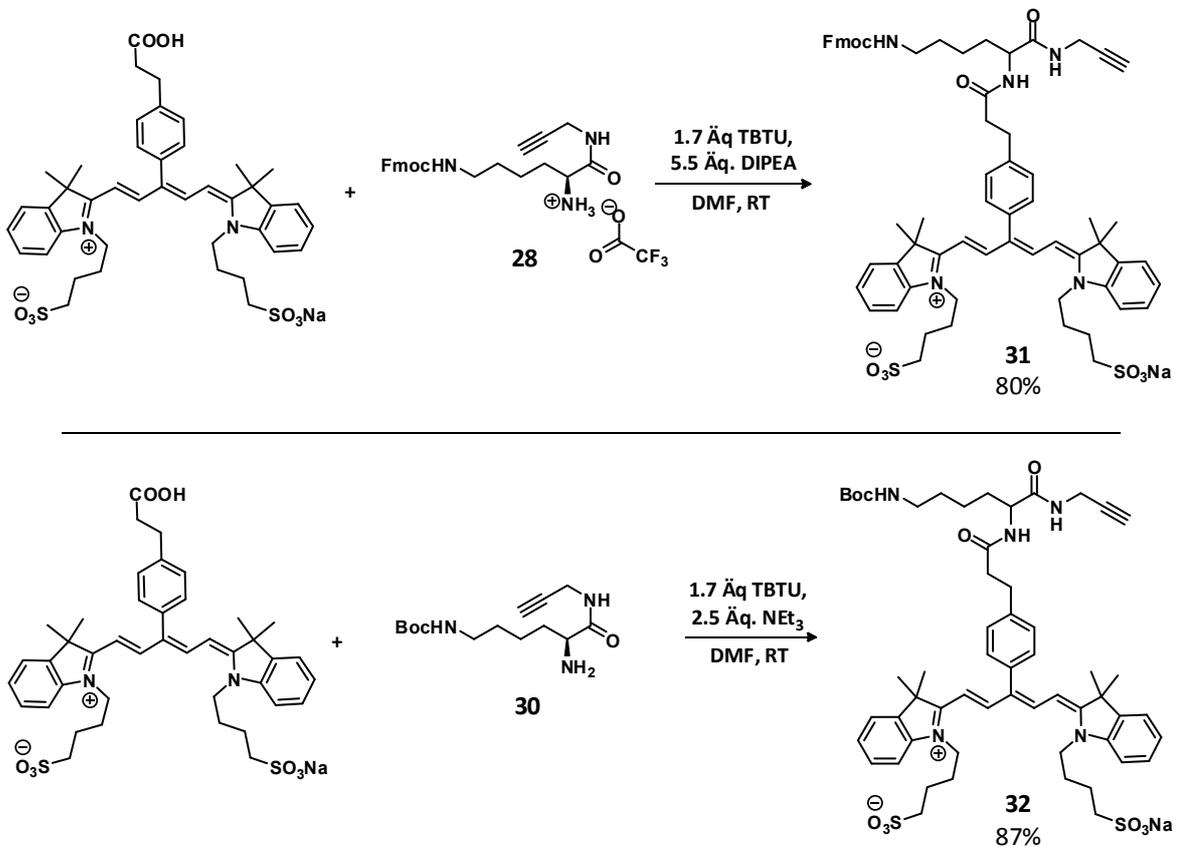


Abbildung 27: Die schematische Darstellung des Linkerdesigns.

(**28**) in guten Ausbeuten von 83% erhalten werden. Als freies Amin H-Lys(Fmoc)-Propargylamid war es nicht löslich und nicht isolierbar, woraufhin davon abgesehen wurde, das Produkt in das freie Amin zu überführen. Für die zweite Linkervariante (Schema 18, zweite Zeile) wurde Fmoc-Lys(Boc)-OH mit Propargylamin unter TBTU-Kupplungsbedingungen umgesetzt und Fmoc-Lys(Boc)-Propargylamid (**29**) in sehr guten Ausbeuten von 93% erhalten. Zur Fmoc-Entschützung des α -Amins wurde das Standardprotokoll von 20% Piperidin in THF angewandt und führte zu moderaten Ausbeuten des gewünschten Produktes **30** von 66%. Diese reduzierte Ausbeute ist zum einen auf den nicht vollständigen Umsatz des Edukts und zum anderen auf das freie Amin zurückzuführen, da bei der Aufreinigung des Produktes auf Kieselgel ein Teil des Produktes durch Wechselwirkungen mit dem sauren SiO_2 adsorbiert wurde. Die Gesamtausbeute über zwei Schritte lag jedoch für beide Linkersysteme in einem guten Bereich von 80-82%.

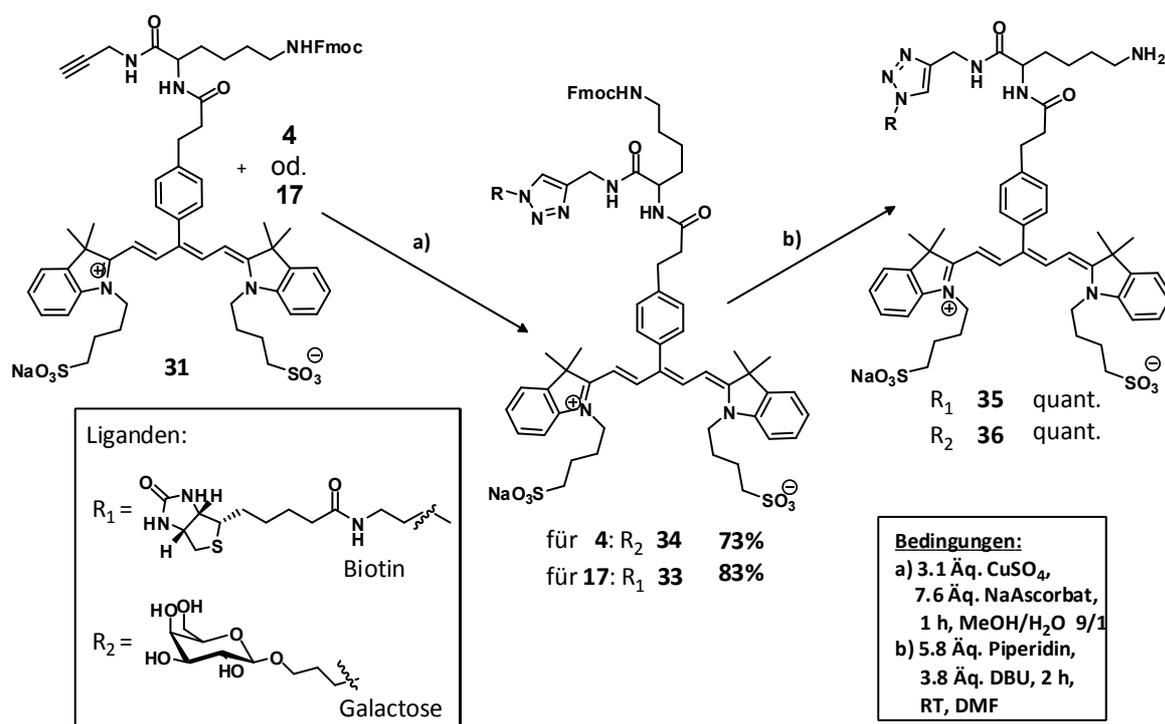
Unsere Linkersysteme verfügen nun über eine freie α -Aminogruppe, die zur Kupplung mit der Carboxylgruppe des CyKaiSym-COOH zur Verfügung steht und einer weiterhin geschützten ϵ -Aminogruppe, die nach der Kupplung an den Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt werden kann, um für die Kupplung an die Oberfläche genutzt zu werden (Abbildung 27).



Schema 19: Die Synthese der beiden fluoreszenten Linker **31** und **32**.

Die Kupplung der freien Aminogruppe des Linkersystems erfolgte unter den zuvor bereits erläuterten Bedingungen mit TBTU als Kupplungsreagenz (Schema 19) und lieferten als Kupplungsprodukt die Fmoc- und Boc-geschützten fluoreszenten Linker mit Ausbeuten von bis zu 87%. Die Synthesen der beiden fluoreszenten Linkersysteme unterschieden sich in der Art der verwendeten Base und der Basenmenge. Dies ist darauf zurückzuführen, dass in Fall des Fmoc-geschützten Linkers **28** das Edukt als TFA-Salz vorliegt und somit das Amin erst freigesetzt werden muss. Daher ist eine größere Menge notwendig und um das Risiko der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe zu minimieren, wurde die weniger nucleophile Base DIPEA verwendet.

Die Modellsystemliganden Biotin sowie D-Galactose wurden durch Cycloaddition ihrer Azid-funktionalitäten mit dem Alkin des fluoreszenten Linkers eingeführt. Da wir mit dem Boc-geschützten Linkersystem **32** unter den Bedingungen der CuAAC-Kupplung nur Produktgemische erhielten, wurde das Fmoc-geschützte System **30** verwendet. Die Umsetzung des Fmoc-geschützten fluoreszenten Linkersystems **30** erfolgte unter den zuvor optimierten Bedingungen der CuAAC-Kupplung. Bei der Umsetzung mit dem Biotin-Azid (**17**) wurde das Reaktionsgemisch



Schema 20: Die Synthese der fluoreszenten Ligand-Linkersysteme.

zusätzlich noch für drei Stunden auf 70°C erwärmt, da nach der regulären Reaktionszeit von 16 Stunden kein Umsatz zu erkennen war. Die Ausbeuten bewegten sich bei dieser Reaktion im moderaten Bereich von 73% für das fluoreszente Biotin-Linkersystem **33** und 83% für das

fluoreszente Galactose-Linkersystem **34**. Nach der CuAAC-Reaktion mit dem jeweiligen Liganden erfolgte für beide Systeme die quantitative Entschützung der Fmoc-Schutzgruppe unter Nutzung eines Gemisches aus Piperidin und DBU nach Augustyns *et al.*^[111] Eine Entschützung unter Standardbedingungen hatte nicht zum Erfolg geführt.

Die Synthese des fluoreszenten Biotin-Linkersystems **35** erfolgte mit einer Gesamtausbeute von 84% über drei Schritte, die des fluoreszenten Galactose-Linkersystems **36** betrug 88%.

3.4 DIE SYNTHESE VON FUNKTIONALISIERTEN POLYGLYCEROLMOLEKÜLEN

Da die Experimente mit den Glasoberflächen zeigten (siehe Kapitel 3.6.2), dass die fluoreszent markierten Proteine auch zu einem gewissen Maße mit unfunctionalisierten Oberflächen wechselwirken, wurde die Verwendung von hochverzweigtem Polyglycerol (hPG) zur Unterdrückung unerwünschter Wechselwirkungen in Betracht gezogen. Für hPG-beschichtete Oberflächen konnten ausgezeichnete Proteinresistenzen gezeigt werden.^[96] Des Weiteren verfügt es über viele freie Hydroxylgruppen, die zur weiteren Funktionalisierung genutzt werden können.

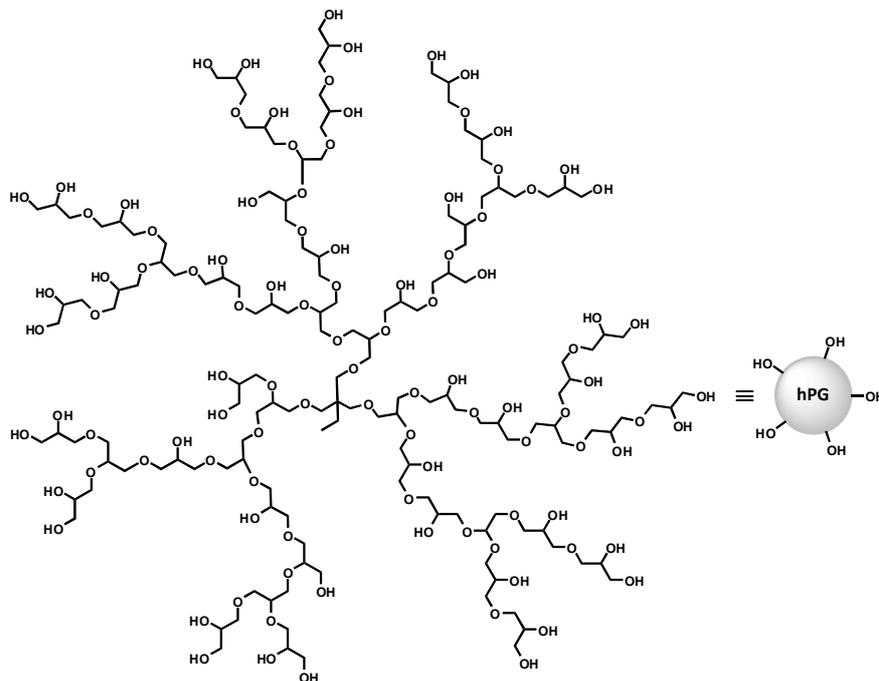


Abbildung 28: Hochverzweigtes Polyglycerol — hPG_{4,000} (hier M_n ≈ 4 kDa).

Bei dem in Abbildung 28 dargestellten hPG handelt es sich um ein hochverzweigtes flexibles Polyetherpolymer, das in einer Einstufenreaktion synthetisiert werden kann.^[112] Um die Eignung von hPG als Gerüstarchitektur zur Präsentation unserer Liganden auf der Oberfläche zu evaluieren, mussten verschiedenste Derivate hergestellt werden (siehe Abbildung 29). Für die

Untersuchungen sollten sie auf Glas und Gold kovalent gebunden werden. Für die von uns verwendeten präfunktionalisierten Epoxy-, Amin- und Carboxy-Glasoberflächen wurde hPG benötigt, das über mindestens eine Carboxy- bzw. Amin-Funktion verfügt. Für die Bindung auf

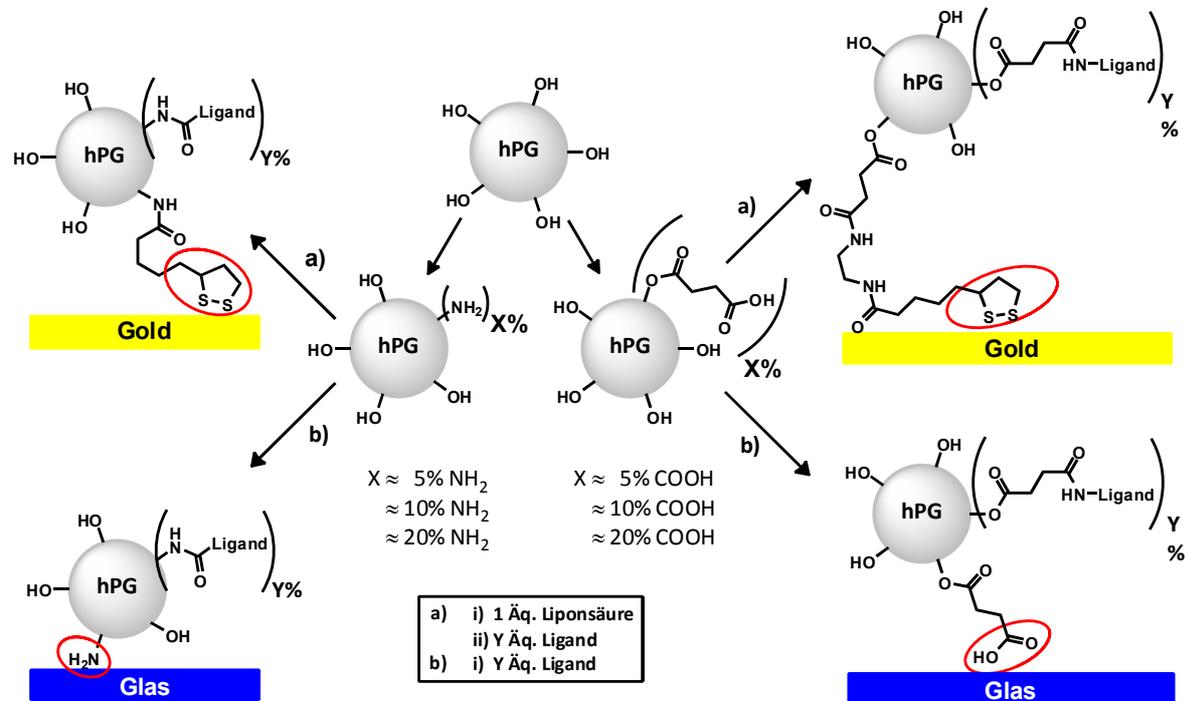
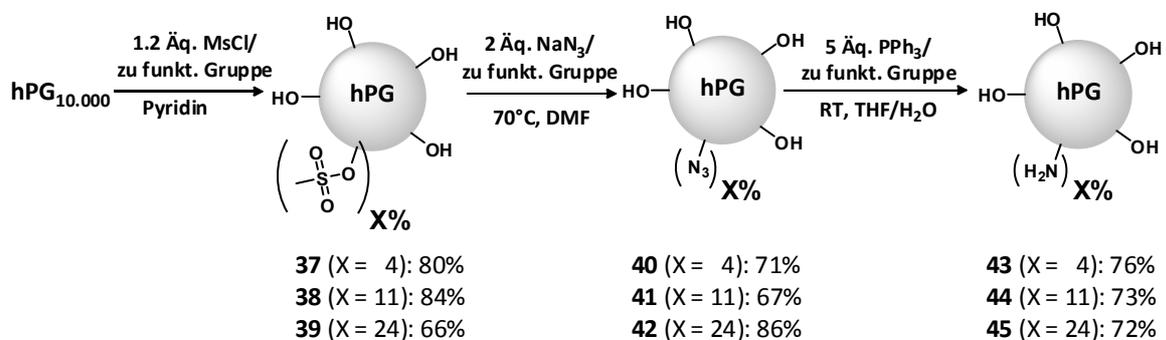


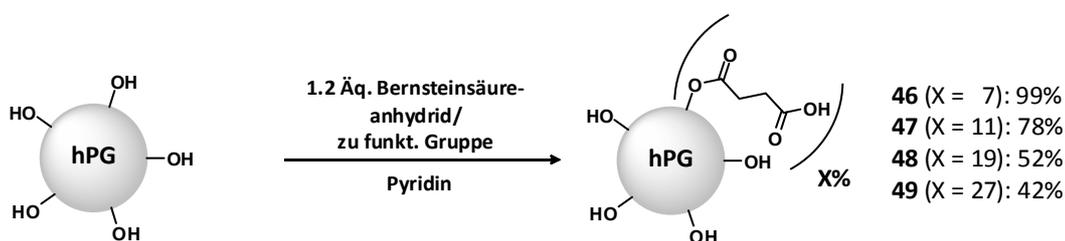
Abbildung 29: Schematische Darstellung der benötigten hPG-Derivate.

Gold mussten wir hPG mit Liponsäure funktionalisieren. Neben der Bindung zur Oberfläche musste das hPG zusätzliche Funktionalitäten aufweisen, um auch die zu untersuchenden Liganden an das Molekül zu binden. Hierfür wurden Funktionalisierungsgrade von 5%, 10% und 20% angestrebt. Als Funktionalisierungsmethode wurde auch hier die Amidkupplung gewählt und somit sollten Amin- und Carboxy-funktionalisierte hPGs hergestellt werden. Die Synthese von hPG-Aminen und -Carboxylaten ist literaturbekannt.^[113]



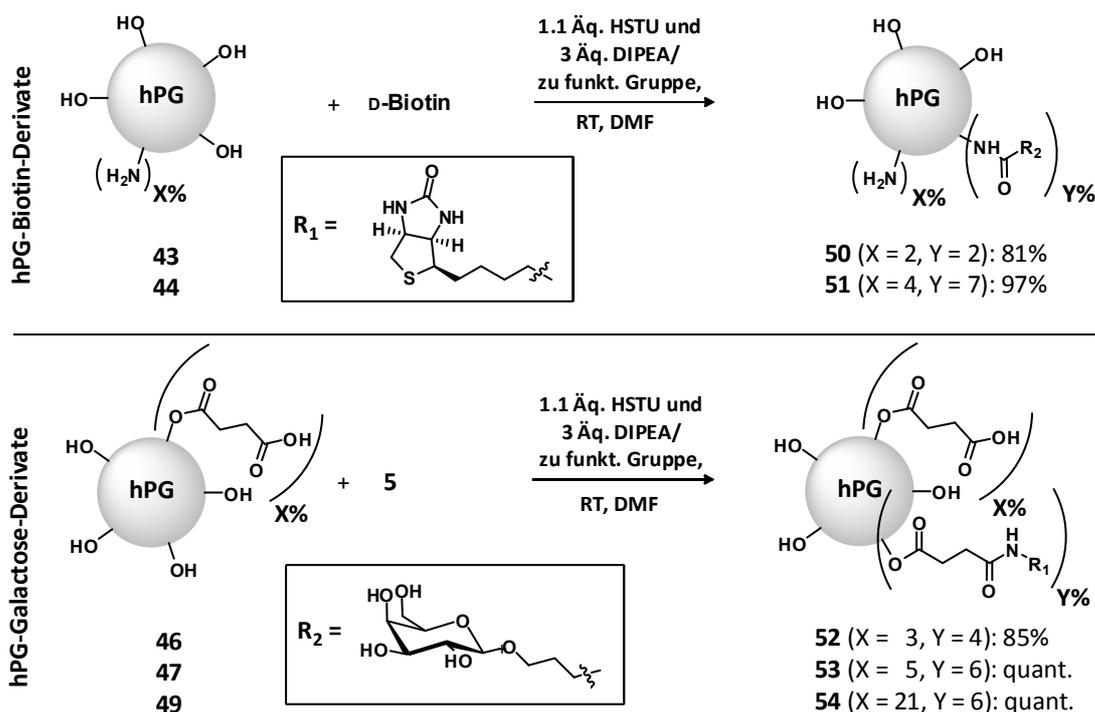
Schema 21: Die Synthese von hPG-Amin.

Die Synthese der hPG-Amine erfolgte über eine dreistufige Methode (Schema 21). Zuerst wurde das hPG-Mesylat in drei unterschiedlichen Funktionalisierungsgraden hergestellt (**37-39**). Dabei konnten laut ^1H NMR Funktionalisierungsgrade von 4% (**37**), 11% (**38**) und 24% (**39**) erhalten werden. Diese Verbindungen wurden dann zum Azid (**40-42**) umgesetzt. Der vollständige Mesylatumsatz wurde mittels ^1H NMR-Kontrolle sichergestellt. Die Reduktion des hPG-Azids (**40-42**) erfolgte unter Staudinger-Bedingungen mit fünf Äquivalenten Triphenylphosphin für jede potentiell zu reduzierende Gruppe. Auch hier wurde der vollständige Umsatz der Azidgruppen sichergestellt (IR-Kontrolle). Die Produkte konnten auf allen Stufen in moderaten Ausbeuten erhalten werden. Das hPG-Amin (**43-45**) wurde in der Kälte sowie in Stammlösung gelagert, um einer Polymerisation des Produktes entgegenzuwirken.



Schema 22: Die Synthese von hPG-Carboxylat.

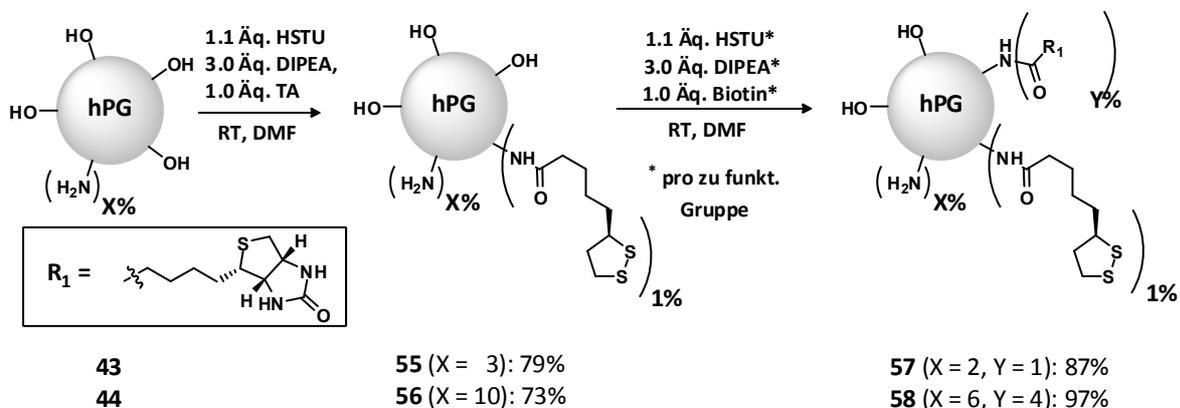
Die Herstellung der hPG-Carboxylate **46-49** erfolgte in einer Stufe durch Umsetzung des hPG mit Bernsteinsäureanhydrid in Pyridin (Schema 22). Für niedrige Funktionalisierungsgrade wurden sehr gute Ausbeuten erhalten (99% für **46**). Bei einem Austausch von mehr als 10% der Hydroxylgruppen durch einen steigenden Prozentsatz Carbonsäuren beobachteten wir eine rapide Verschlechterung der Ausbeuten (**47-49**). Dies ist zum Teil der veränderten Löslichkeit der höher beladenen hPG-Carboxylate, aber auch einer selbstkatalysierten Polymerisation des Produktes zuzuschreiben. Da wir bei den präfunktionalisierten Glasoberflächen unterschiedliche reaktive Gruppen zur Auswahl haben, ist für die Experimente auf Glas kein weiterer Linker notwendig, um das hPG-Derivat zu binden. Hierfür genügt es, circa 1% der Amin- oder Carboxygruppen bei der Kupplung der Liganden frei zulassen. Diese können dann zur Amidkupplung oder Epoxidöffnung verwendet werden. Somit ist die Synthese der hPG-Ligand-Derivate in einem Schritt möglich (Schema 23). Die Amidkupplung der hPG-Biotin-Derivate konnte nur für die Amin-Funktionalisierungen von 4% für **50** und 11% für **51** erfolgen. Sie wurden mit 2-Succinimido-1, 1, 3, 3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HSTU) in einer Eintopfreaktion in guten bis sehr guten Ausbeuten ausgeführt. Das Kupplungsprodukt des $\text{PG}_{10.000}(\text{NH}_2)_{24\%}$ fiel schon während der Synthese aus und war nicht mehr löslich. Bei der Synthese



Schema 23: Die Synthese der hPG-Ligandsysteme für die Glasoberflächen.

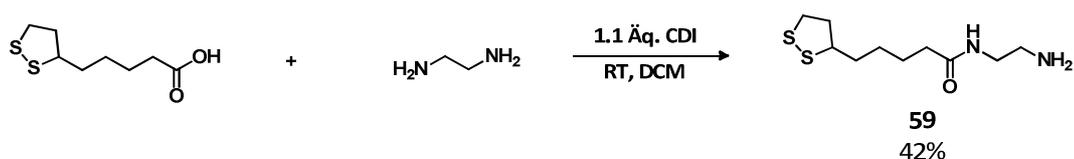
der hPG-Galactose-Verbindungen (**52-54**) konnte die Amidbildung mit HSTU durchgehend mit sehr guten Ausbeuten durchgeführt werden. In allen Fällen lag jedoch die erzielte Funktionalität der hPG-Ligand-Derivate unter dem angestrebten Funktionalisierungsgrad, was auch zu einem höheren prozentualen Anteil von freien Amin- bzw. Carboxylgruppen führte. Die genauen Ausbeuten und Funktionalisierungsgrade der Amidkupplungsreaktionen sind in Schema 23 ausführlich dargestellt.

Für die Kupplung auf Goldoberflächen musste ein Liponsäure(TA) als Linker eingeführt werden.



Schema 24: Die Synthese der hPG-Biotin-Derivate für die Goldoberflächen.

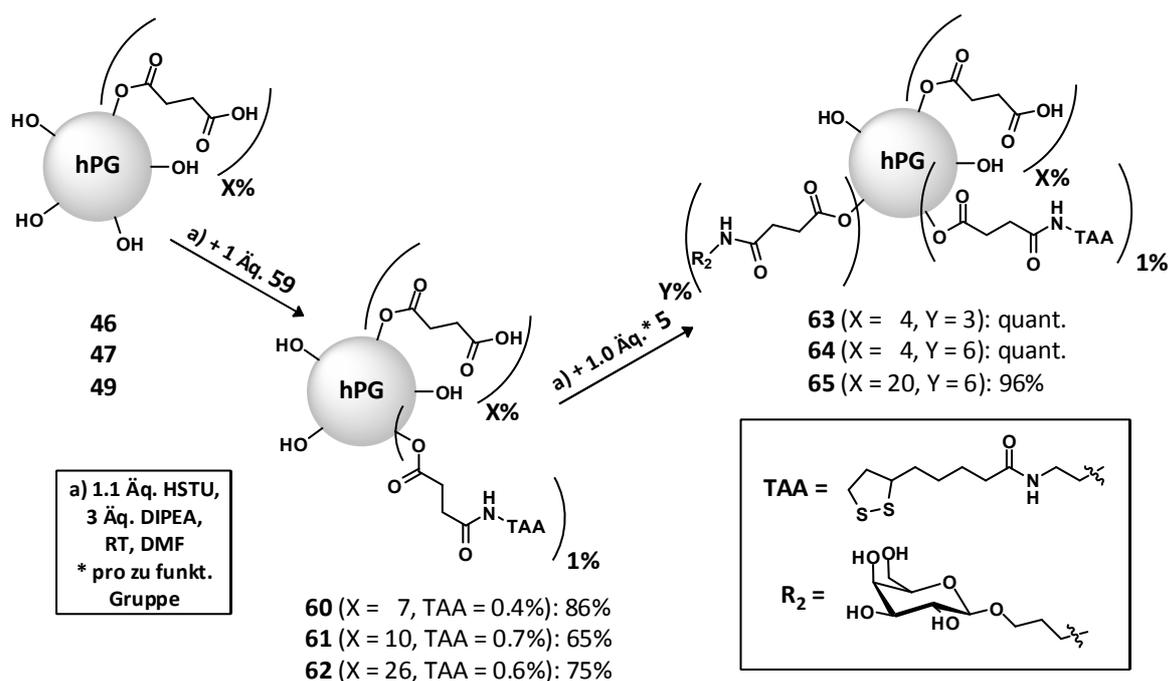
Diese verfügt über ein Disulfid und ist so zur Bindung an Gold geeignet. Die Synthese der hPG-Ligand-Derivate für die Goldoberflächen erfolgte über eine zweistufige Synthese (Schema 24). Die Amidkupplung im ersten Schritt wurde mit Hilfe von HSTU durchgeführt. Der NHS-Ester der Liponsäure wurde *in situ* gebildet und zum hPG-Amin-Derivat (**43** bzw. **44**) gegeben. Für beide hPG-Amin-Derivate wurde der angestrebte Funktionalisierungsgrad von etwa 1% in moderaten Ausbeuten erzielt. Nach Einführung des Disulfidlinkers durfte aufgrund der Polymerisierungsgefahr der Liponsäure das Produkt keinesfalls mehr über 50°C erwärmt werden.^[114] Im nächsten Schritt wurden dieselben Kupplungsbedingungen verwendet, wobei hier der NHS-Ester aus vier bzw. elf Äquivalenten des Biotins gebildet und zum entsprechenden hPG-Derivat (**55** bzw. **56**) gegeben wurde. Für beide Reaktionen konnten sehr gute Ausbeuten erzielt werden, jedoch wurde auch hier der angestrebte Funktionalisierungsgrad nicht erreicht. Die beiden schaumartigen Produkte wiesen somit noch freie Amine von etwa 2% für **57** bzw. 6 % für **58** auf (siehe Schema 24). Auch in das hPG-Carboxylat-Derivat musste für die Bindung an die Goldoberfläche



Schema 25: Die Synthese von Liponsäureamid TAA.

eingeführt werden. Da die Einführung über eine Veresterung mit den freien Hydroxylgruppen des hPG-Carboxylats nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte, musste die Aminogruppe in die Liponsäure eingeführt werden. Dies wurde durch eine Amidkupplung der Liponsäure mit Ethylendiamin erreicht (Schema 25). Die Reaktion bedurfte einiger Optimierung. Das Produkt **59** konnte durch sehr langsame Zugabe eines Überschusses Ethylendiamin in DCM zu der mit 1,1-Carbonyldiimidazol (CDI) aktivierten Liponsäure erhalten werden. Das Liponsäureamid (TAA **59**) durfte nie zur Trockne eingeengt oder auf Temperaturen größer als 50°C erwärmt werden. Es wurde nur in Stammlösung aufbewahrt und auch als Stammlösung zu den folgenden Reaktionen zugegeben.

Auch für die hPG-Galactose-TAA-Derivate war eine zweistufige Synthese für das System für die Goldoberfläche nötig (Schema 26). Die Kupplung mit dem Liponsäureamid (**59**) konnte nicht für jedes hPG-Molekül erzielt werden, sondern es wurden nur Funktionalisierungsgrade von 0.4-0.7% in moderaten Ausbeuten für **60-62** erreicht. Dies war nicht störend, da nach der Kupplung die



Schema 26: Die Synthese der hPG-Carboxylat-Derivate für die Goldoberflächen.

ungebundenen Moleküle vom Gold gewaschen werden. Die nachfolgende Amidkupplung mit Gal-Aminopropanol **5** konnte in sehr guten Ausbeuten, aber mit schlechten Funktionalisierungsgraden durchgeführt werden (Schema 26). Zu beachten hierbei ist das Derivat mit der höchsten angestrebten Funktionalisierung an Galactose **65**. Mittels ^1H NMR konnte eindeutig nur eine Funktionalisierung von 6% Galactose nachgewiesen werden. Aufgrund einer jedoch komplett anderen Löslichkeit des hergestellten Produkts sowie einer deutlichen Veränderung der Struktur des Bereiches des PG-Gerüstsignals im ^1H Spektrum, ist davon auszugehen dass die Funktionalisierung deutlich die 6% übersteigt. Die angestrebten 24% wurden sicherlich nicht erreicht und somit gehen wir im Folgenden (vorallem im Kapitel 3.7.2) von einer Funktionalisierung von etwa 15% aus. Die anschließenden SPR-Experimente in Abschnitt 3.7.2

Zusammenfassend wurden somit alle benötigten Derivate synthetisiert. Problematisch waren hohe Funktionalisierungen für die hPG-Biotin-Derivate aufgrund der geringen Löslichkeit. Generell lagen die Ausbeuten der Reaktionen alle im moderaten Bereich, jedoch war die Erreichung der gewünschten Funktionalisierungsgrade für größere Moleküle wie Biotin oder Gal-Aminopropanol nicht möglich. Die höchste gewünschte Ligandenkonzentration von 20% auf dem hPG-Gerüst konnte somit weder für Biotin noch für Galactose erreicht werden.

Trotzdem war es möglich eine Bibliothek verschiedener hPG-Ligand-Systeme zur Untersuchung auf Glas- und Goldoberflächen herzustellen (Tabelle 1). Zu Gunsten der Übersichtlichkeit wurde

Tabelle 1: Übersicht der synthetisierten hPG-Derivate.

Verbindung	Molekül	Oberfläche	Syntheseschritte	Gesamtausbeute [%]
PG _{10.000} (COOH) _{7%}	46	Glas	1	99
PG _{10.000} (COOH) _{11%}	47	Glas	1	78
PG _{10.000} (COOH) _{27%}	49	Glas	1	42
PG _{10.000} (NH ₂) _{4%}	43	Glas	3	43
PG _{10.000} (NH ₂) _{11%}	44	Glas	3	41
PG _{10.000} (NH ₂) _{24%}	45	Glas	3	41
PG _{10.000} (COOH) _{3%} (Gal) _{4%}	52	Glas	2	84
PG _{10.000} (COOH) _{5%} (Gal) _{6%}	53	Glas	2	78
PG _{10.000} (COOH) _{21%} (Gal) _{6%}	54	Glas	2	42
PG _{10.000} (NH ₂) _{2%} (Biotin) _{2%}	50	Glas	4	35
PG _{10.000} (NH ₂) _{4%} (Biotin) _{7%}	51	Glas	4	40
PG _{10.000} (TAA) _{1%} (COOH) _{6%}	60	Gold	2	85
PG _{10.000} (TAA) _{1%} (COOH) _{10%}	61	Gold	2	51
PG _{10.000} (TAA) _{1%} (COOH) _{26%}	62	Gold	2	32
PG _{10.000} (TA) _{1%} (NH ₂) _{3%}	55	Gold	4	34
PG _{10.000} (TA) _{1%} (NH ₂) _{10%}	56	Gold	4	30
PG _{10.000} (TAA) _{1%} (COOH) _{4%} (Gal) _{3%}	63	Gold	3	85
PG _{10.000} (TAA) _{1%} (COOH) _{4%} (Gal) _{6%}	64	Gold	3	51
PG _{10.000} (TAA) _{1%} (COOH) _{20%} (Gal) _{6%}	65	Gold	3	31
PG _{10.000} (TA) _{1%} (NH ₂) _{2%} (Biotin) _{1%}	57	Gold	5	30
PG _{10.000} (TA) _{1%} (NH ₂) _{6%} (Biotin) _{4%}	58	Gold	5	29

bei der detaillierten Bezeichnung der hPG-Derivate (Angabe der Größe und des Funktionalisierungsgrades des hPGs), auf den Zusatz dass es sich um hochverzweigtes Polyglycerol handelt verzichtet (hPG = PG).

3.5 FRET IN LÖSUNG MIT DEM STREPTAVIDIN—BIOTIN-SYSTEM

Die Auswahl unseres FRET-Paares wurde durch Messung der Absorptions- und Emissionsspektren des verwendeten Cyanin-Farbstoffes sowie des QDots 605 bestätigt. In Abbildung 30 sehen wir ein Überlappungsintegral des Emissionsspektrums von QDot 605 mit der Schulter der CyKai-Absorption.

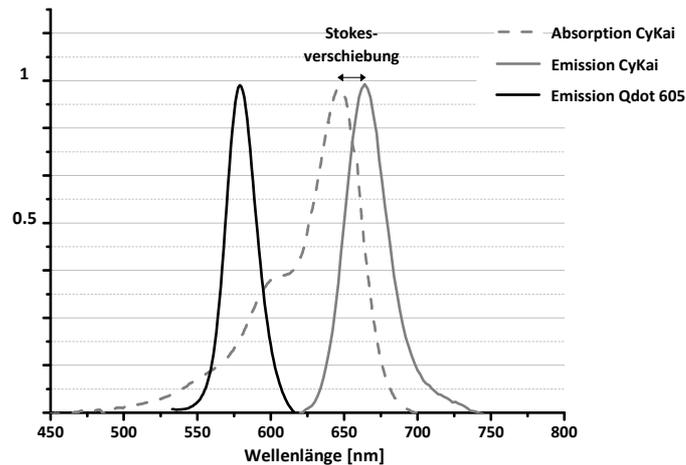


Abbildung 30: Das Absorptions- und Emissionsspektrum von CyKai (Akzeptor) und das Emissionsspektrum von QDot®605 (Donor).

Der Energietransfer zwischen dem QDot 605 und CyKai wurde als erstes zwischen dem Referenzsystem Biotin — Streptavidin in Lösung untersucht. Wie schon in Abschnitt 3.2 erläutert, wurde zu diesem Zweck ein fluoreszentes Biotin-Derivat durch CuAAC-Kupplung synthetisiert.

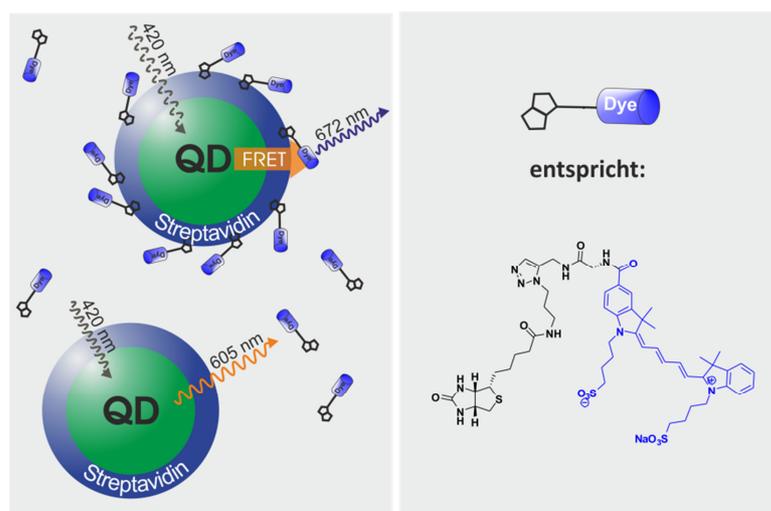


Abbildung 31: Schematische Darstellung des Titrationsversuchs QDot 605 mit CyKai-Biotin.

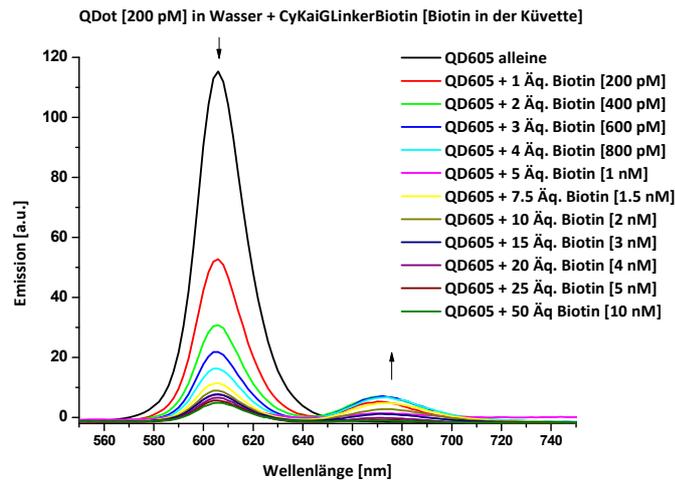


Abbildung 32: Vollständige Darstellung des FRET-Experimentes zum Nachweis der Bindung von Biotin (CyKai) mit Streptavidin (QDot 605). Der QDot [200 pM] befand sich in der Küvette und es wurde CyKai-G-Linker-Biotin (**20**) (hier als Biotin abgekürzt) hinzugegeben. Die finale Konzentration des Biotins in der Küvette nach jeder Zugabe ist in den eckigen Klammern angegeben.

Dieses Biotin-Derivat **21** wurde hochkonzentriert zu einer Lösung von streptavidinbeschichteten QDots 605 [200 pM] titriert. Das System wurde, wie in Abbildung 31 schematisch dargestellt ist, im Fluoreszenzspektrometer mit der Anregungswellenlänge des QDot 605 von 420 nm angeregt. Für den Fall, dass es zu keiner Wechselwirkung zwischen dem QDot 605 kommen sollte, erwarten wir eine Emission des QDots die bei 605 nm zu detektieren wäre. Kommt es hingegen zu einer Bindung zwischen CyKai-Biotin und dem streptavidinbeschichteten QDot, könnte dieser seine Energie strahlungslos auf den Cyanin-Farbstoff übertragen und diesen somit in einen angeregten Zustand versetzen. Die Rückkehr des Cyanin-Farbstoffes in den Grundzustand würde durch

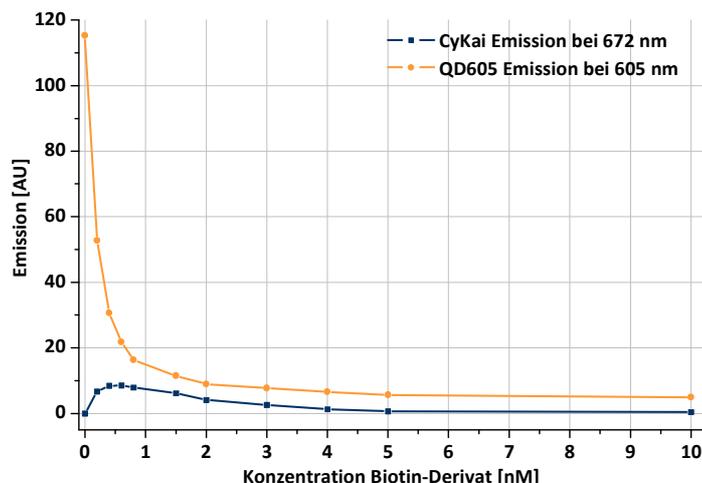


Abbildung 33: Graphischer Vergleich der Emissionsabnahme der Donor-Fluoreszenz und der Emissionszunahme der Akzeptor-Fluoreszenz.

Emission von Licht der Wellenlänge 672 nm geschehen. Somit wäre eine Wechselwirkung von Biotin mit Streptavidin durch Detektion dieser Wellenlänge nachgewiesen.

Bei unserem Experiment konnte ein deutlicher Energietransfer gemessen werden (Abbildung 32), der in der Abnahme der QDot-Emission und der Zunahme der CyKai-Emission zu erkennen ist. Schon bei der Zugabe von einem Äquivalent des fluoreszenten Biotin-Derivats **20** (rote Kurve) konnte eine 46-prozentige Abnahme der Donor-Fluoreszenz beobachtet werden. Mit jeder weiteren Zugabe des CyKai-G-Linker-Biotins nahm die Donor-Fluoreszenz ab. Für die Akzeptor-Fluoreszenz wurde nach einer anfänglichen Zunahme ab einem gewissen Punkt eine Stagnation, gefolgt von einer Abnahme der Fluoreszenz beobachtet. Um dies zu verdeutlichen, haben wir in einem Diagramm die Emissionswerte beider Fluorophore gegeneinander aufgetragen (Abbildung 33). Ab einer Konzentration größer als 800 pM CyKai-Biotin-Derivat können wir eine Abnahme der Akzeptor-Fluoreszenz, bei einer kontinuierlichen, wenn auch nicht mehr so starken, Donor-Fluoreszenzabnahme, beobachten. Dies lässt sich jedoch leicht mit dem Aufbau des Tests

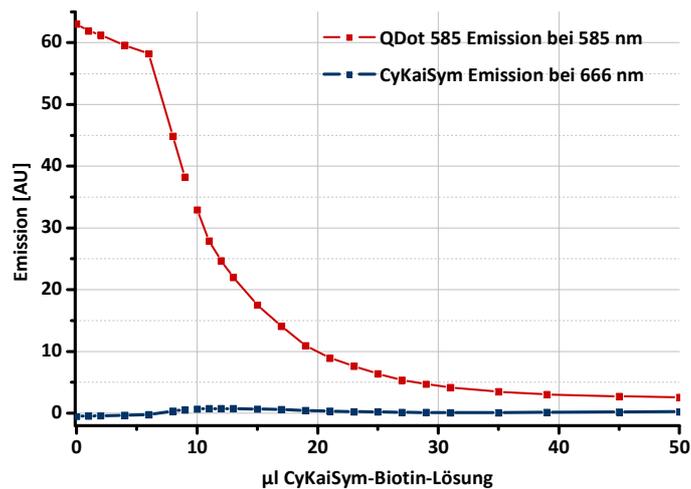


Abbildung 34: Graphischer Vergleich des FRET-Experiments mit dem CyKaiSym-Biotin-Derivat **26** und dem QDot 585.

erklären. Der QDot als sphärischer Partikel präsentiert mehrere Streptavidin-Proteine. Je mehr Biotin-Derivate eine Bindung mit der Streptavidinhülle des QDots eingehen, umso höher wird selbstverständlich auch die Dichte der Cyanin-Farbstoffe auf der QDot-Oberfläche, was zu Fluoreszenzlöschungseffekten zwischen den Cyaninen führen kann.

Da der Aufbau der Filter des Fluoreszenzmikroskopes keine gute Trennung zwischen Anregungs- und Emissionslicht für den QDot 605 ermöglichte, wurde untersucht, ob der QDot 585 als Donor-Fluorophor verwendet werden kann. Mit diesem Donor konnte jedoch nur ein schlechterer

Energietransfer beobachtet werden. Es kam zwar auch hier zu einer Abnahme der Donorfluoreszenz, jedoch war die Zunahme der Akzeptorfluoreszenz sehr gering (siehe Abbildung 34). Auch für den neuen symmetrischen Farbstoff **26** konnte die Fähigkeit zum Energietransfer gezeigt werden (Abbildung 35). Bei der Anregung einer Küvette mit CyKaiSym-Biotin-Lösung [40 nM] mit

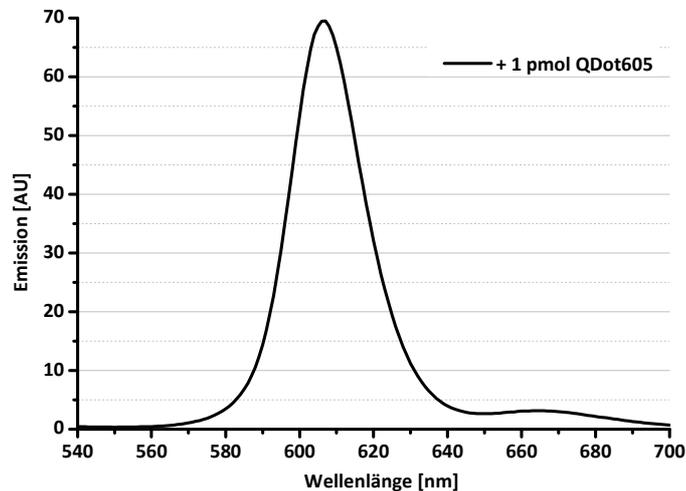


Abbildung 35: FRET vom QDot 605 [0.5 nM] mit Biotin-CyKaiSym-Derivat **26** [40 nM].

405 nm, konnte nach Zusatz von einem Picomol QDot 605, was einer Konzentration von 0.5 nM in der Küvette entspricht, eine geringe Akzeptorfluoreszenz bei 666 nm beobachtet werden.

Es konnte gezeigt werden, dass für unser ausgewähltes System in Lösung ein Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer zu beobachten war. Nachteilig war dabei die geringe Intensitätszunahme der Akzeptorfluoreszenz, da für ein FRET-Experiment eine gleichzeitige Beobachtung der Abnahme der Donorfluoreszenz und Zunahme der Akzeptorfluoreszenz von Vorteil wäre. Für den QDot 585 war das Signal-Rausch-Verhältnis im Bereich der Akzeptorfluoreszenz so schlecht, dass von einer Nutzung dieses QDot abgesehen wurde. Für die weiteren Experimente wurde QDot 605 verwendet, der eine bessere Separation des Donor- und Akzeptorsignals und somit auch eine potentielle Verbesserung der FRET-Detektion am Mikroskop ermöglicht.

3.6 GLASOBERFLÄCHEN — BESCHICHTUNG UND INKUBATION

3.6.1 Beschichtungsoptimierung

Um die Ligand-Protein-Wechselwirkung mittels FRET zu untersuchen, mussten die fluoreszenten Ligand-Linkersysteme auf Glasoberflächen immobilisiert werden. Hierfür wurden kommerziell erhältliche, präfunktionalisierte Objektträger benutzt. Unter Variation der Bedingungen wurde

versucht, diese Objektträger reproduzierbar und einheitlich zu beschichten. Dies wurde durch Fluoreszenzmessungen der beschichteten Oberflächen evaluiert.

Für die Optimierungsexperimente wurden zwei und dreidimensionale (beschichtet mit einer Polymermatrix) Epoxid-Glasobjektträger verwendet, auf denen CyKaiSym-Hex-NH₂ **23** (Synthese siehe Abschnitt 3.3, Schema 15) immobilisiert werden sollte (Abbildung 36). Die zu optimierenden Parameter waren Beschichtungsdauer, Luftfeuchtigkeit, Temperatur, Lösungsmittel und der Zusatz verschiedener Basen oder Säuren als Katalysatoren. Die einzelnen Experimente zur Optimierung sind im Experimentellen Teil mit der Modellverbindung CyKaiSym-Hex-NH₂ (**23**) als ES01 bis ES19 zu finden und für CyKaiSym-L-Linker-NH₂-Biotin (**35**) als ES20 bis ES34 (Abschnitt 5.6). Für die Immobilisierung dieser Derivate wurde mit PDMS-Schablonen gearbeitet, die durch adhäsive Kräfte eine sehr gute reversible Haftung auf Glas bieten. Weitere Vorteile der Nutzung von Schablonen sind ein geringes

PDMS-Schablone

Beschichtungsprozess auf der Oberfläche eines Näpfcens

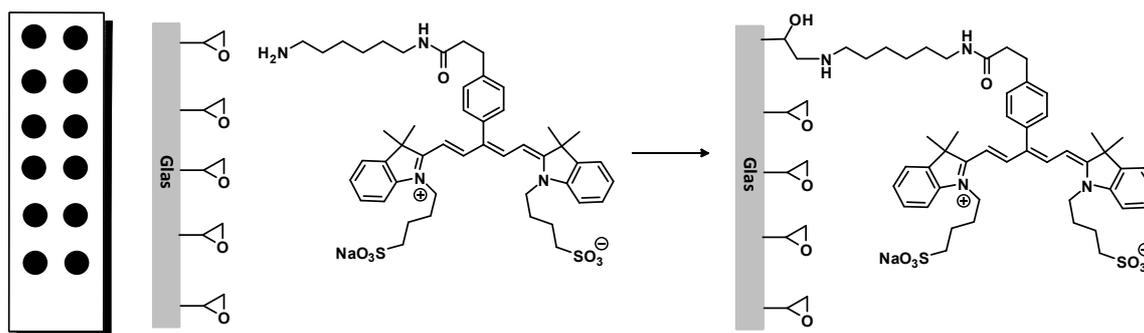


Abbildung 36: Die PDMS-Schablone und die Funktionalisierung der Epoxidoberfläche am Beispiel CyKaiSym-Amin **23**.

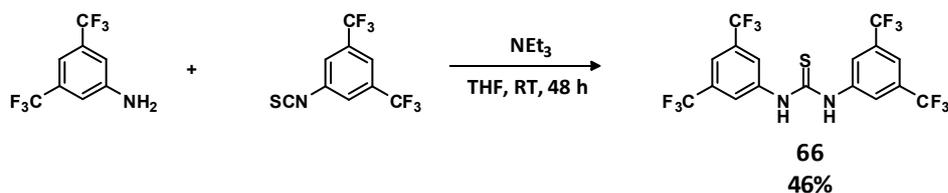
Probenvolumen im Gegensatz zu Beschichtungen eines kompletten Objektträgers beispielsweise im Kolben, somit können viele Bedingungen gleichzeitig getestet und auch deren Reproduzierbarkeit evaluiert werden. Die PDMS-Schablonen enthielten zweimal sechs Nöpfe mit einem Durchmesser von 5 mm und wurden vor der Immobilisierung oder Inkubation auf dem Objektträger platziert. Die Einbringung der Proben erfolgte mit Hilfe von Eppendorfpipetten mit Volumen von 30-90 μ l. Generell traten bei der Immobilisierung auf den Objektträgern mehrere Probleme auf.

Die Löslichkeit der Modellverbindung in Wasser war sehr schlecht. Dies hätte durch die Nutzung von Lösungsmittelgemischen sowie durch Nutzung anderer Lösungsmittel kompensiert werden können. Da die Optimierung der Immobilisierung jedoch auf die Entwicklung einer PDMS-

Flusszelle hinauslaufen sollte, waren wir in der Wahl der Lösungsmittel stark eingeschränkt, da die Kompatibilität von PDMS mit organischen Lösungsmitteln stark begrenzt ist.^[115] Dies führte zur Beschränkung der Lösungsmittel auf Wasser und verschiedene Pufferlösungen sowie MeOH, DMSO und Trifluorethanol. Sowohl **23** als auch **35** waren in allen drei Lösungsmitteln sehr gut löslich. In Wasser war die Modellverbindung CyKaiSym-Hex-NH₂ (**23**) jedoch sehr schlecht löslich, CyKaiSym-L-Linker-NH₂-Biotin (**35**) war etwas besser wasserlöslich. In den verschiedenen Pufferlösungen waren beide Verbindungen noch schlechter löslich und zeigten zusätzlich während der Immobilisierung eine starke Tendenz zur Aggregation, die sich durch sehr inhomogene Oberflächen und hohe Standardabweichungen in der Fluoreszenz bemerkbar machte (ES12-ES17).

Da die adhäsiven Eigenschaften des PDMS nur bei der Verwendung von Wasser und Pufferlösungen Bestand hatten, erwies sich die Nutzung von PDMS als Schablonen- bzw. Flusszellenmaterial hier als problematisch. Auch bei höheren Temperaturen oder der Anwendung von Druck (Klammern o. ä.) konnte die Dichtigkeit der Schablonen nicht gewährleistet werden. Dies führte zu einer hohen Hintergrundfluoreszenz der nicht beschichteten Bereiche. Für die Ausnutzung der guten adhäsiven Eigenschaften der Schablone waren wiederum MeOH, DMSO und CF₃CH₂OH ungeeignet.

Die Volumina der Nöpfchen waren so gering, dass anfangs die Verdunstung der Lösungsmittel und somit die irreversible Antrocknung der Substanzen auf den Glasoberflächen die Folge war. Dies wurde besonders stark für die Immobilisierung mit MeOH beobachtet. Am geringsten waren hier die Probleme mit Wasser, DMSO und den Pufferlösungen, da die Beschichtungen in einer Feuchtigkeitskammer bei 99% Luftfeuchtigkeit die besten Ergebnisse lieferten.



Schema 27: Die Synthese des Thioureakatalysators — TUK (**66**).^[116]

Um eine bessere Reaktion der fluoreszenten Verbindungen mit der Epoxidoberfläche unter wässrigen Bedingungen zu erreichen, verwendeten wir den von Kleiner *et al.* entwickelten Thioureakatalysators (TUK, **66**).^[117] Dieser wurde in einer nicht optimierten Reaktion von 3,5-Bis-(trifluoromethyl)anilin mit 3,5-Bis-(trifluoromethyl) phenylthio isocyanat in 46% Ausbeute nach einfacher Umkristallisation als weißer Feststoff erhalten. Dieser Katalysator wurde nun zur

Beschichtung der Oberflächen genutzt (ab ES27). Für relativ hohe Konzentrationen des CyKaiSym-Derivats **35** konnten in Wasser (blau in Abbildung 37) sogar höhere Fluoreszenzwerte erreicht werden als in Trifluorethanol (grün). Auch ist die durch TUK (**66**) vermittelte Beschichtung besser als die mit den üblicherweise zur Epoxidöffnung verwendeten Lewisäuren. Eine höhere Fluoreszenz der Glasoberfläche konnte auch durch die Verwendung von dreidimensionalen

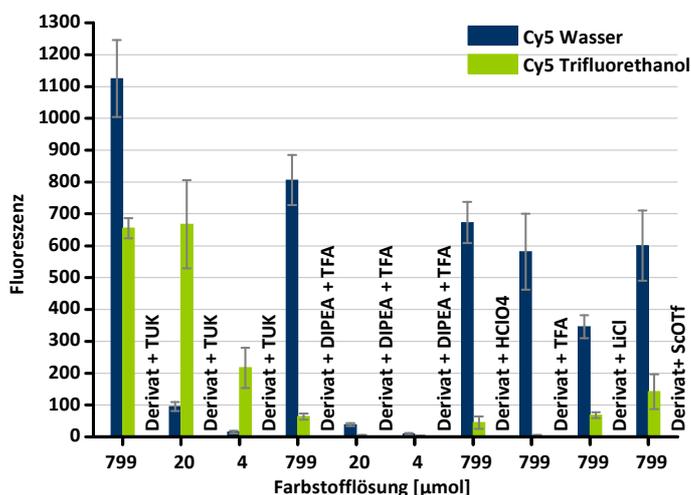


Abbildung 37: Die Darstellung der Fluoreszenzintensitäten zweier Epoxidglasoberflächen, die 24 h bei RT und 99% Luftfeuchte mit CyKaiSym-L-Linker-NH₂-Biotin **35** in Wasser (blau) und Trifluorethanol (grün) unter Einwirkung von verschiedenen Katalysatoren beschichtet wurden.

Epoxidoberflächen erhalten werden. Es konnte teilweise eine Verdreifachung der relativen Fluoreszenzwerte von 800 auf den normalen Epoxidobjekträgern auf Werte um 3000 auf den dreidimensionalen Glasoberflächen erreicht werden (ES36 und ES37). Da nun auch unter wässrigen Bedingungen die reproduzierbare Beschichtung der zwei- und dreidimensionalen Epoxidoberflächen unter milden Bedingungen möglich war, wurde diese Methode für alle weiteren Beschichtungen verwendet.

3.6.2 Inkubation

Die reproduzierbaren und homogenen ligandenpräsentierenden Oberflächen (Abbildung 38), die eine niedrige Hintergrundfluoreszenz zeigten, konnten nun in FRET-Experimenten verwendet werden. Aufgrund der geringen FRET-Effizienz, die bereits im Kapitel 3.5 für die FRET-Experimente in Lösung erwähnt wurde, war es uns unmöglich für das Modellsystem ein FRET-Signal auf der Oberfläche zu detektieren. Eine Optimierung der verwendeten Filtersysteme durch die Verengung der Detektionsbandbreite des Fluoreszenzmikroskops führte zu keiner Verbesserung der Detektion des Akzeptorsignals. Problematisch waren auch die unterschiedlichen Belichtungszeiten der beiden Fluorophore, da die Belichtungszeit von CyKaiSym mit 6400 ms um

ein Vielfaches höher lag, als die für den QDot 605 (max. 800 ms). Somit musste zur Gewährleistung der Anregung des Cyaninfarbstoffes eine Belichtungsdauer gewählt werden, die zwangsläufig zu einer Überbelichtung des QDots führte. Dies machte eine gleichzeitige Beobachtung der Donor-Fluoreszenzabnahme und der Akzeptor-Fluoreszenzzunahme unmöglich. Daraufhin wurden die

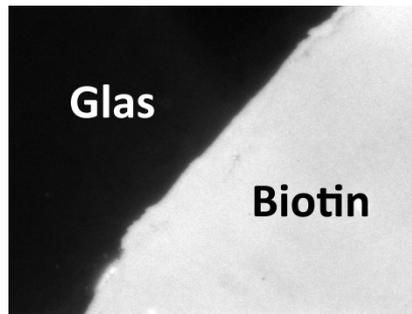


Abbildung 38: Fluoreszenzmikroskopie: Rand eines Spots der mit CyKaiSym-L-Linker-NH₂-Biotin **35** beschichtet wurde (ES20-4; Belichtungsdauer: 6400 ms, Cy5-Filter).

FRET-Messungen auf der Oberfläche mit dem epifokalen Mikroskop abgebrochen und es wurde versucht, primär die Bindungsfähigkeit der Oberflächen durch Inkubationsexperimente mit den Proteinen zu evaluieren.

Hierfür wurden fluoresceinmarkierte Proteine verwendet. Auf den Oberflächen wurden die

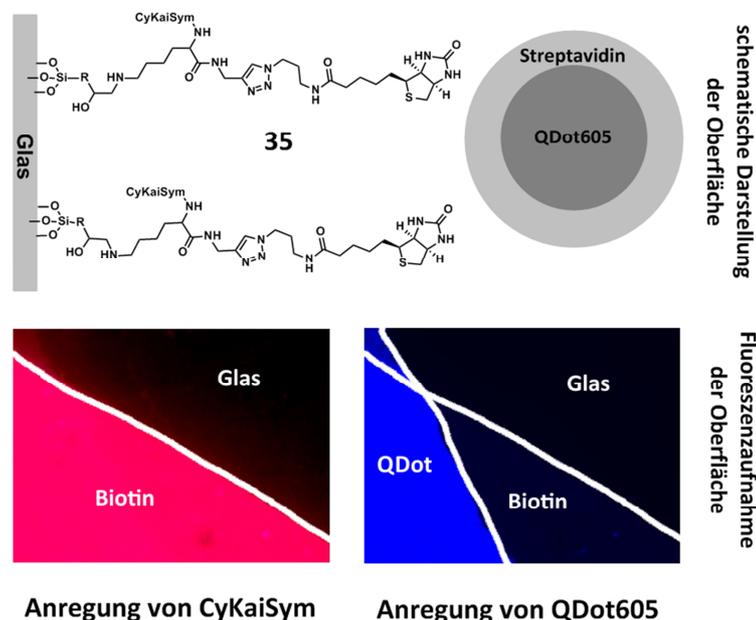


Abbildung 39: Fluoreszenzmikroskopie: Die Inkubation einer CyKaiSym-L-Linker-NH₂-Biotin-Oberfläche **35** mit streptavidinbeschichtetem QDot 605, dargestellt in Falschfarben. Blau: QDot-Fluoreszenz (Alexa), Rosa: CyKaiSym-Fluoreszenz (Cy5).

CyKaiSym-L-Linker-NH₂-Ligand-Moleküle gebunden und mit den FITC-Proteinen oder mit QDot-Streptavidin für ein bis zwei Stunden inkubiert. In Abbildung 39 ist unser Modellsystem Biotin—Streptavidin dargestellt. Links innerhalb des Nüpfchens ist die starke Fluoreszenz des CyKaiSym-Biotin-Derivates (35) in rosa zu erkennen, wohingegen außerhalb des Beschichtungsnapfes (rechts) kaum Hintergrundfluoreszenz zu erkennen ist. Für die Inkubationsexperimente wurde zuerst überprüft, ob die an der Oberfläche gebundenen und fluoreszenzmarkierten Liganden weiterhin zu einer Bindung befähigt waren. Für unsere biotinpräsentierenden Oberflächen konnte dies eindeutig nachgewiesen werden (Abbildung 39). Nach einstündiger Inkubation mit einer Streptavin-QDot-Lösung und anschließendem Waschprozess konnte wir durch die hohe QDot 605-Fluoreszenz (in Abbildung 39 rechts, in blauer Falschfarbe dargestellt) im biotinpräsentierenden Bereich nachweisen, dass das QDot-markierte Streptavidin auf der Oberfläche gebunden war.

Für die CyKaiSym-L-Linker-NH₂-Gal-Oberflächen war dieser Nachweis aufgrund der schwachen Wechselwirkung der Galactose-Liganden mit dem Lectin sowie der hohen unspezifischen Wechselwirkung der Lectine mit dem Glas nicht eindeutig zu erbringen. In Abbildung 40 ist Zweierlei dargestellt. Die blauen Balken stehen für die CyKaiSym-Fluoreszenz und somit für die

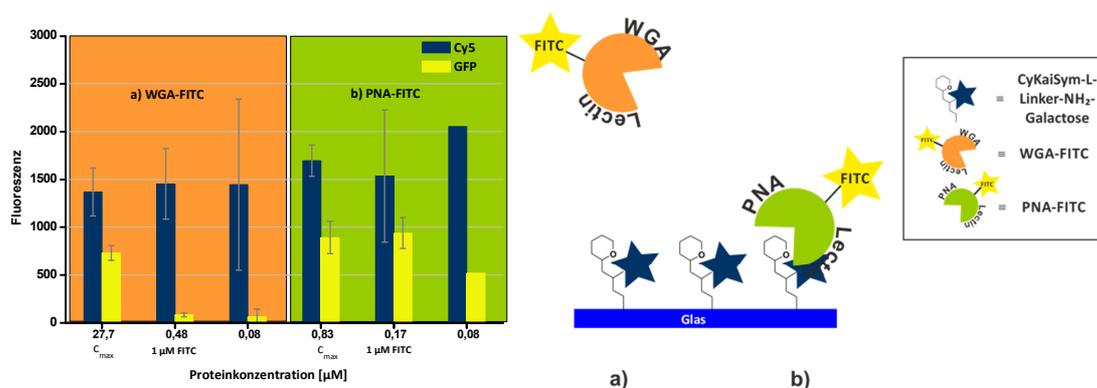


Abbildung 40: Graphische Darstellung der CyKaiSym- und FITC-Fluoreszenz einer CyKaiSym-L-Linker-NH₂-Gal-Oberfläche (ES36), die mit FITC-Lectinen inkubiert wurde.

Galactosedichte auf der Glasoberfläche. Die gelben Balken entsprechen der FITC-Fluoreszenz der fluoresceinmarkierten Lectine: Peanut Agglutinin (PNA-FITC, grün), das spezifisch Galactose bindet, und Wheat Germ Agglutinin (WGA-FITC, orange), das spezifisch Glucose bindet und somit hier als Negativkontrolle fungieren soll (näheres zu diesen Lectinen im nachfolgenden Abschnitt 3.7). Die Proteine wurden in drei verschiedenen Konzentrationen verwendet. Zum einen in der maximalen Konzentration der Stammlösung (jeweils das erste Balkenpaar), PNA $c_{max} = 0,83 \mu\text{mol}$ und für WGA $c_{max} = 27,7 \mu\text{mol}$. Des Weiteren wurde mit gleicher FITC-

Konzentration ($c_f = 1 \mu\text{mol}$, zweites Balkenpaar) und gleicher Proteinkonzentration ($c_p = 0.08 \mu\text{mol}$, drittes Balkenpaar) für eine Stunde inkubiert. Betrachten wir nun die Resultate der Lectininkubation, dargestellt als gelbe Balken. Deutlich zu erkennen ist eine von der Protein- und somit FITC-Konzentration abhängige Fluoreszenz (1-3) für die mit WGA inkubierten

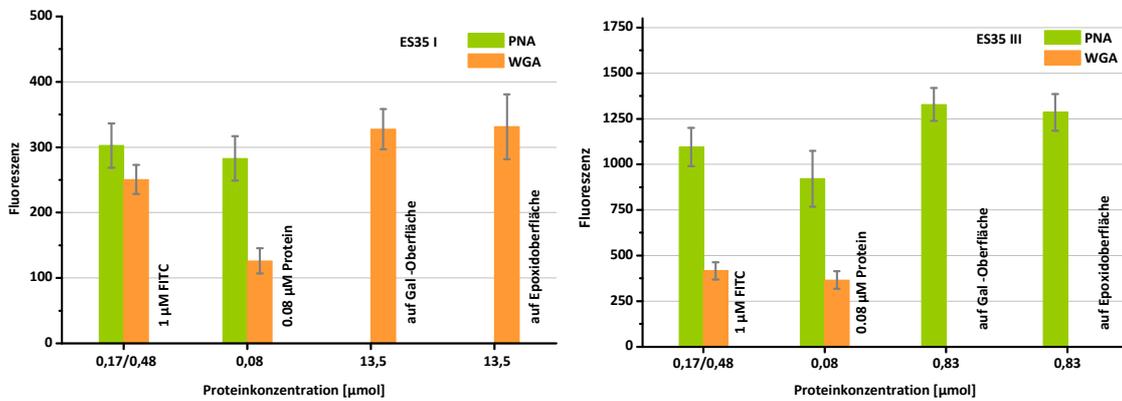


Abbildung 41: Der Vergleich der PNA- (grün) und WGA-Adsorption (orange) auf der CyKaiSym-L-Linker-NH₂-Gal-Oberfläche (ES35 I und III). Bei zweifacher Konzentrationsangabe bezieht sich der erste Wert auf die PNA-FITC- und der zweite auf die WGA-FITC-Konzentration.

Näpfchen. Dies ist für die mit PNA inkubierten Nöpfe (3-6) nicht zu beobachten. Hier erhalten wir eine gleichbleibende konzentrationsunabhängige Fluoreszenz. Dies würde für eine spezifische Bindung sprechen, da selbst bei der niedrigsten Protein-Konzentration von $0.08 \mu\text{mol}$ der siebenfache Wert für PNA (580) im Gegensatz zu WGA (78) erhalten wird. Leider erhielten wir für die PNA-Inkubation aber auch auf unbehandelten Oberflächen (vierte Position in Abbildung 41) solch hohe Werte. Dies könnte zum einen auf eine hohe unspezifische oder kovalente Wechselwirkung zwischen der Epoxidoberfläche und freien Aminen von PNA oder WGA hindeuten, oder auch durch eine Fluoreszenzlöschung der FITC-Markierung durch den

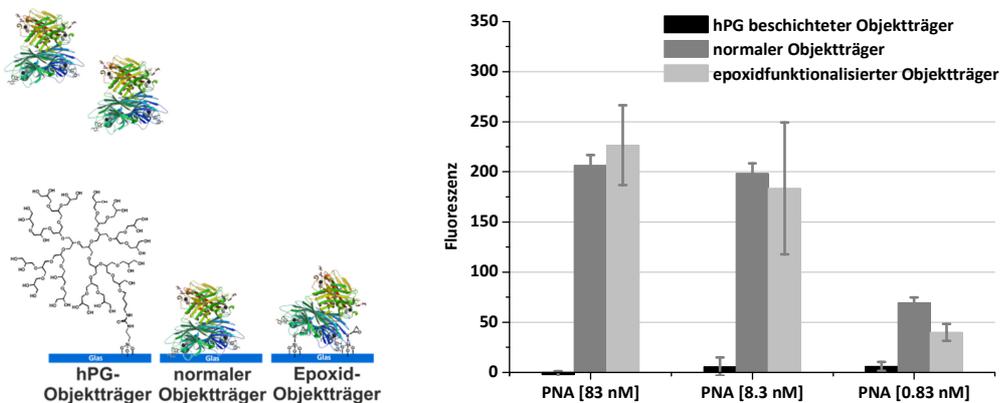


Abbildung 42: Vergleich der PNA-Adsorption auf unterschiedlich beschichteten Glasobjektträgern.

gebundenen CyKaiSym hervorgerufen werden. Um das Letztere auszuschließen, wurden die Inkubationsversuche mit nicht markierter Galactose wiederholt (ES39 I bis ES39 III). Es konnte wiederum eine konzentrationsunabhängige Bindung von PNA und eine konzentrationsabhängige Bindung von WGA auf der Oberfläche beobachtet werden. Auch hier war eine erhöhte Bindung des spezifischen Lectins PNA bei niedrigen Konzentrationen zu beobachten. Im schlechtesten Fall (ES39 III) wurde eine Verdreifachung gegenüber WGA erhalten und die anderen beiden Objektträger wiesen sogar eine hundertfache WGA-Adsorption auf. Auch hier wurde im Kontrollexperiment wieder eine sehr hohe Adsorption der Lectine auf der unbehandelten Oberfläche gefunden. Um diese nichtspezifische Wechselwirkung mit der Glasoberfläche zu minimieren, wurde die Verwendung von hochverzweigtem Polyglycerol (hPG) als Gerüstarchitektur zur Präsentation der Liganden auf der Glasoberfläche in Betracht gezogen. Dies wurde bereits in Abschnitt 3.4 erläutert und dort wurde auch die Synthese der verschiedenen hPG-Galactose- und hPG-Biotinderivate beschrieben. Eine Voruntersuchung, bei der drei unterschiedliche Objektträger mit PNA-FITC inkubiert wurden, (Abbildung 42) zeigte eine deutlich verringerte Adsorption der Proteine. In schwarz ist die hPG-beschichtete Oberfläche dargestellt und man erkennt besonders bei hohen Proteinkonzentrationen eine deutlich verringerte Adsorption des Lectins auf der Oberfläche.

Auf Grundlage dieses Vorexperiments wurde nun die Proteinadsorption von verschiedenen hPG-Ligand-Derivaten untersucht. Zusammenfassend wurden bei den Experimenten ES45 bis ES48 sowie ES62 bis ES65 die Verwendung von $\text{PG}_{10.000}(\text{NH}_2)_{2\%}(\text{Biotin})_{2\%}$ und $\text{PG}_{10.000}(\text{NH}_2)_{4\%}(\text{Biotin})_{7\%}$ untersucht. ES49-ES61 und ES66-ES75 sowie AS01-AS06 dienen zur Evaluierung des Verhaltens

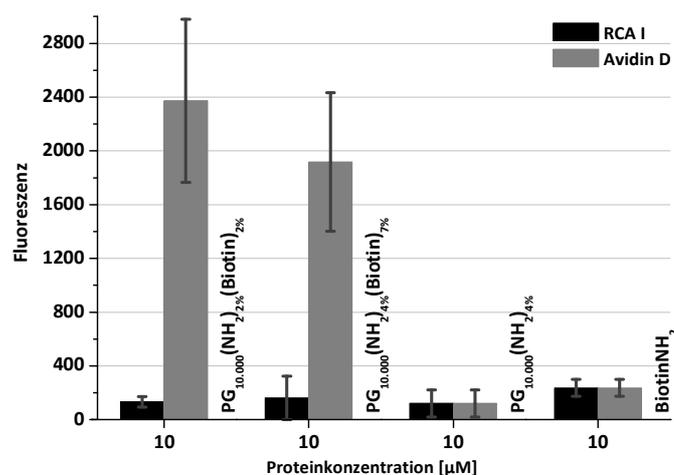


Abbildung 43: Darstellung der spezifischen versus der unspezifischen Bindung zweier verschiedener Proteinen auf unterschiedlichen hPG-Biotin-Oberflächen (ES43).

von $\text{PG}_{10.000}(\text{COOH})_3(\text{Gal})_4$, $\text{PG}_{10.000}(\text{COOH})_5(\text{Gal})_6$ und $\text{PG}_{10.000}(\text{COOH})_{21}(\text{Gal})_6$ gegenüber verschiedenen Proteinen. In der nachfolgenden Abbildung 43 sind drei verschiedene Biotin-Oberflächen dargestellt. Dabei handelt es sich um die dreidimensionalen hPG-Oberflächen mit $\text{PG}_{10.000}(\text{NH}_2)_2(\text{Biotin})_2$ (ersten Balkenpaar) und $\text{PG}_{10.000}(\text{NH}_2)_4(\text{Biotin})_7$ (zweites Balkenpaar) und eine eher zweidimensionale Oberfläche mit Biotin-Amin (viertes Balkenpaar). Als Referenz wurde eine hPG-Amin-Oberfläche mit einer geringen Funktionalisierung untersucht. Alle drei Oberflächen wurden mit Avidin D, das eine starke spezifische Bindung zum Biotin zeigt, und dem Lectin RCA I, das spezifisch an Galactose bindet und hier als Negativkontrolle dienen soll, inkubiert. Sehr deutlich ist die Affinität der dreidimensionalen hPG-Biotin-Oberflächen zum Avidin D zu erkennen, aber es werden auch minimale Adsorptionen für das Lectin beobachtet. Für die hPG-Galactose-Oberflächen konnte wiederum keinerlei solche Spezifität gefunden werden. Die erhöhte Fluoreszenz nach der PNA-FITC-Inkubation rührt alleine schon von der höheren FITC-Beladung (PNA 5.9 mol FITC/Lectin; WGA 2.0 mol FITC/Lectin) des Proteins her und lässt keine eindeutigen Rückschlüsse auf spezifische Bindungen zu. Im Folgenden sollen daher grundlegende Untersuchungen von multifunktionalen dendritischen Ligandoberflächen in Bezug auf Spezifität durchgeführt werden.

3.7 SPR-MESSUNGEN VON PROTEIN-LIGAND-INTERAKTIONEN

Für die Evaluierung der Proteinresistenz von verschiedenen Polyglyceroloberflächen auf ihre spezifische Bindung mit den jeweiligen Proteinen im direkten Vergleich, wurden verschieden funktionalisierte Polyglycerolmoleküle auf Goldoberflächen immobilisiert, um beschichtete SPR-Chips zu erhalten. Das Verhalten dieser Chips gegenüber Proteinen wurde dann im Biacore 3000 untersucht. Es wurden unterschiedliche Proteine untersucht. Ein Lectin aus der Erdnuss (*Arachnis hypogaea*) (*engl.* peanut agglutinin, PNA), das spezifisch endständige Galactose bindet,^[123] ein Lectin aus Weizenkeimen (*engl.* wheat germ agglutinin, WGA), das spezifisch *N*-Acetylneuraminsäure und *N*-Acetyl-D-glucosamin bindet,^[119] das Glycoprotein Fibrinogen (Fib), das man im Blutplasma findet und das aufgrund seiner stark adhäsiven Eigenschaften als positiver Standard zur Untersuchung der Proteinadsorption benutzt wird^[121, 124] sowie Streptavidin, das sich hervorragend als Modellsystem eignet, da es eine außerordentlich starke Ligand-Protein-Wechselwirkung zeigt.^[95] Bei den ersten beiden Lectinen handelt es sich um Proteine, die spezifisch Zucker binden. Diese sollten also keine erhöhte Bindungsaffinität gegenüber Biotin-Oberflächen zeigen und nur mit Oberflächen des spezifischen Zuckers interagieren. Das Fibrinogen sollte möglichst eine sehr geringe Interaktion mit allen zu untersuchenden

Tabelle 2: Übersicht über die in der Arbeit verwendeten Proteine.

Abkürzung	Molgewicht [Da]	Englischer Name	Art des Proteins	Valenz	Nutzung in dieser Arbeit:
PNA ^[118]	120.000	peanut agglutinin	Lectin, Homotetramer	4	Positiv-Testung auf Galactose
WGA ^[119]	36.000	wheat germ agglutinin	Lectin, Homodimer	8	Negativ-Testung auf Galactose
RCA I ^[120]	120.000	ricinus communis agglutinin I	Lectin, Tetramer ($\alpha_2\beta_2$)	8	Positiv-Testung auf Galactose
SA ^[95]	60.000	streptavidin	aus Eiweiß, Homotetramer	4	Positiv-Testung auf Biotin
Fib ^[121]	340.000	Fibrinogen	Glycoprotein, heterohexamer ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$)	-	Standard für Proteinresistenz
BSA ^[122]	66.000	bovine serum albumin	Serumprotein	-	Standard für Proteinresistenz

Oberflächen zeigen, während Streptavidin hochspezifisch für D-Biotin ist. Eine Zusammenfassung findet sich in Tabelle 2. Nachfolgend werden die erhaltenen Ergebnisse zusammengefasst.

Die Beschichtung und die Evaluierung der Chips erfolgte für alle Polyglycerolmoleküle nach denselben Bedingungen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die detaillierte Nomenklatur der hPG-Derivate leicht abgewandelt (Tabelle 3).

Tabelle 3: Zusammenfassung der im Folgenden verwendeten hPG-Derivate.

detaillierte Schreibweise	gekürzte Schreibweise	Molekülnummer
PG _{10.000} (TAA) _{1%} (COOH) _{6%}	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (COOH) _{6%}	60
PG _{10.000} (TAA) _{1%} (COOH) _{10%}	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (COOH) _{10%}	61
PG _{10.000} (TAA) _{1%} (COOH) _{26%}	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (COOH) _{24%}	62
PG _{10.000} (TA) _{1%} (NH ₂) _{3%}	PG _{10.000} (NH ₂) _{5%}	55
PG _{10.000} (TA) _{1%} (NH ₂) _{10%}	PG _{10.000} (NH ₂) _{10%}	56
PG _{10.000} (TAA) _{1%} (COOH) _{4%} (Gal) _{3%}	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{2%}	63
PG _{10.000} (TAA) _{1%} (COOH) _{4%} (Gal) _{6%}	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{6%}	64
PG _{10.000} (TAA) _{1%} (COOH) _{20%} (Gal) _{6%}	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{15%}	65
PG _{10.000} (TA) _{1%} (NH ₂) _{2%} (Biotin) _{1%}	PG _{10.000} (TA) _{1%} (Biotin) _{5%}	57
PG _{10.000} (TA) _{1%} (NH ₂) _{6%} (Biotin) _{4%}	PG _{10.000} (TA) _{1%} (Biotin) _{10%}	58

Zu Beachten ist hierbei, dass die Bezeichnungen der hPG-Derivate aus Gründen der Übersichtlichkeit gekürzt wurden. Es wurde insbesondere auf die Ausweisung des verbleibenden Amin- oder Carbonsäuregehaltes verzichtet. Desweiteren wurde für das am höchsten funktionalisierte hPG-Galactose-Derivat ein Galactose-Gehalt von 15% angegeben. Detaillierte Bedingungen sind im experimentellen Teil zu finden oder werden im Folgenden explizit diskutiert. untersucht.

Um die Ergebnisse untereinander vergleichen zu können, wurde die Adsorption der Proteine auf einer Hexadecanthiol (HDT)-Oberfläche untersucht. Hierbei handelt es sich um eine Referenzoberfläche, die sehr hydrophob ist. Die vereinfachte Annahme ist, dass auf der sehr hydrophoben HDT-Oberfläche eine Monolage des jeweiligen Proteins adsorbiert wird siehe (6). Die Ober-

$$\text{Adsorption [\%]} = \frac{\Delta\text{RU}_{\text{Molekül}}}{\Delta\text{RU}_{\text{HDT}}} \cdot 100\% \quad (6)^{[125]}$$

flächenbedeckung kann nach dem Modell der irreversiblen zufälligen Adsorption (RSA-Modell^[126]; siehe Kapitel 3.7.1) 55% nicht übersteigen.^[127] Im SPR erhalten wir für jedes Protein ein größenabhängiges Signal. Dieser Wert dient uns als Referenz auf die wir die Messungen der anderen Oberflächen beziehen. **Biotin-Polyglycerol-Konjugate**

Im folgenden Kapitel soll untersucht werden, ob die Verwendung von hPG als Gerüstarchitektur zur Präsentation von Biotinliganden eine Verringerung der nichtspezifischen Wechselwirkungen mit der Oberfläche bewirkt und dadurch eine Verbesserung der Evaluierung der spezifischen Wechselwirkung von Biotin mit Streptavidin ermöglicht.

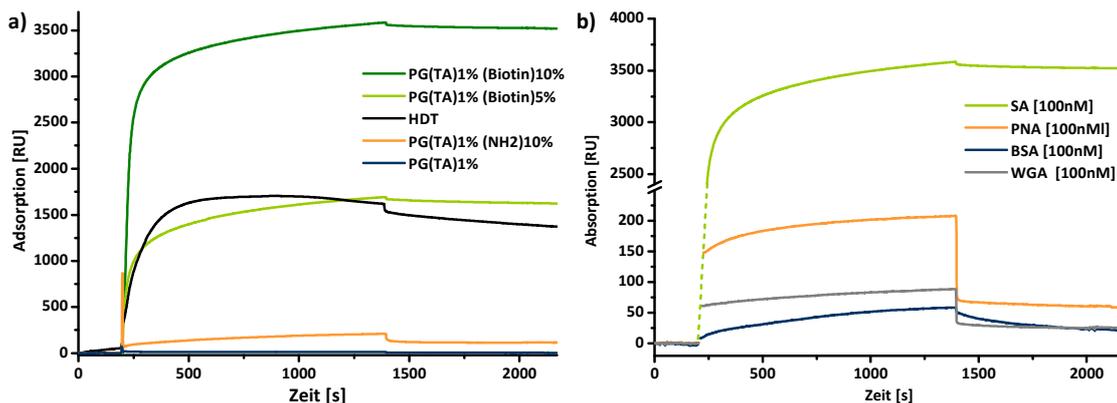


Abbildung 44: Adsorption von (a) Streptavidin [100 nM] auf verschiedenen Oberflächen; (b) versch. Proteinen auf einer PG_{10.000}(TA)₁(Biotin)₁₀-Oberfläche (GS27). Die gestrichelte Linie in (b) ersetzt eine Datenlücke. Diese geht auf eine Daten-Anpassung bei x = 250 s zurück, die dazu dient die sehr hohen Ausschläge beim Erstkontakt der Proteinlösung mit der Goldoberfläche zu unterdrücken.

Im Folgenden werden die Proteinadsorptionseigenschaften von $\text{PG}_{10.000}(\text{TA})_{1\%}(\text{Biotin})_{10\%}$ (**58**) und $\text{PG}_{10.000}(\text{TA})_{1\%}(\text{Biotin})_{5\%}$ (**57**) verglichen. Wir wollen hier die Auswirkungen eines sinkenden Biotingehaltes der Gerüstarchitektur auf das Proteinadsorptionsverhalten beobachten. Die Begrenzung des Biotingehaltes auf 10% ergab sich aus Löslichkeitsproblemen. Betrachtet man nun die Messergebnisse der SPR-Messungen, so erhält man das erwartete Ergebnis. In Abbildung 44a ist die Adsorption von Streptavidin [100 nM] auf drei verschiedenen Oberflächen dargestellt. Für die Referenz-Oberfläche HDT (schwarz) erhalten wir am Dissoziationsminimum $\Delta\text{RU} = 1348 \pm 24$.

Die spezifischen Oberflächen $\text{PG}_{10.000}(\text{TA})_{1\%}(\text{Biotin})_{5\%}$ (**57**) und $\text{PG}_{10.000}(\text{TA})_{1\%}(\text{Biotin})_{10\%}$ (**58**) zeigen gegenüber der HDT-Oberfläche eine erhöhte Adsorption. Bei einem Biotingehalt des Polyglycolgerüsts von 5% erhielten wir einen ΔRU -Wert von 1622. Bei doppelter Ligandenkonzentration können wir eine weitere Steigerung der Streptavidin-Adsorption auf $\Delta\text{RUs} = 3521$ beobachten. Diese Ergebnisse zeigen, dass wir eine beladungsabhängige Adsorption eines spezifischen Proteins auf der Oberfläche erzielen können. Beide Werte für die Biotin-Oberflächen liegen jedoch auch über den Werten der Adsorption auf der HDT-Oberfläche. Diese Ergebnisse unterstreichen nochmals, dass es sich lediglich um eine Annahme handelt, dass eine HDT-Oberfläche aufgrund ihrer hohen Hydrophobie eine geschlossene Monolage von Proteinen adsorbiert. Dies entspricht keinesfalls der Realität und somit dient sie uns nur als Referenzoberfläche, die den internen Standard für unsere Untersuchungen darstellt.

Um die höhere Adsorption des Proteins auf unseren spezifischen Oberflächen im Gegensatz zur HDT-Oberfläche zu erklären, müssen wir zwei verschiedene Modelle der Adsorption betrachten. Eine hydrophobe Oberfläche kann mit den hydrophoben Regionen des Proteins wechselwirken

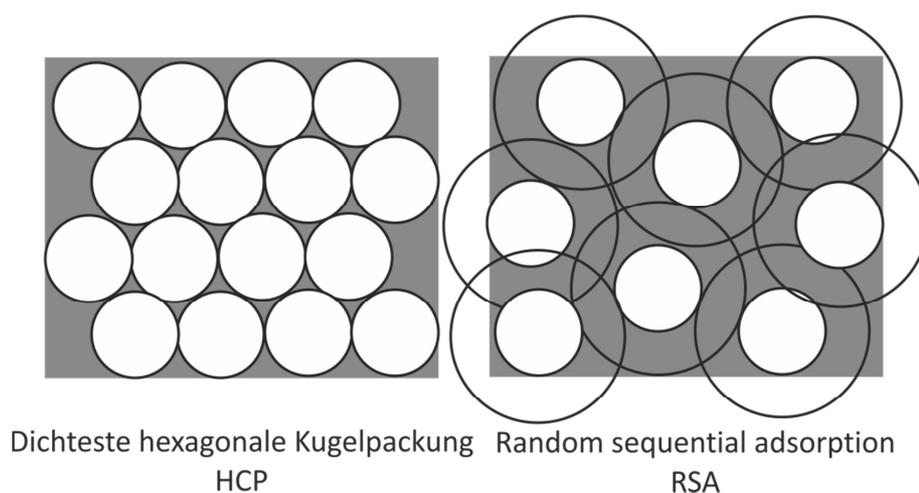


Abbildung 45: Das HCP- und RSA-Modell zur schematischen Darstellung der Protein-Adsorption.^[128]

und an diese Oberfläche adsorbieren. Es kommt zur Konformationsänderung des Proteins und einer Desolvatisierung der Oberfläche sowie auch des Proteins. Stellen wir uns die Proteine als Kugeln vor, die auf eine planare Oberfläche adsorbieren. In Abbildung 45 sind zwei Möglichkeiten dargestellt. Die Proteine können erst reversibel adsorbiert werden und sich dann lateral über die Oberfläche verteilen, um eine hexagonal dichteste Kugelpackung zu erreichen (*engl.* hexagonal close-package, HCP). Dieses entspricht einem maximalen Bedeckungsgrad der Oberfläche von 91%. Die Proteine könnten aber auch irreversibel auf der Oberfläche adsorbiert werden. Das würde bedeuten, dass sie so auf der Oberfläche verharren, wie sie zufällig adsorbiert wurden. In diesem Fall spricht man von der random sequential adsorption (RSA).^[126] Hier erhalten wir eine viel geringe Dichte von maximal 54% der Proteine auf der Oberfläche, da sonst Proteine mit schon adsorbierten Proteinen überlappen würden.^[128] In Abbildung 46 sind die nach den beiden Modellen geschätzten Bedeckungsgrade der Proteine in Abhängigkeit ihrer Molmassen dargestellt. Die schwarze Linie stellt den Bedeckungsgrad für die hexagonal dichteste Kugelpackung dar und die gestrichelte Linie zeigt den Bedeckungsgrad für das RSA-Modell. Die Funktionen wurden nach folgender Formel (2) errechnet:

$$\Delta\theta_{\text{immob}}^{\text{geschätzt}} \sim \frac{0.9\left(\frac{10^{14}}{\pi^2}\right)}{10^{-9}N_A/MW} \cdot 0.1 = 0.9(10^{22} MW/\pi r^2 N_A) \quad (7)$$

$$r = 10^8 \left(\frac{3MW}{4\pi\rho N_A}\right)^{1/3}$$

Diese Gleichung gilt für die hexagonal dichteste Kugelpackung, in der wir von maximal $0.9 \cdot (10^{14}/\pi^2)$ Proteinen/mm² ausgehen. Nach Stenberg *et al.* entspricht des Weiteren eine Veränderung des Resonanzwinkels Θ um 0.1° einer Adsorption von einem ng/mm² und somit $10^9 N_A/MW$ Molekülen.^[129] MW steht für die Molmasse des Proteins und r für dessen Radius. Dieser wurde nach der obigen Gleichung, unter Annahme einer einheitlichen Dichte von $\rho = 1.43 \text{ g/cm}^3$ erhalten.^[130] Für die Darstellung der RSA-Funktion wurde von einer 54%igen Bedeckung der Oberfläche, im Gegensatz zur 91%igen Bedeckung bei der dichtesten Kugelpackung, ausgegangen. Da 1000 Resonanz-Einheiten (*engl.* resonance units, RU) einer Änderung des Winkels Θ von ungefähr 0.1° entsprechen,^[128] können wir unsere gemessenen Werte (graue Kreise in Abbildung 46) in direkter Relation zu beiden Modellen stellen.

Wenn wir nun die beiden Funktionen betrachten, dann sind unsere gemessenen Werte der Streptavidin-Adsorption durchaus in einem realistischen Bereich. Für das RSA-Modell würden Werte von ca. $\Delta RU \approx 2700$ erwartet werden und für die hexagonal dichteste Anordnung eine

maximale Adsorption von $\Delta RU \approx 4500$. Die Werte für die Oberflächen mit $PG_{10.000}(TA)_1(Biotin)_{5\%}$ (**57**) ($\Delta RU = 1622$), bzw. $PG_{10.000}(TA)_1(Biotin)_{10\%}$ (**58**) ($\Delta RU = 3521$) entsprechen somit einer Streptavidin-Adsorption von 36% bzw. 77%, bezogen auf die maximal mögliche Adsorption von

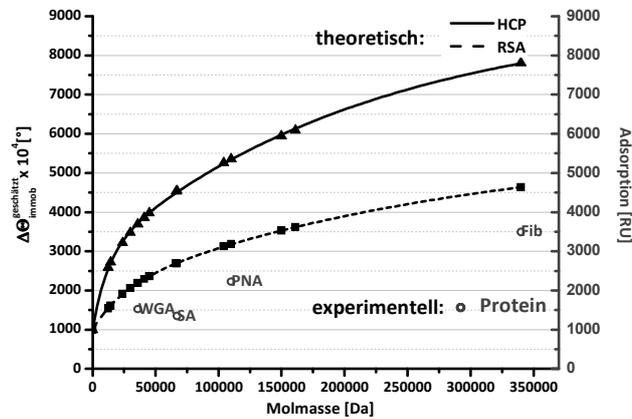


Abbildung 46: Die graphische Darstellung der Molmasse verschiedener immobilisierter Proteine versus der berechneten Menge immobilisierten Proteins (—HCP-Modell, 91% Bedeckungsgrad; -- RSA-Modell, 54% Bedeckungsgrad). Grau dargestellt sind die gemessenen ΔRU -Werte einiger Proteine, die auf einer HDT-Oberfläche adsorbiert wurden.

91% beim Vorliegen einer dichtesten hexagonalen Kugelpackung der Streptavidin-Moleküle. Auf einer HDT-Oberfläche ($\Delta RU = 1348$) adsorbierten nur etwa 30% des maximal möglichen Streptavidins.

Ein weiterer und entscheidender Sachverhalt, der das abweichende Adsorptionsverhalten auf den modifizierten Polyglyceroloberflächen ausmacht, ist in Abbildung 47a dargestellt. Hier wurde eine Goldoberfläche ohne Nutzung der hPG-Gerüststruktur mit Biotin beschichtet (siehe Abbildung 48a). Die Kurven in Abbildung 47a zeigen eindeutig ein sehr gutes Bindungsverhalten gegenüber dem spezifischen Protein Streptavidin, das das der anderen Biotin-Oberflächen sogar übersteigt (schwarze Kurve in Abbildung 47b). Jedoch erhalten wir neben der sehr guten spezifischen Bindung zum Streptavidin, auch sehr hohe Werte für alle anderen Proteine. BSA (in a: schwarz) zeigt 76% seiner Adsorption verglichen zur HDT-Oberfläche und selbst PNA-FITC (a: orange), das von den drei unspezifischen Proteinen am wenigsten auf dieser Oberfläche adsorbiert, zeigt immerhin noch eine Adsorption von 46% bezogen auf die HDT-Referenzoberfläche. Im Vergleich dazu wird selbst bei der am höchsten funktionalisierten Oberfläche mit $PG_{10.000}(TA)_1(Biotin)_{10\%}$ (Abbildung 44b), nach dem Spülen mit PBS-Puffer wieder nahezu die Basislinie erreicht. Wir erhalten hier durchgängig Proteinadsorptionen unter 5% relativ zur HDT-

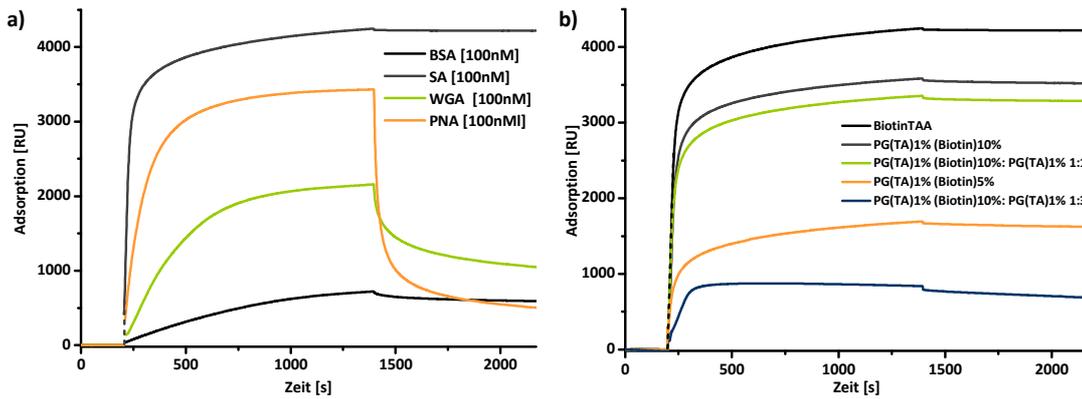


Abbildung 47: Adsorption von (a) verschiedenen Proteinen auf einer Biotin-TAA-Oberfläche (GS26) und (b) Streptavidin [100 nM] auf unterschiedlichen Oberflächen. Die gestrichelte Linie ersetzt eine Datenlücke. Diese geht auf eine Daten-Anpassung bei $x = 250$ s zurück, die dazu dient die sehr hohen Ausschläge beim Erstkontakt der Proteinlösung mit der Goldoberfläche zu unterdrücken.

Referenzoberfläche. Bezogen auf die Spezifität der unterschiedlichen Biotin-Oberflächen, die in Abbildung 48 schematisch dargestellt sind, kann man eindeutig sagen, dass die Nutzung von hPG als Gerüststruktur eindeutig zu einer Verbesserung des Systems führt. Die Bindungsfähigkeit der mit Biotin-TAA (19) beschichteten Goldoberfläche liegt in derselben Größenordnung wie die Bindungsfähigkeit unseres am höchsten mit Biotin funktionalisierten hPG-Derivats 58. Jedoch haben wir eine eindeutige Verbesserung in der Unterdrückung der unspezifischen Wechselwirkungen für unsere mit hPG-Biotin-Derivaten beschichteten Oberflächen erreicht. Für

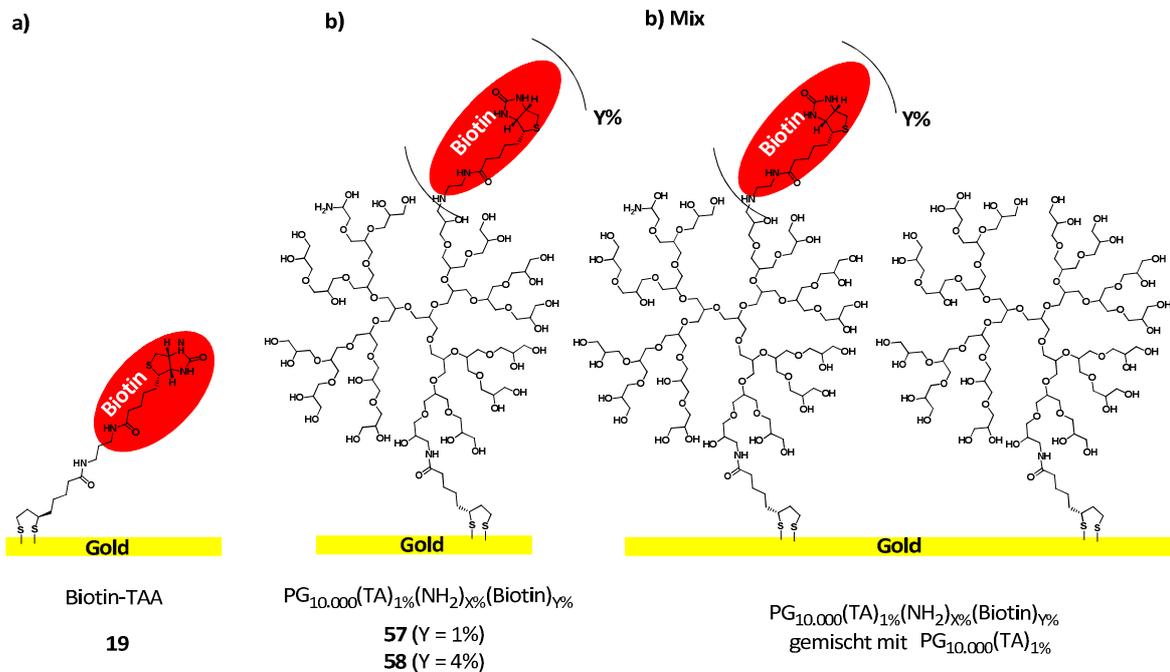


Abbildung 48: Schematische Darstellung verschiedener Biotin-Oberflächen.

PNA-FITC erhalten wir für unsere mit hPG-Biotinderivat **58** beschichteten Goldoberflächen nur 1/11, für BSA 1/20 und für WGA-FITC sogar nur 1/50 der Proteinadsorption im Vergleich zu den Biotin-TAA-Oberflächen. Desweiteren ist in Abbildung 47b auch das Adsorptionsverhalten von gemischten Oberflächen (Abbildung 48b Mix) dargestellt. Durch Mischen von funktionalisiertem $\text{PG}_{10.000}(\text{TAA})_1(\text{Biotin})_{10\%}$ (**58**) mit unfunktionalisiertem $\text{PG}_{10.000}(\text{TAA})_1$ ^[96] erhalten wir ebenfalls eine reduzierte Affinität der Oberfläche gegenüber Streptavidin. Somit können wir die Ligandendichte auf der Oberfläche durch zwei unterschiedliche Methoden steuern. Zum einen durch unterschiedliche Funktionalisierungsgrade des hPG-Gerüsts, dies ist sehr gut beispielsweise über ¹H NMR nachvollziehbar, und durch unterschiedliche Mischungsverhältnisse von hPG:hPG-Ligand.

3.7.2 Galactose-Polyglycerol-Konjugate

Im folgenden Kapitel soll entsprechend dem vorangegangenen Kapitel untersucht werden, ob die Nutzung von hPG als Gerüstarchitektur zur Präsentation von Galactoseliganden eine Verringerung der nichtspezifischen Wechselwirkungen mit der Oberfläche und dadurch eine Verbesserung der Evaluierung der spezifischen Wechselwirkung von Zucker und Lectin ermöglicht.

Im Folgenden werden die Proteinadsorptionseigenschaften folgender Moleküle verglichen: $\text{PG}_{10.000}(\text{TAA})_1(\text{Gal})_{15\%}$ (**65**), $\text{PG}_{10.000}(\text{TAA})_1(\text{Gal})_{6\%}$ (**64**) und $\text{PG}_{10.000}(\text{TAA})_1(\text{Gal})_{2\%}$ (**63**). Hier soll die Auswirkung eines sinkenden Galactosegehaltes der Gerüstarchitektur auf das Proteinadsorptionsverhalten beobachtet werden. Als bindendes Protein für Galactose haben wir anfänglich ein Lectin aus der Erdnuss (PNA) gewählt, das das tumorassoziierte Gal β -1,3-GalNAc

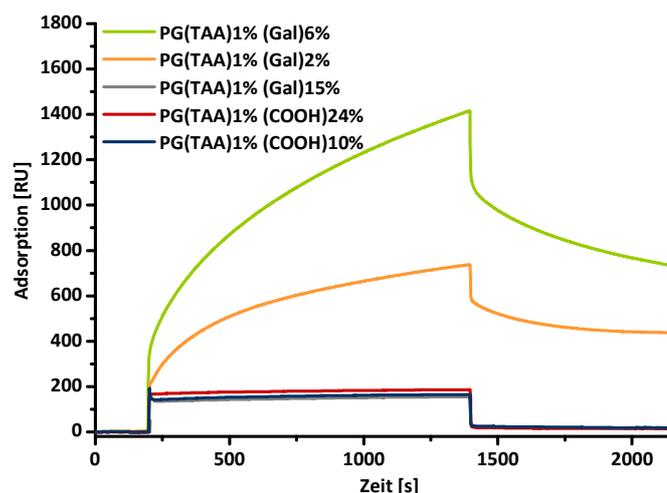


Abbildung 49: Adsorption von PNA-FITC [100 nM] auf verschiedenen Oberflächen.

bindet.^[123b] Es handelt sich um ein Homotetramer mit einer Molmasse von 110 kDa, das pro Untereinheit über eine Kohlenhydrat-Bindungsstelle verfügt.^[118] Dieses Protein erwies sich jedoch im Laufe der Untersuchungen als ungeeignet, da die Quantität der Bindung stark von den jeweiligen Chargen des Proteins abhängig war und es keine reproduzierbare Bindung zu Galactose zeigte. Daraufhin wurde RCA I als Bindungsprotein gewählt, das auch spezifisch Galactose bindet. Dieses Lectin ist auch ein Tetramer mit einer Molmasse von etwa 120 kDa, es besteht aus zwei unterschiedlichen Untereinheiten und verfügt über insgesamt 8 Bindungsstellen für Kohlenhydrate.^[120, 131] Alle anderen Proteine wurden als Negativkontrollen verwendet.

In Abbildung 49 ist die Verwendung des galactosespezifischen Proteins PNA zu sehen. Wir beobachten für die Galactoseoberflächen eine ligandenabhängige Bindung. Wider Erwarten ist diese jedoch nicht proportional zur Konzentration der gebundenen Galactose. Die $\text{PG}_{10.000}(\text{TAA})_{1\%}(\text{Gal})_{2\%}$ -Oberfläche zeigte gegenüber dem Protein eine schwache bis keine Bindung. Dasselbe wurde auch für die $\text{PG}_{10.000}(\text{TAA})_{1\%}(\text{Gal})_{15\%}$ -Oberfläche beobachtet. Sie zeigte von allen drei Derivaten sogar die schlechteste Bindung. Eine maximale Wechselwirkung von PNA-FITC mit der hPG-Gal-Oberfläche beobachteten wir für das $\text{PG}_{10.000}(\text{TAA})_{1\%}(\text{Gal})_{6\%}$ -Derivat (**64**).

Eine Erklärung für dieses Verhalten des am geringsten funktionalisierten hPG-Galactose-Derivats (**63**) ist wahrscheinlich in der Statistik zu finden. Von den etwa 90 funktionellen Gruppen (OH und COOH-Gruppen) des in wässriger Lösung globulären $\text{hPG}_{10.000}$ sind bei einem Funktionalisierungsgrad (FG) von 2% maximal ein bis zwei Moleküle Galactose kovalent an das hPG gebunden. Bei einem solchen FG ist es sehr wahrscheinlich, dass die Galactosemoleküle teilweise nicht zur Wassergrenze, sondern zum Gold hin orientiert sind und so effektiv nicht für eine Bindung mit dem Lectin zur Verfügung stehen.

Für das Derivat mit dem höchsten Funktionalisierungsgrad (**65**) könnte die sterische Hinderung, durch die hohe Galactosedichte auf dem hPG-Gerüst, oder die schlechte Löslichkeit ein ausschlaggebender Punkt sein. In reinem Wasser war $\text{PG}_{10.000}(\text{TAA})_{1\%}(\text{Gal})_{15\%}$ (**65**) fast unlöslich und somit ist es möglich, dass sich auf dem Goldchip eine Grenzfläche zwischen immobilisiertem Molekül und der PNA-Pufferlösung ausbildete und auch hier die Galactoseliganden nicht effektiv für eine Bindung zur Verfügung standen. Auch für die affinste Oberfläche mit 6% Galactose lag die Adsorption von PNA jedoch unterhalb der unspezifischen Wechselwirkung des Proteins mit der hydrophoben HDT-Referenzoberfläche ($\Delta\text{RU} = 2222$, für GS11). Auffällig an den Graphen in Abbildung 49 war das Adsorptionsverhalten des Proteins. Wir konnten auch während einer zwanzigminütigen Inkubation keine Sättigung der Oberfläche mit PNA erreichen; dies würde durch Erreichen eines Plateaus des Kurvenverlaufs deutlich. Die Kurven der Abbildung 49 liefern

durch ihren Verlauf zusätzlich einen Hinweis auf das multivalente Bindungsverhalten von PNA. Knecht *et al.* erklärten in Bindungsstudien mit Oligohistidin-Tags auf Ni²⁺-Oberflächen ein ähnliches Verhalten durch Rückbindungsprozesse an die Liganden Oberfläche, die bei sinkende Konzentration besonders hervortreten.^[132]

Um eine Sättigung der Galactoseoberfläche zu erreichen, wurde zum einen die Konzentration des Proteins erhöht und zum anderen die Dichte des Liganden verringert.

Die Untersuchung höherer Proteinkonzentrationen (250 nM bis 1000 nM) zeigten ebenfalls eine ligandenabhängige Adsorption von PNA auf der Oberfläche (Abbildung 50). An dem Verlauf der Adsorptionskurve konnten wir jedoch auch bei sehr hohen Konzentrationen (1000 nM) kein Sättigungsverhalten der Oberfläche beobachten. Bei diesen hohen Proteinkonzentrationen wurden Adsorptionen für die am besten bindende PG_{10.000}(TAA)_{1%}(Gal)_{6%}-Oberfläche erreicht (schwarze Kurve, Abbildung 50), die mit den bisher erläuterten Modellen nicht übereinstimmen und hinsichtlich der Größenordnung der Δ RU nur durch eine Protein—Protein-Adsorption erklärt werden können. Auch diese Adsorption der PNA-Moleküle scheint durch Fernwirkungen von der Ligandendichte auf der Goldoberfläche abhängig zu sein. Bei dieser hohen PNA-Konzentration konnte auch für PG_{10.000}(TAA)_{1%}(Gal)_{15%} (**65**) eine deutliche Proteinadsorption festgestellt werden. Allein für das am niedrigsten funktionalisierte hPG-Derivat **63** konnte keine relevante Bindung gefunden werden.

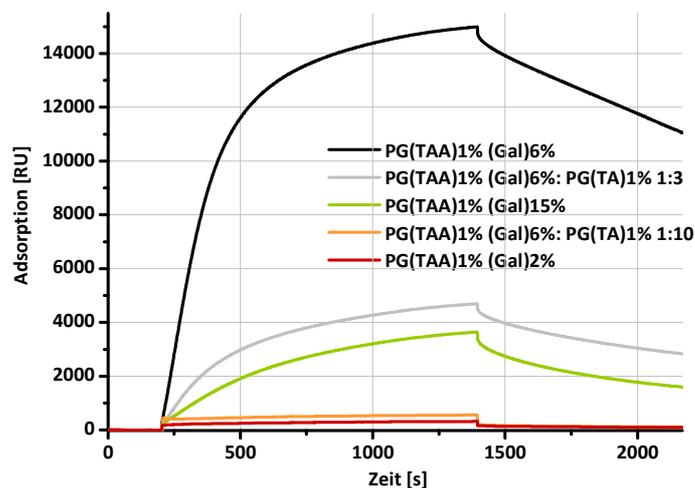


Abbildung 50: Adsorption von PNA [1000 nM] auf verschiedenen Galactoseoberflächen.

Auch der zweite Ansatz unsere Oberfläche durch Reduzierung der Ligandendichte mit Lectin zu sättigen ist in Abbildung 50 dargestellt. Durch die Mischung von PG_{10.000}(TAA)_{1%}(Gal)_{6%} mit unfunktionalisiertem hPG wurde die effektive Ligandendichte auf der Goldoberfläche reduziert.

Es wurde $\text{PG}_{10.000}(\text{TAA})_1(\text{Gal})_6$ (**64**) verwendet, weil es reproduzierbar die beste Proteinwechsel

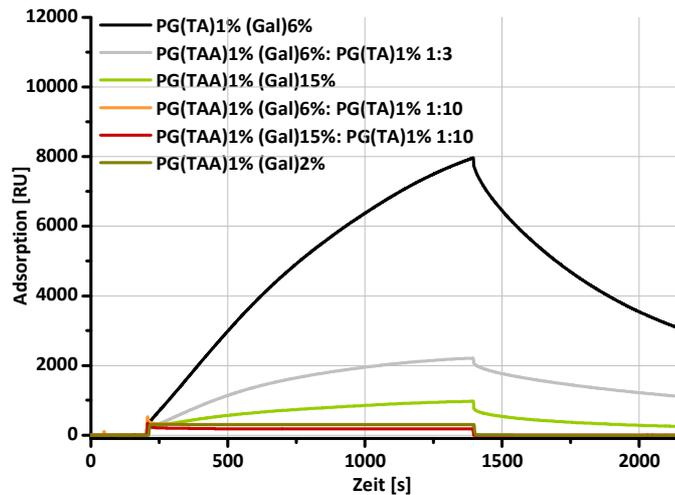


Abbildung 51: Adsorption von PNA [500 nM] auf verschiedenen Galactoseoberflächen.

wirkung zeigte. Die Goldoberflächen wurden mit einer Mischung aus $\text{PG}_{10.000}(\text{TA})_1(\text{Gal})_6$ (**64**) und $\text{PG}_{10.000}(\text{TA})_1$ in verschiedenen Verhältnissen (0:1 schwarz; 1:3 grau; 1:10 orange) inkubiert. Wir beobachteten eine Reduktion der Schichtdicke des PNAs durch Verdünnung der Liganden. Anstatt $\Delta R = 14985$ der reinen $\text{PG}_{10.000}(\text{TAA})_1(\text{Gal})_6$ -Oberfläche, wird für die 1:3-Oberfläche (grau, Abbildung 50) eine um 2/3 reduzierte PNA-Adsorption beobachtet ($\Delta \text{RU} = 4689$), für die stark verdünnte 1:10-Oberfläche (orange) erhalten wir keine detektierbare Bindung. Bei einer Halbierung der PNA-Konzentration auf [500 nM] wurde wiederum keine relevante Bindung von PNA zu den beiden schlecht bindenden Oberflächen, die mit $\text{PG}_{10.000}(\text{TAA})_1(\text{Gal})_{15\%}$ (**65**) und $\text{PG}_{10.000}(\text{TAA})_1(\text{Gal})_{2\%}$ (**63**) beschichtet waren, gefunden (Abbildung 51). Da bei dieser Konzentration das Adsorptionsverhalten des Proteins ein noch auffälligeres Verhalten zeigte (haifischflossenartiger Verlauf in Abbildung 51), wurde RCA I als Galactose-spezifisches Lectin verwendet in erhöhter Konzentration verwendet. Bei der Verwendung von RCA I [5000 nM] auf den verschiedenen Galactoseoberflächen deutete zumindest der Kurvenverlauf auf eine Sättigung der Oberfläche (Abbildung 52) hin. Jedoch wurde auch hier wieder eine zu hohe Adsorption des Lectins beobachtet (für $\text{PG}_{10.000}(\text{TAA})_1(\text{Gal})_6$ $\Delta \text{RU} = 13900$). Dies konnte nicht als Monolage mit den zuvor erläuterten Modellen in Einklang gebracht werden (siehe Abbildung 46; $\Delta \text{RU}_{\text{max}} = 5570$ für das HCP-Modell). Die Tendenz der PNA-Versuche wird auch hier bestätigt. Die beste Bindung wird vom mittleren Galactose-hPG-Derivat (**64**) gezeigt. Die schlechteste aber durchaus existente Bindung zeigen die sehr verdünnten Mischoberflächen (1:10). Dabei fällt auf, dass das Lectin RCA I auch gut auf der gering und der hoch funktionalisierten Galactoseoberfläche adsorbiert.

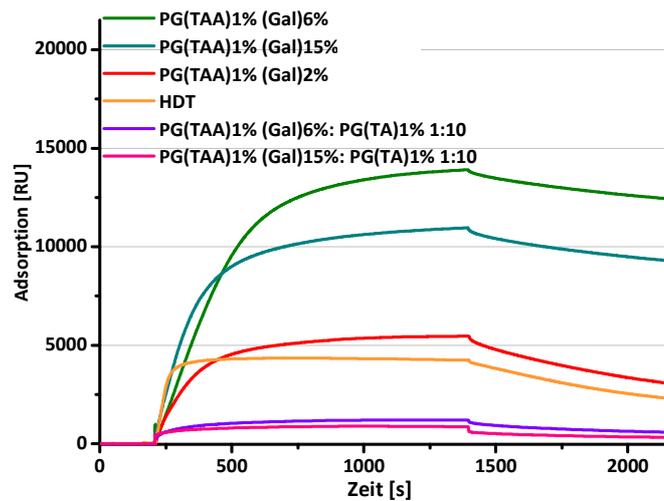


Abbildung 52: Adsorption von RCA I [5000 nM] auf unterschiedlichen hPG-Galactose-Oberflächen.

Die Adsorption liegt sogar über der der unspezifischen Wechselwirkung mit der hydrophoben HDT-Oberfläche. Interessante Ergebnisse wurden auch beim Vergleich ein und derselben Oberflächen während der Inkubation von RCA I bei unterschiedlichen Konzentrationen erhalten (Abbildung 53b). Wie man erwarten würde, ist die adsorbierte Proteinmenge für hohe Lectinkonzentrationen vergleichbar. Bei einem ausreichenden Angebot des Proteins in Lösung ist es anscheinend irrelevant wie viel Protein während der Inkubation angeboten wird.

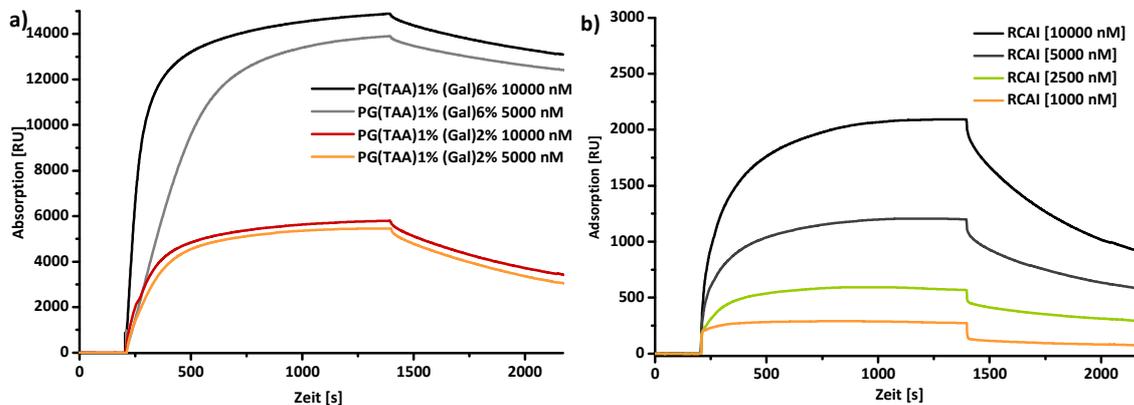


Abbildung 53: Adsorption von RCA I in unterschiedlicher Konzentration auf (a) $PG_{10.000}(TAA)_1(Gal)_2\%$ - und $PG_{10.000}(TAA)_1(Gal)_6\%$ -Oberflächen und (b) 1:10 $PG_{10.000}(TAA)_1(Gal)_6\%$ -hPG-Oberflächen (GS41).

Für die Oberflächen mit reduzierter Ligandendichte sieht das Verhalten jedoch ganz anders aus (Abbildung 53b). Wir sehen auch schon bei hohen Proteinkonzentrationen eine starke Proteinkonzentrationsabhängigkeit der RCA I-Adsorption. Dies ist mit der schwachen Wechselwirkung zwischen RCA I und dem Liganden zu erklären. Bei einer hier vorliegenden sehr niedrigen

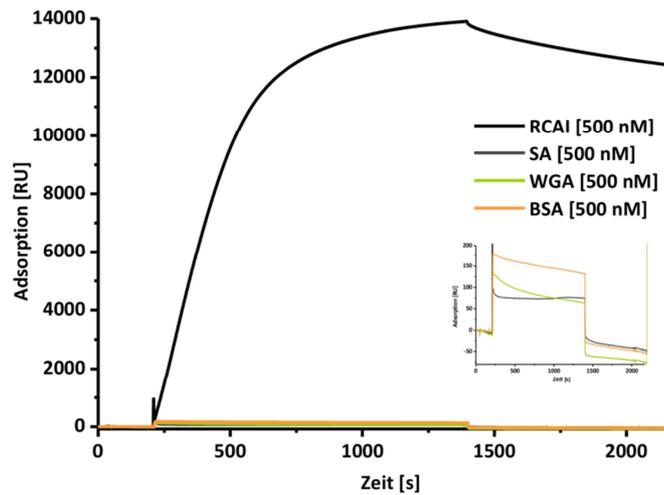


Abbildung 54: Unspezifische versus spezifische Wechselwirkung einer $PG_{10.000}(TA)_1(Gal)_6$ -Oberfläche (GS44). Der Einschub stellt die Kurven der BSA, WGA und SA-Adsorption dar.

Ligandendichte kommt es zur Adsorption der Lectine und da es sich hier um einen Gleichgewichtsprozess handelt, kommt es auch permanent zur Dissoziation der Proteine. Bei einer höheren Ligandendichte (siehe Abbildung 53a) ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass das Protein sofort wieder einen Liganden findet und an die Oberfläche „zurückbinden“ kann. Bei einer niedrigen Ligandendichte (siehe Abbildung 53b) ist jedoch eine komplette Dissoziation von der Oberfläche wahrscheinlicher. Somit ist hier das Signal sehr davon abhängig, wie viele Proteine sich noch in der Nähe der Oberfläche befinden und wieder an die Galactosemoleküle binden können. Man erkennt in dieser Konzentrationsabhängigkeit von Abbildung 53b somit den stärkeren Einfluss der Dissoziationsprozesse auf das Gesamtbild der SPR-Messung, als dies bei Oberflächen mit höherer Ligandendichte der Fall ist, wo die Dissoziationsprozesse durch Rückbindungsprozesse auf die Oberfläche im Kurvenverlauf verborgen werden.

Bei der Proteinresistenz konnten die hPG-Galactose-Oberflächen nicht an die Werte der hPG-Biotinoberflächen (Proteinadsorption unter 5%) heran reichen. Vor allem für Fibrinogen wurden hohe Proteinadsorptionen von bis zu 37% der HDT-Adsorption detektiert ($\Delta RU = 1289$ für GS01II). Da es sich bei Fibrinogen jedoch um ein Glycoprotein handelt, das auch Galactosereste aufweist, wäre es hier möglich, dass Fib auch spezifische Wechselwirkungen mit der Galactose eingeht. Daraufhin wurde mit BSA als Referenzprotein für ein stark adsorbierendes Serumprotein weitergearbeitet. Hierbei konnte letztlich meist eine gute Proteinresistenz gezeigt werden, wie in Abbildung 54 zu erkennen ist. Es wurden Werte von unter 5% Adsorption, verglichen mit der HDT-Referenzoberfläche, erhalten.

4 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Arbeit konnten azid-funktionalisierte Galactose-, TF-Antigen-, Mannose- sowie Biotin-Derivate zur Untersuchung von Ligand-Protein-Wechselwirkungen in moderaten bis guten Ausbeuten synthetisiert werden. Um diese Wechselwirkungen mithilfe von FRET untersuchen zu können, wurden die Liganden erfolgreich mittels der kupferkatalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) mit dem fluoreszenten Farbstoff CyKaiSym gekuppelt. So konnte ein lösliches fluoreszentes Biotin-Derivat hergestellt werden, das in Lösung weiterhin Bindungsfähigkeit gegenüber Streptavidin bewies. Dies konnte anhand der Fähigkeit des Biotin-CyKaiSym-Derivats, als Akzeptor für den Energietransfer von streptavidinbeschichteten QDot 605 zu agieren, gezeigt werden.

Um das System auf Oberflächen zu untersuchen, wurden die Azidverbindungen sowohl von Biotin als auch Galactose mittels CuAAC an ein modifiziertes fluoreszentes Propargyl-Lysin-Derivat addiert. Die erhaltenen fluoreszenten Biotin- und Galactose-Derivate konnten dann mit der verbliebenen Aminofunktionalität auf Glasoberflächen gekuppelt werden. Hierfür wurden prä-funktionalisierte Carboxy- und Epoxidoberflächen verwendet. Die Optimierung verschiedener Beschichtungsbedingungen wie Temperatur, Beschichtungsdauer, Lösungsmittel, Konzentration des Ligand-Linker-Systems und Luftfeuchtigkeit, führte zu einem Protokoll, das uns eine reproduzierbare Beschichtung der Glasoberflächen ermöglichte. Dies wurde mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie evaluiert. Nach 24 Stunden Beschichtungsdauer in Wasser konnte eine gleichmäßige Beschichtung einer 2D-Epoxyglasoberfläche mit einer PDMS-Schablone erhalten werden. Für die 3D-Oberflächen konnte eine zwei- bis zweieinhalbfache höhere Fluoreszenz erreicht werden. Für sehr gut lösliche Ligandsysteme wurden vergleichbare Fluoreszenzen mit und ohne Verwendung eines Thioharnstoff-Katalysators erreicht. Mithilfe von Inkubationsexperimenten mit streptavidinbeschichteten QDots für die Biotin-CyKaiSym präsentierenden Glasoberflächen konnte die weitere Aktivität des gebundenen fluoreszenten Liganden gezeigt werden. Der statische Nachweis von FRET auf der Oberfläche konnte aufgrund der stark unterschiedlichen Belichtungsdauern für den Donor- und den Akzeptorfarbstoff sowie der schon in Lösung festgestellten geringen FRET-Effizienz nicht erbracht werden. Auch konnte die Aktivität der mit CyKaiSym-Galactose beschichteten Glasoberflächen nicht eindeutig durch Inkubationsexperimente mit fluoresceinmarkiertem PNA nachgewiesen werden, da auch die vermeintlichen nicht-spezifischen Proteine, unter Beachtung der Fehlergrenzen, Fluoreszenzen in

ähnlichen Größenordnungen zeigten. Auch die Verwendung von nicht-markierten Galactose-Derivaten konnte die unspezifischen Wechselwirkungen mit anderen Proteinen nicht minimieren. Zur Reduzierung dieser unspezifischen Wechselwirkungen wurden hPG-Galactose-Derivate mit drei verschiedenen Funktionalisierungsgraden für Glasoberflächen (mit verbleibenden freien Carboxylatgruppen) und Goldoberflächen (mit einem Liponäureamid) synthetisiert. Auch hPG-Biotin-Derivate wurden mit zwei verschiedenen Funktionalisierungsgraden für Glas- sowie Goldoberflächen hergestellt. Alle Derivate wurden erfolgreich auf Glas- und Goldoberflächen immobilisiert.

Nach Inkubation der beschichteten Glasoberflächen mit Avidin D-FITC und Streptavidin-FITC konnte für die hPG-Biotin-Derivate mit Fluoreszenzmessungen eine ligandenabhängige spezifische Bindung an die Glasoberflächen bewiesen werden. Aufgrund der schwachen Wechselwirkungen zwischen Galactose und ihren spezifischen Proteinen PNA und RCA I war eine Verifizierung der Galactose-Lectin-Wechselwirkung auf der Glasoberfläche jedoch nicht eindeutig möglich.

Für die Goldoberflächen wurden die Systeme mittels Oberflächenresonanz untersucht. Dabei konnte eine eindeutige Abhängigkeit der Streptavidin-Adsorption vom Funktionalisierungsgrad des hPG-Biotins gezeigt werden sowie gleichzeitig ein Nachweis für die Proteinresistenz der Oberfläche gegenüber anderen Proteinen erbracht werden. Auch für die hPG-Galactose-Derivate konnten unter Verwendung von RCA I analoge Ergebnisse für die spezifische Wechselwirkung mit Hilfe der SPR-Messungen gezeigt werden. Des Weiteren wurden für die hPG-Galactoseoberflächen jedoch auch Wechselwirkungen vor allem mit Fibrinogen gefunden. Für die fünf untersuchten hPG-Ligand-Derivate konnten somit sehr hohe Adsorptionswerte mit dem spezifischen Protein erreicht werden. Diese übertrafen die Wechselwirkung mit hydrophoben Oberflächen bei weitem und führten für die bindungsstärksten Ligand-Oberflächen sogar zu Adsorptionen, die mit etablierten Modellen nicht in Einklang zu bringen sind und Stoff für weitere Untersuchungen bieten. Die Adsorptionsfähigkeit der ligandpräsentierenden Oberfläche konnte zusätzlich sehr gut gesteuert werden. Dies wurde zum Einen durch Reduzierung der Ligandendichte auf dem hPG-Gerüst, zum Anderen durch die Herstellung gemischter Oberflächen mit unfunktionalisiertem hPG erreicht. Durch Verwendung des hPG-Gerüsts konnte die gewünschte deutliche Reduzierung der Proteinadsorption für die hPG-Biotin-Derivate im Vergleich zu direkt immobilisierten Biotin-TAA-Derivaten bewiesen werden. Die hPG-Biotin-Oberfläche zeigt eine teilweise 50fach reduzierte Proteinadsorption für unspezifische Proteine, verbunden mit einer vergleichbar hohen Streptavidin-Adsorption.

Ein Vergleich mit kommerziell erhältlichen Chips (z. B. CM5 von Biacore) zur Bestimmung des Signal-Rauschverhältnisses war nicht möglich, da mit Standardprotokollen keine Kupplung unserer Liganden an CM5 möglich war. Die hPG-Oberflächen wurden aber bereits von Siegers *et al.* mit CM5-Oberflächen (diese tragen eine Dextranmatrix) verglichen und zeigten dort ein leicht besseres Adsorptionsverhalten.^[96] Die Schwierigkeiten, die wir beim Versuch der Kupplung von Liganden mit den CM5-Oberflächen hatten, machen deutlich, dass durch die Präfunktionalisierung des hPGs sowie auch die Herstellung gemischter Oberflächen ein eindeutiger Vorteil zu erzielen ist. Dieser besteht darin, dass die Ligandendichte auf dem hPG-Gerüst einfach gesteuert und quantifiziert werden kann und somit auch die Ligandendichte auf der Oberfläche über die Menge des hPG-Ligand-Gerüsts durch Mischen mit unfunktionalisiertem hPG leicht festgelegt werden kann.

Die Probleme bei der Untersuchung der Galactose-Lectin-Wechselwirkung auf Glas machen nochmals deutlich, wie wichtig die Verwendung eines Prinzips wie FRET zur Identifizierung und vor allem zur Quantifizierung solch schwacher Wechselwirkungen ist, denn mit dem normalen Inkubationsprotokoll, das einen Waschprozess beinhaltet, war es uns nicht möglich die schwache Wechselwirkung zwischen Galactose und dem spezifischen Lectin eindeutig nachzuweisen. Für den Nachweis von FRET auf der Oberfläche könnten verschiedene Ansätze eine Lösung bieten. Es müsste ein FRET-Paar gefunden werden, das eine bessere FRET-Effizienz zeigt und bei dem beide Partner ähnliche Anregungsdauern aufweisen. Die Nutzung anderer FRET-Messtechniken könnte die Sensitivität erhöhen. Auch die Verwendung einer Flusszelle statt des statischen Systems wäre hilfreich, weil so zumindest ein reproduzierbarer Waschprozess möglich ist.

5 EXPERIMENTELLER TEIL

Alle Lösungsmittel wurden vor der Verwendung nach konventionellen Methoden gereinigt. HPLC-Lösungsmittel, Lösungsmittel von p.A.-Qualität sowie deuterierte Lösungsmittel und alle Chemikalien aus kommerziellen Quellen wurde ohne weitere Aufreinigung verwendet. Alle wasser- und sauerstoffempfindlichen Reaktionen wurden unter Nutzung von Schlenk-Technik in ausgeheizten Kolben unter Argonatmosphäre und mit trockenen Lösungsmitteln aus dem Lösungsmittelsystem MBraun MB SPS-800 (solvent purification system) ausgeführt. Es wurde Wasser in Millipore-Qualität (Leitfähigkeit $\approx 18 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$, $\text{pH } 5.6 \pm 0.2$) verwendet. Dulbeccos Phospat Puffer Saline (DPBS) (NaCl (8000 mg/l), KCl (200 mg/l), Na_2HPO_4 (1150 mg/mol), KH_2PO_4 (200 mg/l), MgCl_2 Hexahydrat (100 mg/l), CaCl_2 (100 mg/l)) wurde von Sigma Aldrich bezogen und als fertige Lösung (1x) verwendet oder aus einer zehnfachkonzentrierten Lösung hergestellt.

Dünnschichtchromatographie (DC): DC Kieselgel 60 F_{254} beschichtete Aluminiumplatten und DC Kieselgel 60 RP-18 F_{254} Aluminium Platten (Merck).

Säulenchromatographie: Die Verbindungen wurden manuell mit Kieselgel 60 (230-400 Mesh, Partikelgröße 0.040-0.063 mm) oder maschinell mit der CombiFlash R_f von Teldyne Isco, Lincoln, NE, USA gereinigt. Hierfür wurden vorgefüllte Säulen der Firmen Interchim (Puriflash C18 HP 0.050 mm, in den Größen 6-55 g) und Teledyn Isco (RediSep R_f Kartusche: RP C-18, in den Größen 4.3-130 g, 60 Å, 230-400 Mesh, 0.040-0.063 mm; NP, in den Größen von 4-80 g, 60 Å, 230-400 Mesh, 0.035-0.070 mm) verwendet.

Dialyse/Ultrafiltration: Die Reinigung durch Dialyse erfolgte durch Einbringen der gelösten Rohsubstanz in Dialyseschläuche (Sigma Aldrich) aus benzylierter Cellulose, 2000 NMWCO. Diese wurden dann in Bechergläser gegen ein zehnfaches Volumen Lösungsmittel 24-48 Stunden unter häufigem Wechseln des Lösungsmittels und unter starkem Rühren dialysiert. Die Ultrafiltrationen wurden in 300 und 75 ml lösungsmittelbeständigen Zellen (Millipore) oder 400 ml Amicon Zellen mit Membranen aus regenerierter Cellulose (Millipore, MWCO 1000 und 5000) bei 5 bar durchgeführt.

NMR-Spektroskopie: Die ^1H und ^{13}C NMR-Spektren wurden mit folgenden Spektrometern bei Raumtemperatur aufgenommen: Bruker AC 250 (250 MHz), Jeol ECX-400 (400 MHz), AMX 500 (500 MHz) oder auf dem Bruker BioSpin (700 MHz). Die chemischen Verschiebungen δ sind in parts per million (ppm) angegeben. Die interne Referenzierung erfolgte mithilfe des deuterierten Lösungsmittels. CDCl_3 (^1H : 7.26; ^{13}C : 77.16), MeOD (^1H : 3.31; ^{13}C : 49.0), D_2O (^1H : 4.79), Aceton- d_6

(¹H: 2.05; ¹³C: 29.8, 206.3). DMSO (¹H: 2.50; ¹³C: 39.5).^[133] Bei Gemischen wurde auf das Lösungsmittel mit dem größten Volumenanteil referenziert, die Verschiebung des zweiten Lösungsmittels wurde dann im Spektrum angegeben. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit MestReNova Version 7.7.1-9649. Vor der Integration der Signale wurden in jedem Spektrum manuell die Phasen und die Basislinie korrigiert. Es wurde alle Peaks angegeben. Wenn im Protonenspektrum keine Integration des Signals angegeben sind, handelt es sich um Spuren (<5%) der Verbindung. C_q-quartäre Kohlenstoffatome, s- Singulett, d-Dublett, br-breites Signal,

IR-Spektroskopie: Es wurde mit einem Nicolet Avatar 320 FT-IR ausgestattet mit Diamant ATR Modul gemessen.

Elektrosprayionisierung-Flugzeitmassenspektrometer (ESI-TOF): Die Proben wurden an einem Agilent 6210 ESI-TOF, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA gemessen. Die Flussrate betrug 5 µL/min, die Sprühspannung war 4 kV. Das Desolvatisierungsgas wurde auf 15 psi (1 bar) gesetzt. Alle anderen Parameter wurden für eine maximale Häufigkeit des jeweiligen [M+H]⁺ optimiert.

UV/Vis-Spektroskopie: Die Messungen wurden am Scinco S-3100 Spektrometer mit der Software Labplus ausgewertet oder mit dem Perkin-Elmer Lambda 950 UV/Vis-Spektrometer ausgeführt.

Fluoreszenz-Spektroskopie: Die Fluoreszenz-Emissions-Spektren wurden mit dem Jasco FP- 6500 Spektrofluorimeter gemessen. Dieses war mit einem temperierten Zellhalter, einer Gleichstrom 150 W Xenon-Lampe, einem Hamamatsu R928 Photomultiplier und einem beweglichen Schlitzsystem ausgestattet. Alle Messungen wurden bei 25°C durchgeführt.

Fluoreszenz-Mikroskopie: Zeiss Axio Observer Z1, Objektiv LD „Plan-Neofluar“ 40x/0.6 Korr Ph2 M27, Beleuchtung HXP 120 C, Filtersatz 49009 ET Cy5 (Chroma, Anregung: 640/30x; Strahlenteiler: 660; Emission: 690/50m), Filtersatz QDot (AHF Analysetechnik/Chroma, Anregung: BL HC 605/15; Strahlenteiler: 630 DCXR; Emission: BP ET 685/70), hochauflösende Mikroskopie-Kamera AxioCam Mrm Rev.3 FireWire(D). Die Auswertung der Bilder erfolgte mit der AxioVision 4 Software (Modul Mark & Find) und auch nach Export als *.tiff Dateien (16 bit) in ImageJ.

Proteine:

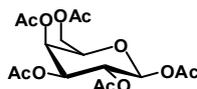
Tabelle 4: a) 10 mM HEPES, 0.15 M NaCl, pH 7.5, 0.08% NaN₃, 0.1 mM Ca²⁺, b) 10 mM HEPES, 0.15 M NaCl, pH 8.5, 0.08% NaN₃, c) 10 mM HEPES, 0.15 M NaCl, pH 7.5, 0.08% NaN₃, 0.1 mM Ca²⁺, 0.01 mM Mn²⁺, d) 89% aktives Konjugat, e) 99% aktives Konjugat.

Charge	Protein	Molmasse [g/mol]	Proteingehalt	Lieferzustand	FITC/Lectin [mol/mol]	Hersteller	Lot.-Nummer
I	PNA	120.000	11.1%	lyophilisiert	5.88	Sigma	058K4008
	WGA	36.000	61.2%		2.03	Aldrich	058K4112
II	PNA	120.000	15.8%	lyophilisiert	5.48	Sigma	030M4005
	WGA	36.000	54.6%		2.78	Aldrich	070M4043

	Con A	102.000	10.0%		5.40		026K7039V
III	RCA I	120.000	5 mg/ml	In Lösung ^a	5.8	Vector	W0616
	Avidin D	60.000	5 mg/ml	In Lösung ^b	3.3		V0331
IV	WGA	36.000	5 mg/ml ^d		4.5	Vector	X0213
	SA	60.000	1 mg/ml ^e		4.4		W0408
	PNA	120.000	5 mg/ml ^e		5.3		X0329
V	PNA	120.000	13.8%		5.73	Sigma	041M4030V
	WGA	36.000	53.8%		2.22	Aldrich	121M4069V

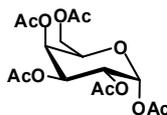
5.1 SYNTHESE DER ZUCKERDERIVATE

5.1.1 D-Galactopyranosepentaacetat (2)^[134]



In einem 500 ml Zweihalskolben mit Rückflußkühler wurde eine Suspension aus ca. 150 ml Essigsäureanhydrid (158.7 g, 14.0 Äq., 1554.2 mmol) und 10.0 g Natriumacetat (1.1 Äq., 122 mmol) bei 155°C zum Sieden erhitzt. Dem Gemisch wurden 20.0 g D-Galactose (1.0 Äq., 111.0 mmol) hinzugesetzt und für 10 Minuten gekocht, danach unter starkem Rühren in 1500 ml eiskaltes Wasser geschüttet und für mindestens eine Stunde gerührt. Vor dem Abfiltrieren wurde nochmals mit Eis gekühlt und der erhaltene weiße Feststoff am Hochvakuum getrocknet. Ausbeute (β -Anomer): 23.0 g (53%). Die wässrige Phase wurde am Rotationsverdampfer eingengt und mehrmals mit DCM extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurde wiederum eingengt und zweimal mit 1 M HCl-Lösung und zweimal mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung ausgeschüttelt. Die org. Phase wurde mit MgSO_4 getrocknet, abfiltriert und das LM am Rotationsverdampfer abdestilliert. Ausbeute (α/β Gemisch): 20.0 g (46%). Das ^1H und ^{13}C NMR entsprach der Literatur.^[135] Für eine langfristige Lagerung wurde das Produkt nochmals aus heißem Ethanol umkristallisiert um Spuren von Essigsäure zu entfernen, die über längere Zeiträume zur Abspaltung der Acetatschutzgruppen führen würde.

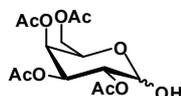
β -GalAc₅: AJ59, M = 390.34 g/mol; δ_{H} (500 MHz, CDCl_3) = 5.67 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H-1), 5.39 (d, J = 3.4 Hz, 1H, H-4), 5.29 (dd, J = 10.4 Hz, J = 8.3 Hz, 1H, H-2), 5.06 (dd, 1H, J = 10.4 Hz, J = 3.4 Hz, H-3), 4.06 (m, 3H, H-5, H-6), 2.13 (s, 3H, Me), 2.08 (s, 3H, Me), 2.01 (s, 3H, Me), 2.00 (s, 3H, Me), 1.96 (s, 3H, Me). δ_{C} (100 MHz, CDCl_3) = 170.2 (C=O), 170.0 (C=O), 169.8 (C=O), 169.3 (C=O), 168.9 (C=O), 92.1 (C-1), 71.6 (C-5), 70.7 (C-3), 67.8 (C-2), 66.7 (C-4), 61.0 (C-6), 20.7 (Me), 20.5 (Me), 20.5 (Me), 20.4 (Me).



α -GalAc₅: AJ59, M = 390.34 g/mol, δ_{H} (500 MHz, CDCl_3) = 6.15 (s, 1H, H-1), 5.38 (m, J = 7.1 Hz, J = 6.9 Hz, J = 4.1 Hz, 1H, H-5), 5.15 (d, J = 1.4 Hz, 1H, H-2), 5.06 (dd, J = 5.3 Hz, J = 1.7 Hz, 1H, H-3), 4.34 (dd, 1H, J = 5.2 Hz, J = 4.2 Hz, H-4), 4.30 (dd, J = 12.0 Hz, J = 4.1 Hz, 1H-6), 4.18 (dd, J = 12.0 Hz, J = 6.9 Hz, 1H, H-6),

2.10 (s, 3H, Me), 2.10 (s, 3H, Me), 2.09 (s, 3H, Me), 2.08 (s, 3H, Me), 2.02 (s, 3H, Me). δ_c (100 MHz, CDCl_3) = 170.5 (C=O), 169.9 (C=O), 169.7 (C=O), 169.3 (C=O), 169.0 (C=O), 99.0 (C-1), 82.1 (C-4), 80.5 (C-2), 76.2 (C-3), 69.2 (C-5), 62.5 (C-6), 20.9 (Me), 20.7 (Me), 20.6 (Me), 20.6 (Me), 20.6 (Me).

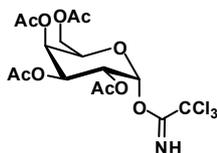
5.1.2 D-Galactosepyranosetetraacetat (9)^[134]



In einem 500 ml Kolben wurden 1.2 g Ethylendiamin (1.3 Äq., 19.2 mmol) in 200 ml DCM gelöst. Es wurden 1.3 g Eisessig (1.4 Äq., 21.2 mmol) langsam mit einer Spritze hinzugegeben, wobei sich ein Niederschlag bildete. Dann wurde 6.0 g Pentaacetat (1.0 Äq., 15.4 mmol) hinzugegeben und über Nacht gerührt. Nach Umsatzkontrolle durch DC wurde zum Reaktionsgemisch etwas Wasser hinzugegeben und mit DCM extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden nacheinander mit 2 N HCl, gesättigter NaHCO_3 -Lösung und dest. Wasser ausgeschüttelt. Dann wurde über MgSO_4 getrocknet, abfiltriert und am Rotationsverdampfer das LM abdestilliert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch auf der Combiflash Rf gereinigt (Säule: 120 g NP Kieselgel, Eluent: Gradient Cyclohexan/DCM 100% bis 0%). Ausbeute: 3.8 g (71%). Laut NMR wurde ein Gemisch aus α - und β -Anomer^[136] erhalten, in dem das β Anomer zu 23% enthalten ist. Es wurde mit dem Gemisch weiter gearbeitet.

GalAc₄OH: TR10, M = 348.30 g/mol, δ_H (500 MHz, CDCl_3) = 5.15 (t, J = 3.6 Hz, 1H, H-1 α), 5.46 (dd, J = 3.4 Hz, J = 1.3 Hz, 1H, H-5 α), 5.40 (dd, J = 10.8 Hz, J = 3.3 Hz, 1H, H-4 α), 5.15 (ddd, J = 10.9 Hz, J = 3.4 Hz, J = 1.2 Hz, 1H, H-3 α), 5.06 (m, H-3 β), 4.69 (dd, J = 9.0 Hz, J = 6.1 Hz, J = 1.7 Hz, H-1 β), 4.46 (m, 1H, OH α), 4.14 (d, 1H, J = 6.6 Hz, H-6 β), 4.10 (m, J = 12.0 Hz, J = 4.1 Hz, 2H, H-6), 3.95 (td, J = 6.7 Hz, J = 6.6 Hz, J = 1.2 Hz, H-5 β), 3.79 (d, J = 8.9 Hz, H-2 β), 3.39 (dd, J = 3.6 Hz, J = 1.2 Hz, H-2 α), 2.16 (s, 3H, Me β), 2.15 (s, 3H, Me β), 2.14 (s, 3H, Me), 2.10 (s, 3H, Me β), 2.09 (s, 3H, Me), 2.04 (s, 3H, Me), 1.99 (s, 3H, Me), 1.99 (s, 3H, Me β). δ_c (100 MHz, CDCl_3) = 170.7 (C=O), 170.5 (C=O), 170.4 (C=O), 170.2 (C=O), 96.1 (C-1 β), 90.8 (C-1 α), 71.2 (C-5 β), 68.5 (C-2 α), 68.3 (C-2 β), (C-4 α), 67.4 (C-3 α), 67.3 (C-4 β), 66.4 (C-5 α), 61.9 (C-6 α), 61.6 (C-6 β), 21.0 (Me β), 20.9 (Me), 20.8 (Me), 20.8 (Me β), 20.8 (Me), 20.7 (Me β), 20.7 (Me β).

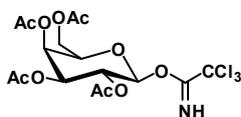
5.1.3 1-Trichloroacetimidat-2, 3, 4, 6-tetra-O-acetyl-D-galactohexa-pyranosid (10)^[134]



Die Reaktion wurde unter inerten Bedingungen durchgeführt. In einem ausgeheizten 100 ml Schlenk Kolben wurden 17 ml trocknes DCM gegeben. Bei 0°C wurden darin 2.93 g D-Galactose-2,3,4,6-tetraacetat (1.00 Äq., 8.41 mmol), 3.51 g Trichloroacetonitril (2.90 Äq., 24.51 mmol) und 1.97 g K_2CO_3 (1.7 Äq., 14.25 mmol; gemörsert, aus dem Exsikkator) gelöst bzw. suspendiert. Nach

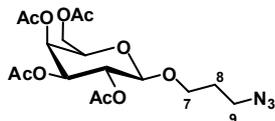
zwei Stunden wurde der Reaktionsverlauf mittels DC überprüft. Das K_2CO_3 wurde nach weiterer Zugabe von DCM abfiltriert und das Gemisch am Rotationsverdampfer eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (NP Kieselgel, EE/Cyclohexan) gereinigt. Es wurde das α - und β -Anomer erhalten und anhand von 1H und ^{13}C NMR-Spektrum charakterisiert.^[136-137]
Ausbeute: 2.89 g (α -Anomer 70%).

A-GalAc₄NHCCl₃: AJ66, M = 492.69 g/mol; δ_H (500 MHz, $CDCl_3$) = 8.65 (s, 1H, NH), 6.42 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H, H-1), 5.38 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H, H-4), 5.24 (dd, $J = 10.9$ Hz, $J = 3.2$ Hz, 1H, H-2), 5.17 (dd, $J = 10.9$ Hz, $J = 3.5$ Hz, 1H, H-3), 4.30 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H; H-5), 4.01 (dd, $J = 11.3$ Hz, $J = 6.5$ Hz, 1H, H-6), 3.89-3.96 (m, 1H, H-6), 2.01 (s, 3H, Me), 1.87 (s, 3H, Me), 1.85 (s, 3H, Me), 1.84 (s, 3H, Me), 1.08 (t, 1H). δ_C (100 MHz, $CDCl_3$) = 169.7 (C=O), 169.6 (C=O), 169.5 (C=O), 169.4 (C=O), 160.2 (CN), 93.1 (C-1), 90.4 (CCl_3), 68.6 (C-5), 80.5 (C-2,4), 76.2 (C-2,4), 69.2 (C-3), 62.5 (C-6), 20.9 (Me), 20.7 (Me), 20.6 (Me), 20.6 (Me), 20.6 (Me).



β GalAc₄NHCCl₃: AJ66, M = 492.69 g/mol; δ_H (500 MHz, $CDCl_3$) (aus der Mischung) = 8.71 (s, 1H, NH), 5.83 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H-1), 5.48 (dd, 1H), 5.44 (s, 1H, H-4), 5.11 (q), 4.14 (t, H-5), 4.11 (m, 2H, H-6).

5.1.4 3-Azidopropanyl-2, 3, 4, 6-tetra-O-acetyl- β -D-galactohexapyranosid (3)



Die Reaktion wurde unter inerten Bedingungen ausgeführt. In einem 50 ml Schlenkkolben wurde 1.0 g Azidopropanol (1.3 Äq., 10.0 mmol) in 10 ml trockenem DCM eine Stunde zum Trocknen mit 3 Å Molsieb gerührt. In einem weiteren 25 ml Schlenkkolben wurden 2.2 g $SnCl_4$ (1.0 ml, 1.1 Äq., 8.5 mmol) in 7.6 ml DCM gegeben und mit 3 Å Molsieb gerührt und in einem dritten 250 ml Schlenkkolben wurden 3.0 g peracetylierte D- β -Galactose (1.0 Äq., 7.7 mmol) in 62 ml DCM über 3 Å Molsieb gerührt. Nach einer Stunde wurden alle drei Kolben auf eine Temperatur von $-10^\circ C$ (Kryostat) gekühlt und es wurde erst die $SnCl_4$ -Lösung zur Galactose gegeben und nach 10 Minuten rühren erfolgte die Zugabe der Azidopropanol-Lösung. Alles zusammen wurde 3 Stunden bei $-10^\circ C$ und dann über Nacht bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit dest. Wasser ausgeschüttelt. Die org. Phase wurde mit $MgSO_4$ getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Das Rohprodukt wurde mehrmals säulenchromatographisch (NP Kieselgel, Eluent: Cyclohexan/EE 4/1) gereinigt. Ausbeute: 0.69 g (21%).

Die Reaktion wurde unter inerten Bedingungen ausgeführt. In einem 10 ml Schlenkrohr wurde in 1.0 g Azidopropanol (1.3 Äq., 10.0 mmol) in 10 ml trockenem DCM eine Stunde zum Trocknen mit 3 Å Molsieb gerührt. In einem weiteren 25 ml Schlenkkolben wurden 2.2 g $FeCl_3$ (1.0 ml, 1.1 Äq.,

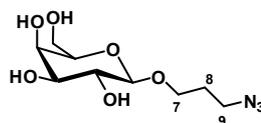
8.5 mmol) in 5 ml trockenes DCM gegeben und mit 3 Å Molsieb gerührt und in einem dritten 250 ml Schlenk Kolben wurden 3.0 g peracetylierte D-β-Galactose (1.0 Äq., 7.7 mmol) in 50 ml DCM über 3 Å Molsieb gerührt. Nach einer halben Stunde wurde zu einer 0°C kalten Galactoselösung, die Eisenchloridlösung hinzugegeben und für 30 Minuten gerührt. Dann wurde die Azidopropanollösung hinzu gegeben und alles zusammen wurde über Nacht bei 0°C gerührt (Kryostat). Das Reaktionsgemisch wurde mit NaCO₃-Lösung ausgeschüttelt. Die org. Phase wurde mit MgSO₄ getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Das Rohprodukt wurde mehrmals säulenchromatographisch (NP Kieselgel, Eluent: Cyclohexan/EE 4/1) gereinigt. Ausbeute: 0.39 g (12%).

Die Reaktion wurde unter inerten Bedingungen durchgeführt. In einem 50 ml Schlenk Kolben wurden 0.9 g Azidopropanol (1.2 Äq., 9.2 mmol) in 10 ml trockenem DCM zwei Stunden zum Trocknen mit 3 Å Molsieb gerührt. In einem weiteren 100 ml Schlenk Kolben wurden 1.6 g BF₃·OEt₂ (1.0 ml, 1.5 Äq., 11.5 mmol) und 3.0 g peracetylierte D-β-Galactose (1.0 Äq., 7.7 mmol) in 30 ml DCM gegeben und mit 3 Å Molsieb gerührt. Nach zwei Stunden wurden die Kolben auf eine Temperatur von 0°C gekühlt und die Azidopropanol-Lösung wurde zur Galactose gegeben. Die Mischung wurde 16 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde am nächsten Tag mit 1.4 g K₂CO₃ (1.4 Äq., 10.4 mmol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde mit dest. Wasser ausgeschüttelt. Die org. Phase wurde über MgSO₄ getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Das Rohprodukt wurde mehrmals säulenchromatographisch (NP Kieselgel, Eluent: Cyclohexan/EE 4/1) gereinigt. Ausbeute: 1.0 g (30%).

Das ¹H und ¹³C NMR-Spektrum entsprach der Literatur.^[138]

GalAc₄-Azidopropanol: AJ65, M = 431.39 g/mol, δ_H (500 MHz, CDCl₃) = 5.24 (d, J = 3.1 Hz, 1H, H-4), 5.03 (dd, J = 10.4 Hz, J = 8.0 Hz, 1H, H-2), 4.89 (dd, J = 10.5 Hz, J = 3.4 Hz, 1H, H-3), 4.36 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H-1), 3.94-4.05 (m, 2H, H-7), 3.80-3.84 (m, 2H, H-5, H-6), 3.47 (ddd, J = 9.4 Hz, J = 8.4 Hz, J = 4.9 Hz, 1H, H-6), 3.19-3.28 (m, 2H, H-9), 2.01 (Me), 1.92 (Me), 1.90 (Me), 1.83 (Me), 1.65-1.79 (m, 2H, H-8). δ_C (100 MHz, CDCl₃) = 169.9 (C=O), 169.8 (C=O), 169.6 (C=O), 169.0 (C=O), 100.8 (C-1), 70.5 (C-3), 70.3 (C-5), 68.5 (C-2), 66.7 (C-4)), 66.0 (C-6), 60.9 (C-7), 47.5 (C-9), 28.6 (C-8), 20.3 (Me), 20.2 (Me), 20.1 (Me). ESI-TOF: C₁₇H₂₅N₃NaO₁₀⁺ m/z berechnet = 454.1432 erhalten = 454.1432; C₁₇H₂₅NNaO₁₀⁺ m/z berechnet = 426.1376 erhalten = 426.1383.

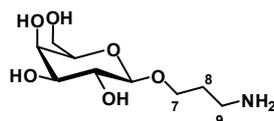
5.1.5 3-Azidopropanyl-β-D-galactohexapyranosid (4)^[134]



In einem 25 ml Schenkkolben wurde durch Lösen von 229 mg Natrium in 10 ml trockenem MeOH eine frische 1 M NaOMe-Lösung hergestellt. Der zu entschütze Zucker wurde in trockenem MeOH gelöst (10 ml/1 g Zucker) und 100 μ l NaOMe-Lösung hinzugefügt. Die Reaktion wurde ca. eine Stunde gerührt und der Reaktionsverlauf mittels DC überprüft. Die Reaktion wurde mit saurem Ionentauscher Lewatit K1131 beendet. Der Ionenaustauscher wurde abfiltriert und das MeOH am Rotationsverdampfer entfernt. Das Produkt wurde als gelbes Öl erhalten und musste nicht aufgereinigt werden. Die Charakterisierung erfolgte anhand von ^1H und ^{13}C NMR.^[138a]
Ausbeute: quantitativ.

Gal-Azidopropanol: AJ88III M = 263.25 g/mol, δ_{H} (500 MHz, MeOD) = 4.20 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, H-1), 3.94 (dt, $J = 10.2$ Hz, $J = 6.0$ Hz, 1H, H-7), 3.87 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-4), 3.74 (m, 2H, H-6), 3.63 (dt, $J = 10.1$ Hz, $J = 6.1$ Hz, 1H, H-7), 3.50 (m, 3H, H-2, H-3, H-5), 3.42 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz, H-9), 1.86 (m (q), $J = 12.9$ Hz, $J = 6.4$ Hz, 2H, H-8). δ_{C} (100 MHz, MeOD) = 104.1 (C-1), 75.5, 74.1 (C-5 und C-3), 71.7 (C-2), 69.3 (C-4), 67.1 (C-7), 61.6 (C-6), 48.8 (C-9), 29.6 (C-8).

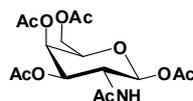
5.1.6 3-Aminopropanyl- β -D-galactohexapyranosid (5)



0.19 g peracetylierter Zucker (1.00 Äq., 0.73 mmol) wurden in 1 ml THF gelöst und 0.39 mg Triphenylphosphin (2.00 Äq., 1.47 mmol) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde auf 60°C erwärmt und es wurden 0.2 ml Wasser zugegeben. Die Reaktion wurde über Nacht gerührt. Nach Reaktionskontrolle mittels DC wurde mehrfach mit Toluol ausgeschüttelt. Das Wasser wurde am Rotationsverdampfer abdestilliert und ein gelbes Öl als Produkt erhalten. Die Charakterisierung erfolgte mithilfe der ^1H , ^{13}C NMR-^[139] und IR-Spektren. Ausbeute: 0.16 g (90%).

Gal-Aminopropanol: AJ260 M = 237.25 g/mol, δ_{H} (500 MHz, MeOD₃) = 4.24 (m, 1H, $J = 7.4$ Hz, H-1), 4.00 (dt, $J = 10.0$ Hz, $J = 5.9$ Hz, 1H, H-7), 3.85 (dd, $J = 3.2$ Hz, $J = 0.6$ Hz, 1H, H-4), 3.73 (m, 3H, H-6, H-7), 3.51 (m, 3H, H-2, H-3, H-5), 2.87 (m, 2H, H-9), 1.82 (m, 2H, H-8). Nicht mit 2D-Spektren verifiziert. δ_{C} (100 MHz, MeOD) = 197.5, 104.9 (C-1), 76.7, 74.9, 72.5, 70.3, 68.7, 62.5 (C-6), 39.6 (C-9), 32.0 (C-8). IR: $\tilde{\nu} = 2924, 2877, 2097, 1653, 1600, 1373, 1299, 1258, 1144, 1116, 1011, 918, 893, 873, 781, 758, 700$ cm⁻¹.

5.1.7 2-Acetamido-1, 3, 4, 6-tetra-O-acetyl-2-deoxy- β -D-galactohexapyranose (6)

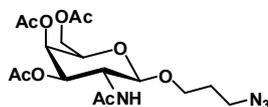


In einem 100 ml Kolben wurden 5 g D-Galactosaminhydrochlorid (1 Äq., 23 mmol) in 36 ml Pyridin (19 Äq., 441 mmol) bei -5°C (Kryostat) gerührt. Nach einer halben Stunde wurden 20 ml

Essigsäureanhydrid (9 Äq., 209 mmol) hinzu gegeben. Die Reaktion wurde 3 Tage bei -5°C bis 0°C unter Verwendung eines Kryostaten gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde in einem halben Liter Eiswasser ausgefällt und abfiltriert. Das Produkt wurde als weißer Feststoff erhalten und durch ^1H und ^{13}C NMR charakterisiert.^[140] Ausbeute: 7 g (79%).

GalNAc₅: AJ13 M = 389.35 g/mol; δ_{H} (500 MHz, MeOD/CDCl₃ 2/1) = 5.70 (d, 1H, J = 8.8 Hz, H-1), 5.36 (d, 1H, J = 3.0 Hz, H-4), 5.10 (dd, J = 11.4 Hz, J = 3.3 Hz, 1H, H-3), 4.29 (dd, J = 11.1 Hz, J = 9.0 Hz, 1H, H-2), 4.18-4.07 (m, 3H, H-5, H-6), 2.15 (Me), 2.09 (Me), 2.02 (Me), 1.97 (Me), 1.91 (Me). δ_{C} (100 MHz, CDCl₃) = 173.1 (C=O), 171.7 (C=O), 171.5 (C=O), 171.3 (C=O), 93.5 (C-1), 72.2 (C-5), 71.3 (C-3), 67.3 (C-4), 62.1 (C-6), 49.9 (H-2), 22.8 (Me), 20.8 (Me), 20.7 (Me), 20.7 (Me), 20.7 (Me).

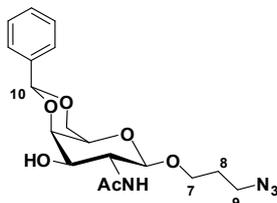
5.1.8 3-Azidopropanyl-2-acetamido-3, 4, 6-tri-O-acetyl-2-deoxy- β -D-galactohexapyranosid (7)



Die Reaktion wurde unter inerten Bedingungen durchgeführt. In einem ausgeheizten Schlenk Kolben wurde 0.6 g Azidopropanol (1.1 Äq., 5.7 mmol) in 3 ml DCM zwei Stunden über Molsieb gerührt. In einem weiteren Kolben wurde bei 0°C 2.0 g GalNAc₅ (1.0 Äq., 5.1 mmol) und 1.3 g TMSOTf (1.1 Äq., 5.7 mmol) in 5 ml für eine Stunde gerührt. Die beiden Lösungen wurden bei 0°C zusammen gegeben und dann 24 Stunden bei 0°C und 12 Stunden bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 ml NaHCO₃-Lösung beendet. Es wurde zweimal mit gesättigter NaHCO₃-Lösung und zweimal mit 1 M HCl-Lösung ausgeschüttelt. Die org. Phase wurde mit MgSO₄ getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel abdestilliert. Das Produkt war nach Extraktion ausreichend sauber und wurde mit ^1H und ^{13}C NMR charakterisiert. Ausbeute: 1.9 g (85%).

GalNAc₄-Azidopropanol: AJ40, M = 430.50 g/mol; δ_{H} (500 MHz, CDCl₃/MeOD 2/1) = 5.04 (d, J = 3.0 Hz, 1H, H-4), 4.79 (dd, J = 11.3 Hz, J = 3.4 Hz, 1H, H-3), 4.29 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H-1); 3.84 (d, J = 6.6 Hz, 2H, H-6), 3.80 (dd, J = 11.2 Hz, J = 8.5 Hz, 1H, H-2), 3.68 (t, J = 6.6 Hz, 1H, H-5), 3.66-3.62 (m, 1H, H-7), 3.32 (ddd, J = 9.9 Hz, J = 7.5 Hz, J = 5.1 Hz, 1H, H-7), 3.08 (t, J = 6.3 Hz, 2H, H-9), 1.85 (Me), 1.75 (Me), 1.67 (Me), 1.65 (Me), 1.59-1.49 (m, 2H, H-8). δ_{C} (100 MHz, MeOD) = 171.8 (C=O), 170.7 (C=O), 170.5 (C=O), 170.4 (C=O), 100.9 (C-1), 70.2 (C-3), 69.9 (C-5), 66.4 (C-4), 66.0 (C-7), 61.2 (C-6), 49.8 (C-2), 47.5 (C-9), 28.4 (C-8), 21.8 (Me), 19.7 (Me), 19.6 (Me), 19.6 (Me). ESI-TOF: C₁₈H₂₄N₄NaO₆⁺ m/z berechnet = 453.1592 erhalten = 453.1605. ESI-TOF: C₁₈H₂₄N₄NaO₆⁺ m/z berechnet = 415.1588 erhalten = 415.1604.

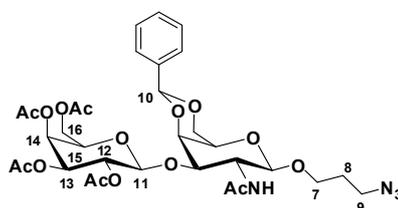
5.1.9 3-Azidopropanyl-2-acetamido-4, 6-benzyliden-2-deoxy- β -D-galactopyranosid (8)^[140]



Zuerst erfolgte die Entschützung von 1.2 g des peracetylierten Zuckers (1.0 Äq., 2.8 mmol) nach Zemplén mit frisch hergestellter NaOMe-Lösung, wie bereits in 5.1.5 beschrieben. Der entschützte Zucker wurde mehrmals mit DCM coevaporiert und dann in 15 ml Acetonitril gelöst. Es wurden 0.2 g Camphersulfonsäure (0.3 Äq., 0.7 mmol) und 1.3 g Benzaldehyddimethylacetal (3.0 Äq., 8.4 mmol) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch zwei Stunden bei 60°C am Rotationsverdampfer rotiert, um entstehendes MeOH abzudestillieren. Die Reaktion wurde durch Zugabe von NEt_3 beendet. Das Produkt wurde durch mehrmaliges Umkristallisieren aus Ethanol als farbloser Feststoff erhalten. Ausbeute: 0.6 g (44%).

GalNAcBzd-Azidopropanol: AJ52 M = 430.50 g/mol; δ_{H} (500 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1/2) = 7.36 (m, 2H, H-Ar), 7.16 (m, 3H, H-Ar), 5.39 (s, 1H, H-10), 4.31 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H-1), 4.09 (d, $J = 12.5$ Hz, 1H, H-6), 3.97 (d, 1H, $J = 3.3$ Hz, H-4); 3.91 (dd, $J = 12.4$ Hz, $J = 1.2$ Hz, 1H, H-6), 3.80-3.75 (m, 1H, H-7), 3.75-3.71 (m, 1H, H-2), 3.58 (dd, $J = 10.8$ Hz, $J = 3.4$ Hz, 1H, H-3), 3.40 (ddd, $J = 9.6$ Hz, $J = 7.8$ Hz, $J = 4.9$ Hz, 1H, H-7), 3.30 (s, 1H, H-5), 3.21 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, H-9), 1.81 (s, 3H, Me), 1.73-1.60 (m, 2H, H-8). δ_{C} (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1/2) = 172.5 (C=O), 137.3 (C-Ar), 128.7 (C-Ar), 127.7 (C-Ar), 126.1 (C-Ar), 101.0 (C-10), 100.7 (C-1), 75.1 (C-4), 70.2 (C-3), 68.8 (C-6), 66.2 (C-5), 65.5 (C-7), 52.8 (C-2), 47.8 (C-9), 28.6 (C-8), 22.3 (Me). ESI-TOF: $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{NaO}_6^+$ m/z berechnet = 415.1588 erhalten = 415.1604. IR: $\tilde{\nu} = 3517$ (w), 3453 (w), 3285 (s), 3066, 3044, 3006, 2989, 2979, 2953, 2934, 2908, 2882, 2861, 2159, 2097 (s), 1658 (s), 1544, 1499, 1451, 1425, 1406, 1367 (s), 1342, 1320, 1295, 1275, 1251, 1232, 1225, 1178, 1171, 1144, 1131, 1106, 1079, 1057 (s), 1034, 999, 963, 947, 899, 891, 863, 822, 770, 737 (s), 696 cm^{-1} .

5.1.10 3-Azidopropyl-3-O-(2, 3, 4, 6-tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-2-acetamido-4, 6-O-benzyliden-2-deoxy- β -D-galactopyranosid (11)

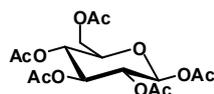


Unter inerten Bedingungen wurde in einem ausgeheizten Kolben 200 mg des Galactose Schmidt-Donors (1.0 Äq., 0.5 mmol) und 760 mg 1-Azidopropanol-2-acetamido-4, 6-benzyliden- β -D-galactohexapyranosid (1.1 Äq, 0.6 mmol) in DCM gelöst. Dann wurde bei 0°C 800 mg TMSOTf (0.02 Äq., 0.01 mmol) hinzugegeben und über Nacht gerührt. Es wurde NEt_3 zum Beenden der

Reaktion hinzugegeben und das LM abdestilliert. Das Produkt wurde durch mehrfache Säulenchromatographie gereinigt (Kieselgel; Eluent: DCM/MeOH). Ausbeute: 101 mg (27%).

GalAc₄(1-3)GalNAcBzd-Azidopropanol: AJ82 M = 722.69 g/mol; δ_{H} (500 MHz, CDCl₃/MeOD 1/2) = 7.52 (m, 2H, H-Ar), 7.35 (m, 3H, H-Ar), 8.85 (broad m, 1H, NH), 5.55 (s, 1H, H-10), 5.36 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H, H-14), 5.22 (dd, $J = 10.3$ Hz, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-12), 5.12 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-1), 4.98 (dd, $J = 10.5$ Hz, $J = 3.4$ Hz, 1H, H-13), 4.78 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-11), 4.68 (dd, $J = 11.1$ Hz, $J = 3.4$ Hz, 1H, H-3), 4.31 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H, H-6), 4.29 (t, 1H, $J = 3.4$ Hz, $J = 1.2$ Hz, H-4), 4.13 (dd, 2H, H-16), 4.05 (dd, $J = 12.3$ Hz, $J = 1.2$ Hz, 1H, H-6), 3.95 (dt, $J = 10.2$ Hz, $J = 5.7$ Hz, 1H, H-7), 3.88 (t, 1H, $J = 6.3$ Hz, H-15), 3.58 (ddd, $J = 10.1$ Hz, $J = 7.3$ Hz, $J = 5.4$ Hz, 1H, H-7), 3.49 (s, 1H, H-5), 3.45 (dd, $J = 7.4$ Hz, $J = 3.1$ Hz, 1H, H-2) 3.36 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, H-9), 2.15 (s, 3H, Me), 2.03 (s, 3H, Me), 2.02 (s, 3H, Me), 1.97 (s, 3H, Me), 1.97 (s, 3H, Me), 1.89-1.79 (m, 2H, H-8). δ_{C} (100 MHz, CDCl₃/MeOD 1/2) = 179.2 (C=O), 171.0 (C=O), 170.3 (C=O), 170.2 (C=O), 170.0 (C=O), 169.1 (C=O), 137.8 (C-Ar), 129.1 (C-Ar), 128.8 (C-Ar), 128.1(C-Ar), 126.4 (C-Ar), 126.1(C-Ar), 101.1 (C-11), 100.6 (C-10), 99.0 (C-1), 75.8 (C-4), 75.5 (C-3), 71.0 (C-13), 70.9 (C-15), 69.3 (C-6), 69.1 (C-12), 67.5 (C-14), 66.5 (C-5), 66.2 (C-7), 61.7 (C-16), 54.3 (C-2), 48.3 (C-9), 28.9 (C-8), 23.7 (Me) 20.8 (Me), 20.7 (Me), 20.5 (Me). ESI-TOF: C₃₂H₄₂N₄NaO₁₅⁺ m/z berechnet = 745.2539 erhalten = 745.2598. IR: $\tilde{\nu} = 3283, 3025, 2970, 2928, 2859, 2096$ (s), 1743 (s), 1654, 1557, 1542, 1455, 1435, 1367 (s), 1304, 1217 (s), 1169, 1136, 1076, 1052 (s), 1007, 953, 915, 902, 861, 822, 736, 700 cm⁻¹.

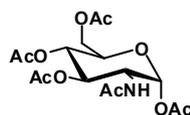
5.1.11 D- β -Glucosepyranosepentaacetate (13)^[134]



Die Synthese des D- β -Glucosepyranosepentaacetats erfolgte nach der bereits beschriebenen Acetylierungsmethode (siehe 5.1.1). Das Produkt wurde mit ¹H und ¹³C NMR charakterisiert.^[141] Ausbeute nach Umkristallisation aus Ethanol: 31.6 g (58%).

GlcAc₅: M = 390.34 g/mol, Schmelzpunkt: 123°C, δ_{H} (500 MHz, CDCl₃) = 5.69 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H-1), 5.22 (t, $J = 9.4$ Hz, 1H, H-3), 5.11 (dd, $J = 9.3$ Hz, $J = 2.6$ Hz, 1H, H-4), 5.09 (dd, 1H, $J = 9.7$ Hz, $J = 3.8$ Hz, H-2), 4.26 (dd, $J = 12.5$ Hz, $J = 4.5$ Hz, 1H, H-6), 4.08 (dd, $J = 12.5$ Hz, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-6), 3.82 (ddd, 1H, $J = 10.1$ Hz, $J = 4.4$ Hz, $J = 2.1$ Hz, H-5), 2.08 (s, 3H, Me), 2.05 (s, 3H, Me), 2.00 (s, 6H, Me), 1.98 (s, 3H, Me). δ_{C} (100 MHz, CDCl₃) = 170.5 (C=O), 170.0 (C=O), 169.3 (C=O), 169.2 (C=O), 168.9 (C=O), 99.9, 91.6 (C-1), 72.7 (C-5), 72.7 (C-3), 70.2 (C-4), 67.7 (C-2), 61.4 (C-6), 20.7 (Me), 20.5 (Me), 20.5 (Me), 20.4 (Me).

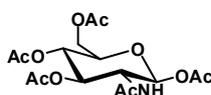
5.1.12 2-Acetamido-2-deoxy-1, 3, 4, 6-tetra-O-acetyl- α -D-glucopyranose (14)



Die Reaktion wurde unter inerten Bedingungen durchgeführt. 20.0 g des D-Glucosaminhydrochlorids (1.0 Äq. 92.8 mmol) wurden in 120 ml Pyridin (16 Äq., 1484.0 mmol) gelöst. Es wurden 78 ml Essigsäureanhydrid (9 Äq., 834.8 mmol) und eine Spatelspitze DMAP hinzugegeben und das Gemisch wurde über Nacht gerührt. Da das entstandene Produkt sehr gut wasserlöslich war, wurde auf eine Ausfällung aus Wasser verzichtet. Das Pyridin wurde am Rotationsverdampfer

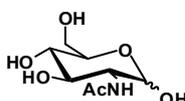
abdestilliert und der Rückstand in DCM aufgenommen und mit kaltem Wasser und anschließend kalter 1 M HCl- und gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit MgSO₄ getrocknet, abfiltriert und am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Die Charakterisierung des Produkts erfolgte durch ¹H und ¹³C NMR und entsprach der Literatur.^[142] Aubeute (α -Anomer): 27.9 g (77%).

α -GlcNAc₅: AJ31 M = 389.35 g/mol; δ_{H} (500 MHz, CDCl₃) = 6.11 (d, J = 3.6 Hz, 1H, H-1), 5.77 (d, J = 9.1 Hz, 1H, NH), 5.20 (m, 2H, H-3, H-4), 4.44 (m, J = 10.1, J = 9.2 Hz, J = 3.6 Hz, 1H, H-2), 4.19 (dd, J = 12.5, J = 4.1 Hz, 1H, H-6), 4.01 (dd, J = 12.5 Hz, J = 2.3 Hz, 1H, H-6), 3.96 (ddd, J = 9.6 Hz, J = 3.8 Hz, J = 2.5 Hz, 1H, H-5), 2.14 (s, 3H, Me), 2.03 (s, 3H, Me), 2.00 (s, 3H, Me), 1.99 (s, 3H, Me), 1.88 (s, 3H, Me). δ_{C} (100 MHz, CDCl₃) = 171.6 (C=O), 170.6 (C=O), 169.9 (C=O), 169.0 (C=O), 168.6 (C=O), 99.9, 90.6 (C-1), 70.6 (C-3), 69.6 (C-5), 67.4 (C-4), 61.5 (C-6), 51.0 (C-2), 23.0 (Me), 20.9 (Me), 20.6 (Me), 20.6 (Me), 20.5 (Me).



β -GlcNHAc₅: AJ31 M = 389.35 g/mol; δ_{H} (500 MHz, CDCl₃) = 5.68 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H-1), 5.40 (d, J = 2.9 Hz, 1H, NH), 5.31 (dd, J = 10.3 Hz, J = 8.3 Hz, 1H, H-3) 5.05 (dd, J = 10.4 Hz, J = 3.4 Hz, 1H, H-4), 4.01-4.18 (m, J = 10.1 Hz, J = 9.2 Hz, J = 3.6 Hz, 1H, H-2), 2.14 (s, 3H, Me), 2.10 (s, 3H, Me), 2.02 (s, 3H, Me), 2.02 (s, 3H, Me), 1.97 (s, 3H, Me). δ_{C} (100 MHz, CDCl₃) = 171.6 (C=O), 170.6 (C=O), 169.9 (C=O), 169.0 (C=O), 168.6 (C=O), 99.9 (?), 90.6 (C-1), 70.6 (C-3), 69.6 (C-5), 67.4 (C-4), 61.5 (C-6), 51.0 (C-2), 23.0 (Me), 20.9 (Me), 20.6 (Me), 20.6 (Me), 20.5 (Me).

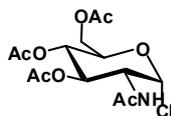
5.1.13 2-Acetamido-D-glucohexapyranose (67)



In einem ausgeheizten Zweihalskolben wurden 5.0 g NaOMe (1 Äq., 92.8 mmol) in 120 ml MeOH bei 0°C gelöst. Dann wurde in drei Portionen 20.0 g D-Glucosaminhydrochlorid (1 Äq., 92.8 mmol) hinzugegeben und eine halbe Stunde bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde wieder auf 0°C herunter gekühlt, 9.5 ml Essigsäureanhydrid (1 Äq., 92.8 mmol) wurden langsam hinzuge tropft und die Mischung 16 Stunden bei RT gerührt. Der Kolben wurde am nächsten Tag für eine Stunde in den Kühlschrank gestellt, das ausgefallene Produkt abfiltriert und mit Diethylether gewaschen. Das ¹H und ¹³C NMR entsprach der Literatur.^[142a] Ausbeute: quantitativ. Anomerenverhältnis: α : β 2.5:1.

GlcNAc: AJ42 M = 221.21 g/mol; δ_{H} (400 MHz, MeOD) = 5.14 (d, J = 3.5 Hz, 1H, H-1 α), 4.64 (d, J = 8.4 Hz, 0.40H, H-1 β), 3.82 (m, J = 12.1, J = 7.9 Hz, J = 3.0 Hz, 3H), 3.78-3.69 (m, 2H), 3.63 (dd, J = 10.3 Hz, J = 8.3 Hz, 0.37H), 3.50-3.34 (m, 1H), 2.03 (s, 3H, Me). δ_{C} (100 MHz, MeOD) = 174.7 (C-Ac β), 174.3 (C-Ac α), 96.2 (C-1 β), 92.0 (C-1 α), 77.2 (C-3 β), 75.2(C-4 β), 72.6 (C-5 α), 71.9 (C-3 α), 71.5 (C-4 α), 70.9 (C-4 β), 62.0 (C-6 β), 61.9 (C-6 α), 58.0 (C-2 β), 55.3 (C-2 α), 22.9 (Me β), 22.6 (Me α).

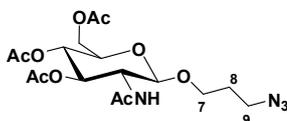
5.1.14 1-Chloro-2-acetamido-3, 4, 6-tri-O-acetyl-2-deoxy- α -D-glucopyranosid (68)^[143]



In einem Kolben wurden 2.23 g *N*-Acetylglucosamin (1 Äq., 10.3 mmol) in 11 ml Acetylchlorid (11 Äq., 113.8 mmol) suspendiert. Durch die Suspension wurde für eine halbe Stunde gasförmige HCl geleitet und der verschlossene Kolben drei Tage über Nacht im Kühlschrank gelagert. Das Lösungsmittel wurde abdestilliert, der Rückstand in Chloroform aufgenommen und mit kalter gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde getrocknet, am Rotationsverdampfer eingengt und durch Zugabe von Diethylether wurde das Produkt ausgefällt und direkt weiter umgesetzt. Ausbeute: 0.6 g (16%).

GlcNAc₄Cl: AJ44 M = 365.76 g/mol, IR: $\tilde{\nu}$ = 2744, 2541, 2359, 1763, 1753, 1737, 1652, 1597, 1588, 1577, 1558, 1518, 1457, 1435, 1380, 1366, 1241, 1220, 1210, 1196, 1144, 1118, 1071, 1031, 1015, 980, 957, 925, 894, 850 cm⁻¹.

5.1.15 3-Azidopropyl-2-acetamido-3, 4, 6-tri-O-acetyl-2-deoxy- β -D-glucohexapyranosid (69)

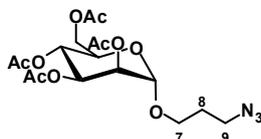


400 mg 1-Chloro-2-acetamido-3, 4, 6-tri-O-actyl- α -D-glucohexapyranosid (1.0 Äq., 1.1 mmol) wurden zusammen mit 1020 mg Azidopropanol (9.2 Äq., 10.1 mmol) gerührt. Bei 0°C wurden 220 mg AgNO₃ (1.2 Äq., 1.3 mmol) hinzugegeben und die Mischung wurde über Nacht gerührt, wobei ein weißer Niederschlag entstand. Die Reaktionslösung wurde in DCM aufgenommen, es wurde Celite hinzugegeben, abfiltriert und mehrfach mit DCM gewaschen. Das Filtrat wurde zweimal mit gesättigter NaHCO₃ und einmal mit gesättigter NaCl-Lösung ausgeschüttelt, über MgSO₄ getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel; Eluent: DCM/MeOH 9/1). Das ¹H und ¹³C NMR entsprach der Literatur.^[144] Ausbeute: 6%.

GlcNAc₄-Azidopropanol: AJ39 M = 430.41 g/mol; δ_H (500 MHz, CDCl₃) = 5.61 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, NH), 5.22 (m (t), 1H, H-3), 5.06 (t, *J* = 9.6 Hz, 1H, H-4), 4.61 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-1), 4.25 (dd, *J* = 12.3 Hz, *J* = 4.8 Hz, 1H, H-6), 4.13 (dd, *J* = 12.3 Hz, *J* = 3.1 Hz, 1H, H-6), 3.97-3.91 (m, 1H, H-7), 3.93-3.89 (m, 1H, H-2), 3.69 (ddd, *J* = 9.9 Hz, *J* = 4.6 Hz, *J* = 2.3 Hz, 1H, H-5), 3.58 (m, 1H, H-7), 3.41-3.32 (m, 2H, H-9), 2.07 (Me), 2.03 (Me), 2.02 (Me), 1.95 (Me), 1.92-1.82 (m, 2H, H-8). δ_C (100 MHz, CDCl₃) = 179.2, 172.0 (C=O), 170.7 (C=O), 170.2

(C=O), 169.3 (C=O), 101.0 (C-1), 72.4 (C-3), 71.8 (C-5), 68.5 (C-4), 66.2 (C-7), 62.1 (C-6), 54.5 (C-2), 48.0 (C-9), 28.9(C-8), 27.4, 23.3 (Me), 20.7 (Me), 20.7 (Me), 20.6 (Me).

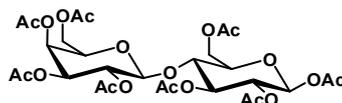
5.1.16 3-Azidopropyl-2, 3, 4, 6-tetra-O-acetyl- β -D-mannosehexapyranosid (70)



Die Reaktion wurde unter inerten Bedingungen durchgeführt. In einem ausgeheizten Schlenk Kolben wurde 0.6 g Azidopropanol (1.2 Äq., 6.2 mmol) und 2.0 g ManAc₅ (1.0 Äq., 5.1 mmol) in DCM über Molsieb für zwei Stunden gerührt. Bei 0°C wurden langsam 2.9 g BF₃·OEt (1.1 Äq., 5.7 mmol) hinzugegeben und für 24 Stunden gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von NaHCO₃ beendet. Es wurde zweimal mit gesättigter NaHCO₃-Lösung und zweimal mit 1 M HCl-Lösung ausgeschüttelt. Die org. Phase wurde über MgSO₄ getrocknet, dieses abfiltriert und das Lösungsmittel abdestilliert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel; Eluent: DCM/MeOH 9/1). ¹H und ¹³C NMR-Spektren entsprachen laut Literatur dem α -Anomer.^[145] Ausbeute: 0.6 g (26%).

ManAc₄-Azidopropanol: AJ161 M = 431.39 g/mol; δ_{H} (500 MHz, CDCl₃) = 5.10 (m, 2H, H-3, H-4), 5.05 (dd, $J = 3.3$ Hz, $J = 1.7$ Hz, 1H, H-2), 4.65 (d, $J = 1.7$ Hz, H-1), 4.09 (dd, $J = 12.2$ Hz, $J = 5.5$ Hz, 1H, H-6), 3.94 (dd, $J = 12.2$ Hz, $J = 2.5$ Hz, 1H, H-6), 3.80 (ddd, $J = 9.6$ Hz, $J = 5.5$ Hz, $J = 2.5$ Hz, 1H, H-5), 3.65 (ddd, $J = 9.9$ Hz, $J = 6.8$ Hz, $J = 5.5$ Hz, 1H, H-7), 3.37 (dt, $J = 9.8$ Hz, $J = 5.9$ Hz, 1H, H-7), 3.27 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, H-9), 1.97 (s, 3H, Me), 1.92 (s, 3H, Me), 1.87 (s, 3H, Me), 1.81 (s, 3H, Me), 1.74 (m, 2H, H-8). δ_{C} (100 MHz, CDCl₃) = 170.1 (C=O), 169.6 (C=O), 169.5 (C=O), 169.3 (C=O), 97.3 (C-1), 69.1 (C-2), 68.7 (C-4), 68.3 (C-5), 65.7 (C-3), 64.5 (C-7), 62.1 (C-6), 47.8 (C-9), 28.3 (C-8), 20.4 (Me), 20.3 (Me), 20.3 (Me), 20.3 (Me).

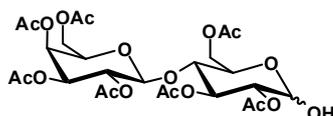
5.1.17 β -D-Lactoseoctacetat (12)^[146]



In einem 250 ml Zweihalskolben mit Rückflusskühler wurden 2.6 g NaOAc (1.1 Äq, 32.1 mmol) in 40.0 ml Essigsäureanhydrid (14.0 Äq., 409.0 mmol) gelöst. Die Mischung wurde auf 165°C erhitzt, 10.0 g Lactose wurden hinzugegeben und es wurde für weitere 10 Minuten zum Sieden erhitzt. Die heiße Mischung wurde unter starkem Rühren direkt in 1.5 l Eiswasser geschüttet. Es fiel eine sirupartige Substanz aus. Durch mehrmaliges Wechseln des Wassers innerhalb der nächsten 12 Stunden verfestigte sich das Rohprodukt zusehends und konnte abfiltriert werden. Der Feststoff wurde in DCM gelöst und zweimal mit gesättigter NaHCO₃- und gesättigter NaCl-Lösung ausgeschüttelt, über MgSO₄ getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. ¹³C und ¹H NMR entsprachen der Literatur.^[147] Ausbeute: 10.5 g (53%).

LacAc₈: AJ118 M = 678.59 g/mol; δ_{H} (500 MHz, CDCl₃) = 5.65 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H-1), 5.33 (dd, J = 3.4 Hz, J = 1.0 Hz, 1H, H-4'), 5.22 (t, J = 9.5 Hz, 1H, H-3), 5.09 (dd, J = 10.4 Hz, J = 8.0 Hz, 1H, H-2'), 5.02 (dd, J = 9.5 Hz, J = 8.5 Hz, 1H, H-2), 4.94 (dd, J = 10.2 Hz, J = 3.4 Hz, 1H, H-3'), 4.46 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H-1'), 4.43 (dd, J = 12.2 Hz, J = 2.0 Hz, 1H, H-6), 4.14-4.04 (m, 3H, H-6, 2xH-6'), 3.87-3.81 (m, 2H, H-4, H-5'), 3.74 (ddd, J = 9.8 Hz, J = 4.8 Hz, J = 2.0 Hz, 1H, H-5), 2.14 (s, 3H, Me), 2.10 (s, 3H, Me), 2.08 (s, 3H, Me), 2.05 (s, 3H, Me), 2.03 (s, 3H, Me), 2.03 (s, 3H, Me), 2.01 (s, 3H, Me), 1.95 (s, 3H, Me). δ_{C} (100 MHz, CDCl₃) = 170.5, 170.4, 170.2, 170.2, 169.7, 169.7, 169.1, 169.0 (8xs, C-Ac), 101.0 (C-1'), 91.7 (C-1), 75.8 (C-4), 73.6 (C-5), 72.7 (C-3), 71.1 (C-3'), 70.9 (C-5'), 70.6 (C-2), 69.1 (C-2'), 66.7 (C-4'), 61.9 (C-6), 61.0 (C-6'), 20.9, 20.9, 20.9, 20.7, 20.7, 20.7, 20.6 (7xs, Me).

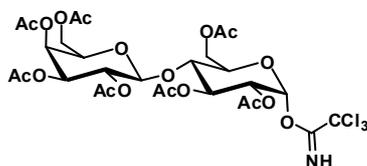
5.1.18 D-Lactoseheptaacetat (71)



Die Entschützung des anomeren Zentrums erfolgte wie in Abschnitt 5.1.2 D-Galactopyranosetetraacetat beschrieben. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung weiter verwendet. Ausbeute: 96%.

LacAc₇OH: M = 636.55 g/mol

5.1.19 D-Lactoseheptaacetattrichloroacetimidat (72)

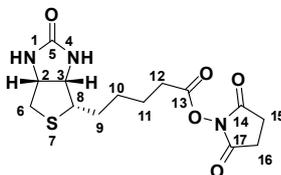


Die Synthese folgte der in Abschnitt 5.1.3 beschriebenen Synthese des Galactosederivates. Die Charakterisierung mittels ¹H und ¹³C entsprach der Literatur.^[148] Ausbeute: 75%.

LacAc₇NHCCl₃: LK4 M = 962.20 g/mol; δ_{H} (400 MHz, CDCl₃) = 8.65 (s, 1H, NHCCl₃), 6.46 (d, J = 3.8 Hz, 1H, H-1), 5.53 (t, J = 9.7 Hz, 1H, H-3), 5.33 (d, J = 2.5 Hz, 1H, H-4'), 5.28 (DCM), 5.10 (dd, J = 10.4 Hz, J = 7.9 Hz, 1H, H-2'), 5.04 (dd, J = 10.1 Hz, J = 3.8 Hz, 1H, H-2), 4.94 (dd, J = 10.4 Hz, J = 3.4 Hz, 1H, H-3'), 4.50 (d, J = 7.9 Hz, 1H, H-1'), 4.46 (m, 1H, H-6), 4.11 (m, 4H, 2xH-6', H-6, H-5), 3.87 (m, 2H, H-4, H-5'), 2.15 (s, 3H, Me), 2.14 (s, 3H, Me), 3.09 (s, 3H, Me), 2.05 (s, 3H, Me), 2.04 (s, 3H, Me), 2.02 (s, 3H, Me), 1.99 (s, 3H, Me), 1.94 (s, 3H, Me). δ_{C} (100 MHz, CDCl₃) = 170.4, 170.3, 170.2, 170.2, 170.2, 169.5, 169.2 (7xC-Ac), 161.1 (C=NH), 101.3 (C-1'), 93.0 (C-1), 90.3 (CCl₃), 76.0 (C-4), 71.2 (C-3'), 71.0 (C-5), 70.8 (C-5'), 70.0 (C-2), 69.7 (C-3), 66.2 (C-4'), 66.7 (C-6), 61.6 (C-6), 60.9 (C-6'), 31.0, 21.0, 20.9, 20.8, 20.7, 20.6, 20.6 (6x, Me).

5.2 SYNTHESE DER BIOTINDERIVATE

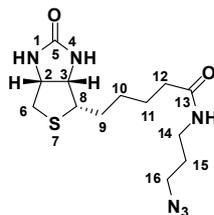
5.2.1 Biotin-NHS-Ester (16)



Die Reaktion wurde unter inerten Bedingungen durchgeführt. In einem ausgeheizten Zweihalskolben wurden 203 mg D-Biotin (1.0 Äq., 0.8 mmol) in 6 ml DMF unter Erhitzen gelöst. Dann wurde 100 mg HOSu (1 Äq., 0.8 mmol) und 170 mg DCC (1 Äq., 0.8 mmol) hinzugegeben und 16 Stunden bei RT gerührt. Das LM wurde abdestilliert und das schwerlösliche, weiße, pulvrige Rohprodukt ohne weitere Aufarbeitung weiter verwendet. Ausbeute: 179 mg (63%).

Biotin-NHS-Ester: AJ54 M = 341.38 g/mol.

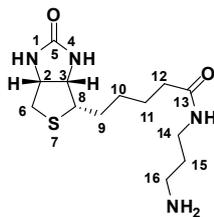
5.2.2 Biotin-Azid (17)



Die Reaktion wurde unter inerten Bedingungen durchgeführt. Unter Erwärmung (60°C) wurden 179 mg Biotin-NHS-Ester (1.0 Äq. 0.5 mmol) in 10 ml DMF gelöst und 100 mg Azidopropanol (1.9 Äq, 1.0 mmol) hinzugegeben. Die Reaktion wurde über Nacht bei RT gerührt. Es erfolgte Reaktionskontrolle mittels DC (DCM/MeOH 9/1, $R_f = 0.8$, Anfärbung mit Anisaldehydfärbelösung: erst gelbe dann braune Färbung des Produktflecks). Das DMF wurde am Rotationsverdampfer abdestilliert und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (NP Kieselgel, Eluent: Gradient: 100% DCM bis zu 10% MeOH). Die spektroskopischen Daten entsprachen der Literatur.^[149] Aubeute: 144 mg (84%).

Biotin-Azid: AJ612F M = 326.42 g/mol; δ_H (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1/1) = 7.33 (t, 1H, $J = 5.2$ Hz, AmidH), 6.07 (s, 1H, NH), 5.89 (s, 1H, NH), 4.29 (dd, $J = 7.7$ Hz, $J = 4.8$ Hz, 1H, H-2), 4.09 (dd, $J = 7.8$ Hz, $J = 4.5$ Hz, 1H, H-3), 3.13 (m, $J = 6.7$ Hz, 2H, H-16), 3.03-3.07 (m, 2H, H-14), 2.93-2.97 (m, $J = 7.4$ Hz, 1H, H-8), 2.70 (dd, $J = 12.9$ Hz, $J = 4.9$ Hz, 1H, H-6), 2.52 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, H-6), 1.98 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, H-12), 1.56 (q, $J = 13.5$ Hz, $J = 6.7$ Hz, 2H, H-15), 1.36-1.51 (m, 4H, H-9, H-11), 1.27-1.14 (m, 2H, H-10). δ_C (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1/1) = 174.2 (C-13), 174.1 (C-13), 164.0 (C-5), 61.5 (C-3), 59.8 (C-2), 55.3 (C-8), 48.6 (C-16), 39.9 (C-6), 36.4 (C-14), 36.3, 35.3 (C-12), 35.3, 28.1 (C-9 od. C-11), 28.0 (C-9 od. C-11), 27.7 (C-10), 25.1(C-15). ESI-TOF: $\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}^+$ m/z berechnet = 327.1598 erhalten = 349.1423. IR: $\tilde{\nu} = 2925$ (s), 2856, 2101, 1959, 1694, 1679, 1645, 1548, 1464, 1418, 1384, 1323, 1265 cm^{-1} .

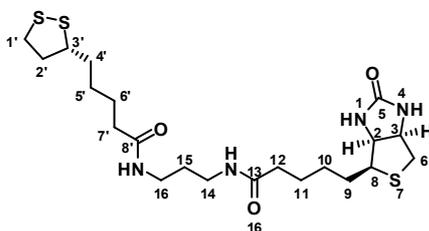
5.2.3 Biotin-Amin (18)



Die Reduktion des Biotin-Azids zum entsprechenden Amin, erfolgte unter Staudinger-Bedingungen. 367 mg des Biotin-Azids (1 Äq., 1.1 mmol) wurden in 9 ml THF suspendiert, dann wurden 443 mg Triphenylphosphin hinzugegeben und auf 60°C erwärmt. Es wurde eine leichte Gasentwicklung beobachtet und nach Zugabe von 1 ml Milliporewasser wurde die Reaktion drei Tage gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abdestilliert. Das Produkt wurde erst mit einer Extraktion der wäßrigen Phase mit Toluol von den größten Anteilen an PPh₃ und PPh₃=O getrennt. Das NMR zeigte jedoch weiterhin leichte Signale im Aromatenbereich und so wurde eine das Produkt in Toluol ausgefällt, woraufhin keine Verunreinigungen mehr nachweisbar waren. Das NMR entsprach der Literatur.^[150] Ausbeute: 302 mg (89%).

Biotin-Amin: AJ259 M = 300.42 g/mol; δ_{H} (500 MHz, MeOD) = 7.68 (m, NH), 7.28 (m, NH), 6.53 (s, NH), 6.46 (s, NH), 4.50 (dd, $J = 7.7$ Hz, $J = 4.8$ Hz, 1H, H-2), 4.31 (dd, $J = 7.9$ Hz, $J = 4.5$ Hz, 1H, H-3), 3.27 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, H-14), 3.21 (ddd, $J = 9.1$ Hz, $J = 5.7$ Hz, $J = 4.6$ Hz, 1H, H-8), 2.93 (dd, $J = 12.8$ Hz, $J = 5.0$ Hz, 1H, H-6), 2.85 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, H-16), 2.71 (d, $J = 12.7$ Hz, H-6), 2.23 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, H-12), 1.78 (p, $J = 6.9$ Hz, 2H, H-15), 1.75-1.55 (m, 4H, H-9, 1H, H-11), 1.45 (q, $J = 7.5$ Hz, 2H, H-10). δ_{C} (125 MHz, MeOD) = 176.7 (C-13), 166.1 (C-5), 63.4 (C-3), 61.6 (C-2), 57.0 (C-8), 41.0 (C-6), 38.7 (C-16), 37.1 (C-14), 36.7 (C-12), 30.2 (C-15), 29.8 (C-10), 29.5 (C-9), 26.8 (C-11) ESI-TOF: C₁₃H₂₅N₄O₂S⁺ m/z berechnet = 301.1693 erhalten = 301.1693. IR: $\tilde{\nu} = 2938$ (s), 2858, 2830, 2520, 2364, 1680, 1651, 1551, 1462, 1399, 1333, 1314, 1267, 1119, 1060, 1020 (s), 860, 762 cm⁻¹.

5.2.4 Biotin-TAA (19)

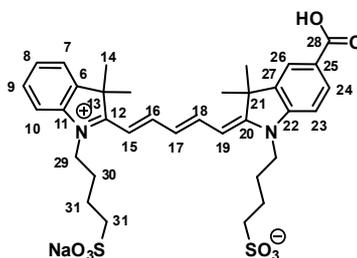


In einem 50 ml Kolben wurden 42 mg Liponsäure (TA, 1 Äq., 0.2 mmol) in 1 ml DMF gelöst und eine Stunde mit 104 mg HSTU (1.1 Äq., 0.2 mmol) und 188 μ l DIPEA (6.0 Äq., 1.1 mmol) gerührt. Es wurden 56 mg Biotinamin hinzugegeben und nochmals über Nacht bei RT gerührt. Das DMF wurde am Rotationsverdampfer abdestilliert (<60°C) und das Produkt säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, Eluent: Gradient DCM/MeOH). Ausbeute: 48 mg (53%).

Biotin-TAA: AJ271 M = 488.73 g/mol; δ_{H} (500 MHz, MeOD) = 7.75 (m, NH_{Amid}), 7.47 (m, NH_{Amid}), 6.96 (s, NH), 6.85 (s, NH), 4.49 (dd, $J = 7.8$ Hz, $J = 4.8$ Hz, 1H, H-2), 4.31 (dd, $J = 7.9$ Hz, $J = 4.5$ Hz, 1H, H-3), 3.59 (ddd, $J = 12.1$ Hz, $J = 8.9$ Hz, $J = 6.3$, 1H, H-3'), 3.19 (m, 5H, H-8, H-14, H-16), 3.17 (m, 1H, H-1'), 3.10 (m, 1H, H-1'), 2.93 (dd, $J = 12.8$ Hz, $J = 5.0$ Hz, 1H, H-6), 2.71 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H, H-6), 2.46 (dq, $J = 12.4$ Hz, $J = 6.4$ Hz, $J = 6.3$ Hz, 1H, H-2'), 2.21 (m, 4H, H-12, H-7'), 1.89 (dq, $J = 13.6$ Hz, $J = 6.9$ Hz, $J = 6.9$ Hz, 1H, H-2'), 1.76-1.31 (m, 14H, H-9, H-10, H-11, H-15, H-4', H-5', H-6'), 1.29 (Schliffett), 0.90 (Schliffett). δ_{C} (125 MHz, MeOD) = 176.1 (C=O), 176.1 (C=O), 63.4 (C-3), 61.6 (C-2), 57.6 (C-3'), 57.0 (C-8), 41.3 (C-2'), 41.1 (C-6), 39.4 (C-1'), 37.8 (C-14), 36.9 (C-16), 36.8 (C-12), 35.7, 30.3, 29.9, 29.7, 29.5, 26.8, 26.7 (C-9, C-10, C-11, C-15, C-4', C-5', C-6'). ESI-TOF: $\text{C}_{21}\text{H}_{36}\text{KN}_4\text{O}_3\text{S}_3^+$ m/z berechnet = 527.1581 erhalten = 527.2049. IR: $\tilde{\nu} = 2981, 2924, 2852, 2736, 1781, 1705$ (s), 1648, 1613, 1542, 1462, 1434, 1393, 1213, 1130, 1075, 1052, 1032, 999, 840, 716 cm^{-1} .

5.3 SYNTHESE DER CYANIN-FARBSTOFFDERIVATE

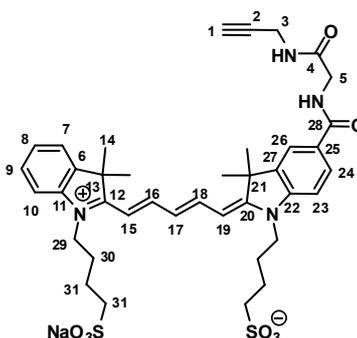
5.3.1 CyKai-COOH



Zur Verfügung gestellt von mivenion.^[105] NW157.1.

CyKai-COOH: NW157.1 M = 692.82 g/mol; δ_{H} (500 MHz, MeOD) = 8.32 (m, 1H, H_{PM}), 8.21 (m, 1H, H_{PM}), 8.06 (dd, $J = 8.4$ Hz, $J = 1.7$ Hz, 1H, H_{Ar}), 8.02 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, H_{A}), 7.49 (m, 3H, H_{Ar}), 7.33 (m, 2H, H_{Ar}), 6.72 (t, $J = 12.4$ Hz, 1H, H_{PM}), 6.53 (d, $J = 14.0$ Hz, 1H, H_{PM}), 6.27 (d, $J = 13.2$ Hz, 1H, H_{PM}), 4.88 (H_2O), 4.25 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, CH_2 -Alkyl), 4.10 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H, CH_2 -Alkyl), 2.92 (m, 4H, q Alkyl- CH_2), 2.15-1.93 (m, 8H, CH_2 -Alkyl), 1.74, 1.73 (2xs, 12H, H-14).

5.3.2 CyKai-G-Linker (20)

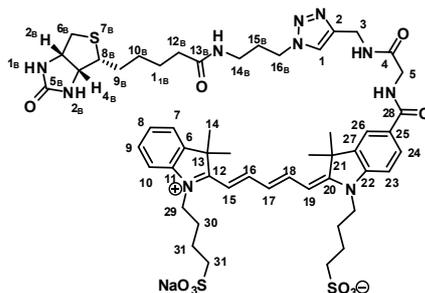


Die Reaktion wurde unter inerten Bedingungen durchgeführt. In einem ausgeheizten Schlenkrohr wurden 42 mg CyKai-COOH (1 Äq., 0.06 mmol), 33 mg TBTU (1.7 Äq., 0.10 mmol) und 60 μl DIPEA in 3 ml DMF eine halbe Stunde gerührt. Dann wurden 21 mg 2-Amino-N-(prop-2-in-1-yl)-acetamid, G-Linker, (1.5 Äq., 0.09 mmol) hinzugegeben und über Nacht gerührt. Die Reaktion wurde durch Ausfällen der Reaktionslösung in 400 ml Diethylether beendet. Der blaue Feststoff

wurde eine Stunde später abfiltriert (Glasfritte P4). Das Rohprodukt wurde mit MeOH und Wasser aus der Fritte gelöst, das LM wurde einrotiert und das Rohprodukt säulenchromatographisch an der Rf-CombiFlash aufgereinigt (13 g RP Kieselgel, Gradient: von 40% MeOH/Wasser + 0.1% TFA auf 60% MeOH/Wasser + 0.1% TFA). Ausbeute: 46 mg (97%).

CyKai-G-Linker: AJ97 M = 786.93 g/mol; δ_H (700 MHz, MeOD/CDCl₃ 1/1) = 8.29 (m, 1H, H_{PM}), 8.20 (m, 1H, H_{PM}), 7.96 (d, J = 1.7 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.93 (dd, J = 8.3 Hz, J = 1.8 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.53 (d, J = 7.4 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.44 (m, 2H, H_{Ar}), 7.33 (m, 2H, H_{Ar}), 6.71 (t, J = 12.4 Hz, 1H, H_{PM}), 6.50 (d, J = 14.0 Hz, 1H, H_{PM}), 6.28 (d, J = 13.3 Hz, 1H, H_{PM}), 4.92 (H₂O), 4.23 (t, J = 7.5 Hz, 2H, m H-Alkyl), 4.10 (t, J = 6.6 Hz, 2H, n H-Alkyl), 4.06 (s, 2H, H-5), 4.01 (d, J = 2.6 Hz, 2H, H-3), 2.92 (m, 4H, q Alkyl-CH₂), 2.59 (t, J = 2.6 Hz, 1H, H-1), 2.03-1.93 (m, 8H, s Alkyl-CH₂), 1.73 (2xs, 12H, H-14). δ_C (125 MHz, MeOD) = 176.8, 172.7, 171.6, 169.7, 156.8 (C_{PM}), 154.5 (C_{PM}), 146.9, 143.2, 143.1, 142.3, 130.4 (C_{Ar}), 130.0 (C_{Ar}), 129.9 (C_{PM}), 127.8 (C_{Ar}), 127.1 (C_{Ar}), 123.5 (C_{Ar}), 122.5 (C_{Ar}), 113.0 (C_{Ar}), 111.0 (C_{Ar}), 106.3 (bs, C_{PM}), 104.0 (bs, C_{PM}), 80.5 (C-2), 72.2 (C-1), 51.8 (q, C-Alkyl), 51.2, 45.2 (m, Alkyl-CH₂), 44.6 (n, Alkyl-CH₂), 44.0 (C-5), 29.5 (C-3), 28.1 (C-14, Me), 27.7 (C-14, Me), 27.4 (s Alkyl-CH₂), 27.0 (s Alkyl-CH₂), 23.5 (s Alkyl-CH₂), 23.4 (s Alkyl-CH₂). ESI-TOF: C₃₉H₄₇N₄Na₂O₈S₂⁺ m/z berechnet = 809.2625 erhalten = 809.2621.

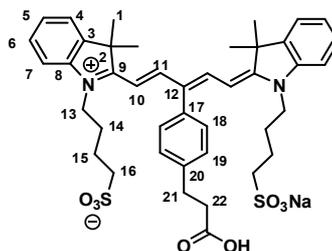
5.3.1 CyKai-G-Linker-Biotin 21



Die Reaktion wurde unter sauerstofffreien Bedingungen durchgeführt. In einem ausgeheizten Schlenkrohr wurden 2.0 mg CyKai-G-Linker (1 Äq., 0.003 mmol) und 1.6 mg Biotin-Azid (2 Äq., 0.005 mmol) in einem 1:1-Gemisch aus DCM und H₂O sehr stark gerührt und dann wurden CuSO₄ 0.05 Äq., 0.0001 mmol) und Natriumascorbat (0.15 Äq., 0.0004 mmol) aus einer wässrigen Stammlösung hinzugefügt und 16 Stunden gerührt. Das LM wurde einrotiert und das Rohprodukt säulenchromatographisch an der Rf-CombiFlash aufgereinigt (RP-Kieselgel, Wasser/MeOH, 100-0%). Ausbeute: 2.7 mg (97%).

CyKai-G-Linker-Biotin: AJ67 M = 1113.35 g/mol; δ_H (250 MHz, MeOD) = 8.32 (t, J = 13.1 Hz, 1H, H_{PM}), 8.23 (t, J = 13.3 Hz, 1H, H_{PM}), 7.95 (m, 2H, H_{Ar}), 7.90 (s, 1H, H-1), 7.54 (m, 1H, H_{Ar}), 7.46 (m, 2H, H_{Ar}), 7.33 (m, 2H, H_{Ar}), 6.96 (s, NH_B), 6.71 (t, J = 12.4 Hz, 1H, H_{PM}), 6.51 (d, J = 14.0 Hz, 1H, H_{PM}), 6.28 (d, J = 13.3 Hz, 1H, H_{PM}), 4.88 (H₂O), 4.50 (s, 2H, H-), 4.48 (dd, 1H, H-2_B), 4.42 (t, J = 7.0 Hz, 2H, H-), 4.29 (dd, J = 7.9 Hz, J = 4.5 Hz, 1H, H-3_B), 4.24 (t, J = 7.5 Hz, 2H, m H-Alkyl), 4.11 (t, J = 7.0 Hz, 2H, n H-Alkyl), 4.07 (s, 2H, H-5), 4.03 (t, J = 6.5 Hz, NH_B), 2.92 (m, 4H, q Alkyl-CH₂), 2.59 (t, J = 2.6 Hz, 1H, H-1), 2.03-1.93 (m, 8H, s Alkyl-CH₂), 1.73 (2xs, 12H, H-14). ESI-TOF: C₅₂H₆₉N₁₀Na₂O₁₀S₃⁺ m/z berechnet = 1135.4150 erhalten = 1135.4236.

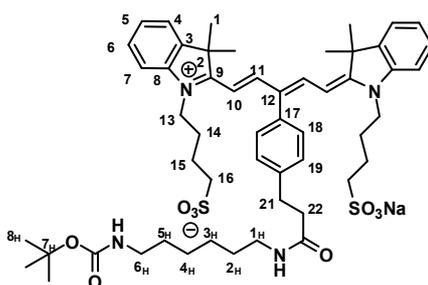
5.3.2 CyKaiSym-COOH



Zur Verfügung gestellt von mivenion.^[105] SK070.1.

CyKaiSym-COOH: $M = 796.21 \text{ g/mol}$; δ_{H} (500 MHz, MeOD) = 8.33 (d, $J = 14.0 \text{ Hz}$, 2H, H-11), 7.51 (dd, $J = 21.0 \text{ Hz}$, $J = 7.6 \text{ Hz}$, 4H, H_{Ar} , H-18, H-19), 7.37 (t, $J = 7.7 \text{ Hz}$, $2H_{\text{Ar}}$), 7.27 (m, 6H, H_{Ar}), 5.82 (d, $J = 14.0 \text{ Hz}$, 2H, H-10), 4.91 (H_2O), 3.83 (t, $J = 6.9 \text{ Hz}$, 4H, H-13), 3.06 (t, $J = 8.0 \text{ Hz}$, 2H, H-21), 2.79 (t, $J = 7.2 \text{ Hz}$, 4H, H-16), 2.59 (t, $J = 8.0 \text{ Hz}$, 2H, H-22), 1.84-1.68 (m, 8H, H-14, H-15), 1.76 (s, 12H, H-1). δ_{C} (125 MHz, MeOD) = 174.6 (C=O), 154.4 (C-11), 143.8 (C_{q}), 143.5 (C_{q}), 142.6 (C_{q}), 136.9 (C_{q}), 134.2 (C_{q}), 131.4 (C_{Ar}), 130.4 (C-18 od. C-19), 129.7 (C_{Ar}), 126.3 (C_{Ar}), 123.4 (C-18 od. C-19), 112.2 (C_{Ar}), 102.9 (C-10), 51.8 (C-16), 50.5 (C-2), 44.7 (C-13), 40.1 (C-22), 33.3 (C-21), 27.9 (C-1), 27.3 (C-14), 23.5 (C-15). UV (MeOH, PS Küvette) λ_{max} [nm] = 646, 600 (sh).

5.3.3 CyKaiSym-Hex-Boc (22)

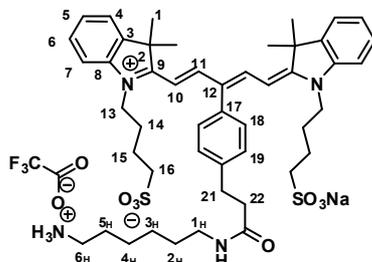


Die Reaktion wurde unter inerten Bedingungen durchgeführt. In einem ausgeheizten Schlenk Kolben wurden 25 mg CyKaiSym-COOH (1.0 Äq., 0.03 mmol), 17 mg TBTU (1.7 Äq., 0.05 mmol) und 10 μl DIPEA (2.5 Äq., 0.08 mmol) in 1 ml DMF eine halbe Stunde gerührt. Dann wurden 10 mg *tert*-Butyl-(6-aminohexyl)carbamat (1.5 Äq., 0.05 mmol) hinzugegeben und über Nacht gerührt. Die Reaktion wurde durch Ausfällen der Reaktionslösung in 400 ml Diethylether beendet. Der blaue Feststoff wurde eine Stunde später abfiltriert. Das Rohprodukt wurde mit MeOH und Wasser aus der Fritte gelöst, das LM wurde abrotiert und das Rohprodukt zweimal säulenchromatographisch aufgereinigt (13 g RP-Kieselgel, Gradient Wasser/MeOH, 100 bis 0%). Ausbeute: 14 mg (45%).

CyKaiSym-Hex-Boc: AJ131 $M = 995.27 \text{ g/mol}$; δ_{H} (500 MHz, MeOD) = 8.34 (d, $J = 14.0 \text{ Hz}$, 2H, H-11), 7.53 (d, $J = 7.7 \text{ Hz}$, 2H, H_{Ar} , H-18), 7.53 (d, $J = 7.4 \text{ Hz}$, 2H, H_{Ar} , H-19) 7.38 (t, $J = 7.7 \text{ Hz}$, $2H_{\text{Ar}}$), 7.27 (m, 6H, H_{Ar}), 5.82 (d, $J = 14.0 \text{ Hz}$, 2H, H-10), 4.88 (H_2O), 3.81 (m, 4H, H-13), 3.21 (t, $J = 7.4 \text{ Hz}$, 2H, H-1_H), 3.03 (m, 4H, H-21, H-6_H), 2.77 (m, 4H, H-16), 2.65 (t, $J = 8.1 \text{ Hz}$, 2H, H-22), 1.80-1.72 (m, 8H, H-14, H-15), 1.77 (s, 12H, H-1), 1.55 (p, $J = 6.4 \text{ Hz}$, $J = 5.9 \text{ Hz}$, 2H, H-5_H), 1.47-1.35 (m, 6H, H-2_H, H-3_H, H-4_H), 1.42 (s, 9H, H-8_H). δ_{C} (125 MHz,

MeOD) = 177.6 (C=O), 174.6 (C=O), 154.4 (C-11), 143.5 (C_q), 142.6 (C_q), 131.5 (C-18 od. C-19), 130.5, 129.8 (C_{Ar}), 126.4 (C_{Ar}), 123.4 (C-18 od. C-19), 112.2 (C_{Ar}), 102.9 (C-10), 101.3, 79.7, 55.8, 51.9 (C-16), 50.6 (C-2), 46.4, 44.7 (C-13), 41.3 (C-22), 30.8 (C-21), 30.4 (C-5_H), 27.8 (C-1), 27.2 (C-14), 27.6 (C-8_H), 27.2, 23.6 (C-15). ESI-TOF: C₅₃H₇₁N₄Na₂O₉S₂⁺ m/z berechnet = 1017.4452, erhalten = 1017.4497.

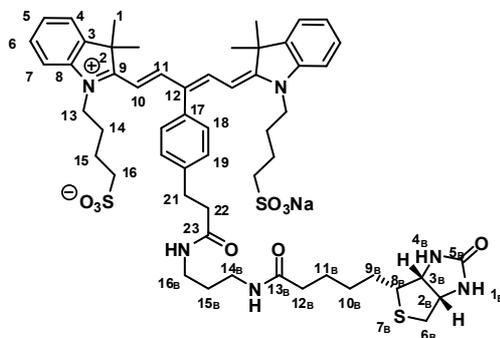
5.3.4 CyKaiSym-Hex-NH₃⁺-TFA-Salz (23)



Das Boc-geschützte Derivat wurde in einer TFA:DCM-Lösung (1:4) über Nacht gerührt. Die Ausbeute war quantitativ.

CyKaiSym-Hex-NH₃⁺-TFA-Salz: AJ139 M = 1009.18 g/mol; δ_H (250 MHz, MeOD) = 8.35 (m, *J* = 14.0 Hz, 2H, H-11), 7.53 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H_{Ar}, H-18), 7.49 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, H_{Ar}, H-19) 7.37 (m, 2H_{Ar}), 7.27 (m, 6H, H_{Ar}), 5.80 (d, *J* = 14.0 Hz, 2H, H-10), 4.88 (H₂O), 3.78 (m, 4H, H-13), 3.25 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, H-1_H), 3.04 (m, 2H, H-21, H-6_H), 2.96 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-6_H), 2.76 (m, 4H, H-16), 2.65 (m, 2H, H-22), 1.76 (s, 12H, H-1), 1.72-1.69 (m, 8H, H-14, H-15), 1.69-1.29 (m, 8H, H-2_H, H-3_H, H-4_H, H-5_H). ESI-TOF: C₄₈H₆₂D₂N₄NaO₇S₂⁺ m/z berechnet = 897,4234, erhalten = 897,4229. UV (MeOH, PS Küvette) λ_{max} [nm] = 646, 601 (sh).

5.3.5 CyKaiSym-Biotin I (26)

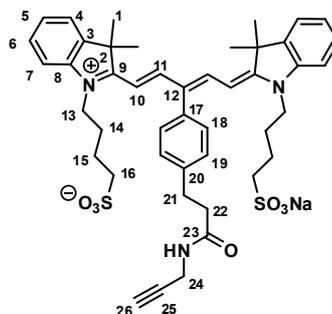


Die Reaktion wurde unter inerten Bedingungen durchgeführt. In einem ausgeheizten Schlenkrohr wurden 25 mg CyKaiSym-COOH (1.0 Äq., 0.03 mmol), 17 mg TBTU (1.7 Äq., 0.05 mmol) und 10 µl DIPEA (2.5 Äq., 0.08 mmol) in 1 ml DMF eine halbe Stunde gerührt. Dann wurden 14 mg Biotin-Amin (1.5 Äq., 0.05 mmol) hinzugegeben und über Nacht gerührt. Die Reaktion wurde durch Ausfällen der Reaktionslösung in 400 ml Diethylether beendet. Der blaue Feststoff wurde eine Stunde später abfiltriert. Das Rohprodukt wurde mit MeOH und Wasser aus der Fritte gelöst, das LM wurde abrotiert und das Rohprodukt zweimal säulenchromatographisch mit der Rf-

CombiFlash aufgereinigt (13 g RP-Kieselgel, Gradient: Wasser/MeOH, 100-0%). Ausbeute: 8 mg (33%).

CyKaiSym-Biotin I: AJ130 M = 1079.37 g/mol; δ_{H} (700 MHz, MeOD) = 8.32 (d, $J = 14.0$ Hz, 2 H, H-11), 7.53 (d, $J = 7.6$ Hz, H_{Ar}), 7.48 (m, 2H, H_{Ar}), 7.38 (m, 2H, H_{Ar}), 7.27 (m, 4H, H_{Ar}), 5.82 (d, $J = 13.3$ Hz, 2H, H-10), 4.81 (H_2O), 4.48 (dd, $J = 8.4$ Hz, $J = 4.6$ Hz, 1H, H-2_B), 4.32 (dd, $J = 7.3$ Hz, $J = 4.7$ Hz, 1H, H-3_B), 3.81 (m, 4H, H-13), 3.24 (m, 4H, H-8_B, H-16_B, H-14_B), 3.06 (m, 2H, H-21), 2.92 (dd, $J = 12.8$ Hz, $J = 5.0$ Hz, 1H, H-6_B), 2.77 (t, $J = 7.0$ Hz, 4H, H-16), 2.69 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, H-6_B), 2.66 (t, $J = 8.3$ Hz, 2H, H-22), 2.23 (dt, $J = 7.3$ Hz, $J = 2.2$ Hz, 2H, H-12_B), 1.77 (s, 12H, H-1), 1.75 (m, 8H, H-14, H-15, H-15_B), 1.70-1.57 (m, 4H, H-9_B, H-11_B), 1.45 (m, 2H, H-10_B). δ_{C} (175 MHz, MeOD) = 174.1 (C=O), 174.6 (C=O), 166.1 (C-5_B), 154.3 (C-11), 143.5 (C_{qu}), 142.9 (C_{qu}), 142.6 (C_{qu}), 131.5 (C_{Ar}), 130.5 (C_{Ar}), 129.8 (C_{Ar}), 126.4 (C_{Ar}), 123.4 (C_{Ar}), 112.2 (C_{Ar}), 102.9 (C-10), 63.3 (C-3_B), 61.6 (C-2_B), 56.9 (C-8_B), 51.9 (C-16), 50.6 (C-2), 44.8 (C-13), 41.1 (C-6_B), 38.8 (C-22), 37.9 (C-16_B), 37.8 (C-14_B), 36.9 (C-12_B), 32.7 (C-21), 29.9 (C-15_B), 29.7 (C-10_B), 29.4 (C-9_B), 27.9 (C-1), 27.2 (C-14), 26.9 (C-11_B), 23.7 (C-15). $\text{C}_{55}\text{H}_{71}\text{N}_6\text{Na}_2\text{O}_9\text{S}_3^+$ m/z berechnet = 1101.4235, erhalten = 1101.4283.

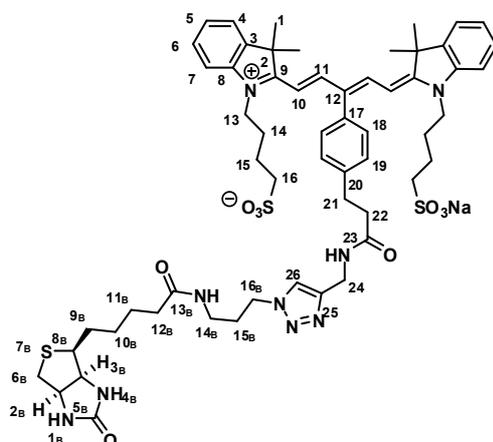
5.3.6 CyKaiSym-Alkin (24)



In einem 25 ml Schlenkcolben wurden 200 mg CyKaiSym-COOH (1.00 Äq., 0.25 mmol), 137 mg TBTU (1.70 Äq., 0.43 mmol) und 90 μl NEt_3 (2.50 Äq., 0.63 mmol) eine Stunde in 2 ml DMF bei RT gerührt. Dann wurden 21 mg Propargylamin (1.50 Äq., 0.38 mmol) hinzugegeben und über Nacht gerührt. Das DMF wurde am nächsten Tag abdestilliert und das Produkt mit Hilfe der Rf-CombiFlash säulenchromatographisch gereinigt (RP-Kieselgel, Gradient Wasser/MeOH, 100-0%). Ausbeute: 141 mg (67%).

CyKaiSym-Alkin: AJ154 M = 834.03 g/mol; δ_{H} (500 MHz, MeOD) = 8.31 (s, 2 H, H-11), 7.50 (m, $J = 7.5$ Hz, 4H, H_{Ar}), 7.38 (t, $J = 8.1$ Hz, $J = 1.2$ Hz, 2H, H_{Ar}), 7.27 (m, 4H, H_{Ar}), 4.00 (d, $J = 2.5$ Hz, 2H, H-24), 3.82 (m, 4H, H-13), 3.07 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H, H-21), 2.77 (t, $J = 7.3$ Hz, $J = 2.8$ Hz, 4H, H-16), 2.69 (m, 2H, H-22), 2.56 (t, $J = 2.6$ Hz, H-26), 1.77-1.72 (m, 12H, H-14, H-15), 1.77 (s, 6H, H-1). δ_{C} (125 MHz, MeOD) = 175.3 (C=O, Amidresonanz), 174.6 (C=O Amidresonanz), 154.3 (C-11), 143.5 (C_q), 142.6 (C_q), 131.4 (C-18/C-19), 130.5 (C_{Ar}), 130.6 (C_{Ar}), 129.8 (C_{Ar}), 126.3 (C_{Ar}), 123.4 (C-18/C-19), 112.2 (C_{Ar}), 102.6 (C-10?), 80.8 (C-25), 72.1 (C-26), 51.9 (C-16), 50.5 (C-2), 44.8 (C-13), 38.2 (C-22), 36.6, 32.4 (C-21), 29.5 (C-24), 27.8 (C-1), 27.2 (C-14/C-15), 23.6 (C-14/C-15). ESI-TOF: $\text{C}_{45}\text{H}_{53}\text{N}_3\text{Na}_2\text{O}_7\text{S}_2^+$ m/z berechnet = 856.3038, erhalten = 856.3043.

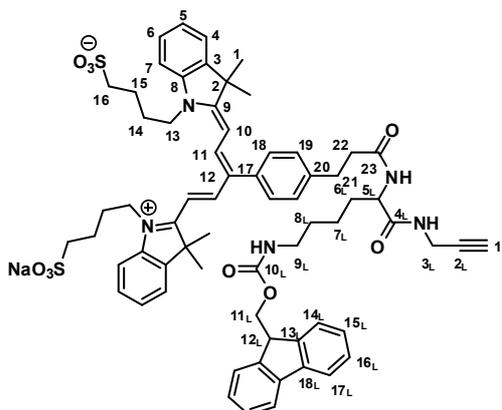
5.3.7 CyKaiSym-Biotin II (25)



Die Reaktion wurde unter sauerstofffreien Bedingungen durchgeführt. 15 mg CuSO_4 (3.1 Äq., 0.09 mmol) und 71 mg Natriumascorbat (12.0 Äq., 0.72 mmol) wurden in 200 μl Wasser suspendiert und gerührt bis die Farbe braun nach gelb umschlug. 25 mg CyKaiSym-Alkin (1.0 Äq., 0.03 mmol) und 11 mg Biotin-Azid (1.10 Äq., 0.03 mmol) wurden 800 μl MeOH gelöst und zur CuSO_4 /Natriumascorbat Lösung gegeben. Die Reaktion wurde über Nacht bei RT gerührt. Es wurde gesättigte NaCl-Lösung und CHCl_3 (5% MeOH) zugeben und so oft ausgeschüttelt, bis die organische Phase farblos blieb. Das Rohprodukt wurde daraufhin säulenchromatographisch gereinigt (RP-Kieselgel 55 g, Gradient Wasser/MeOH, 100-0%). Ausbeute: 22 mg (64%).

CyKaiSym-Biotin II: AJ159 M = 1160.45 g/mol; δ_{H} (700 MHz, MeOD) = 8.33 (d, J = 14.0 Hz, 2H, H-11), 7.97 (s, 1H, H-26), 7.54 (d, J = 7.8 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.49 (d, J = 7.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.38 (m, 2H, H_{Ar}), 7.27 (m, 4H, H_{Ar}), 5.79 (d, J = 14.0 Hz, 2H, H-10), 4.80 (H_2O), 4.50 (m, 3H, H-24, H-2_B), 4.40 (t, J = 7.0 Hz, 2H, H-16_B), 4.30 (dd, J = 7.7 Hz, J = 5.0 Hz, 1H, H-3_B), 3.76 (m, 4H, H-13), 3.20 (m, 3H, H-8_B, H-14_B), 3.09 (m, 2H, H-21), 2.90 (dd, J = 12.8 Hz, J = 5.0 Hz, 1H, H-6_B), 2.76 (t, J = 7.0 Hz, 4H, H-16), 2.73 (m, 2H, H-22), 2.68 (d, J = 12.7 Hz, 1H, H-6_B), 2.21 (t, J = 7.3 Hz, 2H, H-12_B), 2.11 (td, J = 13.6 Hz, J = 13.4 Hz, J = 7.3 Hz, 2H, H-15_B), 1.77 (s, 12H, H-1), 1.77-1.72 (m, 9H, H-14, H-15, H-15_B), 1.68-1.55 (m, 4H, H-9_B, H-11_B), 1.44 (m, 2H, H-10_B). δ_{C} (175 MHz, MeOD) = 176.2 (C=O), 174.6 (C=O), 166.1 (C-5_B), 154.2 (C-11), 143.3 (C_{qu}), 142.8 (C_{qu}), 142.7 (C_{qu}), 136.8, 134.5, 131.5 (C_{Ar}), 130.6 (C_{Ar}), 129.8 (C_{Ar}), 126.4 (C_{Ar}), 123.4 (C_{Ar}), 112.1 (C_{Ar}), 102.9 (C-10), 63.3 (C-3_B), 61.6 (C-2_B), 57.0 (C-8_B), 52.0 (C-16), 49.9 (C-2), 44.8 (C-13), 41.1 (C-6_B), 37.4 (C-14_B od. C-15_B), 36.8 (C-22), 35.9 (C-12_B), 32.6 (C-21), 31.0 (C-16_B), 29.7 (C-9_B), 29.4 (C-10_B), 27.9 (C-1), 27.2 (C-14), 26.8 (C-11_B), 23.6 (C-15). $\text{C}_{58}\text{H}_{74}\text{N}_9\text{Na}_2\text{O}_9\text{S}_3^+$ m/z berechnet = 1182.4562, erhalten = 1182.4624.

5.3.8 CyKaiSym-L-Linker-Fmoc (31)

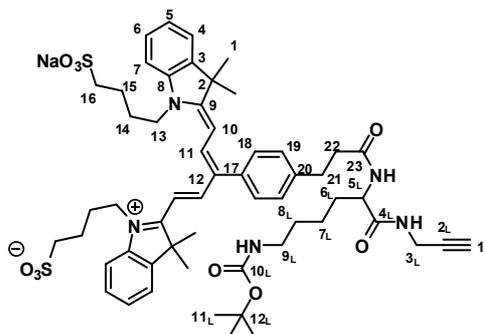


Die Reaktion wurde unter trocknen Bedingungen durchgeführt. In einem 25 ml Schlenkcolben wurden 30 mg CyKaiSym-COOH (1.00 Äq., 0.04 mmol), 29 mg TBTU (1.70 Äq., 0.06 mmol) und 40 μ l DIPEA (5.50 Äq., 0.03 mmol) in 1 ml DMF eine Stunde bei RT gerührt. Dann wurden 27 mg H-Lys(Fmoc)-propargylamid (1.50 Äq., 0.6 mmol) hinzugegeben und über Nacht gerührt. Die Reaktionsmischung wurde am nächsten Tag am Rotationsverdampfer eingengt und aus Diethylether ausgefällt. Das Rohprodukt wurde mit Hilfe der Rf-CombiFlash gereinigt (RP-Kieselgel, Gradient: Wasser/MeOH, 100-0%). Ausbeute: 36 mg (80%).

Das NMR war nicht eindeutig auszuwerten und konnte nur unter der Annahme geklärt werden, dass Ähnlichkeiten mit bereits aufgeklärten analogen Strukturen bestehen.

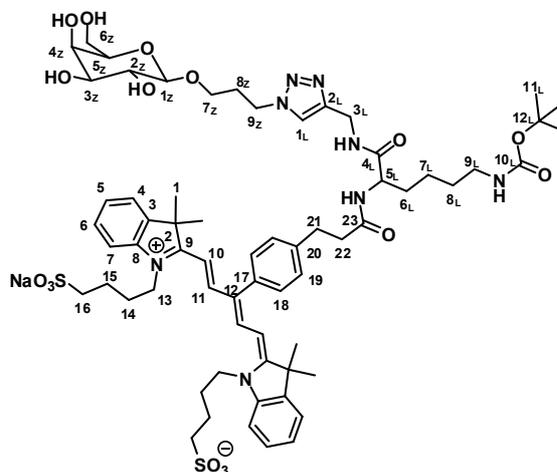
CyKaiSym-L-Linker-Fmoc: AJ132 M = 1184.44 g/mol; δ_{H} (700 MHz, MeOD) = 8.27 (br s, H-11), 7.72 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, H_{Ar}), 7.64 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, H_{Ar}), 7.51-7.21 (m, 16H, H_{Ar}), 5.77 (br s, 1H, H-10), 4.33 (dd, $J = 9.6$ Hz, $J = 4.7$ Hz, 1H, H-5_L), 4.24 (p, $J = 10.8$ Hz, 2H, H-11_L), 4.15 (m, 1H, H-12_L), 3.96 (ddd, $J = 17.4$ Hz, $J = 2.5$ Hz, 2H, H-3_L), 3.69 (m, 4H, H-13), 3.12 (m, 4H, H-9_L, H-22), 2.76 (m, 6H, H-16, H-21), 2.52 (t, $J = 2.5$ Hz, 1H, H-1_L), 1.87-1.77 (m, 2H, H-6_L), 1.74 (s, 12H, H-1), 1.73-1.43 (m, 14H, H-7_L, H-8_L, H-14, H-15). δ_{C} (175 MHz, MeOD) = 175.8, 174.6, 158.8 (C-11), 145.4 (C_{qu}), 145.3 (C_{qu}), 142.5 (C_{qu}), 130.4 (C_{Ar}), 128.8 (C_{Ar}), 128.2 (C_{Ar}), 126.3 (C-), 120.9 (C_{Ar}), 112.1 (C_{Ar}), 102.9 (C-10), 80.7 (C-2_L), 72.0 (C-12_L), 67.7 (C-1_L), 55.4 (C-5_L), 52.0 (C-16), 49.9 (C-2), 48.5 (C-), 41.4 (C-9_L), 32.5, 29.5 (C-3), 28.8 (C-11_L), 24.2 (C-8_L, C-7_L oder C-6_L), 23.6 (C-15). ESI-TOF: C₆₆H₇₄N₅Na₂O₁₀S₂⁺ m/z berechnet = 1206.4667, erhalten = 1206.4678.

5.3.9 CyKaiSym-L-Linker-Boc (32)



40.6 (C-9_L), 39.0 (C-21), 32.8 & 32.2 (C-22 Amid Resonanz), 29.5 (C-3_L), 28.1 (C-8_L,C-7_L oder C-6_L), 27.8 (C-1), 27.1 (C-8_L,C-7_L oder C-6_L), 23.8 (C-8_L,C-7_L oder C-6_L), 23.6 (C-15). ESI-TOF: C₅₁H₆₅N₅NaO₈S₂⁺ m/z berechnet = 962.4167, erhalten = 962.4110.

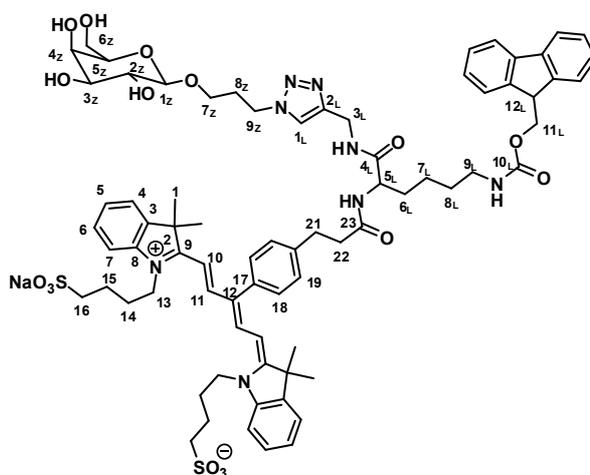
5.3.11 CyKaiSym-L-Linker-Boc-Gal (74)



Es wurde unter sauerstofffreien Bedingungen gearbeitet. 5 mg CuSO₄ (3.10 Äq., 0.29 mmol) und 141 mg Natriumascorbat (7.60 Äq., 0.72 mmol) wurden in 100 µl Wasser suspendiert und gerührt bis die Farbe braun nach gelb umschlug. 100 mg CyKaiSym-L-Linker-Boc (1.00 Äq., 0.09 mmol) und 27 mg Gal-Azidopropanol (1.10 Äq., 0.10 mmol) wurden 900 µl MeOH gelöst und 3 Tage bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit CHCl₃ (5% MeOH) aufgefüllt und zweimal mit 1 M KHSO₄ und zweimal mit NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Es wurde eine schlechte Produkttrennung zwischen der organischen und wässrigen Phase beobachtet. Das Rohprodukt wurde daraufhin säulenchromatographisch gereinigt (RP-Kieselgel, Gradient: Wasser/MeOH 100-0%), auch hier war die Trennung der verschiedenen Produkte sehr schlecht. Durch NMR und ESI-TOF wurde eine partielle Entschützung des Produktes nachgewiesen. Daraufhin wurde das komplette Produktgemisch weiter zum TFA-Salz umgesetzt.

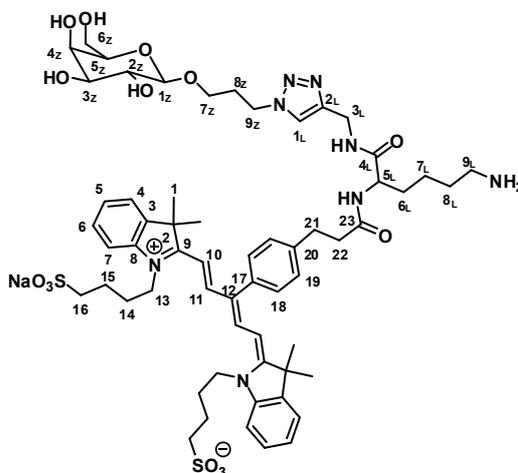
ESI-TOF: es konnte nur Peaks ohne Boc-Schutzgruppe nachgewiesen werden: C₅₆H₇₂N₅Na₂O₁₀S₂⁺ m/z berechnet = 1084.4511, erhalten = 1084.4623.

5.3.12 CyKaiSym-L-Linker-Fmoc-Gal (34)



Es wurde unter sauerstofffreien Bedingungen gearbeitet. 7 mg CuSO_4 (2.10 Äq., 0.05 mmol) und 17 mg Natriumascorbat (4.00 Äq., 0.87 mmol) wurden in 100 μl Wasser suspendiert und gerührt bis die Farbe nach gelb umschlug. 100 mg CyKaiSym-L-Linker-Fmoc (1.00 Äq., 0.02 mmol) und 6 mg Gal-Azidopropanol (1.10 Äq., 0.02 mmol) wurden 900 μl MeOH gelöst zusammen gegeben und über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit CHCl_3 (5% MeOH) aufgefüllt und zweimal mit halbgesättigter NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (RP-Kieselgel, Gradient: Wasser/MeOH, 100-0%) Ausbeute: 26 mg (83%).

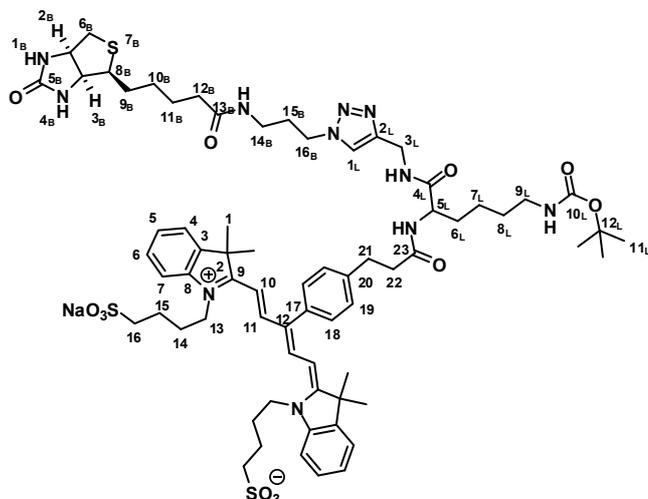
CyKaiSym-L-Linker-Fmoc-Gal: AJ150 M = 1447.69 g/mol; δ_{H} (250 MHz, MeOD) = 8.32 (d, $J = 13.8$ Hz, 2H, H-11), 7.99 (s, 1H, H-1_L), 7.73 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H, H-18), 7.65 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H, H-19), 7.49 (t, 4H, H_{Ar}), 7.27 (m, 12H, H_{Ar}), 5.75 (d, $J = 14.0$ Hz, 2H, H-10), 4.55 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, H-9_Z), 4.49 (s, 2H), 4.31 (dd, $J = 8.6$ Hz, $J = 4.3$ Hz, 1H, H-5_L), 4.24 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-1_Z, H-11_L), 4.17 (m, 1H, H-12_L), 3.83 (m, 4H, H-4_Z, H-7_Z, H-3_L), 3.81-3.54 (m, 10H, H-2_Z, H-3_Z, H-5_Z, H-6_Z, H-7_Z, H-13), 3.05 (m, 4H, H-9_L, H-22), 2.76 (m, 6H, H-16, H-21), 2.17 (p, $J = 6.2$ Hz, $J = 5.9$ Hz, 2H, H-8_Z), 1.90-1.43 (m, 12H, H-6_L, H-8_L, H-14, H-15), 1.76 (s, 12H, H-1).

5.3.13 CyKaiSym-L-Linker-NH₂-Gal (36)

26 mg CyKaiSym-L-Linker-Fmoc-Gal wurden in 480 μ l DMF gelöst und es wurden 10 μ l Piperidin (5.8 Äq.) und 10 μ l DBU (3.8 Äq.) hinzugegeben.^[111] Die Umsatzkontrolle erfolgte mittels DC. Das Reaktionsgemisch wurde in Diethylether ausgefällt und mittels Rf-Combiflash gereinigt (RP-Kieselgel, Gradient: Wasser/MeOH, 100-0%). Ausbeute: 22 mg (quantitativ).

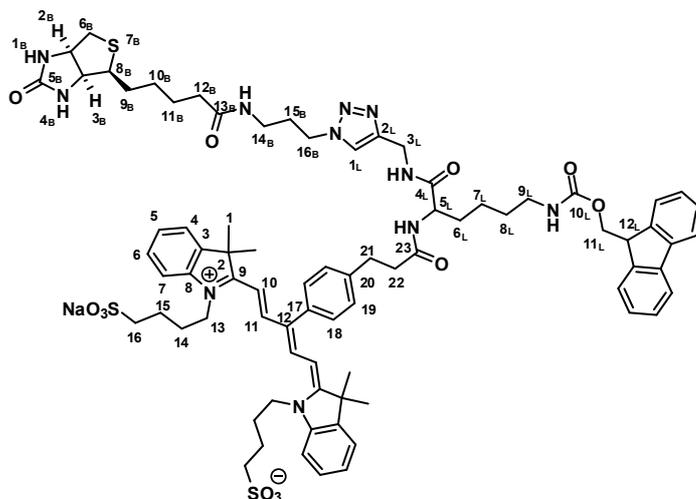
CyKaiSym-L-Linker-NH₂-Gal: AJ170 M = 1225.25 g/mol. δ_{H} (700 MHz, MeOD) = 8.32 (d, J = 14.0 Hz, 2H, H-11), 7.97 (s, 1H, H-1_L), 7.54 (d, J = 7.7 Hz, 2H, H-18), 7.48 (d, J = 7.4 Hz, 2H, H-19), 7.38 (t, 2H, H_{Ar}), 7.26 (m, 6H, H_{Ar}), 5.81 (d, J = 14.5 Hz, 2H, H-10), 4.55 (t, J = 7.0 Hz, 2H, H-9_Z), 4.48 (s, 2H, H-3_L), 4.33 (dd, J = 9.7 Hz, J = 4.2 Hz, 1H, H-5_L), 4.24 (d, J = 7.5 Hz, 1H, H-1_Z), 3.89 (dt, 1H, J = 10.7 Hz, J = 5.8 Hz, H-7_Z), 3.85 (d, J = 3.3 Hz, 1H, H-4_Z), 3.79 (m, 4H, H-13), 3.74 (td, J = 11.8 Hz, J = 11.4 Hz, J = 6.1 Hz, 2H, H-6_Z), 3.54 (m, 4H, H-2_Z, H-3_Z, H-5_Z, H-7_Z), 3.05 (m, 2H, H-22), 3.00 (t, J = 7.2 Hz, 2H, H-9_L), 2.76 (m, 6H, H-16, H-21, H-16), 2.18 (m, 2H, H-8_Z), 1.87 (m, 2H, H-6_L), 1.76 (s, 12H, H-1), 1.73 (m, 9H, H-14, H-15, H-8_L), 1.63-1.51 (m, 2H, H-). δ_{C} (175 MHz, MeOD) = 175.9 (C_{Amid}), 174.8 (C_{Carbam}), 174.5 (C_{Amid}), 154.2 (C-11), 146.5, 143.3 (C_{qu}), 150.0 (C_{qu}), 142.6 (C_{qu}), 136.9 (C_{qu}), 134.6 (C_{qu}), 131.6 (C_{Ar}), 130.4 (C_{Ar}), 129.8 (C_{Ar}), 126.4 (C_{Ar}), 125.0, 123.4 (C_{Ar}), 112.1 (C_{Ar}), 105.0 (C-1_Z), 103.0 (C-10), 76.7, 75.0, 72.6 (C-2_Z, C-3_Z, C-5_Z), 70.4 (C-4_Z), 66.9 (C-7_Z), 62.6 (C-6_Z), 55.2 (C-5_L), 52.0 (C-16), 50.5 (C-2), 48.3 (C-9_Z), 44.8 (C-13), 40.6 (C-9_L), 39.0 (C-21), 35.9 (C-), 32.7 (C-22), 32.1 (C-8_L), 31.5 (C-6_L), 28.0 (C-), 27.8 (C-1), 27.1, 23.8 (C-14 od. C-15), 23.7 (C-7_L), 23.6 (C-15 od. C-14). ESI-TOF: C₆₀H₈₁N₈Na₂O₁₄S₂⁺ m/z berechnet = 1247.5104, erhalten = 1247.5121.

5.3.14 CyKaiSym-L-Linker-Boc-Biotin (75)



Es wurde unter sauerstofffreien Bedingungen gearbeitet. 35 mg CuSO_4 (2.10 Äq., 0.22 mmol) und 82 mg Natriumascorbat (4.00 Äq., 0.42 mmol) wurden in 100 μl Wasser suspendiert und gerührt bis die Farbe nach gelb umschlug. 100 mg CyKaiSym-L-Linker-Boc (1.00 Äq., 0.02 mmol) und 34 mg BiotinAzid (1.30 Äq., 0.14 mmol) wurden 900 μl MeOH gelöst zusammen gegeben und über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit CHCl_3 (5% MeOH) aufgefüllt und zweimal mit halbgesättigter NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (RP-Kieselgel, Gradient: Wasser/MeOH, 100-0%). Ausbeute: 21 mg (16%). Die komplette blaue Fraktion wurde ohne weitere Charakterisierung entsprechend des TFA-Protokolls entschützt.

5.3.15 CyKaiSym-L-Linker-Fmoc-Biotin (33)

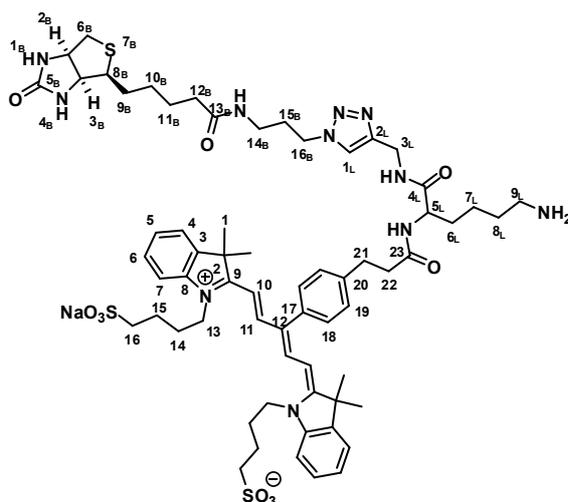


Es wurde unter sauerstofffreien Bedingungen gearbeitet. 7 mg CuSO_4 (3.0 Äq., 0.04 mmol), 11 mg Natriumascorbat (4.00 Äq., 0.06 mmol) 17 mg CyKaiSym-L-Linker-Fmoc (1.1 Äq., 0.01 mmol) und

5 mg Biotin-Azid (1.00 Äq., 0.02 mmol) wurden in einer Mischung aus 40 μl H_2O , 100 μl MeOH und 360 μl MeCN gelöst und über Nacht bei RT gerührt. Das DC zeigte nur den unvollständigen Umsatz an, woraufhin das Reaktionsgemisch für 3 Stunden auf 70°C erwärmt wurde. Die Reaktionslösung wurde mit CHCl_3 (5% MeOH) aufgefüllt, einmal mit gesättigter und einmal mit halbgesättigter NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde einrotiert und säulenchromatographisch gereinigt (RP-Kieselgel, Gradient: Wasser/MeOH, 100-0%). Ausbeute: 16 mg (73%).

CyKaiSym-L-Linker-Fmoc-Biotin: AJ145 M = 1510.74 g/mol, δ_{H} (700 MHz, MeOD) = 8.29 (d, J = 13.9 Hz, 2H, H-11), 7.95 (s, 1H, H-1_L), 7.73 (d, J = 7.6 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.65 (d, J = 7.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.51 (d, J = 7.8 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.47 (d, J = 7.4 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.36 (t, J = 7.9 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.33 (td, J = 7.7 Hz, J = 3.4 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.28 (td, J = 7.5 Hz, J = 7.3 Hz, J = 3.8 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.23 (m, 6H, H_{Ar}), 5.76 (d, J = 14.0 Hz, 2H, H-10), 4.80 (H₂O), 4.48 (m, 2H, H-3_L), 4.47 (dd, J = 7.7 Hz, J = 5.1 Hz, 1H, H-2_B), 4.43 (t, J = 7.3 Hz, 2H, H-16_B), 4.32 (dd, J = 9.6 Hz, J = 4.6 Hz, 1H, H-5_I), 4.27 (dd, J = 7.9 Hz, J = 4.5 Hz, 1H, H-3_B), 4.25 (dd, J = 7.4 Hz, J = 4.7 Hz, 1H, H-11_L), 4.17 (t, J = 7.1 Hz, 1H, H-11_L), 3.70 (m, 4H, H-13), 3.64 (m, 1H), 3.21 (td, J = 6.7 Hz, J = 3.1 Hz, 2H, H-14_B), 3.17 (ddd, J = 8.8 Hz, J = 5.7 Hz, J = 4.3 Hz, 2H, H-14_B), 3.13 (m, 1H, H-8_B), 3.06 (m, 2H, H-22), 2.87 (dd, J = 12.7 Hz, J = 5.0 Hz, 1H, H-6_B), 2.76 (m, 6H, H-16, H-21), 2.65 (d, J = 12.6 Hz, 1H, H-6_B), 2.20 (t, J = 7.5 Hz, 2H, H-12_B), 2.11 (p, J = 6.8 Hz, 2H, H-15_B), 1.91-1.52 (m, 18H, H-6_L, H-7_L, H-8_L, H-9_B, H-11_B, H-14, H-15), 1.77, 1.76 (2xs, 12H, H-1), 1.43 (m, 2H, H-10_B). δ_{C} (175 MHz, MeOD) = 176.2 (C=O), 175.8 (C=O), 175.1 (C=O), 174.5, 166.0 (C-5_B), 158.8, 154.2 (C-11), 146.9 (C_{Ar}), 145.4 (C_{Ar}), 143.4 (C_{qu}), 142.6 (C_{qu}), 142.5 (C_{qu}), 134.5, 131.5 (C_{Ar}), 130.4 (C_{Ar}), 129.8, 128.8, 128.2, 126.3 (C_{Ar}), 124.5 (C-1_L), 123.4, 120.9, 112.1 (C_{Ar}), 102.9 (C-10), 67.7 (C-11_L), 63.3 (C-3_B), 61.6 (C-2_B), 57.0 (C-8_B), 55.6 (C-5_L), 52.0 (C-16), 50.5, 44.8 (C-13), 41.4 (C-14_B), 41.1 (C-6_B), 38.9 (C-21), 37.5 (C-14_B), 36.8 (C-12_B), 36.0 (C-3_L), 32.6 (C-22), 32.4, 31.0 (C-15_B), 30.7, 30.2, 29.8, 29.5, 27.9 (C-1), 27.1, 26.8, 24.3, 23.7 (C-15). $\text{C}_{79}\text{H}_{96}\text{N}_{11}\text{Na}_2\text{O}_{12}\text{S}_3^+$ m/z berechnet = 1532.6192, erhalten = 1532.6267. UV (H_2O , PS Küvette) λ_{max} [nm] = 646, 601 (sh).

5.3.16 CyKaiSym-L-Linker-NH₂-Biotin (35)



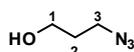
26 mg des CyKaiSym-L-Linker-Fmoc-Biotin wurden in 480 μl DMF gelöst und es wurden 10 μl Piperidin (5.8 Äq.) und 10 μl DBU (3.8 Äq.) hinzugegeben.^[111] Die Umsatzkontrolle erfolgte mittels

DC. Das Reaktionsgemisch wurde in Diethylether ausgefällt und mittels Rf-Combiflash gereinigt (RP-Kieselgel, Gradient: Wasser/MeOH, 100-0%). Ausbeute: 22 mg (quantitativ).

CyKaiSym-L-Linker-NH₂-Biotin: AJ208 M = 1288.74 g/mol; δ_{H} (700 MHz, MeOD) = 8.56 (s), 8.33 (d, $J = 13.9$ Hz, 2H, H-11), 7.94 (s, 1H, H-1_L), 7.53 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, H_{Ar}), 7.49 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H, H_{Ar}), 7.39 (td, $J = 7.8$ Hz, $J = 7.7$ Hz, $J = 1.3$ Hz, 2H, H_{Ar}), 7.27 (m, 6H, H_{Ar}), 5.81 (d, $J = 13.9$ Hz, 2H, H-10), 4.81 (H₂O), 4.49 (s, 2H, H-3_L), 4.47 (dd, $J = 7.6$ Hz, $J = 4.9$ Hz, 1H, H-2_B), 4.43 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, H-16_B), 4.32 (dd, 1H, H-5_L), 4.29 (dd, $J = 7.9$ Hz, $J = 4.5$ Hz, 1H, H-3_B), 3.80 (m, 4H, H-13), 3.65 (m, 1H), 3.22 (dd, $J = 6.8$ Hz, $J = 2.5$ Hz, 1H, H-8_B), 3.19 (m, 2H, H-14_B), 3.05 (m, 2H, H-22), 2.89 (dd, 1H, H-6_B), 2.85 (m, 2H, H-9_L), 2.76 (m, 6H, H-16, H-21), 2.67 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, H-6_B), 2.22 (m, 2H, H-12_B), 2.11 (m, 2H, H-15_B), 1.88-1.55 (m, 18H, H-6_L, H-7_L, H-8_L, H-9_B, H-11_B, H-14, H-15), 1.77 (s, 12H, H-1), 1.43 (m, 2H, H-10_B). δ_{C} (175 MHz, MeOD) = 176.2 (C=O), 175.9 (C=O), 175.0, 174.5, 170.4, 166.0 (C-5_B), 161.6, 154.2 (C-11), , 146.8 (C-), 143.3 (C_{qu}), 143.0 (C_{qu}), 142.7 (C_{qu}), 136.9, 134.6, 133.1, 133.0, 131.6 (C_{Ar}), 130.4 (C_{Ar}), 130.0, 129.9, 129.8 (C_{Ar}), 129.0, 126.4 (C_{Ar}), 123.9 (C_{Ar}), 123.5, 123.4, 112.1 (C_{Ar}), 110.1, 103.0 (C-10), 73.8 (C-2_L), 72.0 (C-12_L), 64.4 (C-), 63.3 (C-3_B), 61.6 (C-2_B), 58.3 (C-), 57.0 (C-8_B), 52.0 (C-16), 50.5 (C-), 49.9 (C-2), 49.5 (C-), 44.8 (C-13), 41.1 (C-6_B), 40.4 (C-9_L), 38.9 (C-), 37.4 (C-14_B od. C-15_B), 36.8 (C-22), 35.9 (C-3_L), 33.0, 32.6 (C-21), 32.3, 31.0 (C-16_B), 30.7 (C-), 29.8 (C-9_B), 29.5 (C-10_B), 27.8 (C-1), 27.1 (C-14), 26.8 (C-11_B), 24.6, 23.6 (C-15). C₆₄H₈₆N₁₁Na₂O₁₀S₃⁺ m/z berechnet = 1310.5511, erhalten = 1310.5655.

5.4 SYNTHESE ANDERER MOLEKÜLE

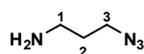
5.4.1 3-Azidopropanol (1)



In einem 500 ml Kolben wurden 28.0 g Natriumazid (1.8 Äq., 431.2 mmol) in 300 ml Wasser gelöst und 33.7 g Bromopropanol (1.0 Äq., 242.3 mmol) hinzugegeben. Die Mischung wurde bei ca. 80°C Badtemperatur 24 Stunden gerührt. Reaktionskontrolle mittels DC. Nach Abkühlen wird fünfmal mit Diethylether ausgeschüttelt, über MgSO₄ getrocknet und einrotiert. Das ¹H NMR entsprach der Literatur.^[151] Ausbeute: 24.0 g (97%). Unter der Verwendung von Chloropropanol wurde eine Ausbeute von 91% erhalten.

Azidopropanol: AJ202 M = 101.06 g/mol; δ_{H} (250 MHz, CDCl₃) = 3.70 (m, 2H, H-1), 3.41 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, H-3), 2.42 (OH), 1.79 (p, $J = 6.4$ Hz, 2H, H-2).

5.4.2 3-Azidopropylamin (15)

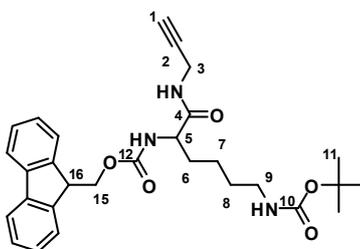


In einem 500 ml Kolben wurden 11.9 g Natriumazid (2.0 Äq., 182.7 mmol) in 300 ml Wasser gelöst und 20.0 g 3-Bromopropan-1-aminhydrobromid (1 Äq., 91.4 mmol) hinzugegeben. Es wurde bei ca. 80°C Badtemperatur 24 Stunden gerührt. Reaktionskontrolle mittels DC. Nach Abkühlen wird fünfmal mit Diethylether ausgeschüttelt (pH Wert überprüfen, die wässrige Phase

muss basisch sein), über MgSO_4 getrocknet und einrotiert. Das ^1H NMR entsprach der Literatur.^[152] Niedriger Siedepunkt des Produktes! Ausbeute: 8.0 g (87%).

Azidopropanol: AJ202 $M = 101.06$ g/mol; δ_{H} (250 MHz, CDCl_3) = 3.33 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, H-1), 2.75 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, H-3), 1.68 (p, $J = 6.8$ Hz, 2H, H-2), 1.24 (s, NH_2).

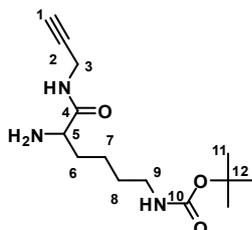
5.4.3 Fmoc-Lys(Boc)-Propargylamid (29)^[153]



Die Reaktion wurde unter inerten Bedingungen durchgeführt. In einem 100 ml Schlenkcolben wurde 1.00 g Fmoc-Lys(Boc)-OH (1.0 Äq., 2.1 mmol) gelöst und 1.17 g TBTU (1.7 Äq., 3.6 mmol) und 0.74 ml Triethylamin (2.5 Äq., 5.3 mmol) hinzugegeben und 20 Minuten gerührt. Es wurde 0.18 g Propargylamin hinzugefügt und über Nacht bei RT gerührt. Der Reaktionsverlauf wurde mittels DC überprüft. Das LM wurde am Rotationsverdampfer destillativ entfernt, der Rückstand in DCM aufgenommen und dreimal mit 1 N KHSO_4 , einmal mit Wasser und dreimal mit 5%iger NaHCO_3 und dreimal mit gesättigter NaCl -Lösung extrahiert. Die org. Phase wurde mit MgSO_4 getrocknet. Dieses wurde abfiltriert und das LM am Rotationsverdampfer abdestilliert. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung für den nächsten Reaktionsschritt verwendet. Eine Aufreinigung konnte durch Umkristallisation erreicht werden. Das NMR entsprach der Literatur.^[153] Rohausbeute: 0.98 g (93%).

L-Linker-Boc-Fmoc: AJ178 $M = 491.58$ g/mol; δ_{H} (250 MHz, CDCl_3) = 7.74 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H, H_{Ar}), 7.56 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H, H_{Ar}), 7.38 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, H_{Ar}), 7.28 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, H_{Ar}), 6.97 (br s, 1H, NH Carbamat), 5.79 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, NH Amid), 4.74 (br t, $J = 6.0$ Hz, 1H, NH Carbamat), 4.38 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H, H-15), 4.19 (m, 2H, H-5, H-16), 3.99 (m, 2H, H-3), 3.07 (q, $J = 6.7$ Hz, 2H, H-9), 2.80 (s), 2.11 (m, 1H, H-1), 1.91-1.59 (m, 2H, H-6), 1.42 (s, 9H, H-11), 1.50-1.26 (m, 4H, H-7, H-8).

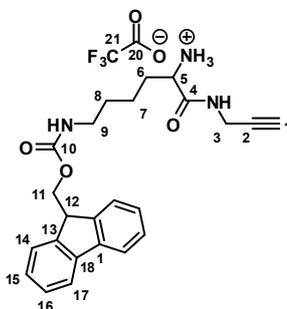
5.4.4 H-Lys(Boc)-Propargylamid (30)^[153]



0.98 g Fmoc-Lys(Boc)-propargylamid (1.94 mmol) wurden für drei Stunden bei RT in einer 20%igen Piperidin-THF-Lösung gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abdestilliert und der Rückstand mit Chloroform coevaporiert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (NP-Kieselgel, Gradient: DCM/MeOH). Ausbeute: 0.36 g (66%)

L-Linker-Boc: AJ164 M = 283.19 g/mol; δ_{H} (500 MHz, MeOD) = 7.63 (t, 1H, $J = 5.8$ Hz, NH Amid), 4.73 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H, NH Carbamat), 3.99 (dt, $J = 5.3$ Hz, $J = 2.2$ Hz, 2H, H-3), 3.33 (dd, $J = 8.1$ Hz, $J = 4.4$ Hz, 1H, H-5), 3.07 (q, $J = 6.7$ Hz, 2H, H-9), 2.20 (t, $J = 2.5$ Hz, 1H, H-1), 1.83-1.76 (m, 4H, H-6, H-7, H-8), 1.26 (s, 9H, H-11), 1.54-1.28 (m, 4H). δ_{C} (125 MHz, MeOD) = 174.9 (C_{Amid}), 156.2 ($\text{C}_{\text{Carbamat}}$), 79.8 (C-12), 79.1 (C-2), 71.4 (C-1), 54.6 (C-5), 40.1 (C-9), 34.5 (C-6, C-7 or C-8), 29.9 (C-6, C-7 or C-8), 28.8 (C-3), 28.5 (C-11), 22.8 (C-6, C-7 or C-8). ESI-TOF: $\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{NaO}_3^+$ m/z berechnet = 306.1788, erhalten = 306.1774.

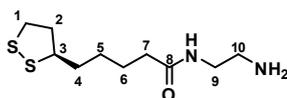
5.4.5 $\text{CF}_3\text{COO}^- \text{NH}_3^+$ -Lys(Fmoc)-Propargylamid (28)



In einem 50 ml Kolben wurden 6 ml TFA in 25 ml DCM gelöst, 402 mg Fmoc-Lys(Boc)-propargylamid (CF-F-3; hergestellt von Tim Gebauer) wurden zugegeben und über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand dreimal mit DCM coevaporiert, mit DCM aufgenommen und säulenchromatographisch gereinigt (9/1 DCM/MeOH). Das Produkt wurde aus Stabilitätsgründen als TFA-Salz gelagert und weiterverwendet. Ausbeute: 344 mg (83%).

NH_3^+ -Lys(Fmoc)-Propargylamid: AJ133 M = 519.51 g/mol; δ_{H} (500 MHz, MeOD) = 7.79 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.63 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.39 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.30 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 4.48 (br s), 4.35 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H), 4.19 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H), 4.00 (d, $J = 1.9$ Hz, 2H), 3.80 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H), 3.11 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.63 (t, $J = 2.3$ Hz, 1H), 1.84 (m, $J = 7.4$ Hz, $J = 7.0$ Hz, 2H), 1.53 (m, $J = 7.4$ Hz, $J = 7.0$ Hz, 2H), 1.40 (m, 2H). δ_{C} (125 MHz, MeOD) = 169.8, 159.0, 145.3, 142.6, 128.8, 128.1, 126.1, 120.9, 79.9, 72.8, 67.6, 54.3, 48.5, 41.2, 32.2, 30.5, 29.6, 22.9, 12.4. δ_{F} = -76.8.

5.4.6 N-(2-aminoethyl)-5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanamid (TAA — 59)

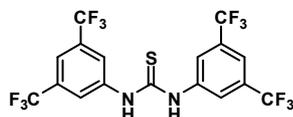


Die Reaktion wurde unter trockenen Bedingungen durchgeführt. In einen 100 ml Schlenk Kolben wurden 3.00 g Liponsäure (TA, 1.00 Äq., 14.54 mmol) und 2.59 g 1,1-Carbonyldiimidazol

(1.10 Äq., 15.99 mmol) gegeben. Der Kolben wurde mehrmals evakuiert und mit Argon belüftet, woraufhin bereits eine erste Gasentwicklung einsetzte. Es wurden 30 ml trockenes CHCl_3 hinzugegeben. Die Mischung wurde eine Stunde bei RT gerührt und dann im Argon-Gegenstrom in einen Tropftrichter überführt. In einem 250 ml Mehrhalskolben wurden 8.00 ml Ethylendiamin (EDA; 8.00 Äq., 120.68 mmol) vorgelegt und die aktivierte Liponsäure (TA) langsam (über ca. 45 Minuten) hinzugetropft. Die Reaktion wurde über Nacht gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit dest. Wasser ausgeschüttelt und die organische Phase mit MgSO_4 getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer auf ca. 20 ml eingengt. Das Rohprodukt wurde an der Rf-CombiFlash aufgereinigt (40 g NP Kieselgelsäule, Eluent: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$). Die Produktfraktion wurde auf ca. 15 ml eingengt und als methanolische Stammlösung im Kühlschrank gelagert. Ausbeute: 1.51 g (42%).

TAA: AJ230 $M = 248.41 \text{ g/mol}$; δ_{H} (400 MHz, MeOD) = 3.58 (dq, 1H, $J = 8.9 \text{ Hz}$, $J = 6.3 \text{ Hz}$, H-1), 3.24 (t, $J = 6.3 \text{ Hz}$, 2H, CH_2EDA), 3.14 (m, 2H, H-1, H-3), 2.72 (t, $J = 6.4 \text{ Hz}$, 2H, CH_2EDA), 2.46 (ddd, $J = 13.2 \text{ Hz}$, $J = 12.1 \text{ Hz}$, $J = 6.7 \text{ Hz}$, 1H, H-2), 2.22 (t, $J = 7.5 \text{ Hz}$, 2H, H-7), 1.90 (m, 1H, H-2), 1.77-1.38 (m, 6 H, H-4, H-5, H-6). δ_{C} (100 MHz, MeOD) = 176.3, 57.6, 42.9, 42.0, 41.3, 39.4, 36.9, 35.7, 29.9, 26.7. ESI-TOF: $\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{OS}_2^+$ m/z berechnet = 249.1090, erhalten = 249.1088. IR: $\tilde{\nu} = 3287, 3076, 2928, 2348, 1643, 1551, 1460, 1436, 1350, 1320, 1280, 1254, 1190, 1146, 1137, 1038, 1027, 940 \text{ cm}^{-1}$.

5.4.7 Thioureakatalysator (TUK – 66)^[116]

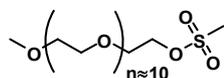


Die Reaktion wurde unter inerten Bedingungen durchgeführt. In einem Schlenkrohr wurden 1.0 g 3,5-Bis-(trifluoromethyl)-anilin (1 Äq., 4.4 mmol) in 30 ml trockenem THF gelöst. In einem weiteren Schlenkrohr wurden 1.2 g 3,5-Bis-(trifluoromethyl)-phenylthioisocyanat (1 Äq., 4.4 mmol) in 7 ml trockenem THF gelöst. Beide Kolben wurden bei 0°C gerührt. Das Thioisocyanat wurde dann langsam zu der Anilinverbindung hinzugetropft. Da nach einem Tag laut DC keinerlei Umsatz stattgefunden hatte wurde 1 Äq. NEt_3 hinzugegeben und über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde abdestilliert und man erhielt ein gelbes Öl und weiße Kristalle. Der Rückstand wurde in Et_2O aufgenommen und zweimal mit Wasser und einmal mit gesättigter NaCl -Lösung extrahiert. Es wurde über MgSO_4 getrocknet, filtriert und das LM abdestilliert. Das Produkt wurde durch Umkristallisation gereinigt. Ausbeute aus der ersten Umkristallisation: 1.0 g (46%).

TUK: AJ153 $M = 500.30 \text{ g/mol}$; δ_{H} (400 MHz, MeOD) = 8.21 (s, 4H, H-1), 7.72 (s, 2H), 4.89 (s, 2H). δ_{C} (100 MHz, MeOD) = 182.5 (C=S), 142.6, 132.9 (quart., $J = 33.4 \text{ Hz}$, CH), 130.3 ($\text{C}_{\text{quart-N}}$), 124.8 (m), 124.7 (q,

$J = 272$ Hz, CF_3), 118.9 (quint., $J = 4.1$ Hz, CH). δ_{F} (400 MHz, MeOD) = -64.4. ESI-TOF: $\text{C}_{17}\text{H}_9\text{F}_{12}\text{N}_2\text{S}^+$ m/z berechnet = 501.0289, erhalten = 501.0297. IR: $\tilde{\nu} = 3203, 3167, 3048, 2987, 2894, 1626, 1551, 1465, 1371, 1325, 1274, 1170, 1120, 1107, 1048, 1027, 1001, 928, 890, 848, 714, 700, 682$ cm^{-1} .

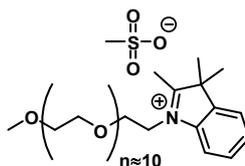
5.4.8 mPEG₅₅₀-OMs (76)



20.00 g mPEG₅₅₀ (1.0 Äq., 36.4 mmol) wurden in 100 ml THF gelöst und 6.6 ml Triethylamin (1.3 Äq., 47.4 mmol) hinzugegeben. Bei RT wurden 3.4 g Mesylchlorid (1.2 Äq., 43.6 mmol) hinzugegeben und die Reaktion 60 Stunden bei RT gerührt. Das THF wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in 1 l Et₂O ausgefällt. Ausbeute: 23.0 g (quantitativ).

mPEG₅₅₀OMs: AJ190 M ≈ 630 g/mol; δ_{H} (250 MHz, D₂O) = 4.48 (m, 2H, H₂COMs), 3.87 (m, 2H, CH₂CH₂OMs), 3.72 (m, 40H, CH₂mPEG₅₅₀), 3.65 (m, 4H, CH₂CH₂OMe), 3.41 (s, 3H, CH₃), 3.26 (s, 3H, CH₃-Mesyl).

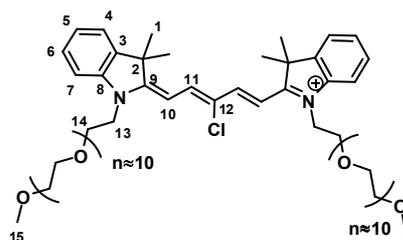
5.4.9 Indol-mPEG₅₅₀ (77)



Die Reaktion wurde in der Mikrowelle durchgeführt. Es wurden 1.0 g 2,3,3-Trimethylindolin (1 Äq., 6.3 mmol) und 7.9 g mPEG₅₅₀OMs (2 Äq., 12.6 mmol) im Reaktionsgefäß zusammengegeben und bei 200 W (T = 100-120°C) 25 Minuten erhitzt. Das Gemisch wurde über Nacht stehen gelassen und in 600 ml Et₂O ausgefällt. Es wurde ein rotbrauner sirupartiger Rückstand erhalten, der säulenchromatographisch gereinigt wurde (Kieselgel, DCM/MeOH). Ausbeute: 0.3 g (6%).

Indol-mPEG₅₅₀: AJ192 M ≈ 658 g/mol; δ_{H} (250 MHz, CDCl₃/MeOD) = 7.59 (m, 1H, H_{Ar}), 7.41 (m, 3H, H_{Ar}), 4.92 (t, 4H, CH₂CH₂-N), 3.43 (m, 38H, CH₂-mPEG₅₅₀), 3.15 (s, 3H, CH₃-OMs), 2.94 (m, 4H, CH₂CH₂OMe), 2.51 (s, 3H, CH₃-mPEG₅₅₀), 1.39 (s, 6H, CH₃), 1.13 (m, 6H, CH₃). ESI-TOF: $\text{C}_{34}\text{H}_{60}\text{NO}_{11}\text{S}^+$ m/z berechnet = 658.4161, erhalten = 658.4222.

5.4.10 CyAiSym-mPEG₅₅₀ (78)



In einem 10 ml Kolben wurden 7 mg Indol-mPEG₅₅₀ (1 Äq., 0.04 mmol), 11 mg 2-Chloromalon-dianilhydrochlorid (2.9 Äq., 0.11 mmol) und 29 mg NaOAc (9 Äq., 0.34 mmol) in 2 ml Essigsäure-anhydrid bei 120°C über Nacht gerührt. Das blaue Rohprodukt wurde nach Entfernung des Lösungsmittels säulenchromatographisch gereinigt (RP-Kieselgel, Wasser:MeOH + 0.1% TFA). Ausbeute: 27 mg (47%). Dadurch, dass das Farbstoffderivat mit einem Polymer konjugiert ist, kann im NMR keine sinnvolle Integration der Signale erfolgen.

CyAiSym-mPEG₅₅₀: AJ212 $M \approx 1394$ g/mol. δ_{H} (700 MHz, MeOD) = 8.35 (d, $J = 13.5$ Hz, H-11), 8.05-6.92 (m, verschiedene H_{Ar} durch mPEG Polymer), 6.62 (d, $J = 13.5$ Hz, H-10), 4.84 (H₂O), 3.95 (m, H-13), 3.68-3.52 (m, 2H, H-21), 3.36 (m), 1.77 (s, 12H, H-1), 1.31 (m, H-15). δ_{C} (175 MHz, MeOD) = 177.1, 148.9, 143.7, 142.0, 137.0, 129.8, 129.7, 128.8, 126.9, 126.7, 124.4, 123.9, 123.4, 123.4, 113.1, 110.5, 102.4, 72.9, 72.1, 71.5 (m), 69.1, 59.1, 51.1, 47.9, 46.1, 45.4, 40.9, 33.1, 30.7 (m), 28.4, 27.7, 24.7, 23.7. ESI-TOF: C₆₉H₁₁₄ClN₂NaO₂₁²⁺ m/z berechnet = 682.3745, erhalten = 682.3769.

5.5 SYNTHESE DER POLYGLYCEROLDERIVATE

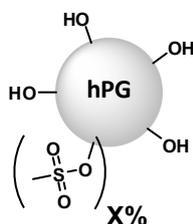
Zur Synthese aller Polyglycerolderivate wurde, wenn nicht explizit vermerkt, hochverzweigtes Polyglycerol der Charge FP071 von Florian Paulus verwendet. PG_{10.000}(OH) FP071 GPC Daten: $M_n = 7210$ g/mol; $M_w = 10140$ g/mol; PDI 1.54. Bei einem Molgewicht von 7210 g/mol entspricht dies ca. 97 Hydroxylgruppen und 487 Protonen für das PG Gerüst. Die Integrale für ¹H NMR-Spektren beziehen sich auf eine theoretische Gesamtprotonenzahl von 487 H's für das unfunktionalisierte PG.

PG_{10.000}(OH): FP071 $M_n = 7210$ g/mol; δ_{H} (400 MHz, D₂O) = 8.17, 5.56-4.88 (m, CH₂ PG), 4.84 (D₂O), 4.57-3.36 (br m, CH₂ PG), 3.46 (q, CH₂ NMP), 2.83 (s, CH₃ NMP), 2.36 (t, CH₂ NMP), 2.16 (s), 2.04 (q, CH₂ NMP), 1.37 (m), 0.91 (br s, PG Starter). δ_{C} (100 MHz, MeOD) = 81.6, 79.8, 74.0, 72.9, 72.4, 72.2, 71.0, 70.7, 64.4, 50.8, 31.7, 29.8, 18.5. IR : $\tilde{\nu} = 2871$ (s), 1660(s), 1456, 1405, 1323, 1304, 1261, 1066(s), 1042(s), 930, 868, 850 cm⁻¹.

Der Funktionalisierungsgrad (FG) wurde über das ¹H NMR bestimmt. Da die Integration willkürlich gewählt werden kann und die spezifischen Signale nicht immer isolierte Signale sind, ist der Funktionalisierungsgrad keine absolute sondern eine ungefähre Größe ($\pm 3\%$). Eine weitere Ungenauigkeit des FG ist auch durch den Sachverhalt begründet, dass es sich um ein Polymer (PDI = 1.54) handelt, welches funktionalisiert wird. Zur Bestimmung der Funktionalisierung wurden die Signale der Protonen des PG-Gerüsts [zwei breite Multipletts, links (2-5% der Wasserstoffatome) und rechts (95-98% der Wasserstoffatome) des Wasser Peaks] auf 5 gesetzt. Dies entspricht der Anzahl der Wasserstoffatome im Monomer und kann ins Verhältnis zu den Protonen der Funktionalität gesetzt werden. Daraus konnte der FG der Mesylatverbindungen bestimmt werden. Unter der Annahme, dass immer ein vollständiger Umsatz aller

Mesylatgruppen erfolgt, wurden alle weiteren Funktionalisierungsgrade ausgehend vom Mesylierungsgrad bestimmt.

5.5.1 PG_{10.000}(OMs)_{x%} (37-39)



Die Reaktion wurde unter Ausschluss von Wasser und Sauerstoff durchgeführt. Polyglycerol (PG) wurde dreimal mit Toluol coevaporiert, um Spuren von Wasser und Methanol azeotrop zu entfernen, und danach in trockenem Pyridin (0.5 mmol PG pro 100 ml Pyridin) gelöst. Die Mischung wurde auf 0°C gekühlt und Mesylchlorid (1.2 Äq MsCl pro umzuwandelnder OH-Gruppe) wurde langsam mittels Spritze hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei RT über Nacht gerührt. Das Pyridin wurde am Rotationsverdampfer abdestilliert. Nach Begutachtung des Roh-NMRs wurde das Produkt entweder ohne weitere Aufarbeitung verwendet oder 24 Stunden in Methanol dialysiert.

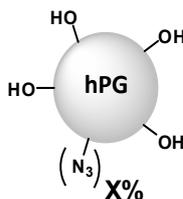
PG_{5.000}(OMs)_{8%}: AJ105, FG = 8%, Ausbeute = 90%, M = 6069 g/mol, δ_H (400 MHz, D₂O) = 8.25 (m, Pyridin), 8.61 (m, Pyridin), 8.11 (m, Pyridin), 5.47 (s, DCM), 5.01-4.85 (m, funkt. CH₂), 4.53-4.30 (m, funkt. CH₂), 4.14-3.44 (br m, CH₂ PG Gerüst), 3.28 (s, CH₃ Ms), 3.24 (s, CH₃ Ms), 2.22 (s, PG Starter), 1.17 (t, PG Starter). δ_C (100 MHz, D₂O) = 145.1 (Pyridin), 137.5 (Pyridin), 126.2 (Pyridin), 103.4, 79.7- 60.8 (m, CH₂ PG), 38.0 - 36.5 (m, CH₂ Ms).

PG_{10.000}(OMs)_{4%} 37: AJ185, FG = 4%, Ausbeute = 80%, M = 7524 g/mol, δ_H (400 MHz, MeOD) = 9.00 (m, Pyridin), 8.66 (m, Pyridin), 8.16 (m, Pyridin), 5.52 (s, DCM), 5.31-5.03 (m, 11H, PG), 4.79 (H₂O), 4.42-3.51 (br m, 476H, PG), 3.17 (br m, 12H, CH₃ Ms), 2.70 (s), 1.35 (m), 1.13 (m, PG Starter), 0.90 (br s, PG Starter). δ_C (100 MHz, MeOD) = 79.7- 64.3 (m, CH₂ PG), 40.0-39.3 (m, CH₃ Ms). IR: $\tilde{\nu}$ = 2917, 2873 (s), 1647(s), 1456, 1417, 1347, 1255, 1069 (s), 1043 (s), 931, 846, 826 cm⁻¹.

PG_{10.000}(OMs)_{11%} 38: AJ186, FG = 11%, Ausbeute = 84%, M = 8081 g/mol; δ_H (400 MHz, MeOD) = 9.01 (m, Pyridin), 8.66 (m, Pyridin), 8.16 (m, Pyridin), 5.50 (s, DCM), 5.36-5.03 (m, 4H, PG), 4.86 (H₂O), 4.58-3.52 (br m, 483H, PG), 3.17 (br m, 33H, CH₃ Ms), 2.71 (s), 1.35 (m, PG Starter), 0.91 (m, 3H, PG Starter). δ_C (100 MHz, MeOD)(sehr dünne Probe) = 73.9-69.6 (m, CH₂ PG). IR: $\tilde{\nu}$ = 2912, 2874 (s), 1636 (s), 1456, 1417, 1345, 1258, 1172 (s), 1111 (s), 1068 (s), 1039 (s), 969 (s), 930(s), 866, 837 cm⁻¹.

PG_{10.000}(OMs)_{24%} 39: AJ184, FG = 24%, Ausbeute = 66%, M = 9033 g/mol, δ_H (400 MHz, MeOD/Aceton-d₆) = 9.09 (m, Pyridin), 8.73 (m, Pyridin), 8.24 (m, Pyridin), 5.39-4.44 (m, 22H, PG), 4.39 (H₂O), 4.28-3.41 (m, 469H, PG), 3.21 (m, 70H, CH₃ Ms), 2.69 (s), 2.12 (q, Aceton-d₆), 1.35 (m, PG Starter), 0.95 (br s, 3H, PG Starter). IR: $\tilde{\nu}$ = 2929, 2880, 2517, 1636 (s), 1456, 1417, 1343 (s), 1259, 1217, 1172 (s), 1101, 1074 (s), 1046, 972 (s), 931 (s), 834 cm⁻¹.

5.5.2 PG_{10.000}(N₃)_{x%} (40-42)



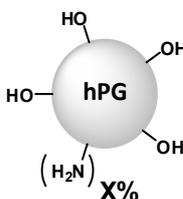
Das PG-Mesylat wurde in DMF am Rotationsverdampfer in Lösung gebracht. Dann wurde NaN₃ hinzugegeben (2 Äq. NaN₃ pro umzuwandelnder Mesylgruppe) und über Nacht bei 70°C Badtemperatur gerührt. Das DMF wurde am Hochvakuum entfernt. Das Roh-NMR wurde in Hinblick auf nicht umgesetztes Mesylat untersucht. Bei vollständiger Umsetzung wurde das Rohprodukt in MeOH aufgenommen und 48 Stunden in MeOH dialysiert. ¹H NMR- und IR-Spektrum entsprachen den Literaturwerten.^[113a]

PG_{10.000}(N₃)_{4%} 40: AJ193, FG = 4%, Ausbeute = 71%, M = 7311 g/mol, δ_H (400 MHz, MeOD) = 8.99 (m, Pyridin), 8.66 (m, Pyridin), 8.16 (m, Pyridin), 5.64-5.14 (br, 4H, PG), 4.83 (H₂O), 4.39-3.31 (m, 483H, PG), 2.71 (s), 1.28 (m, PG Starter), 0.91 (br s, PG Starter). IR: $\tilde{\nu}$ = 2914, 2875, 2497, 2103, 2070 (s), 2036, 1456, 1408, 1355, 1330, 1308, 1262, 1115, 1077 (s), 1026 (s), 977 (s), 873, 850 cm⁻¹.

PG_{10.000}(N₃)_{11%} 41: AJ194, FG = 11%, Ausbeute = 67%, M = 7489 g/mol, δ_H (400 MHz, MeOD) = 8.96 (m, Pyridin), 8.63 (m, Pyridin), 8.14 (m, Pyridin), 5.54-5.09 (m, 4H, PG), 4.84 (H₂O), 4.24-3.39 (m, 483H, PG), 1.33 (m, PG Starter), 0.89 (br s, PG Starter). IR: $\tilde{\nu}$ = 2914, 2875, 2494, 2101 (s), 2070 (s), 2032 (s), 1456, 1356, 1273, 1115, 1079 (s), 1026 (s), 975 (s), 872, 846 cm⁻¹.

PG_{10.000}(N₃)_{24%} 42: AJ195, FG = 24%, Ausbeute = 86%, M = 7794 g/mol, δ_H (400 MHz, MeOD) = 8.98 (m, Pyridin), 8.65 (m, Pyridin), 8.15 (m, Pyridin), 4.85 (H₂O), 4.27-3.51 (m, 487H, PG), 1.35 (m, PG Starter), 0.92 (br s, PG Starter). IR: $\tilde{\nu}$ = 2909, 2872, 2520, 2098 (s), 2030 (s), 1456, 1370, 1268, 11125, 1076 (s), 976 (s), 932, 842, 772 cm⁻¹.

5.5.3 PG_{10.000}(NH₂)_{x%} (43-45)



Das PG-Azid wurde bei 60°C in THF (0.10 mmol/5 ml) gelöst und Triphenylphosphin (5 Äq. PPh₃ pro funktioneller Gruppe) wurde hinzugeben. Es erfolgte eine erste Gasblasenentwicklung. Dann wurde Milliporewasser hinzugefügt (0.10 mmol/1 ml) und die Reaktion wurde über Nacht gerührt. Für den Ausgang der Reaktion war es nicht entscheidend ob die Reaktionslösung eine klare Mischung (niedriger FG) oder emulsionsartig (bei höherem FG) war. Das THF wurde dem Gemisch am Rotationsverdampfer größtenteils entzogen. Das Rohprodukt wurde mit zusätzlichem Wasser

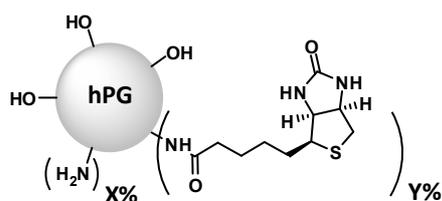
aufgenommen und so oft mit Toluol extrahiert, bis in der organischen Phase laut DC-Probe kein PPh_3O mehr zu ermitteln war. Dem Toluol wurden ca. 5% MeOH beigemischt, um die erwünschte Polarität der organischen Phase zu erzielen. Bei Funktionalisierungen über 10% musste jedoch meist noch eine Dialyse in MeOH durchgeführt werden. Das Produkt wurde bis zum vollständigen Umsatz der Azidfunktion reduziert (Kontrolle IR-Spektrum), dies erforderte teilweise eine mehrmalige Reduktion des Eduktes. Je nach FG wurde eine gelbliche (4%) bis orangefarbene harzartige Substanz erhalten, die als methanolische Stammlösung im Kühlschrank gelagert wurde. Die Charakterisierung durch ^1H NMR- und IR-Spektrum entsprach der der literaturbekannte Verbindung.^[113a]

PG_{10.000}(NH₂)_{4%} 43: AJ198, FG = 4%, Ausbeute = 76%, M = 7206 g/mol, δ_{H} (400 MHz, MeOD) = 8.99 (m, Pyridin), 8.66 (m, Pyridin), 8.16 (m, Pyridin), 4.87 (H₂O), 4.27-3.52 (m, 482H, PG), 3.23-2.65 (br, 5H, PG), 2.71 (s), 1.28 (m, PG Starter), 0.91 (br s, PG Starter). IR: $\tilde{\nu}$ = 2904, 2870, 2035, 1651, 1637, 1598, 1456, 1325, 1065 (s), 1042 (s), 931, 868, 850 cm^{-1} .

PG_{10.000}(NH₂)_{11%} 44: AJ199, FG = 11%, Ausbeute = 73%, M = 7199 g/mol, δ_{H} (400 MHz, MeOD) = 9.00 (m, Pyridin), 8.65 (m, Pyridin), 8.16 (m, Pyridin), 4.84 (H₂O), 4.62-3.50 (m, 460H, PG), 3.35 (s, MeOH), 3.28-2.65 (m, 27H, PG), 1.28 (m, PG Starter), 0.91 (br s, PG Starter). IR: $\tilde{\nu}$ = 2904, 2870, 2035 (s), 1652, 1634, 1597, 1456, 1326, 1305, 1255, 1115, 1070 (s), 1036 (s), 931 (s), 863, 850 cm^{-1} .

PG_{10.000}(NH₂)_{24%} 45: AJ200, FG = 24%, Ausbeute = 72%, M = 7187 g/mol, δ_{H} (400 MHz, MeOD) = 8.98 (m, Pyridin), 8.63 (m, Pyridin), 8.14 (m, Pyridin), 4.82 (H₂O), 4.65-3.47 (m, 440H, PG), 3.33 (s, MeOH), 3.23-2.63 (m, 47H, PG), 1.32 (m, PG Starter), 0.89 (br s, PG Starter). IR: $\tilde{\nu}$ = 2900, 2868, 2520, 2026 (s), 1634, 1597, 1456, 1370, 1327, 1258, 1218, 1072 (s), 973, 841, 772 cm^{-1} .

5.5.4 PG_{10.000}(NH₂)_{x%}(Biotin)_{y%} (50, 51)



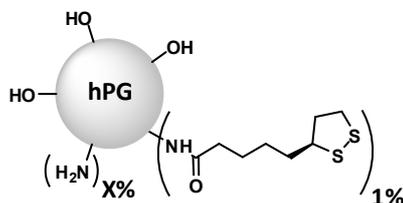
Das Polyglycerolamin wurde aus der methanolischen Stammlösung verwendet. Das Methanol wurde bei einer Temperatur kleiner 50°C am Rotationsverdampfer abdestilliert und das Edukt wurde in DMF gelöst. In einem zweiten Kolben wurde Biotin (1 Äq. pro zu funktionalisierender Gruppe) unter Erwärmung in DMF gelöst und HSTU (1.1 Äq. pro Äq. Biotin) und DIPEA (3 Äq./ Äq. Biotin) hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde eine Stunde bei RT gerührt, dann zur Polyglycerollösung gegeben und über Nacht bei RT gerührt. Das DMF wurde am Rotationsverdampfer abdestilliert, das Rohprodukt in MeOH aufgenommen und 48 h in MeOH dialysiert. Es wurden gelbliche, harzige Produkte erhalten. Der Grad der Funktionalisierung wurde

durch das Verhältnis der Integrale des PG-Grundgerüsts zum Multipllett der CH₂-Gruppe des Biotins (2.24 ppm) im ¹H NMR-Spektrum bestimmt.

PG_{10.000}(NH₂)_{2%}(Biotin)_{2%} 50: AJ248 FG: NH₂ = 2%, Biotin = 2%, Ausbeute = 81%, M = 7749 g/mol; δ_H (400 MHz, MeOD/CDCl₃) = 8.96 (m, Pyridin), 8.60 (m, Pyridin), 8.11 (m, Pyridin), 7.65 (CDCl₃), 5.45-4.82 (m, 8H, PG), 4.70 (H₂O), 4.50 (m, H-2 Biotin), 4.32 (m, H-3 Biotin), 4.19-3.49 (m, 479H, PG), 3.19 (m, Biotin), 2.91 (dd, H-6 Biotin), 2.72 (d, H-12 Biotin), 2.23 (t, 4.80H sollen 2H sein, H-16), 1.77-1.34 (m, Biotin), 1.25 (m, PG Starter), 0.86 (m, PG Starter). δ_C (175 MHz, MeOD/CDCl₃ 1/1) = 175.0 (Biotin), 164.5 (Biotin), 145.7 (d), 127.9, 109.4 (d), 81.6-42.2 (m, CH₂-PG), 77.6 (CDCl₃), 60.2 (Biotin), 57.3 (Biotin), 55.6 (Biotin) 49.3 (Biotin), 40.1 (Biotin), 35.6 (Biotin), 29.5 (Biotin), 28.4 (Biotin), 28.1 (Biotin), 17.5. IR: ν̄ = 2917, 2890, 2032, 1680, 1656, 1451, 1411, 1338, 1217, 1109, 1083, 1023 (s), 930, 870, 846 751 (s), 665 cm⁻¹.

PG_{10.000}(NH₂)_{4%}(Biotin)_{7%} 51: AJ249, FG: NH₂ = 4%, Biotin = 7%, Ausbeute = 97%, M = 8816 g/mol, δ_H (400 MHz, MeOD/CDCl₃) = 8.95 (m, Pyridin), 8.63 (m, Pyridin), 8.12 (m, Pyridin), 6.43 (br s, NH, Biotin), 6.33 (br s, NH, Biotin), 5.48-4.83 (m, 11H, PG), 4.74 (H₂O),), 4.51 (m, Biotin), 4.41 (br s), 4.32 (m, Biotin), 4.18-3.50 (m, 476H, PG), 3.20 (m, Biotin), 2.92 (m, Biotin), 2.73 (d, Biotin), 2.24 (t, 14H, Biotin), 1.78-1.34 (m, Biotin), 1.13 (m, PG Starter), 0.87 (m, PG Starter). δ_C (175 MHz, MeOD/CDCl₃ 1/1) = 175.6 (Biotin), 165.1 (Biotin), 146.1 (d), 128.5, 80.6-42.9 (m, CH₂-PG), 78.3 (CDCl₃), 60.9 (Biotin), 57.9 (Biotin), 56.3 (Biotin) 49.9 (Biotin), 40.8 (Biotin), 36.2 (Biotin), 30.1 (Biotin), 29.1 (Biotin), 28.8 (Biotin), 26.1 (Biotin), 18.2. IR: ν̄ = 2918, 2872, 2359, 1341, 1682 (s), 1651, 1551, 1459, 1432, 1331, 1315, 1223, 1105, 1075 (s), 1027 (s), 931, 843, 750, 684 cm⁻¹.

5.5.5 PG_{10.000}(TA)_{1%}(NH₂)_{x%} (55, 56)



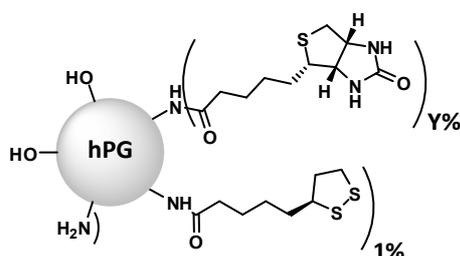
Das Polyglycerolamin wurde aus der methanolischen Stammlösung verwendet. Das Methanol wurde bei unter 50°C am Rotationsverdampfer abdestilliert und das Edukt in DMF gelöst. Es wurden Liponsäure (TA, 1 Äq.), HSTU (1.1 Äq.) und DIPEA (3 Äq.) in einem weiteren Kolben in DMF gelöst, eine Stunde bei RT gerührt und zur Polyglycerollösung gegeben. Die Reaktion wurde über Nacht bei RT gerührt. Das DMF wurde am Rotationsverdampfer abdestilliert (unter 55°C, Polymerisationsgefahr der Liponsäure), das Rohprodukt in MeOH aufgenommen und 48 h in MeOH dialysiert. Es wurden gelbliche, sirupartige Produkte erhalten. Der Grad der Funktionalisierung wurde durch das Verhältnis der Integrale des PG-Grundgerüsts zum Triplet der CH₂-Gruppe der Liponsäure (2.24 ppm) im ¹H NMR-Spektrum bestimmt.

PG_{10.000}(NH₂)_{4%} 55: AJ267, FG: NH₂ = 3%, TA = 1.3%, Ausbeute = 79%, M = 7452 g/mol, δ_H (700 MHz, MeOD) = 8.97 (m, Pyridin), 8.65 (m, Pyridin), 8.15 (m, Pyridin), 7.73 (NH), 7.36 (NH), 4.80 (H₂O), 4.27-3.50 (m, 477H, PG), 3.29-2.90 (br, 10H, PG), 2.71 (s), 2.47 (TA), 2.24 (m, 2.61H, TA), 1.92 (TA), 1.75 (TA), 1.66 (TA), 1.47-1.34 (TA), 1.28 (m, PG Starter), 0.90 (br s, PG Starter). δ_C (175 MHz, MeOD) = 176.2, 170.2, 164.8, 146.8

(d), 132.1, 130.9, 128.9, 110.4, 81.5-44.9 (CH₂-PG), 57.6 (TA), 41.3 (TA), 39.6 (TA), 35.7 (TA), 29.8 (TA), 26.6 (TA). IR: $\tilde{\nu}$ = 2922, 2871, 1650, 1557, 1456, 1346, 1331, 1257, 1229, 1101, 1057, 1034 (s), 930, 844 cm⁻¹.

PG_{10.000}(NH₂)_{11%} 56: AJ268, FG: NH₂ = 10%, TA = 1.3%, Ausbeute = 73%, M = 7455 g/mol, δ_H (700 MHz, MeOD) = 8.98 (m, Pyridin), 8.65 (m, Pyridin), 8.15 (m, Pyridin), 7.75 (NH), 7.37 (NH), 4.84 (H₂O),), 4.28-3.50 (m, 444H, PG), 3.35 (s, MeOH), 3.29-2.40 (m, 43H, PG), 2.24 (m, CH₂ TA), 1.92 (m, TA), 1.74 (m, TA), 1.65 (m, TA), 1.48-1.34 (m, TA), 1.28 (m, PG Starter), 0.91 (br s, PG Starter). δ_C (175 MHz, MeOD) = 176.2, 170.3, 164.8, 146.8(d), 132.2, 130.9, 129.0, 81.4-43.4 (CH₂-PG), 57.6 (TA), 41.3 (TA), 39.3 (TA), 36.7 (TA), 35.6 (TA), 29.8 (TA), 26.6 (TA). IR: $\tilde{\nu}$ = 2912, 2876, 1644, 1459, 1334, 1256, 1077(s), 1042, 1029, 980, 931, 869, 845 cm⁻¹.

5.5.6 PG_{10.000}(TA)_{1%}(NH₂)_{x%}(Biotin)_{y%} (57, 58)



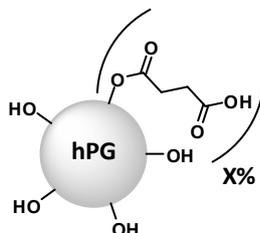
Die Reaktion wurde unter inerten Bedingungen durchgeführt. Das TAA-Derivat des Polyglycerolamins wurde aus der methanolischen Stammlösung verwendet. Das Methanol wurde abdestilliert und das Edukt in DMF aufgenommen. Mit Hilfe von HSTU (1 Äq. pro zu funktionalisierender Gruppe) und DIPEA (3 Äq. pro 1 Äq. HSTU) wurde der NHS-Ester des Biotins (1 Äq. pro zu funktionalisierender Gruppe) in situ gebildet und nach einer Stunde zum Polyglycerolderivat hinzugegeben. Die Reaktion wurde über Nacht gerührt. Das DMF wurde am Hochvakuum abdestilliert, das Rohprodukt in MeOH aufgenommen und 48 Stunden dialysiert. Die Produkte wurden als gelbliche Harze erhalten. Der höchste FG wurde beim Trocknen schaumartig fest und war nicht mehr in reinem MeOH löslich. Der Grad der Funktionalisierung wurde durch das Verhältnis der Integrale des PG-Grundgerüsts (487 H's) zum H-3 des Biotins (4.33 ppm) im ¹H NMR-Spektrum errechnet.

PG_{10.000}(TA)_{1%}(NH₂)_{4%} 57: AJ263, FG: NH₂ = 2%, TA = 1.3%, Biotin = 1%, Ausbeute = 87%, M = 7678 g/mol, δ_H (700 MHz, MeOD) = 8.98 (m, Pyridin), 8.65 (m, Pyridin), 8.16 (m, Pyridin), 5.46-4.89 (m, 4H, PG), 4.83 (H₂O), 4.53 (m, 1H, H-2 Biotin), 4.33 (m, H-3 Biotin), 4.27-3.50 (m, 477H, PG), 3.29-2.90 (br, 6H, PG), 2.75 (m), 2.47 (TA), 2.25 (m, TA und Biotin), 1.92 (TA), 1.75-1.30 (m), 1.28 (m, PG Starter), 0.90 (br s, PG Starter). δ_C (175 MHz, MeOD) = 176.4, 147.2, 129.1, 110.5, 81.6-43.7 (CH₂-PG), 57.6 (TA), 57.0 (Biotin), 55.8 (Biotin), 41.4 (TA), 39.5 (TA), 36.9, 35.8 (TA), 30.7 (Biotin), 30.0 (Biotin), 29.8 (TA), 26.6 (TA), 23.7 (Biotin). IR: $\tilde{\nu}$ = 2936, 2922, 2873, 2849, 2833, 1652, 1558, 1456, 1408, 1331, 1258, 1105 (s), 1059 (s), 1032, 931, 846 cm⁻¹.

PG_{10.000}(TA)_{1%}(NH₂)_{11%} 58: AJ270 FG: NH₂ = 6%, TA = 1.3%, Biotin = 4%, Ausbeute = 97%, M = 8340 g/mol, δ_H (700 MHz, MeOD/CDCl₃ 1/1) = 8.93 (m, Pyridin), 8.60 (m, Pyridin), 8.13 (m, Pyridin), 7.59 (CDCl₃), 5.44-4.88 (m, 7H, PG), 4.62 (H₂O),), 4.49 (m, H-2 Biotin), 4.31 (m, 3.9H, H-3 Biotin), 4.24-3.48 (m, 462H, PG), 3.35 (s,

MeOH), 3.29-3.01 (m, 18H, PG), 2.91 (m, Biotin), 2.72 (m, Biotin), 2.51-2.40 (m), 2.22 (m, CH₂ TA und Biotin), 1.90 (m, TA), 1.72-1.58 (m), 1.44-1.28 (m), 1.13 (m, PG Starter), 0.86 (br s, PG Starter). δ_c (175 MHz, MeOD/CDCl₃ 1/1) = 175.6, 165.1, 146.3, 128.6, 82.3-43.0 (CH₂-PG), 78.2 (CDCl₃), 58.0 (TA), 57.1 (Biotin), 56.4 (Biotin), 40.8 (TA), 39.0 (TA), 36.3, 35.2 (TA), 30.2 (Biotin), 29.4 (Biotin), 29.2 (TA), 28.8 (TA), 23.2 (Biotin). IR: $\tilde{\nu}$ = 2926, 2879, 2034, 1676, 1652, 1556, 1456, 1334, 1256, 1098, 1079, 1024(s), 932, 869, 845, 753 cm⁻¹.

5.5.7 PG_{10.000}(COOH)_{x%} (46-49)



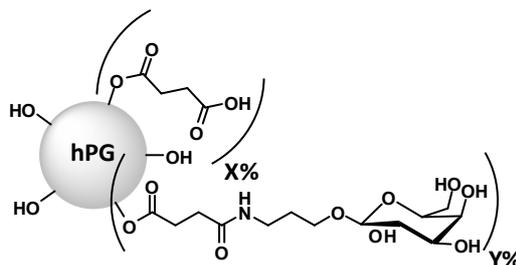
Das Polyglycerol wurde unter starkem Rühren in Pyridin gelöst (0.5 mmol/100 ml). Dann wurde Bernsteinsäureanhydrid (1.2 Äq. pro zu funktionalisierender Gruppe) hinzugegeben, welches nach einiger Zeit komplett in Lösung ging. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht gerührt. Pyridin wurde am Rotationsverdampfer abdestilliert und das Produkt ultrafiltriert (MWCO 5000). Als Produkt wurden farblose honigartige Substanzen erhalten. Die Produktsignale entsprachen denen der Literatur.^[113b]

PG_{10.000}(COOH)_{7%} 46: AJ187, FG = 7%, Ausbeute = quant., M = 7879 g/mol, δ_H (400 MHz, MeOD) = 8.54 (m, Pyridin), 7.98 (m, Pyridin), 7.45 (m, Pyridin), 4.89 (H₂O), 4.28-3.52 (m, 487H, PG), 2.64 (br s, 26H, CH₂ Bernsteinsäure), 1.35 (m, PG Starter), 0.91 (br s, PG Starter). δ_c (100 MHz, MeOD) = 176.0, 175.9 (PG-COOH), 174.6-174.0 (PG-COOR), 81.4-40.3 (CH₂-PG), 29.9-29.6 (CH₂ COOH). IR: $\tilde{\nu}$ = 2915, 2874, 1728 (s), 1652, 1456, 1408, 1329, 1252, 1111, 1066 (s), 1036, 930, 866, 849 cm⁻¹.

PG_{10.000}(COOH)_{11%} 47: AJ189, FG = 11%, Ausbeute = quant., M = 8322 g/mol, δ_H (400 MHz, MeOD) = 5.49-4.98 (m, 8H, PG), 4.90 (H₂O), 4.29-3.41 (m, 479H, PG), 2.64 (br s, 43H, CH₂ Bernsteinsäure), 1.29 (m, PG Starter), 0.89 (br s, PG Starter). δ_c (100 MHz, MeOD) = 176.1, 175.9 (PG-COOH), 174.6-173.7 (PG-COOR), 81.4-40.3 (CH₂-PG), 30.0-29.7 (CH₂-COOH). IR: $\tilde{\nu}$ = 2919, 2874, 2512 (br), 1732 (s), 1454, 1407, 1357, 1250, 1222, 1101, 1072, 1022 (s), 981, 934, 869, 848 cm⁻¹.

PG_{10.000}(COOH)_{19%} 48: AJ188, FG = 19%, Ausbeute = 52%, M = 9101 g/mol, δ_H (400 MHz, MeOD) = 8.56 (m, Pyridin), 7.89 (m, Pyridin), 7.47 (m, Pyridin), 5.20-5.14 (m, 6H, PG), 4.94 (H₂O), 4.39-3.6 (m, 481H, PG), 2.64 (br s, 75H, CH₂ Bernsteinsäure), 1.34 (m, PG Starter), 0.91 (br s, PG Starter). IR: $\tilde{\nu}$ = 2919, 2875, 1725 (s), 1651, 1455, 1405, 1386, 1349, 1246, 1215, 1161, 1111, 1069 (s), 1036, 1003, 931, 876, 838 cm⁻¹.

PG_{10.000}(COOH)_{27%} 49: AJ226 FG = 27%, Ausbeute = 41%, M = 9903 g/mol; δ_H (400 MHz, MeOD) = 4.96 (H₂O), 4.39-3.6 (m, 487H, PG), 2.63 (br s, 107H, CH₂ Bernsteinsäure), 1.34 (m, PG Starter), 0.89 (br s, PG Starter). δ_c (100 MHz, MeOD) = 175.9 (PG-COOH), 174.6-173.8 (PG-COOR), 81.1-45.7 (CH₂ PG), 30.1-29.7 (CH₂ COOH). IR: $\tilde{\nu}$ = 2916, 2876, 2558 (br), 1730 (s), 1442, 1399, 1386, 1358, 1245, 1214, 1162, 1106, 1075, 1022 (s), 943, 869, 837, 805 cm⁻¹.

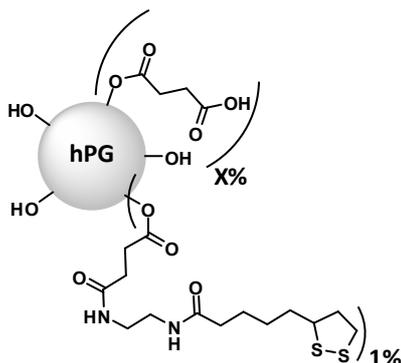
5.5.8 $\text{PG}_{10.000}(\text{COOH})_{X\%}(\text{Gal})_{Y\%}$ (52-54)

Die Polyglycerolcarbonsäure wurde aus der methanolischen Stammlösung verwendet. Das Methanol wurde bei unter 50°C am Rotationsverdampfer abdestilliert und das Edukt wurde in DMF gelöst. Es wurden HSTU (1.1 Äq. pro zu funktionalisierender Gruppe) und DIPEA (3 Äq./Äq. HSTU) hinzugeben und eine halbe Stunde bei RT gerührt. Das 1-O-(β-D-Galactopyranosyl)-3-aminopropanol wurde in DMF aufgenommen und zu dem gebildeten Aktivester des Polyglycerols gegeben. Die Reaktion wurde über Nacht bei RT gerührt. Das DMF wurde am Rotationsverdampfer abdestilliert, das Rohprodukt in MeOH aufgenommen und 48 h in MeOH dialysiert. Es wurden farblose, sirupartige Produkte erhalten. Der Grad der Funktionalisierung wurde durch das Verhältnis der Integrale der beiden CH₂-Gruppen der eingeführten Bernsteinsäure (die Größe des Integrals wurde festgelegt auf die Größe des Integrals dieses Signals im Edukt) zum Multipllett der CH₂-Gruppe des Galactose Linkers (1.77 ppm) im ¹H NMR-Spektrum bestimmt.

PG_{10.000}(COOH)_{3%}(Gal)_{4%} 52: AJ214, FG: COOH = 3%, Gal = 4%, Ausbeute = 85%, M = 8704 g/mol; δ_H (400 MHz, MeOD/CDCl₃ 2/1) = 7.71 (CDCl₃), 5.46-4.88 (m, 10H, PG), 4.76 (H₂O), 4.42-3.50 (m, 544H, PG und Gal), 2.57 (br m, 27H, CH₂ Bernsteinsäureester und -amid), 1.78 (m, 8H, CH₂ Gal Linker), 1.39 (m, CH₂ Gal Linker Gal), 1.13 (m, PG Starter), 0.87 (br s, PG Starter).). δ_C (175 MHz, MeOD) = 174.4-173.8 (PG-COOR), 104.9 (C-1 Gal), 81.6-61.9 (CH₂-PG), 76.7 (Gal), 75.0 (Gal), 37.8 (Gal), 31.5 (Gal), 30.8-30.1 (CH₂ COOH). IR: $\tilde{\nu}$ = 2942, 2920, 2848, 2832, 1731, 1652, 1449, 1412, 1112, 1077, 1021 (s), 936 cm⁻¹.

PG_{10.000}(COOH)_{5%}(Gal)_{6%} 53: AJ216, FG: COOH = 5%, Gal = 6%, Ausbeute = quant., M = 9593 g/mol; δ_H (400 MHz, MeOD/CDCl₃ 2/1) = 7.72 (CDCl₃), 5.46-4.85 (m, 12H, PG), 4.76 (H₂O), 4.44-3.49 (m, 582H, PG und Gal), 2.68-2.49 (m, 43H CH₂ Bernsteinsäureester und -amid), 1.79 (m, 12H, CH₂ Gal Linker), 1.38 (m, PG Starter), 0.88 (br s, PG Starter).). δ_C (175 MHz, MeOD/CDCl₃ 1/1) = 173.9-173.0 (PG-COOR), 104.0 (C-1 Gal), 78.2 (CDCl₃), 80.6-50.3 (CH₂-PG), 62.8 (Gal), 61.9 (Gal), 37.3 (Gal), 31.1 (Gal), 30.3-29.3 (CH₂-COOH). IR: $\tilde{\nu}$ = 2936, 2878, 2834, 1732 (s), 1651, 1558, 1455, 1416, 1106, 1072, 1022 (s), 932, 870, 847, 752 (s) cm⁻¹.

PG_{10.000}(COOH)_{21%}(Gal)_{6%} 54: AJ218, FG: COOH = 21%, Gal = 6%, Ausbeute = quant., M = 11281 g/mol, δ_H (400 MHz, MeOD/CDCl₃ 2/1) = 7.71 (CDCl₃), 5.27-4.90 (m, 12H's, PG), 4.82 (H₂O), 4.36-3.53 (m, 576H, PG), 2.69-2.48 (m, 107H, CH₂ Bernsteinsäureester und -amid), 1.78 (m, 13H, CH₂ Gal Linker), 1.37 (m, PG Starter), 0.87 (br s, PG Starter).). δ_C (175 MHz, MeOD/CDCl₃ 1/1) = 175.4- 175.2 (PG-COOH), 174.1-172.8 (PG-COOR), 104.0 (C-1 Gal), 78.2 (CDCl₃), 80.6-43.1 (CH₂ PG), 61.9 (Gal), 32.2 (Gal), 31.1 (Gal), 30.3-29.3 (CH₂ COOH). IR: $\tilde{\nu}$ = 2978, 2940, 2923, 2872, 2831, 1732 (s), 1653, 1455, 1401, 1255, 1218, 1157, 1113, 1053, 1020 (s), 934, 875, 836, 754 (s) cm⁻¹.

5.5.9 PG_{10.000}(TAA)_{1%}(COOH)_{x%} (60-62)

Die Polyglycerolcarbonsäure wurde aus der methanolischen Stammlösung verwendet. Das Methanol wurde bei unter 50°C am Rotationsverdampfer abdestilliert und das Edukt wurde in DMF gelöst. Es wurden HSTU (1.1 Äq.) und DIPEA (3 Äq.) hinzugegeben und ein Stunde bei RT gerührt. *N*-(2-aminoethyl)-5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanamid wurde ebenfalls aus einer methanolischen Stammlösung entnommen, nach destillativer Entfernung des LM in DMF aufgenommen und zu dem gebildeten Aktivester des Polyglycerols gegeben. Die Reaktion wurde über Nacht bei RT gerührt. Das DMF wurde am Rotationsverdampfer abdestilliert (unter 55°C, Polymerisationsgefahr der Liponsäure), das Rohprodukt in MeOH aufgenommen und 48 h in MeOH dialysiert. Es wurden farblose, sirupartige Produkte erhalten. Der Grad der Funktionalisierung wurde durch das Verhältnis der Integrale des PG-Grundgerüsts zum Triplet der CH₂-Gruppe des EDA-Linkers der Liponsäure (2.22 ppm) im ¹H NMR-Spektrum bestimmt.

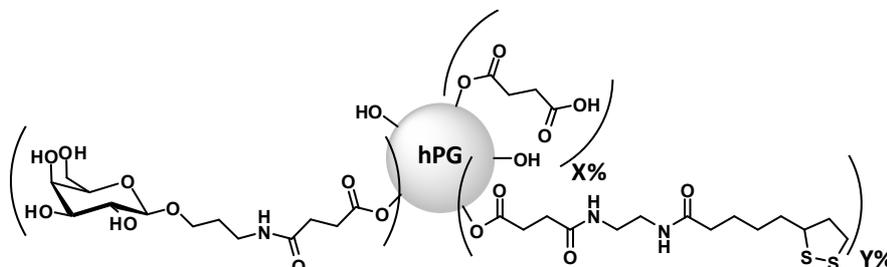
PG_{10.000}(TAA)_{1%}(COOH)_{7%} 60: AJ232, FG: TA = 0.4%, COOH = 7%, Ausbeute = 86%, M = 8109 g/mol, δ_H (400 MHz, MeOD) = 5.33-5.02 (m, 5H, PG), 4.87 (H₂O), 4.29-3.52 (m, 482H, PG), 2.64 (br m, 23H, CH₂ Bernsteinsäure), 2.52 (m, 2H, CH₂ Ester TAA), 2.21 (t, 0.76H sollen 2H sein, TAA), 1.92 (m, TAA), 1.76-1.22 (m, TAA), 1.35 (m, PG Starter), 0.90 (br s, PG Starter). δ_C (175 MHz, MeOD) = 176.3, 176.0 (PG-COOH), 174.6-173.9 (PG-COOR), 81.6-49.9 (CH₂-PG), 57.6 (TAA), 44.7 (TAA), 41.4 (TAA), 40.1 (TAA), 39.4 (TAA), 36.9 (TAA), 35.7 (TAA), 30.6-29.9 (CH₂ COOH), 26.6 (TAA). IR: ν̄ = 2920, 2877, 2835, 1730(s), 1651, 1455, 1410, 1353, 1337, 1254, 1227, 1105, 1075(s), 1025, 933, 858, 845 cm⁻¹.

PG_{10.000}(TAA)_{1%}(COOH)_{10%} 61: AJ233, FG: TA = 0.7%, COOH = 10%, Ausbeute = 65%, M = 8552 g/mol, δ_H (400 MHz, MeOD) = 5.26-5.03 (m, 7H, PG), 4.87 (H₂O), 4.28-3.52 (m, 480H's, PG), 2.64 (br m, 36H, CH₂ Bernsteinsäure), 2.52 (m, 3H, CH₂ Ester TAA), 2.22 (t, 1.32 H sollen 2H sein, TAA), 1.93 (m, TAA), 1.76-1.22 (m, TAA), 1.29 (m, Schliffett), 1.12 (m, PG Starter), 0.91 (br s, PG Starter), 0.88 (m, Schliffett). δ_C (175 MHz, MeOD) = 176.3-174.0 (PG-COOR), 81.6-52.2 (CH₂-PG), 52.5 (TAA), 44.7 (TAA), 40.1 (TAA), 33.1 (TAA), 30.7-29.8 (m, CH₂ COOH), 23.7 (TAA), 20.4 (TAA), 14.4 (TAA). IR: ν̄ = 2925, 2878, 2886, 2360 (s), 2341 (s), 1723, 1652, 1455, 1409, 1353, 1248, 1109, 1072, 1021(s), 932, 839 cm⁻¹.

PG_{10.000}(TAA)_{1%}(COOH)_{26%} 62: AJ234, FG: TA = 0.6%, COOH = 26%, Ausbeute = 75%, M = 10133 g/mol; δ_H (400 MHz, MeOD) = 5.29-5.01 (m, 6H, PG), 4.92 (H₂O), 4.36-3.51 (m, 481H, PG und Gal), 3.07 (TAA), 2.92 (TAA), 2.64-2.52 (br m, 100H, CH₂ Bernsteinsäure), 2.22 (t, 1.45 H sollen 2H sein, TAA), 1.92 (m, TAA), 1.77-1.23 (m, TAA), 1.29 (m, Schliffett), 1.12 (m, PG Starter), 0.90 (br s, PG Starter), 0.88 (m, Schliffett). δ_C

(175 MHz, MeOD) = 176.3-175.8 (PG-COOH), 174.6-173.6 (PG-COOR), 81.4-49.9 (CH₂-PG), 57.6 (TAA), 44.7 (TAA), 41.3 (TAA), 40.2 (TAA), 39.4 (TAA), 37.0 (TAA), 35.7 (TAA), 31.6 (TAA), 30.1-29.8 (m, CH₂ COOH), 26.6 (TAA). IR: $\tilde{\nu}$ = 2941, 2891, 2832, 1726 (s), 1652, 1448, 1411, 1366, 1269, 1216, 1154, 1112, 1079, 1022 (s), 939, 832 cm⁻¹.

5.5.10 PG_{10.000}(TAA)_{1%}(COOH)_{x%}(Gal)_{y%} (63-65)



Die Reaktion wurde unter inerten Bedingungen durchgeführt. Das TAA-Derivat der Polyglycerolcarbonsäure wurde aus der methanolischen Stammlösung verwendet. Das Methanol wurde abdestilliert und das Edukt in DMF aufgenommen. Mit Hilfe von HSTU (1 Äq. pro zu funktionalisierender Gruppe) und DIPEA (3 Äq. pro 1 Äq. HSTU) wurde der NHS-Ester in situ gebildet, nach einer halben Stunde wurde GalactoseAmin (1 Äq. pro zu funktionalisierender Gruppe) hinzugegeben. Die Reaktion wurde über Nacht gerührt. Das DMF wurde am Hochvakuum abdestilliert, das Rohprodukt in MeOH aufgenommen und 48 Stunden in MeOH dialysiert. Die Produkte wurden als farblose Harze erhalten. Der höchste FG (AJ247) wurde beim Trocknen schaumartig fest und war nicht mehr in reinem MeOH löslich. Der Grad der Funktionalisierung wurde durch das Verhältnis der Integrale der CH₂-Gruppen des Bernsteinsäureesters (im Bereich von 2.70-2.50 ppm; die Festlegung der Größe des kompletten Integrals wurde nach denen der Edukte vorgenommen) zum breiten Singulett/Multiplett der CH₂-Gruppe des Gal-Linkers (1.81-1.77 ppm) im ¹H NMR-Spektrum bestimmt.

PG_{10.000}(TAA)_{1%}(COOH)_{3%}(Gal)_{3%} 63: AJ245, FG: TA = 0.4%, COOH = 4% Gal = 3%, Ausbeute = quant., M = 8865 g/mol; δ_H (400 MHz, MeOD) = 5.16-5.04 (m, 2H, PG), 4.84 (H₂O), 4.56-3.51 (m, 524H, PG und Gal), 3.10 (m, TAA), 2.71-2.53 (m, 26H, CH₂ Bernsteinsäure), 2.21 (m, 0.77H sollen 2H sein, TAA), 1.92 (m, TAA), 1.81 (br s, 5H, CH₂ Gal Linker), 1.74-1.26 (m, TAA), 1.29 (Schliff fett), 1.12 (m, PG Starter), 0.90 (br s, PG Starter).). δ_C (175 MHz, MeOD) = 174.3-174.0 (PG-COOR), 104.9 (Gal C-1), 81.6-61.9 (CH₂-PG), 37.8, 31.6-30.0 (CH₂ COOR). IR: $\tilde{\nu}$ = 2986, 2942, 2915, 2831, 2587, 2508, 2361, 2348, 2048, 1739, 1650, 1449, 1416, 1114, 1022 (s) cm⁻¹.

PG_{10.000}(TAA)_{1%}(COOH)_{4%}(Gal)_{6%} 64: AJ246, FG: TA = 0.7%, COOH = 4%, Gal = 6%, Ausbeute = quant., M = 9902 g/mol, δ_H (400 MHz, MeOD/CDCl₃ 1/1) = 7.58 (CDCl₃), 5.30-4.82 (m, 15H, PG), 4.64 (H₂O), 4.25-3.46 (m, 537H, PG), 3.06 (m, TAA), 2.92, 2.67-2.47 (br m, 36H, CH₂ Bernsteinsäure), 2.18 (t, 1.84H sollen 2H sein, TAA), 1.89 (m, TAA), 1.77 (m, 12H, CH₂ Gal Linker), 1.68-1.27 (m, TAA), 1.24 (m, Schliff fett), 1.13 (m, PG Starter), 0.86 (br s, PG Starter), 0.87 (m, Schliff fett). δ_C (175 MHz, MeOD) = 174.0-173.3 (PG-COOR), 110.7,

104.0 (C-1 Gal), 80.7-62.0 (CH₂-PG), 78.2 (CDCl₃), 52.3 (Gal), 37.3, 32.5, 31.1-29.4 (m, CH₂ COOH), 23.2, 14.3. IR: $\tilde{\nu}$ = 2978, 2941, 2923, 2873, 2831, 1732, 1653, 1455, 1401, 1112, 1047, 1020 (s), 943 cm⁻¹.

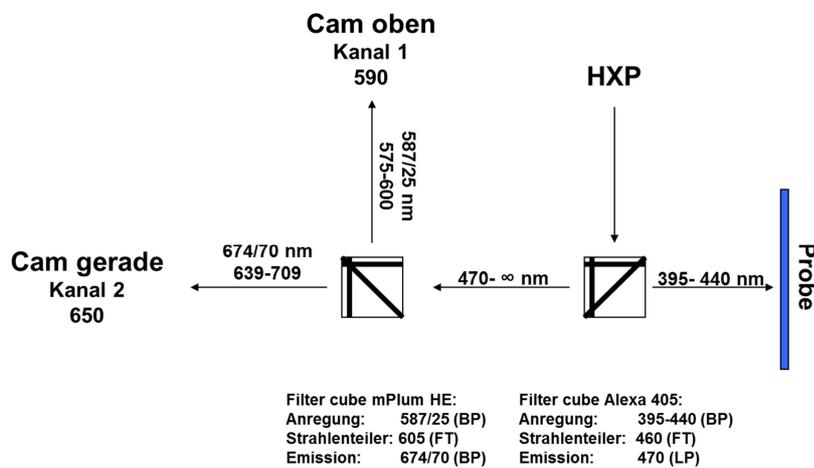
PG_{10.000}(TAA)_{1%}(COOH)_{20%}(Gal)_{6%} 65: AJ247, FG: TA = 0.6%, COOH = 20%, Gal = 6%, Ausbeute = 96%, M = 11455 g/mol, δ_H (400 MHz, MeOD/CDCl₃ 2/1) = 7.61 (CDCl₃), 5.26-4.89 (m, 16H, PG), 4.68 (H₂O), 4.33-3.46 (m, 551H, PG und Gal), 3.07 (TAA), 2.92 (TAA), 2.67-2.47 (br m, 107H, CH₂ Bernsteinsäure), 2.19 (t, 1.93 H sollen 2H sein, TAA), 1.90 (m, TAA), 1.77 (m m, 12H, CH₂ Gal Linker), 1.71-1.23 (m, TAA), 1.29 (m, Schliff fett), 1.12 (m, PG Starter), 0.91 (br s, PG Starter), 0.88 (m, Schliff fett). δ_C (175 MHz, MeOD/CDCl₃) = 173.7-173.0 (PG-COOR), 104.0 (C-1 Gal), 80.7-61.3 (CH₂-PG), 78.2 (CDCl₃), 57.0 (TAA), 52.3 (Gal), 39.7 (TAA), 37.6 (TAA), 37.3 (Gal), 35.2 (TAA), 31.7 (TAA), 31.1-29.3 (m, CH₂ COOH), 28.6 (TAA), 26.0 (TAA), 23.2, 14.3. IR: $\tilde{\nu}$ = 2943, 2831, 2360, 2340, 1737, 1657, 1449, 1413, 12402, 1114, 1022(s), 755 cm⁻¹.

5.6 GLASOBERFLÄCHEN

Es wurde Glasobjektträger der Firmen Schott und PolyAn verwendet. ES – Epoxidobjektträger, CS – Carboxyobjektträger, AS – Aminobjektträger. Die Beschichtung (kovalente Immobilisierung der Moleküle) sowie auch die Inkubation mit den Proteinen erfolgte auf den Objektträgern unter Verwendung selbst hergestellter PDMS-Masken, die jeweils 2x6 Nöpfchen aufwiesen. Die Herstellung der Masken erfolgte aus Sylgard® 184 von Dow Corning. Die zwei Komponenten wurden im Gewichtsverhältnis 1:10 sehr intensiv vermischt und in PS-Petrischalen (\varnothing = 10 cm), in denen sich auf dem Boden ein gereinigter Glasobjektträger befand, bis zu einer Höhe von ca. 0.5 cm aufgefüllt. Die Petrischalen wurden dann in einen Exsikkator gegeben und solange entgast, bis dem Silikon keiner weiteren Gasblasen entwichen (HV bis $3 \cdot 10^{-1}$ mbar). Die entgasten Schalen wurden dann zum Aushärten für zwei Stunden bei 65°C in den Trockenschrank gestellt. Danach wurden sie mithilfe eines Skalpell in Objektträgergröße herausgetrennt und mit einem stumpfen Spatel aus der Petrischale herausgehoben. Die Unterseite der Schablone war die adhäsive Seite und wurde fortan durch Scotch® Magic™ 810 Klebeband vor mechanischer Zerstörung oder Verschmutzung geschützt. Die Ausstanzung der Kammern erfolgte mit Hilfe von Biopsiestanzen (\varnothing = 5 mm) immer von der Unterseite der Schablone aus. Die Beschichtung der Objektträger erfolgte nach selbstständiger Adsorption (ohne Anwendung von Druck) der PDMS-Schablone auf der Glasoberfläche. Danach wurde eine vorher angefertigte Stammlösung-SL mittels Eppendorfpipette in die Kammern eingebracht (30-100 μ l), ohne dabei den Boden mit der Pipette zu berühren. Die Objektträger wurden dann für die Dauer der Beschichtung oder Inkubation in eine Feuchtigkeitskammer gestellt. Die Feuchtigkeitskammer bestand aus einem verschlossenen rechteckigen Behälter mit zwei verschließbaren Eingriffslöchern, Plexiglasdeckel und offenem Boden. In ein hohes 1 l Becherglas mit dest. Wasser wurde ein Ultraschallvernebler (Hobby Hygro Plus) eingebracht, der an einen Controller (Lucky Reptile Humidity Control II Digitales Terrarium Hygrostat) angeschlossen wurde und so die eingestellte Luftfeuchtigkeit regeln konnte. Nach

Ende der Beschichtungs-/Inkubationsdauer wurden die Objektträger, nach rückseitiger Markierung der Spotpositionen mit Hilfe eines Diamantschreibers, gewaschen. Nach der kovalenten Immobilisierung erfolgte sehr intensives Waschen mit 100 ml Milliporewasser (3x) und 100 ml MeOH (3x) im Wechsel mit Hilfe einer Spritzflasche. Die Objektträger wurden dann im Stickstoffstrom getrocknet und im Kühlschrank gelagert. Nach der Proteininkubation erfolgte meist kein intensives Waschen, die Details findet man bei dem jeweiligen Experiment.

Die Vermessung der Objektträger erfolgte am Zeiss Axio Observer Z1. Die zur Messung verwendeten Filter sind durch die Farbauswahl der Graphen (dunkelblau-Cy5; Königsblau-mPlum; gelb-GFP) zu erkennen und in den experimentellen Details erwähnt. Details zum Filteraufbau sind



im Folgenden dargestellt:

Die Belichtung der Cyaninfarbstoffe erfolgte in der Regel für 6400 ms. Die Auswertung eines Spots erfolgte durch sechsfache Bestimmung des Grauwertes (wenn nicht anders angegeben) und Mittelwertbildung. Der Fehlerbalken in den graphischen Darstellungen ergibt sich aus der Standardabweichung der gemessenen Werte. Von den gemittelten Grauwerten wurde die Hintergrundfluoreszenz abgezogen. Diese lag im Normalfall bei Werten zwischen 54 und 68. War die Fluoreszenz des Hintergrundes durch Undichtigkeiten der PDMS-Schablone bei einem Objektträger größer, wurde ein Standardwert von 60 abgezogen. Dies ist in den Bemerkungen vermerkt und im Graphen anhand der Fluoreszenz im zwölften Kontrollnöpfchen (12) zu erkennen.

Tabelle 5: Die Beschichtungsbedingungen für die verschiedenen Objektträger.

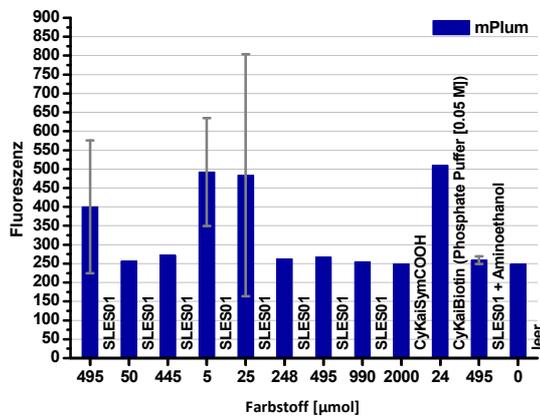
Objektträger	Substanz	Ansatz	Daue r [h]	Lösungs- mittel	Luft- feuchte	Temp ·	Zusätze
ES01	CyKaiSym-Hex-NH ₂ ⁺ TFA-Salz	AJ139	12	H ₂ O	58%	RT	NEt ₃
ES03	CyKaiSym-Hex-NH ₂ ⁺ TFA-Salz	AJ139	1	MeOH	93%	RT	NEt ₃
ES04	CyKaiSym-Hex-NH ₂ ⁺ TFA-Salz	AJ139	1	MeOH	abged.	RT	NEt ₃
ES05	CyKaiSym-Hex-NH ₂ ⁺ TFA-Salz	AJ139	12	MeOH	99%	RT	NEt ₃
ES06	CyKaiSym-Hex-NH ₂ ⁺ TFA-Salz	AJ139	18	DMSO/H ₂ O	30%	45°C	DIPEA
ES07	CyKaiSym-Hex-NH ₂ ⁺ TFA-Salz	AJ139	0.5	DMSO/H ₂ O	27%	45°C	DIPEA/Pyridin
ES08	CyKaiSym-Hex-NH ₂ ⁺ TFA-Salz	AJ139	72	DMSO/H ₂ O	99%	RT	DIPEA/Pyridin
ES09	CyKaiSym-Hex-NH ₂ ⁺ TFA-Salz	AJ139	72h	DMSO/div.	89%	RT	DIPEA
ES10	CyKaiSym-Hex-NH ₂ ⁺ TFA-Salz	AJ139	12	H ₂ O	99%	RT	DIPEA/div.
ES11	CyKaiSym-Hex-NH ₂ ⁺ TFA-Salz	AJ139	12	H ₂ O	99%	RT	DIPEA/div.
ES12	CyKaiSym-Hex-NH ₂ ⁺ TFA-Salz	AJ139	42	versch.Puffer	99%	RT	diverse
ES13	CyKaiSym-Hex-NH ₂ ⁺ TFA-Salz	AJ139	20	versch.Puffer	99%	RT	diverse
ES14	CyKaiSym-Hex-NH ₂ ⁺ TFA-Salz	AJ139	42	versch.Puffer	99%	RT	diverse
ES15	CyKaiSym-Hex-NH ₂ ⁺ TFA-Salz	AJ139	25	versch.Puffer	99%	RT	diverse
ES16	CyKaiSym-Hex-NH ₂ ⁺ TFA-Salz	AJ139	1	versch.Puffer	99%	60°C	diverse
ES17	CyKaiSym-Hex-NH ₂ ⁺ TFA-Salz	AJ139	3	versch.Puffer	99%	RT	diverse
ES18	CyKaiSym-Hex-NH ₂ ⁺ TFA-Salz	AJ139	2	DMSO/H ₂ O	abged.	65°C	diverse
ES19	CyKaiSym-Hex-NH ₂ ⁺ TFA-Salz	AJ139	0.5	DMSO/H ₂ O	abged.	65°C	diverse
ES20	CyKaiSym-L-Linker-NH ₂ .Biotin	AJ147	4	H ₂ O	abged.	80°C	diverse
ES22	CyKaiSym-L-Linker-NH ₂ .Biotin	AJ147	2	H ₂ O	abged.	80°C	diverse

ES23	CyKaiSym-L-Linker-NH ₂ Biotin	AJ147					FRET Exp.
ES24	CyKaiSym-L-Linker-NH ₂ Biotin	AJ147					Kalibrierkurve
ES27	CyKaiSym-L-Linker-NH ₂ Biotin	AJ147	24	CF ₃ CH ₂ OH	99%	RT	TUK
ES28	CyKaiSym-L-Linker-NH ₂ Biotin	AJ147	24	H ₂ O	99%	RT	TUK, div.
ES29	CyKaiSym-L-Linker-NH ₂ Biotin	AJ147	48	CF ₃ CH ₂ OH	99%	RT	TUK, div.
ES30	CyKaiSym-L-Linker-NH ₂ Biotin	AJ147	48	H ₂ O	99%	RT	TUK, div.
ES31	CyKaiSym-L-Linker-NH ₂ Biotin	AJ147	120	CF ₃ CH ₂ OH	99%	RT	TUK, div.
ES32	CyKaiSym-L-Linker-NH ₂ Biotin	AJ147	120	H ₂ O	99%	RT	TUK, div.
ES33	CyKaiSym-L-Linker-NH ₂ Biotin	AJ147	24	MeOH/H ₂ O	99%	RT	TUK, div.
ES34	CyKaiSym-L-Linker-NH ₂ Biotin	AJ147	7	MeOH/H ₂ O	99%	RT	TUK, div.
ES35	CyKaiSym-L-Linker-NH ₂ -Gal	AJ152	24	H ₂ O	99%	RT	i)TUK; ii)Proteine
ES36	CyKaiSym-L-Linker-NH ₂ -Gal	AJ152	24	H ₂ O	99%	RT	i)TUK; ii)Proteine
ES37	CyKaiSym-L-Linker-NH ₂ Biotin	AJ155	24	H ₂ O	99%	RT	i)TUK; ii)Proteine
ES38	CyKaiSym-L-Linker-NH ₂ -Gal	AJ152	24	H ₂ O	99%	RT	i)TUK; ii)Proteine
ES39	Gal-NH ₂	AJ167	24	H ₂ O	99%	RT	i)TUK; ii)Proteine
ES42	leer		1	PBS-Puffer	99%	RT	i)TUK; ii)PNA
ES43	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Biotin) _{y%}		24	H ₂ O	99%	RT	i)TUK; ii)Proteine
ES44	Gal-NH ₂	AJ167	24	H ₂ O	99%	RT	i)TUK; ii)Proteine
ES45	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Biotin) _{y%}	div.	24	H ₂ O	99%	RT	i)TUK; ii)PNA
ES46	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Biotin) _{y%}	div.	24	H ₂ O	99%	RT	i)TUK; ii)PNA
ES47	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Biotin) _{y%}	div.	24	H ₂ O	99%	RT	i)TUK; ii)SAe
ES48	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Biotin) _{y%}	div.	24	H ₂ O	99%	RT	i)TUK; ii)SA
ES49	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{y%}	div.	24	H ₂ O	99%	RT	i)TUK; ii)WGA

ES50	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{γ%}	div.	24	H ₂ O	99%	RT	i)TUK; ii)WGA
ES51	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{γ%}	div	24	H ₂ O	99%	RT	i)TUK; ii)WGA
ES53	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{γ%}	div.	24	H ₂ O	99%	RT	i)TUK; ii)PNA
ES54	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{γ%}	div.	24	H ₂ O	99%	RT	i)TUK; ii)PNA
ES55	PG _{10.000}	FP071	24	H ₂ O	99%	RT	i)TUK; ii)PNA
ES56	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{γ%}	div.	24	H ₂ O	99%	RT	i)TUK; ii)PNA
ES57	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{γ%}	div.	24	H ₂ O	99%	RT	i)TUK; ii)WGA
ES58	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{γ%}	div.	24	H ₂ O	99%	RT	i)TUK; ii)PNA
ES59	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{γ%}	div.	24	H ₂ O	99%	RT	i)TUK; ii)WGA
ES60	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{γ%}	div.	24	H ₂ O	99%	RT	i)TUK; ii)PNA
ES61	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{γ%}	div.	24	H ₂ O	99%	RT	i)TUK; ii)WGA
ES62	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Biotin) _{γ%}	div.	24	H ₂ O	99%	RT	i)TUK; ii)SA
ES63	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Biotin) _{γ%}	div.	24	H ₂ O	99%	RT	i)TUK; ii)SAe
ES64	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Biotin) _{γ%}	div.	24	H ₂ O	99%	RT	i)TUK; ii)PNA
ES65	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Biotin) _{γ%}	div.	24	H ₂ O	99%	RT	i)TUK; ii)PNA
ES66	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{γ%}	div.	24	H ₂ O	99%	RT	i)TUK; ii)PNA
ES67	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{γ%}	div.	24	H ₂ O	99%	RT	i)TUK; ii)PNA
ES68	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{γ%}	div.	24	H ₂ O	99%	RT	i)TUK; ii)PNA
ES69	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{γ%}	div.	24	H ₂ O	99%	RT	i)TUK; ii)WGA
ES70	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{γ%}	div.	24	H ₂ O	99%	RT	i)TUK; ii)WGA
ES71	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{γ%}	div.	24	H ₂ O	99%	RT	i)TUK; ii)PNA
ES72	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{γ%}	div.	24	H ₂ O	99%	RT	i)TUK; ii)PNA
ES73	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{γ%}	div.	24	H ₂ O	99%	RT	i)TUK; ii)PNA

ES74	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{γ%}	div.	24	H ₂ O	99%	RT	i)TUK; ii)WGA
ES75	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{γ%}	div.	24	H ₂ O	99%	RT	i)TUK; ii)WGA
AS01	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{γ%}	div.	24	H ₂ O	99%	RT	i)HSTU; ii)WGA
AS02	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{γ%}	div.	24	H ₂ O	99%	RT	i)HSTU; ii)WGA
AS03	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{γ%}	div.	24	H ₂ O	99%	RT	i)HSTU; ii)WGA
AS04	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{γ%}	div.	24	H ₂ O	99%	RT	i)HSTU; ii)PNA
AS05	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{γ%}	div.	24	H ₂ O	99%	RT	i)HSTU; ii)PNA
AS06	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{γ%}	div.	24	H ₂ O	99%	RT	i)HSTU; ii)PNA
CS01	CyKaiSym-L-Linker-NH ₂ .Biotin	AJ155	0.1	H ₂ O	99%	RT	i)NHS/EDC; ii)Avidin
CS02	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Biotin) _{γ%}	div.	24	H ₂ O	99%	RT	i)TUK; ii)Proteine

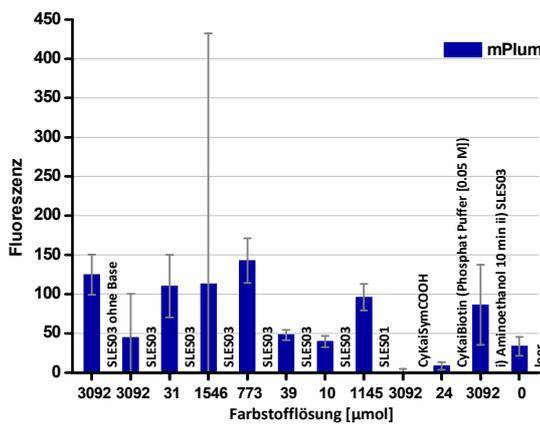
5.6.1 ES01



hintergrunds.

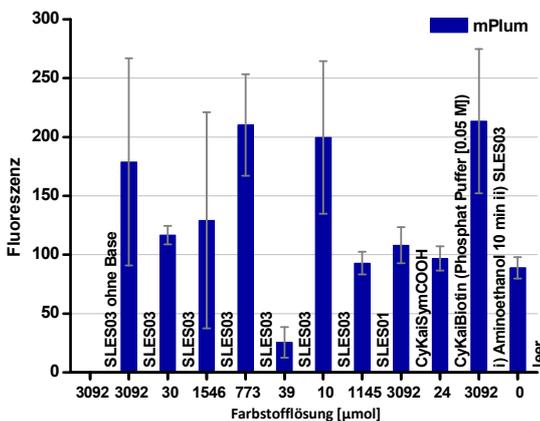
Die Beschichtung des Epoxidobjektträgers erfolgte zwölf Stunden mit CyKaiSym-Hex-NH₂, bei 58% Luftfeuchte und RT. Stammlösung SLES01: Substanz (10.3 mg/10 g Wasser) als TFA-Salz und ein Äquivalent NEt₃. 30 µl Lösung pro Kammer. Messung: mPlum-Filter. Keine 6fach-Bestimmung. Starke Undichtigkeit, Abzug des Standard-

5.6.2 ES03



Die Stammlösung SLES03: CyKaiSym-Hex-NH₂ (5.4 mg/2 ml MeOH) und 8 µl Triethylamin (≈ 3 Äquivalente) in MeOH. Beschichtung erfolgte 60 Minuten bei RT (30 µl pro Kammer) und 93% Luftfeuchtigkeit. Viele Kammern waren leicht eingetrocknet. Messung: mPlum-Filter. Keine 6fach-Bestimmung.

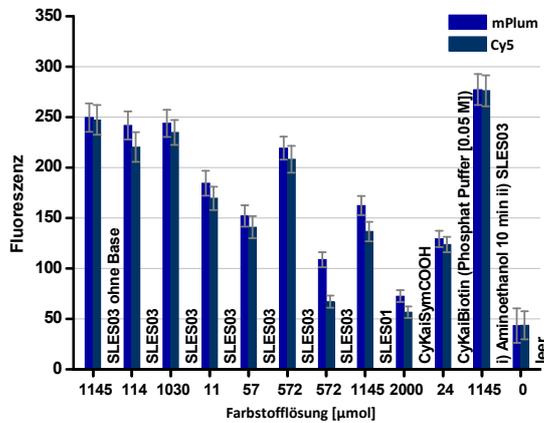
5.6.3 ES04



Die Stammlösung SLES03: CyKaiSym-Hex-NH₂ (5.4 mg/2 ml MeOH) und 8 µl Triethylamin (≈ 3 Äq.) in MeOH. Beschichtung erfolgte 60 Minuten bei RT (35 µl pro Kammer) unter Nutzung eines Objektträgers zur Abdeckung. Messung: mPlum-Filter. Keine 6fach-Bestimmung. Hintergrundwerte waren

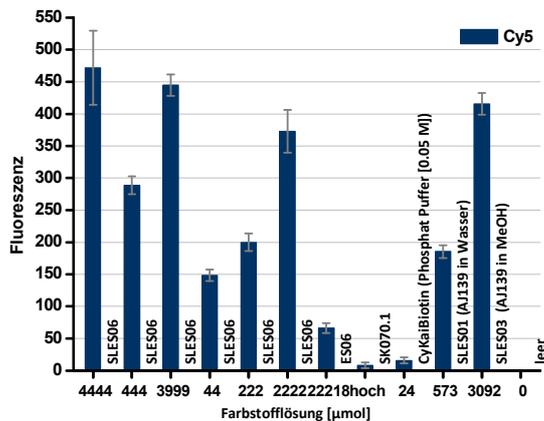
alle zu hoch, es wurde der Standardwert abgezogen.

5.6.4 ES05



Die Stammlösung SLES03: CyKaiSym-Hex-NH₂ (5.4 mg/2 ml MeOH) und 8 µl Triethylamin (≈ 3 Äq.) in MeOH. Beschichtung erfolgte 12 Stunden bei RT (35 µl pro Kammer) und 99% Luftfeuchte. Messung: Cy5- und mPlum-Filter. Keine 6fach-Bestimmung. Hohe Hintergrundfluoreszenz.

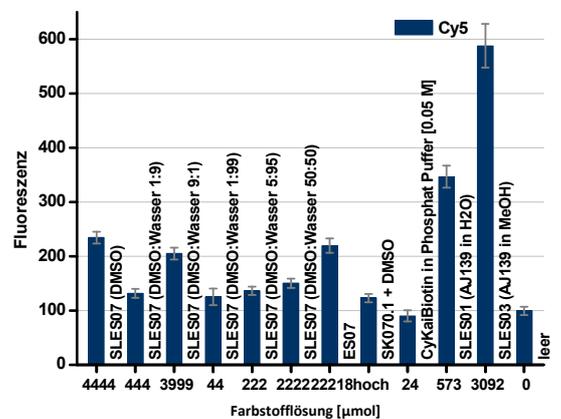
5.6.5 ES06



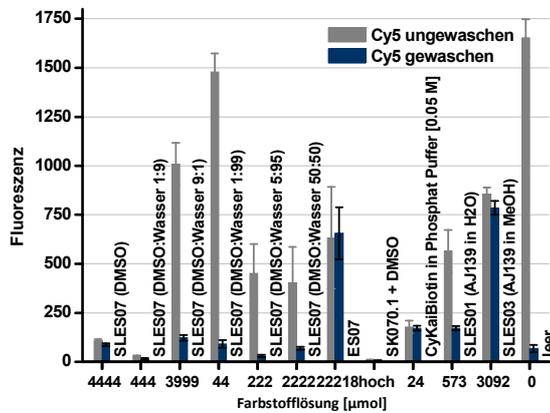
Die Stammlösung SLES06: CyKaiSym-Hex-NH₂ (9.7 mg/0.5 ml DMSO) und 5 µl DIPEA (≈ 3 Äq.) in 2 ml Wasser (DMSO:Wasser, 1:4). Beschichtung erfolgte 30 Minuten bei 45°C (45 µl pro Kammer) und 30% Luftfeuchte. Messung: Cy5-Filter.

5.6.6 ES07

Die Stammlösung in DMSO SLES07: CyKaiSym-Hex-NH₂ (1.9 mg/ 0.5 ml DMSO), 5 µl Pyridin und 11 µl DIPEA (≈ 30 Äquivalente). Beschichtung erfolgte 0.5 h bei 45°C (45 µl/Kammer) und 27% Luftfeuchte. Einige Nöpfe trockneten oder liefen während der Beschichtung aus. Messung: Cy5-Filter. Keine 6fach-Bestimmung. Hohe Hintergrundfluoreszenz.

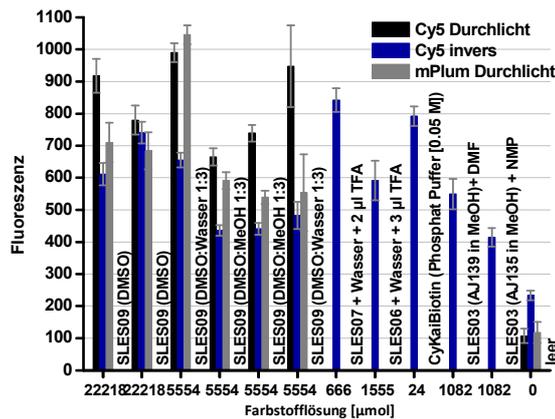


5.6.7 ES08



Die Beschichtung erfolgte über drei Tage mit SLES07. Bei RT, 99% Luftfeuchte und 45 μl pro Kammer. Messung: Cy5-Filter. Bei der Messung von ES08 ungewaschen wurden die Näpfchen nur mit der Pipette entleert und 2x mit einer Pipette und 60 μl Milliporewasser gespült. Bei ES08 ungewaschen keine 6fach-Bestimmung.

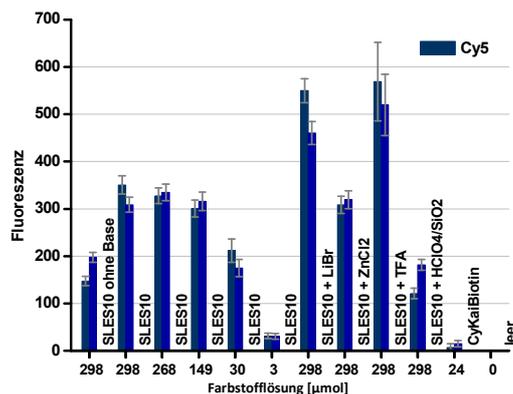
5.6.8 ES09



Die Beschichtung erfolgte mit SLES09: 9.7 mg CyKaiSym-Hex-NH₂ (9.7 mg/500 μl DMSO) + 55 μl DIPEA, für 10 Minuten bei 80°C, danach bei RT für drei Tage bei 89% Luftfeuchte. Undichte PDMS-Schablone. 3, 8, 9 und 10 waren leicht angetrocknet. Messung: Cy5- und mPlum-Filter, sowie mit zwei verschiedenen Objektiveneinstellungen (1-6 und 12):

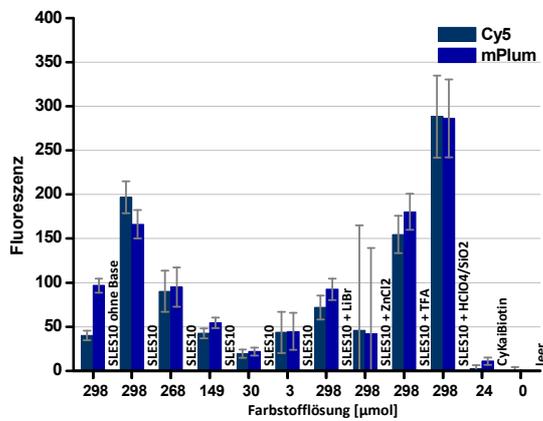
einmal durch den Objektträger (Durchlicht) und invers. Hohe Hintergrundfluoreszenz.

5.6.9 ES10



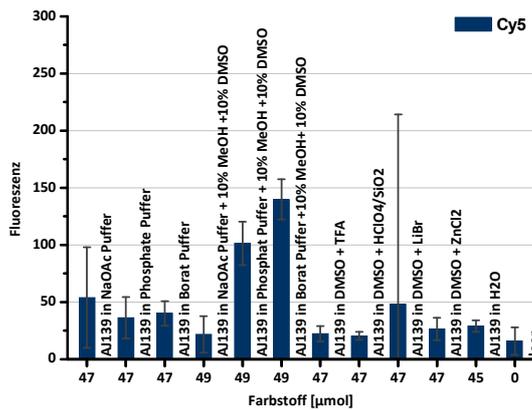
Die Beschichtung erfolgte mit SLES10: CyKaiSym-Hex-NH₂ (2.6 mg/10 ml H₂O) + 55 μl DIPEA, für 12 h bei RT und 99% Luftfeuchtigkeit. Messung: Cy5- und mPlum-Filter.

5.6.10 ES11



Die Beschichtung erfolgte mit SLES10: CyKaiSym-Hex-NH₂ (2.6 mg/10 ml H₂O) + 55 µl DIPEA, für 12 h bei RT und 99% Luftfeuchtigkeit. Messung: Cy5- und mPlum-Filter.

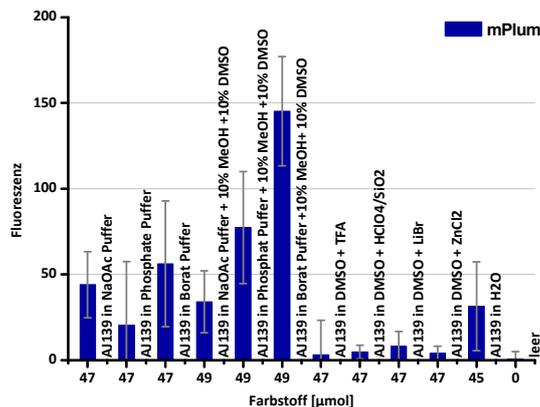
5.6.11 ES12



Die Beschichtung erfolgte mit drei verschiedenen Puffern, bei drei unterschiedlichen pH-Werten. Es wurde jeweils 1 mg CyKaiSym-Hex-NH₂ in 10 ml Puffer gelöst (1-3). NaOAc-Puffer pH = 4.6, Phosphat-Puffer pH = 7.0, Borat-Puffer pH = 8.5. Desweiteren wurde ein 1:1:10 Gemisch DMSO:MeOH:Puffer getestet

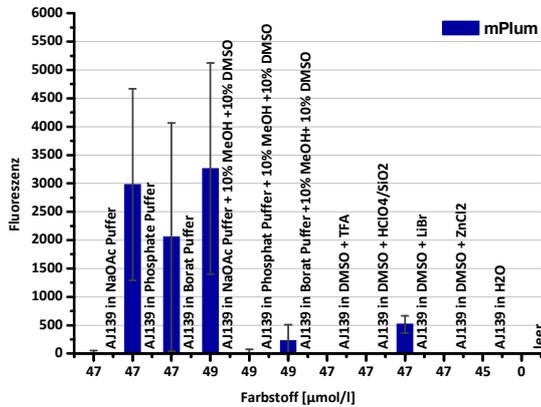
(4-6) und Farbstoff in reinem DMSO unter Zusatz von Lewissäure. Es wurde mit 92 µl pro Kammer für 42 h bei RT und bei 99% Luftfeuchtigkeit beschichtet. Messung: Cy5-Filter.

5.6.12 ES13



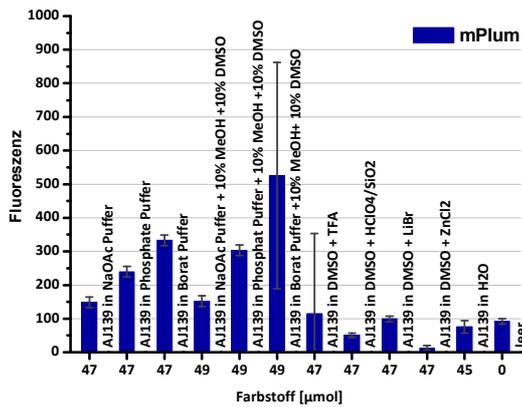
Die Beschichtung erfolgte entsprechend ES12 für 20 h bei RT und 99% Luftfeuchte. Messung: mPlum-Filter.

5.6.13 ES14



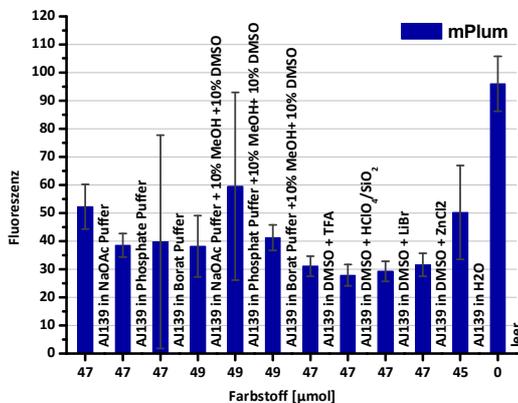
Die Beschichtung erfolgte entsprechend ES12 für 42 h bei RT und 99% Luftfeuchte. Messung: mPlum-Filter.

5.6.14 ES15



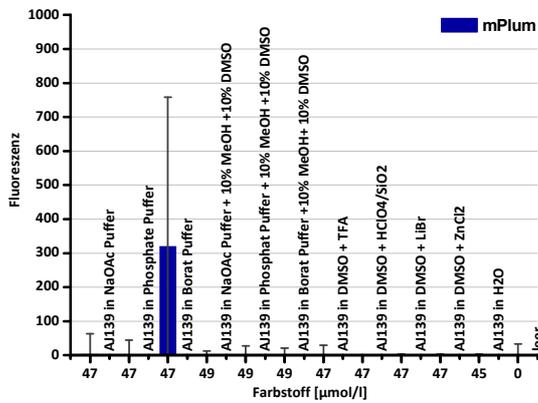
Die Beschichtung erfolgte entsprechend ES12 für 25 h bei RT und 99% Luftfeuchte. Messung: mPlum-Filter.

5.6.15 ES16



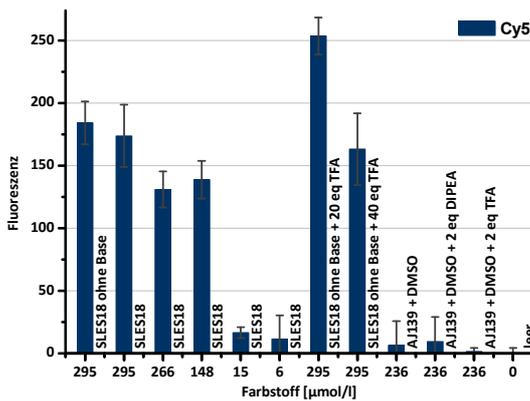
Die Beschichtung erfolgte entsprechend ES12 für 1 h bei 60°C und 99% Luftfeuchte. Messung: mPlum-Filter. Die PDMS-Schablone war völlig undicht.

5.6.16 ES17



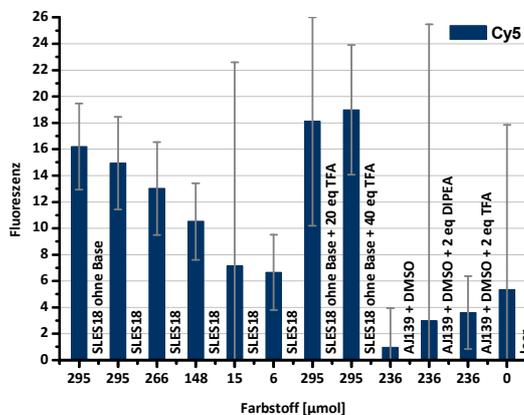
Die Beschichtung erfolgte entsprechend ES12 für 3 h bei RT und 99% Luftfeuchte. Messung: mPlum Filter.

5.6.17 ES18



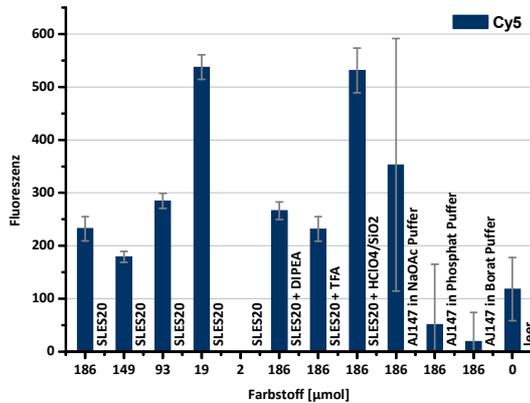
Die Beschichtung erfolgte mit SLES18: CyKaiSym-Hex-NH₂ (9.7 mg/0.5 ml DMSO) und 3 µl DIPEA (≈ 2 Äq.) in 2 ml Wasser (DMSO:Wasser, 1:4). 2 h bei 65°C abgedeckt mit einem Glasobjektträger. Messung: Cy5-Filter.

5.6.18 ES19



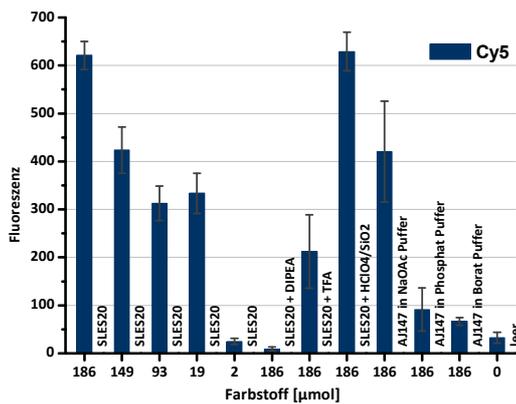
Die Beschichtung erfolgte mit SLES18 für eine halbe Stunde bei 65°C abgedeckt mit einem Glasobjektträger. Messung: Cy5-Filter.

5.6.19 ES20



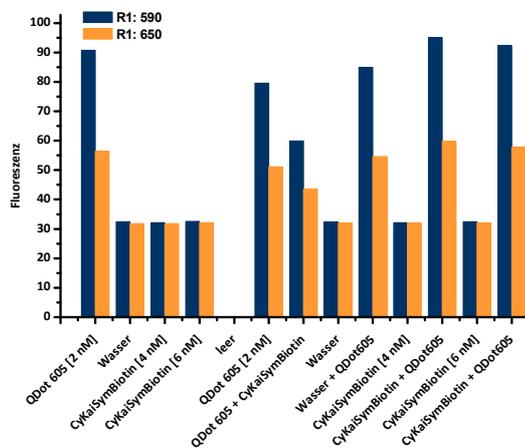
Die Beschichtung erfolgte mit SLES20: CyKaiSym-L-Linker-NH₂-Biotin in Wasser [186 µM]. Für 4 h bei 80°C mit Glasabdeckung im Trockenschrank. Messung: Cy5-Filter.

5.6.20 ES22



Die Beschichtung erfolgte mit SLES20: CyKaiSym-L-Linker-NH₂-Biotin in Wasser [186 µM]. Für 2 h bei 80°C mit Glasabdeckung im Trockenschrank. 7-10 sind während der Beschichtung ausgelaufen. Messung: Cy5-Filter.

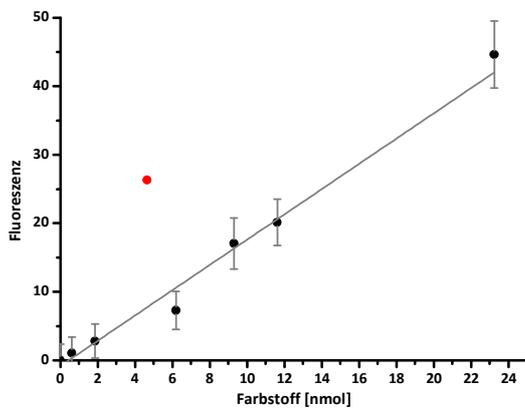
5.6.21 ES23



Durchführung des FRET-Experiments in Lösung auf einem unfunktionalisierten Glasobjektträger mit PDMS-Schablone wurden mehrere Lösungen vermessen (jeweils 40 µl/Kammer). 1: 1 µl QDot 605 und 999 µl Wasser [2 µmol]. 2: pures Wasser. 3: CyKaiSym-L-Linker-NH₂-Biotin und 2999 µl Wasser [6.2·10⁻⁹ mol/l]. 4: CyKaiSym-L-Linker-NH₂-

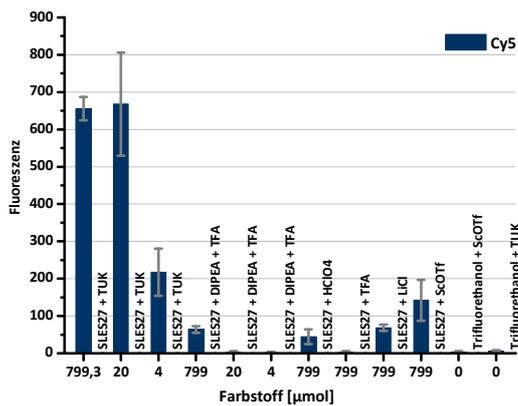
Biotin und 4999 µl [3.7·10⁻⁹ mol/l]. Belichtung: 800 ms Alexa405, 6400 ms Cy5.

5.6.22 ES24



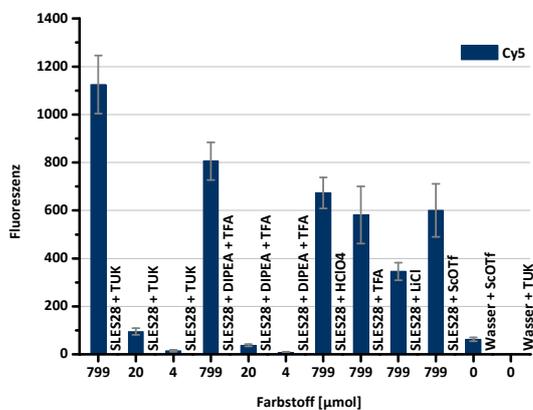
Messung zur Aufnahme einer Kalibrierkurve. Auf einem unfunktionalisierten Glasobjektträger mit PDMS-Schablone wurden 11 verschiedene Konzentrationen (186-0.6 nM) CyKaiSym-L-Linker-NH₂-Biotin vermessen. Messung: Cy5-Filter.

5.6.23 ES27



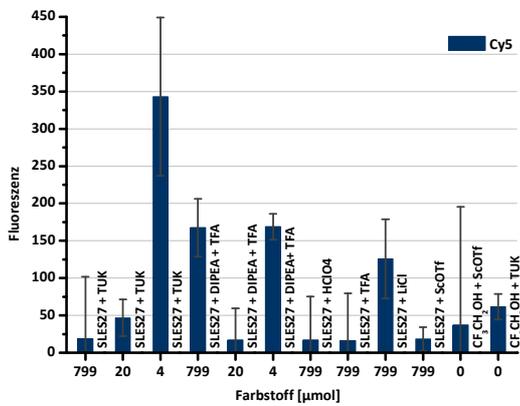
Die Beschichtung erfolgte mit SLES27: 1.3 mg CyKaiSym-L-Linker-NH₂-Biotin in 1 ml CF₃CH₂OH [799 µmol]. 24 h, 99% Luftfeuchte bei RT und Zusatz von TUK—Thioureakatalysator. Messung: Cy5-Filter invers.

5.6.24 ES28



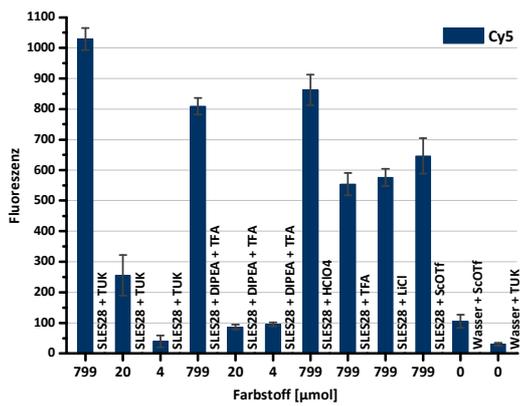
Die Beschichtung erfolgte mit SLES28: 1.3 mg CyKaiSym-L-Linker-NH₂-Biotin in 1 ml H₂O [799 µmol]. 24 h, 99% Luftfeuchte bei RT und Zusatz von TUK. Messung: Cy5-Filter invers.

5.6.25 ES29



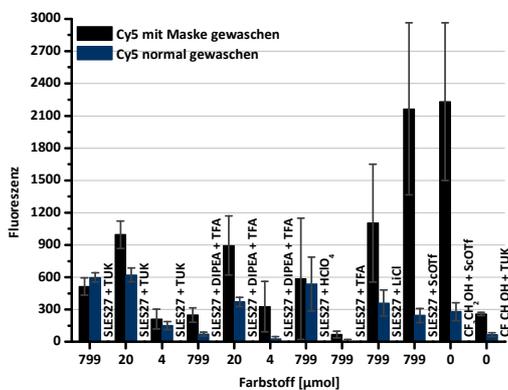
Die Beschichtung erfolgte mit SLES27: 1.3 mg CyKaiSym-L-Linker-NH₂-Biotin in 1 ml CF₃CH₂OH [799 µmol]. 2 Tage, 99% Luftfeuchte bei RT und Zusatz von TUK. Messung: Cy5-Filter invers. Die Schablone war undicht.

5.6.26 ES30



Die Beschichtung erfolgte mit SLES28: 1.3 mg CyKaiSym-L-Linker-NH₂-Biotin in 1 ml H₂O [799 µmol]. 2 Tage, 99% Luftfeuchte bei RT und Zusatz von TUK. Messung: Cy5-Filter invers.

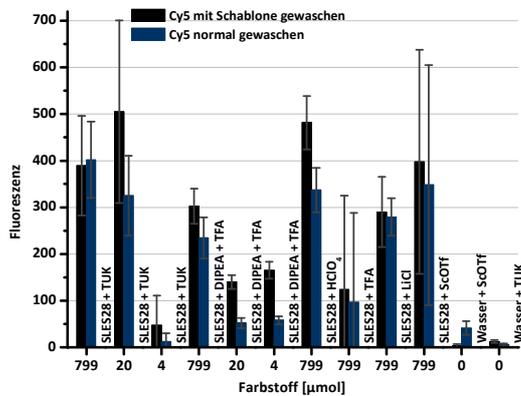
5.6.27 ES31



Die Beschichtung erfolgte mit SLES27: 1.3 mg CyKaiSym-L-Linker-NH₂-Biotin in 1 ml CF₃CH₂OH [799 µmol]. 5 Tage, 99% Luftfeuchte bei RT und Zusatz von TUK. Messung: Cy5-Filter invers. Vergleich zwischen Waschen mit der Schablone und normalem Waschen 3x mit 100 ml Wasser und 3x mit 100 ml MeOH aus der Spritzflasche. Nach dem Waschen mit

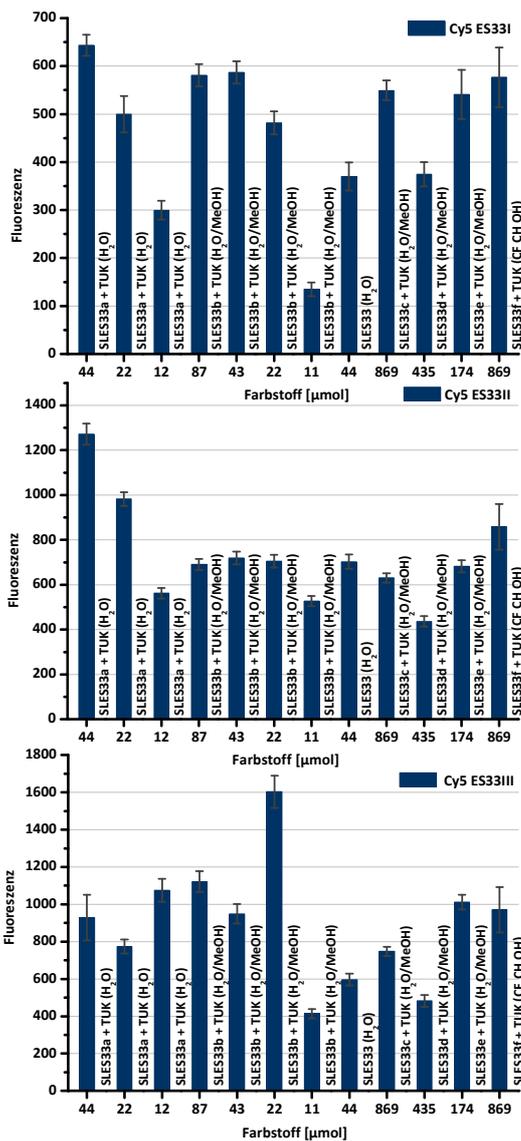
Schablone waren auf 3, 4, 10 und 11 mit bloßem Auge noch Rückstände zu erkennen.

5.6.28 ES32



Die Beschichtung erfolgte mit SLES28: 1.3 mg CyKaiSym-L-Linker-NH₂-Biotin in 1 ml H₂O [799 µmol]. 5 Tage, 99% Luftfeuchte bei RT und Zusatz von TUK. Vergleich zwischen Waschen mit der Schablone und normalem Waschen 3x mit 100 ml Wasser und 3x mit 100 ml MeOH. Messung: Cy5-Filter invers.

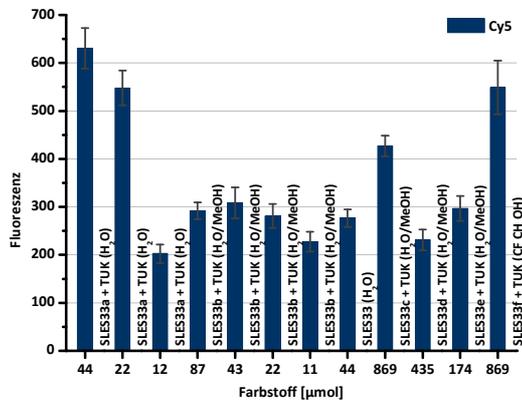
5.6.29 ES33



Die Beschichtung erfolgte mit fünf verschiedenen Stammlösungen auf drei verschiedenen Objektträgern. SLES33a: 1.13 mg CyKaiSym-L-Linker-NH₂-Biotin in 20 ml H₂O [44 µmol]. SLES33b: 1.13 mg CyKaiSym-L-Linker-NH₂-Biotin in 1 ml MeOH aufgefüllt auf 10 ml H₂O [87 µmol]. SLES33c: 1.13 mg CyKaiSym-L-Linker-NH₂-Biotin in 500 µl MeOH gelöst, aufgefüllt auf 1 ml H₂O [869 µmol]. SLES33d: 1.13 mg CyKaiSym-L-Linker-NH₂-Biotin in 550 µl MeOH gelöst, aufgefüllt auf 2 ml H₂O [435 µmol]. SLES33e: 1.13 mg CyKaiSym-L-Linker-NH₂-Biotin in 500 µl MeOH gelöst, aufgefüllt auf 5 ml H₂O [174 µmol]. SLES33f: 1.13 mg CyKaiSym-L-Linker-NH₂-Biotin in 1 ml CF₃CH₂OH [869 µmol]. 24 h, 99%

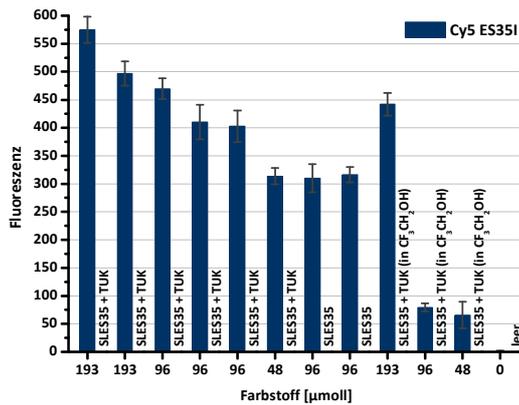
Luftfeuchte bei RT und Zusatz von TUK. Messung: Cy5-Filter invers.

5.6.30 ES34

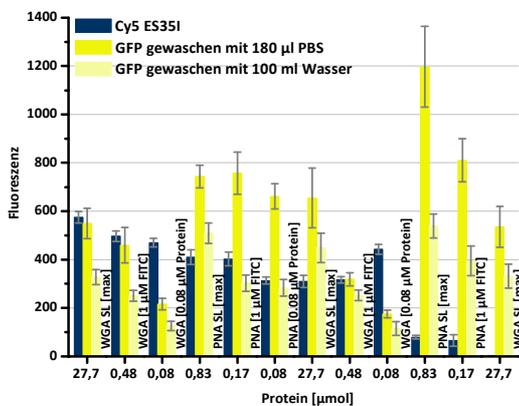


Die Beschichtung erfolgte wie ES33, für 7 Stunden, 99% Luftfeuchtigkeit und RT. Messung: Cy5-Filter.

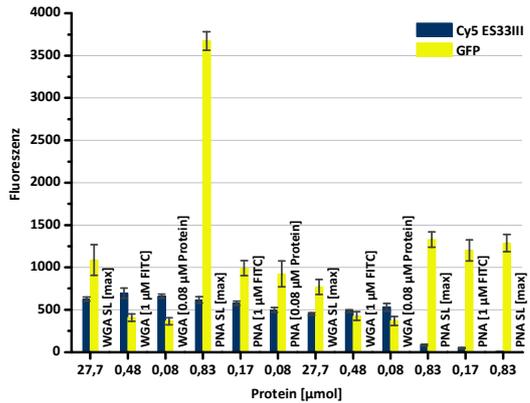
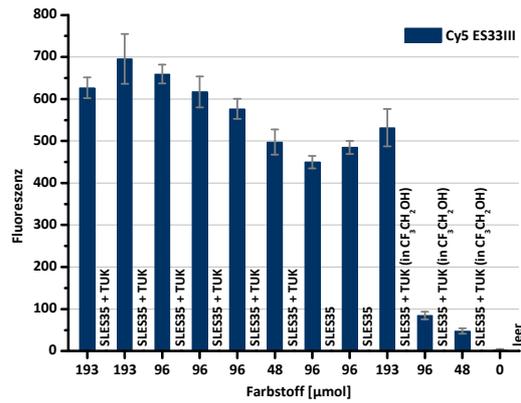
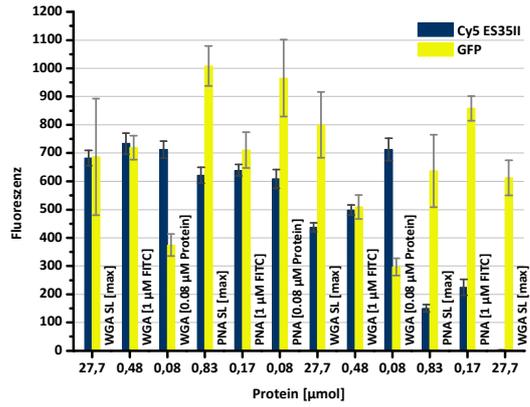
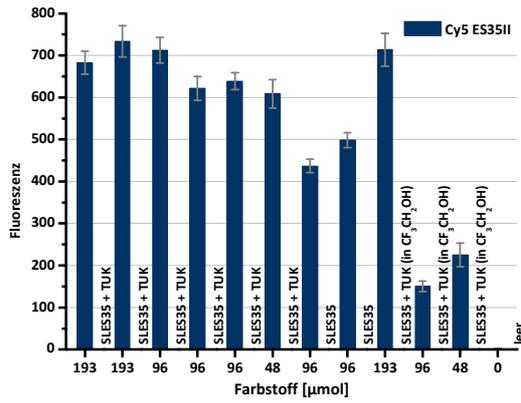
5.6.31 ES35



Die Beschichtung von drei verschiedenen Epoxidobjektträgern erfolgte mit der Stammlösung SLES35: 1.18 mg CyKaiSym-L-Linker-NH₂-Gal in 5 ml H₂O [193 µmol] für 24 h, 99% Luftfeuchtigkeit und RT. Messung: Cy5-Filter. Danach folgte die Inkubation der Galactoseoberflächen

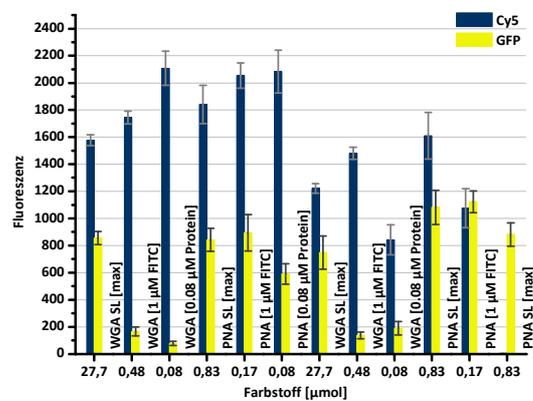
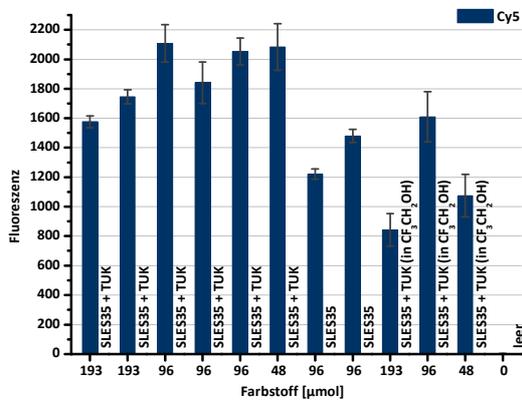


mit PNA-FITC- und WGA-FITC-Lösung für 1 h. Nach der Inkubation wurden die Kammern erst mit PBS-Puffer gespült und wieder vermessen und dann mit Wasser gespült und der Objektträger wurde erneut vermessen. Messung: GFP-Filter.

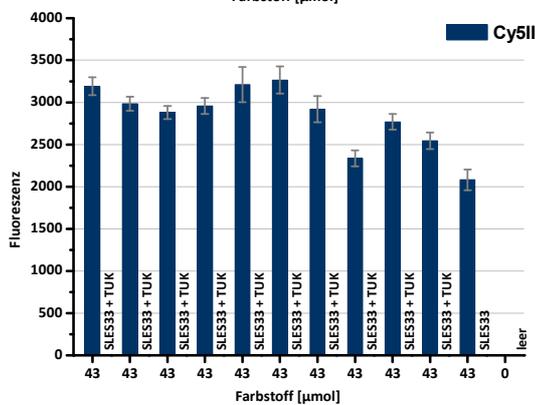
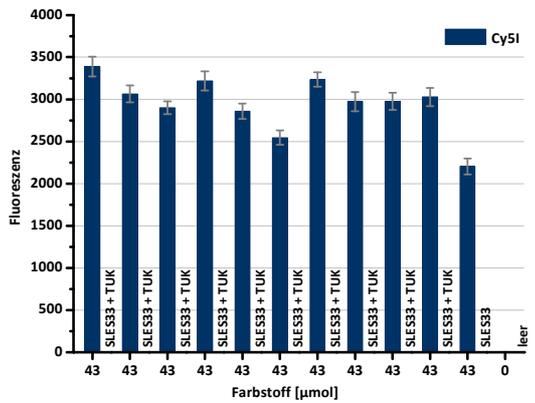


5.6.32 ES36

Die Beschichtung des 3D-Epoxidobjektträgers erfolgte wie bei ES35 mit SLES35: 1.18 mg CyKaiSym-L-Linker-NH₂-Gal in 5 ml Wasser für 24 Stunden, 99% Luftfeuchtigkeit und RT. Messung: Cy5-Filter.



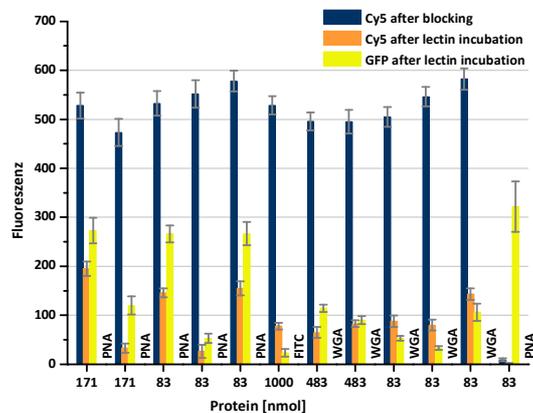
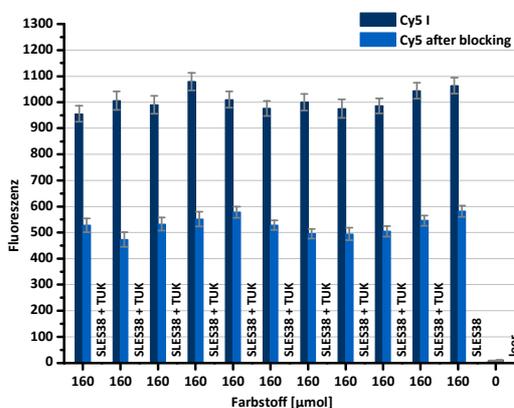
5.6.33 ES37

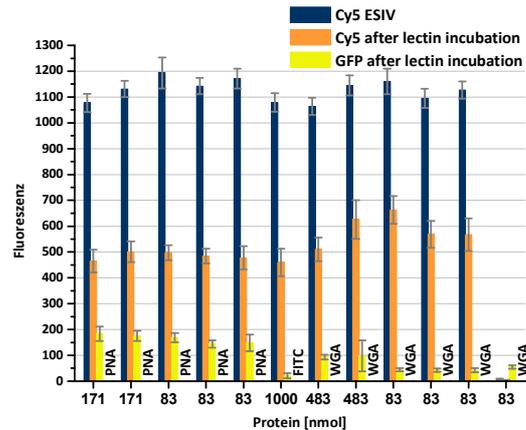
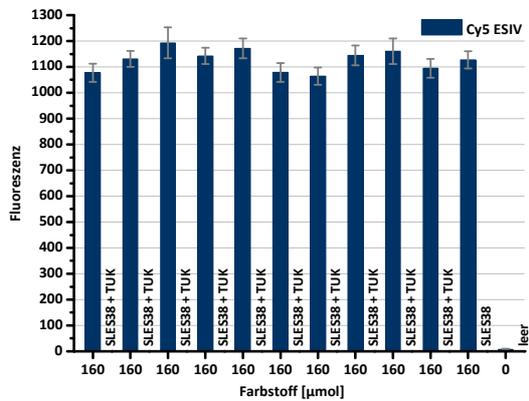
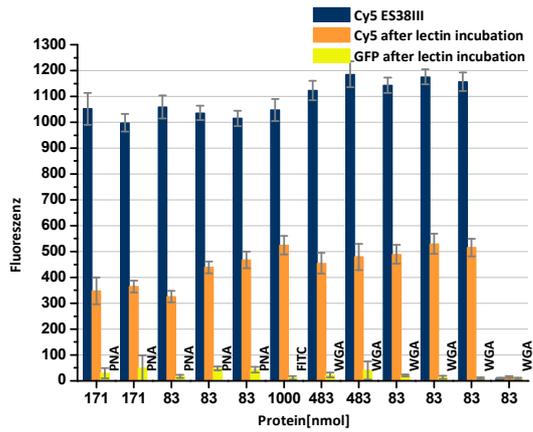
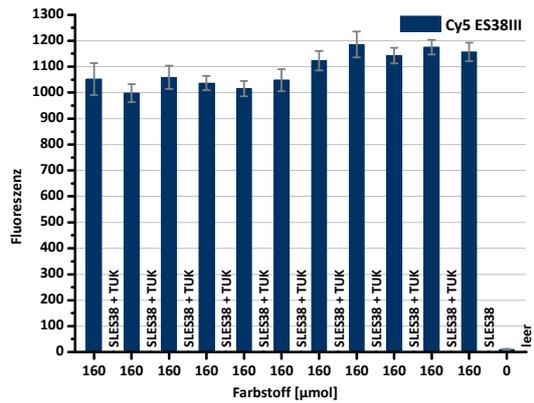
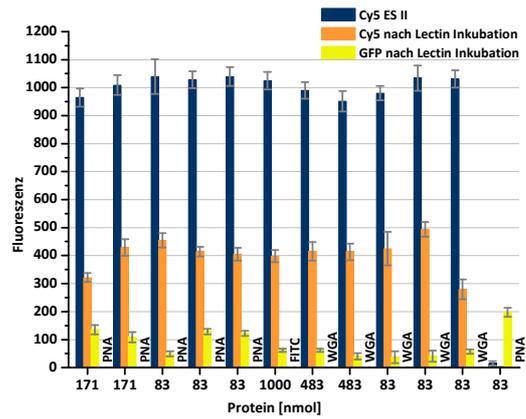
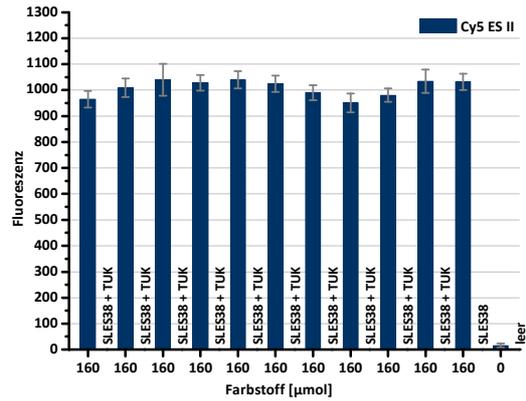


Die Beschichtung erfolgte mit SLES33: 1.13 mg CyKaiSym-L-Linker-NH₂-Biotin in 20 ml H₂O [44 µmol] auf zwei unterschiedlichen 3D-Objektträgern. Messung: Cy5-Filter.

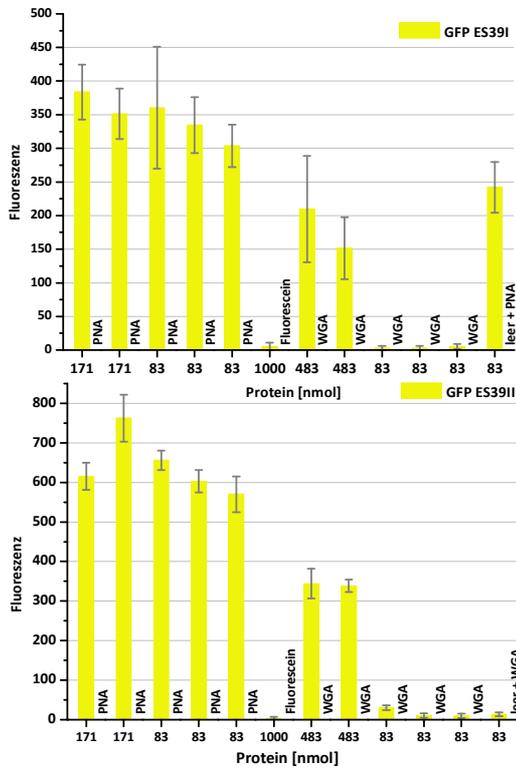
5.6.34 ES38

Die Beschichtung von vier verschiedenen Epoxidobjektträgern erfolgte mit SLES38: 1.18 mg CyKaiSym-L-Linker-NH₂-Gal in 5 ml Wasser [193 µmol] für 24 Stunden, 99% Luftfeuchtigkeit und RT. Messung: Cy5-Filter. ES38I wurde vor der Inkubation mit Aminoethanol geblockt. Inkubation mit den Lectinen der II. Charge. Messung: Cy5- und GFP-Filter.

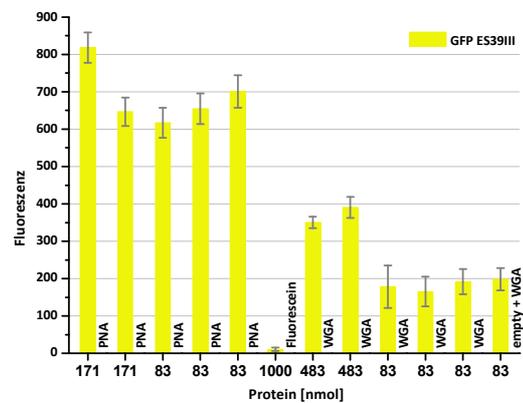




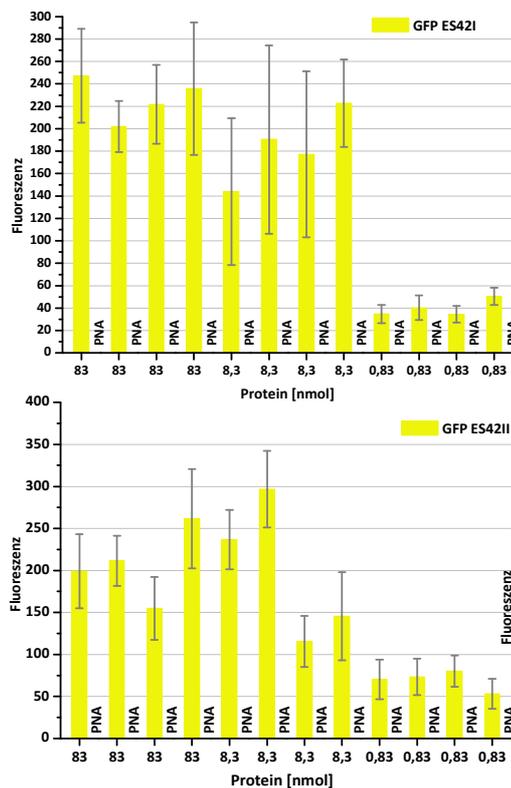
5.6.35 ES39



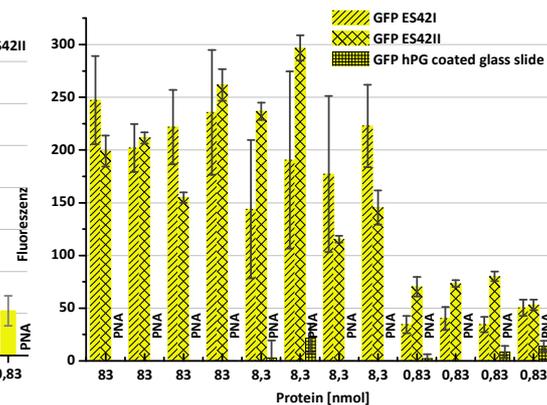
Die Beschichtung erfolgte mit Gal-NH₂ für 24 h, bei 99% Luftfeuchtigkeit und RT. Die Inkubation mit PNA-FITC und WGA-FITC erfolgte danach für eine Stunde. Messung: GFP-Filter.



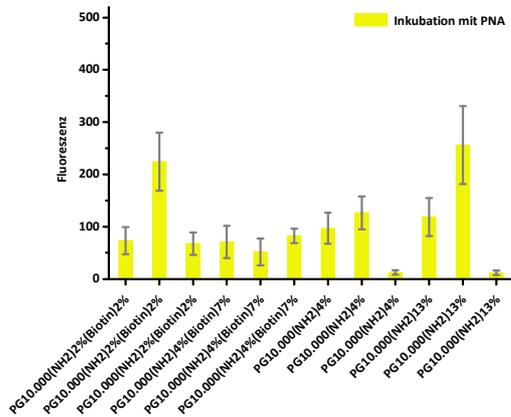
5.6.36 ES42



Es wurden unbeschichtete Objektträger mit den üblichen Proteinkonzentrationen inkubiert. ES42I-Epoxidobjektträger; ES42II-unfunktionalisierter Objektträger und ein hPG-beschichteter Objektträger. Messung: GFP-Filter.

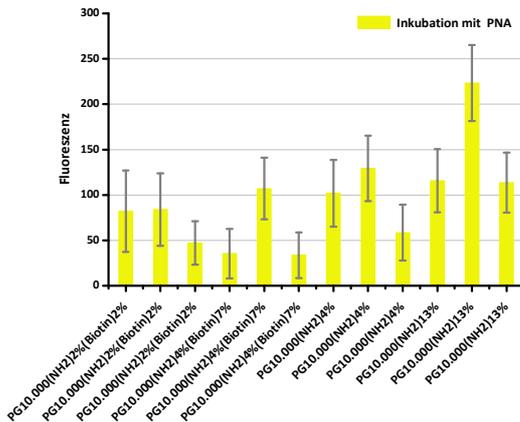


5.6.39 ES45



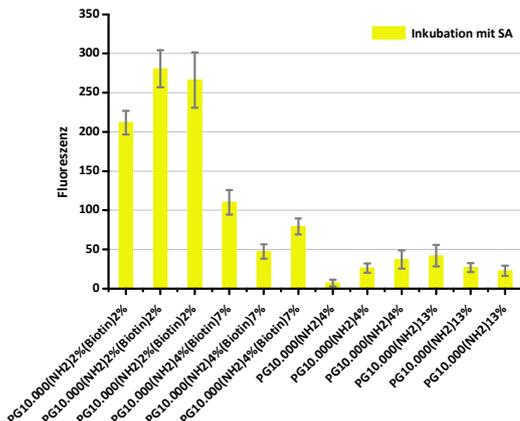
Die Beschichtung des Epoxidobjektträgers erfolgte über 18 h, 99% Luftfeuchtigkeit und RT mit PG_{10.000}(NH₂)₂(Biotin)₂%, PG_{10.000}(NH₂)₄(Biotin)₇%, PG_{10.000}(NH₂)₄% und PG_{10.000}(NH₂)₁₃%. Alle Kammern wurden mit 30 µl PG Derivat [100 nmol] und 30 µl TUK Katalysator Suspension gefüllt. Die Objektträger wurden intensiv gewaschen und nach dem Trocknen für 1.5 Stunden mit PNA [100 nmol] inkubiert. Messung: GFP-Filter.

5.6.40 ES46



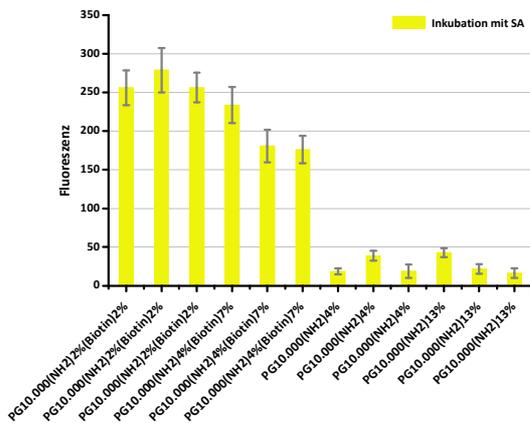
Die Beschichtung und Inkubation des Epoxidobjektträgers erfolgte analog zu ES45. Die Kammern 7, 8 und 12 sahen unbeschichtet aus. Messung: GFP-Filter.

5.6.41 ES47



Die Beschichtung des Epoxidobjektträgers erfolgte analog zu ES45. Die Inkubation des Objektträgers erfolgte mit SA-FITC [100 nmol]. Messung: GFP-Filter.

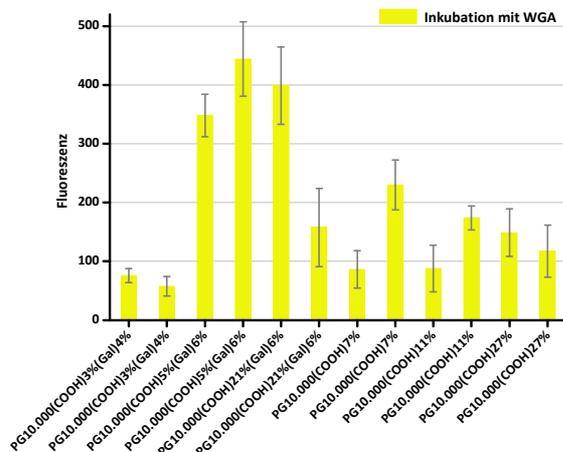
5.6.42 ES48



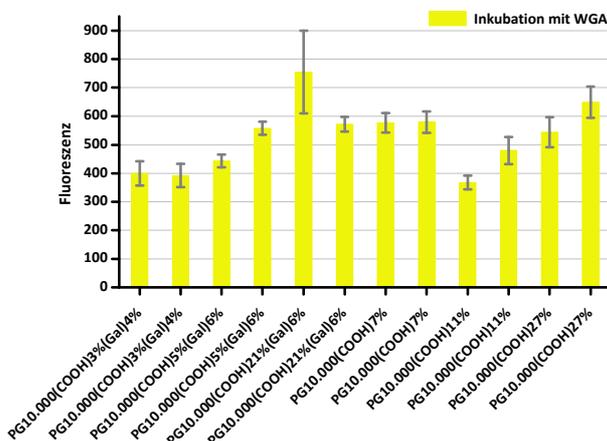
Die Beschichtung des Epoxidobjektträgers erfolgte analog zu ES45. Die Inkubation des Objektträgers erfolgte mit SA-FITC [100 nmol]. Messung: GFP-Filter.

5.6.43 ES49

Die Beschichtung des Epoxidobjektträgers erfolgte über 24 h, bei 99% Luftfeuchtigkeit und RT mit verschiedenen hPG-Derivaten: PG_{10.000}(COOH)_{3%}(Gal)_{4%}, PG_{10.000}(COOH)_{5%}(Gal)_{6%}, PG_{10.000}(COOH)_{21%}(Gal)_{6%}, PG_{10.000}(COOH)_{7%}, PG_{10.000}(COOH)_{11%} und PG_{10.000}(COOH)_{27%}. Alle Kammern



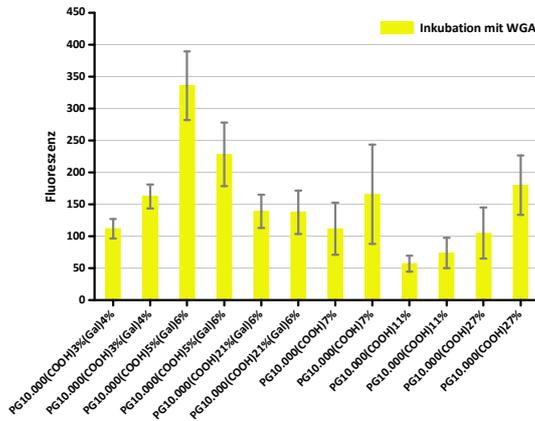
wurden mit 30 µl hPG-Derivatlösung [100 nmol] und 30 µl TUK-Katalysator Suspension gefüllt. Die Objektträger wurden intensiv gewaschen und nach dem Trocknen für 1.5 Stunden mit WGA-FITC [1 µmol] inkubiert. Messung: GFP-Filter.



5.6.44 ES50

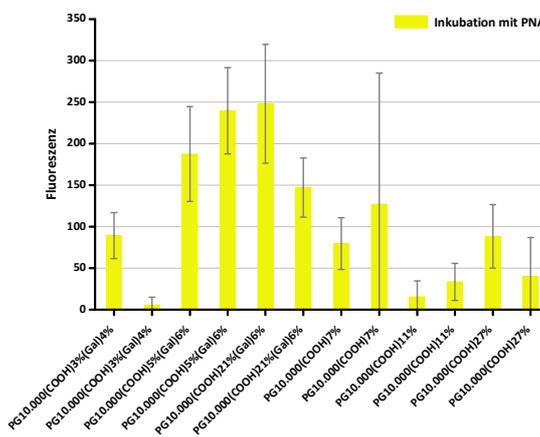
Die Beschichtung und Inkubation erfolgte analog zum Epoxidobjektträger ES49. Messung: GFP-Filter.

5.6.45 ES51



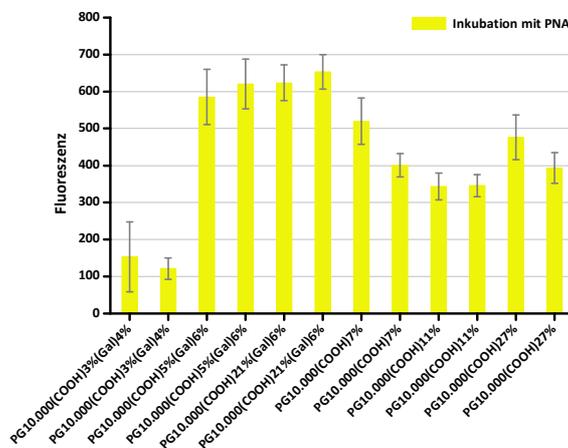
Die Beschichtung und Inkubation erfolgte analog zum Epoxidobjektträger ES49. Messung: GFP-Filter.

5.6.46 ES53



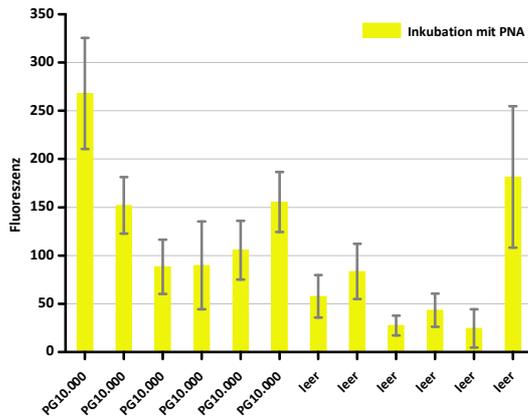
Die Beschichtung erfolgte analog zum Epoxidobjektträger ES49. Danach erfolgte die Inkubation des beschichteten Objektträgers mit PNA-FITC [1 µmol]. Die Näpchen trockneten ein. Messung: GFP-Filter.

5.6.47 ES54



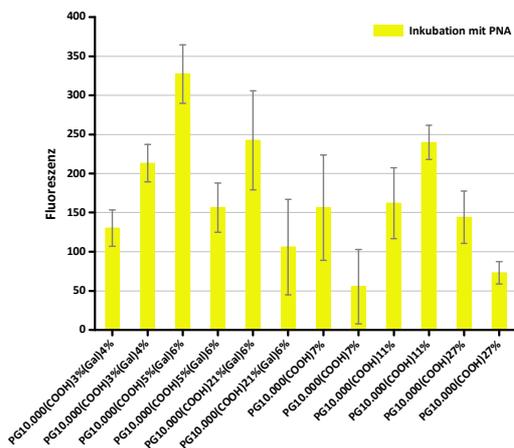
Die Beschichtung und Inkubation des Epoxidobjektträgers erfolgte analog ES49. Messung: GFP-Filter.

5.6.48 ES55



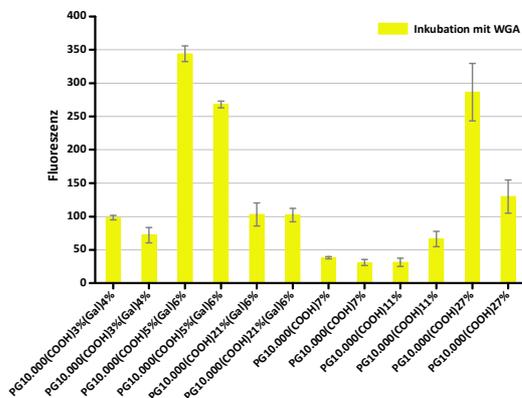
Die Beschichtung erfolgte in sechs Kammern mit 30 μ l hPG_{10.000} [1 mg/ ml Wasser] und 30 μ l TUK-Lösung. Sechs Kammern wurden nur mit der TUK-Lösung inkubiert. Nach dem Waschen wurde der Objektträger mit PNA-FITC [1 μ mol] inkubiert. Messung: GFP-Filter.

5.6.49 ES56



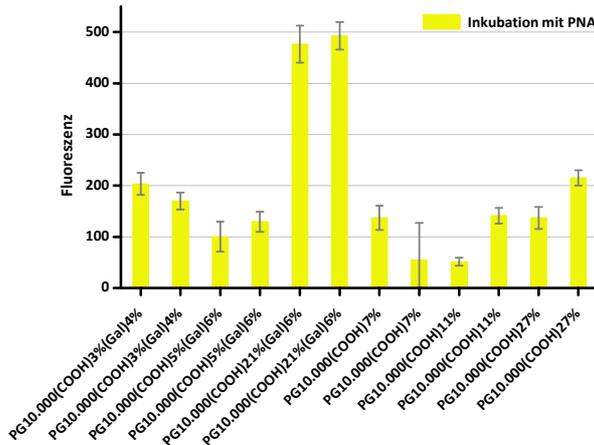
Die Beschichtung erfolgte wie beim Epoxidobjektträger ES49. Nach dem Waschen wurde mit PNA-FITC Lösung [100 nmol] inkubiert. Messung: GFP-Filter.

5.6.50 ES57



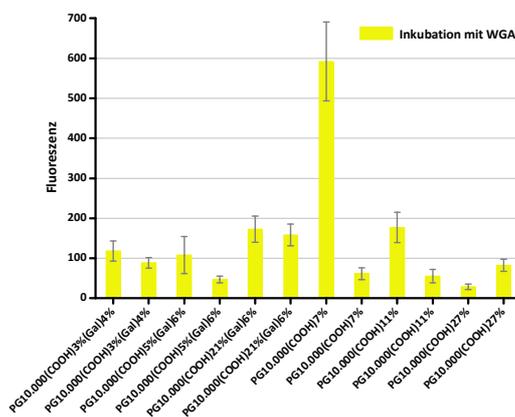
Die Beschichtung erfolgte bei denselben Konzentrationen und mit denselben Verbindungen, wie für den Epoxidobjektträger ES49 beschrieben. Die Dauer betrug 2.5 Tage, nach 24 h wurde Essigsäure hinzugegeben. Nach dem Waschen wurde mit WGA-FITC-Lösung [100 nmol] inkubiert. Messung: GFP-Filter.

5.6.51 ES58



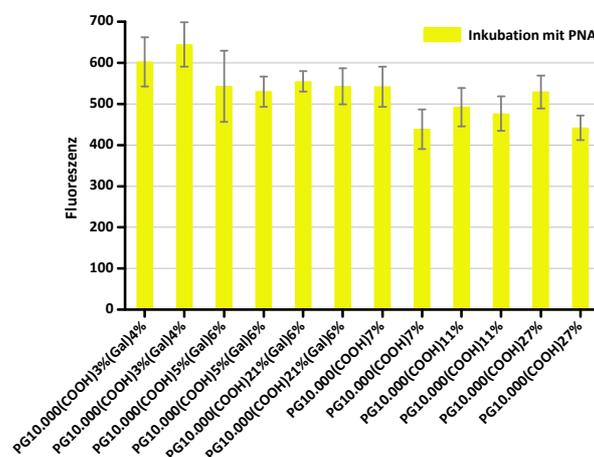
Die Beschichtung erfolgte wie beim Epoxidobjektträger ES49. Nach dem Waschen wurde mit PNA-FITC-Lösung [100 nmol] inkubiert. Messung: GFP-Filter.

5.6.52 ES59



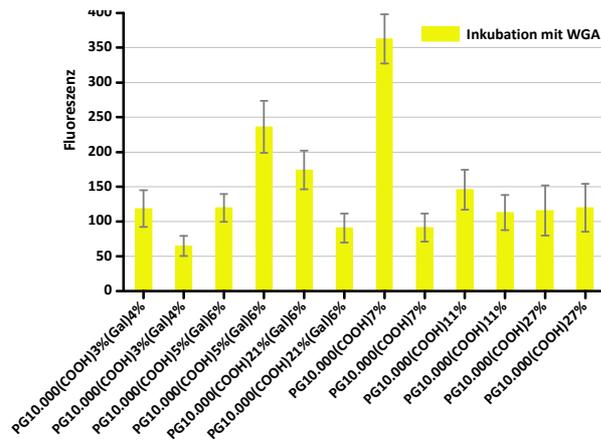
Die Beschichtung erfolgte wie beim Epoxidobjektträger ES49. Nach dem Waschen wurde mit WGA-FITC Lösung [100 nmol] inkubiert. Messung: GFP-Filter. Die Kammern 4, 5 und 6 waren eingetrocknet. Messung: GFP-Filter.

5.6.53 ES60



Die Beschichtung erfolgte bei gleichen Konzentrationen und mit denselben Verbindungen, wie bei ES49. Die Dauer betrug 2.5 Tage, nach 24 h wurde Essigsäure hinzugegeben. Nach dem Waschen wurde mit PNA-FITC-Lösung [100 nmol] inkubiert. Messung: GFP-Filter.

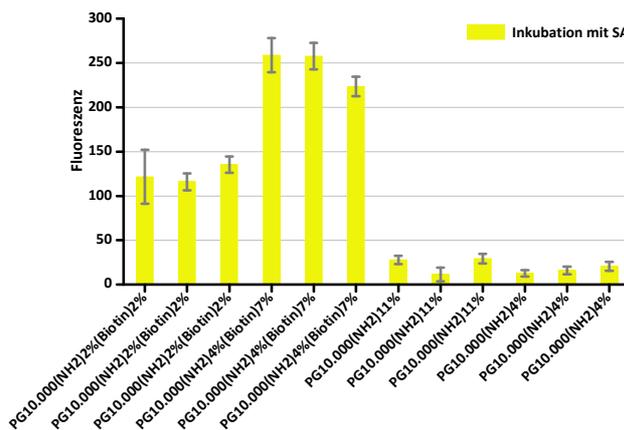
5.6.54 ES61



Die Beschichtung erfolgte bei denselben Konzentrationen und mit denselben Verbindungen, wie für ES49. Die Dauer betrug 2.5 Tage, nach 24 h wurde Essigsäure hinzugegeben. Nach dem Waschen wurde mit WGA-FITC Lösung [100 nmol] inkubiert. Messung: GFP-Filter.

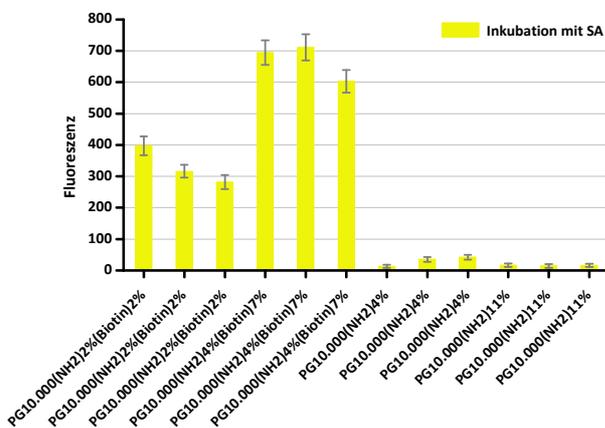
5.6.55 ES62

Die Beschichtung des Epoxidobjektträgers erfolgte über 24 h, bei 99% Luftfeuchtigkeit und RT mit PG_{10.000}(NH₂)₂(Biotin)₂%, PG_{10.000}(NH₂)₄(Biotin)₇%, PG_{10.000}(NH₂)₄% und PG_{10.000}(NH₂)₁₁%. Alle



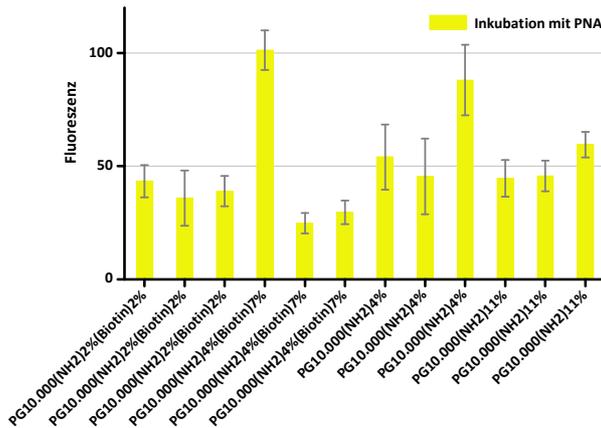
Kammern wurden mit 30 µl hPG-Derivat [100 nmol] und 30 µl TUK-Katalysator-Suspension gefüllt. Die Objektträger wurden intensiv gewaschen und nach dem Trocknen für 1.5 Stunden mit SA-FITC-Lösung [100 nmol] inkubiert. Messung: GFP-Filter.

5.6.56 ES63



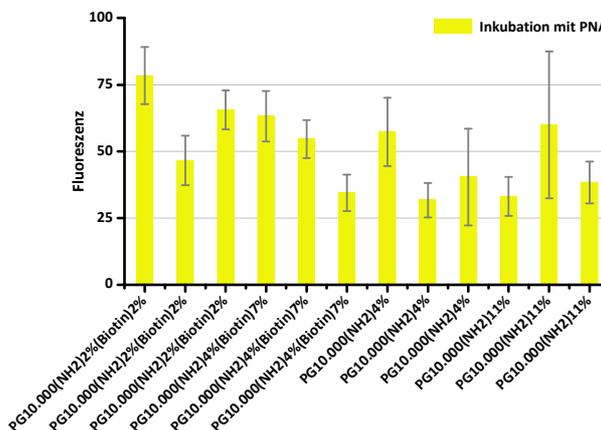
Die Beschichtung und Inkubation erfolgte analog zu ES62. Messung: GFP-Filter.

5.6.57 ES64



Die Beschichtung erfolgte analog zu ES62. Die Inkubation erfolgte für 1.5 Stunden mit PNA-FITC-Lösung [100 nmol]. Messung: GFP-Filter.

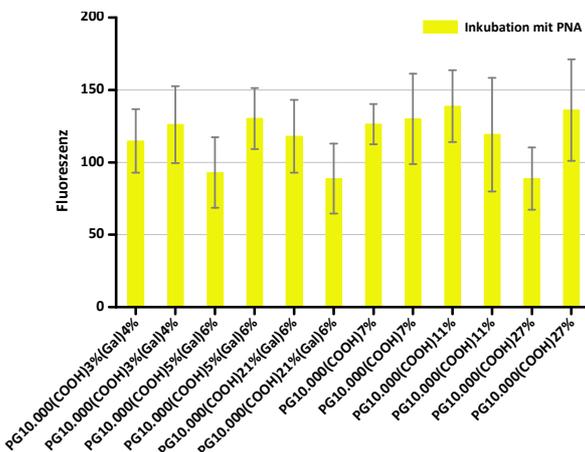
5.6.58 ES65



Die Beschichtung erfolgte analog zu ES62. Die Inkubation erfolgte für 1.5 Stunden mit PNA-FITC-Lösung [100 nmol]. Messung: GFP-Filter

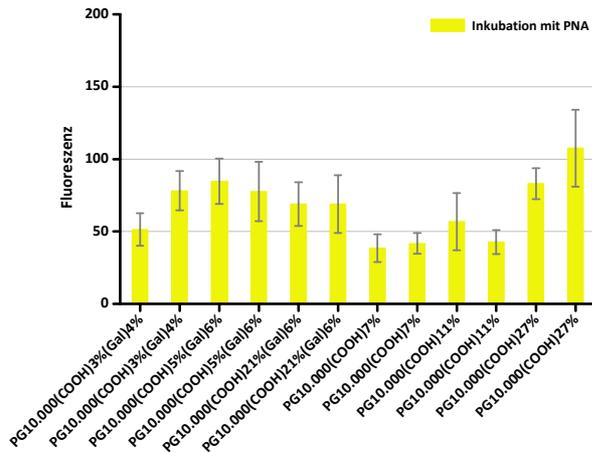
5.6.59 ES66

Die Beschichtung des Epoxidobjektträgers erfolgte über 24 h, bei 99% Luftfeuchtigkeit und RT mit PG_{10.000}(COOH)_{3%}(Gal)_{4%}, PG_{10.000}(COOH)_{5%}(Gal)_{6%}, PG_{10.000}(COOH)_{21%}(Gal)_{6%}, PG_{10.000}(COOH)_{7%}, PG_{10.000}(COOH)_{11%} und PG_{10.000}(COOH)_{27%}. Danach erfolgte die Inkubation des Objektträgers mit



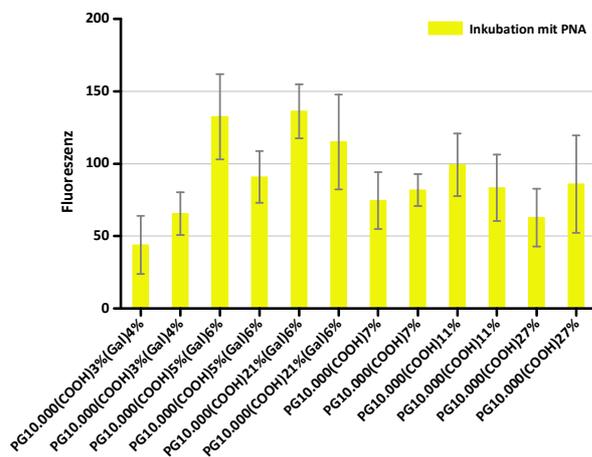
PNA-FITC-Lösung [100 nmol] (Protein Charge V) inkubiert. Messung: GFP-Filter.

5.6.60 ES67



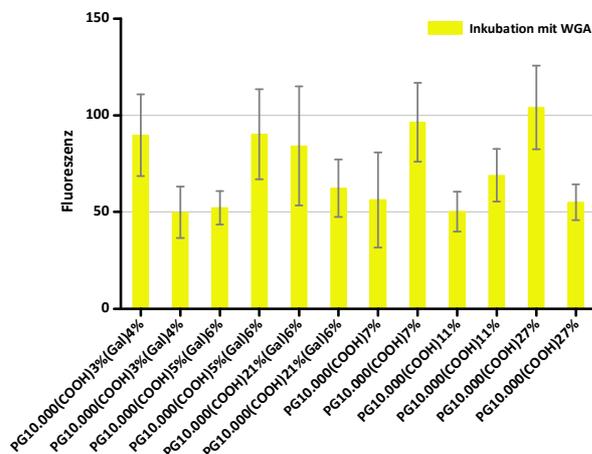
Die Beschichtung und Inkubation erfolgten analog Epoxidobjektträger ES66. Messung: GFP-Filter.

5.6.61 ES68



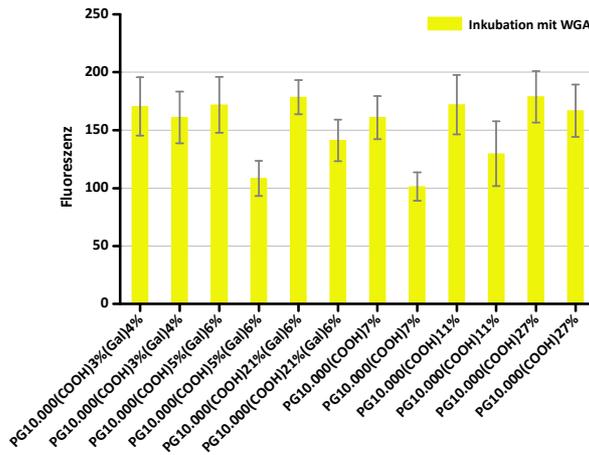
Die Beschichtung und Inkubation erfolgte analog zu ES66. Messung: GFP-Filter.

5.6.62 ES69



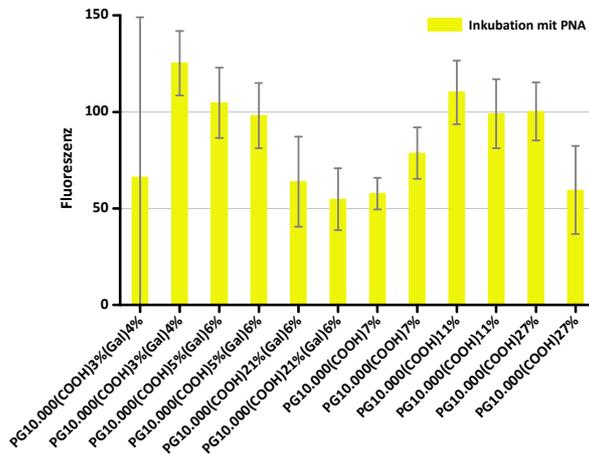
Die Beschichtung erfolgte analog zu ES66. Die Inkubation des Epoxidobjektträgers erfolgte mit WGA-FITC-Lösung [100 nM]. Messung: GFP-Filter.

5.6.63 ES70



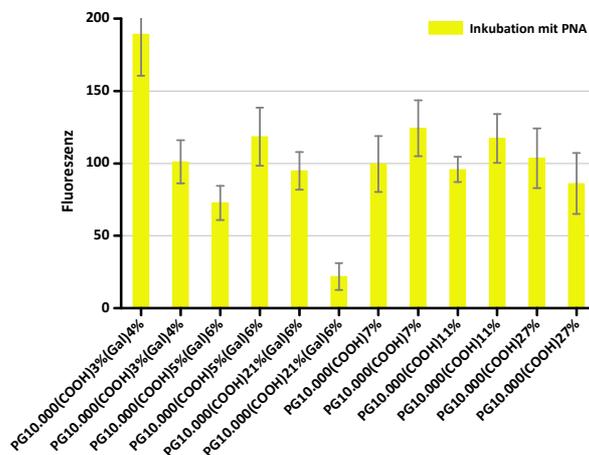
Die Beschichtung erfolgte analog zu ES66. Die Inkubation des Epoxidobjektträgers erfolgte mit WGA-FITC-Lösung [100 nM]. Messung: GFP-Filter.

5.6.64 ES71



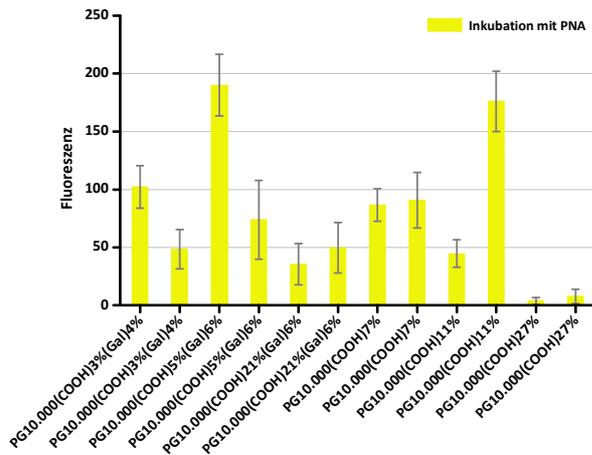
Die Beschichtung und Inkubation erfolgte analog zu ES66 auf einem 3D-Epoxidobjektträger. Messung: GFP-Filter.

5.6.65 ES72



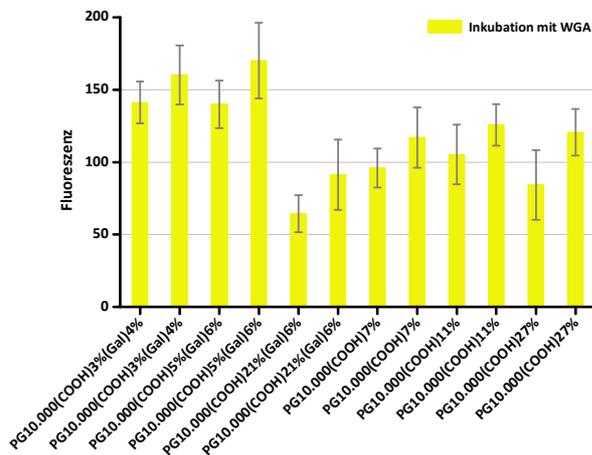
Die Beschichtung und Inkubation erfolgte analog zu ES66 auf einem 3D-Epoxidobjektträger. Messung: GFP-Filter.

5.6.66 ES73



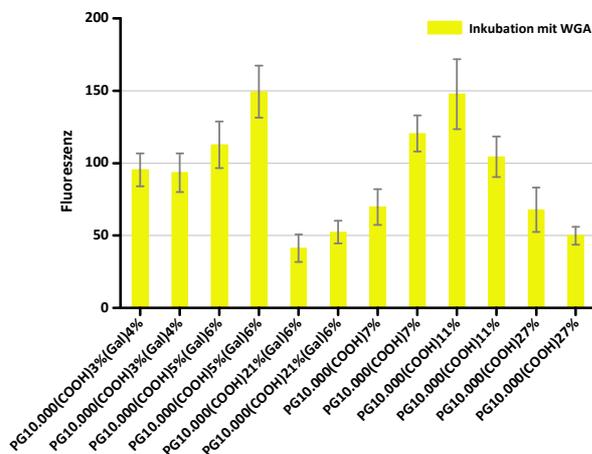
Die Beschichtung und Inkubation erfolgte analog zu ES66 auf einem 3D-Epoxidobjektträger. Messung: GFP-Filter.

5.6.67 ES74



Die Beschichtung erfolgte analog zu ES66 auf einem 3D-Epoxidobjektträger. Die Inkubation des Epoxidobjektträgers erfolgte mit WGA-FITC-Lösung [100 nM]. Messung: GFP-Filter.

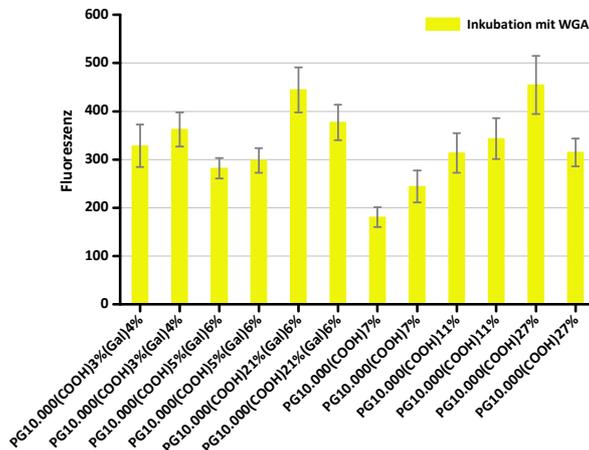
5.6.68 ES75



Die Beschichtung erfolgte analog zu ES66 auf einem 3D-Epoxidobjektträger. Die Inkubation des Epoxidobjektträgers erfolgte mit WGA-FITC-Lösung [100 nM]. Messung: GFP-Filter.

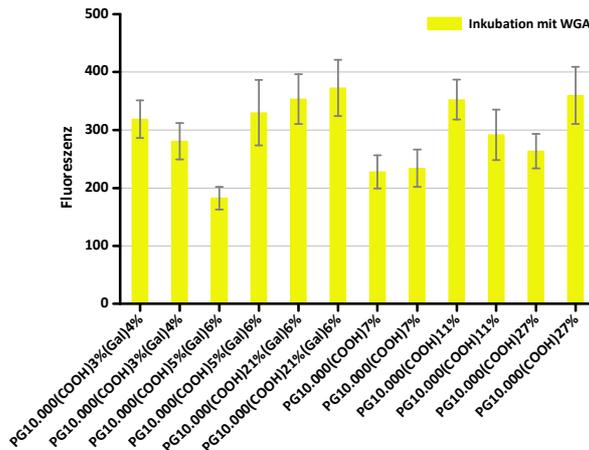
5.6.69 AS01

Die Beschichtung des Aminobjektträgers erfolgte über 24 h, bei 99% Luftfeuchtigkeit und RT mit PG_{10.000}(COOH)_{3%}(Gal)_{4%}, PG_{10.000}(COOH)_{5%}(Gal)_{6%}, PG_{10.000}(COOH)_{21%}(Gal)_{6%}, PG_{10.000}(COOH)_{7%}, PG_{10.000}(COOH)_{11%} und PG_{10.000}(COOH)_{27%}. Alle Kammern wurden mit 30 µl hPG-Derivat [100 nmol]



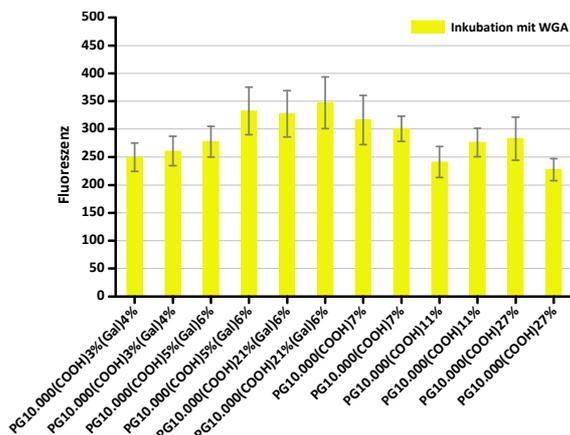
und 30 µl HSTU-Lösung [100 nmol] gefüllt. Die Objektträger wurden intensiv gewaschen und nach dem Trocknen für 1.5 Stunden mit WGA-FITC [1 µmol] inkubiert. Messung: GFP-Filter.

5.6.70 AS02



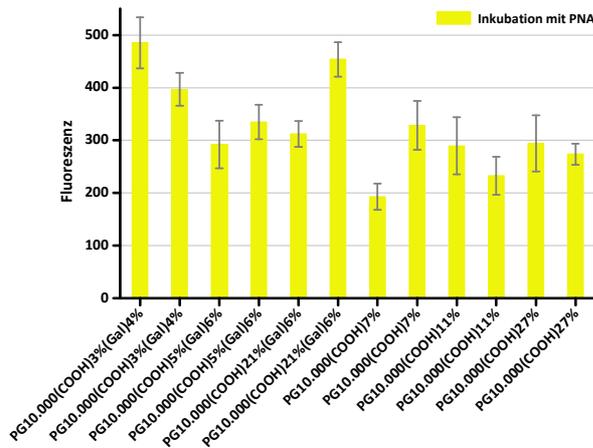
Die Beschichtung und Inkubation erfolgte analog AS01. Messung: GFP-Filter.

5.6.71 AS03



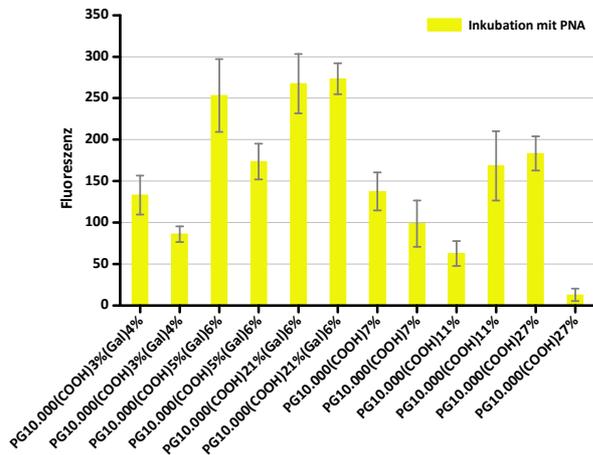
Die Beschichtung und Inkubation erfolgte analog AS01. Messung: GFP-Filter.

5.6.72 AS04



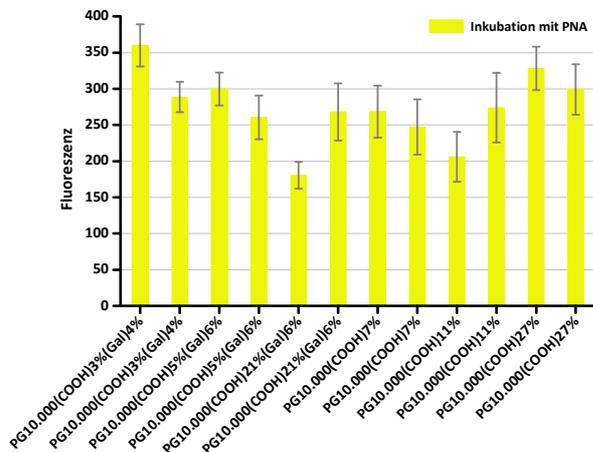
Die Beschichtung des Aminobjektträgers erfolgte analog AS01. Die Inkubation erfolgte für 1.5 Stunden mit PNA-FITC [100 nmol]. Messung: GFP-Filter.

5.6.73 AS05



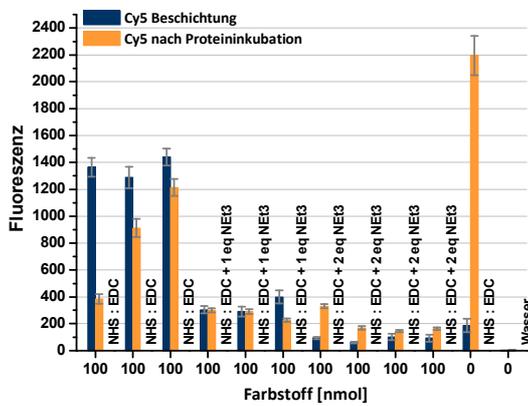
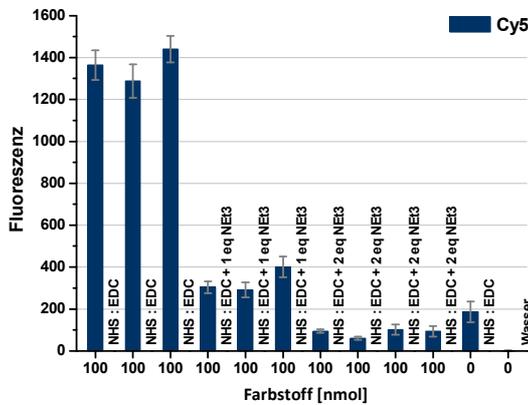
Die Beschichtung und Inkubation erfolgte analog zu AS04. Messung: GFP-Filter.

5.6.74 AS06



Die Beschichtung und Inkubation erfolgte analog zu AS04. Messung: GFP-Filter.

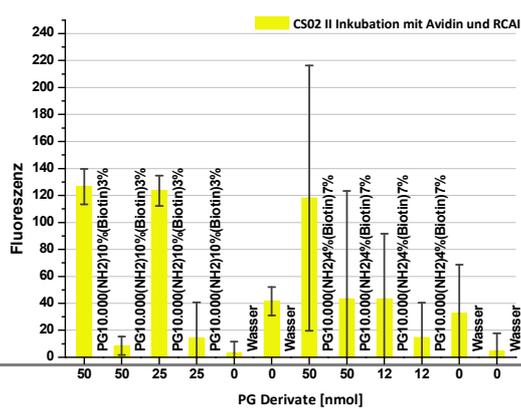
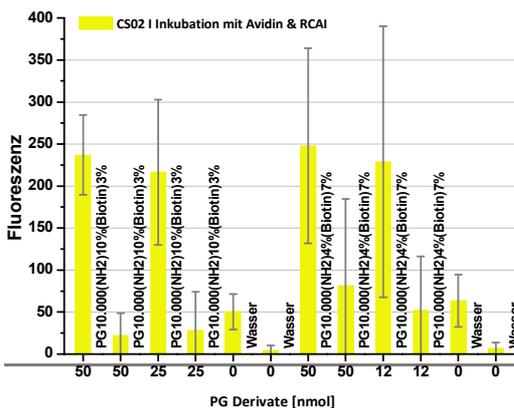
5.6.75 CS01



Die Beschichtung des 3D-Carboxyobjektträgers erfolgte für 18 Minuten, bei 99% Luftfeuchtigkeit und RT mit einer 1:1-Mischung CyKaiSym-L-Linker-NH₂-Biotin [100 nmol] sowie dem Kupplungsreagenz NHS:EDC 1:1 [100 nmol]. Die Spots wurden durch leichtes Klopfen geleert und danach für 1.5 Stunden mit Avidin-FITC [100 nmol] inkubiert. Messung: Cy5-Filter.

5.6.76 CS02

Die Beschichtung erfolgte auf 3D-Carboxyobjektträgern für 24 h, bei 99% Luftfeuchtigkeit und RT mit PG_{10.000}(NH₂)₁₀%(Biotin)₃% und PG_{10.000}(NH₂)₄%(Biotin)₇% bei jeweils zwei unterschiedlichen Konzentrationen. Nach dem Waschvorgang wurde 1.5 Stunden mit zwei unterschiedlichen Proteinen inkubiert: Avidin D-FITC [100 nmol] in allen ungeraden Kammern und RCA I-FITC-



Lösung [100 nmol] in allen gerade Kammern. Messung: GFP-Filter.

5.7 SPR-MESSUNGEN

Die Beschichtung von Goldchips mit Liponsäure-Derivaten und Hexadecanthiol erfolgte in der Regel durch 24-stündiges Eintauchen gereinigter und aktivierter Goldoberflächen in eine methanolische Lösung des jeweiligen Moleküls (1 mg/1 ml). Die sehr hohe Konzentration des Liganden wurde gewählt, um eine möglichst vollständige Beschichtung der Goldoberfläche zu erhalten und um das Molgewicht der entsprechenden Liganden vernachlässigen zu können. Die Aktivierung und Reinigung der Goldoberflächen erfolgte durch Eintauchen (60 Sekunden) in Carosche Säure (30%ig H_2O_2 : konz. H_2SO_4 1:2). Nach der Immobilisierung wurden die so erhaltenen beschichteten Goldchips intensiv mit Methanol und Milliporewasser gespült, im Stickstoffstrom getrocknet und sofort vermessen.

Die Adsorption der verschiedenen Proteine wurde im Biacore 3000 gemessen. Das Messprotokoll war für alle Chips identisch und lautete wie folgt: (i) 3 Minuten Spülen des Kanals mit 1%iger SDS-Lösung, gefolgt von (ii) 10 Minuten spülen mit PBS-Puffer (mit Ca^{2+} und Mg^{2+}). Daraufhin erfolgte (iii) eine 20minütige Injektion, der zu untersuchenden

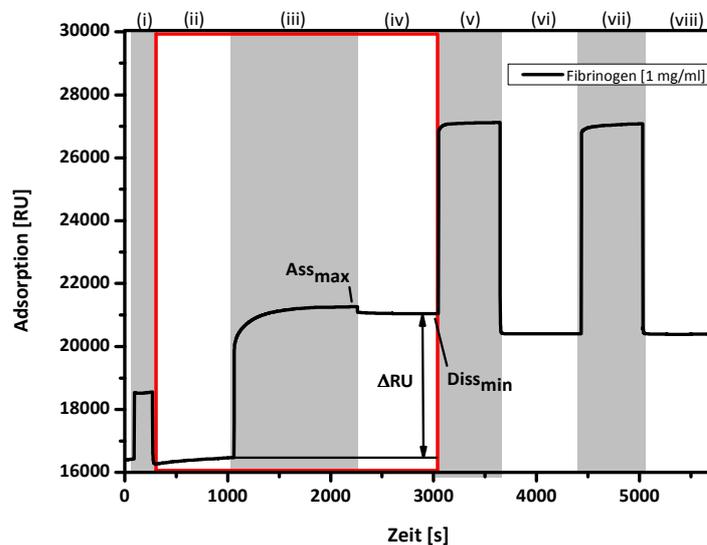


Abbildung 55: SPR-Sensogramm von Fibrinogen auf einer Goldoberfläche.

Proteine [100 nM] in demselben PBS-Puffer, wieder gefolgt von (iv) 10 Minuten Spülen des Kanals mit PBS-Puffer. Die Flussrate des Systems lag bei $10 \mu\text{l}/\text{min}$. Die Regeneration der Chips erfolgte, soweit dies möglich war, durch [(v) und (vii)] 2-faches 10 minütiges Waschen des Kanals mit 4%iger SDS-Lösung, jeweils gefolgt von (vi) und (viii) 10 Minuten Spülen mit PBS-Puffer. Der Erfolg

der Regeneration zeigte sich durch den Erhalt der Anfangsresponse der Chips. Im Falle der Biotinchips war keine Regeneration möglich.

Der zu untersuchende Bereich umfasst die Messung im Zeitfenster (ii) bis (iv). Im Bereich (ii) wird die Oberfläche mit PBS-Puffer gespült, dies wird als Nulllinie des Chips verstanden. Das Adsorptionsverhalten wird beobachtet während das Protein injiziert wird (iii), und das Dissoziationsverhalten wird aufgezeichnet nachdem wieder reine Pufferlösung (iv) über die Goldoberfläche fließt. Die relative Differenz ΔRU zwischen der Nulllinie vor der Proteinadsorption und der Höhe der Basislinie nach Proteinadsorption wird als Maß für die Proteinadsorption verstanden. Die so erhaltene Differenz, wird ins Verhältnis zur Proteinadsorption auf einem mit Hexadecanthal (HDT) beschichteten Chip gesetzt (siehe Tabelle 6). Dies ist mit der vereinfachten Annahme nach Whitesides et. al. dadurch begründet, dass auf einer HDT-Oberfläche eine Monolage des betreffenden Proteins adsorbiert wird.^[154]

$$Adsorption[\%] = \frac{\Delta RU_{Molekül}}{\Delta RU_{HDT}} \cdot 100\% \quad (8)$$

Tabelle 6: Übersicht der Beschichtungs-/Inkubationsbedingungen.

Chip	Substanz	Ansatz	Inkubationszeit [h]	Lösungsmittel	Bemerkungen
GS01	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{6%}	AJ246	18	MeOH	3x gemessen
GS02	Blanker Goldchip		18	MeOH	
GS03	PG _{10.000} ((COOH) _{9%}	AJ189	24	MeOH	Substanz ohne Disulfidanker
GS04	Hexadecanthal		25	Hexan	Unsaubere Oberfläche
GS09	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{2%}	AJ245	18	MeOH	2x gemessen, verschiedene [Protein]
GS10	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (COOH) _{5%}	AJ232	24	MeOH	1 Woche gelagert vor Messung
GS11	Hexadecanthal		24	MeOH	1 Woche gelagert vor Messung
GS12	PG _{10.000} (TA) _{1%} (NH ₂) _{5%}	AJ252	24	MeOH	2x gemessen, aufgrund Luft
GS13	PG _{10.000} (TA) _{1%} (Biotin) _{5%}	AJ263	24	MeOH	

GS14	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (COOH) _{10%}	AJ233	32	MeOH	
GS15	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{6%}	AJ246	17	MeOH	12 h gelagert
GS16	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{15%}	AJ247	24	MeOH	
GS17	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (COOH) _{24%}	AJ266	12	MeOH	
GS18	PG _{10.000} (TA) _{1%}	AJ269	24	MeOH	
GS19	PG _{10.000} (TA) _{1%} (Biotin) _{10%}	AJ270	24	MeOH	
GS20	PG _{10.000} (TA) _{1%} (NH ₂) _{12%}	AJ268	24	MeOH	
GS22	PG _{10.000} (TA) _{1%} (Biotin) _{5%}	AJ263	22	MeOH	Anscheinend schlechte Beschichtung, zweiter Lauf zeigt besser Proteinresistenz
GS23	PG _{10.000} (TA) _{1%} (NH ₂) _{5%}	AJ252	18	MeOH	
GS24	PG _{10.000} (TA) _{1%} (Biotin) _{10%}	AJ270	31	MeOH	Chip sieht seltsam aus; Lösung trüb
GS25	PG _{10.000} (TA) _{1%} (NH ₂) _{10%}	AJ268	24	MeOH	
GS26	BiotinTAA	AJ271	24	MeOH	
GS27	PG _{10.000} (TA) _{1%} (Biotin) _{10%}	AJ270	30	MeOH	
GS28	PG _{10.000} (TA) _{1%} (Biotin) _{10%} /PG _{10.000} (TA) _{1%}	AJ270/ AJ269	24	MeOH	1:1
GS29	PG _{10.000} (TA) _{1%} (Biotin) _{10%} /PG _{10.000} (TA) _{1%}	AJ270/ AJ269	24	MeOH	1:3; Chip sieht dreckig aus
GS30	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{2%}	AJ245	16	MeOH	
GS31					
GS32					
GS33					
GS34	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{2%}	AJ245	20	MeOH	Messung misslungen

GS35	HDT (Biacore)		30	MeOH	
GS36	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{6%} /PG _{10.000} (TA) _{1%}	AJ246/ AJ269	19	MeOH	1:3; 2.Lauf, immer höhere Adsorption
GS37	HDT (Xantec)			MeOH	
GS38	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{2%}	AJ245	22	MeOH	
GS39	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{6%}	AJ246		MeOH	
GS40	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{15%}	AJ247	17	MeOH	
GS41	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{6%} /PG _{10.000} (TA) _{1%}	AJ246/ AJ269	26	MeOH	1:10
GS42	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{2%}	AJ245			
GS43	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{15%} /PG _{10.000} (TA) _{1%}	AJ246/ AJ269	25	MeOH	1:10
GS44	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{6%}	AJ246	17	MeOH	
GS45	HDT		27	MeOH	
GS46	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{15%}	AJ247		MeOH	Inkubationslösung anfänglich trüb
GS47	PG _{10.000} (TAA) _{1%} (COOH) _{24%}	AJ266	16	MeOH	

Die nachfolgenden Tabellen stellen eine Übersicht der erhaltenen Adsorptionen für die gemessenen Chips dar. Bei den Zahlenwerten handelt es sich immer um Mittelwerte zweier Kurven (pro Protein wurde jedes Mal eine Doppelbestimmung durchgeführt), außer es war nicht sinnvoll, die zweite Kurve mit einzubeziehen. Dies war zum Beispiel für die Streptavidin-Adsorption auf mit Biotin derivatisierten Chips der Fall, da eine Regeneration der Chip-Oberfläche weder durch die Standard-Regenerationstechnik (4% SDS-Puffer) noch durch andere Methoden möglich war. Hier wurde immer nur die erste Kurve berücksichtigt.

5.7.1 Hexadecanthal-Beschichtung

GS04: Hexadecanthal Beschichtung				
Protein	Ass. max.	Standardfehler	Diss. min.	Standardfehler
[100 nM]	RU	RU	RU	RU
Fib	2512	25	2510	31
WGA	1639	84	1191	45
bl PNA	2680	37	2224	58
PNA	2571	34	2242	49

GS11: Hexadecanthal Beschichtung				
Protein	Ass. max.	Standardfehler	Diss. min.	Standardfehler
[100 nM]	RU	RU	RU	RU
SA	1686	67	1348	24
Fib	3567	6	3492	31
WGA	1752	9	1519	11
bl PNA	2903	162	2210	87
PNA	2798	64	2222	13

GS35: Hexadecanthal Beschichtung				
Protein	Ass. max.	Standardfehler	Diss. min.	Standardfehler
[100 nM]	RU	RU	RU	RU
SA	343	138	161	17
Fib	3736	78	3544	52
WGA	1079	20	529	27
BSA	646	30	638	55
PNA	1913	242	1507	198

GS37: Hexadecanthal Beschichtung				
Protein	Ass. max.	Standardfehler	Diss. min.	Standardfehler
[100 nM]	RU	RU	RU	RU
SA	496	54	144	8
Fib	4181	37	3997	12
WGA	254	43	150	1
BSA	586	28	649	30
PNA	2370	351	1283	17

GS45: Hexadecanthiol Beschichtung					
Protein	Konz.	Ass. max.	Standardfehler	Diss. min.	Standardfehler
	nM	RU	RU	RU	RU
SA	500	631	30	142	19
Fib	500	5929	347	5455	191
WGA	500	1395	70	967	39
BSA	500	1244	36	972	61
PNA	500	1981	74	1255	46
RCA I	10000	4562	20	2308	39
RCA I	5000	4269	28	2209	62

5.7.2 PG_{10.000}(TA)_{1%}-Beschichtung

GS18: PG _{10.000} (TA) _{1%} Beschichtung					
Protein	Ass. max.	Standardfehler	Diss. min.	Standardfehler	Adsorption*
[100 nM]	RU	RU	RU	RU	%
SA	26	12	2	0	0
Fib	26	14	-4	1	0
WGA	81	4	28	7	2
bl PNA	1168	14	9	4	0
PNA	139	10	15	1	1

5.7.3 PG_{10.000}(TA)_{1%}(NH₂)_{5%}-Beschichtung

GS12: PG _{10.000} (TA) _{1%} (NH ₂) _{5%} Beschichtung					
Protein	Ass. max.	Standardfehler	Diss. min.	Standardfehler	Adsorption*
[100 nM]	RU	RU	RU	RU	%
SA	42	8	10	3	1
Fib	216	19	127	30	4
WGA	111	9	18	1	1
bl PNA	674	6	75	7	3
PNA	373	69	197	79	9

GS23: PG _{10.000} (TA) _{1%} (NH ₂) _{5%} Beschichtung					
Protein	Ass. max.	Standardfehler	Diss. min.	Standardfehler	Adsorption*
[100 nM]	RU	RU	RU	RU	%
SA	176	7	44	8	3
BSA	154	16	87	27	13
WGA	82	26	16	7	1
bl PNA	299	6	62	18	3
PNA	84	0	23	13	1

5.7.4 PG_{10.000}(TA)_{1%}(NH₂)_{10%}-Beschichtung

GS20: PG _{10.000} (TA) _{1%} (NH ₂) _{10%} Beschichtung					
Protein	Ass. max.	Standardfehler	Diss. min.	Standardfehler	Adsorption*
[100 nM]	RU	RU	RU	RU	%
SA	77	7	60	5	4
Fib	21	6	47	9	1
WGA	198	36	163	41	11
bl PNA	356	0	118	12	5
PNA	221	2	94	14	4

GS25: PG _{10.000} (TA) _{1%} (NH ₂) _{10%} Beschichtung					
Protein	Ass. max.	Standardfehler	Diss. min.	Standardfehler	Adsorption*
[100 nM]	RU	RU	RU	RU	%
SA	207	4	101	14	8
BSA	62	1	69	8	11
WGA	76	5	33	2	2
bl PNA	432	7	99	18	4
PNA	174	1	55	11	2

5.7.5 PG_{10.000}(TA)_{1%}(Biotin)_{5%}-Beschichtung

GS13: PG _{10.000} (TA) _{1%} (Biotin) _{5%} Beschichtung					
Protein	Ass. max.	Standardfehler	Diss. min.	Standardfehler	Adsorption*
[100 nM]	RU	RU	RU	RU	%
SA	1555	--	1297	--	96
Fib	245	22	8	10	0
WGA	199	8	53	1	3
bl PNA	758	22	41	8	2
PNA	228	11	30	2	1

Bei GS13 waren die SDS-Lösungen vertauscht und es kam während der Messung zu Luftblasen in den Kanälen, die die Messung beeinträchtigten. Des Weiteren erhielt man bei jedem Erstkontakt des jeweiligen Proteins mit dem beschichteten Chip einen Peak der aber meist nach fünf Sekunden wieder zum erwarteten Kurvenverlauf zurückkehrte.

GS22: PG _{10.000} (TA) _{1%} (Biotin) _{5%} Beschichtung					
Protein	Ass. max.	Standardfehler	Diss. min.	Standardfehler	Adsorption*
[100 nM]	RU	RU	RU	RU	%
SA	1692	--	1622	--	120
BSA	53	10	30	16	5
WGA	80	7	17	16	1
bl PNA	379	4	21	19	1
PNA	175	6	18	20	1

Die zweite Tabelle zeigt nur die Werte der jeweiligen ersten Messung einer Spur, da die zweite Messung durchgängig bessere Proteinresistenz zeigte, was ein Indiz für eine schlechte Beschichtung sein könnte.

GS22: PG_{10.000}(TA)_{1%}(Biotin)_{5%} Beschichtung nur erster Lauf					
Protein	Ass. max.	Standardfehler	Diss. min.	Standardfehler	Adsorption*
[100 nM]	RU	RU	RU	RU	%
SA	1692	--	1622	--	120
BSA	63	--	46	--	7
WGA	87	--	32	--	2
bl PNA	383	--	39	--	2
PNA	182	--	38	--	2

5.7.6 PG_{10.000}(TA)_{1%}(Biotin)_{10%}-Beschichtung

GS19: PG_{10.000}(TA)_{1%}(Biotin)_{10%} Beschichtung					
Protein	Ass. max.	Standardfehler	Diss. min.	Standardfehler	Adsorption*
[100 nM]	RU	RU	RU	RU	%
SA	2485	--	2428	--	180
Fib	95	7	39	13	1
WGA	293	61	201	58	13
bl PNA	1351	5	125	17	6
PNA	284	7	98	13	4

GS24: PG_{10.000}(TA)_{1%}(Biotin)_{10%} Beschichtung					
Protein	Ass. max.	Standardfehler	Diss. min.	Standardfehler	Adsorption*
[100 nM]	RU	RU	RU	RU	%
SA	7035	--	6959	--	516
BSA	-9	43	-68	54	-10
WGA	78	8	1	3	0
bl PNA	327	6	58	3	3
PNA	192	14	31	22	1

GS27: PG_{10.000}(TA)_{1%}(Biotin)_{10%} Beschichtung					
Protein	Ass. max.	Standardfehler	Diss. min.	Standardfehler	Adsorption*
[100 nM]	RU	RU	RU	RU	%
SA	3584	--	3521	--	261
BSA	62	3	25	3	4
WGA	92	3	23	3	2
bl PNA	825	4	100	7	5
PNA	208	0	49	9	2

5.7.7 PG_{10.000}(TA)_{1%}(Biotin)_{10%} mit PG_{10.000}(TA)_{1%} gemischt

GS28: PG _{10.000} (TA) _{1%} (Biotin) _{10%} und PG _{10.000} (TA) _{1%} 1:1 gemischt Beschichtung					
Protein	Ass. max.	Standardfehler	Diss. min.	Standardfehler	Adsorption*
[100 nM]	RU	RU	RU	RU	%
SA	3344	--	2184	--	162
BSA	35	6	11	0	2
WGA	153	13	74	18	5
bl PNA	508	12	27	0	1
PNA	195	7	25	4	1

Der beschichtete Goldchip GS29 schien eine stark verdreckte Oberfläche zu haben. Alle Spuren zeigten eine stark abfallende Basislinie.

GS29: PG _{10.000} (TA) _{1%} (Biotin) _{10%} und PG _{10.000} (TA) _{1%} 1:3 gemischt Beschichtung					
Protein	Ass. max.	Standardfehler	Diss. min.	Standardfehler	Adsorption*
[100 nM]	RU	RU	RU	RU	%
SA	793	--	685	--	51
BSA	-622	454	-990	630	-153
WGA	-33	35	-181	40	-12
bl PNA	210	47	-105	40	-5
PNA	123	23	-50	43	-2

5.7.8 BiotinTAA-Beschichtung

GS26: BiotinTAA Beschichtung						
Protein	Ass _{max}	Standardfehler	Adsorption*	Diss _{min}	Standardfehler	Adsorption*
[100 nM]	RU	RU	%	RU	RU	%
SA	4248	--	252	4218	--	313
BSA	624	98	52	490	101	76
WGA	2284	127	130	1135	88	75
bl PNA	4012	12	138	964	7	44
PNA	3479	46	124	532	30	24

5.7.9 PG_{10.000}(TAA)_{1%}(COOH)_{5%}-Beschichtung

GS10 : PG _{10.000} (TAA) _{1%} (COOH) _{5%} Beschichtung						
Protein	Ass _{max}	Standardfehler	Adsorption*	Diss _{min}	Standardfehler	Adsorption*
[100 nM]	RU	RU	%	RU	RU	%
SA	174	18	10	-18	12	-1
Fib	198	2	6	24	3	1
WGA	267	8	15	4	1	0
bl PNA	409	4	14	-9	6	0
PNA	333	16	12	-5	7	0

GS14 : PG _{10.000} (TAA) _{1%} (COOH) _{5%} Beschichtung						
Protein	Ass _{max}	Standard- fehler	Adsorption*	Diss _{min}	Standard- fehler	Adsorption*
[100 nM]	RU	RU	%	RU	RU	%
SA	87	9	5	-1	1	0
Fib	40	10	1	-5	0	0
WGA	112	5	6	12	3	1
bl PNA	916	4	32	50	11	2
PNA	173	7	6	11	6	0

5.7.10 PG_{10.000}(TA)_{1%}(COOH)_{10%}-Beschichtung

GS14 : PG _{10.000} (TA) _{1%} (COOH) _{5%} Beschichtung						
Protein	Ass _{max}	Standard- fehler	Adsorption*	Diss _{min}	Standard- fehler	Adsorption*
[100 nM]	RU	ΔRU	%	RU	ΔRU	%
SA	87	9	5	-1	1	0
Fib	40	10	1	-5	0	0
WGA	112	5	6	12	3	1
bl PNA	916	4	32	50	11	2
PNA	173	7	6	11	6	0

5.7.11 PG_{10.000}(TAA)_{1%}(COOH)_{20%}-Beschichtung

GS17 : PG _{10.000} (TAA) _{1%} (COOH) _{20%} Beschichtung						
Protein	Ass _{max}	Standard- fehler	Adsorption*	Diss _{min}	Standard- fehler	Adsorption*
[100 nM]	RU	RU	%	RU	RU	%
SA	56	13	3	-5	1	0
Fib	64	21	2	21	28	1
WGA	106	13	6	7	2	0
bl PNA	1703	19	59	38	7	2
PNA	194	7	7	11	2	0

GS47: PG _{10.000} (TAA) _{1%} (COOH) _{20%} Beschichtung							
Protein	Konzent- ration	Ass. max.	Standard- fehler	Adsorp- tion*	Diss. min.	Standard- fehler	Adsorp- tion*
	nM	RU	RU	%	RU	RU	%
RCAI	5000	308	84	7	208	93	9
SA	500	113	10	18	48	26	34
WGA	500	125	7	9	19	13	1
PNA	500	307	3	15	32	18	3
BSA	500	154	2	12	8	12	1

Die SA-Adsorption ist so hoch, weil sie auf die HDT-Referenz GS45 bezogen ist, die jedoch ein merkwürdiges Adsorptionsverhalten zeigte und eine ungewöhnlich geringe Adsorption von 142.

5.7.12 PG_{10.000}(TAA)_{1%}(Gal)_{2%}-Beschichtung

Der Chip ist einmal mit den falschen Proteinkonzentrationen vermessen worden [10 nM]. Die Ergebnisse sind hier nicht dargestellt. Es folgt die Wiederholungsmessung mit der korrekten Proteinkonzentration.

GS09 : PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{2%} Beschichtung						
Protein	Ass _{max}	Standard- fehler	Adsorption*	Diss _{min}	Standard- fehler	Adsorption*
[100 nM]	RU	RU	%	RU	RU	%
SA	295	1	18	52	10	4
Fib	456	10	13	194	22	6
WGA	402	27	23	243	33	16
bl PNA	694	2	24	69	17	3
PNA	464	8	17	126	23	6

GS30 : PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{2%} Beschichtung						
Protein	Ass _{max}	Standard- fehler	Adsorption*	Diss _{min}	Standard- fehler	Adsorption*
[100 nM]	RU	RU	%	RU	RU	%
SA	299	7	18	192	9	14
BSA	484	176	40	398	175	61
WGA	531	77	30	357	109	24
bl PNA	975	260	34	513	246	23
PNA	620	118	22	351	83	16

GS34: PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{2%} Beschichtung							
Protein	Konzent- ration	Ass. max.	Standard- fehler	Adsorp- tion*	Diss. min.	Standard- fehler	Adsorp- tion*
	nM	RU	RU	%	RU	RU	%
PNA	1000	525	31	19	105	20	5
PNA	500	290	51	10	22	37	1
PNA	250	91	10	3	-150	19	-7

GS38: PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{2%} Beschichtung							
Protein	Konzent- ration	Ass. max.	Standard- fehler	Adsorp- tion*	Diss. min.	Standard- fehler	Adsorp- tion*
	nM	RU	RU	%	RU	RU	%
PNA	1000	321	2	11	53	37	2
PNA	500	24	16	1	-32	19	-1
PNA	250	188	31	7	7	52	0

GS42: PG_{10.000}(TAA)_{1%}(Gal)_{2%} Beschichtung							
Protein	Konzentration	Ass. max.	Standardfehler	Adsorption*	Diss. min.	Standardfehler	Adsorption*
	nM	RU	RU	%	RU	RU	%
RCAI	10000	5836	38	128	3507	87	152
RCAI	5000	5537	80	121	3227	202	146
SA	500	108	4	17	5	13	3
WGA	500	109	24	8	-31	34	-3
BSA	500	150	8	12	-41	7	-4
PNA	500	316	18	16	-4	1	0

5.7.13 PG_{10.000}(TAA)_{1%}(Gal)_{6%}-Beschichtung

Der Chip GS01 wurde dreimal vermessen. Zur Unterscheidung wurden die verschiedenen Messungen mit römischen Ziffern nummeriert. Bei der ersten Messung wurde mit einer anderen Fibrinogenkonzentration (1 mg/ml) gemessen. Desweiteren befand sich bei den Doppelbestimmungen von WGA, blockierter PNA und PNA Luft im System.

GS01 I : PG_{10.000}(TAA)_{1%}(Gal)_{6%} Beschichtung						
Protein	Ass _{max}	Standardfehler	Adsorption*	Diss _{min}	Standardfehler	Adsorption*
[100 nM]	RU	RU	%	RU	RU	%
Fib [1mg/ml]	1091	179	31	783	155	22
WGA	116		7	-12		-1
bl PNA	1064		37	335		15
PNA	1313		47	624		28

Die zweite Messung dieses Chips erfolgte nach vier Wochen. Die Lagerung erfolgte unter Argon im Kühlschrank. Es wurden die Proteine der Charge IV verwendet.

GS01 II: PG_{10.000}(TAA)_{1%}(Gal)_{6%} Beschichtung						
Protein	Ass _{max}	Standardfehler	Adsorption*	Diss _{min}	Standardfehler	Adsorption*
[100 nM]	RU	RU	%	RU	RU	%
SA	107	2	6	61	7	5
Fib	989	21	28	909	35	26
WGA	350	7	20	61	4	4
bl PNA	558	10	19	62	0	3
PNA	340	6	12	135	2	6

Die dritte Messung erfolgte ca. acht Wochen nach Herstellung des Chips mit Proteinen der Charge V im Vergleich zu alten Proteinen der Firma Vector.

GS01 III: PG_{10.000}(TAA)_{1%}(Gal)_{6%} Beschichtung						
Protein	Ass _{max}	Standard- fehler	Adsorption*	Diss _{min}	Standard- fehler	Adsorption*
[100 nM]	RU	RU	%	RU	RU	%
SA	30	5	2	49	4	4
Fib	1312	47	37	1289	55	37
WGA	272	6	16	77	6	5
bl PNA SiAl	1043	8	36	545	6	25
bl PNA SiAl [50 nM]	1367	1	47	647	15	29
bl PNA Vec	932	21	32	358	0	16
PNA SiAl	1692	14	60	610	8	27
PNA SiAl [50 nM]	928	24	33	455	17	20
PNA Vec	490	11	18	343	6	15

Für den Chip GS15 erhielten wir für alle Proteine leicht abfallende Basislinien.

GS15 : PG_{10.000}(TAA)_{1%}(Gal)_{6%} Beschichtung						
Protein	Ass _{max}	Standard- fehler	Adsorp- tion*	Diss _{min}	Standard- fehler	Adsorp- tion*
[100 nM]	RU	RU	%	RU	RU	%
SA	74	12	4	-22	2	-2
Fib	14	16	0	-45	13	-1
WGA	90	2	5	-2	7	0
bl PNA	618	4	21	2	9	0
PNA	305	3	11	53	9	2

GS39: PG_{10.000}(TAA)_{1%}(Gal)_{6%} Beschichtung							
Protein	Konzent- ration	Ass. max.	Standard- fehler	Adsorp- tion*	Diss. min.	Standard- fehler	Adsorp- tion*
	nM	RU	RU	%	RU	RU	%
PNA	1000	15299	303	547	11243	257	506
PNA	500	9152	1187	327	3921	955	176
PNA	250	301	88	11	32	31	1
PNA	100	57	3	2	-83	22	-4

GS44: PG_{10.000}(TAA)_{1%}(Gal)_{6%} Beschichtung							
Protein	Konzent- ration	Ass. max.	Standard- fehler	Adsorp- tion*	Diss. min.	Standard- fehler	Adsorp- tion*
	nM	RU	RU	%	RU	RU	%
BSA	500	140	13	11	-66	14	-7
WGA	500	88	38	6	-68	16	-7
SA	500	96	34	15	-44	7	-31
RCAI	10000	15144	356	332	13602	724	589
RCAI	5000	13848	76	324	12341	96	559

5.7.14 PG_{10.000}(TAA)_{1%}(Gal)_{15%}-Beschichtung

GS16: PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{15%} Beschichtung						
Protein	Ass _{max}	Standardfehler	Adsorption*	Diss _{min}	Standardfehler	Adsorption*
[100 nM]	RU	RU	%	RU	RU	%
SA	85	8	5	1	3	0
Fib	84	0	2	44	6	1
WGA	93	8	5	5	3	0
bl PNA	483	3	17	33	9	2
PNA	163	7	6	9	4	0

GS40: PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{15%} Beschichtung							
Protein	Konzentration	Ass. max.	Standardfehler	Adsorption*	Diss. min.	Standardfehler	Adsorption*
	nM	RU	RU	%	RU	RU	%
PNA	1000	4054	411	145	1768	183	80
PNA	500	1141	170	41	270	32	12
PNA	250	229	59	8	9	24	0
PNA	100	37	3	1	-76	17	-3

GS46: PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{15%} Beschichtung							
Protein	Konzentration	Ass. max.	Standardfehler	Adsorption*	Diss. min.	Standardfehler	Adsorption*
	nM	RU	RU	%	RU	RU	%
RCAI	5000	11360	562	267	1768	183	80
SA	500	1141	170	181	270	32	190
WGA	500	229	59	16	9	24	2
PNA	500	37	3	2	-76	17	-6

Die SA-Werte auf GS46 sind so hoch weil alle Werte hier auf die HDT-Referenz von GS45 referenziert sind. Hier war die SA-Adsorption sehr auffällig verlaufen und hatte einen niedriges Diss_{min} von 142 geliefert.

5.7.15 PG_{10.000}(TAA)_{1%}(Gal)_{x%} mit PG_{10.000}(TA)_{1%} gemischt

GS36: PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{6%} : PG _{10.000} (TA) _{1%} 1:3 Beschichtung							
Protein	Konzentration	Ass. max.	Standardfehler	Adsorption*	Diss. min.	Standardfehler	Adsorption*
	nM	RU	RU	%	RU	RU	%
PNA	1000	5018	322	179	3022	211	136
PNA	500	2398	290	86	1268	182	57
PNA	250	311	68	11	9	11	0

GS41: PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{6%} : PG _{10.000} (TA) _{1%} 1:10 Beschichtung							
Protein	Konzentration	Ass. max.	Standardfehler	Adsorption*	Diss. min.	Standardfehler	Adsorption*
	nM	RU	RU	%	RU	RU	%
RCAI	10000	2062	8	0	972,5	57,8	42
RCAI	5000	1292	92	2	638,6	58,5	29
RCAI	2500	611	42	1	295,7	1,5	13
RCAI	1000	295	23	1	78,1	4,4	4
PNA	1000	619	64,8	3	124,25	12,75	10
PNA	500	349	45,75	18	7,65	10,45	1
PNA	250	307	18,85	16	3,15	5,75	0
PNA	100	395	27,25	20	32,95	2,65	3

GS43: PG _{10.000} (TAA) _{1%} (Gal) _{15%} : PG _{10.000} (TA) _{1%} 1:10 Beschichtung							
Protein	Konzentration	Ass. max.	Standardfehler	Adsorption*	Diss. min.	Standardfehler	Adsorption*
	nM	RU	RU	%	RU	RU	%
SA	1000	204	4	12	11	10	1
Fib	500	209	46	6	100	22	3
BSA	250	18	14	3	-18	2	-3
PNA	100	182	8	6	0	4	0
WGA	1000	-79	4	-5	-115	8	-8
RCAI	5000	906	35		345	21	

5.7.16 PG_{10.000}(COOH)_{10%}-Beschichtung

GS03 : PG _{10.000} (COOH) _{10%} Beschichtung						
Protein	Ass _{max}	Standardfehler	Adsorption*	Diss _{min}	Standardfehler	Adsorption*
[100 nM]	RU	RU	%	RU	RU	%
Fib	164	11	5	84	13	2
WGA	440	6	25	121	9	8
bI PNA	790	16	27	132	5	6
PNA	650	5	23	139	15	6

6 LITERATUR

- [1] F. A. Quioco, *Pure Appl. Chem.* **1989**, *61*, 1293-1306.
- [2] aJ. Del Bene, J. A. Pople, *J. Chem. Phys.* **1970**, *52*, 4858-4866; bJ. E. Del Bene, J. A. Pople, *J. Chem. Phys.* **1973**, *58*, 3605-3608; cG. A. Jeffrey, L. Lewis, *Carbohydr. Res.* **1978**, *60*, 179-182.
- [3] K. Stierand, P. C. Maaß, M. Rarey, *Bioinformatics* **2006**, *22*, 1710-1716.
- [4] aF. A. Quioco, N. K. Vyas, *Nature* **1984**, *310*, 381-386; bF. A. Quioco, *Annu. Rev. Biochem.* **1986**, *55*, 287-315.
- [5] J.L. Moreland, A. Gramada, O.V. Buzko, Q. Zhang, P. E. Bourne, *BMC Bioinformatics* **2005**, *6*, 21.
- [6] E. Fischer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1894**, *27*, 2985-2993.
- [7] aE. Goldsmith, R. J. Fletterick, *Pure Appl. Chem.* **1983**, *55*, 577-588; bP. J. McLaughlin, D. I. Stuart, H. W. Klein, N. G. Oikonomakos, L. N. Johnson, *Biochemistry* **1984**, *23*, 5862-5873; cL. N. Johnson, E. A. Stura, S. P. Sansom, Y. S. Babu, *Biochem. Soc. Trans.* **1983**, *11*, 142-144; dC. C. F. Blake, L. N. Johnson, G. A. Mair, A. C. T. North, D. C. Phillips, V. R. Sarma, *Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences* **1967**, *167*, 378-388.
- [8] aC. M. Anderson, R. E. Stenkamp, T. A. Steitz, *Journal of Molecular Biology* **1978**, *123*, 15-33; bC. M. Anderson, F. H. Zucker, T. A. Steitz, *Science* **1979**, *204*, 375-380; cW. S. Bennett Jr, T. A. Steitz, *Journal of Molecular Biology* **1980**, *140*, 183-209.
- [9] aW. Bergthaller, J. Hollmann, in *Comprehensive Glycoscience* (Ed.: P. K. Editor-in-Chief: Johannis), Elsevier, Oxford, **2007**, pp. 579-612; bY. Yao, in *Comprehensive Glycoscience* (Ed.: P. K. Editor-in-Chief: Johannis), Elsevier, Oxford, **2007**, pp. 765-787.
- [10] H. Höfte, M. Gonneau, S. Vernhettes, in *Comprehensive Glycoscience* (Ed.: P. K. Editor-in-Chief: Johannis), Elsevier, Oxford, **2007**, pp. 737-763.
- [11] S. Tokura, H. Tamura, in *Comprehensive Glycoscience* (Ed.: P. K. Editor-in-Chief: Johannis), Elsevier, Oxford, **2007**, pp. 449-475.
- [12] T. K. Lindhorst, *Chem. Unserer Zeit* **2000**, *34*, 38-52.
- [13] H. Paulsen, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 851-867.
- [14] E. Samain, in *Comprehensive Glycoscience* (Ed.: P. K. Editor-in-Chief: Johannis), Elsevier, Oxford, **2007**, pp. 923-947.
- [15] A. Kobata, in *Comprehensive Glycoscience* (Ed.: P. K. Editor-in-Chief: Johannis), Elsevier, Oxford, **2007**, pp. 39-72.
- [16] J. Montreuil, *Pure Appl. Chem.* **1975**, *42*, 431-477.
- [17] aA. D. McNaught, *Pure Appl. Chem.* **1996**, *68*, 1919-2008; b, *Vol. 2012*, USA Consortium for Functional Glycomics **2012**.
- [18] D. J. Harvey, A. H. Merry, L. Royle, M. P. Campbell, R. A. Dwek, P. M. Rudd, *Proteomics* **2009**, *9*, 3796-3801.
- [19] aH. Schachter, *Biochemistry and Cell Biology* **1986**, *64*, 163-181; bR. Kornfeld, S. Kornfeld, *Annu. Rev. Biochem.* **1985**, *54*, 631-664.
- [20] R. A. Dwek, *Chemical Reviews* **1996**, *96*, 683-720.
- [21] E. L. Stern, B. Lindahl, L. Rodén, *J. Biol. Chem.* **1971**, *246*, 5707-5715.

- [22] J. Montreuil, in *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., Vol. Volume 37* (Eds.: R. S. Tipson, H. Derek), Academic Press, **1980**, pp. 157-223.
- [23] J. D. Esko, U. Lindahl, *The Journal of Clinical Investigation* **2001**, *108*, 169-173.
- [24] K. Sugahara, T. Mikami, T. Uyama, S. Mizuguchi, K. Nomura, H. Kitagawa, *Current Opinion in Structural Biology* **2003**, *13*, 612-620.
- [25] A. Pusztai, S. Bardocz, author_in_Japanese, *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* **1996**, *8*, 149-165.
- [26] H. Rüdiger, *Chem. Unserer Zeit* **1981**, *15*, 155-162.
- [27] K. Drickamer, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 9557-9560.
- [28] Y. C. Lee, R. T. Lee, *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 321-327.
- [29] A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. R. Bertozzi, G. W. Hart, M. E. Etzler, *Essentials of Glycobiology*, 2nd edition ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY), **2009**.
- [30] K. Drickamer, *Current Opinion in Structural Biology* **1993**, *3*, 393-400.
- [31] K. Drickamer, M. E. Taylor, *Annu. Rev. Cell Biol.* **1993**, *9*, 237-264.
- [32] A. N. Zelensky, J. E. Gready, *FEBS Journal* **2005**, *272*, 6179-6217.
- [33] S. H. Barondes, D. N. W. Cooper, M. A. Gitt, H. Leffler, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 20807-20810.
- [34] M. T. Elola, C. Wolfenstein-Todel, M. F. Troncoso, G. R. Vasta, G. A. Rabinovich, *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, *64*, 1679-1700.
- [35] H. Lis, N. Sharon, *Chemical Reviews* **1998**, *98*, 637-674.
- [36] F. Pricci, G. Leto, L. Amadio, C. Iacobini, G. Romeo, S. Cordone, R. Gradini, P. Barsotti, F.-T. Liu, U. Di Mario, G. Pugliese, *Kidney Int., Suppl.* **2000**, *77*, S31-S39.
- [37] T. K. Dam, C. F. Brewer, *Chemical Reviews* **2002**, *102*, 387-430.
- [38] I. Shin, S. Park, M.-r. Lee, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 2894-2901.
- [39] S. R. S. Ting, G. Chen, M. H. Stenzel, *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 1392-1412.
- [40] J. J. Lundquist, E. J. Toone, *Chemical Reviews* **2002**, *102*, 555-578.
- [41] aW. G. T. Willats, S. E. Rasmussen, T. Kristensen, J. D. Mikkelsen, J. P. Knox, *Proteomics* **2002**, *2*, 1666-1671; bD. Wang, S. Liu, B. J. Trummer, C. Deng, A. Wang, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 275-281.
- [42] aS. Park, M.-r. Lee, S.-J. Pyo, I. Shin, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10794; bS. Park, I. Shin, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 3180-3182.
- [43] M. Schwarz, L. Spector, A. Gargir, A. Shtevi, M. Gortler, R. T. Altstock, A. A. Dukler, N. Dotan, *Glycobiology* **2003**, *13*, 749-754.
- [44] M. Köhn, R. Wacker, C. Peters, H. Schröder, L. Soulère, R. Breinbauer, C. M. Niemeyer, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 6010-6014.
- [45] B. T. Houseman, M. Mrksich, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 443-454.
- [46] F. Fazio, M. C. Bryan, O. Blixt, J. C. Paulson, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14397-14402.
- [47] T. Feizi, M. S. Stoll, C.-T. Yuen, W. Chai, A. M. Lawson, in *Methods in Enzymology, Vol. Volume 230* (Ed.: G. W. H. William J. Lennarz), Academic Press, **1994**, pp. 484-519.

- [48] aS. Fukui, T. Feizi, C. Galustian, A. M. Lawson, W. Chai, *Nat Biotech* **2002**, *20*, 1011-1017; bT. Feizi, W. Chai, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2004**, *5*, 582-588.
- [49] aM.-r. Lee, I. Shin, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4269-4272; bS. Park, M.-R. Lee, I. Shin, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 155-162.
- [50] aB. G. Davis, M. A. Robinson, *Curr Opin Drug Discov Devel* **2002**, *5*, 279-288; bM. Monsigny, A.-C. Roche, P. Midoux, R. Mayer, *Advanced Drug Delivery Reviews* **1994**, *14*, 1-24; cM. S. Wadhwa, K. G. Rice, *Journal of Drug Targeting* **1995**, *3*, 111-127.
- [51] D. E. Levy, P. Fügedi, *The Organic Chemistry of Sugars*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, **2005**.
- [52] H. M. Berman, S. S. C. Chu, G. A. Jeffrey, *Science* **1967**, *157*, 1576-1577.
- [53] R. U. Lemieux, K. B. Hendriks, R. V. Stick, K. James, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 4056-4062.
- [54] L. K. Mydock, A. V. Demchenko, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 497-510.
- [55] A. Michael, *Am. Chem. J.* **1879**, *1*, 305-312.
- [56] W. Koenigs, E. Knorr, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1901**, *34*, 957-981.
- [57] aE. Fischer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1893**, *26*, 2400-2412; bE. Fischer, L. Beensch, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1894**, *27*, 2478-2486; cE. Fischer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1895**, *28*, 1145-1167.
- [58] S. Bernstein, R. B. Conrow, *The Journal of organic chemistry* **1971**, *36*, 863-870.
- [59] K. Bock, M. Meldal, *Acta Chem. Scand., Ser. B* **1983**, *37*, 775-783.
- [60] T. Ogawa, M. Matsui, *Carbohydr. Res.* **1976**, *51*, C13-C18.
- [61] D. Mukherjee, P. Kumar Ray, U. Sankar Chowdhury, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 7701-7704.
- [62] C. H. Hamann, H. Polligkeit, P. Wolf, Z. Smiatacz, *Carbohydr. Res.* **1994**, *265*, 1-7.
- [63] M. Niahizawa, Y. Kan, H. Yamada, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 4597-4598.
- [64] W. G. Dauben, P. Köhler, *Carbohydr. Res.* **1990**, *203*, 47-56.
- [65] B. Helferich, E. Schmitz-Hillebrecht, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1933**, *66*, 378-383.
- [66] aR. U. Lemieux, W. P. Shyluk, *Can. J. Chem.* **1953**, *31*, 528-535; bS. Hanessian, J. Banoub, *Carbohydr. Res.* **1977**, *53*, C13-C16.
- [67] aG. Zemplén, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1929**, *62*, 985-990; bM. Kiso, L. Anderson, *Carbohydr. Res.* **1979**, *72*, C12-C14; cM. Kiso, L. Anderson, *Carbohydr. Res.* **1979**, *72*, C15-C17; dL. M. Lerner, *Carbohydr. Res.* **1990**, *207*, 138-141.
- [68] aG. Magnusson, G. Noori, J. Dahmen, T. Frejd, T. Lave, *Acta Chem. Scand., Ser. B* **1981**, *B35*, 213-216; bJ. Dahmén, T. Frejd, G. Magnusson, G. Noori, *Carbohydr. Res.* **1983**, *114*, 328-330.
- [69] aT. Ogawa, K. Beppu, S. Nakabayashi, *Carbohydr. Res.* **1981**, *93*, C6-C9; bH. Paulsen, M. Paal, *Carbohydr. Res.* **1984**, *135*, 53-69.
- [70] H. Yamada, T. Hayashi, *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 581-585.
- [71] R. R. Schmidt, J. Michel, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1980**, *19*, 731-732.
- [72] aR. R. Schmidt, *Angew. Chem.* **1986**, *98*, 213-236; bR. R. Schmidt, M. Stumpp, *Liebigs Ann. Chem.* **1984**, *1984*, 680-691; cR. R. Schmidt, J. Michel, *J. Carbohydr. Chem.* **1985**, *4*, 141-169.
- [73] aR. R. Schmidt, G. Grundler, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1982**, *21*, 781-782; bG. Grundler, R. R. Schmidt, *Liebigs Ann. Chem.* **1984**, 1826-1847.

-
- [74] aK. C. Nicolaou, H. J. Mitchell, F. L. van Delft, F. Rübsam, R. M. Rodríguez, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, *37*, 1871-1874; bK. C. Nicolaou, H. J. Mitchell, N. F. Jain, N. Winssinger, R. Hughes, T. Bando, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, *38*, 240-244.
- [75] G. Wedler, *Lehrbuch der Physikalischen Chemie*, 4.te ed., Wiley-VCH, Weinheim, **1997**.
- [76] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 5.te ed., Thieme, Stuttgart; New York, **1995**.
- [77] N. J. Emptage, *Current Opinion in Pharmacology* **2001**, *1*, 521-525.
- [78] T. Förster, *Ann. der Physik* **1948**, *6*, 55-75.
- [79] S. Vogel Steven, C. Thaler, V. Koushik Srinagesh, *Sci. STKE* **2006**, *2006*, re2.
- [80] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3.rd ed., Springer US, **2006**.
- [81] R. M. Clegg, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1995**, *6*, 103-110.
- [82] A. R. Clapp, I. L. Medintz, J. M. Mauro, B. R. Fisher, M. G. Bawendi, H. Mattoussi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 301-310.
- [83] J. R. Lakowicz, I. Gryczynski, W. Wiczk, G. Laczko, F. C. Prendergast, M. L. Johnson, *Biophysical Chemistry* **1990**, *36*, 99-115.
- [84] M. Miki, T. Iio, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 7101-7106.
- [85] Q. Xu, W. J. Brecht, K. H. Weisgraber, R. W. Mahley, Y. Huang, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 25511-25516.
- [86] E. Haas, *ChemPhysChem* **2005**, *6*, 858-870.
- [87] V. Ratner, M. Sinev, E. Haas, *Journal of Molecular Biology* **2000**, *299*, 1363-1371.
- [88] R. Clapp Aaron, L. Medintz Igor, H. Mattoussi, *ChemPhysChem* **2006**, *7*, 47-57.
- [89] C. R. Kagan, C. B. Murray, M. Nirmal, M. G. Bawendi, *Physical Review Letters* **1996**, *76*, 1517-1520.
- [90] D. M. Willard, L. L. Carillo, J. Jung, A. Van Orden, *Nano Letters* **2001**, *1*, 469-474.
- [91] P. R. Selvin, *Nat Struct Mol Biol* **2000**, *7*, 730-734.
- [92] I. Bugiel, K. König, H. Wabnitz, *Lasers in the Life Sciences* **1989**, *3*, 47-53.
- [93] A. H. A. Clayton, Q. S. Hanley, D. J. Arndt-Jovin, V. Subramaniam, T. M. Jovin, *Biophys. J.* **2002**, *83*, 1631-1649.
- [94] E. A. Jares-Erijman, T. M. Jovin, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1387-1395.
- [95] P. C. Weber, D. H. Ohlendorf, J. J. Wendoloski, F. R. Salemme, *Science* **1989**, *243*, 85-88.
- [96] C. Siegers, M. Biesalski, R. Haag, *Chemistry – A European Journal* **2004**, *10*, 2831-2838.
- [97] B. S. Sumerlin, N. V. Tsarevsky, G. Louche, R. Y. Lee, K. Matyjaszewski, *Macromolecules* **2005**, *38*, 7540-7545.
- [98] B. Roy, B. Mukhopadhyay, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 3783-3787.
- [99] A. M. Oliveira, M. T. Barros, A. M. Martins, M. A. R. Cabral, A. A. Dias, M. L. Costa, M. H. Cabral, A. M. C. Moutinho, K. R. Jennings, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1999**, *13*, 559-561.
- [100] Y. Li, J. N. Hoskins, S. G. Sreerama, S. M. Grayson, *Macromolecules* **2010**, *43*, 6225-6228.
- [101] E. Altuntaş, K. Knop, L. Tauhardt, K. Kempe, A. C. Crecelius, M. Jäger, M. D. Hager, U. S. Schubert, *Journal of Mass Spectrometry* **2012**, *47*, 105-114.
-

- [102] J. E. Berlier, A. Rothe, G. Buller, J. Bradford, D. R. Gray, B. J. Filanoski, W. G. Telford, S. Yue, J. Liu, C.-Y. Cheung, W. Chang, J. D. Hirsch, J. M. Beechem, Rosaria P. Haugland, R. P. Haugland, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **2003**, *51*, 1699-1712.
- [103] A. Mishra, R. K. Behera, P. K. Behera, B. K. Mishra, G. B. Behera, *Chemical Reviews* **2000**, *100*, 1973-2011.
- [104] M. Klessinger, *Chem. Unserer Zeit* **1978**, *12*, 1-11.
- [105] mivenionGmbH.
- [106] K. Licha, B. Riefke, V. Ntziachristos, A. Becker, B. Chance, W. Semmler, *Photochemistry and Photobiology* **2000**, *72*, 392-398.
- [107] R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillissen, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1927-1930.
- [108] C. A. G. N. Montalbetti, V. Falque, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827-10852.
- [109] V. D. Bock, H. Hiemstra, J. H. van Maarseveen, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 51-68.
- [110] *European Journal of Biochemistry* **1984**, *138*, 9-37.
- [111] K. Augustyns, W. Kraas, G. Jung, *J. Pept. Res.* **1998**, *51*, 127-133.
- [112] A. Sunder, R. Hanselmann, H. Frey, R. Mülhaupt, *Macromolecules* **1999**, *32*, 4240-4246.
- [113] aS. Roller, H. Zhou, R. Haag, *Molecular Diversity* **2005**, *9*, 305-316; bK. J. Haxton, H. M. Burt, *Dalton Transactions* **2008**, 5872-5875.
- [114] A. Kisanuki, Y. Kimpara, Y. Oikado, N. Kado, M. Matsumoto, K. Endo, *J. Polym. Sci., Part A Polym. Chem.* **2010**, *48*, 5247-5253.
- [115] J. N. Lee, C. Park, G. M. Whitesides, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 6544-6554.
- [116] aM. Kotke, P. R. Schreiner, *Tetrahedron* **2005**, *62*, 434-439; bH. Y. Kim, K. Oh, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 1306-1309.
- [117] C. M. Kleiner, P. R. Schreiner, *Chem. Commun.* **2006**, *0*, 4315-4317.
- [118] S. K. Natchiar, O. Srinivas, N. Mitra, A. Surolia, N. Jayaraman, M. Vijayan, *Acta Crystallographica Section D* **2006**, *62*, 1413-1421.
- [119] D. Schwefel, C. Maierhofer, J. G. Beck, S. Seeberger, K. Diederichs, H. M. Moeller, W. Welte, V. Wittmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8704-8719.
- [120] E. D. Green, R. M. Brodbeck, J. U. Baenziger, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 12030-12039.
- [121] R. R. Townsend, E. Hilliker, Y. T. Li, R. A. Laine, W. R. Bell, Y. C. Lee, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 9704-9710.
- [122] K. A. Majorek, P. J. Porebski, A. Dayal, M. D. Zimmerman, K. Jablonska, A. J. Stewart, M. Chruszcz, W. Minor, *Molecular Immunology* **2012**, *52*, 174-182.
- [123] aK. J. Neurohr, N. M. Young, H. H. Mantsch, *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 9205-9209; bR. Banerjee, K. Das, R. Ravishankar, K. Suguna, A. Surolia, M. Vijayan, *Journal of Molecular Biology* **1996**, *259*, 281-296; cR. Lotan, N. Sharon, in *Methods in Enzymology, Vol. Volume 50* (Ed.: G. Victor), Academic Press, **1978**, pp. 361-367.
- [124] J. M. Kollman, L. Pandi, M. R. Sawaya, M. Riley, R. F. Doolittle, *Biochemistry* **2009**, *48*, 3877-3886.
- [125] E. Ostuni, R. G. Chapman, M. N. Liang, G. Meluleni, G. Pier, D. E. Ingber, G. M. Whitesides, *Langmuir* **2001**, *17*, 6336-6343.
- [126] aJ. W. Evans, *Reviews of Modern Physics* **1993**, *65*, 1281-1329; bX. Jin, N. H. L. Wang, G. Tarjus, J. Talbot, *The Journal of Physical Chemistry* **1993**, *97*, 4256-4258.
- [127] J. Lahiri, L. Isaacs, J. Tien, G. M. Whitesides, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 777-790.

- [128] E. Ostuni, B. A. Grzybowski, M. Mrksich, C. S. Roberts, G. M. Whitesides, *Langmuir* **2003**, *19*, 1861-1872.
- [129] E. Stenberg, B. Persson, H. Roos, C. Urbaniczky, *Journal of Colloid and Interface Science* **1991**, *143*, 513-526.
- [130] M. L. Quillin, B. W. Matthews, *Acta Crystallographica Section D* **2000**, *56*, 791-794.
- [131] A. M. Wu, J. H. Wu, T. Singh, L.-J. Lai, Z. Yang, A. Herp, *Molecular Immunology* **2006**, *43*, 1700-1715.
- [132] S. Knecht, D. Ricklin, A. N. Eberle, B. Ernst, *Journal of Molecular Recognition* **2009**, *22*, 270-279.
- [133] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *The Journal of Organic Chemistry* **1997**, *62*, 7512-7515.
- [134] T. K. Lindhorst, *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 2 ed., WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2003**.
- [135] M. U. Roslund, K. D. Klika, R. L. Lehtilae, P. Tahtinen, R. Sillanpää, R. Leino, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 18-25.
- [136] W. Pilgrim, P. V. Murphy, *The Journal of Organic Chemistry* **2010**, *75*, 6747-6755.
- [137] H. Cheng, X. Cao, M. Xian, L. Fang, T. B. Cai, J. J. Ji, J. B. Tunac, D. Sun, P. G. Wang, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 645-652.
- [138] aJ. A. F. Joosten, V. Loimaranta, C. C. M. Appeldoorn, S. Haataja, F. A. El Maate, R. M. J. Liskamp, J. Finne, R. J. Pieters, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 6499-6508; bH. Yu, H. Chokhawala, R. Karpel, H. Yu, B. Wu, J. Zhang, Y. Zhang, Q. Jia, X. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17618-17619.
- [139] E. Arranz-Plaza, A. S. Tracy, A. Siriwardena, J. M. Pierce, G.-J. Boons, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 13035-13046.
- [140] M. Dowlut, D. G. Hall, O. Hindsgaul, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 9809-9813.
- [141] J.-L. Débieux, A. Cosandey, C. Helgen, C. G. Bochet, *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, *2007*, 2073-2077.
- [142] aB. Coxon, *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 1714-1721; bT. D. Inch, J. R. Plimmer, H. G. Fletcher, Jr., *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 1825-1830; cS. Knapp, R. A. Huhn, B. Amorelli, *Org. Synth.* **2007**, *84*, 68-76.
- [143] N. Pravdić, I. Franjić-Mihalić, B. Danilov, *Carbohydr. Res.* **1975**, *45*, 302-306.
- [144] I. Choudhury, N. Minoura, H. Uzawa, *Carbohydr. Res.* **2003**, *338*, 1265-1270.
- [145] W. Hayes, H. M. I. Osborn, S. D. Osborne, R. A. Rastall, B. Romagnoli, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 7983-7996.
- [146] C. S. Hudson, J. M. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.* **1915**, *37*, 1270-1275.
- [147] R. Sardzik, G. T. Noble, M. J. Weissenborn, A. Martin, S. J. Webb, S. L. Flitsch, *Beilstein J. Org. Chem.* **2010**, *6*, No 81, No pp given, No 81.
- [148] L. F. Tietze, H. J. Schuster, B. Krewer, I. Schuberth, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 537-543.
- [149] P.-C. Lin, S.-H. Ueng, S.-C. Yu, M.-D. Jan, A. K. Adak, C.-C. Yu, C.-C. Lin, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2131-2134.
- [150] V. Ladmiral, G. Mantovani, G. J. Clarkson, S. Cauet, J. L. Irwin, D. M. Haddleton, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4823-4830.
- [151] D. Quemener, T. P. Davis, C. Barner-Kowollik, M. H. Stenzel, *Chem. Commun.* **2006**, 5051-5053.

- [152] J. Budhathoki-Uprety, B. M. Novak, *Macromolecules* **2011**, *44*, 5947-5954.
- [153] M. van Dijk, M. L. Nollet, P. Weijers, A. C. Dechesne, C. F. n. van Nostrum, W. E. Hennink, D. T. S. Rijkers, R. M. J. Liskamp, *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 2834-2843.
- [154] E. Ostuni, R. G. Chapman, R. E. Holmlin, S. Takayama, G. M. Whitesides, *Langmuir* **2001**, *17*, 5605-5620.