

Vom Glycochip zur lebenden Zelle – Studien zu Infektions- und Tumor-relevanten Kohlenhydrat- Erkennungsprozessen



Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Diplom-Chemikerin

Elisabeth Memmel

aus Oberfladungen

Würzburg 2015

eingereicht bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie
am: 09.02.2015

Gutachter der schriftlichen Arbeit

1. Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Seibel
2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Lorenz Meinel

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums

1. Prüfer: Prof. Dr. Jürgen Seibel
2. Prüfer: Prof. Dr. Dr. Lorenz Meinel
3. Prüfer: Prof. Dr. Markus Sauer

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums: 14.07.2015

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 2009 bis Oktober 2014 am Institut für Organische Chemie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter Anleitung von Herrn Professor Dr. Jürgen Seibel angefertigt.

Teile der Arbeit wurden bereits veröffentlicht in

J. Seibel, S. König, A. Göhler, S. Doose, E. Memmel, N. Bertleff, M. Sauer, „Investigating infection processes with a workflow from organic chemistry to biophysics: the combination of metabolic glycoengineering, super-resolution fluorescence imaging and proteomics“, *Expert Rev. Proteomics* **2013**, *10*, 25-31.

E. Memmel, A. Homann, T. A. Oelschlaeger, J. Seibel, „Metabolic glycoengineering of *Staphylococcus aureus* reduces its adherence to human T24 bladder carcinoma cells“, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 7301-7303.

S. Bank, E. Heller, E. Memmel, J. Seibel, U. Holzgrabe, P. Kapková, „Matrix-assisted laser desorption ionization tandem mass spectrometry of *N*-glycans derivatized with isonicotinic hydrazide and its biotinylated form“, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2014**, *28*, 1745-1756.

S. Letschert, A. Göhler, C. Franke, N. Bertleff-Zieschang, E. Memmel, S. Doose, J. Seibel, M. Sauer, „Super-Resolution Imaging of Plasma Membrane Glycans“, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, *53*, 10921-10924; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 11101-11104.

D. Claes, E. Memmel, M. Holzapfel, J. Seibel, W. Maison, „High-Affinity Carbohydrate Binding by Trimeric Benzoboroxoles Measured on Carbohydrate Arrays“, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 2450-2457.

E. Memmel, J. Seibel, „Metabolic Engineering of Bacteria“ in *Proceedings of the 3rd Beilstein Glyco-Bioinformatics Symposium 2013* (Herausgeber M. G. Hicks, C. Kettner, P. Seeberger), Beilstein Institut, Frankfurt/Main **2014**, 1-9.

C. Fleck, E. Memmel, M. Fölsing, B. Poll, T. Hackl, J. Seibel, W. Maison, „Synthesis and evaluation of neoglycoconjugates based on adamantyl scaffolds“ *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, DOI: 10.1002/ejoc.201403517.

weitere Veröffentlichungen

E. Memmel, J. Seibel, „Zuckersüß und richtig wichtig“, *Nachr. Chem.* **2013**, *12*, 1207-1211.

G. Jarre, S. Heyer, E. Memmel, T. Meinhardt, A. Krueger, „Synthesis of nanodiamond derivatives carrying amino functions and quantification by a modified Kaiser test“, *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 2729-2737.

Poster und Tagungsbeiträge

E. Memmel, A. Homann, R. Qamar, J. Seibel, T. Ölschläger, „Synthetic metabolic glycoengineering for cell surface imaging“, EMBO Chemical Biology, Heidelberg **2010**, Poster 144.

E. Memmel, A. Homann, R. Qamar, T. Ölschläger, J. Seibel, „Synthetic metabolic glycoengineering for cell surface imaging“, 6th Joint Ph.D. Students Meeting (SFB 766, SFB 630 & SFB 544), Ellwangen **2010**, Poster 21 und Kurzvortrag.

E. Memmel, A. Homann, R. Qamar, T. Ölschläger, J. Seibel, „Synthetic metabolic glycoengineering for cell surface imaging“, Chem-SyStM, Würzburg **2010**, Poster 98.

E. Memmel, J. Seibel, „LUX AURUMQUE – Chip Technology targeting the Glycome“, Chem-SyStM, Würzburg **2012**, Poster 84.

E. Memmel, A. Göhler, M. Sauer, T. A. Oelschlaeger, J. Seibel, „Taking a Close View on Sticky Sweet Surfaces“ (Poster 8) und „breaking news from the cell surface – Live Report by Azi and Alkyny“ (Kurzvortrag), 3rd Beilstein-Symposium on Glyco-Bioinformatics, Potsdam **2013**.

Danksagung

Die Anfertigung der vorliegenden Arbeit wurde mir durch die Integration in ein stark interdisziplinär ausgerichtetes Umfeld und vielfältige Unterstützung ermöglicht.

Besonders danken möchte ich

Prof. Dr. Jürgen Seibel für die Möglichkeit, zahlreiche spannende Projekte zu bearbeiten und dadurch ein breites Spektrum an Techniken aber auch viele neue Arbeitsgruppen und Kooperationspartner kennenzulernen. Er hat mich im gleichen Maße gefördert wie gefordert, dabei stand seine Tür immer offen für wissenschaftliche wie auch weniger wissenschaftliche Diskussionen.

meinen zahlreichen Projekt- und Kooperationspartnern für die spannende Zusammenarbeit und viele anregende Diskussionen. Namentlich erwähnen möchte ich

Dr. Tobias Ölschläger, der mir zeitweise ein eigenes Labor am Institut für Molekulare Infektionsbiologie zur Verfügung stellte – danke für dein Vertrauen. **Anja Troge** und **Marita Bartrow** haben dieses Labor mit Leben gefüllt und mich in die Welt der Zellkultur eingeführt.

Prof. Dr. Sabine Flitsch und **Robert Šardzik** für die freundliche Aufnahme am Manchester Institute of Biotechnology und die Einführung in die Technik der Goldchips und Massenspektrometrie.

Prof. Dr. Markus Sauer, **Dr. Sören Doose**, **Sebastian Letschert**, **Dr. Antonia Göhler** und **Sarah Aufmkolk** für die Faszination, physikalische Grenzen zu über- oder vielmehr zu unterschreiten.

Prof. Dr. Dr. Lorenz Meinel, **Dr. Tessa Lühmann**, **Marcus Gutmann** und **Gabriel Jones**, die mit mir die Möglichkeiten der Clickchemie auf (Zell-) Oberflächen ausloten – unsere Treffen waren immer wieder inspirierend.

Prof. Dr. Wolfgang Maison, **Dr. Dorith Claes** und **Carsten Fleck**, die immer neue spannende Fragen stellen und deren Moleküle ich auf dem Microarray zum Leuchten bringen durfte.

Dr. Petra Kapková und **Dr. Stephanie Bank**, die meinen Glycochips eine zusätzliche Anwendung eröffneten.

Dr. Martin Fraunholz und **Dr. Michaela Faulstich** für ihre offene Art und freundliche Hilfe bei all meinen Fragen und Ideen zu Neisserien und Fluoreszenzmikroskopie.

der **Universität Bayern e.V.** für die finanzielle Unterstützung meiner Promotion.

Jean-Noël Grad, Jimmy Jeske und Christian Possiel, die mich während ihrer Praktika bei der Synthese unterstützten. Danke für euer Interesse und die Motivation, die auch nach zahlreichen Säulenchromatographien ungebrochen war.

Nicolas Oppmann und Michael Fitzner, die mir während ihrer Zeit als Auszubildende in unserer Arbeitsgruppe ebenfalls einige Syntheseschritte abgenommen haben.

Dr. Nadja Bertleff-Zieschang, die mit mir gemeinsam das „Mädels-Labor“ verteidigt hat. Danke für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die zahlreichen Diskussionen bis ins letzte Detail und die vielen guten Tips, vor allem gegen Ende der Arbeit. Besonders im Gedächtnis bleiben mir aber auch die süßen und kreativen Auszeiten, durch die meine Motivation immer wieder nach oben schnellte.

Dr. Matthias Grüne und Elfriede Ruckdeschel für die äußerst kompetente und freundliche Betreuung der NMR-Abteilung.

Dr. Michael Büchner und Fritz Dadrich für die Messung zahlreicher Massenspektren und die Möglichkeit, auch eigenständig am MALDI zu arbeiten.

Renate Memmel und Dr. Michael Grotz für das unermüdliche und akribische Korrekturlesen meiner Arbeit in allen Stadien ihres Entstehens. Danke auch an **Dr. Nadja Bertleff-Zieschang, Dr. Maria Ortiz-Soto, Alexander Mertsch, Tim Walter, Dr. Dorith Claes, Carsten Fleck, Dr. Tessa Lühmann, Gabriel Jones und Sebastian Letschert** für die sorgfältige Korrektur einzelner Kapitel.

dem gesamten AK Seibel für die unvergessliche Zeit und die vielen gemeinsamen Unternehmungen.

Ein besonderer Dank geht schließlich an meine Familie und meinen Freund, die mich immer auffangen und für mich da sind. Danke!

Inhaltsverzeichnis

1 Motivation	1
2 Kenntnisstand	3
2.1 Kohlenhydrate auf Zelloberflächen	3
2.2 Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen	9
2.3 Glycochips	20
2.4 Metabolic Glycoengineering	30
3 Durchführung und Diskussion der Ergebnisse	41
3.1 Zielsetzung und Strukturierung der Projekte	41
3.2 Kohlenhydrate auf artifiziellen Oberflächen: der Glycochip	50
3.2.1 Massenspektrometrische Analytik auf dem Goldchip.....	50
3.2.1.1 Synthese der linkersubstituierten Kohlenhydrate	50
3.2.1.2 Aufbau des SAM und Anbindung der Kohlenhydrate	60
3.2.1.3 Enzymatische Reaktionen auf dem Goldchip.....	64
3.2.2 optische Analytik auf dem Glaschip.....	68
3.2.2.1 Synthese der linkersubstituierten Kohlenhydrate	68
3.2.2.2 Immobilisierung und Detektion der Kohlenhydrate	72
3.2.2.3 Untersuchung von Bindungsprozessen.....	76
3.2.2.4 Weitere Anwendungen der Chips.....	89
3.3 Synthese des Galabiosemotivs	97
3.3.1 Synthese der beiden Galactosebausteine	97
3.3.2 Kupplung zum Disaccharid und Debenzylierung.....	104
3.4 Kohlenhydrate auf Zelloberflächen: Metabolic Glycoengineering.....	108
3.4.1 Synthese der clickbaren Kohlenhydrate	108
3.4.2 Glycoengineering eukaryotischer Zellen.....	111
3.4.3 Glycoengineering prokaryotischer Zellen	115
3.5 Synthese zweier Nitroxolin-Konjugate als Referenzverbindungen.....	118
4 Zusammenfassung	123
5 Summary	137
6 Experimentalteil	151
6.1 allgemeine Arbeits- und Messtechniken.....	151
6.1.1 Geräte und Materialien	151
6.1.2 Lösungsmittel und Chemikalien.....	153
6.1.3 Medien und Puffer	154
6.2 Synthesevorschriften	155
6.2.1 Synthese von Kohlenhydraten zur Konjugation auf dem Goldchip.....	155
6.2.1.1 Benzyl-2-hydroxyethylcarbammat (18).....	155
6.2.1.2 1- <i>O</i> -(2-Aminoethyl)- β -D-glucopyranosid (36).....	158

6.2.1.3 1- <i>O</i> -(2-Aminoethyl)- β -D-galactopyranosid (37).....	160
6.2.1.4 1- <i>O</i> -(2-Aminoethyl)- α -D-mannopyranosid (38)	162
6.2.1.5 2-Acetamido-1- <i>O</i> -(2-aminoethyl)-2-deoxy- β -D-glucopyranosid (39).....	165
6.2.1.6 2-Acetamido-1- <i>O</i> -(2-aminoethyl)-2-deoxy- β -D-galactopyranosid (40)	168
6.2.1.7 1- <i>O</i> -(2-Aminoethyl)-4- <i>O</i> -(β -D-galactopyranosyl)- β -D-glucopyranosid (41)	171
6.2.1.8 1- <i>O</i> -(2-Aminoethyl)-4- <i>O</i> -(α -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosid (42) ...	176
6.2.2 Synthese von Kohlenhydraten zur Konjugation auf dem Glaschip	182
6.2.2.1 1- <i>O</i> -3-(2-Aminoethylthio)-propyl- α -D-mannopyranosid (49) und 1- <i>O</i> -3-(2- Aminoethylthio)-propyl-6-azido-6-deoxy- α -D-mannopyranosid (50).....	182
6.2.2.2 1- <i>O</i> -Allyl- β -D-glucuronsäure (55)	185
6.2.3 Synthese der Galabiose-Derivate	189
6.2.3.1 2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -benzyl-1-deoxy-1-thiophenyl- β -D-galactopyranosid (9)	189
6.2.3.2 1- <i>O</i> -(2-Aminoethyl)-4- <i>O</i> -(α -D-galactopyranosyl)- β -D-galactopyranosid (1)	192
6.2.3.3 1- <i>O</i> -Allyl-4- <i>O</i> -(α -D-galactopyranosyl)- β -D-galactopyranosid (2).....	199
6.2.3.4 1-Azido-1-deoxy-4- <i>O</i> -(α -D-galactopyranosyl)- β -D-galactopyranosid (4).....	204
6.2.3.5 2,3,6-Tri- <i>O</i> -benzyl-4- <i>O</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -benzyl- α -D-galactopyranosyl)-1- <i>O</i> - propargyl- β -D-galactopyranosid (7).....	210
6.2.4 Synthese von Kohlenhydraten für das Metabolic Glycoengineering	214
6.2.4.1 Azidoanaloga	214
6.2.4.2 1- <i>O</i> -Propargyl- β -D-glucuronsäure (82).....	216
6.2.5 Synthese der Nitroxolin-Konjugate	218
6.2.5.1 1- <i>O</i> -(5-Nitrochinolin-8-yl)- β -D-glucuronsäure (16).....	218
6.2.5.2 Kalium-(5-nitrochinolin-8-yl)-sulfat (109).....	220
6.3 Glyochips	221
6.3.1 goldbasierte Chips.....	221
6.3.1.1 SAM-Aufbau und Immobilisierung der Kohlenhydrate	221
6.3.1.2 Enzymatische Reaktionen on-Chip und Sialinsäurestabilisierung.....	221
6.3.1.3 Analytik mittels MALDI-MS	222
6.3.2 glasbasierte Chips	222
6.3.2.1 Immobilisierung von Kohlenhydraten und Proteinen.....	222
6.3.2.2 Affinitätsstudien mit Lectinen	224
6.3.2.3 Affinitätsstudien mit Lectin-Mimetika	225
6.3.2.4 Affinitätsstudien mit Pathogenen.....	225
6.3.2.5 Analyse BINH-modifizierter Glycane	226
6.3.2.6 Click-Reaktion auf dem Chip	226
6.4 Metabolic Glycoengineering.....	227
6.4.1 Glycoengineering von Eukaryoten	227
6.4.2 Glycoengineering von Prokaryoten	227
7 Abkürzungen und Akronyme	229
8 Literaturverzeichnis.....	233
9 Anhang	261

1 Motivation

„Now every species of mammal and bird so far investigated has shown quite a surprising biochemical diversity by serological tests. The antigens concerned seem to be proteins to which polysaccharides are attached. We do not know their functions in the organism, though some of them seem to be part of the structure of the cell membrane. I wish to suggest that they may play a part in disease resistance, a particular race of bacteria or virus being adapted to individuals of a certain range of biochemical constitutions, while those of other constitutions are relatively resistant“ (J. B. S. Haldane, 1949)^[1]

Mit seinen Vermutungen zur Natur der Antigene lag Haldane richtig, nur wenige Jahre später wurden die Blutgruppenantigene als Kohlenhydratstrukturen identifiziert.^[2-3] Inzwischen ist eine Vielzahl weiterer komplexer Glycanstrukturen bekannt, die in großer Fülle auf den Oberflächen von Zellen präsentiert werden.

Sie sind wichtige Erkennungsmotive für verschiedenste Zell-Zell-Interaktionen auf molekularer Ebene. Zu diesen zählen etwa die Kommunikation und Signalübertragung zwischen Zellen eines Organismus, aber auch – hier vermutete Haldane ebenfalls richtig – die Wechselwirkung mit exogenen Organismen wie Bakterien und Viren.

Diese nutzen die Kohlenhydratmotive häufig für eine erste Kontaktaufnahme mit ihrem Wirt. Spezifische Erkennungsproteine, die Adhäsine, sorgen für eine stabile Anhaftung auf dessen Kohlenhydrat-präsentierenden Zellen. Damit ist der erste und gleichzeitig einer der wichtigsten Schritte auf dem Weg zu einer Infektion getan.

Dieser entscheidende Mechanismus wurde in der Infektionsforschung und Entwicklung von Wirkstoffen bisher vernachlässigt, nur langsam setzt sich die Erkenntnis durch, dass auch Bakterien unsere Zucker lieben.^[4]

Insbesondere unter dem Gesichtspunkt zunehmender Antibiotikaresistenzen, auf welche die WHO in einem eigenen Bericht,^[5] die EU sogar mit einem Thementag, dem „*Antibiotics Awareness Day*“ (jährlich am 18. November)^[6] aufmerksam machen, können wir es uns nicht leisten, auf neue schlagkräftige Waffen zu verzichten – alle Möglichkeiten zur Entwicklung neuer Therapien müssen in Betracht gezogen werden. Die Euphorie der Antibiotika-Ära führte zu vorschnellen Aussagen wie „Wir können das Buch der Infektionskrankheiten schließen“ (um 1967).¹ Im Glauben, keinen Bedarf an weiteren Antibiotika zu haben, wurde in den kommenden Jahren die Forschung an Nachfolgern der heute zunehmend unwirksamen Antibiotika nahezu eingestellt, so dass die verstärkte Resistenz vieler Erreger auch gegen die sogenannten Reserveantibiotika, die letzte Verteidigungslinie der klinischen Behandlung, sich zu einem ernsthaften gesellschaftlichen Problem entwickelt hat.

Doch nicht nur Infektionen, auch Krebserkrankungen fordern jedes Jahr mehr Opfer – allein 2012 starben nach Angaben der WHO weltweit rund 8.2 Millionen Menschen an den Folgen maligner Erkrankungen.^[8]

¹ Diese Aussage wurde lange dem amerikanischen Militärarzt William H. Stewart (1921-2008) zugeschrieben, ihre tatsächliche Quelle ist neueren Erkenntnissen nach allerdings unbekannt.^[7]

Die Tumorgewebe zeigen häufig Veränderungen und Störungen der subtilen Systeme der Zell-Zell-Interaktion und -Kommunikation, bei denen ebenfalls eine Reihe von Kohlenhydrat-Erkennungsprozessen von entscheidender Bedeutung ist.

Auch wenn sich unter dem Begriff „Glycomics“ inzwischen ein neues eigenständiges Forschungsgebiet etabliert hat, bleibt es dennoch weiterhin ein breites Feld mit zahlreichen offenen Fragen. Die komplexen Zuckerstrukturen und ihre Bedeutung für zahlreiche molekulare Prozesse auf Zellebene werden nur mühsam identifiziert.

Dies motivierte zur Arbeit an der vorliegenden Dissertation mit dem Ziel, Kohlenhydrat-Erkennungsprozesse vor dem Hintergrund ihrer Relevanz für Infektionen und maligne Erkrankungen besser zu verstehen. In einem stark interdisziplinär ausgerichteten Umfeld sollten Bindungsmotive und -partner der Glycane identifiziert und Details der Bindungsprozesse untersucht werden.

Gleichzeitig sollten die eingesetzten Verbindungen und Analysemethoden auf ihr Potential für eine mögliche spätere Anwendung in Diagnostik und Therapie evaluiert und entsprechend weiterentwickelt werden.

2 Kenntnisstand

2.1 Kohlenhydrate auf Zelloberflächen

Die Ausbildung einer Zellhülle gab einen essentiellen Startschuss für das Leben auf der Erde wie wir es heute kennen. Sie trennte zum ersten Mal „innen“ von „außen“ (bzw. „selbst“ von „nicht-selbst“) und sorgte so für einen definierten und geschützten Reaktionsraum, auf dessen Grundlage die evolutionäre Entwicklung weiter voranschreiten konnte.

Von der ursprünglichen, wahrscheinlich extrem rudimentären Hülle, die im Wesentlichen einer Mizelle bzw. einem Liposom aus einer Art von amphiphilen Molekülen entsprochen haben dürfte, sind die Membranen und Zellwände moderner Lebewesen und Viren weit entfernt. Zwar ist die Hülle immer noch grundsätzlich die Abgrenzung der Zelle von ihrer Umgebung, bietet Schutz vor äußeren Einflüssen und sorgt für relativ konstante Reaktionsbedingungen im Innern, andererseits ist sie aber auch eine hochdynamische Kontakt- und Interaktionsfläche im wechselseitigen Zusammenspiel einzelner Zellen. Prozesse wie Adhäsion, Zell-Zell-Kommunikation und Regulation bilden die Grundlage für die Funktionalität jedes mehrzelligen Organismus, sind aber auch an der Wechselwirkung zwischen verschiedenen Organismen – egal ob symbiotisch, kommensal oder pathogen – beteiligt.

Viele der komplexen Vorgänge auf der Zelloberfläche sind noch weitgehend unbekannt und nur mit detailliertem Wissen über die beteiligten Strukturen können relevante Prozesse grundlegend verstanden werden und eine medizinische Anwendung finden.

Eine sehr wichtige Rolle beim ersten Kontakt sowie vielen weiteren Interaktionsmechanismen spielen komplexe Zuckerstrukturen, die die Oberfläche vieler eukaryotischer sowie prokaryotischer Zellen in einer bis zu mehrere hundert Nanometer dicken Schicht bedecken.^[9-11] Die eukaryotische Glycokalyx (von griechisch „glykys“: süß sowie „kalyx“: Mantel) wird dabei von in die Lipidmembran integrierten glycosylierten Proteinen und Lipiden gebildet (Abb. 2-1) und ist ein dynamisches System, das einem stetigen Auf- und Abbau unterliegt.^[12-13]

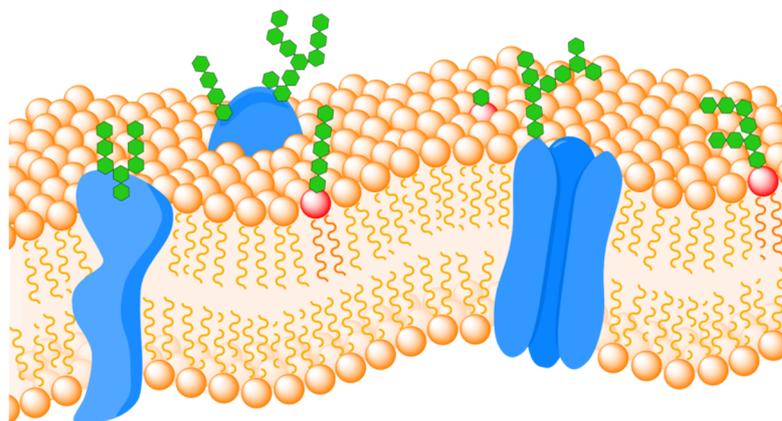


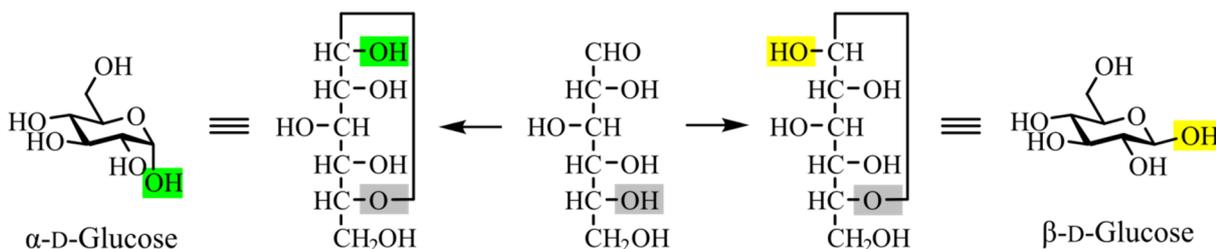
Abb. 2-1: Schematische Darstellung einer eukaryotischen Zellmembran. Auf ihrer Außenseite werden Kohlenhydrate (grün), sogenannte Glycane, auf Glycoproteinen (grün-blau) sowie Glycolipiden (grün-rot) präsentiert.

Für die Glycane der Vertebraten sind bisher zehn verschiedene Monosaccharid-Bausteine bekannt (Abb. 2-2), durch deren Kombination eine unüberschaubar große Fülle an Strukturen aufgebaut werden kann.^[14]

	D-Glc		D-GlcNAc		Neu5Ac
	D-Gal		D-GalNAc		D-GlcA
	D-Man				L-IdoA
	D-Xyl		L-Fuc		

Abb. 2-2: Symboldarstellung (CFG-Code) der in der tierischen Glycokalyx vorkommenden Monosaccharidbausteine (Glc, Glucose; Gal, Galactose; Man, Mannose; Xyl, Xylose; GlcNAc, *N*-Acetylglucosamin; GalNAc, *N*-Acetylgalactosamin; Fuc, Fucose; Neu5Ac, *N*-Acetylneuraminsäure; GlcA, Glucuronsäure; IdoA, Iduronsäure).

Während andere Biomakromoleküle wie Proteine und die DNA ausschließlich aus linear verknüpften bifunktionellen Einheiten (20 Aminosäuren bzw. vier Nucleinbasen) bestehen, bieten die Kohlenhydrate einen weitaus größeren Spielraum für Strukturvielfalt.^[15-16] sie besitzen eine ganze Reihe äquivalent reaktiver Hydroxyfunktionen, so dass lineare Verknüpfungen über verschiedene Positionen, aber auch Verzweigungen möglich sind. Durch intramolekularen Ringschluss zwischen einer dieser Hydroxylgruppen und der Carbonylfunktion des Zuckers zum Halbacetal wird zunächst ein Sechsring (Pyranose), in seltenen Fällen auch ein Fünfring (Furanose) gebildet, und so anstelle der zuvor planaren Carbonylgruppe ein neues Stereozentrum (anomeres Zentrum) eingeführt. Abhängig von der relativen Position des anomeren Sauerstoffs zum namensgebenden Stereozentrum wird die Verbindung als α (gleiche Seite) oder β (gegenüberliegende Seiten) bezeichnet (siehe Schema 2-1).^[17]



Schema 2-1: Die Definition des anomeren Zentrums der D-Glucose als α bzw. β erfolgt aufgrund der relativen Lage der anomeren Hydroxyfunktion (grün/gelb) zum namensgebenden Stereozentrum in Fischerprojektion (grau). Darstellung jeweils in Fischerprojektion und Sesselkonformation.

Die weitere Verknüpfung der Kohlenhydrate erfolgt über das anomere Zentrum unter Ausbildung eines Vollacetals. Zusätzliche strukturelle Vielfalt und Modifikation wird durch diverse Substituenten an den Hydroxylsauerstoffen sowie Aminostickstoffen erzeugt. Zu diesen zählen unter anderem Phosphat-, Sulfat- und Acetylgruppen.

Zur Präsentation auf Proteinen werden die Kohlenhydrate über Aminosäureseitenketten mit dem Protein verknüpft. Anhand der glycosidischen Bindung werden die beiden großen Klassen der *N*-Glycane (Anbindung über Asparagin innerhalb der Konsensussequenz Asn-X-Ser/Thr) sowie der *O*-Glycane (Bindung über Serin oder Threonin; selten auch Tyrosin,

Hydroxyprolin oder Hydroxylysin) unterschieden; C-Glycosylierung über Tryptophan tritt nur selten auf. Während die *N*-Glycane eine gemeinsame Pentasaccharid-Einheit ($\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$) besitzen, auf deren Grundlage Oligomannose-, Komplex- sowie Hybridstrukturen aufgebaut sind,^[18] bilden die *O*-Glycane eine strukturell stark heterogene Gruppe. Ein verbreitetes gemeinsames Strukturmerkmal ist allerdings die Verknüpfung über eine GalNAc-Einheit (Mucin-Typ).^[19-22]

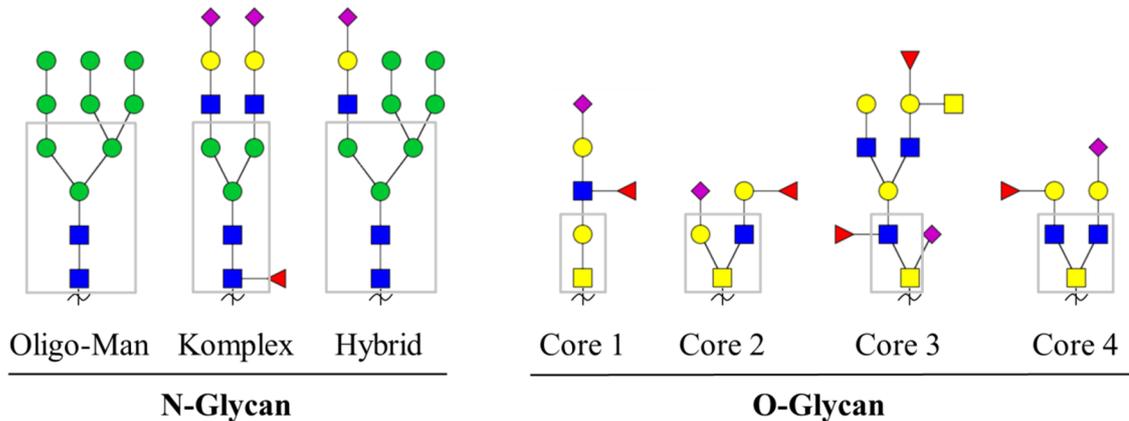


Abb. 2-3: Beispielhafte Darstellung der Hauptklassen der *N*-Glycane (gemeinsame Pentasaccharid-Struktur markiert) sowie einer Auswahl von *O*-Glycanen beruhend auf Core 1-4 (jeweils eingerahmt). Die CFG-Darstellung erfolgte mit GlycoWorkbench.^[23]

Die Glycosylierung der Proteine erfolgt co- oder posttranslational und findet zum großen Teil im Endoplasmatischen Retikulum (ER) sowie dem Golgiapparat statt. Dabei werden nicht immer alle potentiellen Glycosylierungsstellen eines Proteins besetzt, zudem können die Kohlenhydratmotive auch zwischen Proteinen gleicher Aminosäuresequenz variieren, so dass ein Glycoprotein immer eine mikroheterogene Mischung diverser Glycoformen umfasst.^[14]

Neben den Glycoproteinen tragen auch Glycolipide einen beträchtlichen Anteil zur Glycokalyx bei, im Gehirn von Vertebraten machen sie sogar über 80 % aller Glykokonjugate aus.^[24] Sie bestehen aus einem hydrophoben, in die Membran einlagernden Anteil – einer Fettsäure, einem Ceramid (Sphingosin mit amidisch verknüpfter Fettsäure) oder einem Glycerolipid – der als hydrophile Kopfgruppe ein Kohlenhydratmotiv trägt. Dabei dominieren neben dem einfachsten Glycolipid, dem Galactosylceramid, glucoseverlinkte Strukturen, die reich an Galactose, *N*-Acetylgalactosamin und Sialinsäure sind.^[24]

Sowohl *N*- und *O*-Glycane als auch Glycolipide sind häufig sialinsäureterminiert, so dass diesem Monosaccharid als erster interaktionsrelevanter Einheit eine Sonderstellung in vielen kohlenhydratbasierten Wechselwirkungsprozessen zukommt.^[25-26]

Die exakte Zusammensetzung der Glycokalyx ist hochspezifisch für ein Individuum sowie verschiedene Gewebetypen und bildet zudem den physiologischen Status einzelner Zellen ab, kann also als Marker für Prozesse wie Differenzierung oder krankheitsbedingte Veränderungen (Entzündungen, Infektionen oder Tumorerkrankungen) dienen.^[27-36]

Durch den im Kohlenhydratmuster codierten, extrem dichten Informationsgehalt dient sie als ideale Plattform zur subtilen Modulation von Zell-Zell-Interaktion und -Kommunikation.

Auch die zu den Prokaryoten zählenden Bakterien besitzen komplexe Kohlenhydratstrukturen auf ihrer Oberfläche, die integraler Bestandteil der Zellwand sind.^[37] Im Gegensatz zur eukaryotischen Lipidmembran ist die bakterielle Zellwand mehrschichtig aufgebaut (siehe Abb. 2-4)^[38] und beinhaltet häufig Monosaccharide, die in Eukaryoten nicht vorkommen. Zu diesen zählen unter anderem *N*-Acetylmuraminsäure (MurNAc), 3-Desoxy-D-manno-oct-2-ulopyranosonsäure (Kdo, siehe Abb. 2-6) und *L*-Glycero-D-mannoheptose (*L*,*D*-Heptose). Die Außenseite der bakteriellen Cytoplasmamembran ist von Peptidoglycan (Murein) bedeckt, einem durch kurze Peptidsequenzen (vier bis fünf AS) dreidimensional verlinkten Netzwerk alternierender *N*-Acetylglucosamine sowie *N*-Acetylmuraminsäuren.^[39] Die Zusammensetzung der Linkersequenzen ist abhängig vom Bakterienstamm, enthält aber typischerweise Aminosäuren wie *L*-Alanin, *D*-Glutaminsäure und *D*-Alanin. Während sich bei Gram-negativen Bakterien (wie *E. coli* oder *Neisseria*) an ein ein- bis dreilagiges Peptidoglycan eine zweite, äußere Membran anschließt, besitzen Gram-positive (z.B. *Staphylococcus*) lediglich eine verdickte, zehn- bis zwanziglagige Mureinschicht. Der Anteil des Peptidoglycans an der Trockenmasse der Zellwand beträgt dabei zwischen 10 (Gram-negativ) und 25 % (Gram-positiv).^[40]

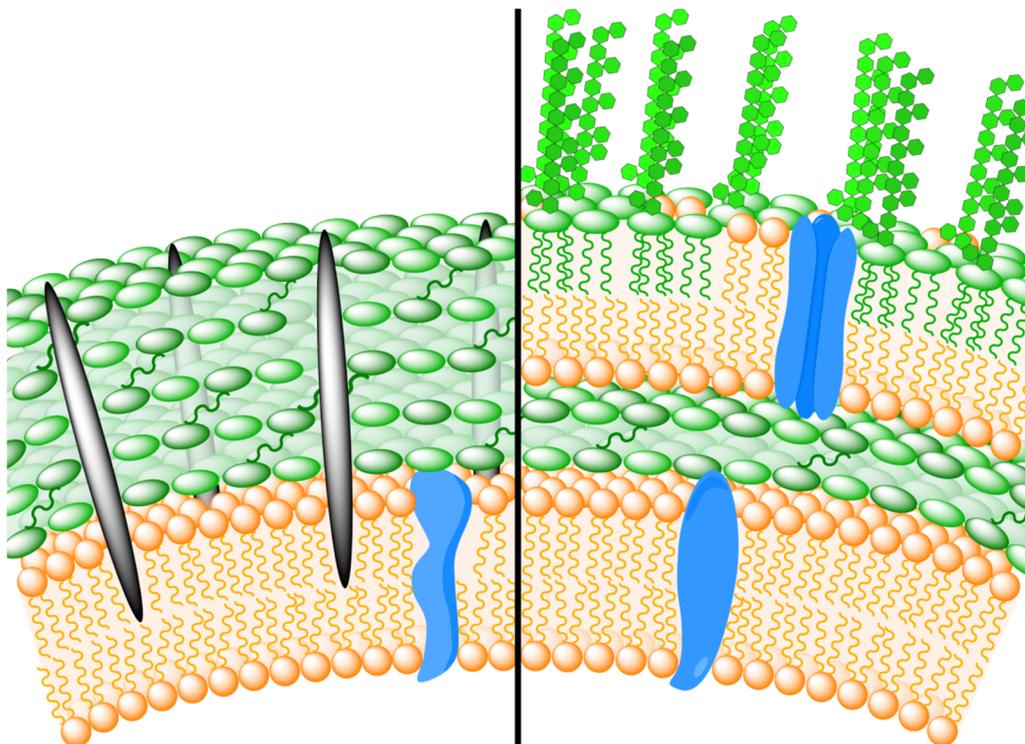


Abb. 2-4: Schematische Darstellung der Zellwand eines Gram-positiven (links) sowie Gram-negativen (rechts) Bakteriums. Die Außenseite der Cytoplasmamembran (orange) ist von Peptidoglycan (Murein; grün) bedeckt. Während Gram-positive Bakterien ein verstärktes Peptidoglycan mit eingelagerten Teichonsäuren (schwarz: Lipoteichonsäuren) besitzen, liegt bei Gram-negativen über einer dünnen Mureinschicht eine zweite Lipidmembran, die auf der Außenseite größtenteils aus Lipopolysaccharid (LPS) besteht.

Zusätzlich besitzen Gram-positive Bakterien in die Mureinschicht eingelagerte Teichonsäuren, die in der Lipidmembran (Lipoteichonsäure, LTA) bzw. am Peptidoglycan (Wandteichonsäure, WTA) verankert sind. Diese durch zahlreiche Phosphatbrücken sowie Alanin-Seitenketten entweder zwitterionischen oder überwiegend anionischen Glycopolymere

bestehen aus Wiederholungseinheiten von substituierten Glycerin- sowie Ribitolphosphaten und diversen Monosacchariden (Strukturbeispiele siehe Abb. 2-5).^[41-44]

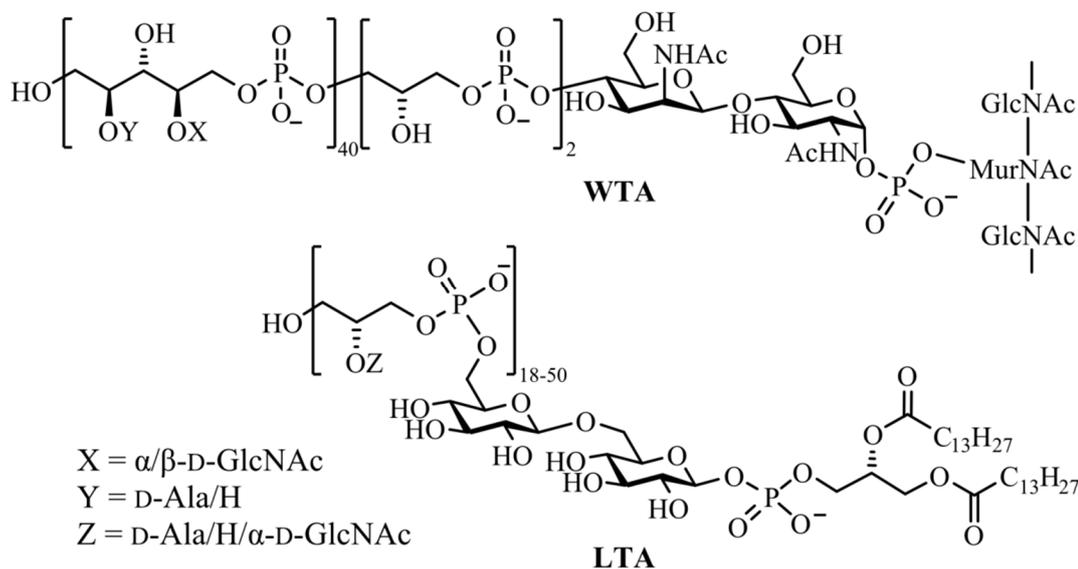


Abb. 2-5: Struktur einer Wandteichonsäure (WTA) sowie Lipoteichonsäure (LTA) von *Staphylococcus aureus*. Während WTA über die 6-OH-Gruppe der *N*-Acetylmuraminsäure (MurNAc) kovalent mit dem Peptidoglycan verknüpft sind, lagern LTA mit ihrem Lipidbestandteil in die Cytoplasmamembran ein. Die Wiederholungseinheiten von Glycerin- (C₃) und Ribitolphosphat (C₅) tragen GlcNAc- und D-Alanin-Seitenketten.^[41-42, 44]

Diese Strukturen fehlen den Gram-negativen Bakterien vollkommen. Ihre Zellwand ist stattdessen von einer Glycokalyx umgeben, die von der Außenseite ihrer unsymmetrisch aufgebauten äußeren Membran gebildet wird. Während die dem Peptidoglycan zugewandte Seite zu großen Teilen aus Phospholipiden besteht, enthält die äußere Lage der Lipid-Doppelschicht vor allem Lipopolysaccharid (LPS). Dieses besteht aus einer amphiphilen Ankereinheit (Lipid A, Abb. 2-6) sowie einem komplexen Kohlenhydratanteil (innere und äußere Kernstruktur sowie O-Antigen).^[45-46] Als Linker zwischen Lipid A und dem weiteren Glycopolymere dient bei *E. coli* ein 1,4-verknüpftes Disaccharid des ausschließlich in Gram-negativen Bakterien vorkommenden Kdos. Zusammen mit der ebenfalls exklusiv in Gram-negativen zu findenden L,D-Heptose (Hep) bildet es die innere Kernstruktur, ein Pentasaccharid der Sequenz Hep-1,7-Hep-1,3- α -Hep-1,5-(α -Kdo-2,4)- α -Kdo. Die äußere Kernstruktur besteht wie das sich anschließende, durch Wiederholung eines Bakterienstamm-spezifischen Strukturmotivs charakterisierte O-Antigen vorwiegend aus „geläufigen“ Kohlenhydraten wie Galactose, Glucose und *N*-Acetylglucosamin.^[46] Anhand der Zusammensetzung ihres O-Antigens werden *E. coli* in sogenannte Serogruppen unterteilt, von denen bisher 164 bekannt sind.^[47]

Während die Glycosylierung von Proteinen in eukaryotischen Systemen seit langem bekannt ist und eine der am weitesten verbreiteten posttranslationalen Modifikationen darstellt – über die Hälfte aller eukaryotischen Proteine sollen glycosyliert sein, beim Menschen sind es sogar über 70 %^[48] – wurde noch bis vor kurzem davon ausgegangen, dass bakterielle Proteine keine derartigen Modifikationen besitzen. Dieses Dogma musste inzwischen der Erkenntnis weichen, dass auch Prokaryoten ein breites Spektrum an Glycoproteinen exprimieren.^[49-55]

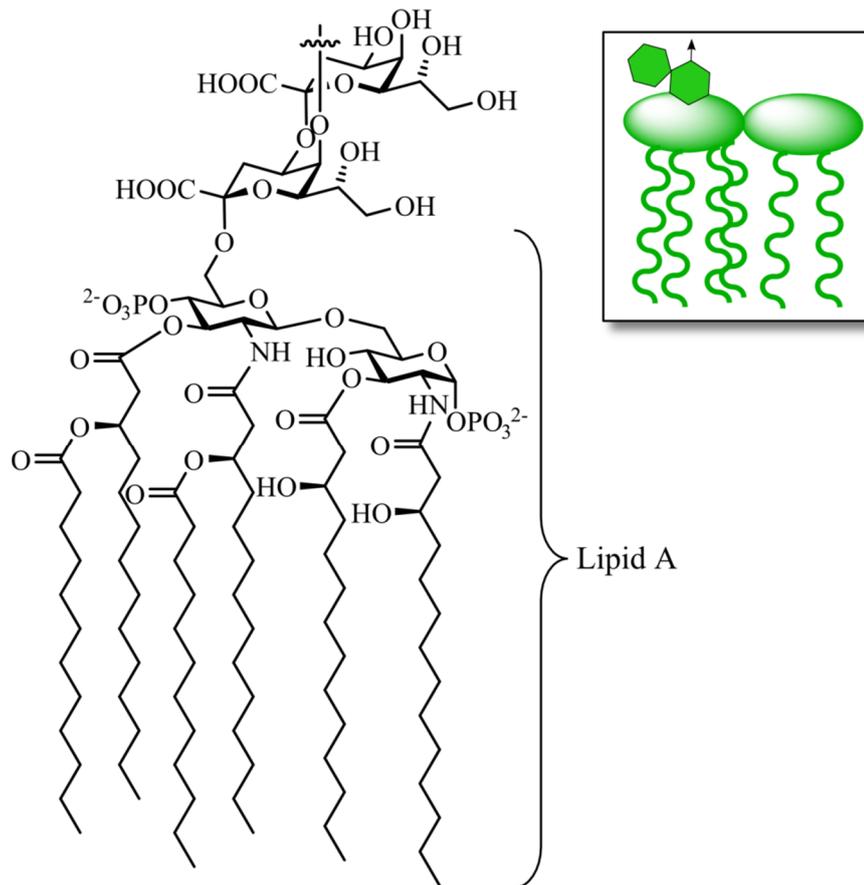


Abb. 2-6: Struktur des Lipopolysaccharidbestandteils Kdo₂-Lipid A des Gram-negativen Bakteriums *E. coli*. Das mit Fettsäuren über Ester bzw. Amide verknüpfte sowie zweifach phosphorylierte Disaccharid β-GlcNAc-1,6-α-GlcNAc bildet den in der Membran verankerten amphiphilen Anteil Lipid A. Über das Kdo-Disaccharid wird der weitere Kohlenhydratanteil des LPS (innere und äußere Kernstruktur sowie O-Antigen; nicht gezeigt) verknüpft. Schematische Entsprechung analog zu Abb. 2-4 im Kasten (Verlängerung des Kohlenhydratmotivs an Position und in Richtung des Pfeils).

Zu diesen zählen die Oberflächen- (S-layer) proteine, aber auch viele für Motilität und Adhäsion verantwortliche Proteine wie Flagelline, Adhäsine und Piline.^[49] Strukturell besitzen sie gewisse Ähnlichkeiten zu den bereits vorgestellten eukaryotischen Glycoproteinen, so erfolgt die Verknüpfung der Kohlenhydratmotive ebenfalls über die Aminosäuren Asparagin (*N*-Glycan) sowie Serin und Threonin (*O*-Glycane). Allerdings finden auch hier, wie in anderen bakteriellen Zuckerstrukturen, ungewöhnliche und ausschließlich prokaryotisch vorkommende Monosaccharide Verwendung. Zu diesen gehören 2,4-Diacetamido-2,4,6-trideoxyhexose (DATDH), Pseudaminsäure, Legionaminsäure, Bacillosamin und *N*-Acetylfucosamin (FucNAc).^[37, 56]

Aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens in exponierter Lage auf der Oberfläche von Eukaryoten, Prokaryoten sowie den hier nicht näher beschriebenen Viren, aber auch ihrer enormen Strukturvielfalt sind komplexe Kohlenhydrate ideal geeignet, zelluläre Interaktions- und Kommunikationsprozesse zu realisieren und fein abgestimmt zu modulieren. Dies geschieht in vielen Fällen durch die Wechselwirkung mit kohlenhydratbindenden Proteinen (Lectinen), die hochspezifisch und selektiv Struktur motive erkennen.

2.2 Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen

Die erste Beschreibung eines Proteins mit kohlenhydratbindenden Eigenschaften wurde 1888 von Stillmark veröffentlicht, der feststellte, dass ein Extrakt der Samen des Wunderbaums (*Ricinus communis*) zur Verklumpung von Erythrozyten führt.^[57] Diese Wirkung führte er auf ein Protein, das Ricin, zurück, allerdings waren zu diesem Zeitpunkt der genaue Wirkmechanismus und die für die Agglutination verantwortlichen molekularen Strukturen noch unbekannt. Nur anhand ihrer biologischen Aktivität wurden Proteine mit ähnlichen, blutverklumpenden Eigenschaften als „Hämagglutinine“ klassifiziert. Der Begriff „Lectin“ (von lateinisch „legere“: auswählen) wurde erst etwa 60 Jahre später von Boyd geprägt, der die proteinabhängige selektive Agglutination von Erythrocyten mit den um 1900 von Landsteiner definierten Blutgruppen (AB0-System) in Verbindung brachte.^[58] Die für die Verklumpung mit Hämagglutininen bzw. Lectinen verantwortlichen, auf der Oberfläche der roten Blutkörperchen präsentierten Antigene wurden schließlich von Morgan und Watkins als Kohlenhydrate identifiziert und ihre Struktur aufgeklärt (siehe Abb. 2-7).^[2-3]

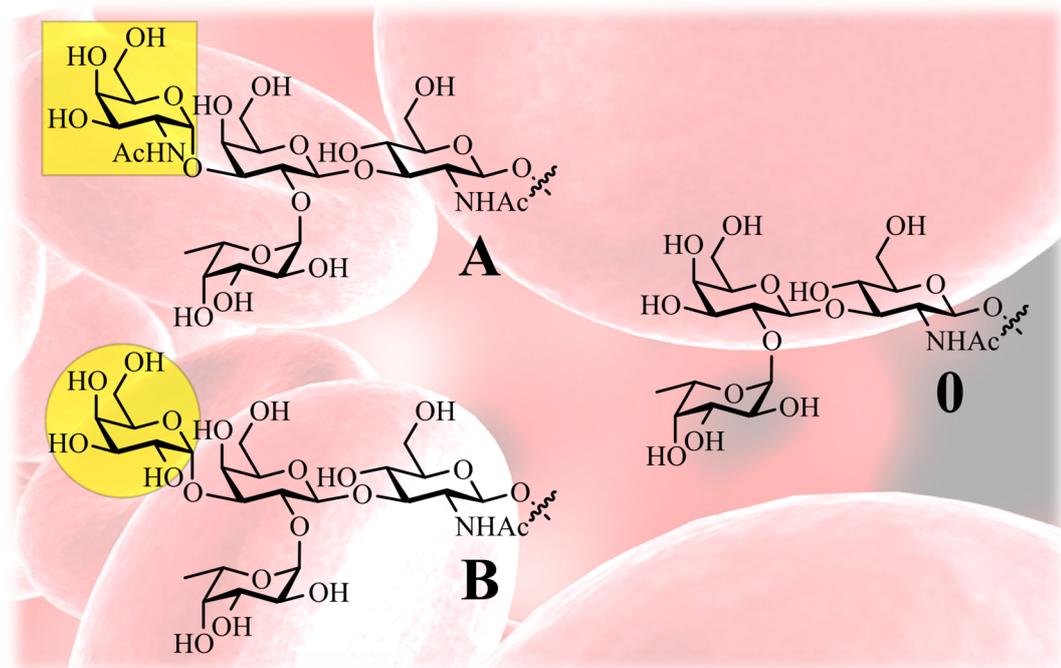


Abb. 2-7: Kohlenhydratmotive der Blutgruppenantigene A, B und 0. Während Blutgruppe 0 lediglich ein Trisaccharid präsentiert, tragen A und B endständig zusätzlich eine GalNAc- bzw. Galactoseeinheit (gelb hinterlegt nach CFG-Schema).

Die aktuelle Definition beschreibt Lectine als kohlenhydratbindende nicht-Antikörper-Proteine mit hochspezifischem Erkennungsmotiv und mindestens einer Domäne ohne enzymatische Aktivität. Sie bilden eine große Proteinklasse, die in Pflanzen^[59] und Tieren,^[60-62] aber auch auf Mikroben^[63-64] gefunden und, historisch bedingt, teilweise weiterhin als Hämagglutinine (viral) bzw. Adhäsine (bakteriell) bezeichnet werden.

Ihre Klassifizierung erfolgt mitunter uneinheitlich nach Kohlenhydratspezifität oder aber auf Grundlage von Sequenz- und Strukturhomologie, wobei sich der genetische Ansatz als eindeutiger erwiesen und mehrheitlich durchgesetzt hat. Dabei werden fünf bzw. sieben etablierte Hauptgruppen unterschieden (R-Typ, L-Typ, P-Typ, C-Typ und I-Typ), wobei die

Galectine sowie Pentraxine nach unterschiedlicher Definition zum L-Typ gezählt bzw. als eigenständige Gruppe gewertet werden. Die Strukturmerkmale sowie Vorkommen und Ligandenspezifität der Lectin-Hauptgruppen sind in Tabelle 2-1 zusammengefasst.

Tabelle 2-1: Lectin-Klassifizierung anhand ihrer Struktur bzw. Sequenz in fünf (sieben) Hauptgruppen. Zusammenstellung nach Varki & Gabius.^[9, 65]

Lectin	abgeleitet von	Strukturmotiv	Vorkommen	Ligand
R-Typ	Ricin (<i>Ricinus communis</i>)	kleblattförmige CRD	Pflanzen (RCA-I, SSA, SNA), Tiere (MR), Bakterien (Xyn10A)	variabel (Gal/GalNAc, α -2,6-Sia, Man)
L-Typ	Leguminosen	„Jelly Roll“ aus 2 antiparallelen β -Faltblättern multimer Ca^{2+} -abhängig	Pflanzen (ConA, PNA), Tiere (ERGIC-53), Bakterien (BoNT/B)	variabel (Man/Glc, Gal, GalNAc, GlcNAc, Fuc, komplexe KH)
Galectin	L-Typ	konservierte CRD (8 AS)	Tiere (Gal-1 - Gal-15), (Pflanzen)*	β -Gal
Pentraxin	L-Typ	pentamer	Tiere (CRP, SAP)	variabel (Gal, SO_4^- - und PO_4^- -haltige KH)
P-Typ	Phosphat-bindend	konservierte CRD	Tiere (CD-MPR, CI-MPR)	M6P
C-Typ	Calcium-abhängig	konservierte CRD (110-130 AS) Ca^{2+} -abhängig	Tiere (DC-SIGN, Selectine), Mikroben	variabel (Man, Gal, Fuc, Heparin)
I-Typ	Immunglobulin-Superfamilie	Ig-artige Faltung	Tiere (Siglecs)	variabel (Sia-Lac, Man ₆ -GlcNAc ₂)

(CRD, *carbohydrate recognition domain*, kohlenhydratbindende Domäne; RCA, *Ricinus communis* Agglutinin; SSA, *Sambucus sieboldiana* Agglutinin; SNA, *Sambucus nigra* Agglutinin; MR, Mannoserezeptor; Xyn10A, *S. lividans* endo- β -1-4-xylanase 10A; ConA, Concanavalin A; PNA, *Peanut* Agglutinin; ERGIC, *ER-Golgi intermediate compartment*; BoNT/B, Botulinum-Neurotoxin Domäne B; KH, Kohlenhydrat; CRP, C-reaktives Protein; SAP, serumamyloide P-Komponente; M6P, Mannose-6-phosphat; C(D/I)-MPR, *cation-(in)dependent M6P receptor*; DC-SIGN, *dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*; Ig, Immunglobulin).

*Galectinverwandte Sequenzen wurden für *Arabidopsis thaliana* vorhergesagt.

Neben diesen Strukturgruppen werden weitere Lectinfamilien zusammengefasst (B-, E-, F-, G-, H-, J-, M-, T-, W- und X-Typ), deren Einstufung und Benennung allerdings noch nicht endgültig akzeptiert und festgelegt ist.

Die kohlenhydratbindende Domäne (CRD) der Lectine bildet übergreifend über alle Strukturgruppen meist keine tiefe Bindungstasche aus, sondern liegt als eher flache, polare Struktur auf der Oberfläche des Proteins (siehe Abb. 2-8). Dort ist der Zucker in der Regel in ein weitläufiges Wasserstoffbrückennetzwerk eingebunden, das teilweise durch koordinierte

Wassermoleküle ergänzt wird. Weitere Beiträge zur Bindungsenergie liefern van-der-Waals-, Dipol- und elektrostatische Wechselwirkungen sowie hydrophobe Kontakte zwischen aromatischen Aminosäureseitenketten (Phenylalanin, Tryptophan) und der unpolaren Unterseite eines Kohlenhydrats.^[66-68] Nur unvollständig verstanden ist bisher der Einfluss der Veränderung der Hydrathülle durch die Komplexbildung, hier spielen sowohl entropische als auch enthalpische Beiträge eine nicht zu unterschätzende Rolle.^[69-70]

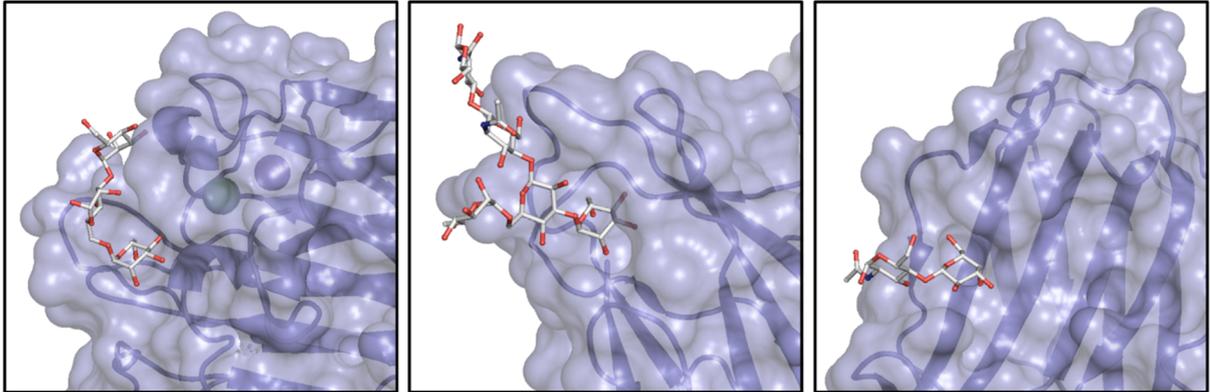


Abb. 2-8: Kohlenhydratbindende Domäne (CRD) verschiedener Lectine im Komplex mit ihrem Bindungspartner. Die Domäne bildet meist keine ausgeprägte Tasche, sondern liegt als flache, polare Struktur auf der Oberfläche der Proteine. Links: ConA (pflanzlich; pdb 1CVN^[71]) mit einem Trimannosid; Mitte: FimH (bakteriell; pdb 2VCO^[72]) mit einem mannosereichen Pentasaccharid; Rechts: Galectin-1 (human; pdb 1W6P^[73]) mit *N*-Acetyllactosamin.

Die Affinität zwischen einer isolierten Bindungsdomäne und ihrem Liganden ist mit K_D -Werten im millimolaren bis mikromolaren Bereich relativ niedrig. Allerdings werden sowohl das Zuckermotiv als auch die CRD auf Zellen nicht singular präsentiert, sondern sind innerhalb einer eng begrenzten Fläche oder sogar innerhalb eines Moleküls im Normalfall mehrfach vorhanden. Durch die so erzielte Multivalenz ist die Avidität der Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkung gegenüber der monovalenten Affinität deutlich (teilweise mehrere Zehnerpotenzen) gesteigert und höher als die Summe der einzelnen Bindungsereignisse erwarten ließe.^[74-75] Der zusätzliche Energiegewinn durch Multivalenz lässt sich sowohl auf thermodynamische (vor allem Entropie) als auch kinetische Effekte zurückführen. Wichtig für eine optimale Wechselwirkung ist zudem die dreidimensionale Anordnung und Dichte von Zuckern und Lectinbindungsdomänen relativ zueinander (illustriert in Abb. 2-9).^[76]

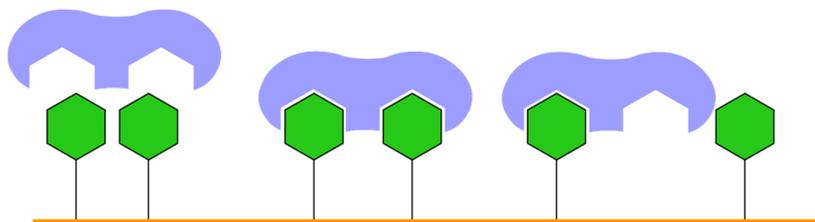


Abb. 2-9: Schematische Darstellung einer erfolgreichen multivalenten Bindung bei optimaler Anordnung von Kohlenhydraten (grün) und Bindungsdomänen im bivalenten Lectin (blau) relativ zueinander (Mitte). Werden die Zuckermotive zu dicht (links) bzw. zu weit voneinander entfernt (rechts) präsentiert, erfolgt ohne Konformationsänderung keine oder nur eine monovalente Bindung.

So können Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen in der dreidimensionalen Umgebung einer Zelloberfläche ihre ganze Stärke ausspielen: Nicht nur ein isoliertes Zuckermotiv wird selektiv erkannt und gebunden, auch die Mikroumgebung trägt zu erweiterter Selektivität und

Affinität bei. Dies gilt für die endogene Erkennung („selbst“, Zell-Zell-Kommunikation, Immuntoleranz) ebenso wie für exogene Wechselwirkungen („nicht-selbst“, pathogene Adhäsion oder Immunreaktion).^[77-80]

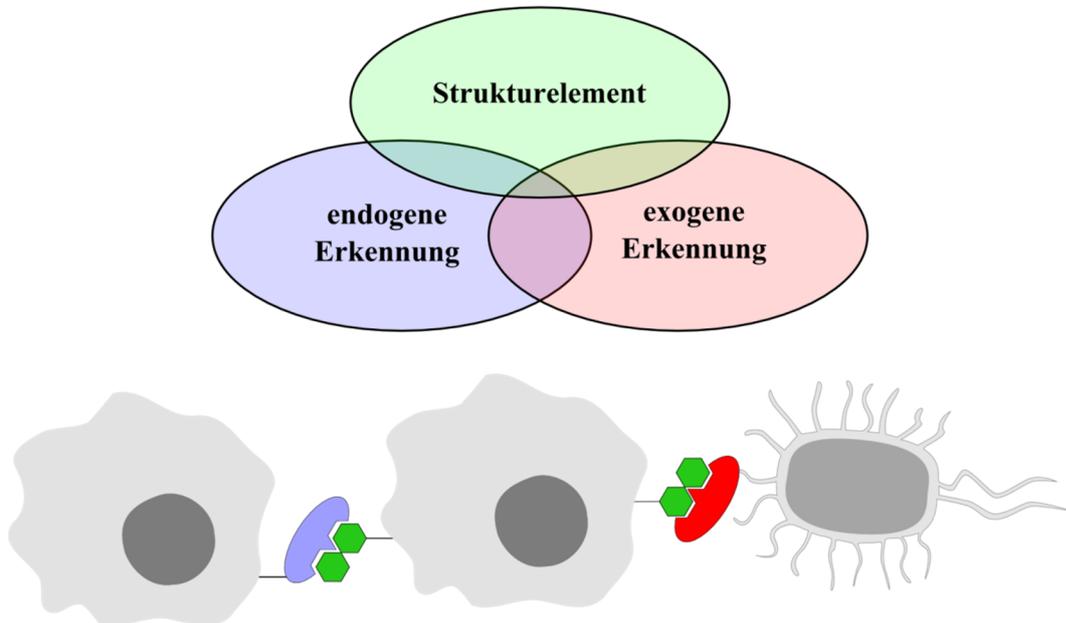


Abb. 2-10: Biologische Bedeutung der auf Zelloberflächen vorhandenen Kohlenhydrate. Neben ihrer Funktion als Strukturelement dienen sie vor allem als Erkennungsmotive für endogene („selbst“) und/oder exogene („nicht-selbst“, Pathogen, Toxin, Symbiont) Lectine. Darstellung modifiziert nach Gagneux *et al.*^[78]

Dabei kann nicht scharf zwischen endogen und exogen erkannten Kohlenhydratmotiven getrennt werden. Häufig adressieren Pathogene mit ihren Adhäsinen Strukturen, die für den befallenen Organismus seinerseits wichtige Informationsträger sind. Dies führte zu einem stetigen evolutionären „Wettlauf“, infolgedessen die strukturelle Diversität von Glycanen und Lectinen entstand (Rote-Königin-Effekt^[81]).²

Die exogene Kohlenhydraterkennung durch Pathogene, die zur Adhäsion führt, ist häufig eng mit dem Wirts-, Gewebe- oder sogar Zelltropismus der Erreger verknüpft. So finden sie ihre bevorzugten Habitate anhand der Unterschiede im Glycosylierungsmuster der adressierten Zelloberflächen.^[64, 82-83]

Die Erkennung erfolgt durch oberflächenassoziierte Lectine (Adhäsine, Hämagglutinine), die von Bakterien häufig am äußeren Ende der Fimbrien (Pili) präsentiert werden, fadenförmigen Proteinen mit einem Durchmesser von fünf bis sieben Nanometern sowie einer Länge von bis zu mehreren hundert Nanometern. Jeder Erreger trägt mehrere hundert dieser Hafthärchen auf seiner Oberfläche (siehe Abb. 2-11), die mit den Glycoproteinen und –lipiden der Wirtszelle interagieren.^[84]

² In Lewis Carrols „Alice hinter den Spiegeln“ erklärt die rote Königin Alice: „Hierzulande musst du so schnell rennen, wie du kannst, wenn du am gleichen Fleck bleiben willst.“ Den Begriff Rote-Königin-Effekt bzw. -Hypothese prägte Leigh Van Valen 1973 als Beschreibung für das gegenseitige evolutionäre „Wettrüsten“ konkurrierender Organismen.

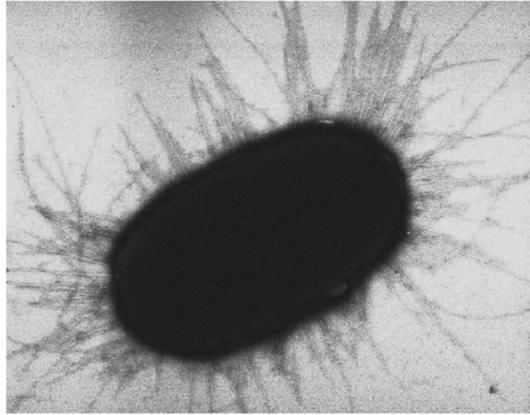


Abb. 2-11: Fimbrien auf der Oberfläche von *E. coli*. Am äußeren Ende der fadenförmigen Proteine sitzen kohlenhydratbindende Proteine, die für die Adhäsion an Wirtszellen verantwortlich sind (Adhäsine). Abbildung: Manu Forero, lizenziert unter Creative Commons (CC-BY-2.5).^[85-86]

bakterielle Erkennungsmotive

Das Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) besitzt eine Vielzahl verschiedener Adhäsine, die abhängig vom jeweiligen Stamm in verschiedener Kombination, Anzahl und Substruktur auf der Oberfläche präsentiert werden. Am intensivsten untersucht und charakterisiert sind die drei Proteine FimH, PapG und Sfa-S.^[64, 83]

FimH ist Bestandteil des Typ 1-Pilus, der unter anderem von uropathogenen *E. coli* (UPEC) exprimiert wird. Es bindet an α -Mannoside (α -Man-1,3- β -Man-1,4-GlcNac, α -Man-1,6- α -Man-1,3-Man), die durch die Glycoproteine Uroplakin Ia und Ib auf dem Urothel (Epithelzellen der ableitenden Harnwege) präsentiert werden. Auf diese Weise kann sich das Bakterium auch entgegen dem Harnfluss auf der Blasenwand festsetzen und dort eine Entzündungsreaktion (Cystitis) auslösen.^[87-89]

PapG wird in drei Subtypen (I, II, III) ebenfalls von UPEC exprimiert, es sitzt an der Spitze des P-Pilus und bindet an Glycosphingolipide der Globo-Serie, die das Disaccharid Galabiose (α -Gal-1,4-Gal) enthalten, unerheblich ob in terminaler oder interner Position.^[90] Dieses Kohlenhydrat ist ebenfalls Bestandteil der Glykokalyx des Harnwegssystems und wird in besonders hoher Konzentration auf Zellen des Nierenepithels präsentiert. Folgerichtig sind PapG-exprimierende *E. coli* häufig Verursacher von Nierenbeckenentzündung (Pyelonephritis).^[91-92]

Sfa-S, auf dem S-Pilus lokalisiert, wird dagegen vorwiegend bei Stämmen gefunden, die Sepsis sowie Meningitis auslösen. Es bindet sialinsäureterminierte Kohlenhydrate wie α -Sia-2,3- β -Lac, die unter anderem auf Glycolipiden des Nervengewebes zu finden sind.^[93]

virale Erkennungsmotive

Auch der Wirts- und Gewebetropismus viraler Erreger lässt sich auf Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen zurückführen: die auf der Virushülle lokalisierten Hämagglutinine (HA) binden selektiv terminale Sialinsäurestrukturen. Während diese auf der Oberfläche des humanen Atemwegsepithels α -2,6-verknüpft sind, präsentieren aviane Zellen Sialinsäure in α -2,3-Verknüpfung, so dass eine Speziesbarriere für die Infektion besteht. Durch Mutation

nur zweier Aminosäuren des Hämagglutinins kann die Spezifität allerdings umgekehrt und eine Infektion des Menschen durch Vogelgrippeviren ermöglicht werden.^[94-97]

Durch die Verwendung kohlenhydratbindender Proteine als Analyten ist es möglich, komplexe Zuckerstrukturen selbst aus Gemischen (auch auf Zelloberflächen) selektiv zu binden und nachzuweisen.

Im einfachsten Fall wird ein Hämagglutinations-Assay durchgeführt, etwa zur Bestimmung der Blutgruppe. Werden die Lectine mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, können Zelloberflächen sowie Gewebe oder sogar ganze Organismen in Abhängigkeit von ihrem Glycosylierungsstatus eingefärbt und mikroskopisch untersucht werden (histochemische Färbung). Auf diese Weise werden kohlenhydratabhängige Prozesse wie Entwicklung und Differenzierung,^[98] maligne Veränderungen^[99] oder auch der Einfluss von Medikamenten auf die Glycokalyx^[100] räumlich und zeitlich aufgelöst verfolgt.

Obwohl kohlenhydratbindende Proteine aufgrund ihrer hohen Selektivität wertvolle analytische Werkzeuge sind, sind ihre Einsatzmöglichkeiten beschränkt. Sie zeigen häufig eine ausgeprägte Toxizität und erfordern eine schonende Handhabung, um eine Degradation zu vermeiden. Die Isolierung aus natürlichen Quellen ist teilweise sehr aufwändig, weshalb die Proteine oft sehr teuer sind, sofern man sie überhaupt kommerziell erhält. Zudem sind nicht für alle Kohlenhydratmotive entsprechende Lectine bekannt, so dass die Glycom-Analytik in jedem Fall unvollständig bleibt. Eine Ergänzung oder sogar Alternative bieten synthetische Lectine.

Exkurs: synthetische Lectine

Synthetische Lectine sind im Labor designte und hergestellte Moleküle, die Kohlenhydrate binden und differenzieren können, jedoch keine Proteine sind. Die für die Bindung verantwortlichen Wechselwirkungen sind zumeist identisch zu denen der bereits vorgestellten natürlichen Vorbilder. Insbesondere Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Hydroxylgruppen der Zucker und dem synthetischen Rezeptor sorgen für eine stabile Komplexierung – zumindest in organischen Lösungsmitteln. Da auch Wasser ein stabiles H-Brücken-Netzwerk ausbilden kann, steht es in direkter Konkurrenz zum Zucker in der Bindung an den Rezeptor, so dass die Kohlenhydraterkennung in wässrigen Medien weiterhin eine große Herausforderung darstellt.^[101-102] Die bisher entwickelten Lectinanaloga lassen sich in zwei Klassen einteilen: nichtkovalent sowie kovalent bindende Moleküle.

Erstere sind biomimetische Rezeptoren, die in den Bereich der supramolekularen Chemie fallen und eine Bindungskavität aufweisen, in der die Kohlenhydrate allein durch nichtkovalente Wechselwirkungen fixiert werden. Diese Kavität ist der Kohlenhydraterkennungsdomäne (CRD) eines natürlichen Lectins nachempfunden und stellt häufig H-Brücken-Donoren und -Akzeptoren sowie Aromaten für hydrophobe Kontakte zur Verfügung (siehe Abb. 2-12).^[103-104]

Aufgrund ihrer begrenzten Größe kann die Kavität allerdings nur relativ kleine Kohlenhydrate (Mono-^[105-109] bzw. Disaccharide^[110-111]) aufnehmen, die zudem in Lösung vorliegen müssen. Die Bindung komplexerer, oberflächengebundener Glycane ist deshalb nicht möglich.

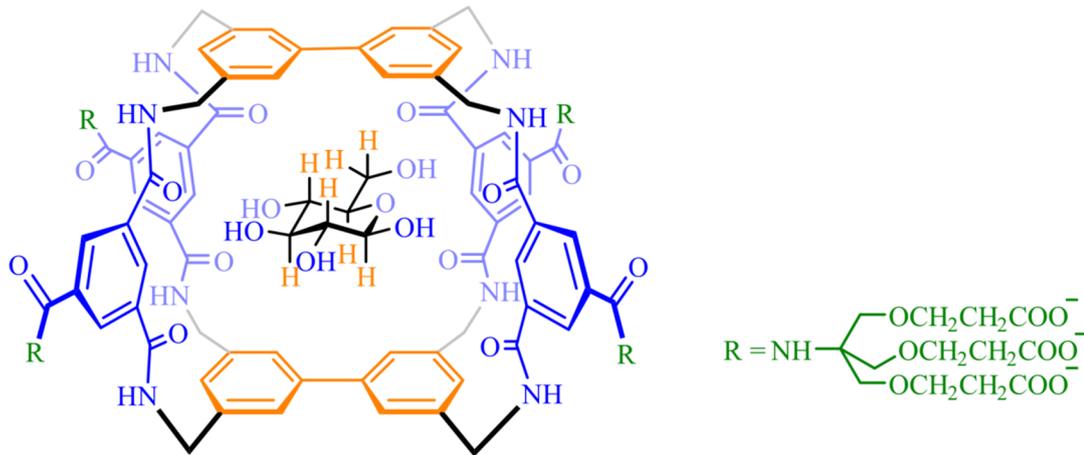
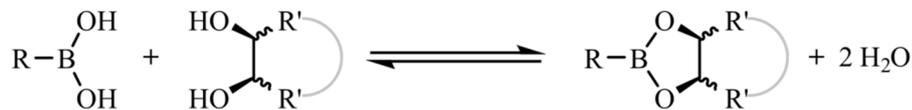


Abb. 2-12: Nichtkovalent bindendes, synthetisches Lectin im Komplex mit β -D-Glucose. Das Kohlenhydrat wird durch H-Brücken (zwischen blau gezeigten Hydroxylgruppen und Amid-Seitenarmen) sowie hydrophobe Kontakte (CH- π -Wechselwirkungen in orange) in der Kavität des Moleküls fixiert. Ionische Seitenketten (grün) dienen der Wasserlöslichkeit.^[106]

Im Gegensatz dazu erfolgt die Kohlenhydratfixierung bei zweiteren über kovalente Bindungen an die Hydroxylgruppen der Zucker. Zum Einsatz kommen hier insbesondere Boronsäurederivate, die mit *cis*-Diolen, wie sie in verschiedensten Kohlenhydraten vorliegen, stabile cyclische Ester ausbilden (siehe Schema 2-2).^[112] Die optimale Geometrie für eine Reaktion bieten Furanosid-Strukturen, in denen die Hydroxylgruppen nahezu coplanar vorliegen. Die Bindung an Pyranoside ist dagegen nicht trivial und erfordert den Einsatz von Derivaten wie *ortho*-Donor-substituierten Phenylboronsäuren (Benzoboroxole).^[113-116]



Schema 2-2: Bildung eines cyclischen Boronsäureesters aus einem Boronsäurederivat und einem *cis*-Diol.

Durch die Verwendung eines vororganisierten Grundgerüsts und Präsentation mehrerer Boroxoleinheiten innerhalb eines Moleküls kann die Affinität der Kohlenhydratbinder durch Multivalenzeffekte weiter erhöht werden. Häufig zeigt der boronsäuresubstituierte Aromat selbst bereits eine ausgeprägte Fluoreszenz, deren Emissionswellenlänge sowie Intensität teilweise von der Anwesenheit gebundener Zucker beeinflusst wird. Entsprechende Verbindungen können direkt für Nachweisreaktionen verwendet werden.^[117-118] Außer Mono- und Oligosacchariden in Lösung werden auch Kohlenhydrate auf Glycoproteinen erkannt und gebunden.^[119-120]

Neben den einfachen Farbnachweisen für Kohlenhydrate wurde eine Vielzahl von Methoden entwickelt, Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen sowohl qualitativ (Bindungspartner) als auch quantitativ (Bindungsstärke) und auf molekularer Ebene (Bindungsmodus) zu untersuchen.

Zu diesen zählen unter anderem Affinitätschromatographie (*frontal affinity chromatography*, FAC),^[121-123] Oberflächenplasmonenresonanz (SPR),^[124-125] *enzyme linked lectin assay* (ELLA),^[126-127] isotherme Titrationskalorimetrie (ITC),^[128-131] Agglutinationsassays,^[132-134]

Glycochips,^[135-141] rasterkraftmikroskopische Methoden (AFM),^[142-144] Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)^[145-148] sowie Röntgenkristallstrukturaufklärung^[71, 91] (siehe Abb. 2-13).

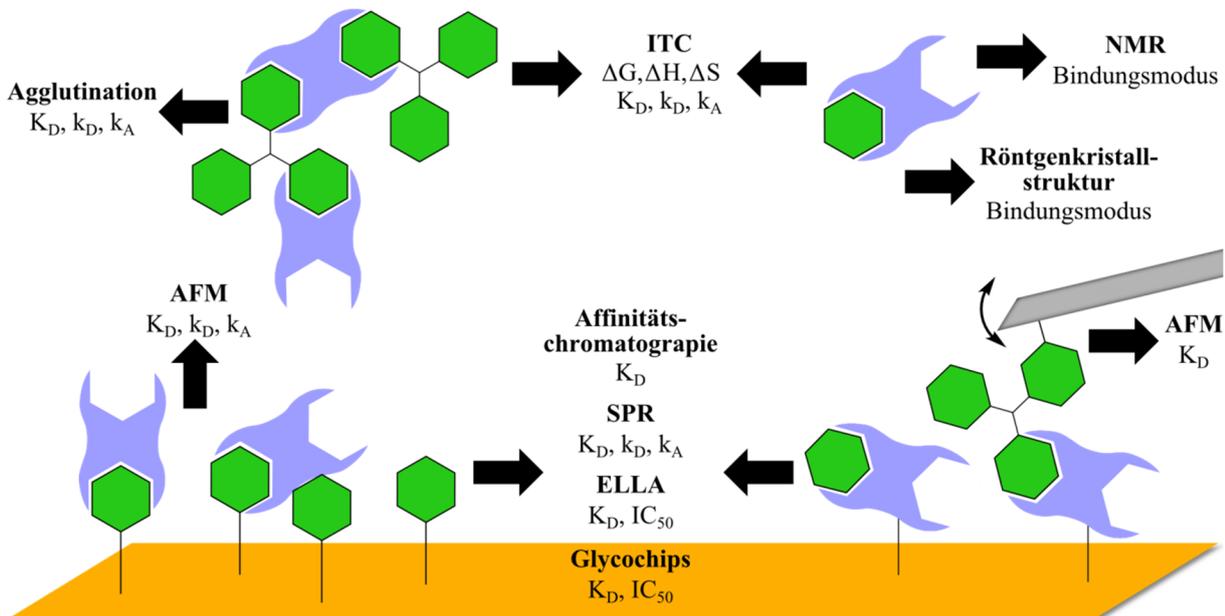


Abb. 2-13: Schematische Zusammenfassung der vorgestellten Methoden zur Untersuchung und Quantifizierung von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen. Das Bindungsmotiv (grünes Sechseck) kann sowohl ein Monosaccharid als auch ein komplexes Oligosaccharid sein.

Für die **Affinitätschromatographie** wird ein Bindungspartner (meist das Lectin) auf einer Säule immobilisiert. Das Kohlenhydrat als potentieller Bindungspartner wird markiert (radioaktiv, fluoreszenzaktiv) und in Lösung auf die Säule gegeben, von der es bei Affinität zum Lectin erst deutlich nach dem Totvolumen wieder eluiert wird. Durch Elution unter kompetitiver Zugabe einfacher Monosaccharide kann auf die terminal präsentierte Struktur geschlossen werden. Die *frontal affinity chromatography* ermöglicht zudem die Bestimmung von K_D -Werten aus der Differenz der Elutionszeiten der bindenden Kohlenhydrate zu einer nichtbindenden Referenzsubstanz.^[149] Die Methode eignet sich zur Untersuchung schwacher Wechselwirkungen ($K_D > 10^{-7}$ M) und benötigt nur minimale Mengen der Kohlenhydrate (0.5 pmol/Messung).^[123]

Mit der **Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)** können zusätzlich zum K_D -Wert auch kinetische Parameter wie die Assoziations- und Dissoziationsraten (k_A und k_D) eines Komplexes bestimmt werden. Dazu wird ebenfalls einer der Bindungspartner immobilisiert, dies geschieht auf einem mit einem entsprechend vorfunktionalisierten Goldfilm (2.5 bis wenige zehn Nanometer dick) beschichteten Glaträger. Auf der Rückseite des Goldfilms werden durch Einstrahlung polarisierten Lichts Oberflächenplasmonen erzeugt, deren Anregungswellenlänge (Plasmonenresonanz) von der chemischen Umgebung des Films abhängt. Der zweite Bindungspartner wird über einen mikrofluidischen Aufbau zutitriert; findet eine Bindung zwischen Kohlenhydrat und Protein statt, verändert dies die Resonanzfrequenz, was als Änderung im Brechungsindex auf der Filmrückseite detektiert wird.^[124]

Der *enzyme linked lectin assay (ELLA)* leitet sich vom ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) ab, einem antikörperbasierten Nachweisverfahren, das standardmäßig in 96-Well-Platten durchgeführt wird. Einer der Bindungspartner (in diesem Fall meist das Kohlenhydrat) wird auf der Kunststoffoberfläche der Wells immobilisiert und die zu bindenden Proteine in Lösung zugegeben. Die Detektion erfolgt durch Auslesen einer Fluoreszenz- oder Chemolumineszenzintensität, weshalb die verwendeten Lectine zuvor entweder mit einem Fluoreszenzfarbstoff oder einem Reporterenzym (alkalische Phosphatase oder Meerrettichperoxidase) gekoppelt werden müssen. Im zweiten Fall muss zudem ein Substrat für das Enzym zugegeben werden, dessen Umsetzung durch einen Farbumschlag oder Chemolumineszenz detektiert wird. Durch Verwendung von Konzentrationsreihen können IC_{50} -Werte sowie relative K_D -Werte in Bezug auf eine Referenzverbindung bestimmt werden. Auch kann das Screening durch das 96-Well-Format automatisiert im Hochdurchsatzverfahren durchgeführt werden, wodurch allerdings der Bedarf an Kohlenhydraten und Lectinen stark ansteigt.^[127]

Eine Weiterentwicklung und Miniaturisierung des ELLA sind die **Glycochips (Microarrays)**. Hier werden ebenfalls meist die Kohlenhydrate immobilisiert und die Lectine anschließend in Lösung zugegeben. Im Gegensatz zum ELLA sind allerdings nur geringste Mengen der Zuckerlösungen nötig, die als winzige Tropfen (einige Nanoliter) auf eine funktionalisierte Oberfläche (meist Glas oder Gold) aufgetragen werden. Sind die verwendeten Lectine fluoreszenzmarkiert, können Bindungsereignisse über die Fluoreszenzintensität detektiert werden. Auf leitenden Oberflächen ist zusätzlich eine massenspektrometrische Analytik möglich. Der extrem geringe Materialbedarf und die Möglichkeit, viele hundert Kohlenhydrate parallel auf einem Chip zu analysieren machen den Microarray ideal für Hochdurchsatzverfahren und Glycomstudien. Durch Verwendung von Konzentrationsreihen können zudem ebenfalls K_D -Werte bestimmt werden.^[136, 140]

Da in dieser Arbeit ausschließlich Glycochips zur Untersuchung von Kohlenhydrat-Lectin-Wechselwirkungen verwendet wurden, wird auf die zugrundeliegenden Prinzipien und Methoden in Kapitel 2.3 im Detail eingegangen.

Bindungskräfte zwischen Sacchariden und Proteinen sind durch Verwendung eines **rasterkraftmikroskopischen (AFM) Aufbaus** auch direkt messbar. Hierfür wird einer der Bindungspartner auf einer Oberfläche immobilisiert, sein Pendant (auch ganze Zellen können verwendet werden) befindet sich gebunden am Ende des Hebelarms (Cantilever) eines Rasterkraftmikroskops. Dieser wird zunächst auf die Oberfläche abgesenkt, so dass eine Bindung zustande kommen kann. Beim Zurückziehen des Cantilevers wird der Kraftaufwand gemessen, der nötig ist, die Spitze wieder von der Oberfläche zu lösen.^[143, 150] Auch Bindungspräferenzen und K_D -Werte können am AFM bestimmt werden, dazu wird der Zucker auf der Oberfläche des Hebelarms immobilisiert und dieser in einer mikrofluidischen Messzelle mit der Lectinlösung^[142] oder auch ganzen Zellen^[144] umspült. Die Bindung der Proteine induziert in der Oberfläche eine mechanische Spannung, die sich durch Verbiegen des Cantilevers löst. Aus der Höhe des Ausschlags in Abhängigkeit von der eingesetzten Lectinkonzentration kann die Dissoziationskonstante des Komplexes bestimmt werden.^[142]

Neben den bisher beschriebenen Methoden mit mindestens einem immobilisierten Bindungspartner sind Untersuchungen zu Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen auch in

Lösung möglich. Im einfachsten Assay wird ähnlich zum Blutgruppentest eine **Agglutination** zwischen Zucker- und Lectinstrukturen induziert. Eine messbare Partikelgröße wird nur durch Kombination zweier mindestens bivalenter Bindungspartner und die entsprechende dreidimensionale Vernetzung erzielt. Besonders gut eignet sich dieser Assay deshalb für die Untersuchung von Zelloberflächen oder beschichteten (Nano-)Partikeln.^[134] Neben dem rein optischen, qualitativen Nachweis einer Verklumpungsreaktion^[132] kann die Partikelbildung und -größenverteilung auch zeitaufgelöst mittels dynamischer Lichtstreuung^[133] oder Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie^[134] verfolgt werden, so dass Aussagen zu kinetischen Parametern wie Assoziations- und Dissoziationsraten möglich sind.

Exakte Daten für die kinetischen sowie thermodynamischen Beiträge auch für monovalente Wechselwirkungen liefert die **Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)**. In zwei parallel geschalteten Messzellen wird die freiwerdende bzw. verbrauchte Wärmeenergie bei sukzessiver Zugabe einer Kohlenhydratlösung zum gelösten Lectin bestimmt. Diese steht in direktem Zusammenhang mit der Bindungsenthalpie (ΔH). Durch Kombination mit der ebenfalls bestimmbaren Dissoziationskonstante K_D kann auch der entropisch bedingte Anteil der Bindungsenergie berechnet werden.^[128-129] Besonders für die Untersuchung schwacher Wechselwirkungen (ΔH klein) werden allerdings erhebliche Mengen an Kohlenhydrat sowie Protein benötigt, um eine messbare Wärmedifferenz zu erzielen, was den Einsatz von ITC-Messungen für breite Screenings unattraktiv macht.

Zusätzlich zum Wissen um interagierende Kohlenhydrat-Lectin-Kombinationen und die thermodynamischen sowie kinetischen Parameter der Interaktion sind insbesondere im Ligandendesign auch Kenntnisse der Wechselwirkungen auf molekularer Ebene nötig. Der exakte Bindungsmodus eines Kohlenhydrats in der CRD eines Lectins, der die Identifizierung der mit dem Zucker interagierenden Aminosäureseitenketten sowie des Wasserstoffbrückennetzwerks beinhaltet, kann unter anderem anhand einer **Röntgenkristallstruktur** untersucht werden. Zunächst muss das Protein isoliert und kristallisiert werden. Durch Zugabe eines Bindungspartners kann der Kristallisationsprozess in manchen Fällen unterstützt werden. Der Ligand kann aber auch nachträglich durch sogenanntes *soaking* in den Proteinkristall eingeführt werden.^[151] Durch Bestrahlung des Kristalls mit kurzweiliger Röntgenstrahlung (z. B. aus einer Synchrotronquelle) wird ein Beugungsmuster erzeugt, aus dem nach Fouriertransformation die Elektronendichteverteilung des Komplexes ermittelt wird. Daraus wird schließlich eine dreidimensionale Struktur rekonstruiert, in der aufgrund der Abstände zwischen einzelnen Atomen oder Atomgruppen auf attraktive und repulsive Wechselwirkungen geschlossen werden kann.^[71, 91]

Obwohl die Kristallstruktur detaillierte Informationen zur dreidimensionalen Struktur des Kohlenhydrat-Protein-Komplexes liefert, bildet die Situation im Festkörper nicht immer die natürliche Bindungssituation, die in wässriger Umgebung vorliegt, ab. Zudem lassen sich nicht alle Proteine ohne weiteres kristallisieren. Hier kann die **NMR-Spektroskopie** mit verschiedenen Techniken zusätzliche Daten bereitstellen. Zum Einsatz kommen unter anderem die Sättigungs-Transfer-Differenz (STD)-NMR-Spektroskopie sowie diverse NOE (*Nuclear Overhauser-Effekt*)-Methoden. In beiden Fällen werden nur geringe Mengen des Lectins benötigt, die mit einem Überschuss des Liganden versetzt werden.

Bei der (STD)-NMR werden einzelne Protein-Resonanzfrequenzen eingestrahlt und damit abgesättigt. Intramolekularer Spintransfer führt in Folge zur Absättigung aller Proteinresonanzen. An der Kontaktfläche zwischen Protein und Ligand ist außerdem ein intermolekularer Spintransfer möglich, so dass Resonanzen des Kohlenhydrats gesättigt werden. Durch Differenzbildung zweier Spektren, aufgenommen mit bzw. ohne Proteinsättigung, treten die Signale der Teile des Liganden hervor, die in engem Kontakt mit der Lectinoberfläche stehen. Mit dieser Methode können auch einzelne Bindungspartner aus komplexen Mischungen von Sacchariden detektiert sowie Bindungsprozesse auf ganzen Zellen untersucht werden.^[145, 147] Die Transfer-NOE-NMR-Spektroskopie liefert zusätzliche Informationen zur Konformation des Kohlenhydrats im Komplex. Voraussetzung dafür ist ein schneller Austausch der gebundenen und ungebundenen Form (K_D -Werte im mikro- und millimolaren Bereich). Im Komplex nimmt der Zucker dabei seine Vorzugskonformation ein und sich räumlich nahe kommende Protonen können durch Spintransfer miteinander wechselwirken. Dieser Spintransfer wird auf die ungebundenen Liganden in Lösung übertragen und mittels phasensensitiver 2D-NOESY-Messung detektiert.^[146, 152]

2.3 Glycochips

Ein limitierender Faktor für die Untersuchung von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen ist die begrenzte Verfügbarkeit komplexer Glycokalyx-Saccharide, die entweder aufwändig synthetisch dargestellt^[153-157] oder aus natürlichen Quellen isoliert und gereinigt werden müssen.^[79, 158-160] Deshalb wurden innerhalb des letzten Jahrzehnts miniaturisierte Verfahren entwickelt, die trotz geringen Materialverbrauchs breit angelegte Studien mit hohem Informationsgehalt ermöglichen.

Unter dem Begriff Glycochip werden verschiedene Methoden zur Untersuchung von Kohlenhydrat-Protein-Bindungsprozessen auf Oberflächen zusammengefasst, unter anderem die bereits kurz erwähnten Microarrays und andere Array-Formate, wobei jeweils die Saccharide immobilisiert werden. Entwickelt wurden sie innerhalb der letzten 15 Jahre in Anlehnung an die DNA- und Proteinmicroarrays der Genomics- und Proteomicsära.^[137, 161] Auf ihnen ist es möglich, artifizielle, vereinfachte „Zelloberflächen“ bzw. deren Glycokalyx darzustellen und biologisch relevante Interaktionen in einer dem natürlichen Vorbild angelehnten zwei- bzw. dreidimensionalen Umgebung zu untersuchen. Dabei wird allerdings die Krümmung der Zelloberflächen vernachlässigt, die einen wichtigen Beitrag zur Präsentation der Kohlenhydrat-epitope liefert. Versuche mit modifizierten Mikrobeads können hier wertvolle Zusatzinformationen liefern.^[162]

Als Substrat für Microarrays dienen vor allem modifizierte Glas- sowie Kunststoffoberflächen im Format eines Mikroskopieobjektträgers (25 x 75 mm), die mit den gängigen Systemen für DNA- und Proteinarrays kompatibel sind. Die Immobilisierung erfolgt unter Verwendung verschiedenster Linkerstrategien und Oberflächenfunktionalisierungen aus einer Lösung, über deren Konzentration die Dichte der Glycane einstellbar ist, so dass über Cluster- und Multivalenzeffekte auch die Untersuchung nur schwach affiner Bindungspartner möglich wird (vgl. Abb. 2-9 sowie Abb. 2-14).^[75, 154, 163-168]

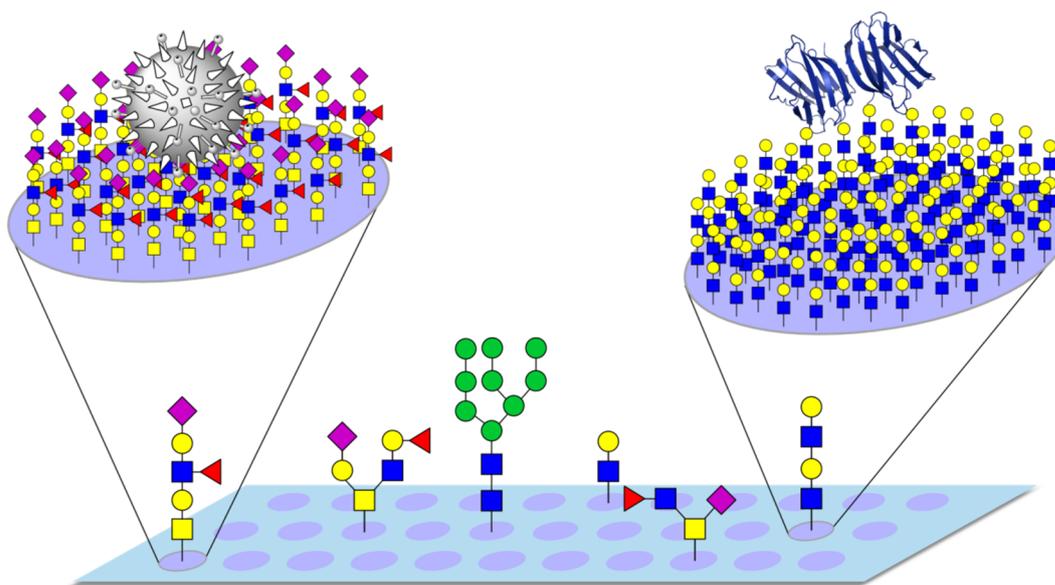


Abb. 2-14: Schematische Darstellung der Oberfläche eines Glycochips. Auf jedem Spot wird ein Kohlenhydratmotiv vielfach präsentiert, so dass stabile multivalente Interaktionen mit verschiedenen Bindungspartnern wie Proteinen (rechts: Galectin-1, pdb 1W6P^[73]) oder ganzen Zellen sowie Partikeln (links: Virus) ermöglicht werden. Darstellung modifiziert nach Rillahan *et al.*^[137]

Dabei werden gleichzeitig nur minimale Mengen der Kohlenhydrate benötigt, die als Spots entweder im Mikrokontaktverfahren oder kontaktlos auf die Oberfläche gebracht werden. Bei ersterem werden feine Nadeln (Pins) aus Metall (teilweise mit integrierten Kapillaren) in die zu spottende Lösung getaucht. Durch Oberflächenspannung sowie Kapillarkräfte bleiben kleine Volumina (< 1 nl) an ihrer Spitze haften. Die Pins werden für kurze Zeit auf die Arrayoberfläche gedrückt und die Lösungen als Spots (Durchmesser bis mehrere $100\ \mu\text{m}$) abgesetzt.^[159-160, 165] Das kontaktlose Verfahren verwendet piezogesteuerte Ink-Jet-Drucker. In feine Kapillaren werden definierte Volumina (zwischen $333\ \text{pL}$ ^[169] und $1\ \text{nL}$ ^[170-171]) aufgezogen und durch Erzeugung eines Überdrucks auf die Oberfläche gesprüht. Dabei werden Spots mit Durchmessern zwischen 100 ^[169, 172] und $300\ \mu\text{m}$ ^[158] erhalten. Neben dem pro Spot verwendeten Volumen sowie dem Pindurchmesser bzw. der Druckerdüse beeinflussen auch die Konzentrationen der Zucker und verschiedener gelöster Salze des Puffers die erzielte Spotgröße und -morphologie.^[171] Im Vergleich zu den für ELLA (siehe Kapitel 2.2) verwendeten 96-Well-Platten (Fläche pro Well ca. $0.32\ \text{cm}^2$) reduziert sich die Oberfläche pro Spot drastisch auf unter $1\ \%$ (bei $300\ \mu\text{m}$ Durchmesser ca. $2.8 \cdot 10^{-3}\ \text{cm}^2$), zusätzlich ist bei derart kleinen Flächen das zur vollständigen Benetzung benötigte Probenvolumen stark verringert (für ein 96-Well $20\text{-}30\ \mu\text{l}$).

So können auf der Fläche eines einzigen Chips mehrere tausend Spots positioniert und Bindungsereignisse in Parallelexperimenten mit äußerst geringen Lectinmengen untersucht werden. Werden der Spotting-Prozess und die sich anschließende Analytik zudem automatisiert, sind höchst effiziente Hochdurchsatz-Screenings möglich.^[135]

Erste Untersuchungen zu Glyco-(Micro)arrays wurden 2002 veröffentlicht,^[137] ihre Methodik lehnte sich an die ELISA-Systeme an, bei denen die Analyten meist nichtkovalent auf der Oberfläche immobilisiert werden. Da im weiteren Verlauf der Untersuchung von Bindungsprozessen viele Waschschriffe folgen, sollte die Bindung der Kohlenhydrate auf der Oberfläche möglichst stabil und resistent sein, hierfür wurden verschiedenste Strategien entwickelt (siehe Abb. 2-15), sowohl kovalente als auch nichtkovalente Interaktionen werden genutzt. Eine Linkereinheit, die eine für die Anbindung notwendige funktionelle Gruppe bereitstellt, den Abstand zur Oberfläche vorgibt und die dreidimensionale Ausrichtung der Glycane beeinflusst,^[138, 173] kann zusätzlich am reduzierenden Ende eingeführt werden.^[137]

Durch den Verzicht auf diese Linkereinheit können aus natürlichen Quellen isolierte Kohlenhydrate ohne zusätzlichen synthetischen Aufwand direkt auf den Arrays immobilisiert werden (Abb. 2-15a - h). Im Gegenzug können allerdings der Verknüpfungspunkt und die Ausrichtung der Glycane nur bedingt kontrolliert werden, was zu einer inhomogenen Präsentation der Bindungsmotive führt.

Materialien wie Nitrocellulose^[174-175] oder oxidiertes Polystyrol^[159] eignen sich zur Adsorption von Kohlenhydraten (Abb. 2-15a), die durch unspezifische hydrophobe sowie hydrophile Wechselwirkungen nicht-kovalent immobilisiert werden. Eine stabile Bindung gelingt allerdings erst mit länger-kettigen Oligo- und Polysacchariden, Proteoglycanen und (Neo)Glycoproteinen. Trägt das Glycan durch Uronsäuren oder Seitenkettensubstitutionen eine negative Überschussladung, können elektrostatische Wechselwirkungen zu positiv geladenen Gruppen, z. B. protonierten Aminen, ausgebildet werden (Abb. 2-15b).

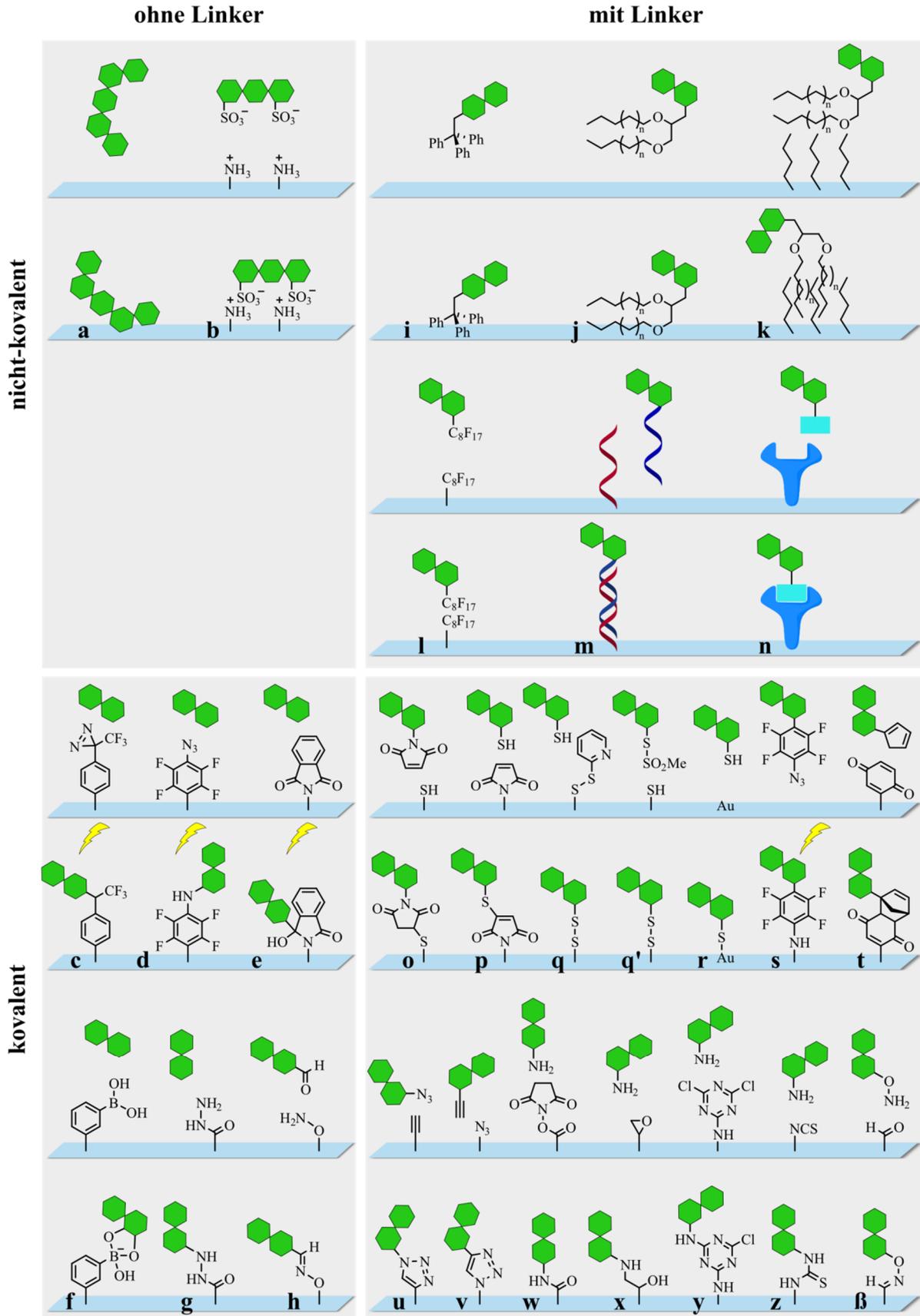


Abb. 2-15: Übersicht diverser Methoden, Kohlenhydrate (grün) nicht-kovalent oder kovalent, mit bzw. ohne Verwendung eines Linkers auf Glycochips zu immobilisieren. Im Text wird auf die entsprechenden Buchstaben verwiesen. Darstellung modifiziert nach Rillahan *et al.*^[137]

Shipp *et al.* nutzten diverse Heparinanaloga auf Poly-L-Lysin-Arrays,^[176] während Carion *et al.* synthetisch sulfatierte sowie carboxymethylierte Dextrane auf aminoterminierten Glasoberflächen immobilisierten, um den Einfluss des Substitutionsmusters auf Bindungsprozesse zu untersuchen.^[177]

Eine stabile, kovalente Anbindung auch kürzerer Zuckerstrukturen (bis hin zum Monosaccharid) gelingt zum Beispiel photochemisch. Der Array trägt hierfür funktionelle Gruppen, die unter UV-Bestrahlung Radikale bilden und statistisch in C-H-Bindungen der Kohlenhydrate insertieren (Abb. 2-15c-e). Angeloni *et al.* nutzten Aryltrifluormethyldiazirin (Abb. 2-15c), das unter Stickstoffabspaltung ein Carben bildet, um Polysaccharide (LPS) sowie (Neo)Glycoproteine zu immobilisieren und ihre Bindungseigenschaften gegenüber diversen Lectinen zu untersuchen.^[178] Tyagi *et al.* konnten durch Reaktion mit Perfluorphenylazid (PFPA, Abb. 2-15d), welches photochemisch ein Nitren bildet, eine Auswahl von Mono-, Di- und Trisacchariden auf der Oberfläche eines SPR-Sensors immobilisieren und ebenfalls Bindungsstudien mit Lectinen durchführen.^[179] Carroll *et al.* stellten einen Phthalimidarray (Abb. 2-15e) vor, auf dessen Oberfläche sie durch Verwendung photolithographischer Masken Muster von Mono-, Di- und Oligosacchariden sowie Dextranen aufbrachten. In den belichteten Bereichen kommt es durch ein angeregtes Phthalimid zur Wasserstoffabstraktion am Zucker mit anschließender Rekombination der beiden Radikale. Diese konnten durch Inkubation mit Lectinen sowie Antikörpern nachgewiesen werden.^[180]

Auch Boronsäuren (siehe Exkurs: synthetische Lectine, Kapitel 2.2) sind geeignet, underivatisierte Glycane auf Oberflächen zu fixieren. Ein entsprechender Assay wurde von Hsiao *et al.* zur Präsentation von Kohlenhydratketten verschiedener Länge (Mono- bis Polysaccharid) verwendet, wobei erst ab einer Kettenlänge von zwei eine signifikante Bindung zur Boronsäure stattfindet und die Zucker durch Lectine nachgewiesen werden können.^[181]

Systeme auf Basis von Carbohydraziden sowie Oxyaminen nutzen die intrinsische Reaktivität der reduzierenden Zucker zur Anbindung. In beiden Fällen ist damit ihr Verknüpfungspunkt vorgegeben, allerdings bilden die Hydrazide bevorzugt ringgeschlossene Halbaminal-Ether aus (Abb. 2-15g),^[182-184] während es bei der Reaktion mit Oxyaminen zur Öffnung des Halbacetals unter Bildung eines Oxims kommt (Abb. 2-15h).^[184] Damit steht dieser Monosaccharid-Baustein nicht mehr für Erkennungsprozesse zur Verfügung.^[185-186]

Auch wenn die Einführung einer Linkereinheit am reduzierenden Ende des Glycans einen höheren synthetischen Aufwand bedeutet, bietet sie eine Reihe von Vorteilen: die Kohlenhydrate werden in einer dem natürlichen Vorbild nahen Art und Weise präsentiert, wobei das reduzierende Ende der Oberfläche am nächsten liegt. Über die Länge und Art des Linkers können die Freiheitsgrade der Beweglichkeit eingestellt und so die Zugänglichkeit der Zucker für potentielle Bindungspartner moduliert werden. Nicht zuletzt werden die Glycane in einem einheitlichen Bindungsmodus präsentiert, so dass in Bindungsstudien eindeutige und leichter reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden (Abb. 2-15i-β).

Aus der Arbeitsgruppe von Flitsch stammt ein tritylbasierter Oberflächenanker (Abb. 2-15i), der die nicht-kovalente Anbindung von Glycanen auf Polystyrol sowie Glas ermöglicht. In Kombination mit einer leitenden Rückseite (aufgeklebte Aluminiumfolie) dient diese

Tritylgruppe auch als Matrix-Ersatz für MALDI-Experimente auf der Oberfläche.^[187-188]

Dem Vorbild der Glycolipide angelehnt ist die nicht-kovalente Immobilisierung von Neoglycolipiden auf Nitrocellulose sowie Polyvinylidenfluorid-Membranen (PVDF)^[158] oder Silicagel (DC-Platten),^[189] wie von der Gruppe um Feizi vorgestellt (Abb. 2-15j). Der unpolare Lipid-Anteil der Glycokonjugate geht stabile van-der-Waals-Wechselwirkungen mit der Oberfläche ein und präsentiert die Kohlenhydrate als Kopfgruppe. Die Oberfläche kann zuvor auch mit langen, unpolaren Kohlenwasserstoffen modifiziert werden, in deren Zwischenräume sich die Neoglycolipide wie in einer Membran einlagern (Abb. 2-15k). Als Trägermaterial wurden bisher unter anderem Gold^[190] sowie Glas^[191] verwendet. Einen Schritt weiter gingen Zhu *et al.*, die eine cholesterinstabilisierte Lipid-Doppelschicht auf Glas herstellten, in die Neoglycolipide eingelagert wurden. Auf dieser Oberfläche sind die Zucker begrenzt mobil, so dass sich, durch den Bindungspartner (hier *E. coli*-Zellen) induziert, Cluster bilden können und das dynamische System noch näher am natürlichen Vorbild einer Zelloberfläche liegt als andere Arrays.^[163]

Ausschließlich auf hydrophoben Wechselwirkungen beruht das Arrayformat von Ko *et al.*: sowohl die Kohlenhydrate als auch die Glasoberfläche des Chips wurden mit perfluorierten Alkylketten versehen (Abb. 2-15l) und nicht-kovalent verknüpft.^[192]

Auf Grundlage der Hybridisierung komplementärer DNA-Einzelstränge können Glycane auf (kommerziell erhältlichen) DNA-Arrays immobilisiert werden (Abb. 2-15m). Dazu wird jeder Zucker mit einer spezifischen Basensequenz verknüpft und über dessen Komplementärmotiv auf dem Chip gebunden.^[193] Auch die Inkubation ganzer Substanzbibliotheken aus einer Lösung führt zur spezifischen Anordnung der Glycane auf der Unterlage. Huang *et al.* stellten zudem eine Methode vor, verschiedene Kohlenhydrate mit jeweils einer kurzen sDNA-Sequenz auf einem langen Strang zu kombinieren, um kooperative Bindungseffekte zu untersuchen.^[194]

Die stabile Bindung zwischen dem Protein Streptavidin und seinem Bindungsmotiv Biotin (K_D pro Untereinheit des Tetramers 10^{-14} - 10^{-15} M) wird häufig für die Markierung biologischer Proben sowie Nachweisreaktionen verwendet. Auch die erste Chipgeneration des *Consortium for Functional Glycomics* (CFG) basierte auf der Biotin-Streptavidin-Bindung (Abb. 2-15n). Die Kohlenhydratstrukturen wurden mit dem Biotinmotiv gekuppelt^[195] und auf mit Streptavidin (bzw. NeutrAvidin, der deglycosylierten Form des Proteins) beschichteten 384-Well-Mikrotiterplatten gebunden.^[196] Bereits 2005 wurde so eine Bibliothek von 172 Zuckermotiven für Bindungsstudien am humanen Protein Siglec-8 genutzt.^[197] Einen miniaturisierten Array auf gleicher Basis zur Anbindung synthetischer Mucin-Mimetika auf Glasoberflächen stellte die Gruppe um Bertozzi vor, die Multivalenz- und Vernetzungseffekte in der Bindung zu verschiedenen Lectinen untersuchte.^[165]

Nochmals stabiler als eine nicht-kovalente Wechselwirkung zwischen Linker und Array-Oberfläche ist eine kovalente Verknüpfung. Neben den thiol- (Abb. 2-15o-r) und aminbasierten (Abb. 2-15w-β) Strategien werden auch Photoreaktionen (Abb. 2-15s) sowie Cycloadditionen (Abb. 2-15t-v) eingesetzt.

Einer der ersten vorgestellten Glyochips basierte auf der Michael-Addition von Thiolen an Maleimide. Park und Shin derivatisierten Mono- und Disaccharide mit Maleimidlinkern

verschiedener Länge, immobilisierten sie auf thioleffunktionalisierten Glaschips ununtersuchten den Einfluss des Linkers auf die Bindung zu Lectinen (Abb. 2-15o).^[198] Durch Aufkleben einer Maske aus Kunststoff unterteilten sie den Array in Felder, die unabhängig voneinander mit verschiedenen Proteinen untersucht werden konnten. Zudem bauten sie das Sialyl-Le^x-Tetrasaccharid ausgehend von GlcNAc durch drei enzymatische Transformationen direkt auf der Oberfläche auf.^[199] Die beiden funktionellen Gruppen können auch in umgekehrter Geometrie eingesetzt werden (Abb. 2-15p): die Arbeitsgruppe um Seeberger immobilisierte thiolterminierte Kohlenhydrate auf Maleimid-Chips und führte damit unter anderem SPR-Messungen und massenspektrometrische Untersuchungen durch.^[153, 171]

Auch die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen Glycan und Oberfläche ist möglich. Die Gruppe um Kiessling aktivierte dazu die thioleffunktionalisierte Oberfläche eines SPR-Chips mit 2,2'-Dipyridyldisulfid, das erzeugte gemischte Disulfid wurde mit thioleffunktionalisierten Monosacchariden unter Abspaltung von Pyridin-2-thion (Abb. 2-15q) zum neuen Disulfid umgesetzt. Neben der Bestimmung von K_D-Werten gegenüber Lectinen nutzten sie das SPR-Imaging zur Darstellung der Oberflächenverteilung der Kohlenhydrate; dabei wird die Stärke des SPR-Signals orts aufgelöst gemessen und falschfarbencodiert wiedergegeben.^[125] Auch Harris *et al.* nutzten Disulfidbrücken, um Kohlenhydrate zu immobilisieren, allerdings aktivierten sie das zuckerverknüpfte Thiol als Methylthiosulfonat, das mit Oberflächen-Thiolen reagierte (Abb. 2-15q').^[200] In beiden Fällen konnten die gebundenen Glycane durch Einwirkung eines Disulfidbrücken-lösenden Reagenzes (Dithiothreitol, DTT bzw. Natriumdodecylsulfat, SDS) wieder von der Oberfläche entfernt und diese neu funktionalisiert werden („wiederbeschreibbarer Glycochip“).

Auf Goldoberflächen können Thiole auch direkt unter Ausbildung selbstorganisierender Monolagen (self assembled monolayers, SAM) immobilisiert werden (Abb. 2-15r). Neben der Funktionalisierung der Glycane mit Thiol-Linkern und Anbindung dieses Konjugats^[188, 201] kann auch zunächst ein SAM auf der Goldoberfläche ausgebildet werden, über dessen Kopfgruppe nachträglich die Kohlenhydrate angeknüpft werden. Diese Methode wurde besonders von der Gruppe um Flitsch in Verbindung mit MALDI-Massenspektrometrie zur Analyse weiterentwickelt und etabliert.^[182-183, 202-203]

Exkurs: SAMs auf Goldoberflächen

Eine selbstorganisierende Monolage (SAM) ist eine hochsymmetrische Anordnung von Molekülen auf einer Oberfläche – meist von edleren Metallen wie Gold, Silber, Platin oder Kupfer. Sie formiert sich spontan durch Abscheidung aus einer Lösung oder der Gasphase. Das meistverbreitete und auch für Glycochips immer stärker genutzte System basiert auf Alkylthiolen, die sich auf einer Gold-Oberfläche anordnen. Die ersten SAMs dieser Art wurden von Nuzzo und Allara 1983 beschrieben.^[204]

Der Mechanismus und die Kinetik der SAM-Bildung aus der Gasphase wurden intensiv untersucht^[205] und sind vermutlich auch auf die Abscheidung aus einer Lösung übertragbar: wird die Oberfläche des Golds mit dem Alkylthiol benetzt, kommt es zunächst (innerhalb von Minuten) zur Adsorption der Moleküle. Diese sind allerdings noch nicht einheitlich ausgerichtet und „liegen“ teilweise auch auf der Oberfläche. Innerhalb von etwa zwölf Stunden richten sich die Alkylketten gleichmäßig in einem Winkel von ca. 30° zur Oberfläche

aus (siehe Abb. 2-16). Die Dauer der Ausrichtungsphase sowie der Winkel werden durch die Länge und Gestalt des Alkylrests beeinflusst.^[206-207] An das Ende der Alkylkette kann als „Kopf“ der SAM eine funktionelle Gruppe integriert werden, welche die kovalente Anbindung weiterer Moleküle (z.B. Glycane) erlaubt. Die Dichte der potentiellen Verknüpfungspunkte kann durch Mischen verschiedener Alkyle mit und ohne funktionelle Gruppe bzw. unterschiedlicher Länge individuell eingestellt werden.

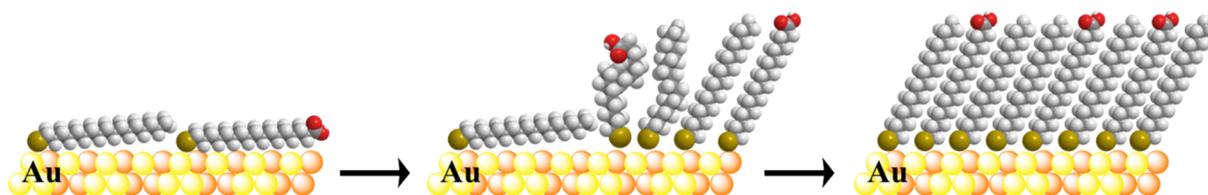


Abb. 2-16: Ausbildung einer SAM aus Alkylthiolen auf einer Gold-Oberfläche. Nach der schnellen, aber ungerichteten Adsorption der Moleküle kommt es in einem langsamen Prozess zur hochsymmetrischen Ausrichtung. Durch Mischen von Alkylen mit und ohne funktionelle Kopfgruppe (hier: Carbonsäure) kann die Dichte der Verknüpfungspunkte auf der Oberfläche gesteuert werden.

Darstellung modifiziert nach http://www.seas.upenn.edu/~bonnell/research/Properties_of_Molecules.html.

Zur Darstellung von Glychochips auf SAM-Basis werden die Alkylketten am Kopfende häufig mit hydrophilen Polyethylenglycoleinheiten ausgestattet. Die zur Verknüpfung der Zucker verwendeten funktionellen Einheiten sind vielfältig und reichen von der bereits vorgestellten Thiol-Maleimid-Kombination^[208] über Cycloadditionen^[208-209] bis hin zu aminreaktiven Gruppen.^[183, 202, 209-210]

Das bereits im Rahmen der linkerfreien Immobilisierung vorgestellte PFPA wurde von Deng *et al.* mit einem PEG-Linker kombiniert, um Kohlenhydrate auf polyethylenbasierten Oberflächen kovalent anzubinden (Abb. 2-15s).^[211]

Eine weitere interessante Reaktionsklasse zur Linkerbindung auf dem Glychochip ist die Cycloaddition. Die klassische Diels-Alder-Reaktion zwischen Cyclopentadien-terminierten Glycanen und Parachinonen auf einer SAM-Oberfläche (Abb. 2-15t) wurde bereits sehr früh von Houseman *et al.* vorgestellt.^[212] Reaktionen unter inversem Elektronenbedarf zwischen einem Dienophil (Norbonen bzw. terminale Doppelbindung) und dem Dien Tetrazin wurden in der Gruppe um Wiessler entwickelt^[213] und insbesondere von Wittmann für den Glychochip adaptiert. Ihr Linker eignet sich durch Nutzung der vorgestellten Oxyamin-Aldehyd-Chemie (Abb. 2-15h) auch zur Funktionalisierung reduzierender Zucker, die aus natürlichen Quellen isoliert wurden.^[214-215] Auch die Click-Chemie fand Eingang in das Array-Format; ihr bekanntester Vertreter, die dipolare [2+3]-Cycloaddition zwischen Alkinen und Aziden wurde bereits von verschiedenen Gruppen genutzt, wobei sowohl das Azid (Abb. 2-15u)^[216-217] als auch das Alkin (Abb. 2-15v)^[218] im Linker integriert wurde.

Die am intensivsten genutzten Strategien zur Bindung von Kohlenhydraten auf Glychochips beruhen allerdings auf aminterminierten Linkern und komplementär funktionalisierten Oberflächen. Unter diesen ist die mit *N*-Hydrosuccinimid (NHS)-Ethern aktivierte die wohl wichtigste, dabei reagiert das Carbonsäurederivat unter Abspaltung von NHS mit dem Amin des Linkers zum Amid (Abb. 2-15w). Auch der inzwischen 610 Glycane umfassende Säuger-Array (Version 5.1) sowie der 48 Antigene präsentierende Pathogen-Array (Version 1) der CFG beruhen auf dieser Kombination,^[172, 219] die von Blixt *et al.* 2004^[154] vorgestellt wurde. Eine Reihe von Gruppen nutzte das System seitdem, um Interaktionen von Kohlenhydraten

und Lectinen,^[162, 164, 220] Hämagglutininen,^[94-95, 221] Antikörpern^[79, 220, 222-223] sowie ganzen Zellen^[170] zu untersuchen und Dissoziationskonstanten ($K_{D,surf}$) zu bestimmen.^[164, 221-222] Die Gruppe um Wong untersuchte zudem den Einfluss benachbarter, nicht erkannter Glycane auf Bindungsprozesse gegenüber Antikörpern, indem eine Reihe von Kombinationen auf jeweils einem Spot immobilisiert wurden.^[224] Serna *et al.* nutzen die Plattform als Screening-System auf Aktivität zweier rekombinanter Fucosyltransferasen gegenüber einer Reihe von *N*-Glycanen.^[157] Etxebarria *et al.* verwandten als Linker ein langkettiges Polyethylenglycol (PEG-110) und immobilisierten die Glycane nicht nur auf ebenen Flächen sondern auch auf Latex-Nanopartikeln.^[162] Seibel *et al.* setzten in einem inversen Ansatz dagegen einen carbon-säureterminierten Linker ein, um potentielle Akzeptoren der Glycosyltransferase R (GTFR) aus *Streptococcus oralis* auf aminfunktionalisierten Mikrotiterplatten zu immobilisieren und die Übertragungsreaktion des Enzyms zu verfolgen.^[225]

Neben seiner Aufgabe als verknüpfendes Element kann der Linker auch die Isolierung und Reinigung von Glycanen vereinfachen. Das von de Boer vorgestellte 2-Aminobenzamid wird zur reduktiven Aminierung des reduzierenden Endes der (isolierten oder synthetisierten) Kohlenhydrate eingesetzt und erlaubt durch die Fluoreszenz des Aromaten zunächst die Detektion und Reinigung per HPLC, bevor die Glycane auf aminreaktiven Oberflächen gebunden werden. Allerdings kommt es bei der Aminierung zur Öffnung des endständigen Vollacetals, so dass die Methode nur für längere Zuckerstrukturen geeignet ist, deren reduzierendes Monosaccharid nicht im Erkennungsmotiv enthalten ist.^[160] Die Gruppe um Cummings nutzte zunächst ähnliche Linker,^[226-227] modifizierte diese allerdings später, um ringgeschlossene Glycanderivate zu erhalten.^[169] Zusätzlich führten beide Gruppen vergleichende Experimente zur Immobilisierung auf NHS- sowie epoxidfunktionalisierten Oberflächen durch.^[160, 226] Auf zweiteren wird das Amin unter Öffnung des Dreirings addiert (Abb. 2-15x).

Nur vereinzelt wurden dagegen bisher Cyanurchlorid (Abb. 2-15y)^[228-229] und Isothiocyanat (Abb. 2-15z)^[230] zur Anbindung von Aminlinkern sowie Aldehyde zur Kondensation mit Oxyaminen (Abb. 2-15ß)^[231] genutzt.

Kohlenhydrate werden auf Zelloberflächen im Regelfall konjugiert an Proteine oder Lipide präsentiert, die ebenfalls den Bindungsprozess beeinflussen. Diese Wechselwirkungen werden im Fall des klassischen Glycochips vernachlässigt. Durch Verwendung intakter Glycoproteine sowie Glycan-Protein-Konjugate (z.B. mit Serumalbumin^[232] oder Ovalbumin^[233]) zur Anbindung der Kohlenhydrate auf dem Chip können zusätzliche Details des Bindungsprozesses untersucht sowie Glycosylierungsmuster der Proteine identifiziert werden. Ihre Anbindung erfolgt häufig über Lysin-Reste auf aminreaktiven Oberflächen (Epoxide^[232] oder NHS-aktivierte Ester^[233]), aber auch die Adsorption auf Nitrocellulose^[234-235] sowie die Photoreaktion mit Aryltrifluormethyldiazirin (siehe Abb. 2-15c)^[178] wurden beschrieben.

Die Untersuchung von Bindungsprozessen auf dem Glycochip erfolgt meist durch Inkubation mit Proteinen (Lectinen oder Antikörpern), die entweder bereits fluoreszenzmarkiert^[153-154, 157] sind oder nachträglich immunochemisch gefärbt werden,^[79, 169, 174, 227, 232] und anschließende Detektion der Fluoreszenzintensität an einem Array-Reader.^[172] Die erhaltenen Daten können zur Bestimmung von Bindungsstärken (K_D -Werten) und anderen thermodynamischen

Parametern genutzt werden.^[164, 221-222] Auch die Adhäsion ganzer Zellen (Bakterien^[163, 170, 209] oder tierische Zellen^[202, 229]) sowie Viruspartikel^[236-239] ist möglich, sie werden nach einer Färbung ebenfalls fluorimetrisch oder aber unter dem Mikroskop nachgewiesen, wobei die adhärennten Zellen zusätzlich ausgezählt und auf mögliche Deformationen sowie ihre bevorzugte Ausrichtung untersucht werden können.

Labelfreie Methoden der Detektion gebundener Proteine auf Glycochips umfassen die SPR (siehe Kapitel 2.2)^[153, 179, 211] sowie die Massenspektrometrie (meist MALDI).^[190-191] Ungewöhnlicher ist dagegen die Verwendung einer Quarzkristall-Mikrowaage.^[217]

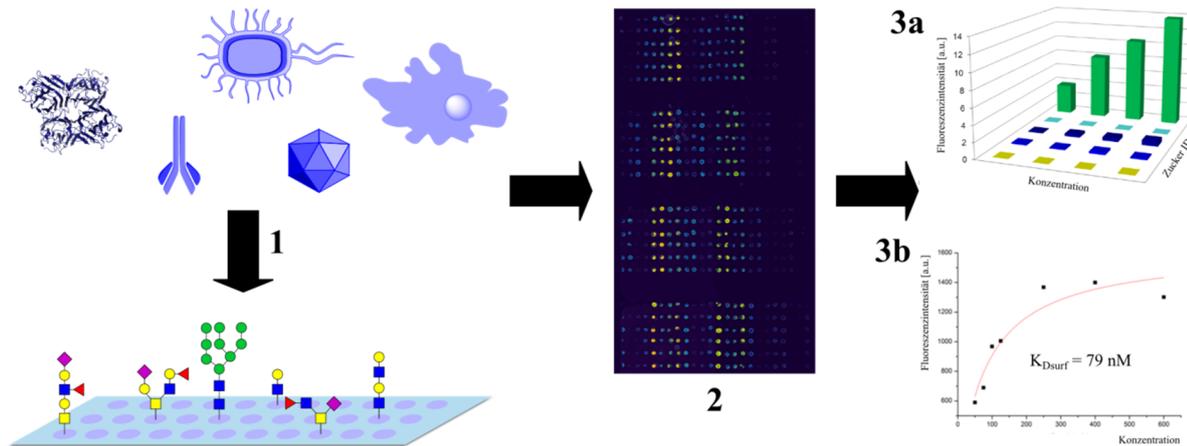


Abb. 2-17: Auswertung eines Glycochips. Kohlenhydratbindende Proteine (Lectine, Antikörper), ganze Zellen (Bakterien, tierische Zellen) oder Viruspartikel werden auf die modifizierte Oberfläche gegeben (1) und über Fluoreszenzmarkierung detektiert (2). Die gemessene Fluoreszenzintensität dient zur Bestimmung von Bindungspräferenzen (3a) sowie Bindungsstärken (3b). Darstellung modifiziert nach Geissner *et al.*^[240]

Neben der Untersuchung von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen werden Glycochips inzwischen häufig für den Nachweis von Glycosyltransferase-Aktivität im miniaturisierten Format genutzt. Hierfür werden die immobilisierten Kohlenhydrate mit geringen Volumina ($< 1 \mu\text{l}$) einer Reaktionsmischung aus Zuckerdonor und verschiedenen Enzymen behandelt. Der Nachweis der entstandenen Produkte erfolgt meist massenspektrometrisch.^[183, 203, 208]

Mit fortschreitender Entwicklung und Automatisierung der Glycochipanalytik findet diese Eingang in die medizinische Forschung und Diagnostik. Veränderungen der Glycosylierungsstadien von Zellen können verfolgt und mit definierten Krankheitsbildern in Verbindung gebracht werden.^[241] Damit eignen sich die identifizierten Kohlenhydratmuster als Biomarker, die häufig bereits in einem frühen Stadium des Krankheitsverlaufs eindeutig nachgewiesen werden können.^[241-242]

Auch Erreger verschiedener Infektionskrankheiten können anhand ihrer Kohlenhydratbindung nachgewiesen und klassifiziert werden, so dass Glycochips die bisher meist langwierige Identifizierung durch Inkulturnahme der Bakterien verkürzen und einen frühzeitigen Therapiebeginn ermöglichen.^[240, 243]

Stowell *et al.* zeigten kürzlich, dass aus Seren gewonnene, gegen bakterielle O-Antigene gerichtete Antikörper auf einem entsprechenden Glycochip nachweisbar sind und so Rückschlüsse auf die Art der Besiedlung mit Mikroorganismen ermöglichen.^[79] Blixt *et al.* konnten in einem ähnlichen Ansatz Salmonellen-Infektionen auf jeweils eine von drei

verschiedenen Serogruppen zurückführen.^[244]

Mit zunehmenden Einsatzmöglichkeiten in der medizinischen Diagnostik sowie dem präventiven Screening wächst allerdings der Aufwand für die Isolierung der Glycane von Zelloberflächen. Zudem wurden inzwischen auch die Oberflächenglycane vieler pathogener Organismen als wichtige Mediatoren für Adhäsions- und Infektionsprozesse erkannt. Um dieser Entwicklung Rechnung zu tragen wurden zur Ergänzung die Lectin-Arrays entworfen.

Exkurs: Lectin-Arrays

Lectin-Arrays sind dem Glycochip komplementäre Formate zur Untersuchung von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen, die vor etwa zehn Jahren zum ersten Mal beschrieben wurden.^[178, 245-247] Im Gegensatz zu den bisher vorgestellten Chips werden hier die Lectine auf der Oberfläche immobilisiert und bindende Glycane nachgewiesen, meist in Form von Glycoproteinen oder präsentiert auf ganzen Zellen.^[139, 248-250] Anhand von Veränderungen im Bindungsmuster gegenüber einer Auswahl von Lectinen können nach einer Clusteranalyse einzelne Zell-Populationen unterschieden werden. Da die Unterschiede oft sehr subtil und durch einfache Bindungsstudien kaum aufzuspüren sind, wurde von Pilobello *et al.* eine Methode entwickelt, die in einem Zweifarbenexperiment einen internen Standard verwendet, anhand dessen geringste Veränderungen des Glycosylierungsmusters sicher detektiert werden können.^[251]

Durch die Verwendung der von Kuno *et al.* entwickelten Evaneszenzfeld-Fluoreszenz-Detektion können selbst schwache Bindungen und geringste Mengen der Bindungspartner (100 pg/ml eines Glycoproteins) nachgewiesen werden. Beim klassischen Array sind zur Verringerung des Hintergrundsignals zahlreiche Waschschriffe nötig, die zu einer niedrigeren Sensitivität führen. Bei der Anregung durch ein Evaneszenzfeld kann darauf völlig verzichtet werden, da die Probe lediglich in einem Abstand von maximal 200 nm zur Arrayoberfläche zur Fluoreszenz angeregt wird und damit in der Lösung vorliegende Fluorophore quasi nicht zur Fluoreszenz beitragen.^[246] Die Verwendung rekombinant hergestellter Lectine^[252-253] sowie genetischer Varianten mit neuen, bisher unbekanntem Bindungsspezifitäten^[254-255] ergänzt die limitierten natürlichen Quellen und bietet erweiterte Screeningmöglichkeiten.

Auch wenn die Glycochips inzwischen eine Reihe ausgereifter Analysemöglichkeiten zur Untersuchung von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen bieten und für medizinisch relevante Fragestellungen genutzt werden können, bleibt ihre Oberfläche doch nur eine sehr vereinfachte Abbildung einer Glycokalyx. Die in Bindungsstudien erhaltenen Ergebnisse zeigen eine starke Abhängigkeit von der Präsentation der Glycane (Oberfläche, Linker),^[173, 256] so dass bereits zwischen einzelnen Arrayformaten signifikante Unterschiede festgestellt werden.^[138, 257]

Interessant wäre es deshalb, das Glycosylierungsmuster einer Zelle zu definieren und exakt einzustellen. Ansätze in diese Richtung nutzen bisher vor allem Mutagenese und anschließende Selektion von CHO (*Chinese Hamster Ovary*)-Zellen, um glycosylierungsdefiziente Varianten (Lec) zu erhalten.^[258-259] Ausgehend von diesen ist es möglich, durch enzymatische Transformationen^[260-263] sowie Metabolic Glycoengineering (siehe Kapitel 2.4) neue einheitliche Glycosylierungsmuster zu generieren.

2.4 Metabolic Glycoengineering

Der Begriff des Metabolic Glycoengineering fällt fast immer in einem Atemzug mit dem Namen Bertozzi. In nicht einmal 15 Jahren hat sie mit ihrer Gruppe diese Technik zur Untersuchung und Modifizierung von Kohlenhydraten auf Zelloberflächen, die an der Grenze zwischen Chemie und Biologie lokalisiert ist, so weit entwickelt, dass sie heute zum Standardrepertoire der Glycomics zählt und Reagenzien sowie komplette Kits kommerziell erhältlich sind (z. B. Click-iT[®], life technologies).

In einem zweistufigen Ansatz wird zunächst ein Monosaccharid, das eine nichtnatürliche Funktionalisierung („chemischer Reporter“^[264-265]) trägt, über den Biosyntheseweg in das Glycom einer Zelle integriert und anschließend durch eine chemische Reaktion selektiv markiert (siehe Abb. 2-18). Dies ermöglicht, Einblick in räumliche und zeitliche Veränderungen der Glycosylierung von Zellen sowie ganzer Organismen zu erhalten, aber auch gezielte Modifizierungen durchzuführen.

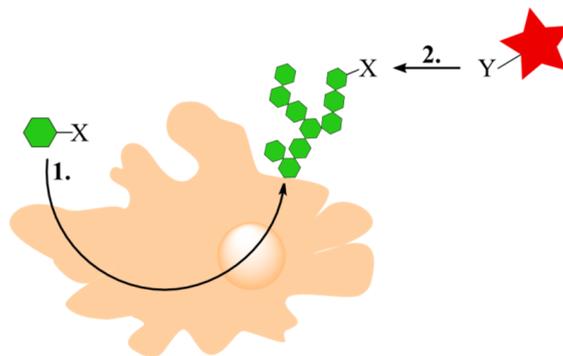
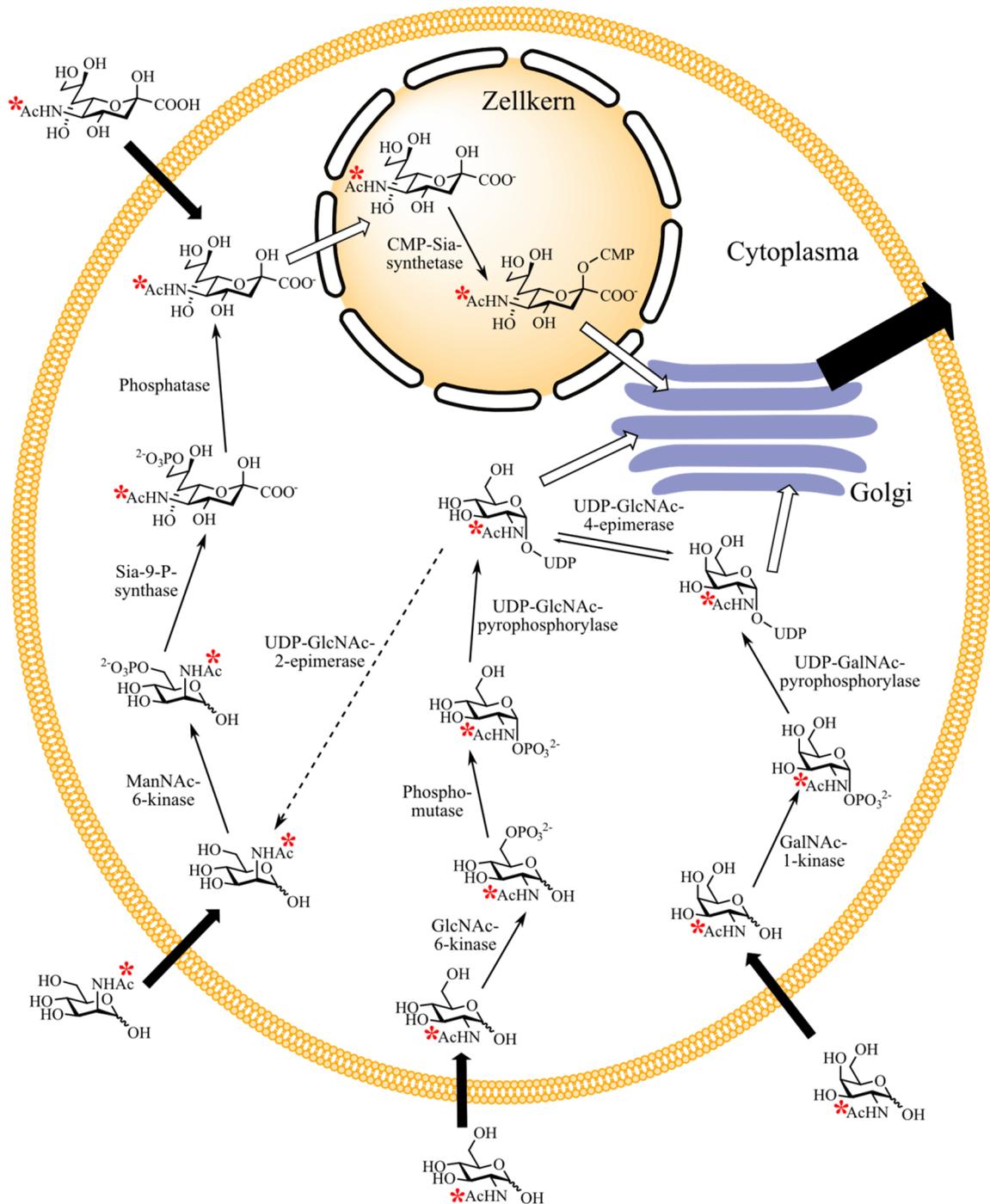


Abb. 2-18: Prinzip des Metabolic Glycoengineerings. 1.) Ein mit einer Reportergruppe X funktionalisiertes Monosaccharid wird über den Biosyntheseweg einer Zelle ins Glycom integriert und auf der Oberfläche präsentiert. 2.) Dort kann es durch eine chemische Reaktion mit Y und einer Sonde (roter Stern) detektiert werden.

Die verwendeten Reporter und ihre Reaktionspartner (Sonden) müssen dabei dem Anspruch der Bioorthogonalität^[266-269] genügen. Das bedeutet, sie dürfen nicht mit anderen in der Zelle vorkommenden reaktiven Gruppen interferieren und müssen trotzdem unter physiologischen Bedingungen (wässrige Umgebung, pH 6-8, maximal 37 °C) schnell und selektiv miteinander reagieren, wobei möglichst keine toxischen (Neben-)Produkte entstehen. Als Reportergruppe am weitesten verbreitet ist das organisch gebundene Azid, das durch seine geringe Größe die enzymatische Umsetzung eines markierten Kohlenhydrats kaum beeinflusst.

Die benötigte Substrat-Promiskuität einiger Enzyme der Glycanbiosynthese wurde in grundlegenden Arbeiten von der Gruppe um Reutter erkannt. Sie adressierten die Sialinsäure, die als terminal präsentierter Zucker (siehe Kapitel 2.1) viele Zell-Zell- sowie Zell-Pathogen-Interaktionen steuert. Nach Gabe von ManNAc- und GlcNAc-Derivaten mit verlängerten Acylketten (C₃-C₅) *in vivo* sowie *in vitro* fanden sie die entsprechenden Seitenketten in Sialinsäuren wieder, wobei das Mannosederivat effektiver biotransformiert wurde als das entsprechende Glucosamin. Zudem beeinflusste die Modifikation der Glycokalyx die Adhäsion von Polyomviren, die auf Sialinsäureerkennung beruht.^[270-271] Die Enzyme der Sialinsäurebiosynthese (siehe Schema 2-3) akzeptieren also kleine Veränderungen in ihren Substraten, so dass über entsprechend funktionalisierte Vorstufen die chemischen

Reportergruppen auf der Zelloberfläche installierbar sind. Die Abhängigkeit der Promiskuität von der Position des Reporters wurde in späteren Studien eingehend untersucht und die Acyl-Seitenkette als variabelste Stelle des Moleküls identifiziert, während die Substitution des Mannosevorläufers an C-4^[272] und C-6 nur bedingt sowie an C-2 überhaupt nicht zur Sialinsäuremarkierung führt.^[273]



Schema 2-3: Biosynthese von Glycanen ausgehend von ManNAc, GlcNAc, GalNAc und Neu5Ac. Eine in der Acylseitenkette eingeführte Reportergruppe (*) wird von den beteiligten Enzymen toleriert und im Golgi, dem endoplasmatischen Retikulum oder dem Cytoplasma in Glycoproteine integriert. Sialinsäure wird durch Kondensation von ManNAc und Phosphoenolpyruvat aufgebaut, so dass dieser Zucker durch Gabe von ManNAc-Derivaten adressiert werden kann. GlcNAc wird bei Mangel an Mannosamin über eine Epimerisierung der Sialinsäuresynthese zugeführt, GalNAc gelangt über eine Epimerisierung auch in den GlcNAc-Stoffwechsel (CMP, Cytidinmonophosphat; UDP, Uridindiphosphat).^[273]

In folgenden Studien zeigte die Gruppe um Reutter, dass der Zusatz von *N*-Acetylneuraminsäure zu Zelllinien mit defizitärer *de novo*-Sialinsäurebiosynthese deren Hyposialylierung kompensiert. Zudem konnten sie nachweisen, dass Neu5Ac entgegen der geltenden Lehrmeinung die Zellmembran passieren kann und intrazellulär weiter umgesetzt wird.^[274] Als Aufnahmeweg postulierten sie einen aktiven Transportmechanismus, der bis heute nicht belegt ist. Alternativ wurde von Bardor *et al.* die Internalisierung von Neuraminsäure durch Pinocytose diskutiert.^[275] In der Folge wurde eine Reihe von Sialinsäurederivaten mit Substitutionen an C-1, C-5 und C-9 verwendet, ihre Einbauraten verfolgt und der Einfluss der Modifikation auf die Erkennung durch Siglec-2 sowie Papovaviren untersucht.^[276]

Die erste chemische Modifikation der Oberfläche einer lebenden Zelle nach Inkorporation eines unnatürlichen Zuckers wurde schließlich im *Journal Science* vorgestellt: Mahal *et al.* nutzten *N*-Levulinoylmannosamin (ManLev) zur Präsentation von Ketonen auf Jurkat-, HL-60- sowie HeLa-Zellen und setzten sie unter physiologischen Bedingungen mit einem biotinylierten Hydrazid zum Hydrazon um. Der Nachweis der erfolgreichen und selektiven Reaktion erfolgte durch Inkubation mit FITC-markiertem Avidin und anschließende FACS-Analyse der Zellpopulationen.^[277]

Diesen wegweisenden ersten Studien zur Derivatisierung von Glycanen auf Zelloberflächen und in lebenden Organismen folgte eine Vielzahl von Veröffentlichungen zum Metabolic Glycoengineering, wobei die Palette der eingesetzten Kohlenhydrate und Reportergruppen sowie entsprechend funktionalisierter Nachweisreagenzien kontinuierlich erweitert wurde.

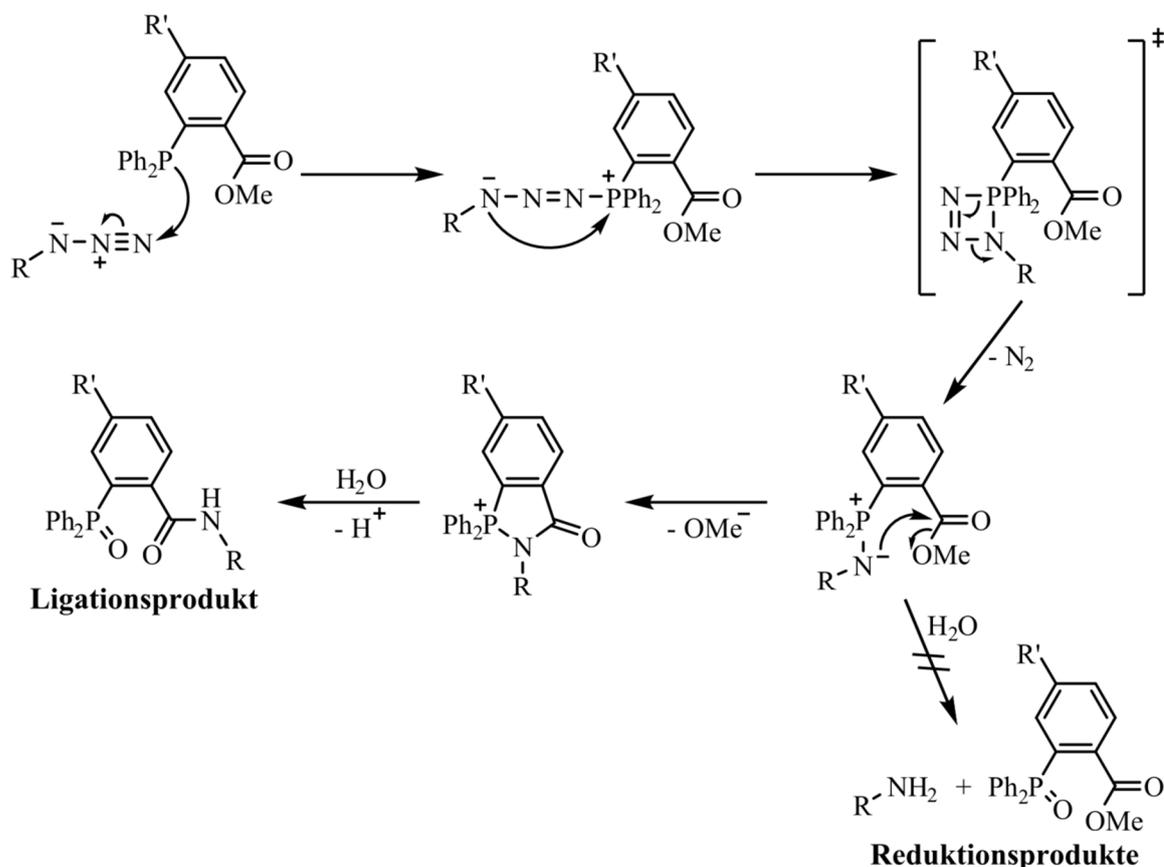
Bei ihren Untersuchungen zur Inhibition der Glycanbiosynthese unter Verwendung eines glycosylierten Aromaten als Synthese-Primer stellten Sarkar *et al.* fest, dass dieser nach der Acetylierung des Glycananteils deutlich effizienter in CHO-Zellen aufgenommen wurde. Nach der Acetylierung der freien Hydroxylgruppen verliert das Molekül seine hohe Polarität, was die passive Diffusion durch die Membran erleichtert. In der Zelle vorhandene Esterasen sorgen dort für die Abspaltung der Acetylgruppen, so dass die internalisierten Zucker der Biosynthese zur Verfügung stehen.^[278-279] Dies gilt nicht nur für die zunächst verwendeten Verbindungen sondern konnte auch für den *N*-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc)-Vorläufer ManNGc gezeigt werden. Im direkten Vergleich zwischen acetylierter und nicht acetylierter Form erwies sich die acetylierte Verbindung als deutlich effektiver, wobei so etwa viermal mehr Neu5Gc auf Glycoproteinen nachgewiesen werden konnte.^[280]

Mit Ausnahme der Sialinsäure und weniger anderer, durch Mikroinjektion verabreichter Derivate^[281-283] werden seither für das Metabolic Glycoengineering von Säugerzellen bevorzugt acetylierte Zucker eingesetzt.

Das Keton als Reportergruppe wurde aufgrund der nur relativ langsam stattfindenden Reaktion mit einem Hydrazid, die zudem optimalerweise im Sauren (pH 4-6) stattfinden sollte,^[268] bald abgelöst durch andere funktionelle Gruppen, die eine deutliche Verbesserung in der Reaktionskinetik aufweisen.

Mit der Einführung der Staudinger-Ligation^[284-285] (einer Variation der Staudinger-Reduktion eines Azids mit Triphenylphosphin zum Amin,^[286] Mechanismus siehe Schema 2-4), bei der eine Amidbindung geknüpft wird, wurde das organische Azid zur bedeutensten Reporter-

gruppe. Diese Stellung hat es bis heute, trotz mehrmaligen Wechsels der folgenden Konjugationsreaktion, inne.^[287]



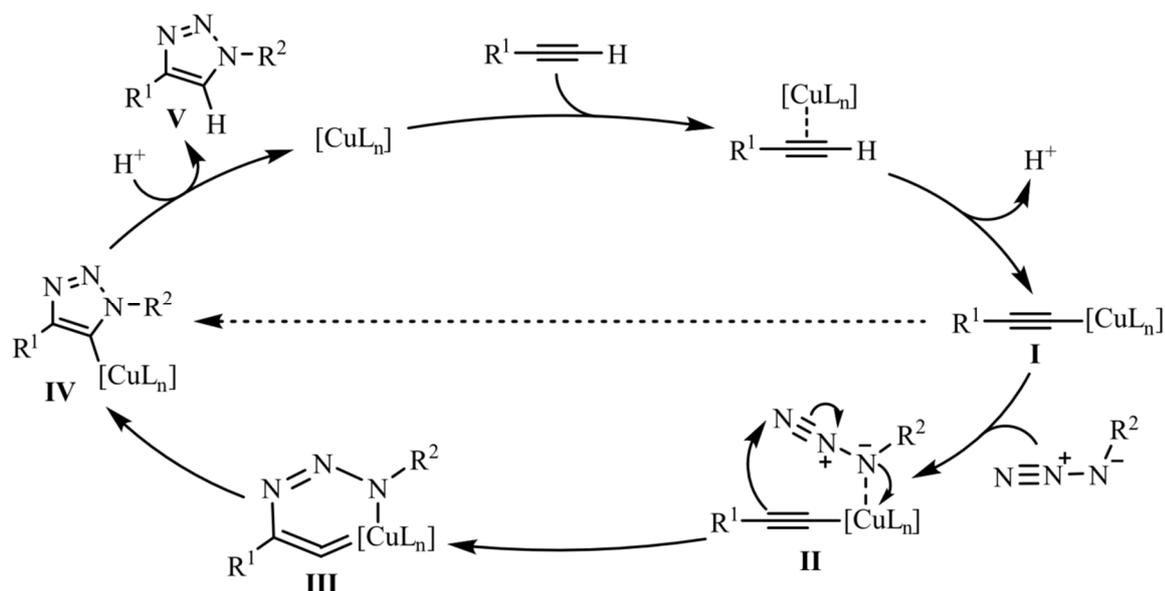
Schema 2-4: Mechanismus der Staudinger-Ligation. Analog zur Staudinger-Reduktion erfolgen der nucleophile Angriff des Triphenylphosphinderivats am Azid und die Bildung des intermediären Phosphazids aus dem durch Stickstoffabspaltung ein Aza-Ylid generiert wird. Der in *ortho*-Position liegende Methylester dient als elektrophile Falle zum Abfang des Nucleophils, so dass die direkte Hydrolyse zum Amin verhindert und stattdessen ein Amid geknüpft wird. R' ist die zum Nachweis verwendete Gruppe, z. B. ein Fluoreszenzfarbstoff, Biotin oder eine Peptidsequenz.^[288]

Die Staudinger-Ligation eignet sich sowohl zur Markierung von Glycanen in Zellkultur^[284, 289-291] als auch in lebenden Tieren.^[292-294] Prescher *et al.* zeigten dies erstmals an Mäusen, denen zunächst Ac₄ManNAz verabreicht wurde. Die Staudinger-Reaktion mit FLAG-Phosphin (FLAG ist eine Octapeptidsequenz,^[295-296] die mittels eines spezifischen Antikörpers nachgewiesen werden kann) war sowohl *ex vivo* an entnommenen Zellen oder Geweben als auch *in vivo* erfolgreich und lieferte vergleichbare Ergebnisse. Der Nachweis der FLAG-Sequenz erfolgte durch einen FITC-markierten Antikörper und Durchflusszytometrie bzw. Western Blot-Analyse eines Zelllysats mit einem Meerrettich-Peroxidase-Konjugat.^[292] In einem Tumormodell an der Maus, wurde von Neves *et al.* das maligne Gewebe anhand seiner erhöhten Sialinsäureexpression bildgebenden Verfahren zugänglich gemacht.^[294] Hubbard *et al.* inkubierten Zellen aus Prostatakarzinomen (PC-3 sowie primäre Gewebeschnitte) mit Ac₄GalNAz und isolierten nach der Reaktion mit FLAG-Phosphin die markierten Glycoproteine, die einer LC-MS/MS-Analyse zugeführt wurden. Auf diese Weise wurden im Glycoproteom der Zellen 71 extrazelluläre Proteine identifiziert, unter ihnen mehrere tumorassoziierte, die sich zum Nachweis eines Prostatakarzinoms sowie der Abschätzung seiner potentiellen Metastasierungs-Neigung eignen.^[297] Neben Proteinen der

Zellmembran können auch Antikörper adressiert werden. Rochefort *et al.* zeigten kürzlich, dass aus HB8059-Hybridomazellen isolierte Antikörper ohne Beeinflussung ihrer Antigen-erkennung durch Metabolic Glycoengineering mit Ac₄ManNAz und Biotin-Phosphin homogen im *N*-Glycan markiert werden.^[298]

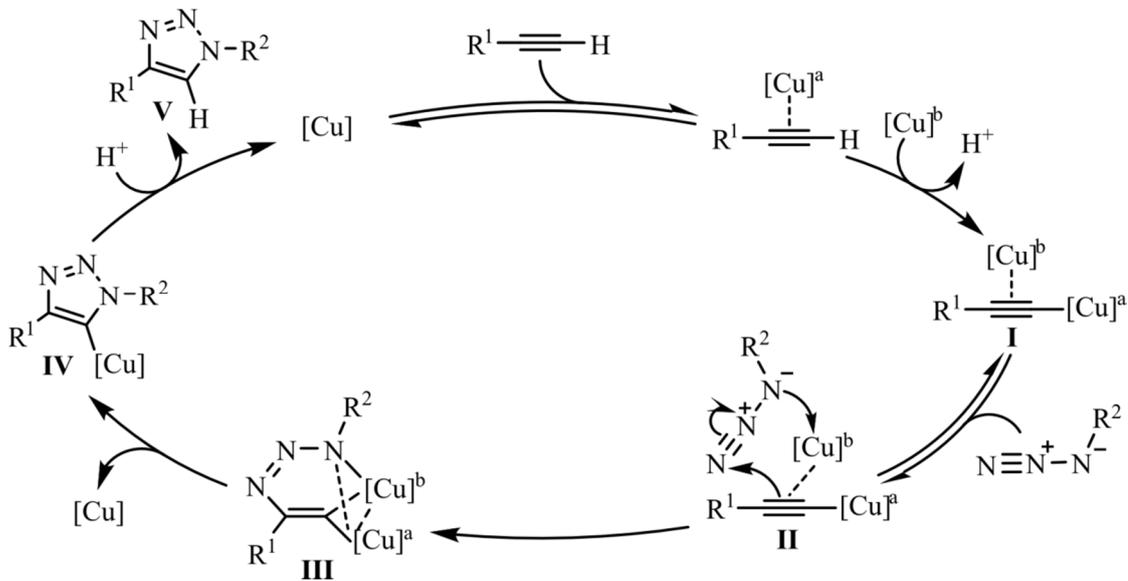
Trotz der vielfältigen Einsatzmöglichkeiten der Staudinger-Ligation sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ist auch diese Reaktion zu langsam, ebenfalls reagieren die verwendeten Phosphorverbindungen empfindlich auf Sauerstoff.^[267-268]

Deutlich schneller und ebenfalls auf Grundlage eines Azids erfolgt die dipolare Cycloaddition mit einem Alkin zum Triazol. Während die ursprünglich von Huisgen entwickelte Reaktion noch Bedingungen erforderte, die in keiner Weise biokompatibel sind (erhöhte Temperatur und Druck),^[299] wird durch die Katalyse mit Cu(I) – unabhängig voneinander in den Gruppen um Meldal^[300] und Sharpless^[301] entwickelt – eine schnelle und regioselektive Umsetzung bereits bei Raumtemperatur erzielt (mechanistische Diskussion siehe Schema 2-5 sowie Schema 2-6).^[302]



Schema 2-5: Ursprünglich von Sharpless postulierter Mechanismus der kupferkatalysierten Cycloaddition zwischen Aziden und terminalen Alkinen. Nach der Bildung des Kupferacetylids (I) wird das Azid durch Koordination des nucleophilen Stickstoffs aktiviert (II). Das interne Kohlenstoffatom des Acetylids greift nucleophil am terminalen Stickstoff des Azids an, wobei ein gespanntes Sechsring-Intermediat (III) entsteht. Nach Ringkontraktion zum Kupfertriazolid (IV) und Protonierung wird das 1,4-substituierte Triazol (V) erhalten.^[301] Eine konzertierte [2+3]-Cycloaddition (gestrichelter Pfeil) sowie die von Meldal und Tornøe vorgeschlagene initiale Koordination des Azids über dessen terminalen Stickstoff (nicht dargestellt)^[303] wurden nach späteren DFT-Rechnungen von Hein und Fokin ausgeschlossen.^[304]

Die Cu(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) gilt heute als prominentester Vertreter des von Sharpless geprägten Begriffs „Click-Reaktion“^[305] und wird häufig synonym verwendet.



Schema 2-6: Von Worrell *et al.* durch Kupferisotopenmarkierung experimentell belegter Mechanismus der CuAAC unter Beteiligung eines zweikernigen Kupferkomplexes. Das zunächst gebildete Kupferacetylid reagiert erst nach Koordination eines zweiten Kupfers (I) mit dem Azid, wobei ein zweikerniges Intermediat mit zwei chemisch äquivalenten Kupferatomen (II) gebildet wird. Nach Abspaltung eines Metallzentrums (IV) sowie Protonierung wird ebenfalls das 1,4-substituierte Triazol (V) erhalten.^[306]

Das für die Reaktion benötigte Cu(I) kann entweder *in situ* durch Reduktion von Cu(II)-salzen wie Kupfersulfat mit Natriumascorbat oder Tris(carboxyethyl)phosphin (TCEP)^[307] erzeugt oder in Form von CuBr^[308] direkt eingesetzt werden. Die katalytisch aktive Spezies wird durch den Einsatz chelatisierender Amin- sowie Triazoliganden stabilisiert, so dass bereits geringe Konzentrationen des Kupfers für eine schnelle Umsetzung genügen. Damit wird gleichzeitig die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die für die Cytotoxizität der Kupferverbindungen verantwortlich gemacht werden,^[302, 309-311] vermindert. Während die erste Generation der Liganden durch ihre geringe Wasserlöslichkeit noch den Zusatz erheblicher Mengen organischer Lösungsmittel wie DMSO erforderte und zudem den Transport des komplexierten Kupfers durch die unpolare Zellmembran begünstigte, erlauben die polaren, von den Gruppen um Wu^[312] sowie Finn^[313] entwickelten Liganden den Einsatz der Kupferkatalyse *in vivo* (Strukturen siehe Abb. 2-19).^[314]

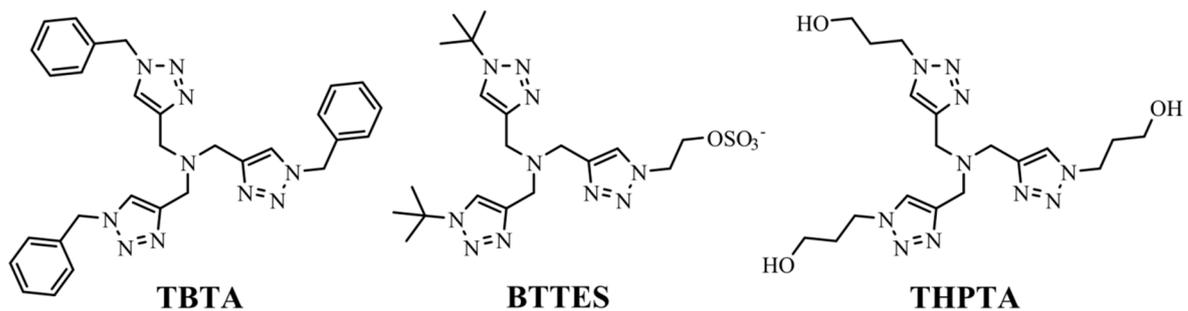


Abb. 2-19: Strukturen dreier für die CuAAC verwendeter Kupferliganden auf Basis eines Tris(triazol)amins. TBTA (Tris[1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin)^[315] ein Ligand der ersten Generation besitzt eine geringe Wasserlöslichkeit und sorgt zudem für die Membrangängigkeit des komplexierten Kupfers, was sich in einer erhöhten Cytotoxizität niederschlägt. Die polaren Liganden BTES (2-[4-((Bis[1-tert-butyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amino)-methyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl)ethyl-hydrogensulfat)^[312] sowie THPTA (Tris[1-(1-hydroxypropyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin)^[313] sind dagegen auch für Reaktionen *in vivo* geeignet.

Die CuAAC wurde von verschiedenen Gruppen zum Markieren von Glycanen verwendet, dabei wurden sowohl Azide als auch Alkine als Reportergruppe eingesetzt.

Während Chang *et al.* die Clickreaktion noch an Lysaten der mit Ac₄ManNAz bzw. Ac₄ManNAI kultivierten Zellen sowie aus Mäusen entnommenen Organen durchführten und mittels Western-Blot eine um etwa 25 % gesteigerte Label-Effizienz durch den Alkinzucker feststellten,^[316] markierten Homann *et al.* Glycane auf der Oberfläche humaner Kehlkopfepithelzellen (HEp-2). Nach Inkubation mit *N*-(1-oxohex-5-ynyl)-neuraminsäure (Neu5Hex) bzw. Ac₄GlcNAz und anschließender Click-Reaktion mit Azido-Fluorescein bzw. TAMRA-Alkin beobachteten sie jeweils eine selektive Färbung der Membran.^[317] Fucosylierte Kohlenhydratstrukturen wurden von der Gruppe um Wong durch Einsatz von acetylierten Fucosederivaten mit Azid- bzw. Alkin-Funktion in Position 6 und Click-Reaktion mit Biotin-Derivaten nachgewiesen. Zudem wurde für das Azido-Derivat der Fucose eine erhöhte Cytotoxizität gegenüber Jurkat-Zellen festgestellt.^[318] Breidenbach *et al.* nutzten eine genetische Variante der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, deren *de novo*-Synthese von GlcNAc durch einen „Knock-Out“ stillgelegt war, zum Einbau von GlcNAz sowie GlcNAI in extrazelluläre *N*-Glycane mit GlcNAc₂Man₈-Kernstruktur. Die Einführung eines Membrantransporters für GlcNAc (aus *Candida albicans*) sowie einer humanen GlcNAc-Kinase führte zur Präsentation der Reportergruppe auf der Zelloberfläche, wo sie nach Click-Reaktion mit derivatisierten Fluoreszenzfarbstoffen der AlexaFluor-Reihe nachgewiesen wurden.^[319]

Eine elegante Methode zur Reduktion unspezifischer Hintergrundfluoreszenz ist der Einsatz eines nicht fluoreszierenden Precursors, dessen Fluorophor erst mit der Bildung des Triazols aufgebaut wird.^[308, 318, 320-322]

Parallel zur Einführung der biokompatiblen CuAAC wurde eine alternative Click-Reaktion entwickelt, die gänzlich ohne Kupfer-Katalysator auskommt. Wird das Alkin in ein cyclisches Molekül integriert, so weichen insbesondere in kleinen Ringen die Bindungswinkel am sp²-hybridisierten Kohlenstoff stark von den bevorzugten 180° ab, so dass die Dreifachbindung gegenüber Additionen aktiviert ist (die Ringspannung im kleinsten bei Raumtemperatur isolierbaren Cycloalkin, dem Cyclooctin beträgt ca. 80 kJ/mol).^[323] Bereits 1953 beobachteten Blomquist und Liu eine spontane und stark exotherme Reaktion des Cyclooctins mit Phenylazid,^[324] das Produkt wurde allerdings erst 1961 von Wittig und Krebs in ausführlichen Studien zu Cycloalkinen isoliert und als aneliertes Triazol identifiziert.^[325]

Ausgehend von diesen Vorarbeiten wurden verschiedenste Cyclooctinderivate entwickelt, deren Reaktivität in der [2+3]-Cycloaddition mit einem Azid im Vergleich zum Grundkörper durch Einsatz von Substituenten, die die elektronische Struktur des Alkins verändern (Fluorid^[326-329]) bzw. zusätzliche Ringspannung liefern (anelierte Aromaten^[330-335] oder Cyclopropane^[336]), gesteigert wird (Strukturauswahl siehe Abb. 2-20). Die hohe Lipophilie der Cyclooctinderivate, die *in vivo* zu einer unspezifischen Bindung an Biomoleküle wie Serumalbumin^[337] und damit geringer Markierungseffizienz führt, wurde durch den Einsatz polarer Substituenten wie Methoxygruppen,^[338-339] Sulfaten^[335] oder Heteroatomen im Achtring^[331-333, 338] gesenkt.

Obwohl die Kinetik der spannungsgetriebenen Alkin-Azid-Cycloaddition (*strain-promoted alkyne-azide cycloaddition*, SPAAC) weit hinter der einer CuAAC zurückbleibt, erfolgt die

Reaktion mit metabolisch in Glycane integrierten Aziden innerhalb weniger als einer Stunde. Damit ist diese Methode geeignet, Veränderungen der Oberflächenglycane lebender Zellen *in vitro*,^[327, 331, 336, 340] aber auch *in vivo* – an ganzen Organismen wie dem Zebrafisch,^[12, 272] dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*^[341] oder der Maus^[337] – zu verfolgen. Neben der räumlichen Verteilung kann in mehrfach wiederholten Fütterungs- und Clickzyklen mit verschiedenen Farbstoffen auch die Dynamik der Glycanbiosynthese,^[327] etwa während der embryonalen Entwicklung, verfolgt werden. Die Gruppe um Bertozzi zeigte dies in eindrucksvollen Arbeiten an den Modellorganismen Zebrafisch^[12, 342] und *C. elegans*,^[341] die sich durch ihre Transparenz im Entwicklungsstadium ideal für Fluoreszenzmarkierungen eignen. Wird der mit einem Reporterazid versehene (nucleotidaktivierte) Zucker bereits im Einzellstadium des Embryos durch Mikroinjektion in den Dottersack verabreicht, können O-Glycane des Mucintyps,^[281] Fucose,^[282] N-Acetylneuraminsäure^[342] sowie Xylose^[283] bereits wenige Stunden nach der Befruchtung im Becherkeimstadium (Gastrula) nachgewiesen und verfolgt werden.

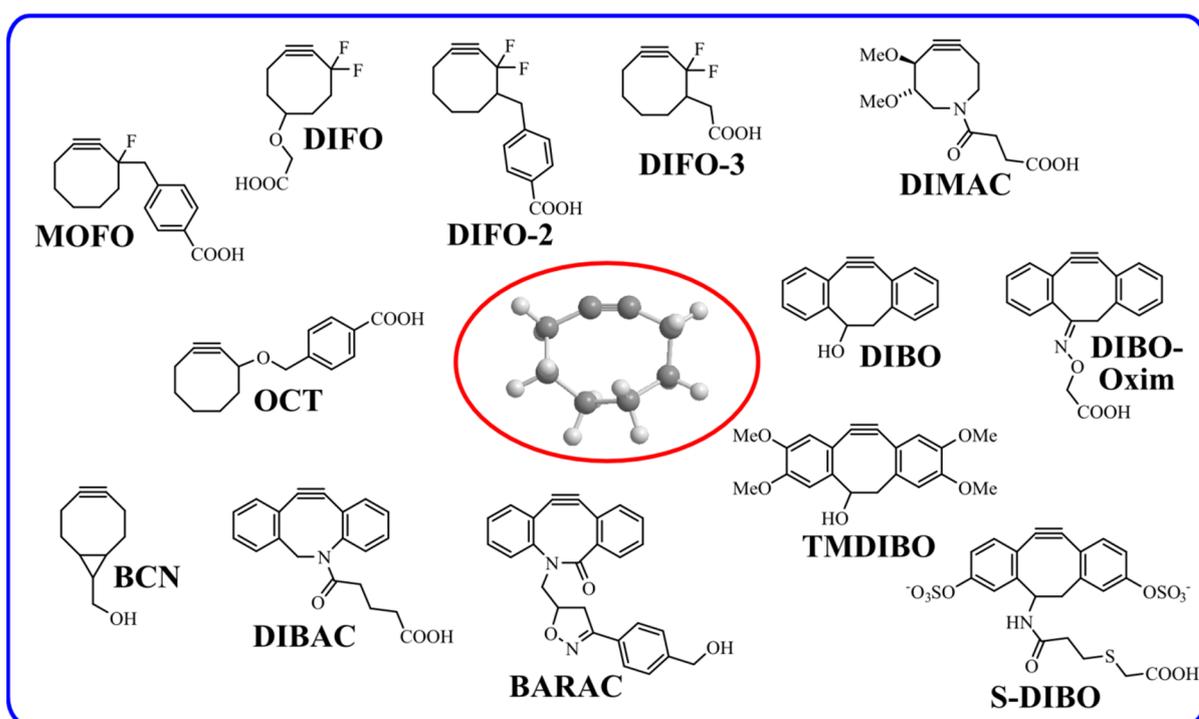


Abb. 2-20: Strukturauswahl von Cyclooctinderivaten, die für die SPAAC verwendet werden. Ausgehend vom gespannten Cyclooctin (OCT)^[343] kann die Reaktivität des Alkins gegenüber einem Azid durch elektronenziehende Substituenten, wie im monofluorierten Cyclooctin MOFO^[326] sowie den difluorierten Derivaten DIFO,^[327] DIFO-2^[329] und DIFO-3^[328] gesteigert werden. Die Anelierung von Cyclopropan in Bicyclononin BCN^[336] oder Aromaten wie im Dibenzocyclooctin DIBO^[330] und zudem sp^2 -hybridisierten Atomen im daraus abgeleiteten Oxim (DIBO-Oxim^[340]) sowie Biarylazacyclooctinon BARAC^[331] und Azadibenzocyclooctin DIBAC^[332-333] führt durch zusätzliche Ringspannung ebenfalls zu einer erhöhten Reaktivität. Hydrophile Substituenten wie die Sulfate im sulfatierten Dibenzocyclooctin S-DIBO^[335] oder Methoxygruppen in 6,7-Dimethoxyazacyclooct-4-in (DIMAC^[338]) und Tetramethoxydibenzocyclooctin (TMDIBO^[339]) sowie die Integration von Heteroatomen in den Achtring sorgen für eine verbesserte Wasserlöslichkeit. Chemische Sonden wie Fluoreszenzfarbstoffe, Biotin oder das FLAG-Peptid werden über freie Hydroxyl- bzw. Carbonsäurefunktionen angebunden.

Unter Verwendung einer Peptidsequenz am Azidozucker markierten Chang *et al.* selektiv Zellen, die über eine entsprechende extrazelluläre Protease zur Freisetzung des Kohlenhydrats verfügen. Da diese Protease besonders in malignem Gewebe der Prostata überexprimiert wird,

bietet sich damit die Möglichkeit für eine gewebespezifische Färbung in der Krebs-Diagnostik.^[344] Koo *et al.* markierten in einem ähnlichen Ansatz Tumore in einem Mausmodell durch Injektion von Ac₄ManNAz direkt ins maligne Gewebe. Nach intravenöser Gabe von Dibenzocyclooctin-funktionalisierten Nanopartikeln (Liposomen) wurden diese selektiv im markierten Zielgewebe angereichert und internalisiert.^[345] Die Nanopartikel eignen sich somit bei entsprechender Zweitfunktionalisierung als potentielle Tumormarker für bildgebende Verfahren sowie als Transporter für Wirkstoffe.

Nicht über den Zellmetabolismus, sondern durch den Einsatz exogener Glycosyltransferasen integrierten Zheng *et al.*^[262] sowie Mbua *et al.*^[263] ein Reporterazid ins Glycom. Die Kohlenhydrate wurden nucleotidaktiviert (GDP-Fuc-6Az sowie CMP-Neu5Ac-9Az) und als Substrate einer Fucosyltransferase bzw. Sialyltransferase selektiv auf *N*-Acetylactosaminmotive der *N*-Glycane übertragen. Der Nachweis erfolgte durch Reaktion mit Cyclooctinderivaten. *N*-Acetylglucosamin-terminierte Glycane wurden von Clark *et al.*^[346] sowie Mercer *et al.*^[347] durch Reaktion mit UDP-GalNAz sowie einer genetisch veränderten Galactosyltransferase humanen bzw. bovinen Ursprungs adressiert und auf HeLa-Zellen sowie Neuronen und Thrombozyten nachgewiesen.

Auch maskierte Cycloalkine können für die Reaktion mit Aziden eingesetzt werden. Das von van Berkel *et al.* vorgestellte elektronenarme Oxanorbornadien reagiert in einer Tandem-[3+2]-Cycloaddition-retro-Diels-Alder-Reaktion unter Abspaltung von Furan mit Aziden zum Triazol. Die Reaktion wurde bisher allerdings nur an Modellpeptiden und -proteinen durchgeführt.^[348] Die Gruppe um Boons zeigte dagegen, dass die als Cyclopropenon maskierte Dreifachbindung eines DIBO-Systems durch Einstrahlung von UV-Licht (350 nm) unter CO-Verlust freigesetzt wird und für eine Reaktion mit Azido-Glycanen auf Jurkat- und CHO-Zellen zur Verfügung steht.^[349]

Weitere Kandidaten für bioorthogonale Glycanmarkierungen sind gespannte Alkene wie Norbornen,^[350] E-Cycloocten^[351-353] oder Cyclopropen,^[354-355] aber auch terminale Doppelbindungen^[356] und Isonitrile,^[357-358] die mit Tetrazinen in einer [4+2]- bzw. [4+1]-Cycloaddition und anschließender Cycloreversion unter Stickstoffabspaltung zum Pyridazin bzw. Pyrazol reagieren, sowie Nitrone, die mit gespannten Alkinen eine Cycloaddition zum *N*-alkylierten Isoxazolin eingehen.^[359-360] Durch Kombination verschiedener untereinander orthogonaler Reporterstrategien können mehrere Kohlenhydratmotive parallel markiert und verfolgt werden.

Ohne weitere Markierungsreaktion verwandten Lin *et al.* *N*-Acetylmannosamininderivate mit Alkin-, Azid- und Nitrilsubstitution sowie deuterierter Methylgruppe als ramanaktive Funktionen für Messungen der oberflächenverstärkten Ramanstreuung (*surface enhanced Raman scattering*, SERS).^[361]

Wurden bisher fast ausschließlich Glycane eukaryotischer Zellen mittels Metabolic Glycoengineering adressiert, verfolgt und modifiziert, rücken nun immer mehr auch bakterielle Kohlenhydratstrukturen in den Fokus der Untersuchungen.^[37, 362] Können diese selektiv gegenüber eukaryotischen Glycanen, womöglich sogar stammspezifisch markiert werden, eröffnen sich neue Möglichkeiten für die Diagnostik und Therapie, aber auch ein vertieftes Verständnis bakterieller Infektionsprozesse.

Die Gruppe um Bertozzi erbrachte zunächst den Nachweis, dass auch bakterielle Enzyme der

Glycanbiosynthese eine Substrat-Promiskuität aufweisen, indem sie *Haemophilus ducreyi* mit Sialinsäurederivaten mit verlängerter *N*-Acyl-Einheit (C3-C8) inkubierten und deren Einbau in Lipooligosaccharide massenspektrometrisch verfolgte.^[363]

In weiteren Arbeiten nutzten Yi *et al.* genetisch veränderte *E. coli*, deren Fucose-*de novo*-Syntheseweg durch eine Route aus *Bacteroides fragilis* ersetzt war, so dass sie exogene Fucose zum Aufbau von Polysacchariden nutzten und auch Substituenten wie Azid oder Alkin in Position 6 des Kohlenhydrats tolerierten. Der Nachweis der auf diese Weise in die Zellwand integrierten Azide erfolgte durch CuAAC der Zellen mit Biotin-Alkin sowie anschließende Inkubation mit FITC-Streptavidin.^[364]

Auch ohne vorherige genetische Modifikation der Bakterien werden verschiedenste Reporter-markierte Kohlenhydrate aufgenommen und verstoffwechselt. Die Gruppen um Dukan und Vauzeilles zeigten dies für ein Kdo-Derivat mit Azidfunktion in Position 8: Dieser Baustein findet sich ausschließlich im Lipopolysaccharid Gram-negativer Bakterien (siehe Kapitel 2.1), so dass dementsprechend eine erfolgreiche Clickreaktion mit Alexa488-Alkin auf *E. coli*, *Salmonella typhimurium* und *Legionella pneumophila*, nicht aber auf den Gram-positiven Bakterien *Bacillus subtilis* sowie *S. aureus* beobachtet werden konnte.^[365] *L. pneumophila* wird darüberhinaus durch einen Vorläufer der Legionaminsäure, 6-Azido-2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxy-D-mannose gegenüber anderen *Legionella*-Spezies diskriminiert.^[366]

Das in Glycolipiden von Mycobakterien vorkommende Disaccharid Trehalose (α -Glc-1,1- α -Glc) wurde von Swarts *et al.* an verschiedenen Positionen (C2, C3, C4 oder C6) zum Azid funktionalisiert und erfolgreich in die apathogenen Stämme *M. smegmatis* und *M. bovis* BCG, aber auch in pathogene *M. tuberculosis* eingebaut, wo es durch CuAAC sowie SPAAC mit Fluoreszenzfarbstoffen nachgewiesen wurde.^[367]

Pseudaminsäure, eine Komponente des Glycoproteins Flagellin, dem Hauptbestandteil der Flagellen von *Campylobacter jejuni* wurde von Liu *et al.* durch Fütterung des derivatisierten Biosynthesevorläufers 2-Acetamido-4-azidoacetamido-2,4,6-trideoxy-L-altrose (6-Deoxy-AltNAc-4NAz) mit Aziden ausgestattet, die in einer nachfolgenden Staudingerligation mit Biotin-Phosphin reagierten.^[368]

Die Inkubation von *Helicobacter pylori* mit Ac₄GlcNAz führt zur Markierung einer Reihe von Glycoproteinen, wie die Gruppe um Dube durch Western Blot^[369] und massenspektrometrische Analyse^[370] der mit FLAG-Phosphin umgesetzten Proben zeigte. In weiteren Studien führte die Staudingerligation mit dem Immunostimulant 2,4-Dinitrophenyl zu einer erhöhten Aktivität humaner Immuneffektorzellen und daraus resultierendem Zelltod der Bakterien.^[371]

Fucosylierte Glycoproteine der Spezies *Bacteroides fragilis* und *Parabacteroides distasonis* wurden mit Fucose-6-Alkin adressiert und im Western Blot nachgewiesen.^[372]

Metabolic Glycoengineering ist ein vielseitiges Werkzeug zur Untersuchung und definierten Derivatisierung von Oberflächenglycanen (lebender) Zellen. In bioorthogonalen Reaktionen können nicht nur chemische Sonden, sondern auch neue Glycosylierungsmuster – basierend etwa auf Bindungsstudien mit Glycochips – installiert und ihr Einfluss auf Zell-Zell-Interaktionen analysiert werden. Daraus ergeben sich möglicherweise neue Ansatzpunkte für die Bekämpfung von Infektionskrankheiten.

3 Durchführung und Diskussion der Ergebnisse

3.1 Zielsetzung und Strukturierung der Projekte

Trotz der hohen Fallzahlen von Infektionen und malignen Erkrankungen sind viele der ihnen zugrunde liegenden molekularen Strukturen und Wechselwirkungen noch weitgehend unbekannt. Erst allmählich setzt sich die Erkenntnis durch, dass komplexe Kohlenhydratmotive und -erkennungsprozesse häufig an entscheidenden Vorgängen wie Adhäsion, Zell-Zell-Interaktion, Immunreaktion bzw. -toleranz sowie Ausbreitung eines Erkrankungsherds beteiligt sind. Dennoch fehlen dem Gesamtbild weiterhin viele (wesentliche) Details, um die fundamentalen Mechanismen zu verstehen und neue diagnostische sowie therapeutische Ansätze zu entwickeln. Unbekannte Kenngrößen sind unter anderem die Dichte und Verteilung verschiedener Kohlenhydratmotive auf Zelloberflächen sowie ihre laterale und temporale Dynamik. Auch der Einfluss bakterieller Oberflächenglycane auf Erkennung und Adhäsion ist bisher weitgehend unverstanden.

Besonders im Licht zunehmender Verbreitung antibiotikaresistenter, speziell multiresistenter Keime ist es entscheidend, neue Wirkstoffe mit grundlegend anderen Wirkprinzipien zu entwickeln, die bisherige Resistenzmechanismen umgehen und im optimalen Fall gar keinen Selektionsdruck ausüben.

Ziel dieser stark interdisziplinär angelegten Arbeit, die Methoden der (Organischen) Chemie, Pharmazie, Biologie, Medizin sowie Physik kombiniert, ist es deshalb, kohlenhydratbasierte Wechselwirkungen und Erkennungsereignisse mit Relevanz für infektions- und tumorassoziierte Prozesse zu untersuchen. Dabei sollen Bindungsmotive und Zielstrukturen identifiziert, Affinitäten bestimmt und Strukturen ermittelt werden, die als Basis für neue diagnostische sowie therapeutische Anwendungen dienen können.

Ausgehend vom Modell einer Blaseninfektion (*in vitro*: T24 Blasenepithelzellen) durch uropathogene *E. coli* sollen die bekannten Kohlenhydratmotive α -Mannose, β -Galabiose sowie sialylierte Lactose für Adhäsionsstudien verwendet werden, auf deren Grundlage neuartige Antiinfektiva entwickelt werden können.

Als vereinfachtes Modell einer Zelloberfläche, das ausschließlich auf den Kohlenhydratanteil reduziert ist, dienen Glycochips auf Basis von Gold und Glas (siehe Kapitel 2.3), die analytisch komplementäre Systeme bieten. Auf dem Goldchip können im Parallelverfahren zahlreiche Reaktionen mit einem Volumen von jeweils etwa 1 μ l durchgeführt werden, wobei der Nachweis einer erfolgreichen Umsetzung und die Identifizierung der Produkte mittels MALDI-Massenspektrometrie erfolgt. Der Aufbau der Glycane kann chemoenzymatisch durchgeführt werden; die erstellten oberflächengebundenen Glycanbibliotheken finden zudem Einsatz in der Identifizierung passender Bindungspartner (Proteine), die bei ausreichend hoher Affinität gebunden und ebenfalls massenspektrometrisch nachgewiesen werden.

Bindungsereignisse auf der Oberfläche des Glasarrays werden dagegen mit optischen Methoden detektiert. Entsprechend markierte Bindungspartner (Proteine, aber auch

synthetische Lectine) liefern ein Fluoreszenzsignal, über dessen Intensität die Bestimmung von Dissoziationskonstanten möglich wird. Die Adhärenz ganzer Zellen wird zusätzlich lichtmikroskopisch nachgewiesen.

Die Ergebnisse dieser Bindungsstudien sollen schließlich mit der Situation auf nativen sowie durch Metabolic Glycoengineering modifizierten Zelloberflächen verglichen werden. In beiden Fällen sind starke Multivalenzeffekte an einer hochselektiven und affinen Bindung beteiligt. Allerdings ist die komplexe Zusammensetzung und dreidimensionale Verteilung der Glycane auf der Zelloberfläche bisher nur ungenügend verstanden. Aus diesem Grund sollten zunächst Studien zur Untersuchung dieser Parameter durchgeführt werden.

Neben den Kohlenhydraten auf Wirtsseite nehmen auch Oberflächenglycane pathogener Organismen an Bindungsprozessen teil. Diese sind häufig direkt mit der Fähigkeit der Pathogene assoziiert, ihren Wirt zu kolonisieren und eine Infektion auszulösen. Dennoch sind bisher nur wenige Details zu Struktur und Interaktion bakterieller Glycane (insbesondere Glycoproteine) bekannt. Ihre Adressierung mit einer modifizierten Variante des Metabolic Glycoengineering verspricht deshalb grundlegende Erkenntnisse über ihre Zusammensetzung, Funktion und mögliche Beeinflussung in Hinsicht auf therapeutische Anwendungen.

Ausgehend von diesen Überlegungen wurden konkrete Einzelprojekte zu Untersuchung der Bindungssituation auf Oberflächen definiert. Trotz ihrer thematischen und methodischen Vielfalt vereinen sich die vorgestellten Einzelprojekte alle unter der Zielsetzung der Untersuchung kohlenhydratbasierter Wechselwirkungen und Erkennungsereignisse mit Relevanz für infektiions- und tumorassoziierte Prozesse.

Projekt A:

Aufbau eines Glycochips für massenspektrometrische Untersuchungen und Screenings

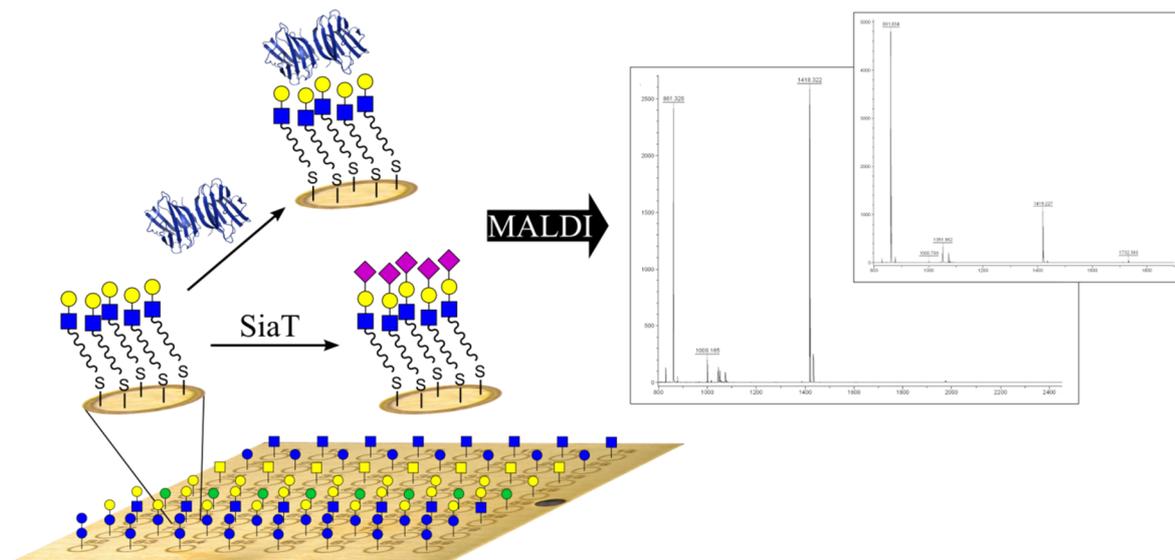


Abb. 3-1: Aufbau eines Glycoarrays auf Goldoberflächen für MALDI-Screenings; Projekt A (SiaT, Sialyltransferase).

Auf der Oberfläche humaner Zellen werden Sialinsäuren in exponierter Position als terminale Einheit zahlreicher *N*- und *O*-Glycane sowie Glycolipide präsentiert. Viele Zell-Zell- aber

auch Zell-Pathogen-Interaktionen werden durch diesen Zucker initiiert und reguliert (siehe Kapitel 2.2). Biosynthetisch werden sie von Sialyltransferasen in α -2,3- bzw. α -2,6-Verknüpfung auf die Glycane übertragen. Aus der Untersuchung viraler Infektionen ist bekannt, dass die Verknüpfungsselektivität der Sialinsäuren eine wichtige Rolle in Erkennungsprozessen spielt. Unbekannt ist bisher allerdings der exakte Einfluss einzelner Aminosäuren der übertragenden Enzyme auf ihre Akzeptorspezifität und Verknüpfungpräferenz.

In einem gemeinsamen Projekt mit *Dr. Maria Ortiz-Soto* (Universität Würzburg) sollte deshalb ein MALDI-kompatibles Screeningsystem für ein von ihr erzeugtes Set rekombinant hergestellter Sialyltransferasevarianten entwickelt werden. Dieses System sollte eine schnelle und kostengünstige Übersicht über veränderte Substratspezifitäten, den Verknüpfungspunkt der übertragenen Sialinsäure und die Aktivität der Enzyme erlauben.

Zu diesem Zweck sollten diverse Mono- und Disaccharide (neben den natürlichen Substraten der Transferasen, Lactose und *N*-Acetylactosamin) mit einem Linker für die kovalente Anbindung auf einem entsprechend funktionalisierten SAM der Goldoberfläche ausgestattet und anschließend kovalent immobilisiert werden. Zudem mussten geeignete Reaktionsbedingungen für die enzymatische Transformation an der Festphase gefunden werden, die auf Gold in der Literatur bisher nur für Transsialidasen beschrieben ist.^[202, 373]

Die sialylierten Glycanstrukturen sollten zusätzlich für den massenspektrometrischen Nachweis und die Identifizierung affiner Bindungspartner (vor allem Proteine, aber auch ganze Zellen, die per MALDI-„Fingerabdruck“ zugeordnet werden) zur Verfügung gestellt werden.

Projekt B:

Aufbau eines Glycochips für die qualitative und quantitative Untersuchung von Bindungsprozessen

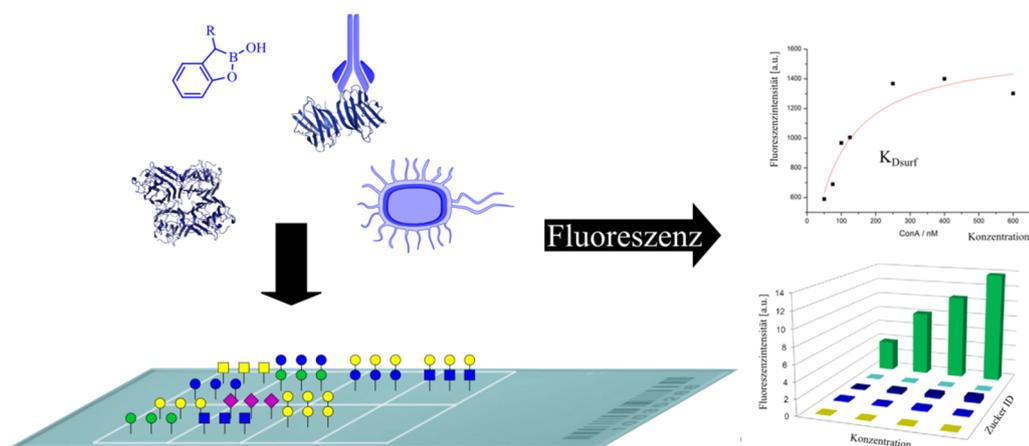


Abb. 3-2: Aufbau eines Glycoarrays auf Glasoberflächen zur Ermittlung von Bindungspräferenzen und -stärken diverser Bindungspartner; Projekt B.

Die Affinität zwischen einem isolierten Kohlenhydratmotiv und seinem Bindungspartner, einem Protein, ist mit K_D -Werten im milli- bis mikromolaren Bereich relativ gering. Erst durch multivalente Präsentation der Bindungsmotive und -domänen wird eine hohe Avidität erzielt, die dennoch – im Gegensatz zu On-Off-Signalen – eine feinabgestimmte Regulierung

der Wechselwirkung und nachgeschalteter Signalkaskaden erlaubt (siehe Kapitel 2.2). Diese Multivalenz sowie die dreidimensionale Vororganisation der Bindungspartner auf nativen Zelloberflächen bleibt bei Untersuchungen in Lösung unberücksichtigt, so dass etwa per ITC bestimmte Bindungskonstanten nicht direkt auf die natürliche Situation übertragen werden können. Im Gegensatz dazu bietet der mit einem Hydrogel vorfunktionalisierte Glaschip eine vereinfachte dreidimensionale, hydrophile Oberfläche, auf deren Basis definierte Glycane mit entsprechender Linkereinheit in unterschiedlicher Dichte immobilisiert, präsentiert und in Affinitätsstudien adressiert werden. Er eignet sich in Kombination mit fluoreszenzmarkierten Proben als leicht auslesbare Plattform für die Identifizierung von Bindungsmotiven, erlaubt über die Messung von Konzentrationsreihen aber auch quantitative Aussagen über K_D -Werte. Nach der Validierung des Systems mit einem bekannten kohlenhydratbindenden Protein wie Concanavalin A sollte er für Studien mit unterschiedlichsten Bindungspartnern (Proteine, synthetische Lectine, Zellen) verwendet werden. Zudem bietet die Glasoberfläche die Möglichkeit, Lectine in ihrer nativen Konformation zu immobilisieren und Affinitäten in Abhängigkeit von der Dichte des Proteins sowie der Multivalenz eines Kohlenhydratmotivs zu bestimmen.

Im Hinblick auf Selektivität und Affinität können ausgewählte Glycanmotiven auf dem Glycochip als mögliches diagnostisches Werkzeug zur Bestimmung erhöhter Serumspiegel tumorassoziierter Proteine wie Galectin-1 sowie zur schnellen Identifizierung pathogener Stämme aus verschiedenen klinischen Proben und Isolaten dienen und entwickelt werden.

Projekt C:

Synthese des Galabiosemotivs mit diversen Linkern für Glycochips und Clickreaktionen

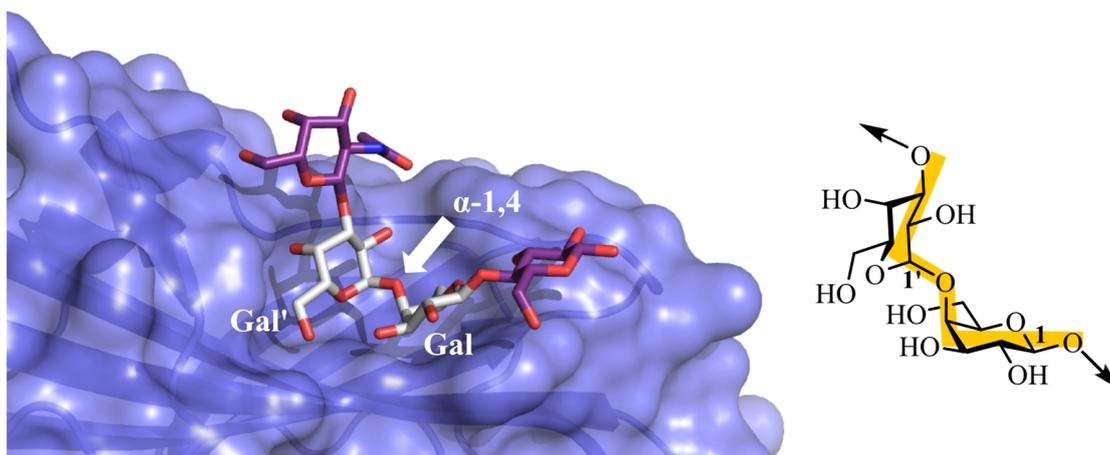


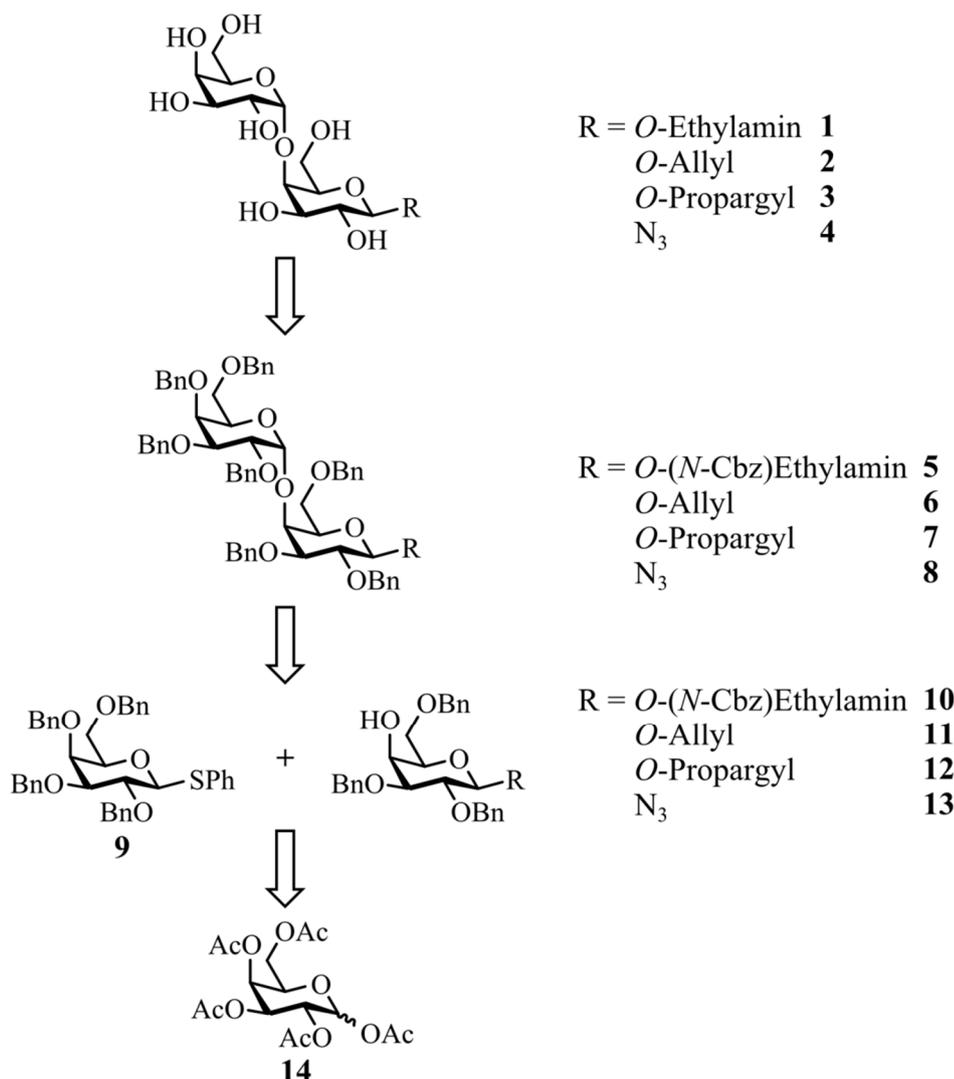
Abb. 3-3: Kristallstruktur des bakteriellen Proteins PapG-II im Komplex mit dem Tetrasaccharid Globotetraose (GbO₄, β -GalNac-1,3- α -Gal-1,4- β -Gal-1,4-Glc; pdb 1J8R^[91]; links). Das Erkennungsmotiv Galabiose (weiß hervorgehoben) gibt dem Kohlenhydrat seine charakteristische W-Form (rechts).

Das Disaccharid Galabiose ist das Haupterkennungsmotiv uropathogener *E. coli* (UPEC), die das Adhäsins PapG an der Spitze ihrer P-Pili präsentieren (siehe Kapitel 2.2). Die α -1,4-Verknüpfung der beiden Galactoseeinheiten verleiht dem Molekül seine charakteristische W-Form, mit der es sich in die Bindungsdomäne des Proteins einschmiegt (siehe Abb. 3-3). Aus der Kristallstruktur des Komplexes von PapG (Subtyp II) mit Globotetraose, einem

Tetrasaccharid, das an den Enden des Galabiosemotivs um eine Glucose- bzw. *N*-Acetyl-galactosamineinheit verlängert ist, wird die Einbettung des Disaccharids in ein ausgeprägtes Wasserstoffbrückennetzwerk unter Einbeziehung mehrerer Wassermoleküle deutlich. Zudem ist an der Unterseite der β -glycosidisch verknüpften Galactose eine unpolare Fläche des Proteins erkennbar, die durch die Seitenkette des Tryptophan-107 gebildet wird.^[91]

Ausgehend von diesen Informationen wurden bereits verschiedene Galabiosederivate synthetisiert und der Einfluss diverser Seitenkettenmodifikationen auf die Bindungsstärke evaluiert. Dabei wurden die Hydroxylgruppen an C3, C6, C2', C4' und C6' sowie der Sauerstoff an C3' als wichtig für die Bindung identifiziert, während die Substituenten an C2 sowie O1 und O3' variabel sind. C1 muss in β -Konfiguration vorliegen, um die hydrophoben Kontakte mit Trp-107 zu ermöglichen, zusätzliche hydrophobe Wechselwirkungen durch unpolare Substituenten an O1 erwiesen sich als vorteilhaft.^[92, 374-375]

Zur Präsentation des Disaccharids auf verschiedenen Arrays sollte deshalb die benötigte Linkereinheit β -glycosidisch an C1 eingeführt werden (**1**, **2**). Eine zusätzliche Erweiterung des Motivs am reduzierenden Ende schien durch eine Alkin- (**3**) bzw. Azidsubstitution (**4**) möglich, die eine [2+3]-Cycloaddition nach Huisgen, Sharpless und Meldal erlauben sollte.



Schema 3-1: Retrosynthetische Überlegungen zum Aufbau des Galabiosemotivs; Projekt C.

Mit Hilfe dieser funktionellen Gruppe könnte das Disaccharid in Kombination mit dem Metabolic Glycoengineering (siehe Kapitel 2.4) ebenfalls auf Zelloberflächen präsentiert werden. Als positiven Nebeneffekt könnte die Clickreaktion mit dem Triazol eine aromatische Komponente liefern, die möglicherweise weitere stabilisierende Wechselwirkungen mit Trp-107 in der Bindungstasche eingeht.

Schlüsselschritt der Syntheseroute (siehe Schema 3-1) ist allerdings die α -selektive Kupplung der beiden Monosaccharide, die unter Verwendung entsprechend vorfunktionalisierter Bausteine verwirklicht werden sollte. Beide können retrosynthetisch auf Pentaacetylgalactose (**14**) zurückgeführt werden; für den Galactosedonor soll nach der Einführung des gewünschten Substituenten an C1 durch verschiedenste Schutzgruppenmanipulationen gewährleistet werden, dass nur die axiale Hydroxygruppe an C4 für eine Verknüpfung zur Verfügung steht, während die anomere Position des Galactosedonors als Thiophenyl aktiviert wird. Eine anchimere Assistenz durch den benachbarten Substituenten an C2, die zum β -verknüpften Disaccharid führen würde, sollte unter Verwendung der Benzylschutzgruppe ausgeschlossen werden, so dass nach der Aktivierung des Thioacetals unter thermodynamischen Bedingungen ausschließlich das gewünschte α -Anomer gebildet werden sollte.

Projekt D:

Metabolic Glycoengineering humaner Zellen zur Untersuchung der Dichte und Verteilung von Oberflächenglycanen

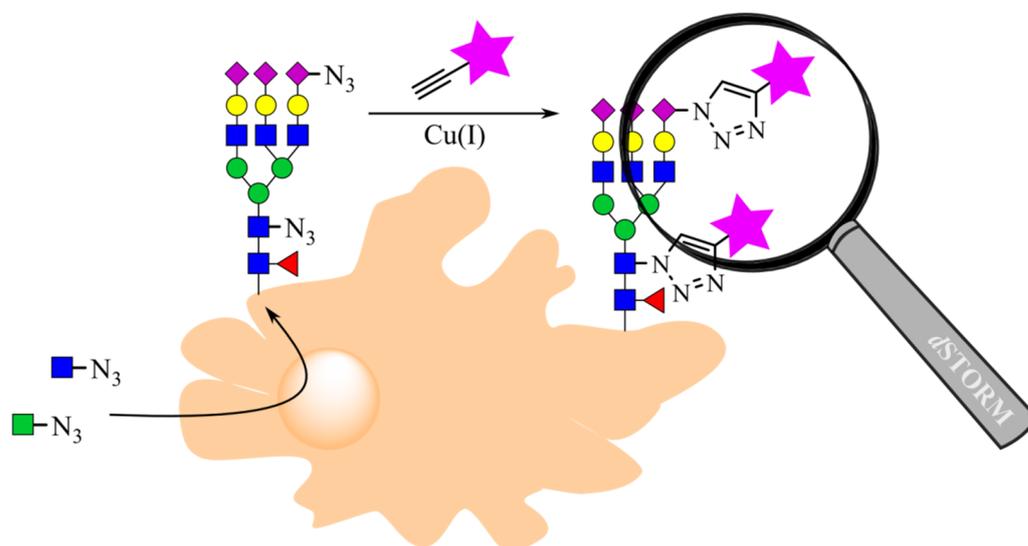


Abb. 3-4: Metabolic Glycoengineering humaner Zellen zur Markierung der Oberflächenglycane sowie Untersuchungen zu Dichte und Verteilung der Strukturen mittels hochauflösender Mikroskope; Projekt D.

Die bisher vorgestellten Projekte nutzen jeweils vereinfachte Modellsysteme zur Untersuchung von Bindungsereignissen. Ihr entscheidender Nachteil liegt allerdings darin, dass sie Dichte, Zusammensetzung und dreidimensionale Präsentation von Glycanen auf Zelloberflächen nur ungenügend abbilden können. Diese Parameter sind allerdings häufig entscheidend für biologische Erkennungsprozesse und auch im nativen Vorbild noch immer kaum untersucht. Ein Grund dafür ist die Tatsache, dass die Glycane der Zelloberfläche für

klassische optische Untersuchungsmethoden im wahrsten Sinne des Wortes unsichtbar sind. Zum einen können die Kohlenhydratmotive nur in Ausnahmefällen selektiv markiert werden, zum anderen unterliegt die klassische optische Mikroskopie dem Beugungslimit, so dass zwei Punkte nur dann isoliert dargestellt werden, wenn ihr Abstand größer ist als die halbe Wellenlänge des verwendeten Lichts.^[376] Bei einer Minimalwellenlänge von ca. 400 nm ist es deshalb unmöglich, Strukturen unter 200 nm im Lichtmikroskop scharf abzubilden.

Zur vollständigen Interpretation von Bindungsereignissen ist es aber notwendig, die genannten Parameter oder zumindest ihre Größenordnung zu kennen. Zu diesem Zweck sollten in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe *Sauer* (Universität Würzburg) verschiedene Oberflächenglycane mittels Metabolic Glycoengineering fluoreszenzmarkiert und mit dem hochauflösenden Verfahren *dSTORM*^[377-378] (*direct stochastic optical reconstruction microscopy*) abgebildet werden. Der Einfluss definierter, durch „Clickchemie“ auf der Zelloberfläche installierter Motive sollte ebenfalls bewertet werden. Die so gewonnenen Ergebnisse können möglicherweise wichtige Impulse für das Verständnis medizinisch relevanter glycanabhängiger Prozesse liefern und zu neuen Diagnose- und Therapieansätzen für Infektionen und maligne Erkrankungen führen.

Projekt E:

Metabolic Glycoengineering von Bakterien und Untersuchung von Adhäsionsprozessen

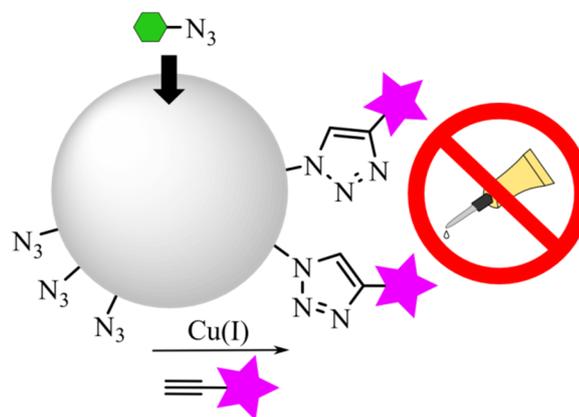


Abb. 3-5: Metabolic Glycoengineering von Bakterien und Einfluss der veränderten Zelloberfläche auf Adhäsionsprozesse; Projekt E.

Ebenso wie eukaryotische Zellen sind auch Bakterien von einer Vielzahl komplexer Kohlenhydrate bedeckt, die häufig vollkommen anders strukturiert sind und sich zum Teil aus gänzlich verschiedenen Bausteinen zusammensetzen (siehe Kapitel 2.1). Diese beeinflussen in einem hohen Maß Faktoren wie das Kolonisierungsverhalten, die Infektiosität sowie die Invasivität pathogener Stämme und bieten sich deshalb als künftige Angriffspunkte im Kampf gegen (multiresistente) Erreger an. Da die Unterschiede im Glycom auch zwischen einzelnen Stämmen teilweise sehr groß sind, besteht die Hoffnung, auf dieser Grundlage gezielt einzelne pathogene Stämme anzugreifen. Im Gegensatz zu heute gängigen (Breitband)-Antibiotika würden derartige Wirkstoffe etwa die symbiotische Darmflora unbeeinträchtigt lassen und so zu einer deutlich besseren Langzeitverträglichkeit führen.

Eine Möglichkeit, die spezifischen bakteriellen Glycane zu adressieren und zu modifizieren könnte das Metabolic Glycoengineering bieten. Während das System für eukaryotische Zellen etabliert ist liegen für Bakterien bisher nur wenige Studien vor (siehe Kapitel 2.4). Im Rahmen dieser Arbeit sollten deshalb die Möglichkeiten der Technik evaluiert und das Potential der Modifikation bakterieller Glycane im Zusammenhang mit Infektionsprozessen bewertet werden.

Neben therapeutischen Ansätzen kann so möglicherweise auch die Diagnostik von den Optionen des gezielten Nachweises eines Stamms bzw. einer virulenten Variante profitieren.

Projekt F:

Synthese zweier Nitroxolin-Konjugate als Referenz für quantitative LC-MS-Studien und die Untersuchung ihres antibakteriellen Potentials

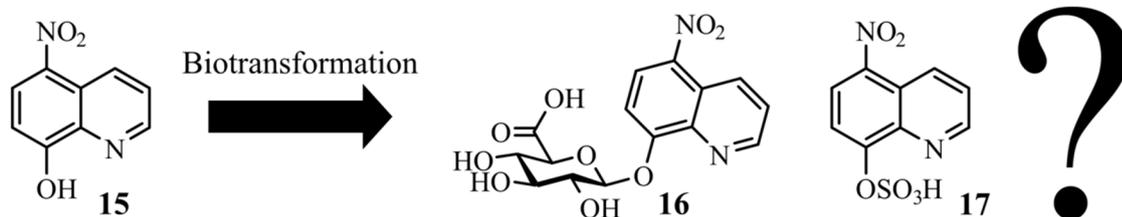


Abb. 3-6: Für das Antibiotikum Nitroxolin (**15**) postulierte Konjugate, die durch Biotransformation der Phase II entstehen und massenspektrometrisch im Urin nachgewiesen wurden. Zur Verifizierung der Struktur, Quantifizierung und Bestimmung des Wirkprofils sollten die Derivate dargestellt und charakterisiert werden; Projekt F.

In der konservativen Therapie von Harnwegserkrankungen wird häufig das Antibiotikum Nitroxolin (5-Nitrochinolin-8-ol) eingesetzt, das zweiwertige Metallionen wie Mg^{2+} und Ca^{2+} chelatisiert und dadurch die Integrität der bakteriellen Zellwand, speziell der äußeren Membran Gram-negativer Spezies (siehe Abb. 2-4) stört.^[379] Der Wirkstoff unterliegt, wie andere exogene lipophile Verbindungen auch, der Biotransformation, so dass nur ein Bruchteil der ursprünglich eingesetzten Dosis unverändert an ihren Wirkort, die Blase, gelangt. Die Identität der im Harn vorhandenen Metabolite wurde bisher nur massenspektrometrisch untersucht, eine Verifizierung der Struktur sowie die Quantifizierung unter Einsatz eines Standards stand noch aus. Auch das Wirkprofil der postulierten Konjugate ist weiterhin unbekannt, so dass die Synthese und Charakterisierung der Hauptkomponenten des im Urin vorhandenen Wirkstoffs angestrebt wurde.

In Teilen bauen die Projekte aufeinander auf, wie bei der Untersuchung von Bindungsereignissen auf Zelloberflächen, denen Versuche am reduzierten Modell des Glychips vorausgehen. Andererseits ergänzen sich etwa die Studien zu humanen und bakteriellen Glycanen in ihrem gegenseitigen Einfluss auf Erkennungsprozesse.

Obwohl Projekt F zur Synthese zweier Metabolite des Antibiotikums Nitroxolin zunächst isoliert von den anderen steht liefert es doch wichtige Impulse für spätere Überlegungen zur Biotransformation und Untersuchung des Wirkprofils möglicher Antiadhäsiva. Zudem steht so ein Standard zur Einordnung der Wirksamkeit neuer Verbindungen im Vergleich zum Standardtherapeutikum zur Verfügung.

Die Verknüpfung der einzelnen Projekte A bis F, die wie Puzzlesteine ineinandergreifen, um einen Teil des Gesamtbildes zu ergeben, ist in Abb. 3-7 graphisch zusammengefasst:

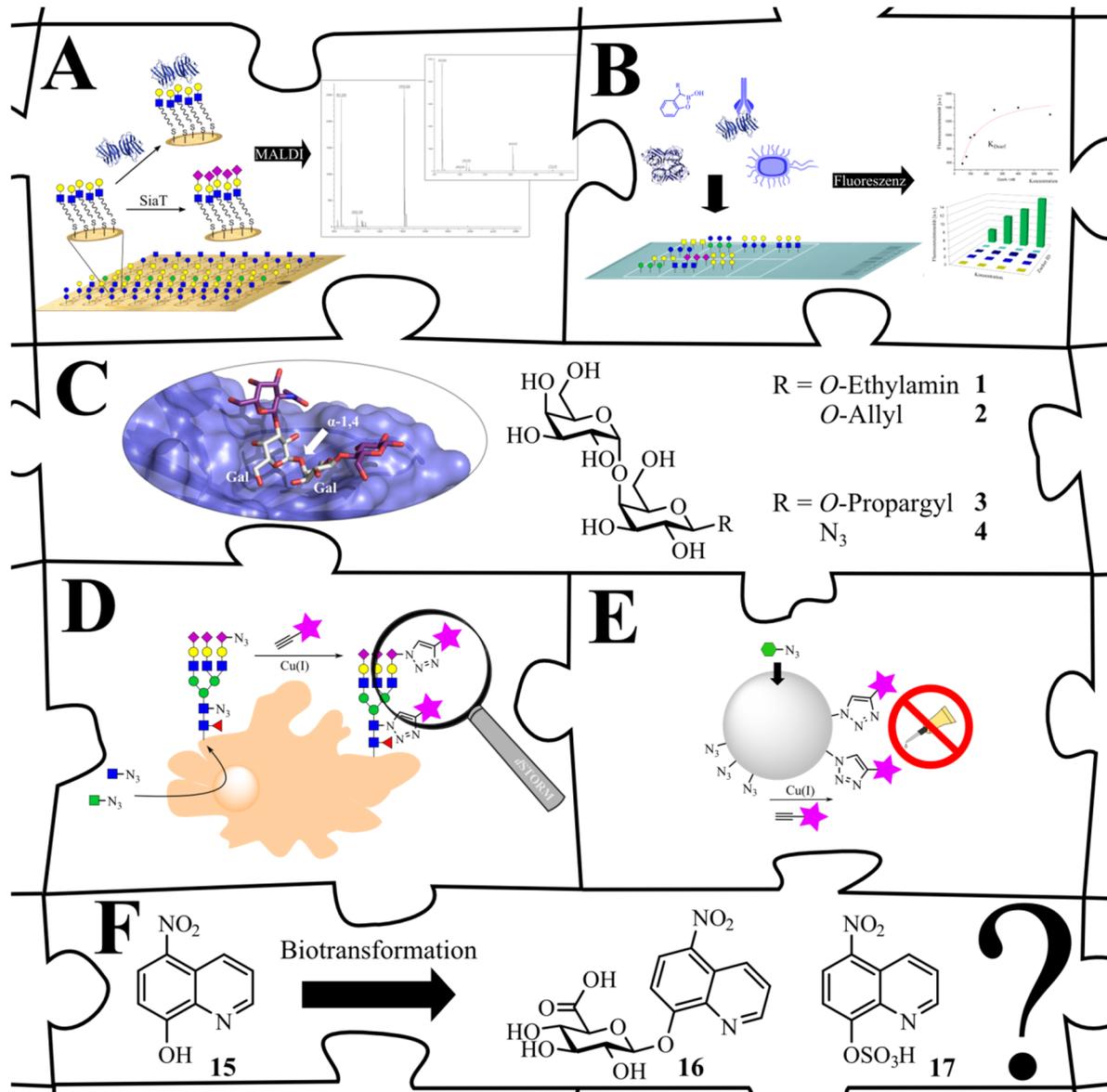


Abb. 3-7: Gesamtübersicht und inhaltliche Verknüpfung der bearbeiteten Projekte. In den beiden Projekten A und B sollten Bindungsereignisse am Modellsystem des Glycochips untersucht werden. Die beiden verwendeten Systeme auf Gold- und Glasbasis ergänzen sich hinsichtlich der verwendeten analytischen Methoden komplementär. Projekt C, die Synthese des Galabiosemotivs mit diversen Linkermotiven stellt die Verbindung zwischen dem Modellsystem und Untersuchungen auf nativen Zelloberflächen her. Die dargestellten Disaccharidmotive sollten sowohl für Bindungsstudien auf dem Chip als auch *in vitro* eingesetzt werden. In den Projekten D und E sollten schließlich die Eigenschaften der Oberflächenglycane sowohl eukaryotischer als auch prokaryotischer Zellen näher untersucht und diese mittels Metabolic Glycoengineering gezielt verändert werden, um so unter Umständen Adhäsions- und Zell-Zell-Interaktionsprozesse zu beeinflussen. Mit der Synthese der beiden Metabolite des Antibiotikums und Antiadhäsivums Nitroxolin in Projekt F sollte eine Referenzverbindung zur Definition der Wirkstärke neu entwickelter Antiadhäsiva näher charakterisiert werden.

3.2 Kohlenhydrate auf artifiziellen Oberflächen: der Glycochip

Glycochips oder Kohlenhydrat-(Mikro)Arrays dienen der Präsentation definierter Glycane auf einer zweidimensionalen Oberfläche sowie der Untersuchung von Wechselwirkungen mit verschiedensten Bindungspartnern (siehe Kapitel 2.3). Damit können sie als vereinfachtes, auf den Glycananteil reduziertes Modell einer Zelloberfläche genutzt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Arrayformate realisiert, die sich in ihrer Eignung für verschiedenste analytische Methoden optimal ergänzen. Ihr Aufbau, beginnend bei der Synthese der jeweiligen linkerfunktionalisierten Kohlenhydrate, sowie die Verwendung für verschiedene Screenings und Bindungsstudien werden in diesem Kapitel diskutiert.

3.2.1 Massenspektrometrische Analytik auf dem Goldchip

Der Glycochip auf Basis einer Goldoberfläche in der hier verwendeten Form wurde von der Gruppe um Flitsch³ entwickelt.^[183, 203, 380] Das Gold erlaubt den einfachen Aufbau von SAMs auf Basis langkettiger Alkylthiole, die eine kovalente Immobilisierung funktionalisierter Glycane ermöglichen. Gleichzeitig eignet sich die leitende Oberfläche für die direkte Nutzung in massenspektrometrischen Untersuchungen mittels MALDI.

Damit kombiniert der Array eine Festphasenplattform für chemoenzymatische Synthesen im Mikroformat mit einem leicht zugänglichen Analysetool. Die benötigten Goldsubstrate sind kommerziell erhältlich und bieten jeweils 64 definierte Wells mit einem Durchmesser von ca. 2 mm, was einer Fläche von etwas über 3 mm² entspricht und Reaktionen in 1 µl-Volumina ermöglicht.

Eine effiziente und verlässliche Kupplungsmethode, die bereits vielfältige Verwendung im Bereich der Glycochips findet, ist die Reaktion einer als NHS-Ester aktivierten Carbonsäure mit einem primären Amin (siehe Kapitel 2.3 sowie Abb. 2-15w), die ohne weitere Reagenzien bereits bei leicht basischem pH-Wert in wässrigen Puffern stattfindet. Die Aktivierung der carbonsäureterminierten Oberfläche ist leicht aus einer Lösung realisierbar, zudem sorgt das gebildete Amid für eine stabile Verbindung zwischen Kohlenhydrat und Oberfläche.

3.2.1.1 Synthese der linkersubstituierten Kohlenhydrate

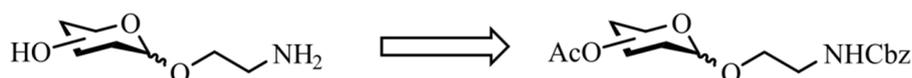
Als Linker wurde in Anlehnung an die Arbeiten von Zhi *et al.*^[183] sowie Šardžik *et al.*^[381] Ethanolamin gewählt, das *O*-glycosidisch an C1 eingeführt wird (siehe Schema 3-2). Seine Länge gewährleistet eine gewisse Flexibilität und ermöglicht durch den Abstand zwischen dem sperrigen Kohlenhydrat und dem für die Kupplung benötigten Amin eine effiziente Reaktion mit der aktivierten Oberfläche. Dieser Linker wurde bereits auf verschiedenen Arrayformaten verwendet und erwies sich als vollständig kompatibel mit anschließenden enzymatischen Transformationen^[202, 382] und Bindungsstudien mit Lectinen.^[183, 383]

Im Vergleich mit den Hydroxyfunktionen der Zucker, aber auch des Linkers selbst besitzt das Amin eine hohe Nucleophilie, was zu unerwünschten Nebenreaktionen führen kann. Zudem

³ Im Rahmen eines Praktikums in ihren Laboren am Manchester Institute of Biotechnology wurden die Grundzüge der Technik vermittelt.

erschwert die hohe Polarität der primären Aminogruppe die Isolation und Reinigung von Zwischenstufen. Aus diesem Grund wurde das Amin zunächst als Benzyloxycarbonyl (Cbz) geschützt,^[384] die Umsetzung mit Cbz-Chlorid lieferte nahezu quantitative Ausbeuten; am Ende der Synthesesequenz kann das Carbamat hydrogenolytisch wieder entfernt werden.

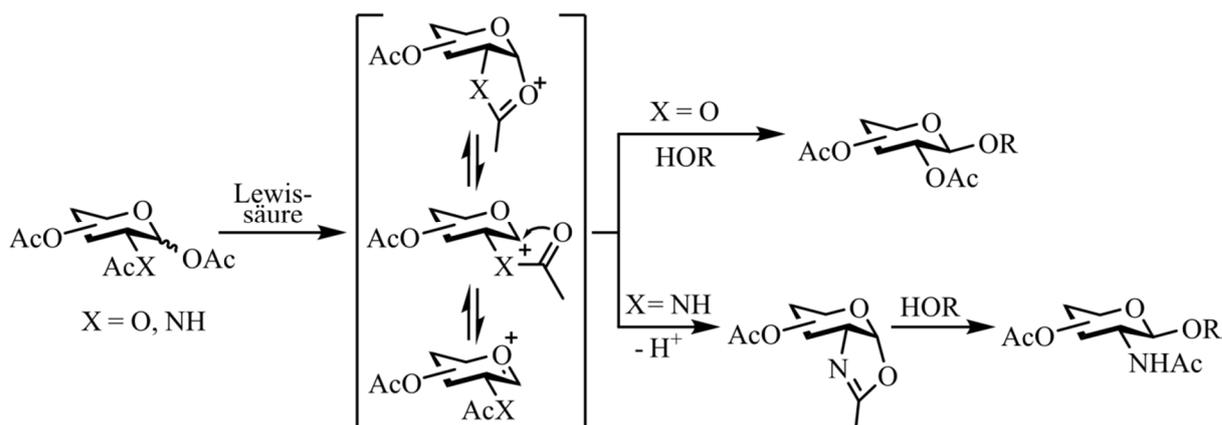
Die weiteren Schutzgruppen der Kohlenhydrate wurden orthogonal gewählt, für einfache Mono- und Disaccharide erwiesen sich Acetylgruppen als geeignet. Die Wahl der Schutzgruppen zur Synthese des Galabiosemotivs wird im entsprechenden Kapitel diskutiert.



Schema 3-2: Zielstruktur aminoterminierter Kohlenhydrate zur Immobilisierung auf dem Goldchip und retrosynthetischer Vorläufer.

Für die Einführung *O*-glycosidisch gebundener Substituenten am anomeren Zentrum wurden zahlreiche Methoden beschrieben, die sich unterschiedlichster Abgangsgruppen und Aktivierungsreagenzien bedienen.^[385-386]

Peracetylierte Zucker, die synthetisch sehr leicht zugänglich sind, werden durch Umsetzung mit einem Akzeptor in Anwesenheit einer Lewissäure wie Bortrifluorid, Trimethylsilyltriflat oder Zinn(IV)chlorid funktionalisiert. Diese begünstigt die Abspaltung eines Acetats am anomeren Zentrum unter Ausbildung eines mesomeriestabilisierten Oxocarbeniumions. Dies wird zusätzlich durch benachbarte Acetylsubstituenten gefördert, deren Carbonylsauerstoff ein Elektronenpaar zur Verfügung stellt.^[387-388] Die anchimere Assistenz sorgt zudem meist für eine hohe Stereoselektivität der Reaktion, wobei bevorzugt das 1,2-*trans*-substituierte Produkt erhalten wird. Äquatoriale Substituenten an C-2 (wie in Glucose- oder Galactose-derivaten) begünstigen so die β -Konfiguration des anomeren Zentrums (siehe Schema 3-3). Analog werden bei axialer Substitution, wie sie in Mannosederivaten vorliegt, fast ausschließlich α -anomere Glycosylierungsprodukte gefunden.



Schema 3-3: Glycosylierung eines Alkohols ROH mit peracetylierten Kohlenhydraten unter Lewissäurekatalyse und anchimerer Assistenz eines benachbarten äquatorialen Substituenten. Bei Verwendung von Aminozuckern kann das intermediär gebildete Produkt zudem deprotoniert und als stabiles Oxazolin isoliert werden

Besitzt das Kohlenhydrat an Position 2 eine Acetamidogruppe, sorgt diese durch die Bildung eines Fünfrings ebenfalls für eine Stabilisierung des intermediären Oxocarbeniumions.

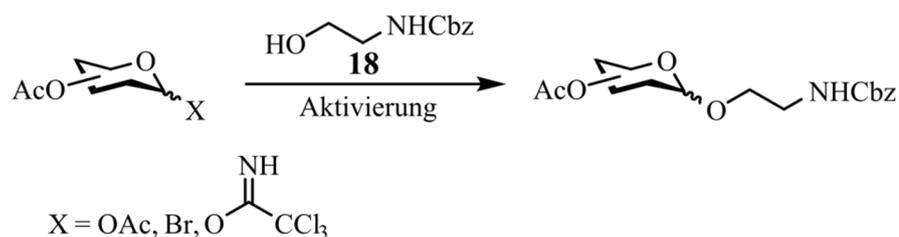
Durch Deprotonierung des Ringstickstoffs entsteht ein Oxazolin als stabile Zwischenstufe. Dieses kann entweder *in situ* unter Substitution am anomeren Zentrum durch ein Nucleophil geöffnet oder aber zunächst isoliert werden (siehe Schema 3-3).

Genügt die Reaktivität des anomeren Acetyls nicht zur Verknüpfung des Glycosyldonors, wird zunächst eine andere Abgangsgruppe eingeführt.

Die Königs-Knorr-Methode bedient sich anomerer Halogenide (Chlorid, Bromid), die durch Reaktion des peracetylierten Kohlenhydrats mit Halogenwasserstoffen meist quantitativ dargestellt werden. Die hohe Elektronegativität der Halogenide sorgt in Kombination mit dem anomeren Effekt (negative Hyperkonjugation eines freien Elektronenpaars des Ringsauerstoffs mit dem unbesetzten σ^* -Orbital der C-Hal-Bindung) für eine stereoselektive Substitution zum α -Anomer. Zur Aktivierung der Halogenide werden Schwermetallionen, meist Silber- oder Quecksilbersalze verwendet.^[389] Diese sorgen für eine Verlängerung der C-Hal-Bindung, was zu einer positiven Polarisierung des anomeren Kohlenstoffs führt. Die Substitution verläuft nach einem S_N2 -artigen Mechanismus, so dass stereoselektiv β -Glycoside erhalten werden. Ist die Nucleophilie des Glycosylakzeptors allerdings zu gering, neigen die Halogenide zur Hydrolyse.

Deutlich reaktiver wird der Glycosyldonor durch Aktivierung als Trichloracetimidat (TCAI) und Umsetzung unter Lewissäure-Zusatz. Die aktivierten Kohlenhydrate sind einfach und in guten Ausbeuten aus den entsprechenden Halbacetalen darstellbar und werden als kristalline Feststoffe isoliert. Die Stereoselektivität der folgenden Substitutionsreaktion kann durch geschickte Wahl der Nachbargruppe an C2 gesteuert werden. Damit findet diese von Schmidt *et al.* vorgestellte Variante^[390] breite Anwendung in verschiedensten Glycosylierungsreaktionen, unter anderem auch in der Totalsynthese von Naturstoffen.

Zur Einführung des Ethanolaminlinkers wurden sowohl peracetylierte Kohlenhydrate als auch die Varianten nach Königs-Knorr und Schmidt verwendet (siehe Schema 3-4).



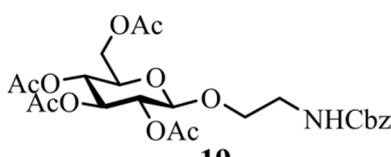
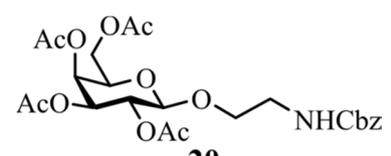
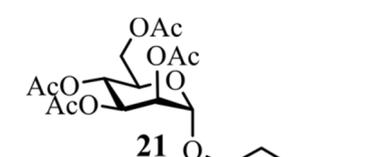
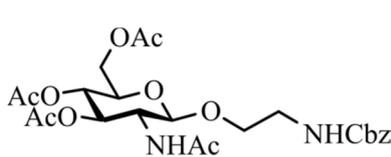
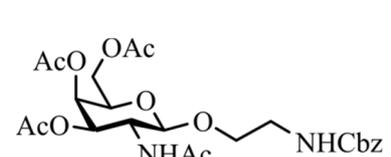
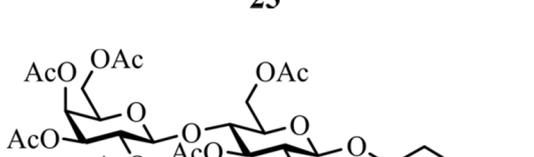
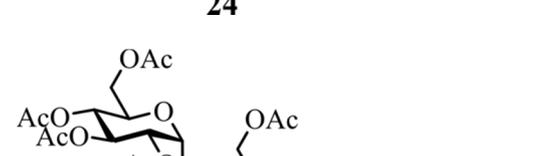
Schema 3-4: Allgemeine Reaktionsgleichung zur Glycosylierung von *N*-Cbz-Ethanolamin **18**.

Mit Ausnahme der Mannose **21** wurde jeweils das β -Anomer der Kohlenhydrate erhalten. Die bevorzugte Bildung dieses thermodynamisch weniger stabilen Produkts (das α -Anomer wird durch den sogenannten anomeren Effekt stereoelektronisch stabilisiert^[391]) ist auf die Kombination einer kinetischen Reaktionsführung mit dem in Schema 3-3 diskutierten Nachbargruppeneffekt der Acetylfunktion an C-2 zurückzuführen.

Auch das α -anomere Produkt der Mannose wird durch diesen Effekt favorisiert, seine höhere thermodynamische Stabilität beeinflusst den Reaktionsverlauf nicht.^[392]

Die durchgeführten Reaktionen und erzielten Ausbeuten sind in Tabelle 3-1 zusammengefasst.

Tabelle 3-1: Zusammenfassung der Ergebnisse zur Glycosylierung von *N*-Cbz-Ethanolamin.

Produkt	X	Aktivierung	Ausbeute [%]
 19	OAc	I	40 [56] [*]
 20	OAc TCAI	I II	48 [60] [*] 40
 21	OAc	I	48
 22	OAc OAc OAc	I III IV	- ^{a)} 33 [#] 33 ^{b)}
 23	OAc OAc OAc	I III IV	- ^{a)} 61 [#] - ^{b)}
 24	OAc TCAI Br	I II V	- 47 - ^{c)}
 25	TCAI	II	78

(TCAI, Trichloracetimidat; Aktivierung **I**) $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, DCM, 0 °C, 30 min, dann RT, 18 h; **II**) $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, DCM, 0 °C, 1 h, dann RT, 18 h; **IIIa**) TMSOTf, DCM, 45 °C, 18 h; **IIIb**) TMSOTf, DCM, RT, 18 h; **IV**) SnCl_4 , MeCN, 0 °C, 1 h, dann RT, 14 h; **V**) Ag_2CO_3 , Aceton, RT, 18 h; ^{*}bereinigte Ausbeute nach Reisolation des Edukts; [#]über zwei Stufen; ^{a)} partiell Bildung des Oxazolins; ^{b)} besonders bei erhöhter Temperatur Bildung des Oxazolins; ^{c)} überwiegend Hydrolyse).

Für einfache Pyranosen (Glucose, Galactose, Mannose) erwiesen sich bereits die peracetylierten Vorstufen als ausreichend reaktiv für eine Kupplung. Diese wurde unter

Einsatz von $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ in Dichlormethan durchgeführt und lieferte mit 40-48 % zwar mäßige, aber im Bereich der Literatur liegende Ausbeuten (Reaktionen in Acetonitril, 36-62 %^[381]). In zwei Fällen konnte zudem ein Teil des Edukts reisoliert werden, was zu einer bereinigten Ausbeute von 56-60 % führte. Auch unter Verwendung eines Trichloracetimidats nach Schmidt konnte keine Steigerung der Ausbeute erzielt werden, so dass aus ökonomischen Gründen die direkte Kupplung der acetylierten Pyranosen bevorzugt werden sollte.

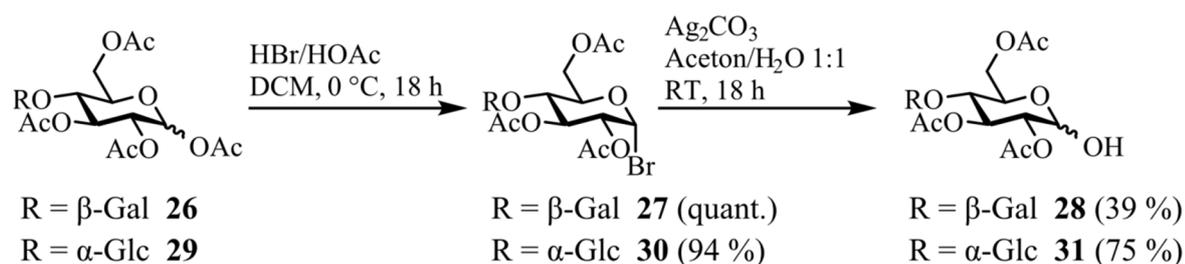
Die Umsetzung der acetylierten Aminozucker Glucosamin und Galactosamin mit dem Linker unter Verwendung verschiedener Lewissäuren ($\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, TMSOTf, SnCl_4) lieferte dagegen nicht die gewünschten Produkte. Besonders bei erhöhter Temperatur (40 °C) wurde stattdessen ausschließlich die Bildung der entsprechenden Oxazoline (vgl. Schema 3-3) beobachtet. Durch Reaktionsführung bei 0 °C unter Einsatz von Zinnchlorid konnte schließlich das Glucosaminderivat **22** isoliert werden, allerdings erwies sich diese Umsetzung als wenig verlässlich und kaum reproduzierbar.

Auch die vielfach beschriebene *in situ*-Umsetzung der intermediär gebildeten Oxazoline führte nicht zu den gewünschten Kupplungsprodukten **22** und **23**, stattdessen wurden komplexe Produktgemische beobachtet. Erst nach der Isolierung der Oxazoline konnte die Reaktion mit **18** unter Verwendung von TMSOTf erfolgreich und mit akzeptablen Ausbeuten durchgeführt werden.

Die direkte Kupplung des peracetylierten Disaccharids Lactose (**26**) blieb ebenso erfolglos wie die Verwendung des Bromids **27** unter Königs-Knorr-Bedingungen mit Silbercarbonat. Die von Šardžik *et al.* verwendeten Quecksilbersalze $\text{Hg}(\text{CN})_2$ und HgBr_2 ^[381] sollten aufgrund ihrer ausgeprägten akuten sowie chronischen Toxizität vermieden werden, so dass auf die Aktivierung als Trichloracetimidat ausgewichen wurde.

Dazu wurden die peracetylierten Disaccharide zunächst regioselektiv an C1 entschützt. Dies ist zum einen durch Umsetzung mit Basen wie Hydrazinacetat, Benzylamin oder KOH, aber auch zweistufig durch Bromierung und anschließende Hydrolyse möglich. Während die einstufige Variante meist nur mäßige Ausbeuten liefert und zudem eine säulen-chromatographische Reinigung des Produkts erfordert, können sowohl die Bromierung als auch die Hydrolyse mit jeweils exzellenten, häufig quantitativen Ausbeuten durchgeführt werden.^[381, 393] Auch eine weitere Reinigung der Rohprodukte entfällt im Normalfall.

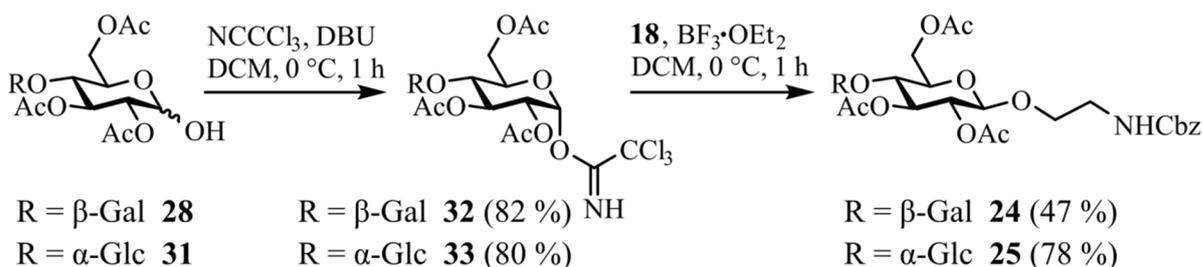
Für die Maltose gelang dies mit einer Ausbeute von 71 % über zwei Stufen zweifellos, dagegen wurde im Fall der Lactose nur eine Gesamtausbeute von 39 % erzielt (siehe Schema 3-5). Als problematisch erwies sich die Hydrolyse des Bromids **27**, vermutlich sind die deutlichen Ausbeuteverluste auf die gute Löslichkeit von **28** in der wässrigen Phase zurückzuführen und können durch intensive Extraktionsschritte abgemildert werden.



Schema 3-5: Zweistufige regioselektive Deacetylierung der Disaccharide Lactose und Maltose zum Halbacetal.

Die Aktivierung zum Trichloracetimidat erfolgte durch Umsetzung mit einem 20-fachen Überschuss an Trichloracetonitril in Anwesenheit der nichtnucleophilen Base DBU (1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en). Für beide Disaccharide wurde ausschließlich das α -Anomer erhalten, die Ausbeuten lagen mit 80 bzw. 82 % im erwarteten Bereich.

Die Kupplung mit dem Cbz-geschützten Ethanolaminlinker **18** unter Einsatz der Lewissäure $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ lieferte die gewünschten, ausschließlich β -verknüpften Produkte **24** und **25** in moderaten bis zufriedenstellenden Ausbeuten (siehe Schema 3-6).



Schema 3-6: Aktivierung der Disaccharide Lactose und Maltose zum Trichloracetimidat und Glycosylierung des Ethanolaminlinkers **18** unter lewis-sauren Bedingungen.

Diskussion der spektroskopischen Daten

Eine charakteristische Gemeinsamkeit aller ^1H -Spektren der dargestellten linkersubstituierten Kohlenhydrate sind die Signale, die dem *N*-Cbz-Aminoethyllinker zugeordnet werden. Die aromatischen Protonen der Schutzgruppe resonieren als Multiplett mit einem Integral von fünf im Bereich von 7.38-7.28 ppm, während die benzyliche CH_2 -Gruppe als Singulett bei ca. 5.1 ppm auftritt. Das Proton des Amids unterliegt aufgrund seiner Acidität einem teilweisen Austausch mit dem deuterierten Lösungsmittel und liefert deshalb ein breites, strukturloses Signal mit einem Integral kleiner eins, das im Bereich um 5.2 ppm auftritt; nur in wenigen Ausnahmen wurde ein Triplet mit einer Kopplungskonstante zwischen vier und sechs Hertz beobachtet, was einer 3J -Kopplung mit der benachbarten CH_2 -Gruppe entspricht. Die Protonen der Ethyleinheit sind durch die Verknüpfung mit dem chiralen Kohlenhydrat diastereotop, wobei der Effekt auf die direkt benachbarte CH_2 -Gruppe am Sauerstoff größer ist als auf diejenige am Stickstoff. Aus diesem Grund werden für erstere zwei Multipletts in den Bereichen um 3.90-3.80 ppm sowie 3.75-3.65 ppm beobachtet, deren zugrunde liegende Struktur als Dublett von Dublett von Dublett nur selten klar aufgelöst ist. Zweitere resoniert als Multiplett mit einem Integral von zwei, das im Bereich von 3.50-3.30 ppm auftritt und eine charakteristische Form aufweist. Nur für die Aminosucker **22** und **23** werden auch hier zwei getrennte Multipletts bei 3.51-3.43 sowie 3.38-3.29 ppm beobachtet.

Ebenfalls in allen Spektren zu finden sind die Signale für die Methylgruppen der Acetylreste. Diese treten jeweils als Singuletts mit einem Integral von drei im Bereich um 2 ppm auf, die sich in manchen Fällen auch überlagern. Die Signale der amidischen Acetylgruppen liegen leicht hochfeldverschoben als Singuletts um 1.90 ppm.

Die anomeren Protonen der Verbindungen können aufgrund ihrer Aufspaltung als Dublett zugeordnet werden, während alle weiteren Protonen ein komplexeres Kopplungsmuster zeigen. Aus der Größe der Kopplungskonstante erschließt sich mit Hilfe der Karpluskurve^[394] die Konfiguration des anomeren Zentrums. So zeigen die anomeren Protonen der

β -verknüpften Verbindungen **19** (Glc), **20** (Gal), **22** (GlcNAc), **23** (GalNAc), **24** (Lactose) sowie **25** (Maltose) bei einer chemischen Verschiebung von 4.48, 4.45, 4.58, 4.60, 4.44 bzw. 4.50 ppm eine Kopplungskonstante von etwa 8 Hz. Dies entspricht einer axial-axialen Kopplung der Protonen an C1 und C2 unter einem Winkel von 180° . Für Mannose **21** ist dagegen bei 4.82 ppm ein Dublett mit einer Kopplungskonstante von 1.7 Hz zu beobachten, was für die α -Konfiguration des anomeren Zentrums spricht, bei dem die beiden Protonen an C1 und C2 jeweils äquatorial unter einem Winkel von ca. 60° zueinander stehen. Im Fall der Disaccharide tritt im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum jeweils ein zweites Dublett auf, das dem anomeren Proton an C1' entspricht. Die β -1,4-verknüpfte Lactose **24** zeigt für H1' ein Signal bei 4.47 ppm mit einer Kopplungskonstante von 7.8 Hz, während das anomere Proton der α -1,4-verknüpften Maltose **25** bei 5.40 ppm mit einer Kopplungskonstante von 4.0 Hz resoniert. Die Unterscheidung der beiden anomeren Protonen als H1 bzw. H1' erfolgte anhand der $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektren über mehrere Bindungen (HMBC), in denen Kopplungen zwischen H1 und dem Kohlenstoff des Ethyllinkers sowie H1' und C4 über den verbrückenden Sauerstoff hinweg auftreten. Die weiteren Ringprotonen der Kohlenhydrate wurden anhand der 2D-Spektren mit $^1\text{H-}^1\text{H}$ - bzw. $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ -Korrelation (COSY, HSQC) zugeordnet. In ihren Kopplungsmustern spiegeln sie zudem die Konfigurationen der jeweiligen Kohlenstoffe wider. So werden für axial-axiale Kopplungen Kopplungskonstanten im Bereich von 9-10 Hz beobachtet, während axial-äquatoriale Kopplungen zwischen H3 und H4 sowie H4 und H5 der Galactoseeinheiten deutlich kleinere Aufspaltungen um 3 bzw. 1 Hz zeigen.

Auch in den ^{13}C -Spektren treten neben den Signalen für den Kohlenhydratanteil jeweils die charakteristischen Signale des Linkers sowie der Acetylschutzgruppen auf: die aromatischen Kohlenstoffe resonieren im Bereich um 128 ppm, wobei der quartäre Kohlenstoff mit ca. 137 ppm etwas weiter tieffeldverschoben ist. Der benzyllische sowie die beiden Kohlenstoffe des Ethyllinkers können anhand ihres negativen Signals im DEPT-135-Spektrum identifiziert werden und resonieren bei ca. 67 sowie 69 und 41 ppm, wobei der dem Carbamatstickstoff benachbarte Kohlenstoff eine deutlich geringere Entschirmung erfährt und deshalb hochfeldverschoben resoniert. Die Carbonylkohlenstoffe des Carbamats sowie der Acetylreste treten bei ca. 157 sowie im Bereich um 170 ppm auf, während die Methylkohlenstoffe eine Verschiebung von ca. 20 ppm aufweisen. Etwas weiter tieffeldverschoben resonieren dagegen die Methylkohlenstoffe der NHAc-Einheiten, sie treten bei etwa 23 ppm auf.

Die Signale der anomeren Kohlenstoffe werden bei etwa 101 ppm beobachtet, eine Ausnahme bilden nur die α -konfigurierten C1 der Mannose **21** sowie C1' der Maltose **25**, die bei 97.9 bzw. 95.7 ppm resonieren.

Die Identität der Vorstufen in der Synthesesequenz wurde ebenfalls NMR-spektroskopisch sowie massenspektrometrisch verfolgt. Da ausschließlich Manipulationen an C1 durchgeführt wurden, beschränkt sich die Diskussion auf die Verfolgung der entsprechenden Signale.

Besonders auffällig sind die Spektren der während der Synthese der Aminosucker **22** und **23** als Intermediate isolierten Oxazoline **34** und **35**. Durch die Anellierung eines gespannten Fünfrings an der C1-C2-Bindung kommt es zu einer leichten Konformationsänderung des Sechsrings, was sich in insgesamt kleineren Kopplungskonstanten für die Ringprotonen niederschlägt als im Fall einer axial-axialen Ausrichtung zu erwarten wären. Bedingt durch den Ringschluss mit der äquatorial stehenden Acetylgruppe an C2 liegen die Oxazoline als

α -Anomere vor, deren Protonen H1 jeweils bei 5.97 ppm resonieren und eine Kopplungskonstante von 7.4 (GlcNAc) bzw. 6.8 Hz (GalNAc) aufweisen. Die Methylgruppe des Oxazolins zeigt zudem zwei Signale im ^1H -NMR-Spektrum (dies deutet auf die Anwesenheit zweier Konformere des Fünfrings hin), die über ^1H - ^{13}C -Korrelation (HSQC) nur einem Kohlenstoff bei etwa 14 ppm zugeordnet werden können. Gegenüber den übrigen Acetylgruppen (20-21 ppm) ist dieser deutlich hochfeldverschoben (siehe Abb. 3-8). Auch der amidische Kohlenstoff zeigt mit etwa 167 ppm einen Hochfeldshift gegenüber den weiteren Carbonylen, die bei 169-170 ppm resonieren. Während die Verschiebung der anomeren Kohlenstoffe der Oxazoline mit 99.57 sowie 101.59 ppm weitgehend mit den Werten der gekuppelten Verbindungen **22** und **23** übereinstimmt, erfahren die Kohlenstoffe an C2 eine deutliche Tieffeldverschiebung auf 65.11 bzw. 63.73 ppm gegenüber 54.72 und 51.24 ppm nach der Öffnung des Fünfrings.

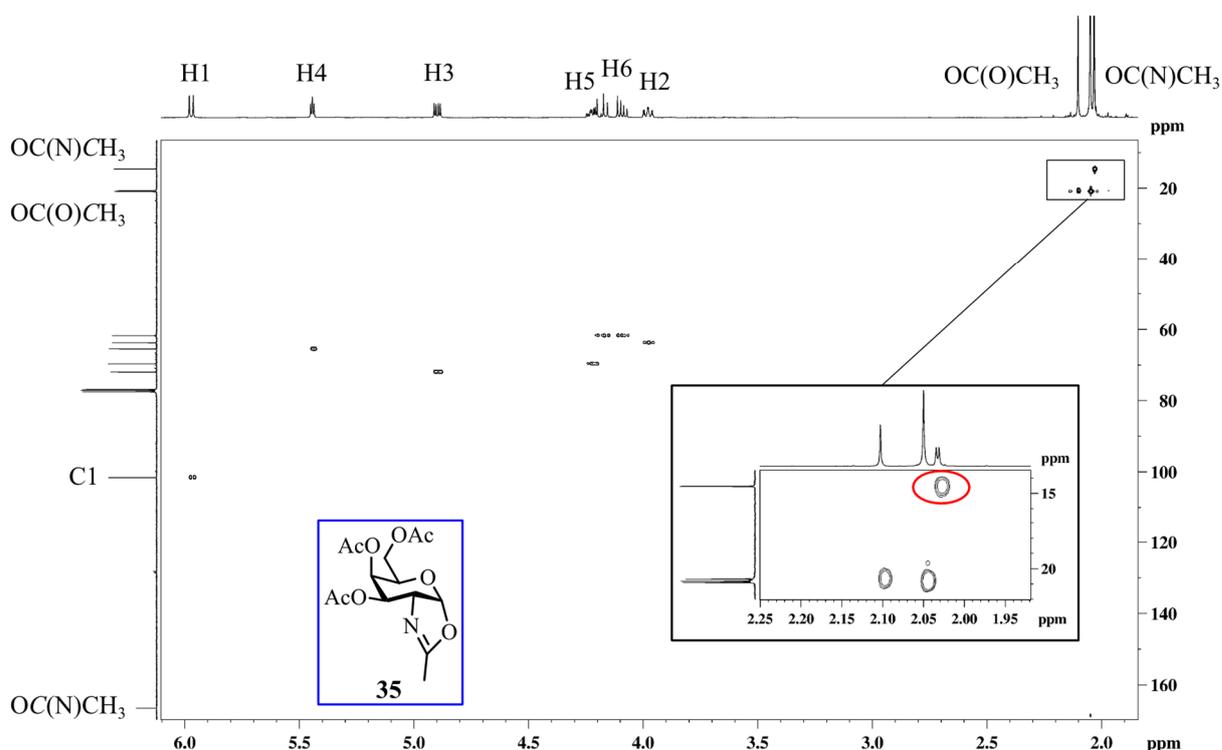


Abb. 3-8: HSQC-Korrelationsspektrum des Oxazolins **35**. Charakteristisch sind die Aufspaltung des Protonensignals der Methylgruppe am Fünfring sowie die deutliche Hochfeldverschiebung des zugehörigen Kohlenstoffs (siehe vergrößerter Ausschnitt). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden nicht alle Signale des ^{13}C -Spektrums gesondert beschriftet.

Für die Disaccharide Lactose und Maltose wurde die Aktivierungssequenz der anomeren Position (Acetyl-Bromid-Hydroxyl-Trichloracetimidat) verfolgt. Während die anomeren Protonen H1 der peracetylierten Kohlenhydrate eine Verschiebung um 5.7 ppm aufweisen und mit einer Kopplungskonstante von etwas über 8 Hz die β -Konfiguration belegen, erfahren sie durch die Substitution mit HBr eine Tieffeldverschiebung auf etwa 6.5 ppm, wobei die Kopplungskonstante von etwa 4 Hz auf eine Inversion des Stereozentrums zum α -Anomer hinweist. Die anomeren Kohlenstoffe unterliegen einem gegenläufigen Trend und erfahren einen leichten Hochfeldshift von ursprünglich ca. 91 auf ca. 86 ppm. Die Anwesenheit eines Bromatoms wird zudem im Massenspektrum belegt, das einen doppelten Basispeak bei m/z 716 sowie 718, aufweist, der dem Molekülion im Ammoniumaddukt $[\text{M}+\text{NH}_4^+]$

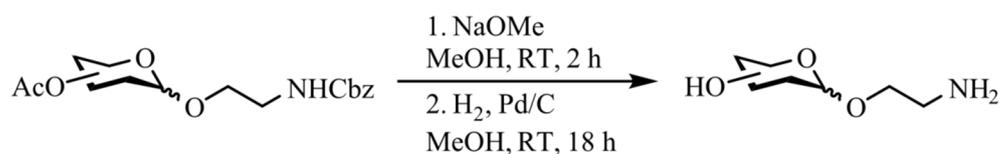
entspricht und auf die beiden Bromisotope ^{79}Br sowie ^{81}Br (relative Häufigkeit 50.69:49.31) zurückzuführen ist. Nach der Hydrolyse des Bromids erfahren die anomeren Protonen H1 eine erneute Hochfeldverschiebung, während die Kohlenstoffe wieder im tieferen Feld resonieren. Bedingt durch die Halbacetalstruktur unterliegt die anomere Position in Lösung der Mutarotation, so dass jeweils Anomerengemische isoliert wurden. Zusätzlich werden im Protonenspektrum Signale mit einem Integral von eins beobachtet, die mittels HSQC keinem Kohlenstoffatom zugeordnet werden können, dagegen im HMBC Kreuzsignale zu C1 zeigen. Die Signale bei 2.88 (**28**, α) bzw. 3.30 (**31**, β) entsprechen damit der freien Hydroxylfunktion und verschwinden mit der Einführung des Trichloracetimidats in **32** sowie **33**.

An ihrer Stelle treten sowohl im Protonen- als auch im Kohlenstoffspektrum neue Signale auf. Das Proton des eingeführten Acetimidats resoniert als Singulett bei ca. 8.7 ppm, der imidische Kohlenstoff resoniert bei 161 ppm, der Kohlenstoff der Trichlormethylgruppe bei 91 ppm. Auch die anomeren Protonen und Kohlenstoffe der aktivierten Glucoseeinheiten erfahren im Vergleich zum Halbacetal einen Shift auf 6.5 bzw. 93 ppm. Die Kopplungskonstante von 3.8 bzw. 3.7 Hz belegt die exklusive Bildung des α -Anomers, was durch die starke elektronenziehende Wirkung des Trichloracetimidats begünstigt wird.

Im Massenspektrum wird das charakteristische Isotopenmuster einer CCl_3 -Gruppe gefunden. Chlor besitzt zwei stabile Isotope, ^{35}Cl sowie ^{37}Cl mit einer relativen Häufigkeit von 75.77:24.23. Die Signale bei m/z 802, 804 und 806 entsprechen damit dem Natriumaddukt $[\text{M}+\text{Na}^+]$ des Molekülions mit einer Verteilung der Chlorisotope als $^{35}\text{Cl}_3$, $^{35}\text{Cl}_2^{37}\text{Cl}$ und $^{35}\text{Cl}^{37}\text{Cl}_2$.

Entfernung der Schutzgruppen

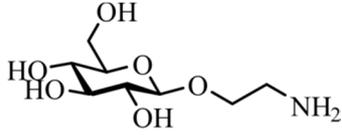
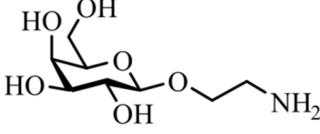
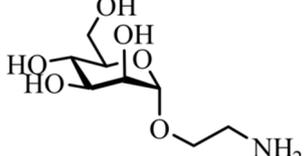
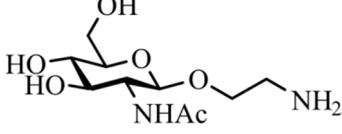
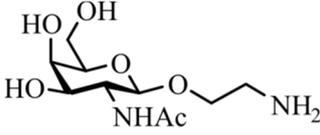
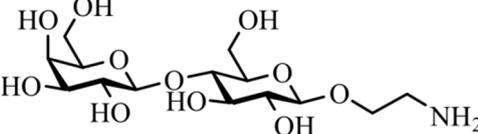
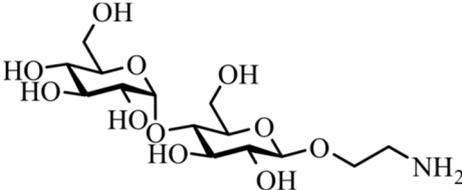
Die Acetyl- sowie Cbz-Schutzgruppen wurden in zwei Schritten entfernt (siehe Schema 3-7). Der Deacetylierung unter Zemplén-Bedingungen^[395] mit katalytischen Mengen basischen Natriummethanols in Methanol folgte die Hydrierung des Benzylcarbamats mit Wasserstoff unter heterogener Katalyse an Palladium auf Aktivkohle.



Schema 3-7: Zweistufige Entschützung der ethanolaminverlinkten Kohlenhydrate.

Die Produkte wurden in guten bis sehr guten Ausbeuten erhalten und in vielen Fällen ohne den Einsatz einer Säulenchromatographie isoliert. Die isolierten Verbindungen und Ausbeuten sind in Tabelle 3-2 zusammengefasst.

Tabelle 3-2: Erhaltene Zielstrukturen und Ausbeuten nach zweistufiger Entfernung der Schutzgruppen.

Produkt	Ausbeute [%]	
	Deacetylierung	Hydrierung
 36	72	74
 37	quant.	75
 38	82	quant.
 39	75	quant.
 40	80	92
 41	68	93
 42	86	66

Diskussion der spektroskopischen Daten

Mit der Abspaltung der Schutzgruppen verändern sich die NMR-Spektren der Verbindungen nur unwesentlich. Zunächst verschwinden die Signale der Acetylgruppen, anschließend die des Benzyloxycarbonyls. Durch die Abspaltung der Acetylgruppen steigt zudem die Polarität der Verbindungen, so dass ein Wechsel des Lösungsmittels von CDCl_3 auf MeOD nötig wird, was eine marginale intrinsische Verschiebung aller Signale mit sich bringt. Wird diese berücksichtigt, ist für die Ringprotonen der zuvor acetylierten Positionen eine deutliche Hochfeldverschiebung um etwa 1-2 ppm zu beobachten, wobei dieser Effekt auf H6 mit nur etwa 0.5 ppm wesentlich geringer ist. Damit rücken die Signale der anomeren Protonen – abgesehen von den Signalen der Cbz-Schutzgruppe – an den tieffeldverschobenen Rand des Spektrums und sind klar von den übrigen Protonen der Kohlenhydrate abgegrenzt.

Die Signale der Kohlenstoffspektren zeigen eine Tendenz zur Tieffeldverschiebung, wobei diese für die Ringkohlenstoffe C4 (Glc) bzw. C5 (Gal, Man, GlcNAc, GalNAc) der Monosaccharide sowie C5 und C5' beider Disaccharide und C4 der Maltose besonders ausgeprägt ist und im Bereich von 6-9 ppm liegt.

Nach der Hydrierung erfahren ausschließlich die Protonen der dem Stickstoff benachbarten Methyleneinheit eine leichte Hochfeldverschiebung von 0.3-0.5 ppm, alle weiteren Signale der Protonen- und Kohlenstoffspektren bewegen sich im Bereich der jeweiligen Cbz-geschützten Vorstufen.

Die freie Aminfunktion des Linkers begünstigt die Detektion des einfach protonierten Moleküls $[\text{M}+\text{H}^+]$ als Basispeak im ESI-Massenspektrum, nur in einem Fall (Glucose **36**) wurde stattdessen das Natriumaddukt $[\text{M}+\text{Na}^+]$ gefunden.

3.2.1.2 Aufbau des SAM und Anbindung der Kohlenhydrate

Der Aufbau der kohlenhydratterminierten selbstorganisierenden Monolage (SAM) erfolgte schrittweise. Zunächst wurde eine Grundlage aus zwei verschiedenen Thiolen hergestellt, deren Adsorption auf den Wells aus einer Lösung in DMSO erfolgte. Sie bestehen aus einer langen Alkylkette (C_{17}), die für die Ausbildung einer stabilen und regelmäßig gepackten SAM sorgt (siehe Abb. 2-16 sowie Abb. 3-9). Am Kopfende schließt sich ein hydrophiles Polyethylenglycol (PEG, drei bzw. sechs Einheiten) an, das unspezifische Proteinbindungen auf der Oberfläche unterbindet,^[209] bevor die Kette mit einer Hydroxylgruppe bzw. einer reaktiven Carboxyleinheit terminiert. Das verkürzte, hydroxylterminierte Thiol wird im folgenden als Spacer bezeichnet, das längere, carboxylterminierte als Linker.

Die weitere Funktionalisierung und Anbindung der Kohlenhydrate erfolgt ausschließlich über das Linker-Thiol, der Spacer dient zur Verdünnung und Einstellung der Dichte der reaktiven Gruppe sowie zur Bereitstellung einer hydrophilen Grundfläche für weitere Umsetzungen in wässrigen Medien. Die präsentierten Kohlenhydrate ragen damit aus der Oberfläche heraus und besitzen durch die verlängerte PEG-Einheit ein hohes Maß räumlicher Flexibilität, so dass folgende (enzymatische) Reaktionen und Erkennungsprozesse mit sterisch anspruchsvollen Partnern möglich werden (siehe Abb. 3-9).^[396]

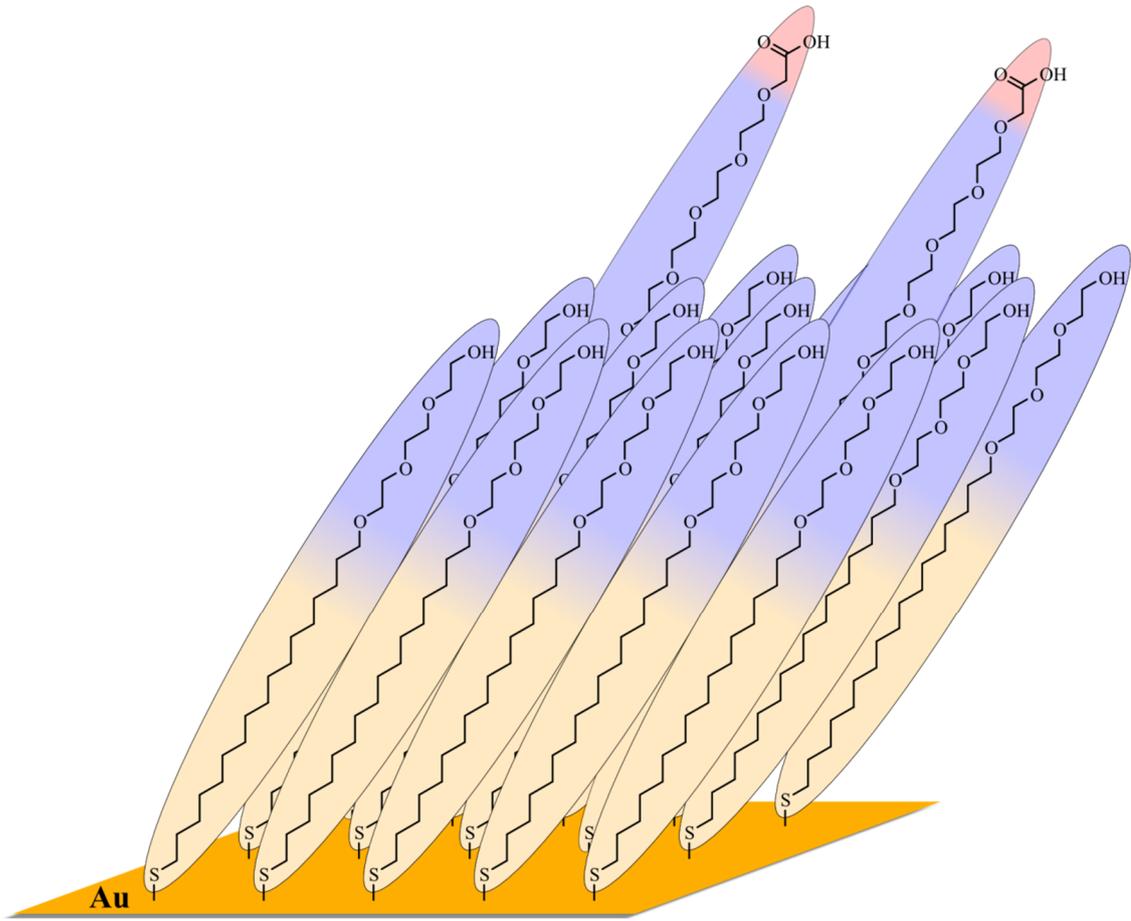
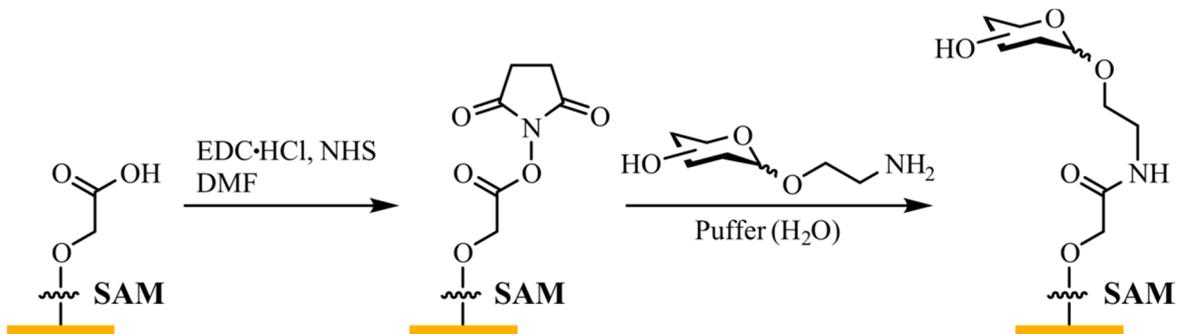


Abb. 3-9: Schematische Darstellung der verwendeten selbstorganisierenden Monolage (SAM) aus Spacer und Linker auf Gold. Die langen unpolaren Alkylketten (gelb) sorgen für eine stabile und regelmäßig gepackte SAM, während die polaren PEG-Einheiten (blau) unspezifische Proteinadsorption verhindern. Über die Carboxyltermini (rot) erfolgt die weitere Funktionalisierung. Darstellung modifiziert nach Gray *et al.*^[396]

Für die Reaktion mit den in Kapitel 3.2.1.1 beschriebenen aminterminierten Kohlenhydraten wurden die Carbonsäurefunktionen mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimidhydrochlorid (EDC·HCl) und *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) zum aktivierten NHS-Ester umgesetzt. Diese Reaktion kann sowohl im 1 µl-Volumen der Wells als auch vollflächig in einem Volumen von etwa 6 ml in einer Petrischale durchgeführt werden. Die so präparierte Oberfläche eignet sich für die Immobilisierung der Kohlenhydrate aus wässrigem Puffer (siehe Schema 3-8).



Schema 3-8: Aktivierung der carboxylerminierten SAM als NHS-Ester und Anbindung der aminofunktionalisierten Kohlenhydrate.

Alle Schritte zur Anbindung der Glycanmotive auf der Goldoberfläche sowie folgende Manipulationen wurden mittels MALDI-Massenspektrometrie verfolgt. Als Matrix diente 2,4,6-Trihydroxyacetophenon (THAP), das auch für die Untersuchung von Oligonucleotiden an der Festphase verwendet wird.^[397]

Exkurs: MALDI-Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie (MS) dient dem Nachweis geladener Teilchen (Ionen) in der Gasphase sowie der Bestimmung ihres Masse-Ladungs-Verhältnisses (m/z). Sie zählt neben der NMR-Spektroskopie zu den wichtigsten analytischen Methoden der Strukturaufklärung organischer Verbindungen. Für die apparative Umsetzung stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung, die aber auf ein einfaches Grundkonzept reduziert werden können.

Zunächst wird der Analyt in die Gasphase überführt und in der Quelle ionisiert, anschließend erfolgt im Analysator die Separierung nach m/z und schließlich am Detektor der Nachweis der erzeugten Ionen.

Je nach Beschaffenheit des Analyten wird dieser direkt verdampft (z. B. Elektronenionisation, EI), als Lösung eingesprüht (z. B. Elektrosprayionisation, ESI), oder durch Desorption von einer Oberfläche (z. B. *Fast-Atom Bombardment*, FAB oder *Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation*, MALDI). Letztere gelingt durch Beschuss der Oberfläche, des sogenannten Targets, mit energiereichen Teilchen oder einem Laserstrahl. Zuvor wird der Analyt mit einer sogenannten Matrix gemischt, Molekülen, die die zugeführte Energie besonders effektiv aufnehmen und auf den Analyten übertragen. Damit ist eine relativ sanfte Ionisation gewährleistet, so dass auch Moleküle mit Massen über 1 MDa zersetzungsfrei ionisiert und detektiert werden (siehe Abb. 3-10).^[398]

Für die MALDI-MS wird meist ein gepulster UV-Laser zur Anregung verwendet, so dass die verwendeten Matrices organische Chromophore mit einer Absorptionsbande im UV-Bereich sind. Zu den verbreiteten Verbindungen gehören 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB), 3-Hydroxypicolinsäure (3-HPA) und α -Cyano-4-hydroxizimtsäure (HCCA).^[397]

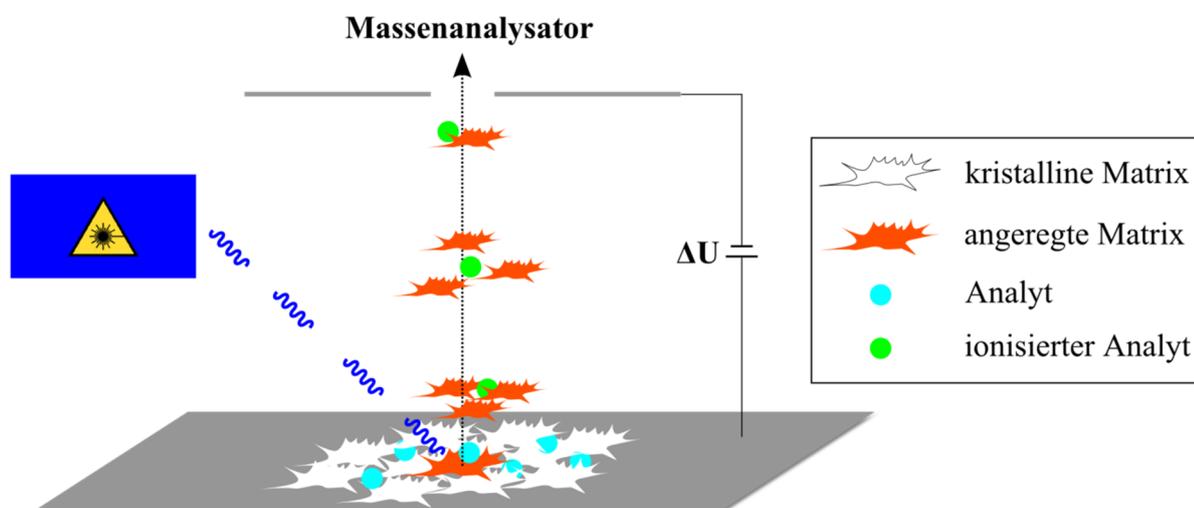


Abb. 3-10: Schematische Darstellung des Ionisationsprozesses durch MALDI. Auf der Oberfläche des Targets liegt der Analyt eingeschlossen in der kristallinen Matrix. Diese wird durch einen gepulsten UV-Laser angeregt und lokal verdampft (*Plume*-Bildung). Dabei wird der Analyt mit in die Gasphase überführt, ionisiert, in einem elektrischen Feld (ΔU) beschleunigt und dem Analysator zugeführt. Darstellung modifiziert nach Hesse, Meier, Zeeh, S. 293.^[399]

Die Methode eignet sich auch zur Analyse oberflächengebundener Moleküle wie SAMs, vorausgesetzt die eingesetzte Laserenergie reicht aus, die Bindung zur Oberfläche zu lösen. Mit einer Bindungsstärke von etwa 170-190 kJ/mol ist die terminale Gold-Schwefel-Bindung die schwächste des Konstrukts^[400] und wird mit hoher Wahrscheinlichkeit zuerst gebrochen, so dass einheitliche Massensignale detektiert werden.

Die zugeführte Laserenergie bewegt sich im Normalfall knapp über der Anregungsgrenze der Matrix, so dass mit einem einzigen Puls nur ein schlechtes Signal-Rausch-Verhältnis erzielt wird und die Spektren von etwa 50-200 Pulsen summiert werden müssen. Andererseits werden mit jedem Laserschuss auch nur geringste Mengen des Analyten (im Bereich von 10^{-17} mol) von der Oberfläche gelöst, so dass selbst nach mehreren hundert Schüssen noch über 99 % Ausgangsmenge vorhanden ist.^[397] Ein SAM kann also nahezu verlustfrei per MALDI-MS untersucht und in mehrfachen Zyklen unter analytischer Verfolgung weiter funktionalisiert werden.

Die MALDI-MS-Spektren wurden im positiven Modus unter Verwendung eines Reflectrons sowie der Flugzeitanalyse (ToF, *time of flight*) aufgenommen (Signalunterdrückung unter m/z 800). In der Regel wurden die Natriumaddukte der Moleküle $[M+Na]^+$ beobachtet. Nach der Abspaltung der Thiole von der Goldoberfläche kommt es zunächst zur Dimerisierung, so dass für die unfunktionalierte SAM zwei charakteristische Signale bei m/z 861 (Dimer des Spacers) sowie 1051 (gemischtes Dimer Linker-Spacer) beobachtet werden (siehe Abb. 3-11).

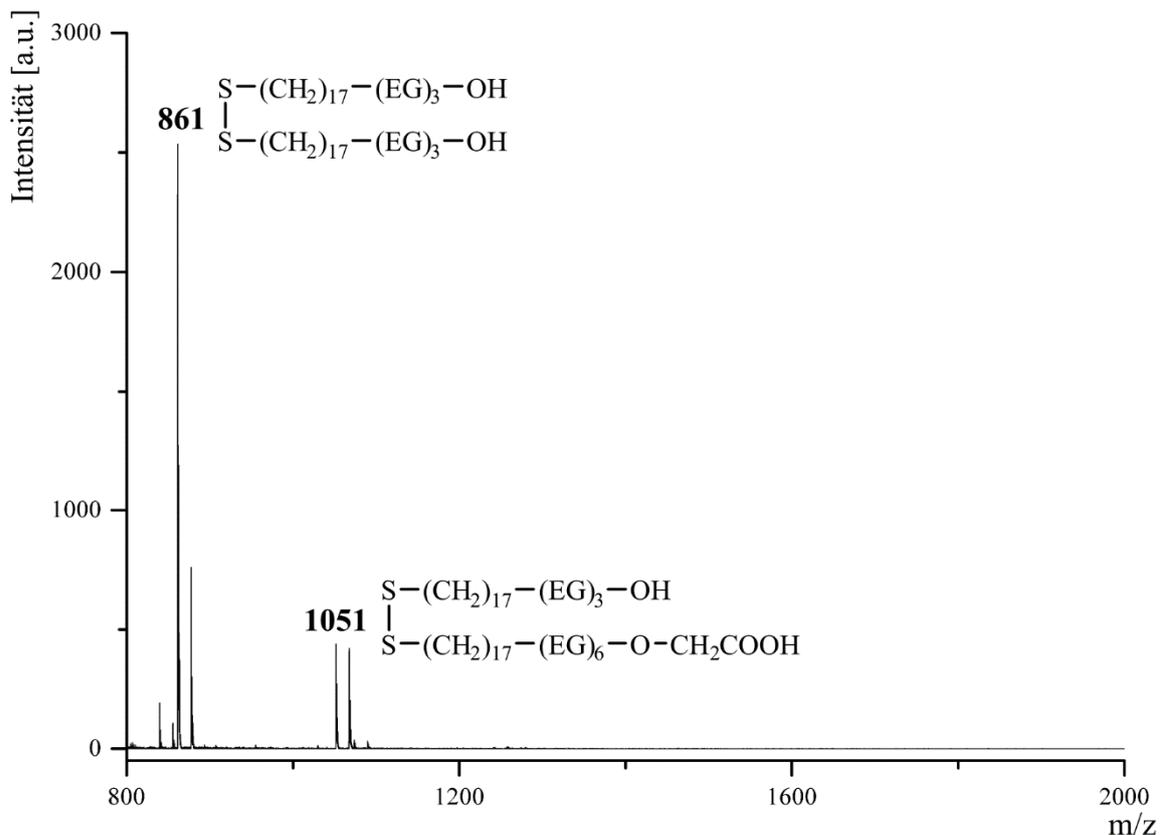


Abb. 3-11: MALDI-MS-Spektrum der unfunktionalierten SAM (Spacer/Linker 3:1). Beobachtet werden die Natrium- und Kaliumaddukte des Spacerdimers (m/z 861 und 877) sowie des gemischten Dimers (m/z 1051 und 1067). Nur mit verschwindend geringer Intensität tritt das Dimer des Linkers (m/z 1241 und 1257) auf (EG, Ethylenglycol).

Mit der weiteren Funktionalisierung der Oberfläche verschwindet das Signal bei m/z 1051, stattdessen tritt ein Signal bei höherer Masse auf, das dem Kondensationsprodukt des Linkers mit den aminfunktionalisierten Kohlenhydraten im gemischten Dimer entspricht. Dieses liegt für die Hexopyranosen **36**, **37** und **38** bei m/z 1256 (siehe Abb. 3-12), für ihre *N*-Acetyl-amino-Derivate **39** und **40** bei m/z 1297 sowie für die Disaccharide **41** und **42** bei m/z 1418 (weitere Spektren im Anhang). Als interner Standard zur Einpunktkalibrierung kann das weiterhin vorhandene Signal des Spacer-Dimers (m/z 861) genutzt werden.

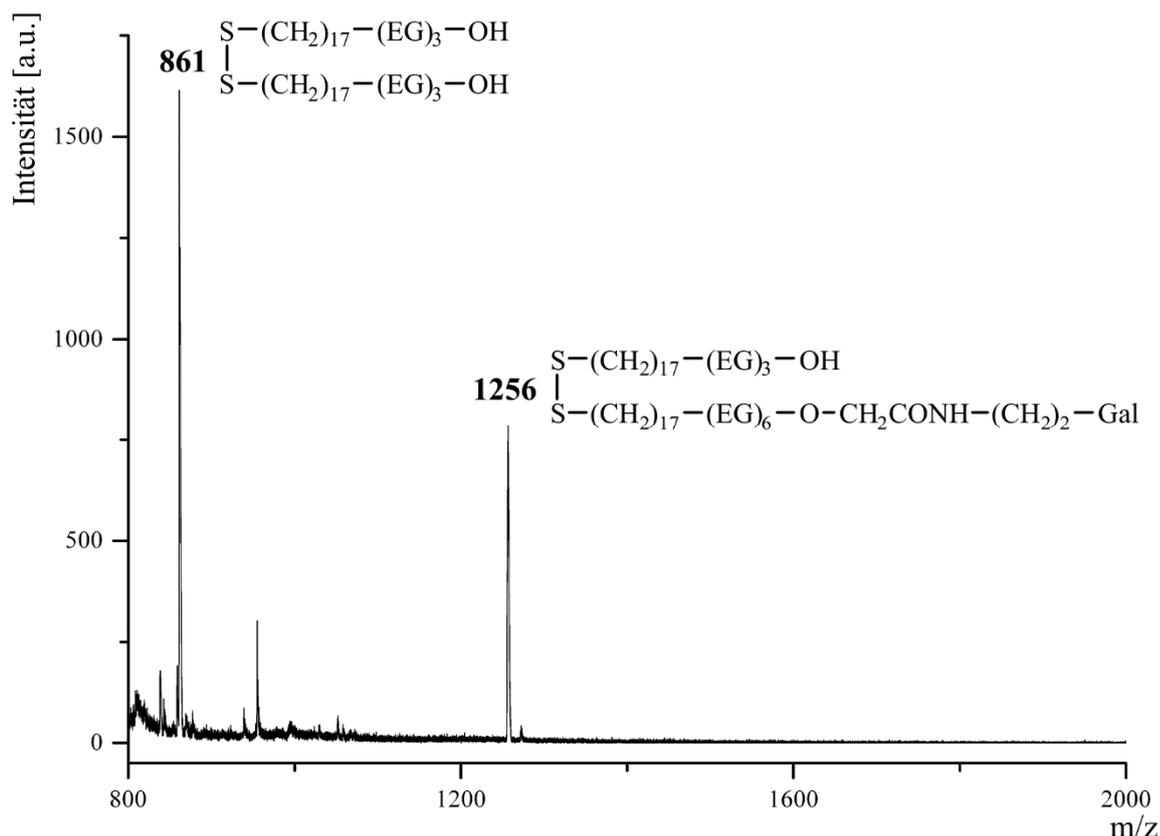


Abb. 3-12: MALDI-MS-Spektrum der SAM nach Anbindung der Hexopyranose **37**.

Der vorgestellte Glycochip auf Goldbasis wurde im weiteren Verlauf des Projekts für verschiedene enzymatische Übertragungsreaktionen, insbesondere das Screening auf Aktivität sowie Akzeptor- und Verknüpfungsspezifität eines von *Dr. Maria Ortiz-Soto* erstellten Sets von Sialyltransferasevarianten genutzt.

3.2.1.3 Enzymatische Reaktionen auf dem Goldchip

Zunächst wurde das Disaccharid *N*-Acetyllactosamin (LacNAc, β -Gal-1,4-GlcNAc) ausgehend von *N*-Acetylglucosamin durch eine enzymatische Übertragungsreaktion aufgebaut. Präsentiert auf Proteinen und Lipiden ist es das natürliche Substrat der beiden α -2,6- bzw. α -2,3-verknüpfenden humanen Sialyltransferasen ST6gal1 sowie ST3gal4 und dient als Standard für die Bestimmung der Reaktivität des Enzyms und seiner Varianten.

Zudem bietet die als zuverlässig bekannte Übertragung des Galactoserests mit einem kommerziellen Enzym, das bereits erfolgreich auf dem Goldchip eingesetzt wurde,^[203, 373, 380]

die Möglichkeit, zunächst die Bedingungen für eine enzymatische Reaktion zu optimieren. Die geringen Reaktionsvolumen von etwa 1 μl neigen bei einer Temperatur von 37 $^{\circ}\text{C}$, die das Optimum der enzymatischen Aktivität darstellt, dazu, innerhalb kurzer Zeit auszutrocknen. Deshalb wurde zunächst eine Inkubationskammer entworfen (siehe Abb. 3-13), die eine konstant hohe Luftfeuchtigkeit bereitstellt und so eine verlängerte Reaktionszeit von mehreren Tagen ermöglicht. Speziell für Enzymvarianten mit geringer Aktivität ist dies ein wichtiger Faktor.

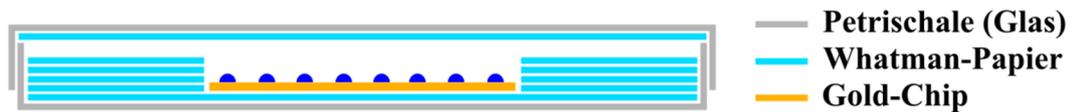


Abb. 3-13: Schematischer Querschnitt durch die Inkubationskammer zur Wahrung einer konstanten Luftfeuchtigkeit während der enzymatischen Reaktionen. Eine Petrischale wird mit mehreren Lagen Whatman-Papier ausgekleidet, das vor Gebrauch mit heißem Wasser getränkt wird. Die Kammer wird zusätzlich mit Parafilm oder Klebestreifen abgedichtet.

In dieser Kammer wurde zunächst die Verlängerung des immobilisierten GlcNAc zum LacNAc-Motiv durchgeführt. Die aus Kuhmilch isolierte bovine Galactosyltransferase (β -1,4-GalT) überträgt den nucleotidaktivierten Donor UDP-Gal auf die Hydroxylgruppe in Position vier des Akzeptors.

Der Nachweis der erfolgreichen Übertragung wurde massenspektrometrisch geführt, anstelle des Signals bei m/z 1297 wurde bei m/z 1459 das Natriumaddukt des gemischten Dimers mit LacNAc gefunden (siehe Abb. 3-14).

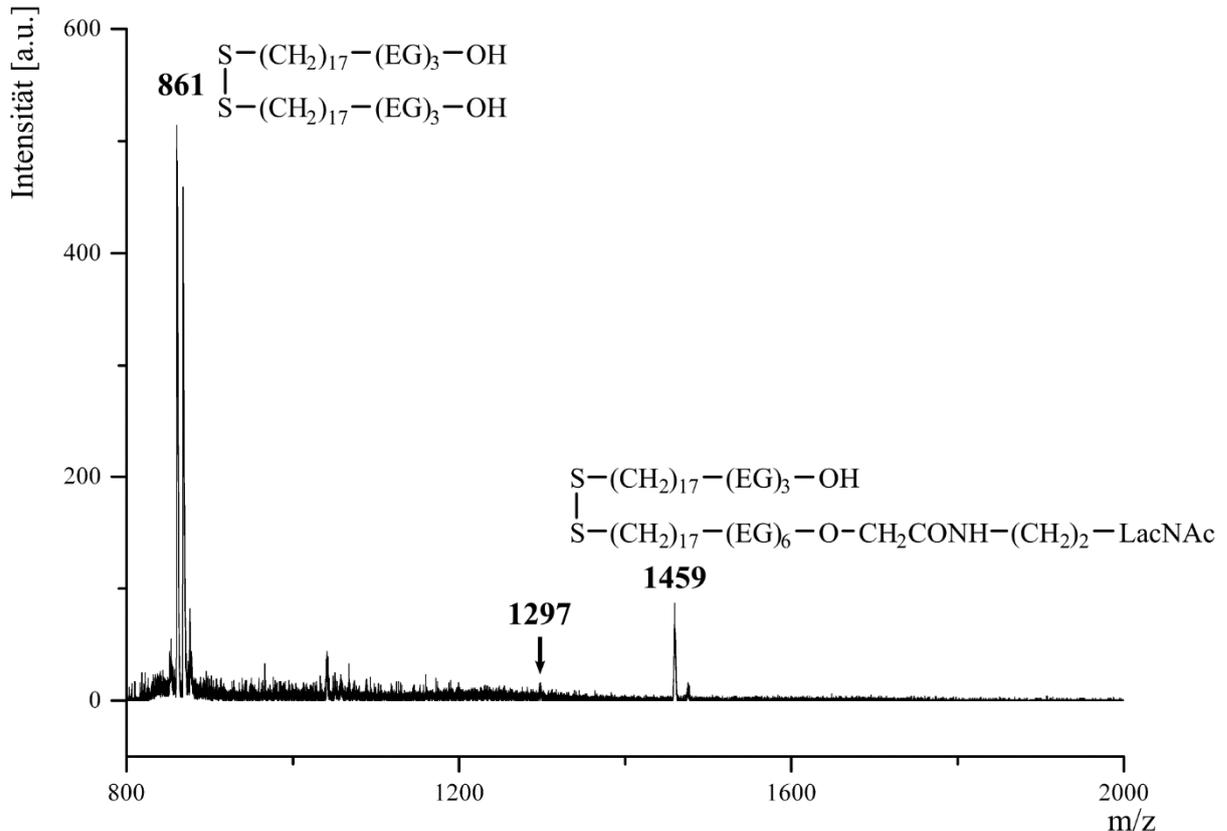


Abb. 3-14: MALDI-MS-Spektrum nach enzymatischer Verlängerung des *N*-Acetylglucosamins zum LacNAc-Motiv. An die Stelle des Signals bei m/z 1297 tritt ein Signal bei m/z 1459.

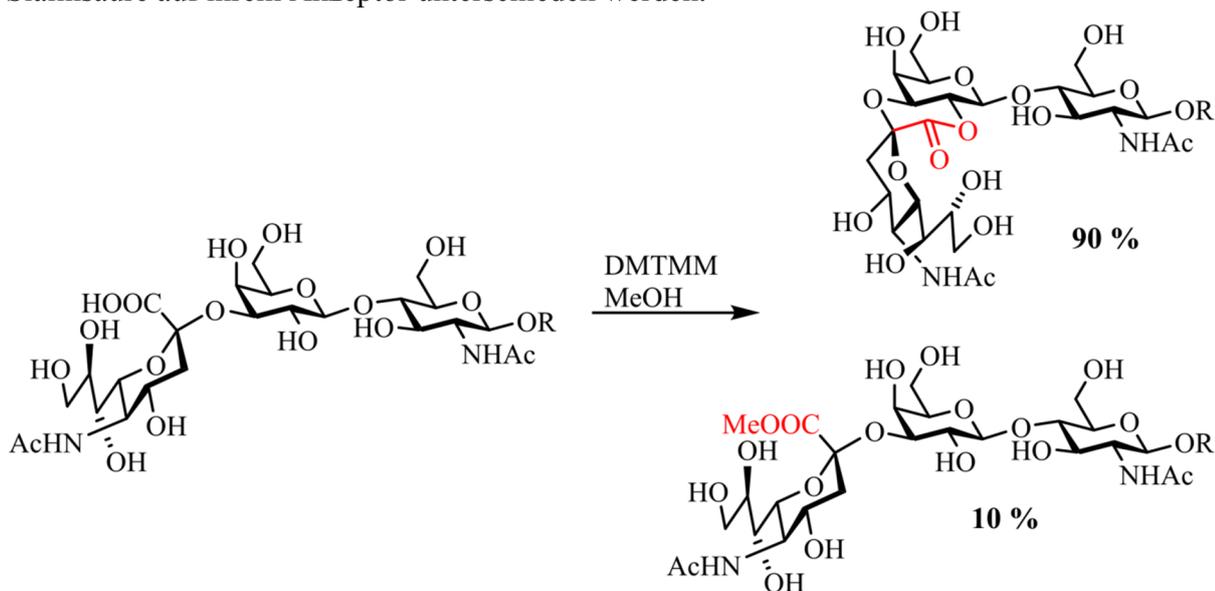
Im Fall einer unvollständigen Übertragungsreaktion kann diese wiederholt werden, bis kein Akzeptor mehr nachgewiesen wird.

Das vervollständigte Akzeptorset wurde zum Screening einer Reihe von rekombinant in *E. coli* exprimierten humanen Sialyltransferasevarianten von *Dr. Maria Ortiz-Soto* genutzt. Diese umfassen verschiedene von den drei Grundstrukturen hST3gal1, hST3gal4 sowie hST6gal1 abgeleitete genetische Varianten, die durch spezifischen Austausch einzelner Aminosäuren erzeugt wurden. Der Aufbau des Varianten-Sets war nicht Bestandteil dieser Arbeit und wird von *Dr. Maria Ortiz-Soto* anderweitig veröffentlicht.^[401]

Nach Inkubation der Akzeptoren mit einer Sialyltransferase in Gegenwart des aktivierten Donors CMP-Sia wird im Fall einer erfolgreichen Übertragungsreaktion ein Massenshift des Akzeptorsignals um 291 Einheiten erwartet. Dieser Wert entspricht der Masse eines Moleküls *N*-Acetylneuraminsäure unter Berücksichtigung des bei der Kondensation frei werdenden Wassers. Ein solches Signal wurde zunächst nicht beobachtet, allerdings fiel in einem Spektrum auf, dass sich die relativen Intensitäten zwischen GlcNAc (durch unvollständige Galactoseübertragung verblieben) und LacNAc zugunsten des Monosaccharids verschoben. Daraus wurde geschlossen, dass eine Sialinsäureübertragung auf den Akzeptor LacNAc stattgefunden hatte, das entstandene Produkt aber nicht per MALDI-MS detektierbar war.

Eine Instabilität der Sialinsäure und ihrer Derivate unter massenspektrometrischen Bedingungen ist bekannt.^[402] Durch Veresterung der freien Carbonsäurefunktion sowie Permethylierung können die Verbindungen aber meist stabilisiert und zuverlässig detektiert werden.^[403] Anstelle der häufig beschriebenen Umsetzung mit Methyljodid^[202] wurde 4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methyl-morpholiniumchlorid (DMTMM)^[404-405] in Methanol als Kupplungsreagenz zur Ausbildung des Methylesters verwendet.⁴

Durch die Reaktion kann zudem zwischen Produkten mit 2,3- bzw. 2,6-Verknüpfung der Sialinsäure auf ihrem Akzeptor unterschieden werden.



Schema 3-9: Umsetzung von 2,3 auf LacNAc verknüpfter Sialinsäure mit DMTMM in Methanol. Das Verhältnis zwischen den beiden möglichen Produkten, dem internen Lacton sowie dem Methylester beträgt etwa 9:1 (R = SAM).

⁴ Die Veresterung mit DMTMM auf dem Goldchip wurde zuerst von der Arbeitsgruppe um Flitsch genutzt. Im Rahmen des dort durchgeführten Praktikums wurde die Methode gezeigt und übernommen.

Während die auf Position sechs übertragene Sialinsäure ausschließlich in ihren Methylester überführt wird (Massenzuwachs 14 a.u.), hat die 2,3-verknüpfte *N*-Acetylneuraminsäure die Möglichkeit zum internen Ringschluss mit der Hydroxylgruppe an Position zwei der Galactose. Das ausgebildete Lacton zeigt durch die Abspaltung von Wasser eine um 18 a.u. verringerte Masse und wird zu einem Anteil von etwa 90 % beobachtet, der Methylester tritt mit etwa 10 % auf (siehe Schema 3-9). Für eine auf LacNAc übertragene und durch DMTMM stabilisierte Sialinsäure bedeutet das eine Gesamtmassenzunahme von 273 a.u. in 2,3-Verknüpfung sowie 305 a.u. nach 2,6-Übertragung.

Nach der Behandlung der funktionalisierten SAM wurde in der Tat ein schwaches Signal bei m/z 1766 nachgewiesen (siehe Abb. 3-15), die Abweichung vom erwarteten Wert (m/z 1765) für das 2,6-verknüpfte Produkt ist auf Kalibrierungsprobleme sowie die Signalverbreiterung zurückzuführen.

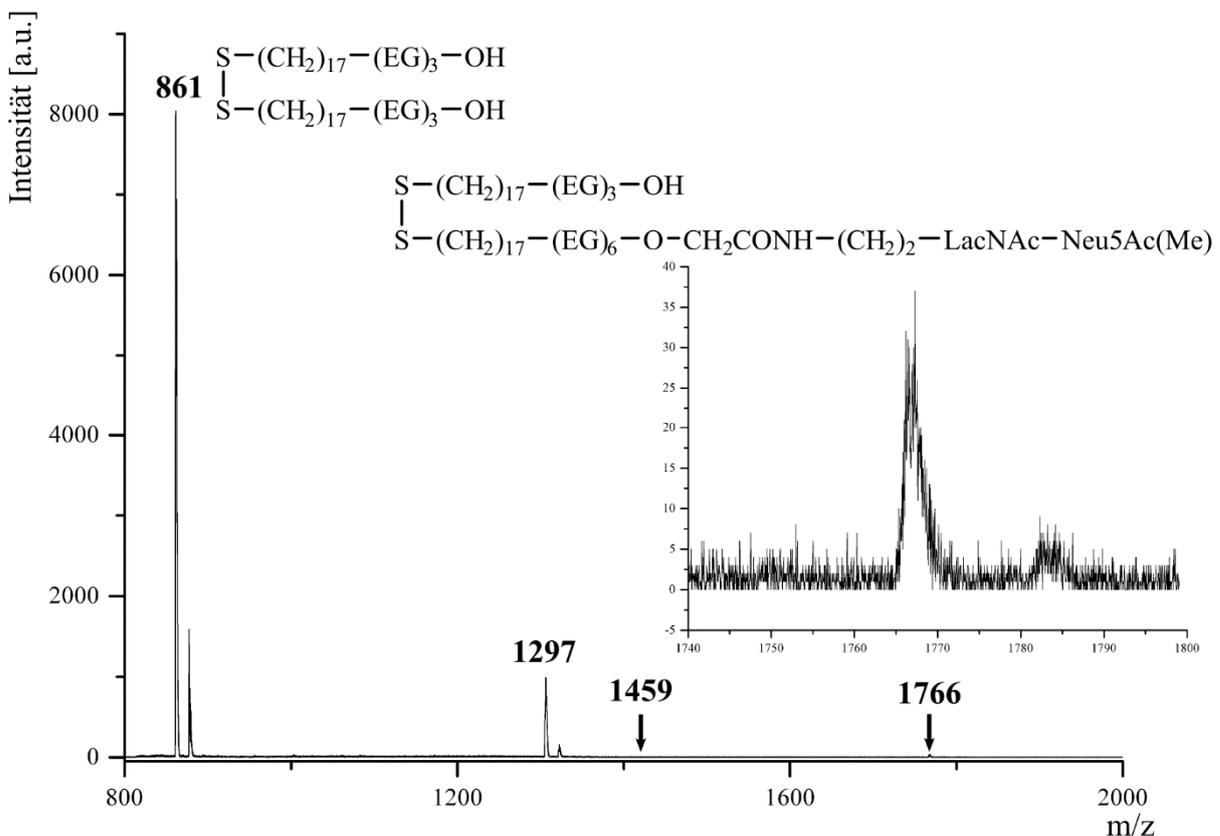


Abb. 3-15: MALDI-MS-Spektrum nach enzymatischer Übertragung von *N*-Acetylneuraminsäure auf LacNAc (m/z 1459) und anschließender Methylierung der Carbonsäure mit DMTMM. Das Signal bei m/z 1766 entspricht dem erwarteten 2,6-verknüpften Produkt, bei m/z 1297 ist nicht zum Disaccharid umgesetztes *N*-Acetylglucosamin sichtbar.

Damit wurde zum ersten Mal eine auf dem Goldchip aktive Sialyltransferase nachgewiesen.

Mittlerweile wurden weitere Übertragungsreaktionen verschiedener Enzymvarianten auf diversen Akzeptoren beobachtet. Die Ergebnisse sind allerdings nicht Bestandteil dieser Arbeit, sondern werden von *Dr. Maria Ortiz-Soto* anderweitig veröffentlicht.^[401] Durch Erweiterung des Akzeptorspektrums können auf Grundlage der bisherigen Arbeiten weitere Screenings im effektiven Parallelverfahren durchgeführt und neue Substratspezifitäten sowie der Einfluss einzelner Aminosäuren auf das Akzeptor- und Verknüpfungsmuster der

Sialyltransferasen untersucht werden. Die Kenntnis des exakten Reaktionsmechanismus erlaubt zudem das gezielte Design von Enzymen für neuartige Übertragungsreaktionen.

Die aufgebaute Bibliothek an (sialylierten) Glycanstrukturen auf dem Chip kann weiterhin genutzt werden, Proteine, aber auch ganze Zellen mit entsprechender Affinität selektiv zu binden und per MALDI nachzuweisen. Seit den ersten Veröffentlichungen zur Identifizierung und Diskriminierung von Bakterien anhand des MALDI-Fingerabdrucks der Zellen^[406-407] revolutionierte diese Technik die klinische Mikrobiologie.^[408-410] Im Gegensatz zu Methoden, die auf selektiver Kultivierung oder genomischer Identifizierung beruhen, bietet die MALDI-Massenspektrometrie eine einfache, kostengünstige und schnelle Variante zum Nachweis von Pathogenen, die eine hohe Reproduzierbarkeit gewährleistet.^[411-414] Bereits hinterlegte Datenbanken der Massenspektren diverser Stämme und optimierte Algorithmen erleichtern die Zuordnung der gewonnenen Daten.^[415-417]

Allerdings bestehen weiterhin Schwierigkeiten, nah verwandte Stämme eindeutig zu unterscheiden.^[410, 418] Eine Vorselektion der Bakterien aus der Probe durch spezifische Adhäsion an oberflächenfixierte Glycane wie auf dem vorgestellten Goldchip liefert hier eine entscheidende Zusatzinformation, ohne dass Genom- oder Proteomanalysen nötig werden.

3.2.2 optische Analytik auf dem Glaschip

Auf einem Microarray werden viele tausend Proben auf kleinstem Raum immobilisiert und mit minimalem Materialaufwand parallel analysiert. Insbesondere für genomische und proteomische Untersuchungen wurde ein standardisiertes System entwickelt, das funktionalisierte Glaschips im Format eines Mikroskopie-Objekträgers (25 x 75 mm) nutzt und Bindungsereignisse fluorimetrisch detektiert sowie quantifiziert. Das benötigte Material, vom Glaschip bis zum Array-Reader, ist kommerziell erhältlich und wurde für die Anbindung von Glycanen und die Detektion von Bindungsereignissen adaptiert.

3.2.2.1 Synthese der linkersubstituierten Kohlenhydrate

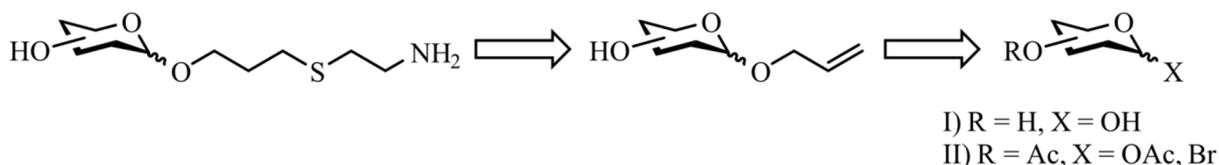
Der verwendete Glaschip ist wie die Oberfläche des in Kapitel 3.2.1 vorgestellten Goldchips mit NHS-aktivierten Carbonsäurefunktionen terminiert, so dass die Glycane ebenfalls zunächst mit einer Linkereinheit ausgestattet werden müssen, die ein Amin enthält.

Der bereits vorgestellte Linker auf Ethanolaminbasis erwies sich als zu kurz für eine optimale Präsentation und Erkennung der Glycane auf dem Glasarray. Deutlich bessere Ergebnisse wurden dagegen mit dem 3-(2-Aminoethylthio)propyllinker^[419] erzielt, der bereits zuvor in der Arbeitsgruppe verwendet wurde^[420] (siehe Kapitel 3.2.2.2).

Das Amin wurde in einer zweistufigen Reaktionssequenz eingeführt, nach der Glycosylierung von Allylalkohol unter Fischer-Bedingungen^[421] bzw. durch eine Königs-Knorr-Reaktion erfolgte die photochemische Thio-Clickreaktion^[422-423] mit Cysteamin (siehe Schema 3-10).

Eine Reihe von entsprechend funktionalisierten Kohlenhydraten wurde von *Dr. Lars Hillringhaus* zur Verfügung gestellt, so dass die Synthesesequenz nur exemplarisch für zwei Mannosederivate durchgeführt wurde. Die Glucuronsäure wurde zum Allylderivat umgesetzt, da zwischenzeitlich gewonnene Ergebnisse die Thio-Clickreaktion direkt auf dem Chip

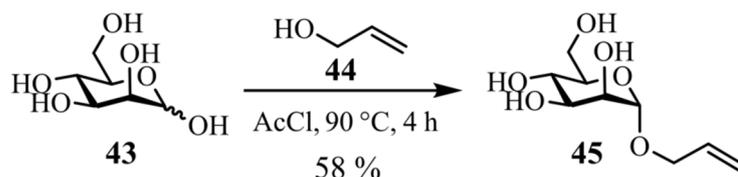
ermöglichten.



Schema 3-10: Retrosynthetischer Zugang zu 3-(2-Aminoethylthio)propylterminierten Kohlenhydraten zur Immobilisierung auf dem Glaschip.

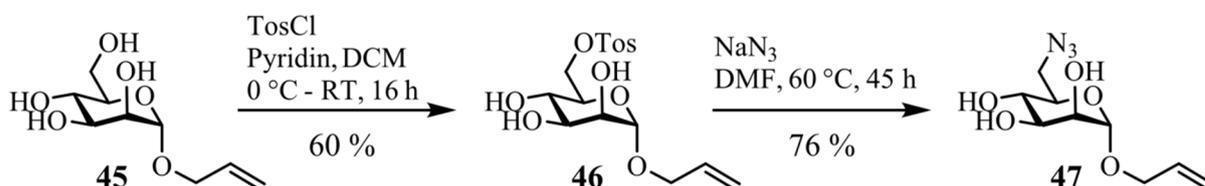
Die Fischer-Glycosylierung erlaubt die selektive anomere Funktionalisierung ungeschützter Kohlenhydrate durch Umsetzung mit diversen Alkoholen (als Lösungsmittel) unter (Lewis-) Säurekatalyse. Bedingt durch ihren Charakter als komplexe Gleichgewichtsreaktion wird, insbesondere bei verlängerter Reaktionszeit, als Hauptprodukt das thermodynamisch stabilste Glycosid gebildet.^[424] Aufgrund des anomeren Effekts wird so das α -Anomer bevorzugt. Dieser Effekt ist für Mannose, die bereits eine axiale Hydroxylfunktion an Position zwei besitzt, besonders ausgeprägt, so dass der Anteil des α -substituierten Mannosids im Produkt bei über 90 % liegt.

Tatsächlich wurde bei der Reaktion von D-Mannose mit katalytischen Mengen Acetylchlorid in Allylalkohol^[425] fast ausschließlich das 1-O-Allyl- α -D-mannopyranosid (**45**) erhalten, das mittels Säulenchromatographie von seinem β -Anomer getrennt werden konnte.



Schema 3-11: Synthese von Allylmannose **45** unter Fischer-Bedingungen.

Um eine Erweiterung des Kohlenhydrats an C6 zu ermöglichen, wurde die Hydroxylfunktion in einer zweistufigen Synthese durch ein Azid substituiert. Dieses steht anschließend für die Clickreaktion mit diversen Alkinen zur Verfügung und erlaubt die einfache Darstellung einer Strukturbibliothek sowie die Immobilisierung alkinterminierter Verbindungen auf dem bereits mit Mannose funktionalisierten Glycochip.

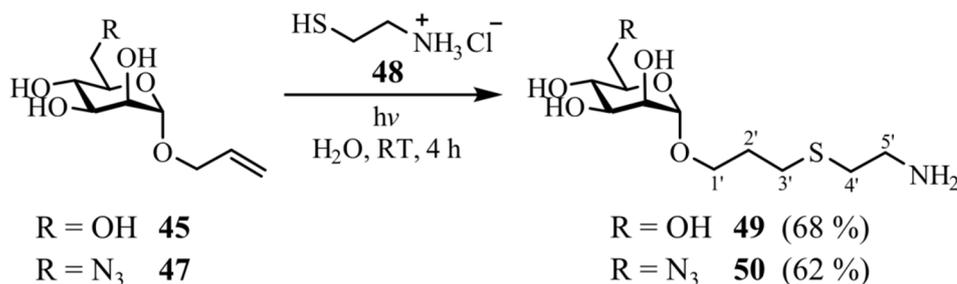


Schema 3-12: Zweistufige Synthese der Azidomannose **47** durch Tosylierung und nucleophile Substitution mit Natriumazid.

Nach der selektiven Tosylierung der primären Hydroxylfunktion an C6 in basischem Pyridin erfolgte die nucleophile Substitution der eingeführten Abgangsgruppe mit Natriumazid (siehe Schema 3-12).^[426]

Beide Mannose-Derivate wurden in Wasser mit einem siebenfachen Überschuss Cysteamin-Hydrochlorid (**48**) umgesetzt. Die radikalische Addition des Thiols an die terminale Doppelbindung erfolgte unter Bestrahlung mit UV-Licht (254 nm),^[425] kann aber auch unter

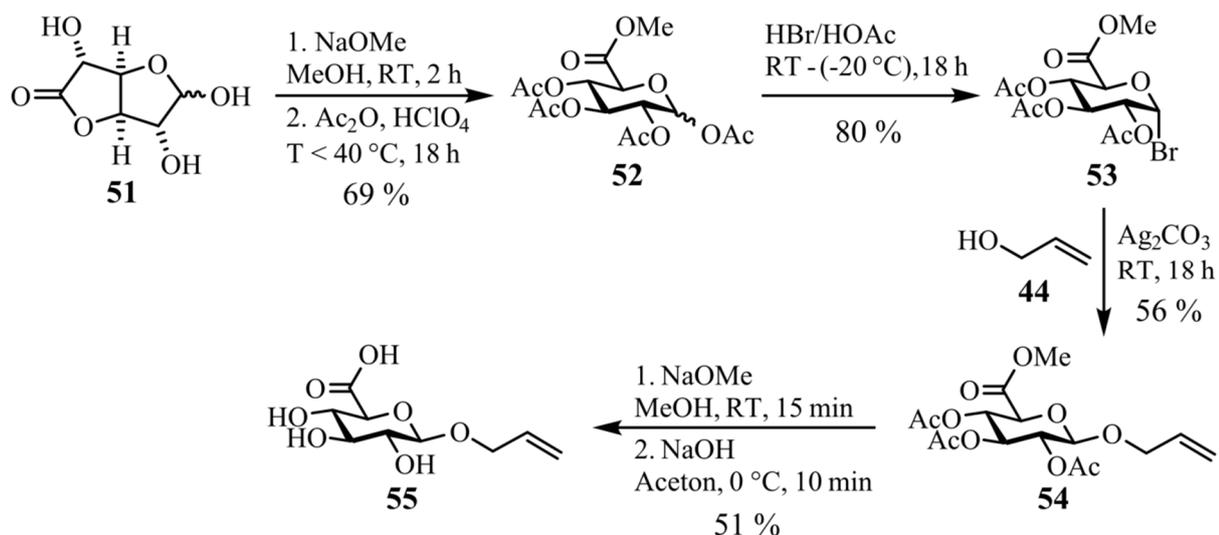
Verwendung eines Radikalstarters wie AIBN (Azo-bis-(isobutyronitril)) durchgeführt werden.^[427]



Schema 3-13: Photochemische Addition des Cysteamins an die terminale Doppelbindung der Allylmannoside **45** und **47**.

Die Abtrennung des überschüssigen Cysteamins erwies sich als Herausforderung. Die beschriebene Verwendung eines Kationentauschers für die Säulenchromatographie^[419] führte zwar zu einer geringen Abreicherung des Cysteamins, dennoch waren weitere Schritte (Größenausschlusschromatographie an Biogel^[428] sowie Chromatographie an reverser Phase) nötig, um das überschüssige Edukt vollständig zu entfernen. Die beiden Produkte **49** und **50** wurden so in moderaten Ausbeuten erhalten.

Die Einführung der Allylfunktion an Glucuronsäure, einem anionischen Monosaccharid erfolgte dagegen unter Königs-Knorr-Bedingungen. Ausgehend von Glucuronsäure- γ -lacton (**51**) wurden zunächst die Carbonsäure als Methylester sowie die freien Hydroxylfunktionen als Acetyle geschützt. Die Umsetzung mit HBr in Essigsäure lieferte das entsprechende α -anomere Bromid **53**,^[429] das in Allylalkohol gelöst und in Anwesenheit von Silbercarbonat stereoselektiv substituiert wurde.



Schema 3-14: Synthese der Allylglucuronsäure **55**.

Die Schutzgruppen wurden unter Zemplén-Bedingungen^[395] sowie anschließende Umsetzung mit wässriger Natronlauge entfernt.

Diskussion der spektroskopischen Daten

Die allylfunktionalisierten Kohlenhydrate zeigen für ihren Substituenten jeweils drei Gruppen charakteristischer Signale im Protonenspektrum (stellvertretend abgebildet ist das HSQC-Spektrum der Allylmannose **45**, Abb. 3-16).

Das Dublett von Dublett von Dublett von Dublett bei etwa 6 ppm ist dem vinylicen Proton H2' zuzuordnen, das mit den terminalen vinylicen Protonen H3' sowie den diastereotopen allylicen Protonen H1' vier Kopplungspartner besitzt. Die Protonen H3' resonieren etwas weiter hochfeldverschoben als zwei Dubletts von Dubletts von Dubletts von Dubletts bei etwa 5.3-5.4 sowie 5.2-5.3 ppm und können anhand der Größe ihrer Kopplungskonstante zu H2' als trans- ($^3J \approx 17$ Hz) bzw. cisständig ($^3J \approx 10$ Hz) zugeordnet werden. Die geminale 2J -Kopplung sowie die Fernkopplungen zu H1' (4J) liegen jeweils im Bereich von 1.2-1.7 Hz und sind nicht immer klar aufgelöst, so dass die Signale für H3' auf den ersten Blick wie zwei Dubletts von Quartetts erscheinen. Auch die beiden Protonen H1' zeigen jeweils das Kopplungsmuster eines Dublett von Dublett von Dublett von Dublett, wobei meist ein deutlicher Dacheffekt der beiden Signale bei ca. 4.3 sowie 4.1 ppm zueinander zu beobachten ist. Dieser ist auf den geringen Quotienten (< 10) zwischen der Verschiebungsdifferenz und der geminalen Kopplung ($^2J \approx 13$ Hz) der beiden zwar nicht magnetisch, aber chemisch äquivalenten Protonen zurückzuführen.

Die zugehörigen Kohlenstoffe der Doppelbindung resonieren bei 133-135 ppm (C2'), 118 ppm (C3'), das Signal des allylicen Kohlenstoffs C1' wird bei 68-71 ppm beobachtet. Ihre Zuordnung ist anhand des DEPT-135- sowie HSQC-Spektrums möglich.

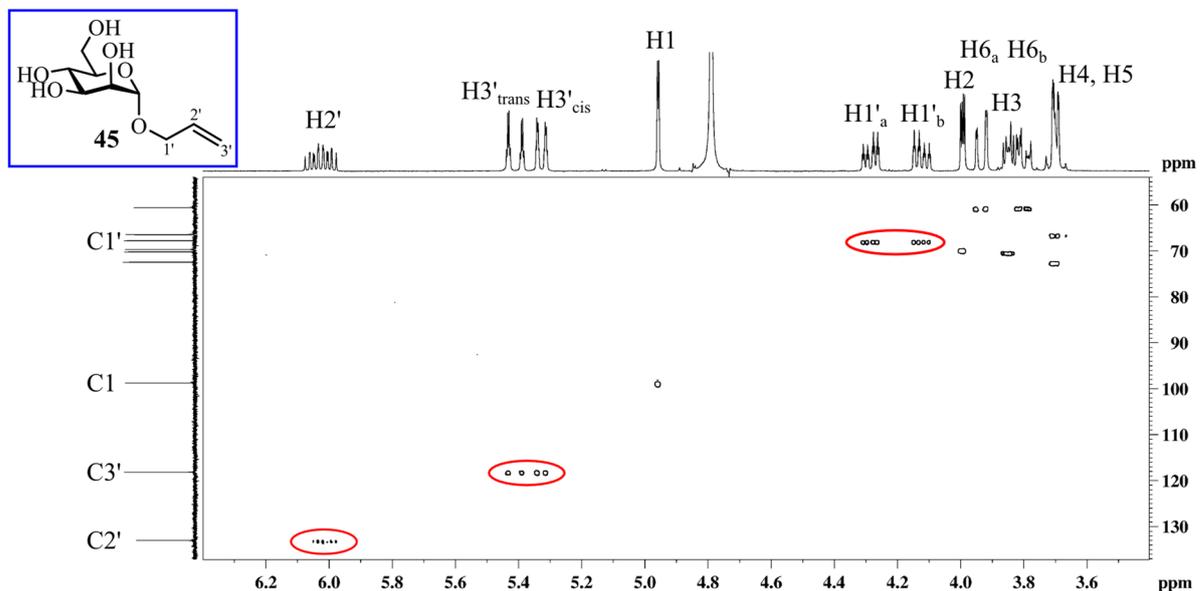


Abb. 3-16: HSQC-Korrelationsspektrum der Allylmannose **45**. Die für die Allylfunktion charakteristischen Signale sind rot markiert.

Die anomeren Protonen der drei Mannosederivate **45**, **46** und **47** resonieren um 4.9 ppm als Dublett mit einer Kopplungskonstante von etwa 1.7 Hz, was für eine α -Verknüpfung am Anomeren spricht; das Signal des zugehörigen Kohlenstoffs liegt bei etwa 99 ppm.

Durch die Manipulationen an C6 verschieben sich vor allem die Signale der entsprechenden Protonen und des Kohlenstoffs deutlich, während alle weiteren Resonanzfrequenzen nur

marginal beeinflusst werden. Nach der Tosylierung ist eine deutliche Tieffeldverschiebung der beiden diastereotopen Protonen H6 von 3.93 und 3.82-3.78 auf 4.38 und 4.27 ppm zu beobachten. Die Signale treten jeweils als Dublett von Dublett mit einer großen geminalen Kopplungskonstante im Bereich von 11-13 Hz sowie jeweils einer deutlich kleineren 3J -Kopplung mit H5 auf, wobei diese Struktur in manchen Fällen von Signalen anderer Ringprotonen überlagert wird. Auch der Kohlenstoff C6 resoniert bei tieferem Feld, sein Signal verschiebt sich von 60.60 auf 69.45 ppm. Zusätzlich sind die aromatischen Protonen des Tosylats als zwei Dubletts bei 7.81 und 7.34 ppm ($^3J = 8.4$ Hz) sowie die Methylgruppe als Singulett bei 2.45 ppm erkennbar, im Kohlenstoffspektrum treten neue Signale im aromatischen (145.13 sowie 132.92-128.16 ppm) sowie aliphatischen Bereich (21.79 ppm) auf. Diese verschwinden nach der Substitution zum Azid **47**, während erneut die Protonen H6 sowie der Kohlenstoff C6 eine deutliche Verschiebung, in diesem Fall ins Hochfeld (3.51 und 3.22 sowie 40.59 ppm), erfahren. Dies ist auf die Substitution des stark elektronenziehenden Sauerstoffs durch das resonanzstabilisierte Azid zurückzuführen.

Die Glucuronsäurederivate **54**, **55** und **56** sind dagegen β -verknüpft, so dass das anomere Proton bei einer Verschiebung zwischen 4.6 und 4.3 ppm eine Kopplungskonstante knapp unter 8 Hz aufweist. Auffällig ist auch die Verschiebung von C6, der als Kohlenstoff einer Carbonsäurefunktion im Bereich von 167-177 ppm resoniert, wobei die höchste Verschiebung für die freie Carbonsäure in **55** beobachtet wird. Die Charakteristika der Spektrensätze einer peracetylierten Verbindung sowie eines Bromids wurden bereits in Kapitel 3.2.1 beschrieben und werden hier nicht erneut aufgegriffen.

Die erfolgreiche Umsetzung der Allylverbindungen **45** und **47** mit Cysteamin konnte bereits anhand der Rohspektren der Reaktionsmischung vor der Isolierung der Produkte belegt werden. Die beschriebenen charakteristischen Signale der Allylgruppe verschwinden zugunsten neu auftretender Signale im Hochfeld. Insbesondere der Wegfall der drei Signale für die vinylic Protonen H2' und H3' ist auf den ersten Blick erkennbar. Die beiden Protonen H2' resonieren stattdessen als breites Multiplett bei 2.0-1.9 ppm, das Signal bei etwa 2.7 ppm kann den beiden Protonen H3' zugeordnet werden. Auch die beiden Kohlenstoffe der vormaligen Doppelbindung verschieben sich deutlich ins Hochfeld und resonieren nach der Addition am rechten Rand des Spektrums zwischen 27 und 29 ppm. Zusätzliche Signale liefern die beiden Methyleinheiten des Cysteamins mit Protonenverschiebungen von 2.7-2.9 (H4') sowie 2.9-3.3 ppm (H5'), die jeweils eine Tripletstruktur aufweisen ($^3J = 6.6$ -6.7 Hz).

3.2.2.2 Immobilisierung und Detektion der Kohlenhydrate

Die aminfunktionalisierten Kohlenhydrate wurden aus wässriger Pufferlösung auf den Glaschip aufgetragen. Der verwendete, kommerzielle Slide (SCHOTT NEXTERION® Slide H) besitzt eine vorfunktionalisierte Oberfläche, die aus einem hydrophilen Polymer, dem 3D-Hydrogel, besteht. Dieses stellt eine „quasi-flüssige“ Umgebung bereit, in der Proteine auch über längere Zeit ihre native Konformation und Aktivität beibehalten. Über lange, flexible Linkereinheiten werden NHS-aktivierte Carbonsäuren präsentiert (siehe Abb. 3-17), die mit den Aminen unter Ausbildung einer stabilen Amidfunktion reagieren. Wie die hydrophilen

PEG-Einheiten der beschriebenen SAMs (siehe Kapitel 3.2.1.2) minimiert die hydrophile Oberfläche des 3D-Hydrogels unspezifische Proteinbindung, so dass der Chip auch ohne Blocking-Schritte ein exzellentes Signal-Hintergrund-Verhältnis liefert.^[430]

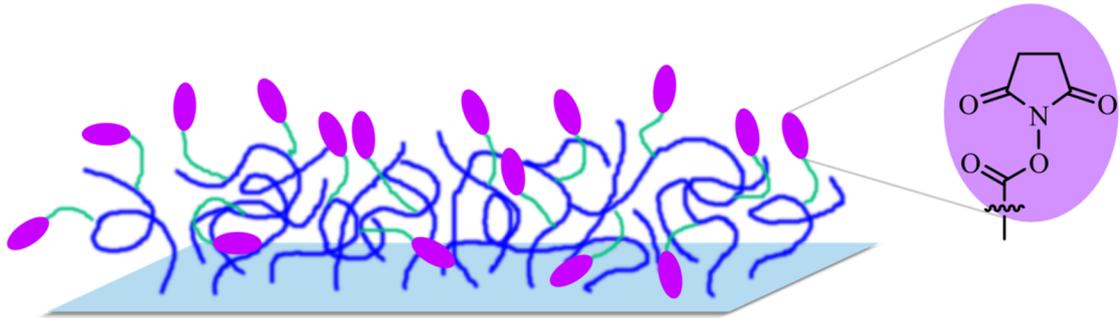


Abb. 3-17: Schematische Darstellung der Oberfläche des verwendeten Glaschips. Das Glas ist mit einem hydrophilen Polymer (blau) beschichtet, das über flexible Linker (grün) in statistischer Verteilung die aminreaktive Funktion (magenta) – eine NHS-aktivierte Carbonsäure – präsentiert.

Die Pufferlösungen wurden im Mikrokontaktverfahren manuell aufgebracht („gespottet“, siehe Kapitel 2.3). Das verwendete Handtool besitzt acht Nadeln mit einem Durchmesser von 457 µm, an deren Spitze nach dem Eintauchen in die Flüssigkeit ein Volumen von 20-70 nl verbleibt (abhängig von Oberflächenspannung, Viskosität und Dichte). Dieses wird durch kurzen Kontakt mit der Chip-Oberfläche als Spot mit einem Durchmesser von 350-500 µm platziert. Durch vielfaches Wiederholen der Verfahrens können mit dem verwendeten Tool pro Chip bis zu 768 individuelle Spots positioniert werden (8 Nadeln x 8 Spalten x 12 Zeilen). Jede der acht Nadeln realisiert dabei einen Subarray von maximal $8 \times 12 = 96$ Spots.

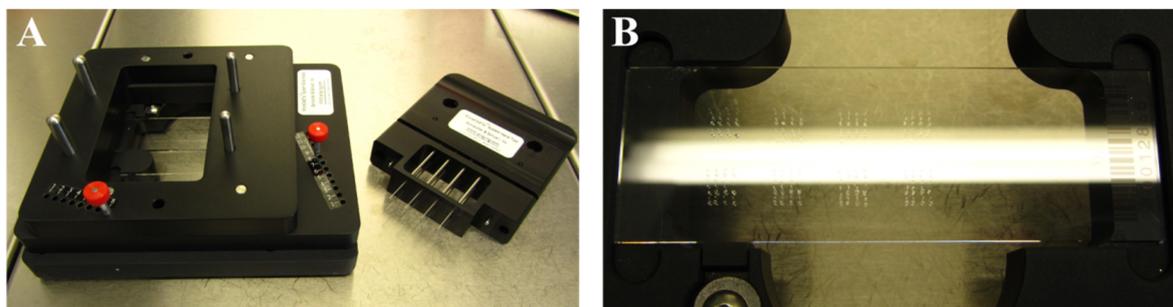


Abb. 3-18: A) Das zum Spotten der Glaschips verwendete Handtool besteht aus einer Grundplatte, in die die Slides eingespannt und mit Hilfe der Pins (rot) an vorgegebenen Positionen des Rasters fixiert werden (links) sowie dem eigentlichen Spotter mit acht Nadeln (rechts). B) Vergrößerte Darstellung eines Chips nach dem Spotten. Zu erkennen sind die acht individuellen Subarrays mit jeweils 4×6 Spots.

Nach der Inkubation der Kohlenhydrate auf der Oberfläche wurden die verbliebenen reaktiven NHS-Ester mit Ethanolamin abgesättigt, was für eine flächige Hydroxylterminierung der Slides sorgt. Diese Situation kommt vermutlich der Umgebung einer nativen Zelloberfläche nahe, wo (neben anderen Funktionalitäten) ebenfalls eine Vielzahl von OH-Gruppen in zufälliger Anordnung präsentiert werden.

Die Detektion der Kohlenhydrate erfolgte durch Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Proben und Auslesen der Fluoreszenzintensität der gebundenen Verbindungen an einem Arrayreader. Dieser besitzt zwei Laser zur Anregung der Fluorophore (532 und 635 nm), und eignet sich damit für Cy3 und Cy5 bzw. deren Äquivalente. Die Emission erfolgt jeweils rotverschoben.

Vergleich der beiden aminterminierten Linkersysteme

Zur Untersuchung des Einflusses der Länge des aminterminierten Linkers auf die Erkennung der Kohlenhydrate wurden die beiden Mannosederivate **38** und **49** sowie *N*-Acetylglucosamin **39** und **57** auf dem Chip immobilisiert. Für die Derivate **49** und **57** mit dem längeren Cysteaminlinker wurde eine Konzentrationsreihe (0,1, 0,25, 0,5, 1 mM) gespottet, während **38** und **39** mit vier Replikaten der Konzentration 1 mM je Subarray eingesetzt wurden. Ihre Detektion erfolgte mit fluoreszenzmarkiertem ConA (Alexa647) in einer Konzentrationsreihe (5, 10, 20, 40 µg/ml, siehe Abb. 3-19A).

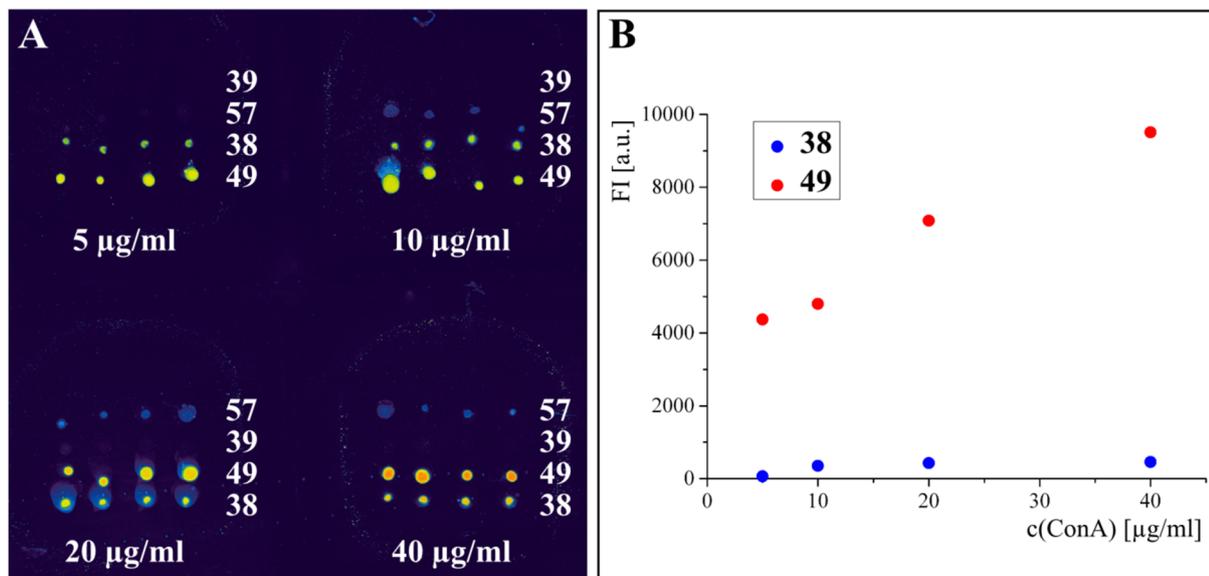


Abb. 3-19: A) Fluoreszenzintensität des Glycochips nach Anbindung der Mannosederivate **38** und **49** sowie der beiden *N*-Acetylglucosamine **39** und **57** und Detektion mit ConA-Alexa647 (5-40 µg/ml). Die Falschfarbendarstellung (blauschwarz = niedrige, rot = hohe Intensität) dient der einfacheren optischen Erfassung der Signalintensitäten. B) Quantifizierung der Fluoreszenzintensität für **38** und **49**.

Die auf dem kurzen Linker präsentierten Kohlenhydrate werden deutlich schlechter erkannt als die auf dem langen. Dieser Effekt liegt für den guten Binder Mannose im Bereich von 1-7 % der Signalintensität (siehe Abb. 3-19B). Der schwächere Binder GlcNAc wird auf dem kurzen Linker überhaupt nicht erkannt und liegt auch auf dem langen Linker nur gering über dem Hintergrund, so dass eine relative Quantifizierung nicht sinnvoll ist.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurden für alle weiteren Versuche auf dem Glaschip Glycane verwendet, die den längeren Cysteaminlinker besitzen.

Immobilisierung der Kohlenhydrate durch Photoreaktion on-Chip

Wie in Kapitel 3.2.2.1 erläutert, kann die zur Anbindung auf den Chip benötigte terminale Aminfunktion leicht und zuverlässig durch eine photochemisch induzierte Addition von Cysteamin an Allylzuckern eingeführt werden. Wiederholte Probleme bereitete allerdings die Isolierung des Produkts, das heißt die Entfernung des überschüssigen Cysteamins aus der Reaktionsmischung.

Deshalb sollte überprüft werden, ob die Photoreaktion auch direkt auf der Oberfläche der Chips durchführbar ist. Dieses Verfahren an der Festphase vereint mehrere Vorzüge in sich: Aus synthesesökonomischen Gründen ist es vorteilhaft, einen Reaktionsschritt einschließlich

Isolierung des Produkts einzusparen, dieser Effekt potenziert sich mit der Größe der Glycanbibliothek. Weiterhin sollte es möglich sein, überschüssige Reagenzien und nicht kovalent gebundene Verunreinigungen in einem einfachen Waschprozess von der Oberfläche zu entfernen.

Um die für die Photoreaktion benötigten Thiofunktionen auf dem Chip zur Verfügung zu stellen, wurde dieser – ähnlich der Absättigung mit Ethanolamin – flächig mit Cysteamin beschichtet. Damit verändert sich allerdings auch die Struktur der Oberfläche, so dass vermutlich das Signal-Hintergrund-Verhältnis beeinflusst wird. Dies muss beim Vergleich verschieden behandelter Chips beachtet werden. Anstelle der aminterminierten Zucker wurde in einem ersten Versuch Allylmannose **45** auf den Slide gespottet und mit einer UV-Lampe bestrahlt. Durch sukzessives Abdecken einzelner Subarrays wurde die Photoreaktion über die Zeit verfolgt. Innerhalb der ersten 180 min wurden relativ engmaschige Zeitabstände gewählt, ein Subarray schließlich für 19 h bestrahlt, um eine Sättigung zu erzielen.

Nach Inkubation mit ConA-Alexa647 konnte auf allen acht Subarrays das platzierte Spotmuster nachgewiesen werden, wobei die Signalintensität des markierten Lectins den zeitlichen Verlauf der Photoreaktion widerspiegelte. Wie erwartet wurde für eine Reaktionsdauer von 19 h die höchste Signalintensität gemessen, allerdings tendierten die Fluoreszenzintensitäten hier bereits zum Übersteuern, auch waren manche Spots nicht mehr eindeutig von den benachbarten Signalen abgrenzbar.

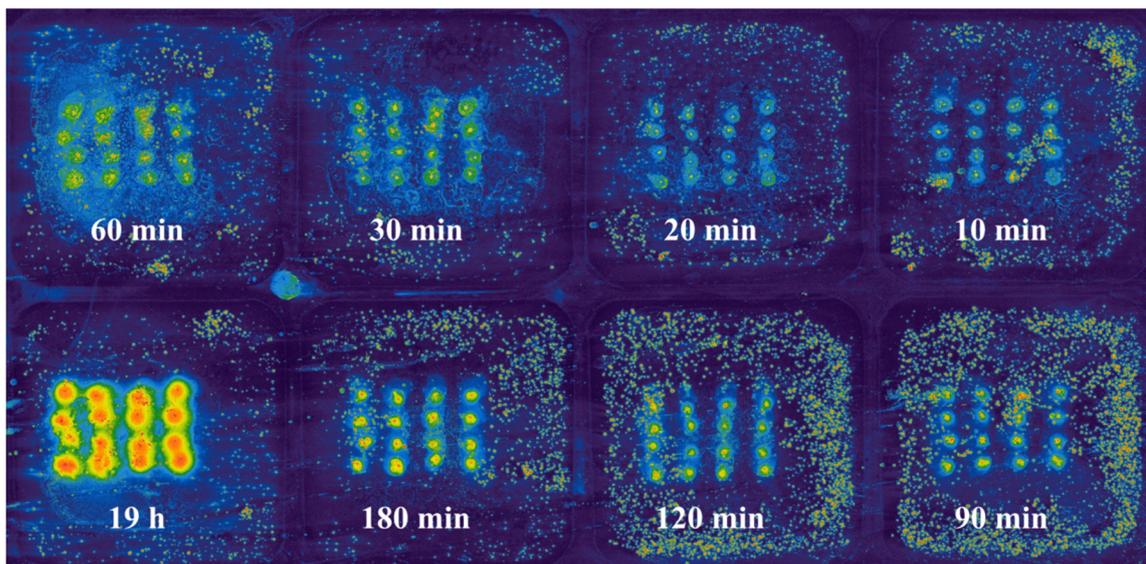


Abb. 3-20: Fluoreszenzintensität (Falschfarbendarstellung) des Glycochips nach photochemischer Anbindung von Allylmannose **45** (10 mM) und Detektion mit ConA-Alexa647 (50 µg/ml). Die Bestrahlung der Subarrays mit UV-Licht erfolgte in einem Zeitraum zwischen 10 min und 19 h. Während zunächst nur schwache Signale detektiert werden, ist nach 19 h eine Sättigung erreicht, allerdings sind hier nicht mehr alle Spots eindeutig voneinander abgrenzbar.

Damit wurde belegt, dass die Reaktion zwischen Thiolen und der terminalen Doppelbindung der Allylzucker auch auf der Oberfläche des Glaschips durchgeführt werden kann und den Erkennungsprozess der Kohlenhydrate durch Lectine nicht beeinträchtigt. Die optimale Reaktionsdauer der Photoreaktion auf dem Chip liegt zwischen drei und 19 h.

Der Einfluss der beiden Varianten zur Immobilisierung des Kohlenhydratmotivs auf seine Erkennung wurde in einem weiteren Versuch gegenübergestellt. Zunächst wurde die aminterminierte Mannose **49** jeweils in der unteren Hälfte der Subarrays platziert, nach der

Absättigung der Oberfläche mit Cysteamin wurde Allylmannose **45** in der oberen Hälfte gespottet und die Photoreaktion durchgeführt. Als Referenzzeitpunkte dienten 0 h (Negativkontrolle), 3 h, 6 h und 20 h (Sättigung), die Detektion der Mannose erfolgte wie zuvor mit ConA-Alexa647.

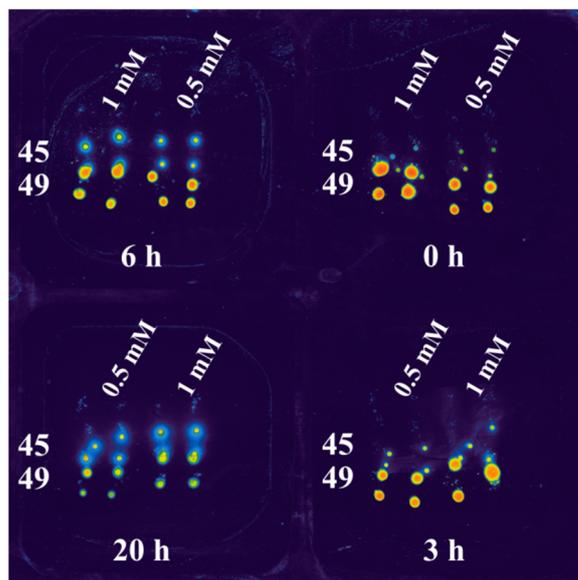


Abb. 3-21: Vergleich der Fluoreszenzintensität (Falschfarbendarstellung) des Glycochips nach Anbindung von Mannose **45** und **49** (0,5 und 1 mM) sowie Detektion mit ConA-Alexa647 (50 µg/ml). Die Photoreaktion wurde für 0-20 h durchgeführt. Nach 6 h wird für die Photoreaktion die Sättigung erreicht. Nach 20 h verringert sich das Signal für **49** deutlich, was auf eine photoinduzierte Schädigung hinweist.

Bereits in der Negativkontrolle bei 0 h wurden schwache Signale für den Allylzucker **45** beobachtet. Diese sind entweder auf eine unvollständige Abschirmung des UV-Lichts oder aber eine Addition des Thiols an die Doppelbindung nach dem alternativ möglichen ionischen Mechanismus zurückzuführen. Nach einer Bestrahlungszeit von 6 h wird für **45** eine Sättigung der Signalintensität erreicht, auch eine längere Reaktionsdauer steigert diese nicht. Für Mannose **49** werden im Zeitraum 0-6 h konstant starke Signale detektiert, die sich nach weiter verlängerter Bestrahlung verringern. Dies weist auf eine photoinduzierte Schädigung der Oberfläche hin, so dass die Photoreaktion nach etwa 6 h abgebrochen werden sollte.

Die beobachteten Signalintensitäten der beiden Kohlenhydrate unterscheiden sich selbst im Bereich der Sättigung von **45** deutlich voneinander, so dass die mit den beiden Immobilisierungstechniken gewonnenen Ergebnisse nicht direkt vergleichbar sind, sondern zunächst normiert werden müssen. Sowohl die mit Ethanolamin als auch die mit Cysteamin abgesättigte Oberfläche liefern ein vergleichbares Hintergrundsignal, so dass die unterschiedliche Terminierung des Slides vernachlässigt werden kann.

3.2.2.3 Untersuchung von Bindungsprozessen

Der vorgestellte Glycochip wurde genutzt, um verschiedenste Kohlenhydrat-Erkennungsprozesse zu untersuchen.

In einem breit angelegten Ansatz mit einer Vielzahl präsentierter Glycanmotive wurden zunächst Bindungspräferenzen detektiert, bevor vielversprechende Paarungen detaillierter charakterisiert und Dissoziationskonstanten (K_D -Werte) bestimmt wurden.

Als Referenzsysteme zur Validierung der Methode dienten literaturbekannte Kombinationen von Glycanen und pflanzlichen Lectinen (Man-ConA, Gal-PNA).

Vorbereitende Untersuchungen

Zunächst wurden der Nachweisbereich sowie die benötigten Arbeitskonzentrationen der verwendeten Kohlenhydrate und Lectine abgeschätzt. Zu diesem Zweck wurden fünf verschiedene Saccharide (Mannose **49**, Glucose **58**, *N*-Acetylglucosamin **57**, Galactose **59** und *N*-Acetyllactosamin **60**) in vier verschiedenen Konzentrationen (0.1, 0.25, 0.5, 1 mM) auf dem Chip immobilisiert und mit ConA-Alexa647 in zwei Konzentrationen (20, 50 µg/ml) detektiert.

Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten spiegeln die Affinität der Glycane gegenüber ConA wider. Für den starken Binder Mannose ($K_{D,surf} \approx 100 \text{ nM}^{[130, 164]}$) sowie die ebenfalls erkannten, allerdings deutlich weniger affinen Verbindungen GlcNAc und Glucose^[431] sind jeweils Signalintensitäten deutlich über dem Hintergrund messbar, auch die verwendete Konzentrationsreihe kann nachvollzogen werden. Einen schnellen Überblick bietet hier die Falschfarbendarstellung, welche die detektierten Intensitäten optisch eindeutig aufbereitet (vergleiche Abb. 3-22A1 und A2).

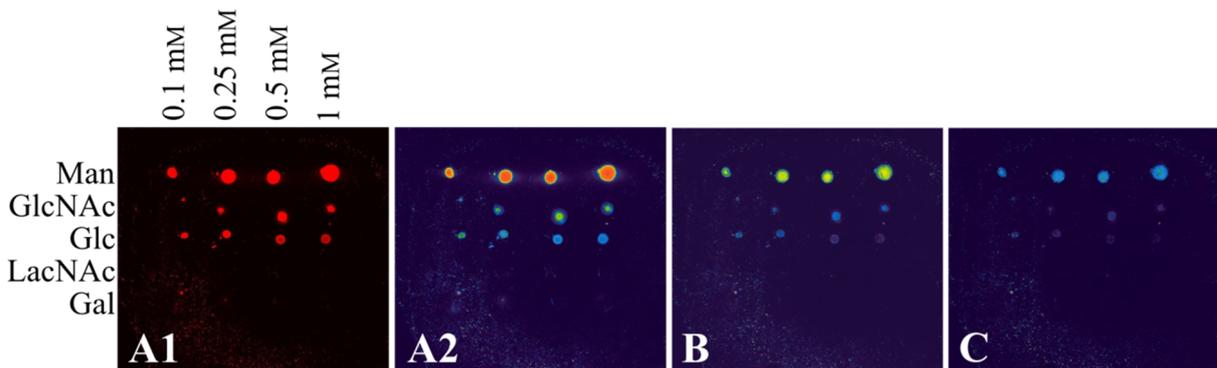


Abb. 3-22: Fluoreszenzintensität des Glycochips nach Immobilisierung fünf verschiedener Saccharide in je vier Konzentrationen und Inkubation mit ConA-Alexa647 (50 µg/ml), gefolgt von Waschschritten mit 100 mM Mannose. A1 und A2) Einfarben- und korrespondierende Falschfarbendarstellung nach Inkubation mit ConA. B und C) Falschfarbendarstellung desselben Ausschnitts nach Inkubation mit 100 mM Mannose für 1 bzw. 2 h.

Die Reversibilität der Lectin-Bindung wurde ebenfalls überprüft. Mehrfache Inkubation des Chips mit 100 mM Mannose-Lösung für jeweils 1 h sorgte für eine deutliche Intensitätsabnahme der Spots, wobei wiederum Mannose am längsten sichtbar blieb (siehe Abb. 3-22C und D). Die detektierten Unterschiede zwischen den Feldern mit 20 bzw. 50 µg/ml ConA waren nur marginal und lagen im Bereich der Messgenauigkeit.

Für Komplexe mit hoher Bindungsaffinität können folglich Arbeitskonzentrationen der Glycane von deutlich unter 1 mM verwendet werden, um verlässliche Signalstärken zu erzielen. Für schwache Binder sind Konzentrationen im Bereich von 1 mM oder sogar darüber empfehlenswert, wobei auch hier die Detektionsgrenze der Methode noch nicht ausgeschöpft ist. Einen starken Einfluss auf das Ergebnis hat zudem die Intensität des Waschvorgangs. Für schwache Binder empfiehlt es sich deshalb zunächst vorsichtig zu waschen, bis ein vertretbares Signal-Hintergrund-Verhältnis erreicht ist.

Bestimmung des $K_{D,surf}$ -Werts für Mannose-ConA

Zur Überprüfung der Eignung des Systems für quantitative Charakterisierungen der beobachteten Bindungsereignisse wurde zunächst die Dissoziationskonstante $K_{D,surf}$ des Komplexes Mannose-ConA nach einer Methode von Liang *et al.*^[164] bestimmt. Innerhalb eines Subarrays wurde Mannose **49** in Konzentrationen zwischen 1 μM und 1 mM gespottet und die acht Subarrays mit ConA-Alexa647 in Konzentrationen von 50, 75, 100, 125, 150, 200, 400 und 600 nM inkubiert. Die bei konstanter Glycankonzentration erhaltenen Fluoreszenzintensitäten wurden über der Lectinkonzentration aufgetragen und nach

$$F = \frac{F_{\max} \cdot [c]}{[c] + K_{D,surf}} \quad (1)$$

als Langmuir-Isothermen analysiert. F entspricht dabei der gemessenen, F_{\max} der maximalen Fluoreszenzintensität (nach Erreichen der Sättigung), $[c]$ der Konzentration des Lectins und $K_{D,surf}$ der Gleichgewichtskonstante für die Dissoziation des Lectins von der Oberfläche.

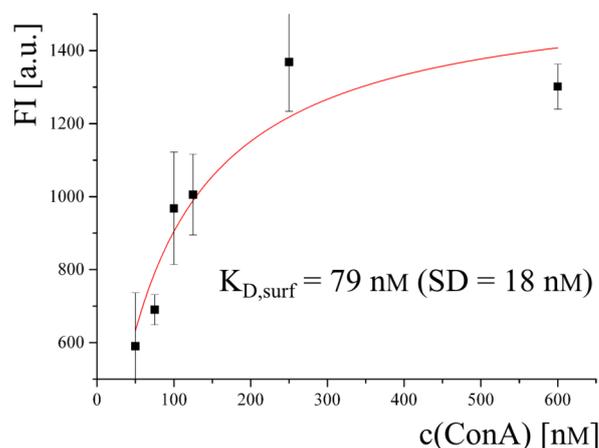


Abb. 3-23: Bestimmung des $K_{D,surf}$ -Werts für ConA auf immobilisierter α -Mannose **49** anhand einer Langmuir-Isotherme (die Messpunkte sind Quadruplikate bei $c(\text{Man}) = 50 \mu\text{M}$, Fehlerbalken sind angegeben).

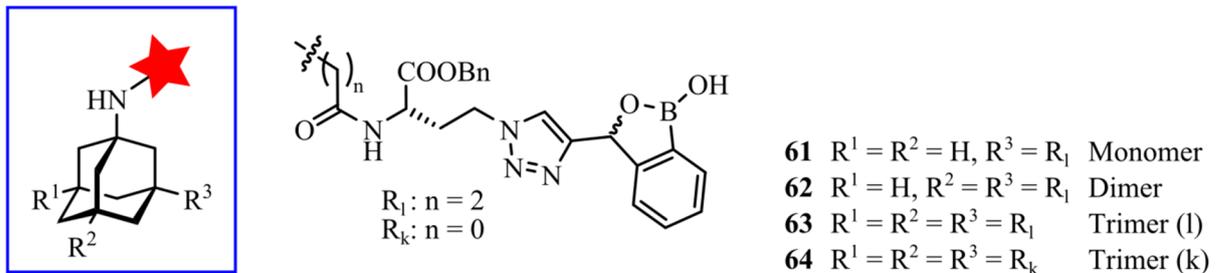
Die Dissoziationskonstante $K_{D,surf}$ wurde mit 79 nM bestimmt (Standardabweichung 18 nM), dies stimmt sehr gut mit den von Wong *et al.* veröffentlichten Daten überein, der über verschiedene Mannose-Konzentrationen einen mittleren $K_{D,surf}$ -Wert von 83 nM ermittelte.^[164] Die relativ hohe Standardabweichung ist vermutlich auf Ungenauigkeiten beim manuellen Spotprozess zurückzuführen.

Dennoch belegen die Messungen, dass es mit dem verwendeten System möglich ist, $K_{D,surf}$ -Werte für Bindungspartner mit hoher Affinität mit zufriedenstellender Genauigkeit zu bestimmen. Bei niedriger Affinität zwischen Kohlenhydrat und Bindungspartner sollte zumindest die Größenordnung der Dissoziationskonstante verlässlich eingrenzbar sein.

Bindungsstudien mit synthetischen Lectinen

Basierend auf den vielversprechenden Ergebnissen der qualitativen sowie quantitativen Referenzmessungen mit pflanzlichen Lectinen wurde die Ausweitung des Systems und seiner Anwendbarkeit auf neuartige Kohlenhydraterkennungsmotive untersucht. Dies geschah in

enger Zusammenarbeit mit *Prof. Dr. Wolfgang Maison* und *Dr. Dorith Claes*. Die im Rahmen ihrer Promotion entwickelten mono-, di- und trivalenten Boronolectine auf Grundlage eines tripodalen Adamantangerüsts (siehe Schema 3-15)^[432-435] sollen Kohlenhydrate auch in biologischen Systemen selektiv binden, was aufgrund der wässrigen Umgebung sowie vieler weiterer konkurrierend präsentierter Hydroxylfunktionen eine große Herausforderung darstellt.



Schema 3-15: Von *Dr. Dorith Claes* dargestellte tripodale Boronolectine auf Basis eines Adamantangerüsts. Zur Detektion auf dem Glycochip wurden die Verbindungen über das Brückenkopffamin mit PromoFluor-647 fluoreszenzmarkiert.

Boronsäurederivate bilden mit *cis*-Diole in Kohlenhydraten stabile cyclische Ester aus (siehe Schema 2-2).^[112] Die für die Bindung bevorzugte coplanare Ausrichtung der Hydroxylgruppen wird allerdings nur in Furanosiden näherungsweise erreicht. Da auf Zelloberflächen fast ausschließlich Pyranoside präsentiert werden, wurden *ortho*-Donor-substituierte Phenyl-boronsäuren (Benzoboroxole) als Erkennungseinheit gewählt, welche *cis*-Diole auch in nicht optimal coplanarer Stellung stabil binden.^[113-116] Sie wurden über eine kurze bzw. lange Linkereinheit mit dem Adamantan verknüpft, als Fluoreszenzmarkierung diente das Alexa647-Analogon PromoFluor-647. Die Verwendung des vororganisierenden Gerüsts sorgt für eine strukturierte trivalente Präsentation der Erkennungseinheiten nach dem geometrischen Vorbild natürlicher Lectine, so dass eine gesteigerte Bindungsaffinität der Trimere und des Dimers gegenüber dem Monomer erwartet wird.

Zunächst wurde das Potential der Boronolectine zur (selektiven) Erkennung von Glycanen in wässriger Umgebung überprüft. Auf dem Glycochip wurden sieben Mono- bzw. Disaccharide (1 mM) immobilisiert und mit den Boronsäuren **61**, **62**, **63** und **64** (gelöst in Wasser bzw. Wasser/DMSO 1:1 (**64**) in nicht exakt definierter Konzentration) inkubiert.

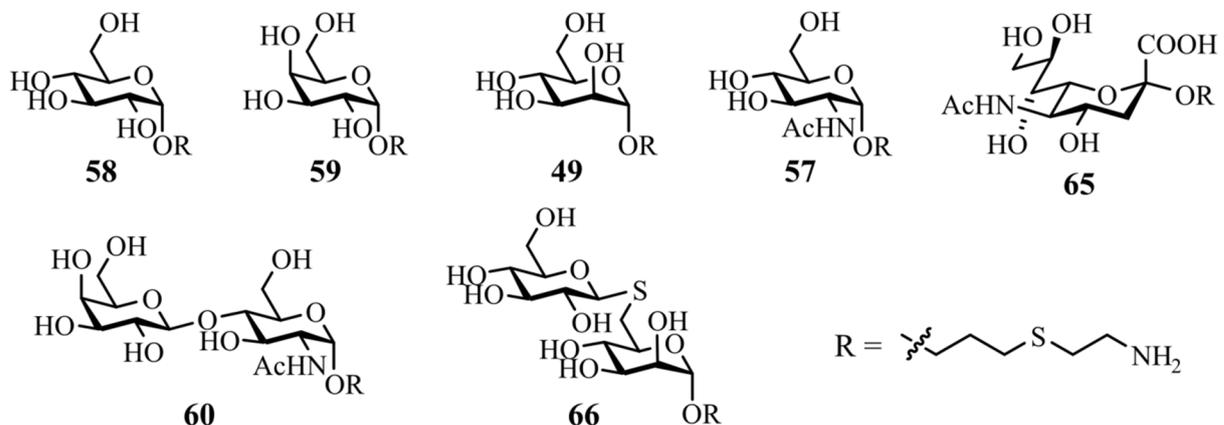


Abb. 3-24: Zur Untersuchung der Bindungspräferenzen der Boronolectine wurden sieben Kohlenhydrate auf dem Glycochip immobilisiert. Glucose **58**, Galactose **59**, *N*-Acetylglucosamin **57** und *N*-Acetyllactosamin **60** wurden von *Dr. Lars Hillringhaus* dargestellt,^[420] Sialinsäure **65** und das thiolverknüpfte Disaccharid **66** von *Stefanie Klotzbach*.^[436]

Auf dem Chip war eine deutliche Präferenz aller vier Boronsäuren zur Bindung an Galactose und LacNAc erkennbar, zudem eine schwache Affinität gegenüber Mannose. Dies bestätigt die grundsätzliche Fähigkeit von Boronsäuren zur Erkennung von cis-Diolen, die nur in der axial-äquatorialen Anordnung benachbarter Hydroxylfunktionen in Galactose und Mannose auftreten. Neben den definierten Spots wurde zudem ein starkes Hintergrundsignal beobachtet, das vermutlich auf unspezifische Bindung der Boronsäuren an die Hydroxylfunktionen des Ethanolamins zurückzuführen ist, welches die Oberfläche absättigt. Dieses Signal konnte durch mehrmalige Waschschritte mit Wasser, deutlich besser aber noch kompetitiv mit 100 mM Galactose verringert werden. Die definierten Signale der Boroxole auf den Glycanen traten dadurch klarer aus dem Hintergrund hervor, wurden insgesamt aber auch schwächer. Die monomere und dimere Verbindung konnte so vollständig von der Oberfläche gewaschen werden, während die trimeren Boronsäuren auch nach 2 h noch eine deutliche Bindung gegenüber Galactose zeigten (siehe Abb. 3-25).

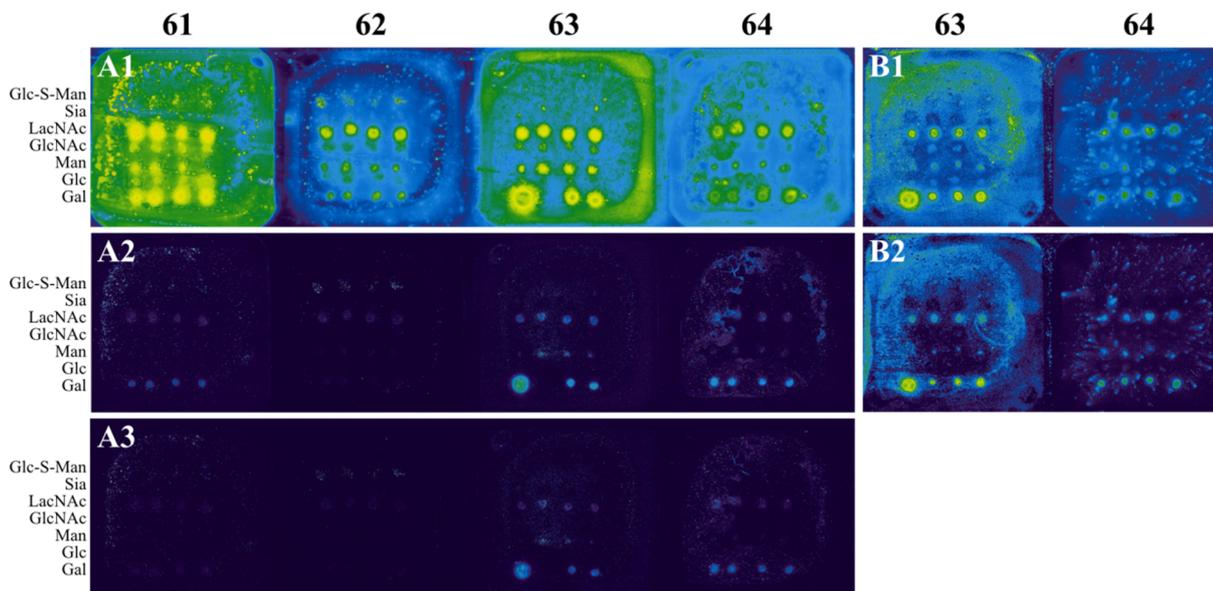


Abb. 3-25: Fluoreszenzintensität des Glycochips nach Inkubation mit Boronolectinen. Zunächst ist neben den definierten Glycanmustern eine starke Hintergrundfluoreszenz zu beobachten (A1 & B1), die nach intensivem Waschen (30 min) mit 100 mM Galactose (A2) bzw. Wasser (B2) deutlich zurückgeht. Selbst nach vier Waschzyklen (gesamt 2 h) mit Galactose binden die trimeren Boronsäurederivate **63** und **64** noch deutlich sichtbar an Galactose und LacNAc (A3).

Ein interessantes Phänomen wurde für Sialinsäure **65** beobachtet: die unspezifische Bindung der Boroxole an den Hintergrund war deutlich stärker als die Affinität zum Glycan, so dass ein Negativmuster des gespotteten Zuckers sichtbar wurde (besonders auffällig in Abb. 3-25B). Dieser Effekt kann plausibel durch repulsive Wechselwirkung zwischen der tendenziell anionischen Sialinsäure und dem nach der Bindung an Diole ebenfalls negativ geladenen Boronat-Anion erklärt werden.

Zur Quantifizierung der Bindungsstärke der Boronolectine wurde Galactose **59** als Bindungspartner mit der höchsten Affinität ausgewählt und nach der für Mannose-ConA beschriebenen Methode der $K_{D,surf}$ -Wert des Dimers **62** sowie der Trimere **63** und **64** bestimmt.

Die Galactose wurde hierfür in Konzentrationen von 1, 5, 10, 50, 100, 500 sowie 1000 μ M als Quadruplikat gespottet und mit den Boronsäuren im Konzentrationsbereich von 30 bis

1000 nM inkubiert. Die Dissoziationskonstanten $K_{D,surf}$ wurden nach Auftragung der Fluoreszenzintensität über der Lectinkonzentration und Auswertung als Langmuir-Isotherme (Gleichung 1) erhalten.

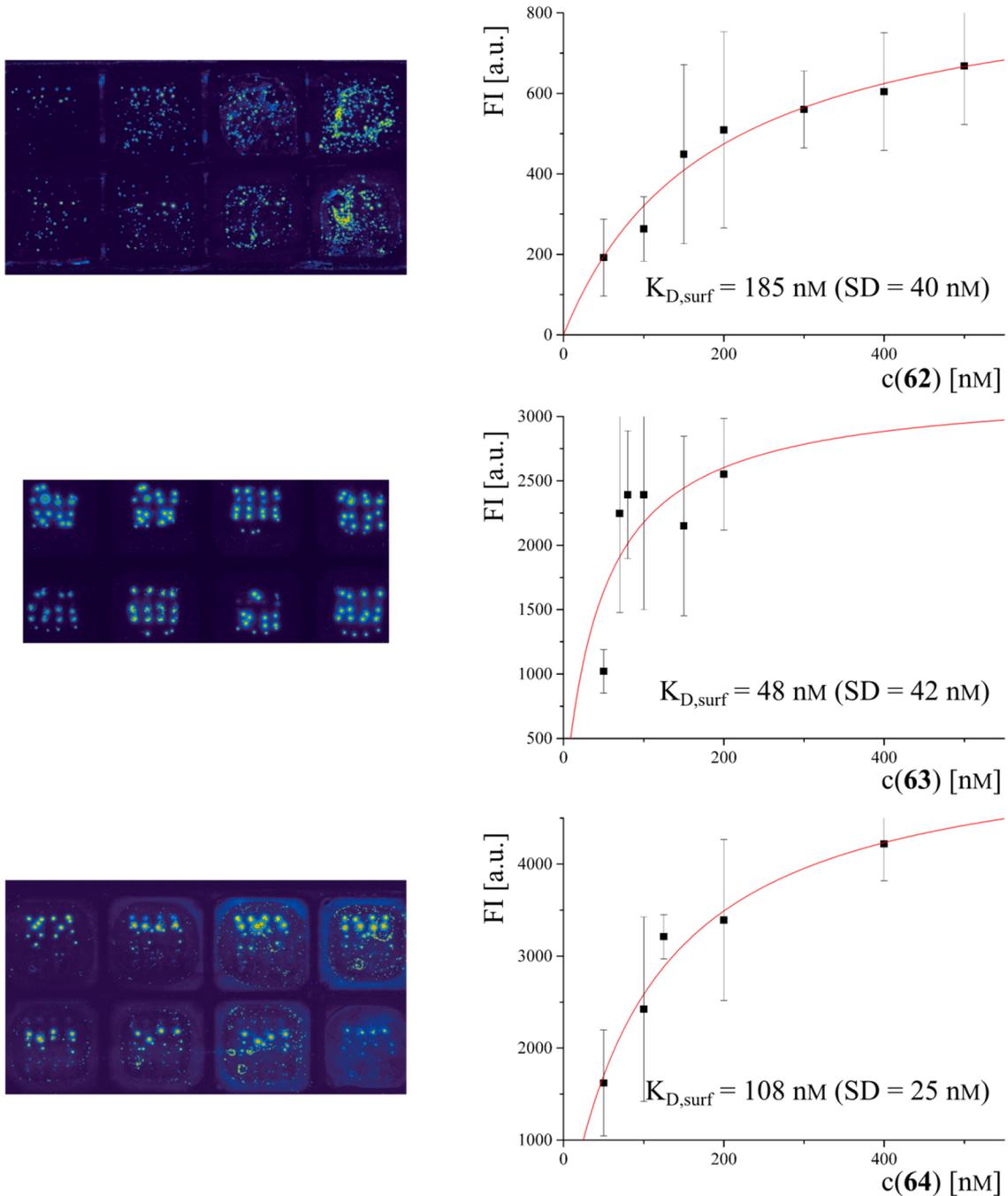


Abb. 3-26: Bestimmung der Dissoziationskonstanten $K_{D,surf}$ der Benzoboroxole **62**, **63** und **64** aus den Langmuir-Isothermen bei einer Galactosekonzentration von 0.5 mM. Links gezeigt sind jeweils die Fluoreszenzintensitäten der für die Auswertung verwendeten Slides.

Die bestimmten Werte der Dissoziationskonstanten von 185 nM für das Dimer **62**, 48 nM für das lange Trimer **63** sowie 108 nM für das kurze Trimer **64** spiegeln die zuvor beobachteten Tendenzen der Bindungsstärke (siehe Abb. 3-25) wider. Insbesondere die beiden Trimere zeigen eine ähnlich starke Affinität gegenüber Galactose wie das pflanzliche Lectin ConA

gegenüber Mannose, wobei der etwas flexiblere Linker in **63** multivalente Bindungen scheinbar etwas besser unterstützt als die kürzere Variante in **64**.

Die Standardabweichungen der $K_{D,surf}$ -Werte liegen mit 22-88 % der Messwerte erneut sehr hoch, was zum einen auf das manuelle Spotten der Kohlenhydrate, zum anderen aber auch auf die unspezifische Bindung der Boroxole an die Hydroxylterminierte Oberfläche zurückzuführen ist.

Dennoch eignet sich der Glycochip für die Untersuchung synthetischer Lectine, deren Bindungseigenschaften nicht nur qualitativ sondern auch quantitativ bestimmt werden konnten. Die Entwicklung von Boronolactinen mit möglicher Applikation in medizinischer Diagnose^[437] und Therapie^[438] kann so in Zukunft parallel mit einfach durchführbaren Affinitätsmessungen verfolgt und vorangetrieben werden.

Bindungsstudien mit tumorassoziierten Proteinen

Galectine sind kohlenhydratbindende Proteine mit einer hochkonservierten Sequenz ihrer Erkennungsdomäne für β -Galactoside (siehe Tabelle 2-1). Zwölf der bisher gefundenen 15 Säuger-Varianten des Proteins wurden auch im Menschen nachgewiesen. Hier sind sie häufig mit malignen sowie entzündlichen Prozessen assoziiert.^[439] Insbesondere die Überexpression von Galectin-1 (Gal-1) korreliert, in Verbindung mit erhöhten Serumspiegeln des Proteins, mit einer gesteigerten Aggressivität des Tumors und schlechten Prognosen für seine Bekämpfung.^[440-442] Die Inhibierung bzw. Regulierung der Interaktion des Proteins mit seinen Bindungspartnern, β -Galactosidstrukturen auf Zelloberflächen, gilt als vielversprechender Ansatzpunkt zur Tumorthherapie.^[443] Zudem eignet sich Galectin-1 möglicherweise als Biomarker für eine frühzeitige Diagnose einer malignen Erkrankung, was die Heilungschancen ebenfalls deutlich steigern würde.

Im Rahmen ihrer Promotion entwickelte *Dr. Nadja Bertleff-Zieschang* mit Hilfe des rationalen Ligandendesigns eine Reihe von Derivaten des natürlichen Bindungsmotivs *N*-Acetyllactosamin, die in SPR- und ITC-Messungen eine gesteigerte Affinität gegenüber Gal-1 aufwiesen.^[444]

Das Potential dieser Derivate für die selektive Bindung sowie den Nachweis des Proteins auf dem Glycochip sollte im Hinblick auf eine mögliche diagnostische Anwendung in einem gemeinsamen Projekt evaluiert werden.

Neben den Referenzverbindungen Lactose und LacNAc wurden drei Derivate mit aromatischen Seitenketten (siehe Abb. 3-27) für die Untersuchung ausgewählt, die in zuvor durchgeführten SPR- und ITC-Studien eine zwei- bis dreifach höhere Affinität gegenüber Gal-1 (relativ zu LacNAc) gezeigt hatten. Aus den Kristallstrukturen der Verbindungen **69** und **70** im Komplex mit Gal-1 wurden zudem detaillierte Einblicke in ihren Bindungsmodus gewonnen und zahlreiche zusätzliche Wechselwirkungen der eingeführten Seitenkette mit der Oberfläche des Proteins identifiziert.^[444]

Die multivalente Präsentation auf der Chipoberfläche versprach, die beobachtete geringfügige Affinitätssteigerung gegenüber dem homodimeren Protein zu potenzieren, und eine deutlichere Diskriminierung der Bindungsmotive zu ermöglichen.

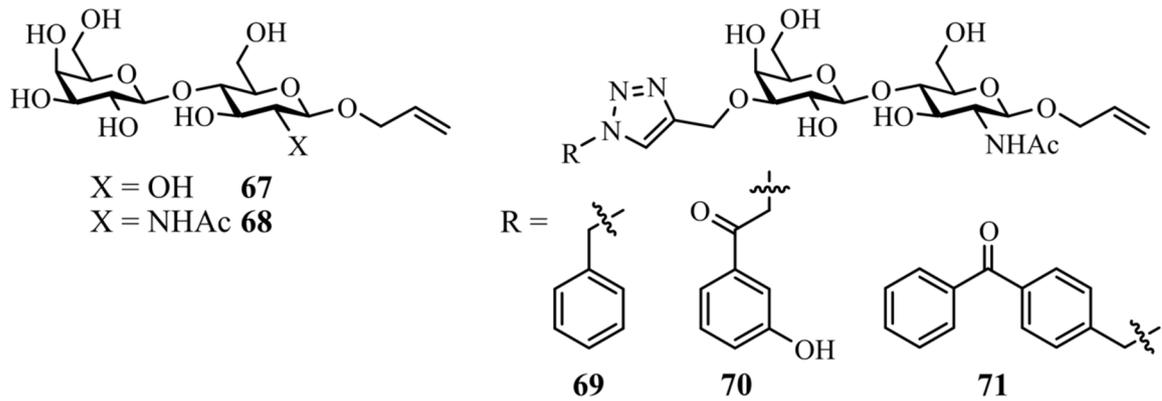


Abb. 3-27: Für die Detektion von Galectin-1 auf dem Glycochip ausgewählte Lactose- bzw. LacNAc-Derivate. Die Verbindungen wurden von *Dr. Nadja Bertleff-Zieschang* im Rahmen ihrer Promotion dargestellt.^[444]

Die allylterminierten Kohlenhydrate wurden photochemisch auf dem Glaschip immobilisiert und mit fluoreszenzmarkiertem Gal-1 inkubiert. Das Protein wurde von *Dr. Nadja Bertleff-Zieschang* rekombinant in *E. coli* exprimiert^[444] und von *Dr. Antonia Göhler* mit Alexa647 markiert.^[445] Als Kontrolle diente das pflanzliche Lectin PNA, das ebenfalls β -Galactoside erkennt.

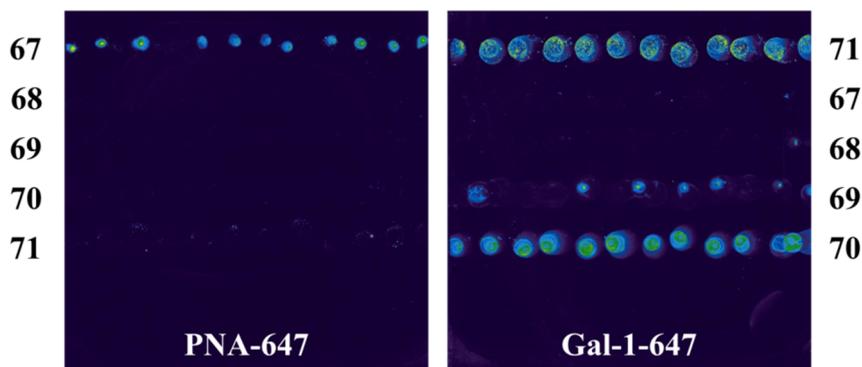


Abb. 3-28: Fluoreszenzintensität des Glycochips nach Immobilisierung der Lactose- und LacNAc-Derivate aus Abb. 3-27 (1 mM) und Inkubation mit Alexa647 markierten Proteinen (50 μ g/ml). PNA als Referenz (links) erkennt ausschließlich Lactose **67**, während Gal-1 (rechts) keine detektierbare Affinität zu den natürlichen Bindungsmotiven Lactose und LacNAc zeigt, sondern ausschließlich die LacNAc-Derivate **69**, **70** und **71** bindet.

Wie erwartet wurde eine Bindung des PNA auf Lactose beobachtet, Gal-1 zeigte dagegen keine detektierbare Affinität gegenüber den Referenzverbindungen **67** und **68**, stattdessen Signale auf den LacNAc-Derivaten **69**, **70** und **71** (siehe Abb. 3-28).

Angesichts des mittels SPR ermittelten Unterschieds in der Dissoziationskonstante K_D von nicht einmal einer Größenordnung überrascht dieses Ergebnis zunächst. Ein Vergleich der beiden Methoden lässt aber darauf schließen, dass die Präsentation der Glycane auf der Oberfläche des Glycochips dem dimeren Protein ermöglicht, bivalente Wechselwirkungen einzugehen (siehe Abb. 3-29A). Diese sind deutlich stärker als die im SPR-Experiment detektierten monovalenten Bindungen zwischen dem immobilisierten Protein und dem Kohlenhydrat, das in Lösung vorliegt (siehe Kapitel 2.2, Abb. 2-13).

Die multivalente Präsentation eines nur wenig in seiner Affinität gesteigerten Derivats des natürlichen Bindungsmotivs führt also leicht zu einer deutlichen Diskriminierung zwischen den konkurrierenden Bindern. Dies sollte sich für die Verwendung des Glycochips als diagnostisches Tool zur Detektion von Gal-1 bzw. erhöhter Serumspiegel nutzen lassen.

Allerdings stellt die Verwendung des fluoreszenzmarkierten Gal-1 eine klinisch wenig relevante Situation dar. Stattdessen sollte das unmarkierte Protein möglichst sensitiv und selektiv selbst aus komplexen Gemischen wie Serum detektiert werden können.

Zu diesem Zweck werden häufig (markierte) Antikörper verwendet, die hochspezifisch ein Bindungsepitop ihres Antigens erkennen und binden. Die Nutzung eines Sandwich-Aufbaus, also der Bindung des nativen Galectin-1 auf die Glycane der Chipoberfläche sowie sein Nachweis durch einen fluoreszenzmarkierten Antikörper erschien deshalb zweckmäßig (siehe Abb. 3-29B).

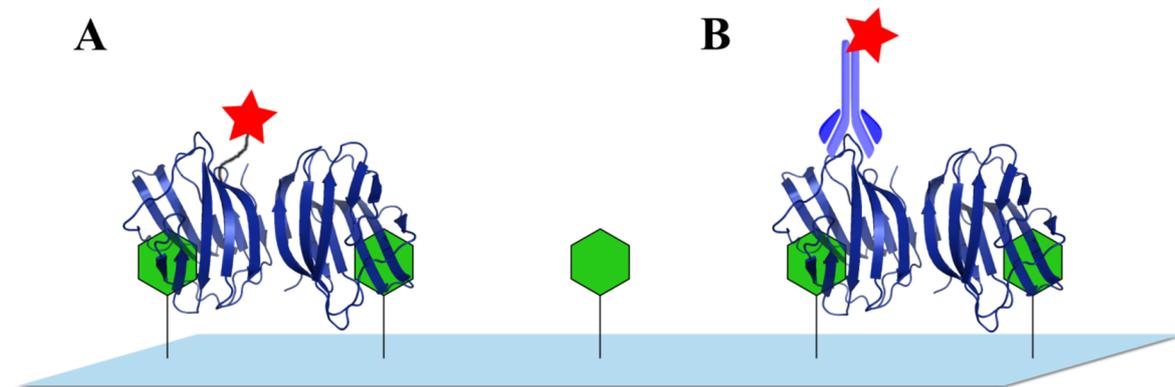


Abb. 3-29: Nachweis von Galectin-1 durch Bindung auf den Glycochip. Das fluoreszenzmarkierte Protein wird direkt detektiert (A), das native Protein kann durch Sandwichbildung mit einem markierten Antikörper nachgewiesen werden (B).

Als strukturell ähnlicher, kompetitiver Bindungspartner wurde Galectin-3 gewählt, dessen Beteiligung an malignen Prozessen bekannt ist^[446-448] und das ebenfalls als potentieller Tumormarker untersucht wird.^[449-451] Dieses Protein wurde von *Dr. Nadja Bertleff-Zieschang* in zwei Varianten rekombinant exprimiert, in Volllänge (Gal-3FL) sowie als verkürztes, auf die Kohlenhydraterkennungsdomäne reduziertes Protein (Gal-3CRD). Die Affinität der beiden Proteine gegenüber LacNAc sowie den in Abb. 3-27 gezeigten Derivaten **69**, **70** und **71** wurde in SPR-Experimenten bestimmt. Dabei zeigte sich ein differenziertes Bindungsverhalten; während **69** und **71** keine Affinitätssteigerung gegenüber LacNAc zeigten, wurde der K_D -Wert für **70** um etwa 50 % gesenkt.^[444]

Auf dem Glycochip sollte es also möglich sein, beide Proteine parallel zu detektieren und anhand ihres unterschiedlichen Bindungsmusters zu differenzieren. Zum Nachweis der nativen Proteine wurden kommerzielle polyklonale Antikörper verwendet, die mit Alexa647 (aGal-1) bzw. Alexa555 (aGal-3) markiert waren. Die beiden Farbstoffe können mit den im Arrayreader vorhandenen Lasern unabhängig voneinander angeregt und detektiert werden (siehe Abb. 3-30), so dass auch Zweifarben-Experimente möglich sind.

Zunächst musste allerdings die Detektionsgrenze der verwendeten Antikörper bestimmt und eine Kreuzreaktivität ausgeschlossen werden.

In einem vereinfachten Ansatz wurden deshalb die Proteine Gal-1, Gal-3FL und Gal-3CRD über Lysinseitenketten direkt auf der NHS-aktivierten Oberfläche der Slides immobilisiert (1, 5, 10 und 25 $\mu\text{g/ml}$) und anschließend mit einem der beiden Antikörper (2, 10, 20, 50 und 100 $\mu\text{g/ml}$) bzw. einem 1:1-Gemisch (10 und 20 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert. Dabei wurden zwei verschiedene Slide-Fabrikate verwendet. Neben dem bereits vorgestellten Slide H mit Hydrogelbeschichtung wurde Slide P (ebenfalls SCHOTT NEXTERION[®]) eingesetzt, der

vom Hersteller für Antikörper-Arrays empfohlen wird. Er unterscheidet sich von Slide H nur dadurch, dass die reaktiven NHS-Ester ohne einen zusätzlichen flexiblen Linker direkt auf dem hydrophilen Polymer der Beschichtung präsentiert werden.

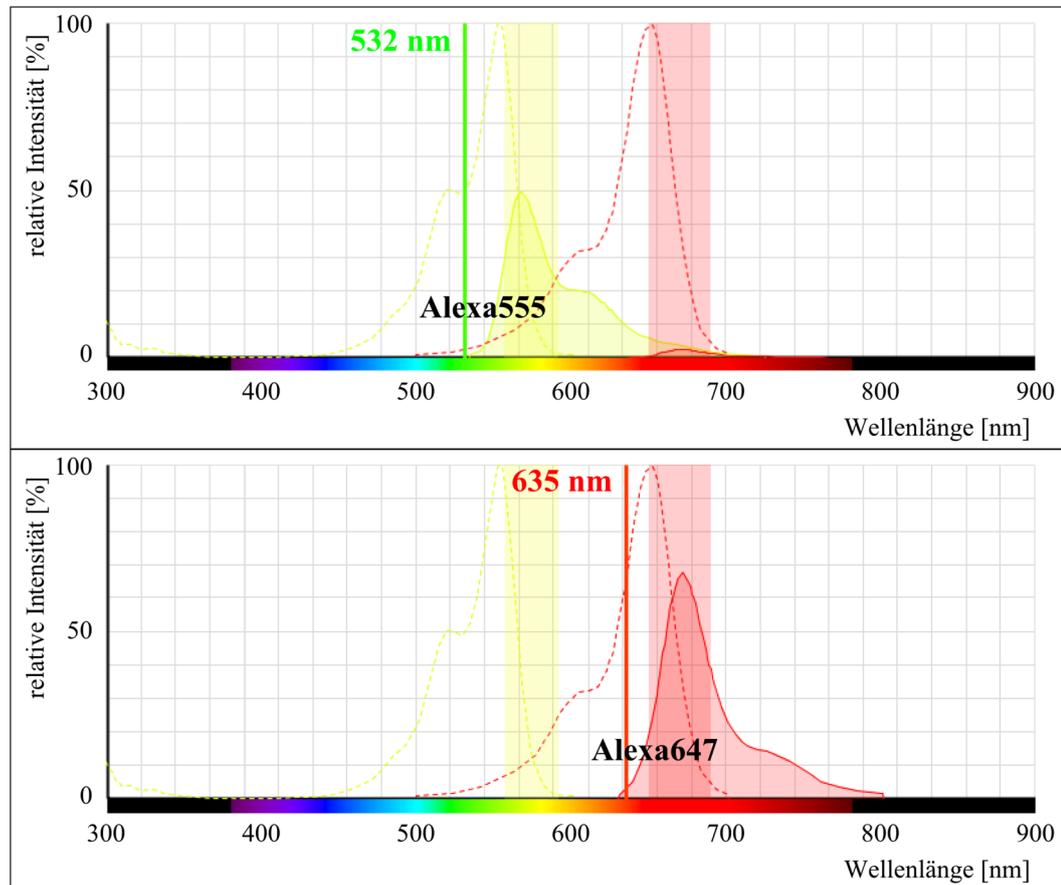


Abb. 3-30: Absorptions- (gestrichelte Linien) und Emissionsspektren (gefüllte Flächen unter durchgezogenen Linien) der Farbstoffe Alexa555 (gelb) und Alexa647 (rot) bei Anregung mit 532 nm (oben) sowie 635 nm (unten). Die Emissionsfilter des Arrayreaders sind als gelbe bzw. rote Balken überlagert. Die Spektren der verwendeten Farbstoffe sind deutlich voneinander getrennt, so dass beide unabhängig voneinander angeregt und detektiert werden können. Die Spektren wurden im „Fluorescence SpectraViewer“ (*life technologies*) erzeugt.^[452]

Auf beiden Slide-Fabrikaten wurden vergleichbare Ergebnisse erhalten, wobei sowohl im Hinblick auf die Spot-Morphologie als auch das Signal-Hintergrundverhältnis Slide P deutlich bessere Ergebnisse lieferte.

Galectin-3 wurde bereits ab einer gespotteten Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ mit der niedrigsten verwendeten Antikörper-Konzentration (2 $\mu\text{g/ml}$) sicher nachgewiesen, für Galectin-1 lag die Nachweisschwelle bei 10 $\mu\text{g/ml}$ des entsprechenden Antikörpers, ein stabiles Signal wurde aber erst bei noch höheren Konzentrationen erzielt.

Auf den mit einem Gemisch beider Antikörper inkubierten Subarrays konnte eine eindeutige Diskriminierung zwischen Gal-1 und Gal-3 nachgewiesen werden, im Zweifarben-Experiment wurden die Spots für Gal-1 ausschließlich im roten (Alexa647), die für Gal-3 ausschließlich im grünen (Alexa555) Kanal beobachtet (siehe Abb. 3-31).

Die Vollängen-Variante des Gal-3 (Gal-3FL) zeigte eine uneinheitliche und verwischte Spot-Morphologie. Da dieser Effekt für Gal-3CRD nicht beobachtet wurde, ist er vermutlich auf Clusterbildung und unspezifische Wechselwirkungen der N-terminalen kollagenartigen

Domäne zurückzuführen, die im verkürzten Protein fehlt.

Die beiden verwendeten Antikörper sind im untersuchten Konzentrationsbereich in der Lage, zwischen Gal-1 und Gal-3 zu diskriminieren, dies ist sogar aus einem Gemisch beider Antikörper in einem Zweifarben-Experiment möglich.

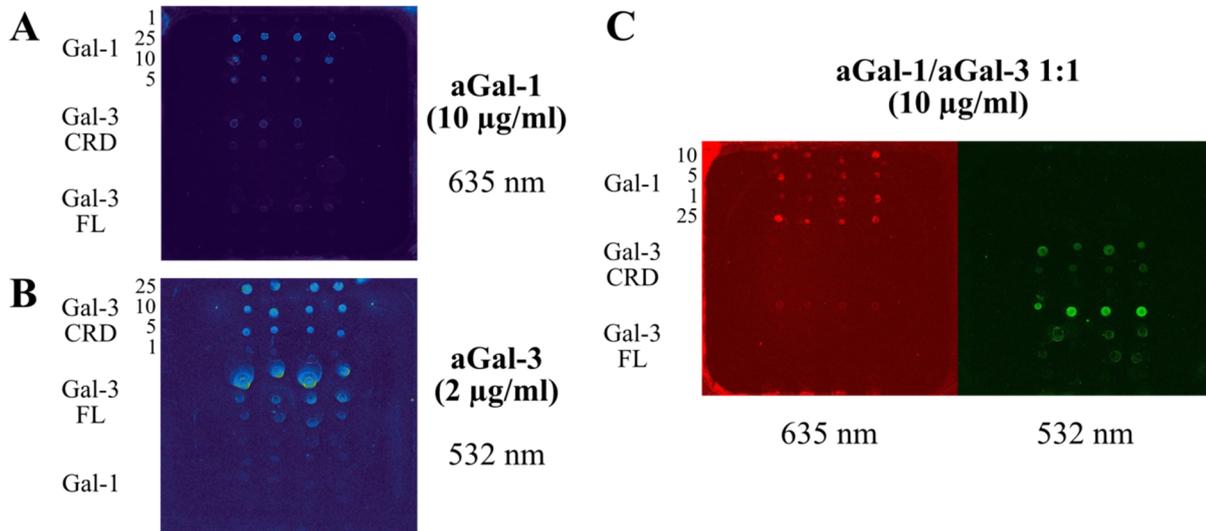


Abb. 3-31: Fluoreszenzintensität des Proteinchips nach Immobilisierung von Gal-1, Gal-3CRD und Gal-3FL sowie Inkubation mit den Antikörpern aGal-1-Alexa647 und aGal-3-Alexa555. A) Falschfarbendarstellung eines Subarrays nach Inkubation mit aGal-1 (10 µg/ml) nach Anregung bei 635 nm. B) Falschfarbendarstellung eines Subarrays nach Inkubation mit aGal-3 (2 µg/ml) nach Anregung bei 532 nm. C) Getrennte Zweifarbenendarstellung des gleichen Subarrays nach Inkubation mit einer 1:1-Mischung von aGal-1 und aGal-3 (10 µg/ml) nach Anregung bei 635 nm (rot) sowie 532 nm (grün).

Die nachfolgenden Experimente zur Erkennung der Galectine im Sandwich-Aufbau (siehe Abb. 3-29B) wurden zunächst ebenfalls auf Slide H und Slide P durchgeführt. Slide P lieferte in diesem Fall allerdings eine extrem schlechte Spotmorphologie, so dass die einzelnen Spots nicht separiert detektiert werden konnten sondern stark ineinander überliefen. Aus diesem Grund wurde für weitere Untersuchungen wieder ausschließlich auf Slide H zurückgegriffen. Nach der Immobilisierung der Lactose-Derivate wurde der Chip zunächst mit unmarkierten Proteinen (Gal-1 sowie Gal-3CRD, je 100 µg/ml, einzeln sowie als 1:1-Gemisch, 3 h) inkubiert, anschließend folgte eine zweite Inkubation mit den beiden Antikörpern (aGal-1: 50 und 100 µg/ml, aGal-3: 20 und 50 µg/ml, Gemisch 1:1 50 und 100 µg/ml, 18 h). Um einer (übermäßigen) Denaturierung der Proteine vorzubeugen wurden alle Inkubationsschritte bei 4 °C durchgeführt.

Auf den Slides wurden durchweg sehr schwache Signale beobachtet, die sich aber dennoch signifikant vom Hintergrund abhoben (siehe Abb. 3-32). Dabei zeigten sich für Gal-1 die gleichen Tendenzen wie bei der Anbindung des fluoreszenzmarkierten Proteins (siehe Abb. 3-28). Die beiden LacNAc-Derivate **70** und **71** wurden sowohl von Gal-1 als auch von Gal-3 erkannt und im Sandwich-Komplex durch entsprechende Antikörperbindung nachgewiesen. Im Einfarbenexperiment (aGal-1 oder aGal-3 inkubiert, Abb. 3-32A und B) wurde jeweils nur bei Anregung mit der entsprechenden Wellenlänge ein Signal nachgewiesen, während die Hintergrundmessung im zweiten Kanal nur minimale unspezifische Artefakte erbrachte. Wurden dagegen beide Proteine als 1:1-Gemisch inkubiert und anschließend mit beiden Antikörpern gleichzeitig behandelt, waren dagegen beide Farbstoffe parallel nachweisbar (Abb. 3-32C). Dabei verringerte sich im Vergleich zu den Einzel-Inkubationen jedoch die

Signalintensität auf den Spots, was auf eine kompetitive Bindung der beiden Galectine auf den Glycanen hinweist. Ohne quantifizierbare Referenzmessungen ist allerdings keine Aussage zur relativen Bindungsaffinität der beiden Proteine gegenüber **70** und **71** möglich. Derivat **69**, das in Abb. 3-28 noch deutlich von Gal-1-Alexa647 nachgewiesen wurde, ist im Sandwichkomplex nicht mehr sichtbar, so dass von einer deutlich geringeren Affinität gegenüber den untersuchten Lectinen ausgegangen werden kann.

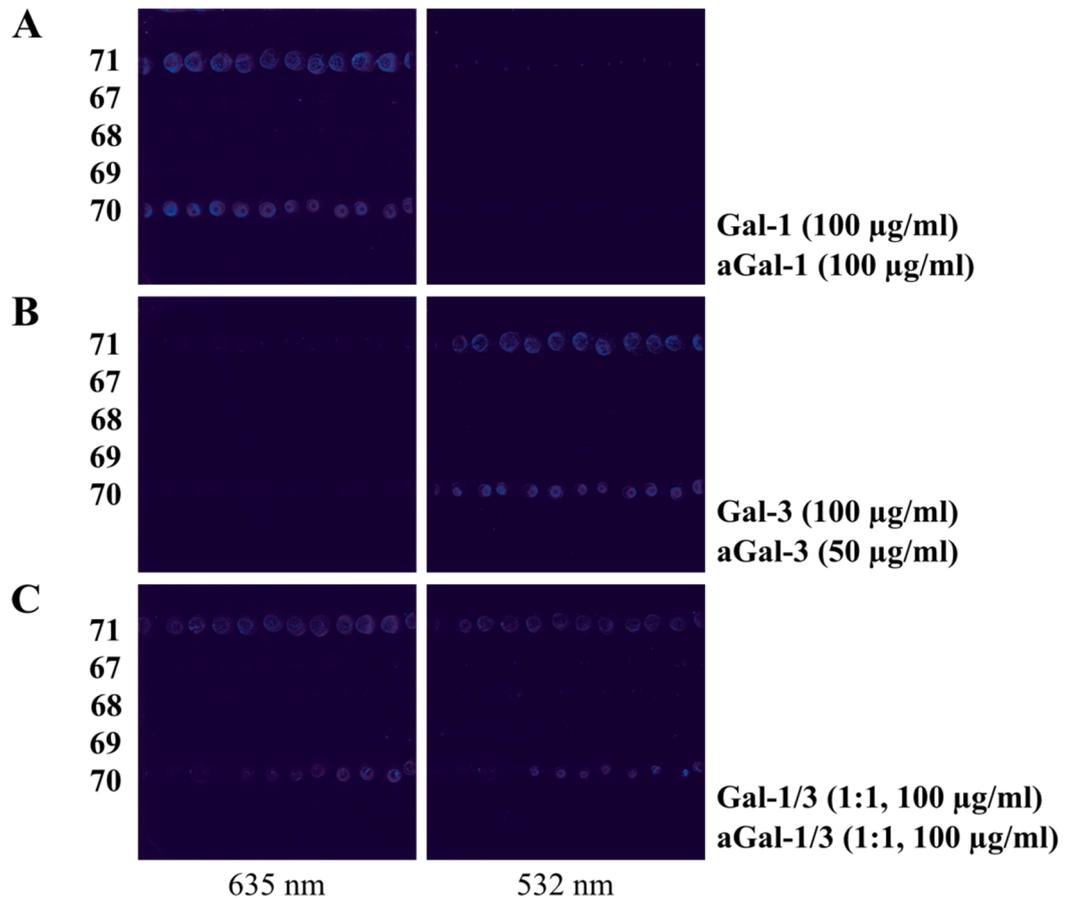


Abb. 3-32: Fluoreszenzintensität der Glycochips nach Immobilisierung der Lactosederivate (1 mM), Primärinkubation mit Galectin und Sekundärinkubation mit entsprechenden Antikörpern. A) Inkubation mit Gal-1 (100 µg/ml) und aGal-1 (100 µg/ml). B) Inkubation mit Gal-3 (100 µg/ml) und aGal-3 (50 µg/ml). C) Inkubation mit Gal-1/Gal-3 (1:1-Gemisch, 100 µg/ml) und aGal-1/aGal-3 (1:1-Gemisch, 100 µg/ml).

Der parallele spezifische Nachweis der beiden Galectine aus einer Probe eröffnet vielfältige Möglichkeiten zur diagnostischen Anwendung des Glycochips. Allerdings liegen die für verschiedene Tumorerkrankungen gefundenen Serumkonzentrationen für Gal-1 und Gal-3 meist bei niedrigstelligen ng/ml.^[453-455] Die Sensitivität des verwendeten Chipsystems sollte also mindestens um den Faktor 10^4 gesteigert werden, um einen sicheren Nachweis dieser geringen Mengen zu ermöglichen. Zudem sind klinische Proben wie Seren komplexe Mischungen vieler verschiedener Proteine und anderer Verbindungen, so dass eine exklusive Bindung der adressierten Galectine auf dem Chip sichergestellt werden muss.

Initiale Experimente in diese Richtung wurden mit Prof. Dr. Jörg Wischhusen (Universitätsklinikum Würzburg) durchgeführt. Die von ihm zur Verfügung gestellten Zellen einer Prostatakarzinom-Linie (PC-3M) exprimieren sowohl Gal-1^[456] als auch Gal-3.^[457] Sowohl ganze Zellen als auch Lysate wurden zur Bindung der Galectine auf dem

funktionalisierten Glycochip inkubiert und anschließend wie beschrieben mit Antikörpern gefärbt. Dabei wurden für beide Proteine leicht positive Ergebnisse erhalten, wobei die Signalintensität für Gal-1 nur gering über dem Hintergrund lag und damit nicht aussagekräftig ist. Auch die Signaldifferenzen für Gal-3 auf den verschiedenen Kohlenhydraten unterscheiden sich nur um den Faktor drei, zeigen aber eine eindeutige Tendenz zur Bindung der beiden Derivate **70** und **71**, was bereits mit reinem Protein beobachtet wurde.

In laufenden Versuchen wird das Protokoll hinsichtlich der verwendeten Puffer, etwaiger Zusätze stabilisierender Reagenzien, Inkubationszeiten und Waschverfahren überarbeitet, um so eine optimale Signalintensität zu erzielen und die Nachweisgrenze der Galectine nach unten zu verschieben. Eine zusätzliche Steigerung der Sensitivität des verwendeten Assays verspricht der Einsatz rückseitig verspiegelter Slides (SCHOTT NEXTERION® HiSens). Die Beschichtung sorgt für eine effizientere Anregung der Farbstoffe, verringert Emissionsverluste durch Rückstrahlung aller abgegebenen Photonen in Richtung des Detektors und ermöglicht so laut Hersteller eine Signalverstärkung um den Faktor acht bis zehn bei gleichbleibend niedrigem Hintergrund.^[458]

Gelingt es, die Sensitivität des vorgestellten Arrayformats entsprechend zu steigern, können Studien mit Proben von Tumorpatienten angeschlossen werden, so dass der Glycochip Anwendung in der klinischen Diagnostik Galectin-abhängiger maligner Erkrankungen finden kann.

Bindungsstudien mit Mikroorganismen

Auch für die Diagnostik von Infektionskrankheiten sowie mögliche neue therapeutische Ansätze eignet sich der Glycochip. So wurde bereits mehrfach gezeigt, dass neben isolierten Proteinen auch ganze Zellen sowie Viren kohlenhydratvermittelt auf Oberflächen adhären und auf Arrays gebunden werden (siehe Kapitel 2.2 und 2.3).

Werden Kohlenhydrate präsentiert, die spezifisch von einzelnen Stämmen oder sogar noch differenzierter von Pathogenen erkannt werden, können diese anhand ihres Bindungsmusters („Fingerabdruck“) schnell und einfach identifiziert werden. Da die Expression bestimmter Adhäsine häufig mit Pathogenitätsfaktoren wie Infektiosität und Invasivität korreliert^[83] kann so der akute Handlungsbedarf für die Bekämpfung einer Infektion abgeschätzt und möglichst frühzeitig mit einer Behandlung begonnen werden. Dies ist etwa im Fall einer Blutvergiftung (Sepsis), die trotz Intensivbehandlung häufig nicht erfolgreich therapiert werden kann, entscheidend.^[459-460] Die überschießende Immunreaktion sorgt andernfalls für einen akuten Entzündungszustand des gesamten Körpers und damit verbundenem Multiorganversagen. Dialysegeräte mit entsprechender Beschichtung eignen sich hier möglicherweise zur Identifizierung und gezielten Abreicherung zirkulierender Erreger, besitzen also sowohl diagnostisches als auch therapeutisches Potential.

Leider sind bisher nur für wenige Bakterien entsprechend selektive Bindungsmotive identifiziert sowie ihr Einfluss auf das Auftreten und den Verlauf einer Infektion untersucht.^[83]

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erste Experimente zur Anbindung von *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis* und *N. gonorrhoeae* (letztere in Kooperation mit Dr. Michaela Faulstich, Universität Würzburg) durchgeführt.

Auf dem Slide wurden Mannose **49**, Glucose **58**, *N*-Acetylglucosamin **57**, Galactose **59** sowie *N*-Acetyllactosamin **60** immobilisiert (0.1, 0.25, 0.5, 1.0 mM) und mit Suspensionen der Bakterien in PBS ($6 \cdot 10^6$ - $6 \cdot 10^9$ Zellen/ml) 1 h bei 37 °C inkubiert. Im Hellfeldmikroskop wurden für *E. coli* adhärenzte Zellansammlungen auf Mannose detektiert. Dies bestätigt die Anwesenheit des mannosebindenden Adhäsins FimH, das auf den Typ1-Pili präsentiert wird.^[64] Für pilierte Neisserien wurde eine Tendenz zur Bindung an LacNAc gefunden, das ebenfalls zu den bekannten Bindungsmotiven zählt.^[83] Allerdings war die beobachtete Bindung äußerst schwach und konnte bereits durch leichte Waschvorgänge gelöst werden. Möglicherweise weicht die Präsentation des Glycans auf dem Chip zu stark von der natürlichen Situation ab, in der Neisserien das Motiv auf Glycolipiden erkennen.^[83] Die beiden Staphylokokken-Stämme zeigten auf den verwendeten Kohlenhydraten keine spezifische Adhäsion.

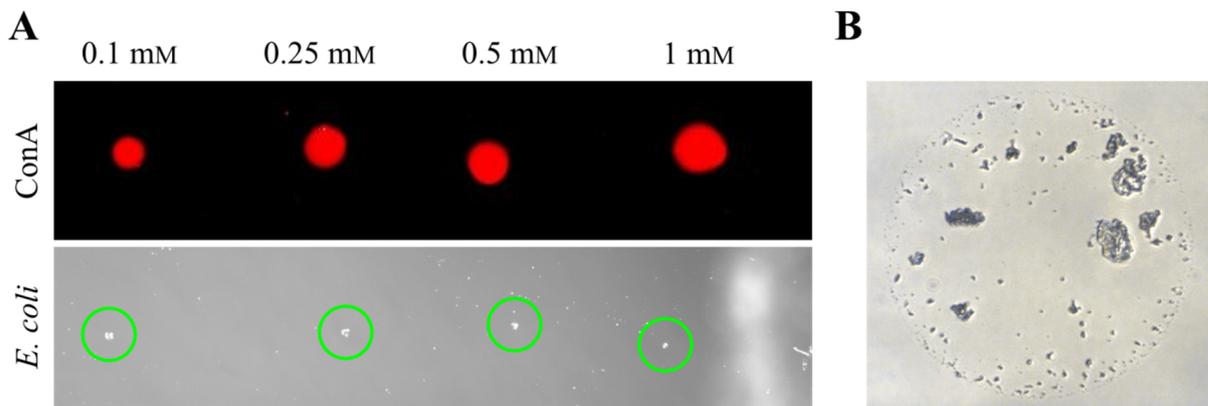


Abb. 3-33: Bindung von *E. coli* auf mannosefunktionalisierten Spots des Glycochips. A) In der Hellfeldaufnahme (10x, unten) sind regelmäßige Ansammlungen von Zellen zu erkennen, die der Referenz (ConA-Alexa647, oben) entsprechen. B) Im vergrößerten Ausschnitt (40x) ist die regelmäßige Kreisform des Spots zu erkennen, auf dem die Zellen anhaften. Durch Austrocknung des Slides sind die Zellen deformiert und geschrumpft.

Die initialen Versuche zeigen, dass eine selektive Bindung und damit eine Identifizierung von Bakterien auf dem entsprechend funktionalisierten Glycochip möglich ist. Für eine zukünftige diagnostische oder sogar therapeutische Anwendung des Chips oder von ihm abgeleiteter Oberflächen müssen jedoch zunächst weitere Kohlenhydratbindungsmotive identifiziert und den entsprechenden Stämmen zugeordnet werden („Adhäsions-Fingerabdruck“). Auf Grundlage der exprimierten Adhäsine und ihrer Zusammensetzung sollte es damit möglich sein, Pathogene schnell, einfach und sicher auch aus Gemischen zu selektieren und zu identifizieren. Möglicherweise bietet die Nutzung pathogenspezifisch mit Kohlenhydraten funktionalisierter Oberflächen in Dialyseverfahren auch therapeutisches Potential.

3.2.2.4 Weitere Anwendungen der Chips

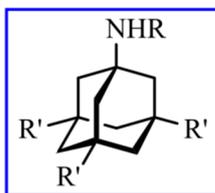
Das System des Microarrays wurde in dieser Arbeit neben seiner klassischen Anwendung als Glycochip für eine Reihe weiterer analytischer Methoden genutzt.

Zu diesen zählen der Lectinchip (siehe Kapitel 2.3), die Verwendung als ergänzendes analytisches Tool zur Detektion und Charakterisierung natürlicher *N*-Glycane sowie der Einsatz als individuell funktionalisierbare Oberfläche für die Zellkultur.

Bindungsstudien auf dem Lectinchip

Auf Zelloberflächen präsentierte kohlenhydratbindende Proteine erfüllen in Organismen häufig wichtige Funktionen in Zell-Zell-Interaktionen und Signalübertragung. Neben der spezifischen Erkennung von isolierten Glycanmotiven ermöglicht die Anwesenheit mehrerer Bindungsstellen (CRD) in einem Protein auch die Bindung geometrisch entsprechend vororganisierter größerer Strukturen und Cluster.^[461]

Solche Strukturen auf Basis des tripodalen Adamantangerüsts wurden von *Carsten Fleck* (AG Maison, Universität Hamburg) im Rahmen seiner Promotion dargestellt^[462-463] und sollten auf ihre Fähigkeit zur Bindung an verschiedene Lectine untersucht werden. Die Verbindungen sind an drei der vier Brückenkopf-atome mit α -glycosidisch verknüpften Mannoseeinheiten derivatisiert, die über einen hydrophilen PEG-Linker gebunden sind. Das vierte Brückenkopfatom trägt eine Aminfunktion zur weiteren Funktionalisierung bzw. Immobilisierung der Trimere (siehe Schema 3-16).

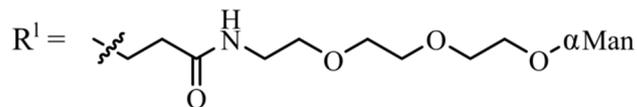
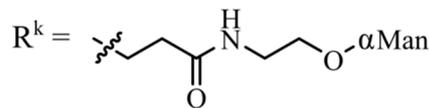


72 R = H, R' = R^k

73 R = H, R' = R^l

74 R = PromoFluor-647, R' = R^k

75 R = PromoFluor-647, R' = R^l



Schema 3-16: Von *Carsten Fleck* dargestellte Mannosetrimere auf Basis eines tripodalen Adamantangerüsts.

Für erste Studien wurden die Trimere **72** und **73** sowie monomere Mannose **49** als Referenz auf dem Chip immobilisiert (1 mM) und mit ConA-Alexa647 in einer Konzentrationsreihe (5-80 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert. Alle Verbindungen zeigten eine deutliche Affinität gegenüber ConA über den gesamten Konzentrationsbereich, wobei Trimer **72** mit dem kurzen Linker eine deutlich geringere Signalintensität auf dem Chip verursachte als Trimer **73** sowie Monomer **49**, das etwas überraschend die höchsten Signalintensitäten aufwies.

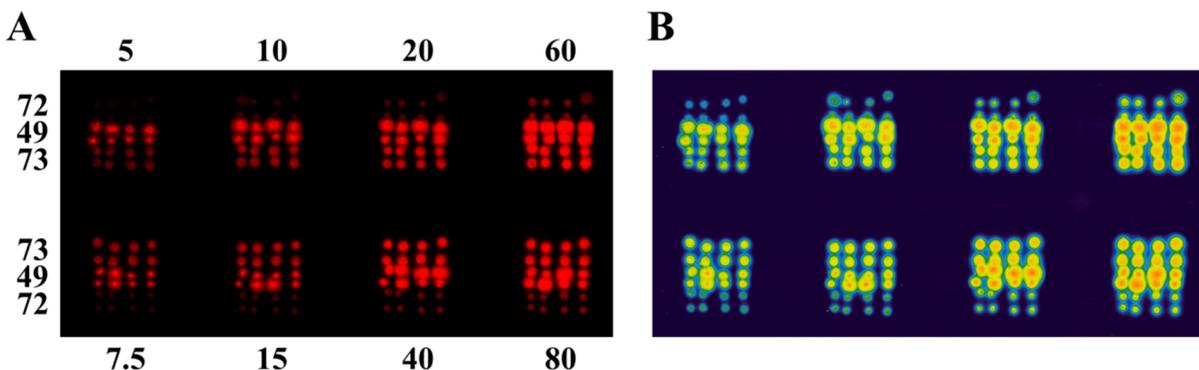


Abb. 3-34: Fluoreszenzintensität des Glycochips nach Immobilisierung der Mannosetrimere **72** und **73** sowie des Monomers **49** und anschließender Inkubation mit ConA-Alexa647; die verwendeten Konzentrationen des Lectins sind in $\mu\text{g/ml}$ angegeben. A) Einfarbandarstellung, B) Falschfarbandarstellung des gleichen Ausschnitts.

Vermutlich ist die Linkereinheit in **72** zu kurz, um mehrere Bindungstaschen eines ConA-Tetramers zu adressieren, gleichzeitig ist die Bindung mehrerer Proteine auf einem Glycan-Trimer aus sterischen Gründen nicht möglich. Der lange Linker in **73** bietet dagegen eine deutlich höhere konformationelle Freiheit und ermöglicht so eine – wie auch immer geartete – multivalente Bindung des Lectins. Die Affinität der eigentlich monovalenten, nur multivalent präsentierten Mannose **49** wird dennoch nicht erreicht. **49** trägt allerdings eine sterisch deutlich weniger gehinderte Aminfunktion zur Reaktion mit den auf der Chipoberfläche präsentierten NHS-Estern, so dass auch eine reduzierte Effektivität der Kupplungsreaktion zu den beobachteten Unterschieden geführt haben kann.

Eine Untersuchung des multivalenten Effekts der trimeren Verbindungen auf einer Plattform wie dem Glycochip, welcher die Glycane ohnehin multivalent präsentiert, ist allerdings nur eingeschränkt und bei starker Verdünnung der Kohlenhydrate möglich. Stattdessen erschien eine invertierte Versuchsanordnung mit immobilisierten Proteinen sinnvoll, bei der die Bindung der Glycane aus einer Lösung erfolgt. Zum fluorimetrischen Nachweis der Trimere wurden diese über ihre freie Aminfunktion mit PromoFluor-647 verknüpft (siehe Schema 3-16). Als Referenz diente die monomere Verbindung **76**, die ebenfalls von *Carsten Fleck* dargestellt wurde.

Zunächst wurde das fluoreszenzmarkierte Lectin ConA-Alexa647 in verschiedenen Konzentrationen und aus zwei verschiedenen Puffersystemen immobilisiert, um geeignete Bedingungen für die weiteren Messungen zu evaluieren.

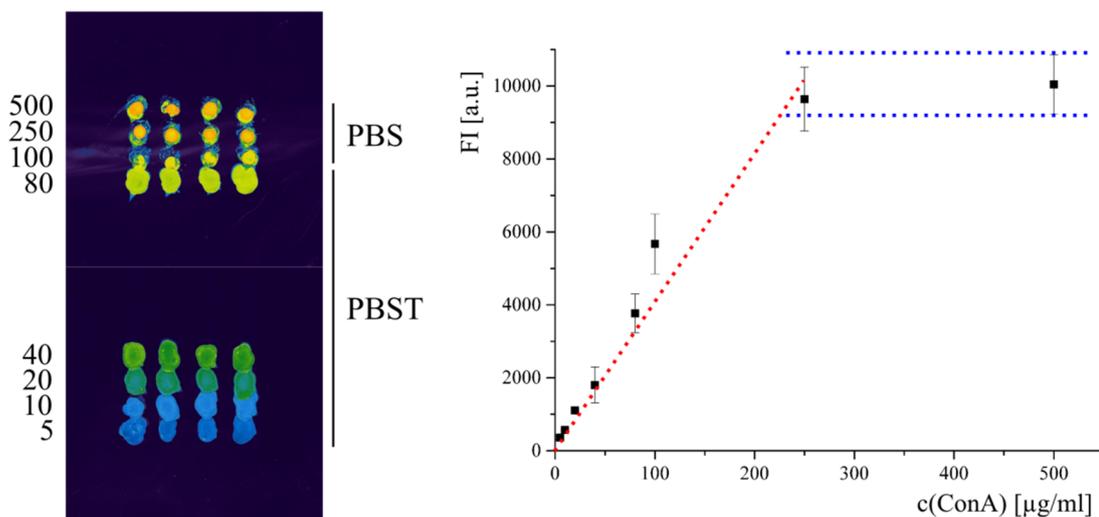


Abb. 3-35: Fluoreszenzintensität des Lectinchips nach Immobilisierung von ConA-Alexa647 (5-500 µg/ml) aus PBS (*Phosphate Buffered Saline*) bzw. PBST (PBS + Tween-20). Nach einem linearen Anstieg der Fluoreszenzintensität bis 250 µg/ml (rot) geht die Signalintensität in die Sättigung (blau), die Oberfläche ist hier mit der maximalen Proteinkonzentration bedeckt. Die Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert von jeweils sechs Messwerten, Fehlerbalken sind angegeben.

Zur Stabilisierung der Proteine während des Bindungsprozesses wurden dem Printpuffer zudem in Anlehnung an Hsu *et al.* der Bindungspartner Mannose und die zur Koordination benötigten zweiwertigen Metallionen Ca^{2+} und Mn^{2+} zugesetzt.^[464-465] Über den gesamten verwendeten Konzentrationsbereich wurde eine deutlich vom Hintergrund abzugrenzende Signalintensität verzeichnet. Der Zusatz von Tween-20 zum Puffer (PBST) sorgte für eine stark unregelmäßige Spotmorphologie, die eine spätere quantitative Analyse erschwerte, so dass in weiteren Versuchen auf PBS zurückgegriffen wurde. Zwischen 250 und 500 µg/ml

immobilisierten Proteins wird die Sättigung des Fluoreszenzsignals erreicht, das heißt, die Oberfläche ist in maximaler Dichte mit dem Lectin bedeckt. Zur Vermeidung von Fehlinterpretationen erfolgten die weiteren Messungen nicht oberhalb dieser Konzentrationsschwelle.

Für Bindungsstudien der fluoreszenzmarkierten trimeren Strukturen **74** und **75** wurden die mannosebindenden pflanzlichen Lectine ConA, LcH (*Lens culinaris*), GNA (*Galanthus nivalis*) und PSA (*Pisum sativum*) ausgewählt. Nach der Immobilisierung auf dem Glaschip (50, 100, 250, 500 µg/ml) wurden sie mit den Mannosiden (0.1, 0.5, 1, 10 µM) inkubiert. Die mit Abstand höchste Affinität zeigten beide Trimere gegenüber ConA. Während das kurze Trimer **74** nur im hohen Konzentrationsbereich und nur für PSA weitere messbare Signale lieferte, konnte das lange Trimer **75** auch auf PSA sicher, auf LcH etwas weniger deutlich nachgewiesen werden. GNA zeigte zu beiden Verbindungen keine signifikante Affinität.

Anhand dieser Daten wurden die Paarungen mit den höchsten Affinitäten (**74**-ConA, **75**-ConA und **75**-PSA) ausgewählt, um ihre Dissoziationskonstanten $K_{D,surf}$ zu bestimmen und die Bindungsereignisse damit zu quantifizieren. Die Messungen für **74**-PSA sowie **75**-LcH sollten möglich, aber vermutlich mit einem höheren Fehler behaftet sein.

Die Bestimmung der $K_{D,surf}$ -Werte erfolgte analog zu den bereits vorgestellten Messungen mit Mannose-ConA sowie Galactose-Boronolectine (siehe Kapitel 3.2.2). Die immobilisierten Proteine wurden mit den beiden Trimeren im Konzentrationsbereich von 50 nM bis 100 µM inkubiert, die erhaltenen Fluoreszenzintensitäten über der Glycankonzentration aufgetragen und als Langmuir-Isothermen (Gleichung 1) ausgewertet.

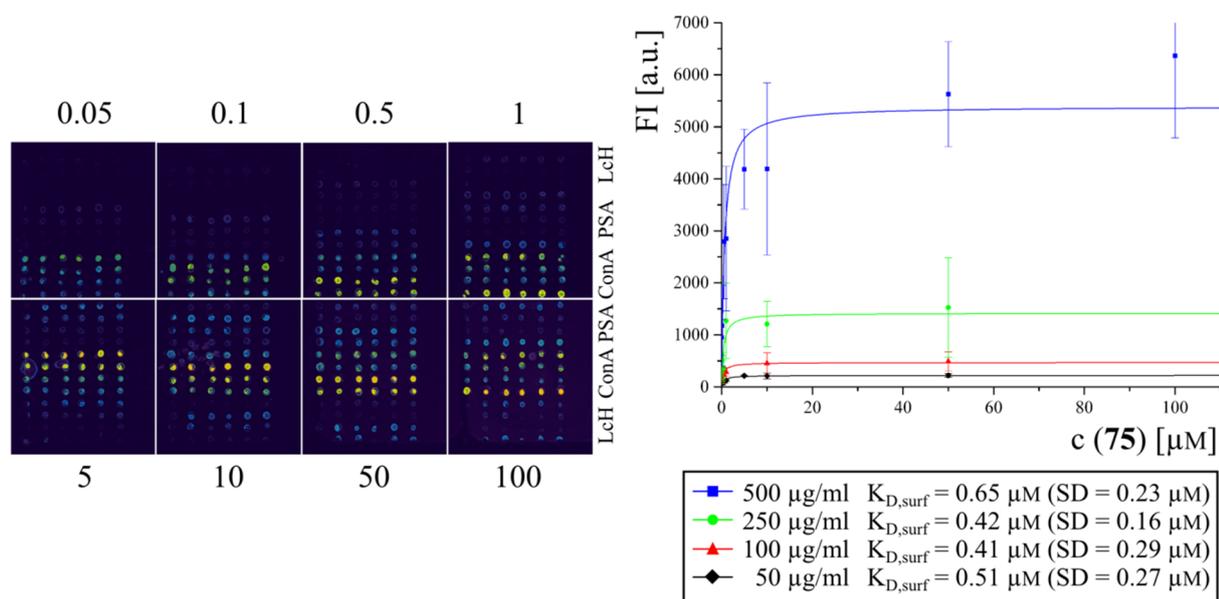


Abb. 3-36: Fluoreszenzintensität des Lectinchips nach Inkubation mit **75** (Konzentrationen in µM) sowie Bestimmung der $K_{D,surf}$ -Werte für ConA aus den Langmuir-Isothermen. Die Datenpunkte sind Mittelwerte aus jeweils sechs Messungen.

Für die Dissoziationskonstante der Paarung mit der höchsten Affinität, **75**-ConA, wurde über den gesamten verwendeten Konzentrationsbereich ein nahezu konstanter Wert erhalten (siehe Abb. 3-36). Alle weiteren Messungen zeigten insbesondere bei der niedrigsten Lectin-Konzentration (50 µg/ml) starke Abweichungen vom Mittelwert. Dies ist auf die niedrigen Absolutwerte der Signalintensitäten zurückzuführen, die den Messfehler stark erhöhen,

andererseits ist der mittlere Abstand der Proteine auf der Oberfläche in diesem Konzentrationsbereich möglicherweise bereits zu groß für effektive multivalente Wechselwirkungen. Aus diesem Grund wurden alle weiteren $K_{D,surf}$ -Werte basierend auf den Messwerten für die höchste Lectinkonzentration (500 $\mu\text{g/ml}$) bestimmt; die Daten sind in Tabelle 3-3 zusammengefasst.

Die Affinität der monomeren Referenzverbindung **76** war selbst gegenüber ConA zu gering für eine aussagekräftige Bestimmung der Dissoziationskonstante.

Tabelle 3-3: Zusammenfassung der für die Trimere **74** und **75** gegenüber drei mannosebindenden Lectinen bestimmten $K_{D,surf}$ -Werte.

Trimer	$K_{D,surf}$ [μM] (SD μM)		
	ConA	PSA	LcH
74	0.53 (0.44)	8.90 (5.33)	-
75	0.50 (0.15)*	6.97 (3.97)	-#

*Mittelwert aus vier Messungen bei verschiedenen Lectinkonzentrationen (siehe Abb. 3-36). #Aufgrund niedriger Absolutwerte der gemessenen Signalintensitäten vermutlich stark überschätzter Wert.

Der Lectinchip – die invertierte Form des Glycochips mit immobilisierten Proteinen und Bindung von Kohlenhydratmotiven aus der Lösung – eignet sich damit ebenso wie sein Vorbild zur Detektion und Quantifizierung von glycanbasierten Bindungsereignissen. Allerdings müssen die Affinitäten der Komplexe auch hier einen Mindestwert überschreiten, um aussagekräftige und quantitativ auswertbare Daten zu erhalten.

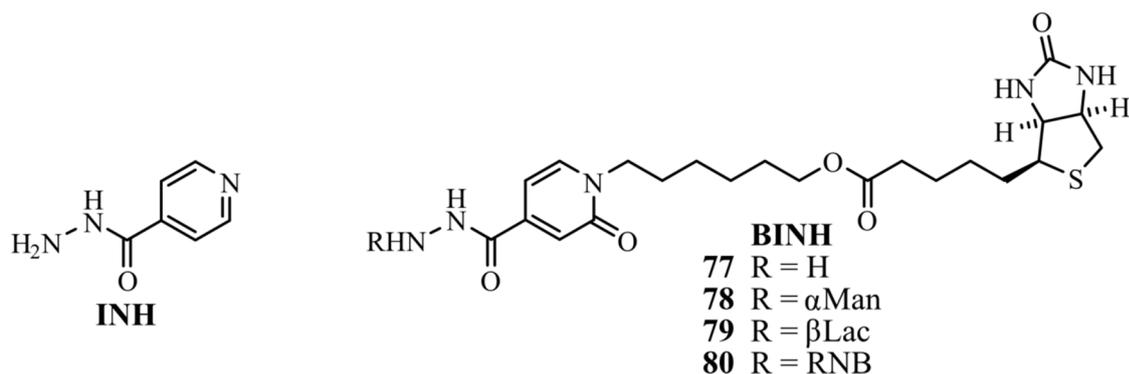
Arrays zur Detektion und Charakterisierung natürlicher N-Glycane

Die Analytik komplexer Glycanstrukturen, die aus natürlichen Quellen isoliert werden, erfolgt aufgrund der hohen Sensitivität der Methode meist massenspektrometrisch. Durch eine Derivatisierung des reduzierenden Endes wird die Ionisierung der Moleküle deutlich vereinfacht, was zu einer weiteren Steigerung der Nachweisempfindlichkeit führt.^[466] Verwendet werden meist aromatische Amin- und Hydrazinderivate wie 2-Aminobenzoesäure, 2-Aminopyridin, oder Phenylhydrazin, die mit dem freien Aldehyd reduzierender Zucker Imine bzw. Hydrazine (Schiff-Basen) bilden und teilweise durch Reduktion zum Amin weiter stabilisiert werden.^[466-467]

Im Rahmen ihrer Promotion entwickelte *Dr. Stephanie Bank* ein biotinyliertes Hydrazinderivat, Biotin-Isoniazid (BINH), das eine einfache Derivatisierung komplexer N-Glycane (isoliert aus den beiden Glycoproteinen Ribonuclease B und Ovalbumin) für die massenspektrometrische Analytik (MALDI-MS/MS) erlaubte (siehe Schema 3-17).^[468-469]

Die Verknüpfung der Glycane mit Biotin sollte zudem ihre Immobilisierung sowie den selektiven Nachweis durch kohlenhydratbindende Proteine auf Oberflächen und damit einen multifunktionalen Einsatz der BINH-Derivate ermöglichen.

Die entsprechenden Untersuchungen wurden gemeinsam mit *Dr. Stephanie Bank* durchgeführt.



Schema 3-17: Von Dr. Stephanie Bank dargestellte, auf Isoniazid (INH) basierende biotinylierte (BINH-) Derivate zur Analytik von Glycanen. Die Stammverbindung **77** wurde für Referenzmessungen mit D-Mannose zu **78** sowie mit D-Lactose zu **79** umgesetzt. Komplexe N-Glycane wurden durch enzymatische Deglycosylierung von Ribonuclease B (RNB) gewonnen und zu **80** derivatisiert.

Zur Immobilisierung der BINH-Derivate dienten Streptavidin-modifizierte Oberflächen. Entsprechend beschichtete schwarze 384-Wellplatten erwiesen sich nach Anbindung von **78** bzw. **79** sowie anschließender Inkubation mit den fluoresceinmarkierten Lectinen ConA bzw. PNA als nicht sensitiv genug für die Detektion eines Signals, so dass in weiteren Versuchen auf Glasslides im Arrayformat (*PolyAn*) zurückgegriffen wurde.

Die Verbindungen **78**, **79** und **80** wurden sowohl mit dem Handtool als Spots sowie großflächiger als Tropfen von 0.5 µl auf die Oberfläche übertragen und immobilisiert. Nach der Absättigung der freien Bindestellen des Streptavidins mit Biotin und Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Lectinen wurden auf den 0.5 µl-Spots von **78** und **80** mit ConA Signale detektiert. Dies ist auf die Anwesenheit mannosereicher Oligosaccharide wie Man₆GlcNAc₂ auf Ribonuclease zurückzuführen.^[470-471] Die Signale waren zwar relativ schwach, hoben sich aber dennoch deutlich vom Hintergrund ab. Lactose **79** wurde von PNA dagegen nicht erkannt.

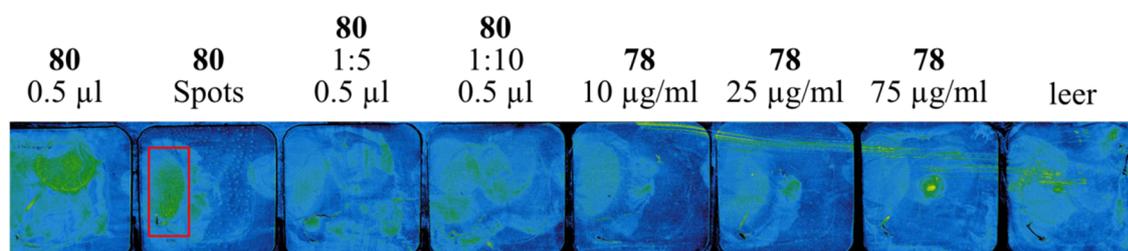


Abb. 3-37: Fluoreszenzintensität des Slides nach Inkubation mit BINH-Derivat **78** bzw. **80** und Nachweis der Glycane mit ConA-Alexa647. Bei hoher Konzentration der Glycane ist jeweils ein zwar schwaches, aber signifikant über dem Hintergrund liegendes Signal zu erkennen. Die Spots von **80** im zweiten Feld erscheinen nicht getrennt, sondern als flächiges Signal (roter Kasten).

Auch wenn die beobachteten Signalintensitäten nur schwach und die Hintergrundfluoreszenz relativ hoch waren, konnte doch belegt werden, dass sich der BINH-Linker für die multifunktionelle Analytik von (komplexen) Glycanen eignet. Bei entsprechender Weiterentwicklung des Arrays können die Bindungsstudien auf dem Chip zusätzliche wertvolle Informationen zur Struktur der analysierten Kohlenhydratmotive liefern.

Glycochips als individuell funktionalisierbare Oberflächen

Die Oberfläche medizinischer Implantate muss nicht nur biokompatibel sein, sondern wird auch auf ihr Potential zur weiteren Funktionalisierung untersucht, um etwa regenerative Prozesse zu initialisieren. Auf diese Weise können Heilungsprozesse beschleunigt und neuartige Therapieansätze entworfen werden. Ein möglicher Ansatz ist die Immobilisierung von Wachstumsfaktoren, die die Zellproliferation stimulieren und so das Wachstum neuen Gewebes induzieren.^[472-473] Zu diesen gehört auch die 23 Mitglieder umfassende Familie der Fibroblasten-Wachstums-Faktoren (*Fibroblast Growth Factor*, FGF).^[474] Die Wachstumsfaktoren werden natürlicherweise lokal in der extrazellulären Matrix (ECM)^[475] des Gewebes gespeichert und bei Bedarf freigesetzt. Eine derartige Mikroumgebung soll durch die Beschichtung der Implantate imitiert werden.

Als stark vereinfachtes Modell werden zunächst Zellkulturstudien durchgeführt, um die Aktivität und den Einfluss der immobilisierten Wachstumsfaktoren sowie alternativer Oberflächenmodifikationen zu untersuchen.

Die Proteine können auf verschiedenste Weise auf der Oberfläche gebunden werden, sollten aber möglichst flexibel, räumlich frei zugänglich und in kontrollierter Ausrichtung präsentiert werden, um ihre Wirkung entfalten zu können. Eine solche Möglichkeit bietet die Integration eines potentiellen Linkers bereits bei der Expression des Proteins. Durch die Verwendung einer unnatürlichen Aminosäure kann etwa eine Alkin-Seitenkette in die Sequenz integriert werden. Das Protein FGF-2 wurde von *Dr. Tessa Lühmann* mit einer derartigen Modifikation rekombinant exprimiert und sollte auf seine Eignung zur Immobilisierung durch eine kupferkatalysierte Clickreaktion (siehe Kapitel 2.4) auf einer azidmodifizierten Oberfläche untersucht werden. Eine solche Fläche bietet der Glycochip nach Anbindung der Azidomannose **50**; nach dem Vorbild der ECM wird so eine kohlenhydratreiche, polare Umgebung für das Protein geschaffen.

Zunächst mussten allerdings geeignete Bedingungen für die Clickreaktion gefunden werden, so dass für erste Studien zur Anbindung ein alkinmodifizierter Fluoreszenzfarbstoff (CLK-TA116, ein Cy5-Analogon von *Jena Bioscience*) verwendet wurde. Die Versuche wurden von *Dr. Tessa Lühmann* und *Gabriel Jones* durchgeführt und sind nicht Bestandteil dieser Arbeit,^[476] deshalb werden hier nur initiale Ergebnisse diskutiert.

Azidomannose **50** wurde zunächst wie bereits beschrieben in Form von Spots auf dem Slide immobilisiert, für spätere Anwendungen auch vollflächig gebunden. Die selektive Bindung des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffs auf den azidmodifizierten Spots konnte nachgewiesen werden, wobei zunächst eine starke Hintergrundfluoreszenz durch unspezifisch gebundene Farbstoffe beobachtet wurde (siehe Abb. 3-38). Diese konnte durch Optimierung des Protokolls stark reduziert werden, so dass das Arrayformat in laufenden Versuchen zur Immobilisierung und Präsentation des FGF-2 und Studien zur Stimulation von Fibroblasten genutzt wird.

Weiterhin denkbar ist die gezielte Modifikation von Zellen, die durch Metabolic Glycoengineering mit entsprechenden Kohlenhydratanaloga (siehe Kapitel 2.4) ebenfalls Azidofunktionen auf ihrer Oberfläche präsentieren. So wird der Wachstumsfaktor kovalent an seinem Wirkort gebunden und erlaubt möglicherweise eine gezieltere sowie länger anhaltende Stimulation.

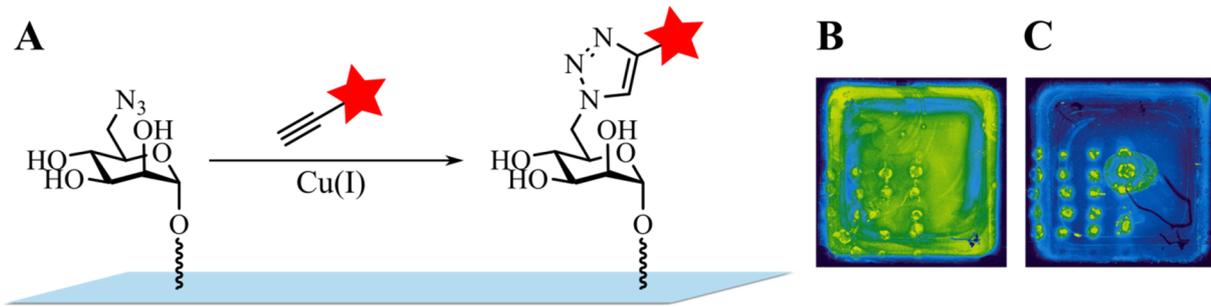


Abb. 3-38: Immobilisierung eines Alkinfarbstoffs (CLK-TA116 von *Jena Bioscience*) auf dem azidofunktionalisierten Glycochip mittels kupferkatalysierter Huisgen-Sharpless-Meldal-Reaktion. A) Schematische Darstellung des Prinzips. B) Fluoreszenzintensität des Glycochips unter nicht optimierten sowie C) unter optimierten Bedingungen. Die Spotstruktur der immobilisierten Mannose **50** ist deutlich erkennbar.

In folgenden Untersuchungen wurden anstelle des Fluoreszenzfarbstoffs die beiden propargyl-funktionalisierten Kohlenhydrate Galactose **81** und Glucuronsäure **82** mittels Clickreaktion auf dem Chip gebunden und ihr Einfluss auf die Erkennung der Motive durch Lectine überprüft.

Während Azidomannose **50** noch von ConA erkannt wird (die Signalintensität liegt im Bereich der schwachen Binder Glucose und *N*-Acetylglucosamin), sind diese Signale nach der Clickreaktion vollkommen verschwunden (siehe Abb. 3-39).

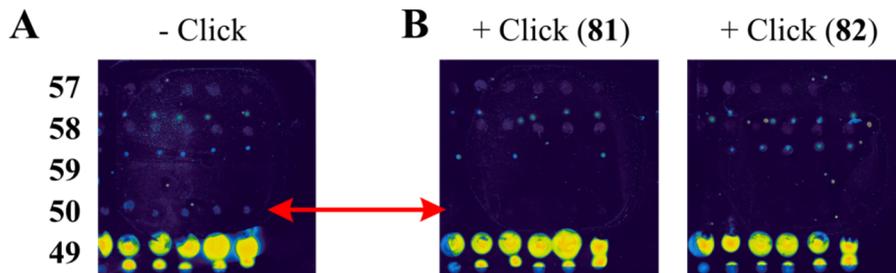


Abb. 3-39: Fluoreszenzintensität des Glycochips vor sowie nach Clickreaktion mit Galactose **81** bzw. Glucuronsäure **82** sowie Inkubation mit ConA-Alexa647 (die Kohlenhydrate wurden jeweils in Konzentrationen von 1 mM (obere Zeile) sowie 0.1 mM (untere Zeile) gespottet). A) Vor der Clickreaktion wird Azidomannose **50** noch schwach gebunden (Pfeil). B) Nach der Reaktion sind die entsprechenden Signale verschwunden.

Die [2+3]-Cycloaddition zwischen Azid und Alkin eignet sich demzufolge für die weitere Funktionalisierung und Modifikation der Chipoberfläche. So können auf einfache Weise verschiedenste Motive immobilisiert und ihr Einfluss auf Bindungsereignisse untersucht werden.

Das Arrayformat auf Gold- oder Glasbasis bietet vielfältige Möglichkeiten zur Untersuchung von Kohlenhydrat-Wechselwirkungen auf einer Oberfläche.

Bedingt durch die hohe Sensitivität der Messmethoden werden nur geringste Mengen der Glycane und ihrer Bindungspartner – vom natürlichen Lectin über den synthetischen Kohlenhydratbinder bis zu ganzen Zellen – benötigt, um Bindungsereignisse qualitativ und quantitativ zu beschreiben. Damit nimmt der Glycochip zu Recht eine wichtige Stellung in der Untersuchung komplexer Prozesse mit Relevanz für medizinische Fragestellungen, unter anderem in der Infektions- und Tumorforschung, ein.

3.3 Synthese des Galabiosemotivs

Das Disaccharid Galabiose (α Gal-1,4- β Gal) ist das Bindungsmotiv des bakteriellen Adhäsins PapG, das von uropathogenen *E. coli* (UPEC) auf den P-Pili präsentiert wird. Es dient den Bakterien zur Adhäsion im humanen Harnwegssystem sowie auf Nierenepithelzellen (siehe Kapitel 2.2).

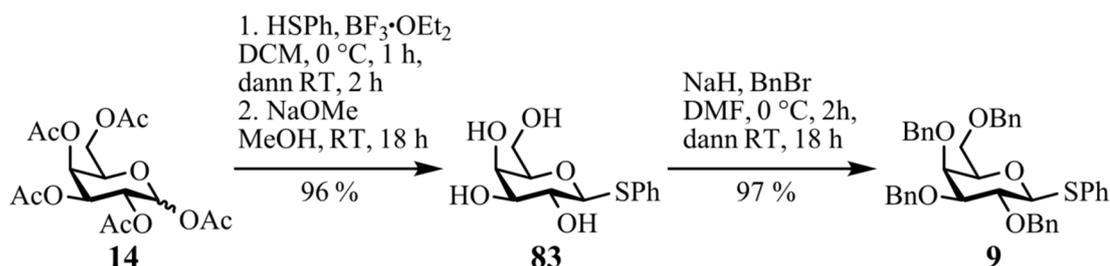
Das Galabiosemotiv sollte sowohl für Bindungsstudien auf den vorgestellten Chipsystemen (siehe Kapitel 3.2) als auch für die Anbindung auf Zellen mittels Metabolic Glycoengineering (siehe Kapitel 3.4) mit entsprechenden Linkern versehen werden. Die Synthese der Derivate steht zwischen mehreren Projekten, folgte aber gleichzeitig einer einheitlichen Strategie und wird deshalb in diesem Kapitel gesondert diskutiert.

Wie bereits in den retrosynthetischen Überlegungen diskutiert (siehe Schema 3-1), ist der Schlüsselschritt der Synthesesequenz die stereoselektive Kupplung der beiden Galactoseeinheiten unter Ausbildung eines α -Anomers am Glycosyldonor. Die beiden Monosaccharide wurden hierfür, jeweils ausgehend von peracetylierter Galactose (**14**), unter Anwendung diverser Schutzgruppenmanipulationen vorbereitet.

3.3.1 Synthese der beiden Galactosebausteine

Die Stereoselektivität einer Glycosylierungsreaktion kann durch geschickte Wahl der Substituenten am Donor gesteuert werden, wobei insbesondere die dem anomeren Zentrum benachbarte Gruppe entscheidend ist. Wie bereits in Kapitel 3.2.1.1 (Schema 3-3) diskutiert, führt die Anwesenheit potentieller Elektronenpaardonoren wie Acetylgruppen zu einer anchimeren Assistenz und damit bevorzugt zur Bildung des β -Anomers. Aus diesem Grund wurden Benzylschutzgruppen gewählt, welche keinen solchen Nachbareffekt zeigen.

Als Abgangsgruppe diente ein Thiophenylsubstituent am anomeren Zentrum. Dieser kann unter thermodynamischen Bedingungen mit *N*-Iodsuccinimid (NIS) und Trimethylsilyltriflat (TMSOTf) aktiviert werden, so dass eine α -selektive Kupplung erfolgt. Der Galactosyldonor **9** wurde ausgehend von Pentaacetylgalactose **14** dargestellt (siehe Schema 3-18).^[477]



Schema 3-18: Synthese des thiophenylaktivierten Galactosyldonors **9**.

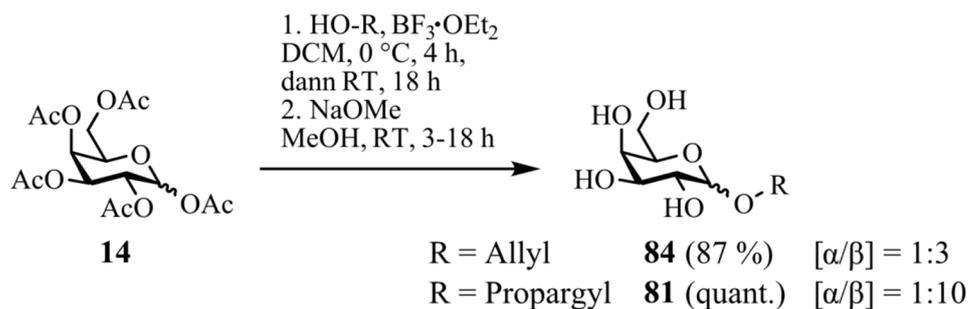
Thiophenol wurde zunächst unter Lewisäurekatalyse galactosyliert, die vier verbliebenen Acetylschutzgruppen unter Zemplén-Bedingungen entfernt. Durch Umsetzung von **83** mit Benzylbromid und Natriumhydrid wurde der funktionalisierte Donor **9** in exzellenter Ausbeute von 93 % über drei Stufen erhalten.

Auch die Vorbereitung der Galactosylakzeptoren für die selektive Kupplung über die

Hydroxylfunktion an Position vier erforderte eine Reihe von Schutzgruppenmanipulationen. Nach der Einführung des gewünschten Linkers am Anomer wurden zunächst die Hydroxylfunktionen an Position vier und sechs durch ein cyclisches Acetal des Benzaldehyds geschützt.^[478] Die verbliebenen beiden Hydroxylfunktionen wurden als Benzylether abgesättigt^[478] und das Benzylidenacetal unter Verwendung des Hydrididondonors Triethylsilan (TES) regioselektiv geöffnet, um die gewünschte Hydroxylgruppe an Position vier zur Kupplung freizugeben (siehe Schema 3-21).^[479]

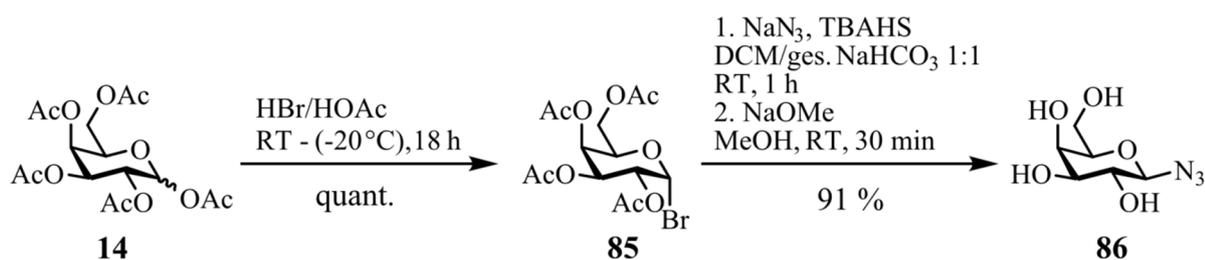
Die Einführung des *N*-Cbz-geschützten Ethanolaminlinkers **18** erfolgte wie in Kapitel 3.2.1.1 beschrieben unter Lewissäurekatalyse mit BF₃-Etherat.

Auch die beiden anderen *O*-glycosidischen Linker, Allyl- und Propargylalkohol wurden in Anwesenheit der Lewissäure glycosyliert.^[478] Im Gegensatz zu Galactose **20** war es hier in beiden Fällen möglich, das Rohprodukt der Reaktion, das bereits Anteile verschiedener partiell deacetylierter Produkte enthielt, ohne vorige Trennung des Gemischs basisch zu entschützen und so die Gesamtausbeute zu steigern. Im Gegenzug wurde allerdings jeweils ein Gemisch des gewünschten β -Anomers mit dem als Minderprodukt entstandenen α -Anomer erhalten (siehe Schema 3-19). Dieses konnte nach der Einführung des verbrückenden Benzylidens zwar einfach säulenchromatographisch getrennt werden, allerdings minderte das Nebenprodukt die Ausbeute entsprechend.



Schema 3-19: Einführung eines Allyl- bzw. Propargyllinkers unter Lewissäurekatalyse.

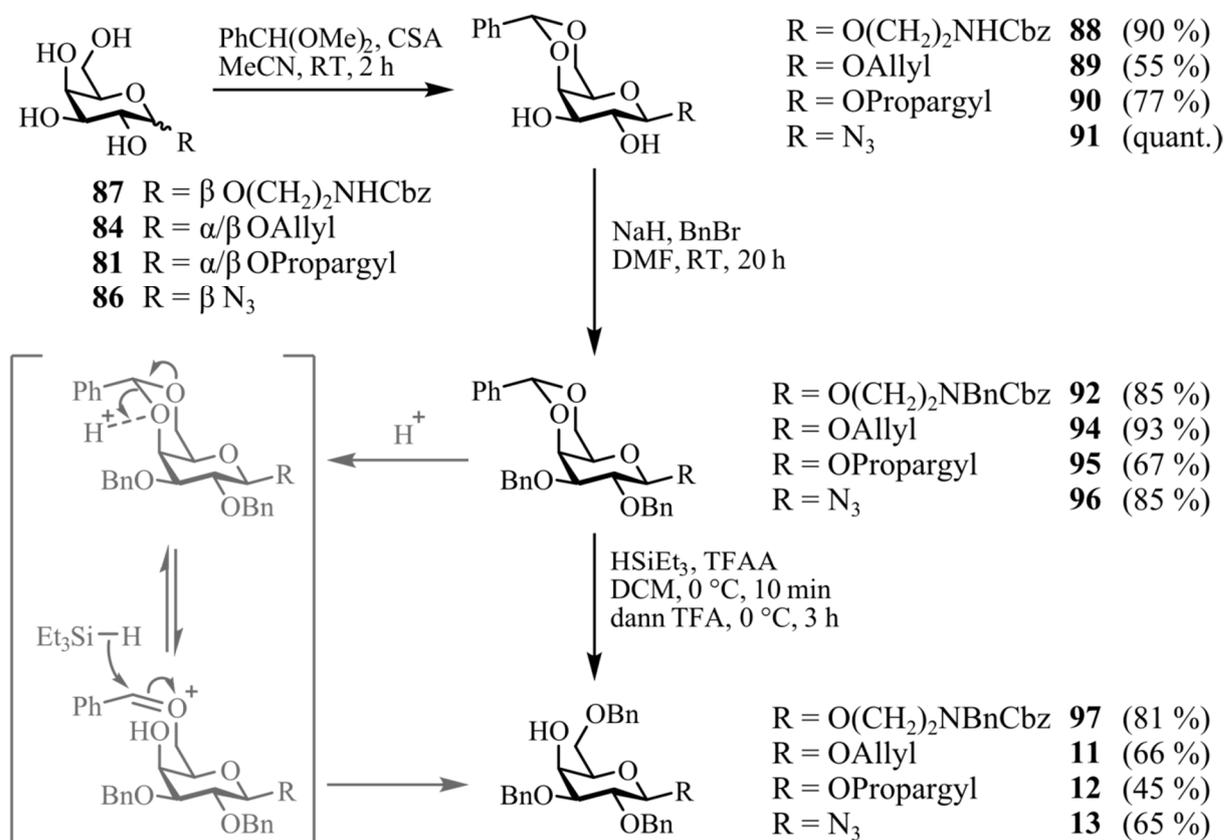
Das Azid wurde dagegen nach Bromierung von Galactose **14** mit HBr in Essigsäure eingeführt. Die Substitution des Bromids erfolgte unter Phasentransferkatalyse mit Tetrabutylammoniumhydrogensulfat (TBAHS) in einem Gemisch von DCM und gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung.^[480-481] Komplettiert wurde die Synthesesequenz durch die basische Deacetylierung unter Zemplén-Bedingungen. Alle drei Schritte lieferten (nahezu) quantitative Ausbeuten, so dass das Galactoseazid **86** in einer Gesamtausbeute von 91 % über drei Stufen isoliert wurde (siehe Schema 3-20).



Schema 3-20: Darstellung der Azidogalactose **86** durch Bromierung und nucleophile Substitution.

Die Hydroxylfunktionen an Position vier und sechs der Galactosederivate wurden durch Umsetzung mit Benzaldehyddimethylacetal unter Säurekatalyse mit Campher-10-sulfonsäure (CSA) regioselektiv geschützt.^[478] Die Gleichgewichtsreaktion ist durch Freisetzung je zweier Moleküle Methanol entropisch getrieben und liefert ausschließlich den spannungsfreien Sechsring unter Einbeziehung von O4 und O6. Die ebenfalls denkbaren Fünfringprodukte über O3 und O4 bzw. O2 und O3 werden dagegen nicht beobachtet. Der Reaktionsfortschritt ließ sich leicht verfolgen, da die Edukte im verwendeten Lösungsmittel Acetonitril jeweils suspendiert vorliegen, während sich die Produkte (mit Ausnahme von **88**) lösen und die Mischung dadurch aufklart. Die Produkte wurden in guten bis sehr guten Ausbeuten erhalten, die allerdings, wie bereits diskutiert, im Fall von **89** und **90** durch Abtrennung des aus der vorhergehenden Reaktion stammenden α -Anomers vermindert wurden.

Die verbliebenen freien Hydroxylfunktionen wurden im Hinblick auf eine einheitliche Schutzgruppenstrategie, die am Ende der Synthese die Anzahl der Entschützungs Schritte minimiert, in Anwesenheit der nichtnucleophilen Base NaH mit Benzylbromid benzyliert. Dabei ist zu beachten, dass auch das Carbamat in **88** acide genug ist, um unter den verwendeten Reaktionsbedingungen deprotoniert zu werden,^[482] so dass der Ethanolaminlinker zusätzlich benzyliert und damit Produkt **92** anstelle von **93** erhalten wurde. Die Reaktion lieferte wie erwartet gute bis sehr gute Ausbeuten, eine Ausnahme bildete nur die propargylsubstituierte Galactose **95**, die mit 67 % Ausbeute hinter den anderen Derivaten zurückblieb. Das Proton des Alkins kann mit einem pK_s-Wert von etwa 25 ebenfalls durch NaH deprotoniert werden, so dass daraus resultierende Nebenreaktionen die Ausbeute schmälern.



Schema 3-21: Synthese der Galactoseakzeptoren **11**, **12**, **13** und **97** mit freier OH-Gruppe an Position vier.

Die regioselektive reduktive Öffnung des Acetals setzte schließlich die gewünschte Hydroxylgruppe zur weiteren Umsetzung mit dem Galactosyldonor **9** frei. Der Hydridonor TES sorgte in Verbindung mit Trifluoressigsäure (TFA) und Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA) für die Öffnung zum O6-Benzylether (siehe Schema 3-21).^[479]

Entscheidend für die Regioselektivität ist der sterische Anspruch der protischen oder Lewis-Säure, die zunächst einen der beiden Acetalsauerstoffe koordiniert. Während große Lewissäuren wie AlCl₃ oder TMSOTf bevorzugt den sterisch weniger gehinderten Sauerstoff an C6 koordinieren, lagern sich Protonen oder kleine Säuren wie BF₃ am elektronenreicheren sekundären O4 an. Entsprechend entstehen die resonanzstabilisierten ringgeöffneten Intermediate mit freier Hydroxylfunktion an C6 bzw. C4; der Hydridonor sorgt schließlich für die Reduktion zum Benzylether (Mechanismus siehe Schema 3-21).^[483-484]

Für alle vier Galactosylakzeptoren wurde ausschließlich der C6-Benzylether isoliert. Bereits Spuren von Wasser sorgen während der Reaktion für eine vollständige saure Hydrolyse des Benzylidenacetals, so dass sorgfältig auf Feuchtigkeitsausschluss geachtet werden muss.

Diskussion der spektroskopischen Daten

In allen Protonenspektren der dargestellten Verbindungen (mit Ausnahme des α -anomeren Bromids **85**) wird das charakteristische Kopplungsmuster der Ringprotonen für die Konfiguration der β -Galactose gefunden: während die ³J-Kopplungen zwischen H1 und H2 bzw. H2 und H3 im Bereich von 7-10 Hz liegen und damit die axial-axiale Stellung der Protonen belegen, werden für H4 zwei deutlich kleinere Kopplungskonstanten (H3-H4: 2.7-3.8 Hz, H4-H5: 0.5-1.4 Hz) beobachtet.

Durch die anomere Substitution der acetylierten Galactose **14** mit Thiophenol verschiebt sich sowohl das Signal des anomeren Protons als auch das des zugehörigen Kohlenstoffs zu höherem Feld (von 5.70 nach 4.58 bzw. 92.31 nach 90.31 ppm). Zusätzlich werden für **83** die Resonanzen der aromatischen Protonen mit zwei Multipletts bei 7.56-7.53 (2H) sowie 7.31-7.21 ppm (3H) sowie der entsprechenden Kohlenstoffe bei 132-128 ppm beobachtet; das Signal bei 136.06 ppm entspricht dem quartären aromatischen Kohlenstoff. Durch die Benzylierung der Positionen zwei, drei, vier und sechs erfahren die betroffenen Ringprotonen, aber auch die Kohlenstoffe einen Tieffeldshift, während die Signale für H1 und H5 bzw. C1 und C5 nahezu unverändert bleiben. Die 20 zusätzlichen aromatischen Protonen resonieren zwischen den beiden beschriebenen Multipletts des Thiophenols bei 7.39-7.27 ppm ebenfalls als Multiplett. Die zahlreichen Dubletts im Bereich von 4.42-4.97 ppm, die jeweils eine große geminale Kopplungskonstante von 10-12 Hz sowie häufig einen starken Dacheffekt aufweisen, können den diastereotopen Protonen der benzyliischen Methyleneinheiten zugeordnet werden.

Die Signale der aromatischen Kohlenstoffe liegen im Bereich von 131-127 ppm, während die quartären Kohlenstoffe der Benzylgruppen mit 138-139 ppm bei leicht niedrigerem Feld resonieren als derjenige der Phenylgruppe. Die Kohlenstoffe der benzyliischen CH₂-Einheiten resonieren im Bereich von 73-76 Hz und werden anhand des umgekehrten Vorzeichens ihres DEPT-Signals zugeordnet.

Die charakteristischen Signale des Allylsubstituenten sowie des *N*-Cbz-Ethanolaminlinkers wurden bereits in den Kapiteln 3.2.2.1 bzw. 3.2.1.1 diskutiert und werden deshalb hier nicht

mehr gesondert aufgeführt. Neu ist dagegen der Propargylsubstituent, dessen terminales Proton bei ca. 2.4 ppm als Dublett von Dublett mit dem Erscheinungsbild eines Triplettts resoniert. Die 4J -Kopplung mit den beiden diastereotopen Methylenprotonen ist mit 2.4-2.5 Hz ungewöhnlich groß, was auf die gute Übertragung der Spin-Spin-Kopplung über die Dreifachbindung zurückzuführen ist. Die Signale der Methylenprotonen erscheinen als zwei nahe beieinander liegende Dubletts von Dubletts zwischen 4.4 und 4.5 ppm mit einer großen geminalen Kopplungskonstante von fast 16 Hz und einem ausgeprägten Dacheffekt. Die Zuordnung der beiden Kohlenstoffe der Dreifachbindung erwies sich dagegen als nicht trivial. Beide liefern im DEPT-Spektrum kein Signal und zeigen im HSQC ein Kreuzsignal zum Alkynylproton, während im HMBC-Spektrum lediglich Kopplungen mit der Methyleinheit zu beobachten sind. Dies ist auf die starke Abweichung der Größe der Kopplungskonstanten $^1J(\text{C-H})$ und $^2J(\text{C-H})$ des sp-hybridisierten Kohlenstoffs von denen eines sp²- oder sp³-hybridisierten zurückzuführen, die der Messmethode zugrunde liegen. Die Aufnahme eines DEPT-Spektrums mit optimierter Resonanzfrequenz kann hier Klarheit schaffen. Zudem zeigt das interne Kohlenstoffatom der Dreifachbindung im ¹³C-Spektrum eine deutlich verringerte Signalintensität. Damit können die Signale bei 79-80 ppm dem internen, die leicht hochfeldverschobenen bei 75-76 ppm dem terminalen Kohlenstoff zugeordnet werden, während der Kohlenstoff der Methyleinheit bei etwa 56 ppm resoniert.

Auch die Einführung des Azids wurde NMR-spektroskopisch sowie massenspektrometrisch verfolgt. Das anomere Proton in **85** erfährt durch die Bromierung gegenüber dem acetylierten Vorläufer **14** eine deutliche Verschiebung ins Tieffeld und resoniert bei 6.70 ppm mit einer für das α -Anomer charakteristischen Kopplungskonstante von 4.0 Hz. C1 wird dagegen leicht hochfeldverschoben und resoniert bei 88.28 ppm. Im Massenspektrum belegt das bereits diskutierte Isotopenmuster des Broms mit einem doppelten Basispeak bei m/z 433 sowie 435 (Molekülion im Natriumaddukt [M+Na⁺]) die Substitution.

Durch die Reaktion mit Natriumazid erfährt das anomere Proton in **98** einen drastischen Hochfeldshift und resoniert bei 4.59 ppm mit einer Kopplungskonstante von 8.7 Hz, was auf eine Inversion des Stereozentrums zum β -Anomer hinweist. Die Verschiebung des anomeren Kohlenstoffs bleibt dagegen nahezu konstant mit einem Signal bei 88.47 ppm. Nach der Deacetylierung verschieben sich die Signale der Ringprotonen tendenziell ins höhere Feld, wobei der Effekt auf die von der Schutzgruppenmanipulation betroffenen Protonen H2, H3, H4 und H6 am deutlichsten zu beobachten ist, dagegen für H1 und H5 nur gering ausfällt. Da die Anwesenheit des Azids im ¹H- und ¹³C-Spektrum nur indirekt durch seinen Einfluss auf die Signale benachbarter Protonen und Kohlenstoffe belegt wird, wurde zudem ein Massenspektrum aufgenommen. Dieses zeigt als Basispeak von **86** bei m/z 228 das Molekülion im Natriumaddukt [M+Na⁺], zudem bei m/z 433 das Dimer des Moleküls, ebenfalls mit Natrium [2M+Na⁺].

Die weiteren Schutzgruppenmanipulationen zur Darstellung der vier Galactosylakzeptoren **97**, **11**, **12** und **13** wurden jeweils analog durchgeführt, so dass sich auch die entsprechenden Spektren stark ähneln – mit Ausnahme der bereits diskutierten Signale der Linker sowie der anomeren Protonen und Kohlenstoffe. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden deshalb die Spektren der propargylsubstituierten Verbindungen **90**, **95** und **12** stellvertretend für jeweils vier Derivate diskutiert.

Die regioselektive Einführung der Benzylidenschutzgruppe als verbrückender Einheit zwischen C4 und C6 kann anhand der Spektrensätze nachgewiesen werden. Im HMBC werden Fernkopplungen zwischen dem Proton des Acetals ($\delta = 5.56$ ppm) sowie C4 und C6 beobachtet, zudem eine Kopplung zwischen H6_a und dem Kohlenstoff des Acetals ($\delta = 101.6$ ppm; siehe Abb. 3-40).

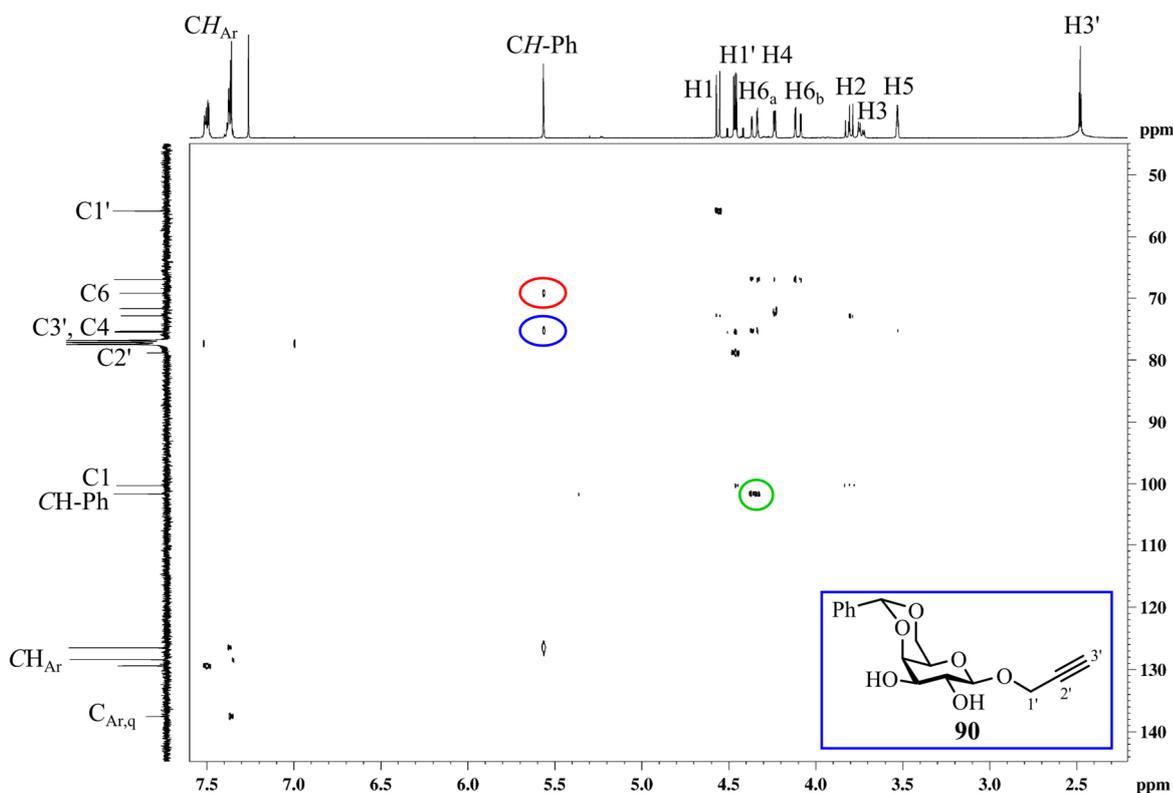


Abb. 3-40: HMBC-Korrelationsspektrum der Propargylgalactose **90**. Die Kreuzsignale zwischen dem Proton des Benzylidens und C4 (blau) und C6 (rot) des Kohlenhydrats sowie H6_a und dem Kohlenstoff des Benzylidens (grün) belegen die regioselektive Einführung der verbrückenden Schutzgruppe.

Die Protonen H4 und H6_{ab} werden zu tieferem Feld verschoben und resonieren als Dubletts von Dubletts bei 4.22 bzw. 4.35 und 4.10 ppm. Durch die konformative Fixierung des Sechsrings wird die freie Drehbarkeit um die C5-C6-Achse aufgehoben, wodurch sich die Kopplungskonstante zwischen H5 und H6_a bzw. H6_b auf 1.6 bzw. 1.9 Hz verringert (zuvor ca. 5 bzw. 7 Hz), während die geminale Kopplungskonstante von 11.5 auf 12.5 Hz ansteigt. Auch die Verschiebungsdifferenz ($\Delta\delta$) der magnetisch nicht äquivalenten Protonen H6_a und H6_b steigt von 0.05 auf 0.25 ppm deutlich an. Die beiden Kohlenstoffe C4 und C6 werden um 5 bzw. 7 ppm tieffeldverschoben, C5 erfährt dagegen einen deutlichen Hochfeldshift von 10 ppm.

Diese Merkmale bleiben auch nach der Benzylierung der beiden freien Hydroxylgruppen an C2 und C3 erhalten, allerdings resonieren auch diese beiden Kohlenstoffe nun im tieferen Feld bei 78.37 bzw. 79.37 ppm (Shift um etwa 6.5 ppm) und zeigen zudem Fernkopplungen zu den benzylichen Methylenprotonen. Diese resonieren im Bereich von 4.74-4.96 ppm als vier Dubletts mit jeweils einer großen geminalen Kopplungskonstante von 10.8 bzw. 12.4 Hz. Zu beachten ist zudem, dass der amidische Stickstoff in **88** ebenfalls benzyliert wird und damit anstelle von zwei neuen Signalsätzen für die Schutzgruppe drei beobachtet werden.

Nach der reduktiven Öffnung des Benzylidenacetals verschwindet das charakteristische Singulett des Protons des Acetals, stattdessen werden im Spektrensatz von **12** drei benzyliche Methylengruppen beobachtet (siehe Abb. 3-41). Diese können anhand ihrer Fernkopplungen im HMBC-Spektrum den Ringpositionen zwei, drei und sechs zugeordnet werden, was die gewünschte Regioselektivität belegt. Auch die Fixierung der Achse C5-C6 wird aufgehoben, so dass die betroffenen Kopplungskonstanten wieder Werte von ${}^3J(\text{H5-H6}_a) = 6.0$, ${}^3J(\text{H5-H6}_b) = 5.9$ Hz sowie ${}^2J(\text{C6}_a\text{-C6}_b) = 9.9$ Hz annehmen. C4 erscheint im Vergleich zur ringgeschlossenen Vorstufe mit 67.05 ppm deutlich hochfeldverschoben, C5 rückt dagegen zurück ins Tieffeld und resoniert bei 73.40 ppm.

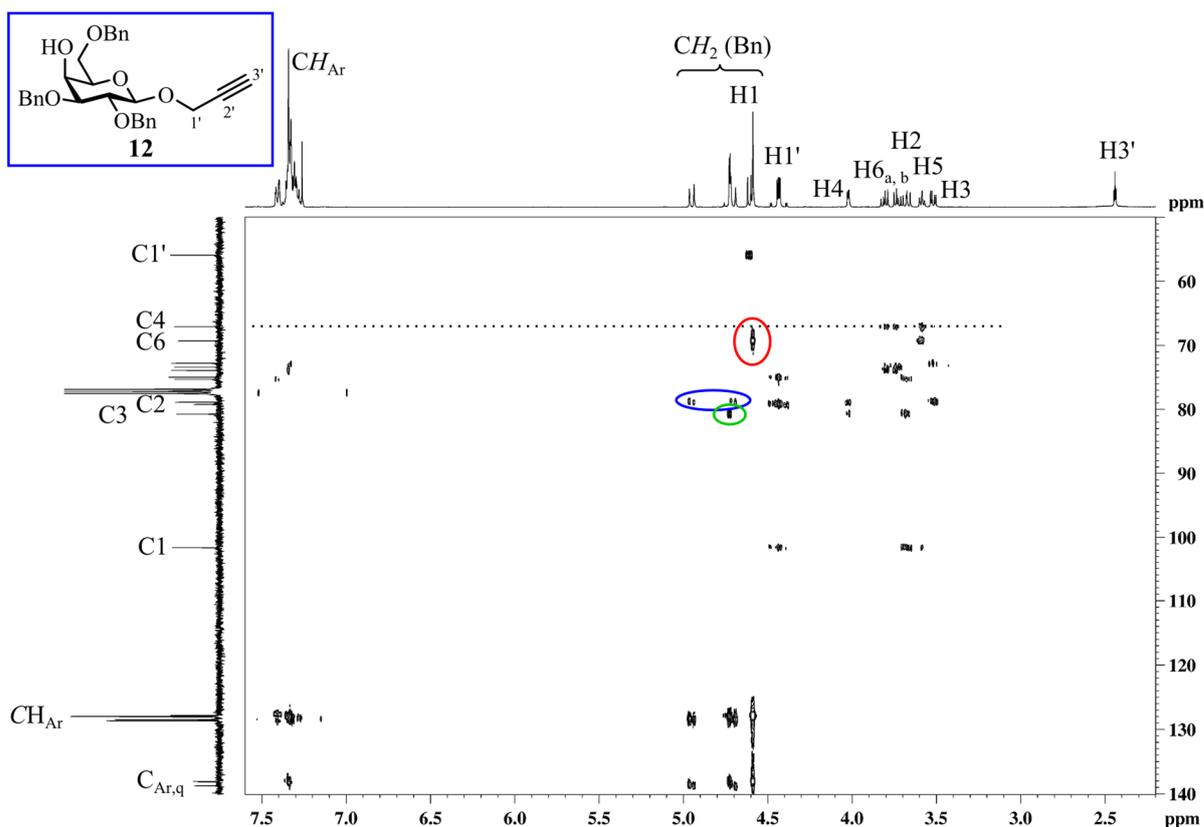
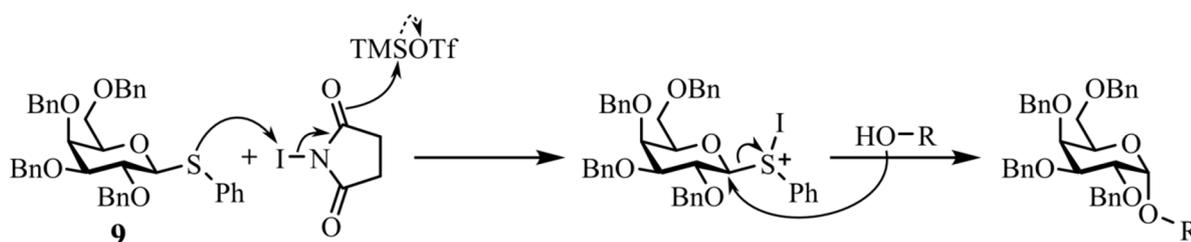


Abb. 3-41: HMBC-Korrelationspektrum des Galactosylakzeptors **12**. Die Regioselektivität der reduktiven Öffnung des Acetals zum O6-Benzylether wird durch die Fernkopplung des Kohlenstoffs C6 mit Protonen einer benzylichen Methyleneinheit (rot) belegt. Die beiden weiteren Benzyleinheiten werden den Positionen zwei (blau) und drei (grün) zugeordnet. Für C4 sind keine Kopplungen zu benzylichen Protonen vorhanden (gestrichelte Linie).

Die Verbindungen **92** und **97** mit Ethanolaminlinker zeigten nur eine sehr geringe Löslichkeit in den verwendeten deuterierten Lösungsmitteln ([d6]DMSO, CDCl₃, MeOD, [d6]Aceton sowie Mischungen daraus), so dass in den Protonenspektren im Allgemeinen stark verbreiterte Signale beobachtet wurden, die die Zuordnung erschwerten. Durch Acetylierung anstelle der Einführung von Benzylgruppen an Position zwei und drei konnte die Löslichkeit in CDCl₃ deutlich gesteigert werden; auch die Zweitfunktionalisierung des Amidstickstoffs wurde so vermieden. Das **97** analoge Derivat eignet sich zur Durchführung der anschließenden Kupplungsreaktion mit Donor **9**, dennoch wurde diese alternative Schutzgruppenstrategie vorerst nicht weiter verfolgt.

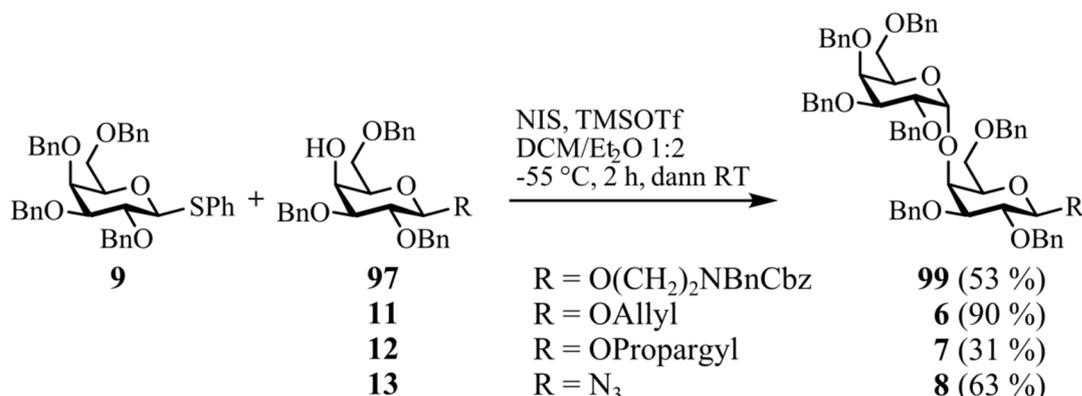
3.3.2 Kupplung zum Disaccharid und Debenzylierung

Die Glycosylierung der Akzeptoren mit **9** erfolgte unter Verwendung von *N*-Iodsuccinimid (NIS) und Trimethylsilyltriflat (TMSOTf) unter thermodynamischen Bedingungen (-55 °C).^[477] Die Lewisäure koordiniert dabei zunächst an einen der beiden Sauerstoffe im Succinimid und erleichtert die Freisetzung eines stark elektrophilen Iodoniumions.^[485] Dieses addiert unter Ausbildung eines aktivierten Glycosylsulfoniumions an den Schwefel des Thiophenyls.^[486] Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist schließlich die Substitution der Abgangsgruppe durch den nucleophilen Akzeptor, so dass bei geeigneter Reaktionsführung ausschließlich das α -verknüpfte Produkt erhalten wird (siehe Schema 3-22).



Schema 3-22: Aktivierung des Thiophenyl donors **9** mit NIS und TMSOTf sowie stereoselektive Glycosylierung eines Akzeptors.

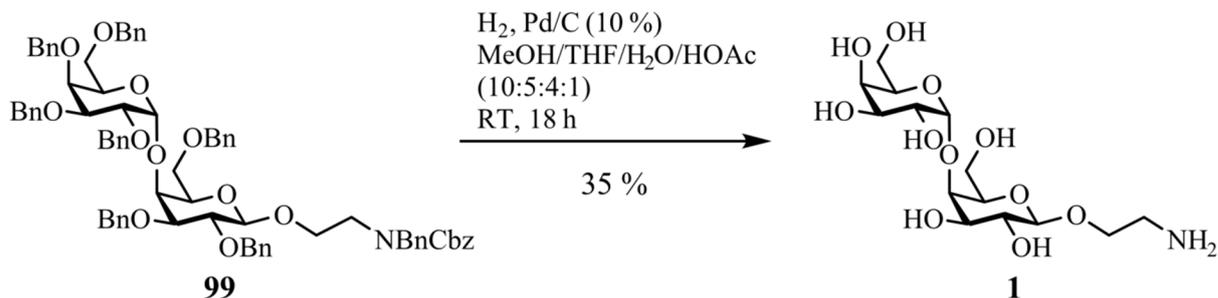
Alle vier Galactosylakzeptoren konnten auf diese Weise erfolgreich glycosyliert werden, so dass die benzylierten Galabiose motive in Ausbeuten von 31 bis 90 % isoliert wurden (siehe Schema 3-23).



Schema 3-23: Kupplung der Galactosylakzeptoren mit Donor **9**.

Die Abspaltung der Schutzgruppen im letzten Schritt erforderte erneut die geschickte Kombination von Reagenzien und Reaktionsbedingungen. Die klassische reduktive Debenzylierung mit Wasserstoff und Pd/C eignet sich nur für Galabiose **99** mit dem Ethanolaminlinker. Dabei wird, wie bereits in Kapitel 3.2.1.1 beschrieben, gleichzeitig die Cbz-Schutzgruppe vom Amin entfernt. Aufgrund der zahlreichen Benzylschutzgruppen und der damit verbundenen starken Polaritätsdifferenz zwischen Edukt und Produkt konnte die Reaktion nicht in einem einzelnen Lösungsmittel durchgeführt werden. Erst in einem Gemisch von Methanol, THF, Wasser und Essigsäure^[487] wurde eine vollständige Umsetzung beobachtet und das gewünschte Produkt **1** isoliert (siehe Schema 3-24). Die Ausbeute blieb mit 35 % weit hinter den Erwartungen zurück. Dies ist zum größten Teil auf Verluste

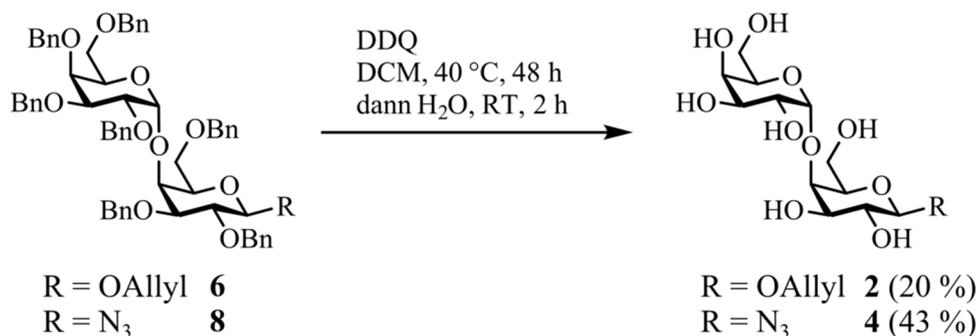
während der aufwändigen Isolierung durch mehrfache Säulenchromatographie zurückzuführen, so dass weiterhin Optimierungspotential besteht.



Schema 3-24: Reduktive Debenzylierung des Galabiosederivats **99** durch katalytische Hydrierung mit Wasserstoff und Pd/C.

Die weiteren Galabiosederivate **6**, **7** und **8** besitzen mit ihren Linkern zusätzliche ungesättigte Funktionen, die ebenfalls potentielle Reaktionsstellen für Reduktionsmittel darstellen. Aus diesem Grund wurde auf oxidative Methoden zurückgegriffen. Als kompatibel mit Mehrfachbindungen wurden unter anderem die Reaktion mit 2,3-Dichlor-5,6-dicyano-1,4-benzochinon (DDQ)^[488] oder Natriumbromat/Natriumdithionit^[489-490] beschrieben.

Beide Methoden wurden erfolgreich zur Darstellung der allyl- sowie azidsubstituierten Derivate **2** und **4** eingesetzt, wobei die Produkte nur nach der Reaktion mit DDQ in DCM aus dem Reaktionsgemisch isoliert werden konnten. Die Ausbeuten blieben mit 20 bzw. 43 % ebenfalls unbefriedigend (siehe Schema 3-25). Möglicherweise kann durch die Verwendung eines polar-unpolaren Lösungsmittelgemischs (etwa DCM/MeOH) auch hier eine ausreichende parallele Löslichkeit von Edukt und Produkt sichergestellt und die Ausbeute gesteigert werden.^[491]



Schema 3-25: Oxidative Debenzylierung der Galabiosederivate **6** und **8** durch Umsetzung mit DDQ.

Der bereits für das Ethanolaminderivat vorgeschlagene Ersatz der beiden Benzylgruppen am Akzeptor gegen Acetylfunktionalitäten ist möglicherweise ebenfalls zielführend. Zwar wird so ein weiterer Reaktionsschritt zur Abspaltung der beiden Schutzgruppen nötig, dennoch verspricht die sukzessive Steigerung der Polarität eine vereinfachte Isolierung der Zielmoleküle.

Nur die propargylsubstituierte Galabiose **3**, deren Vorläufer sich bereits in verschiedenen Reaktionsschritten empfindlich zeigten, konnte mit keiner der beiden Methoden erhalten werden. Denkbar ist hier alternativ die Verwendung von feuchtem Pd(OH)₂/C^[492] oder das Ausweichen auf eine neue Schutzgruppenstrategie. Dabei bieten sich – neben der erwähnten

partiellen Acetylfunktionalisierung – die nahezu identischen Paramethoxybenzylgruppen (PMB) an, die deutlich leichter oxidierbar sind als Benzylether. Die Funktionalisierung zum Galactosylakzeptor wird analog zur in Schema 3-21 beschriebenen Strategie durchgeführt, wobei die Öffnung des stark säurelabilen PMB-Acetals mit Natriumcyanoborhydrid durchgeführt wird.^[493] Die Kupplungsmethode mit NIS und der Lewissäure TMSOTf sollte prinzipiell auch in Gegenwart der labilen PMB-Ether möglich sein, allerdings müssen die Bedingungen sorgfältig gewählt und insbesondere die Lewissäure sehr langsam zugegeben werden.

Führt keine der Alternativen zum Erfolg kann auch auf die von Ohlsson und Magnusson vorgestellte Strategie ausgewichen werden, die zunächst die Kupplung zum Disaccharid durchführten und erst anschließend dessen anomere Position zur Einführung eines Linkers aktivierten.^[477]

Diskussion der spektroskopischen Daten

Die vier dargestellten Disaccharide unterscheiden sich lediglich in ihrem Linker, so dass auch die Protonen- und Kohlenstoff-NMR-Spektren erwartungsgemäß jeweils eine hohe Übereinstimmung untereinander zeigen. Aus diesem Grund werden die Daten der mit Ethanolamin substituierten Verbindung **1** stellvertretend diskutiert.

Im Wesentlichen werden die bereits für die beiden Monosaccharide **9** und **97** beschriebenen Charakteristika auch in den Spektren der Galabiose wiedergefunden. Durch die Kupplungsreaktion verschieben sich lediglich die Signale für H1', C1' und C4 sowie C3' und C5' signifikant. Das Proton H1' resoniert im Vergleich zum Thiophenol **9** deutlich tieffeldverschoben bei 4.96 ppm, wobei die Kopplungskonstante von 4.0 Hz die gewünschte Konfiguration des α -Anomers belegt. C1' erfährt durch die Reaktion ebenfalls einen starken Tieffeldshift um fast 13 ppm und resoniert bei 100.49 ppm, nahe dem Signal des zweiten Anomers C1, das nahezu unverändert bei 103.07 ppm liegt.

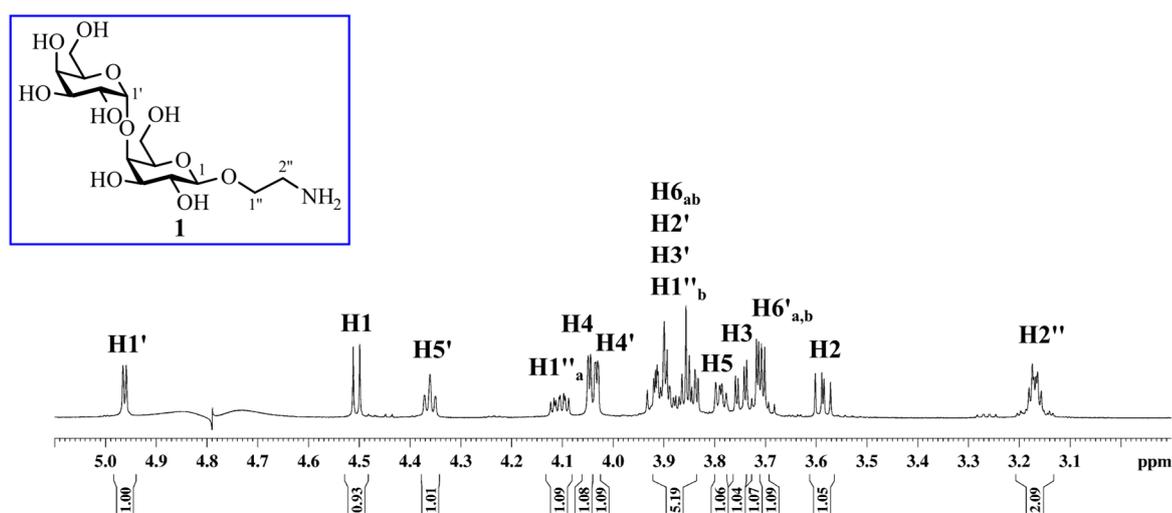


Abb. 3-42: ¹H-NMR-Spektrum der Galabiose **1**. Das Signal der Restprotonen des Lösungsmittels bei 4.79 ppm wurde unterdrückt, was zu Artefakten auf der Basislinie des Spektrums führt.

Die Kreuzsignale der HMBC- sowie NOESY-Spektren belegen ebenfalls die gewünschte Regio- und Stereoselektivität der Kupplung. Neben den Signalen des Kohlenhydratgerüsts

sowie des Linkers werden in der geschützten Vorstufe **99** zudem zahlreiche Benzylgruppen detektiert. Diese bilden auch den wesentlichen Unterschied zwischen den Spektrensätzen von **99** und **1**. Durch die Debenzylierung erfahren lediglich die Protonen und Kohlenstoffe an den Positionen der ehemaligen Benzylether einen Shift, dessen Tendenz bei den Kohlenstoffen in Richtung des höheren Felds, für die Protonen entgegengesetzt ins niedrigere Feld weist.

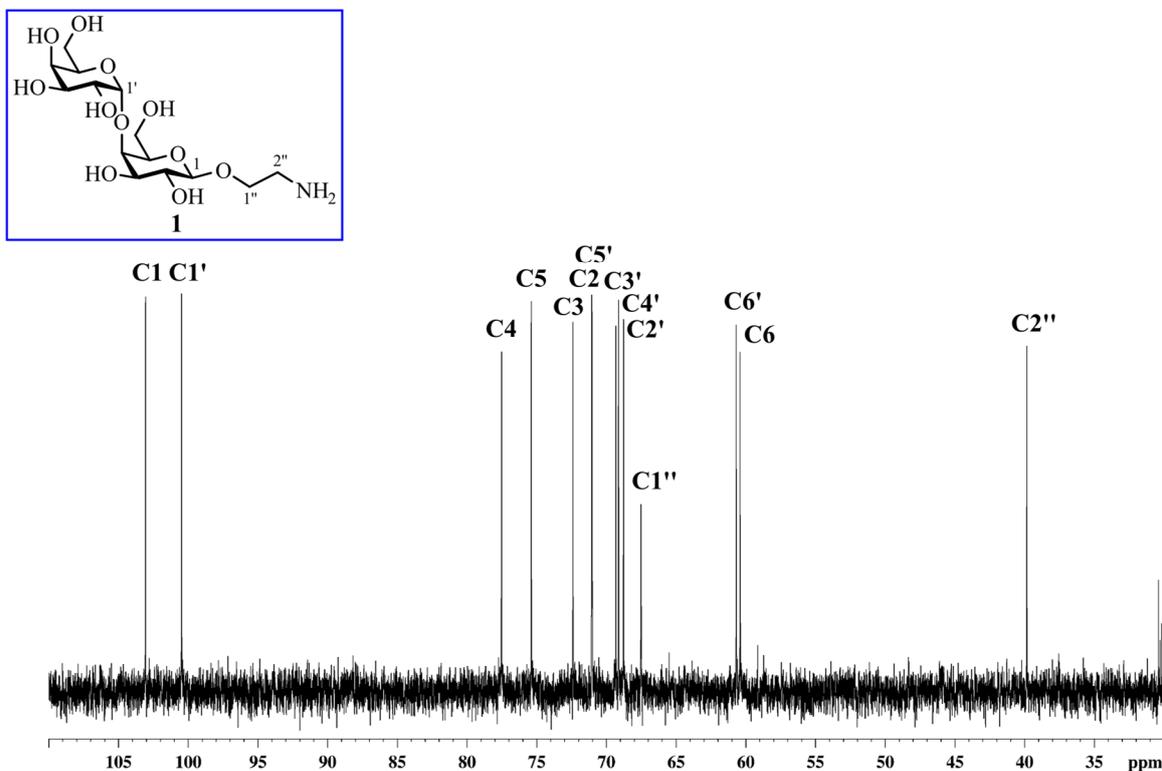


Abb. 3-43: ^{13}C -NMR-Spektrum der Galabiose **1**.

Der Spektrensatz von **99** zeigt zudem eine weitere Besonderheit: Bedingt durch das konformativ labile Stereozentrum am tertiären Amin liegen in der Lösung zwei stabile Diastereomere vor. Dies führt im Protonenspektrum zu stark verbreiterten Signalen, während das ^{13}C -Spektrum zahlreiche Signaldopplungen zeigt.

Der in Kapitel 3.1 vorgestellten Syntheseroute folgend konnten die vier Disaccharide **99**, **6**, **7** und **8** in einer stereoselektiven Kupplungsreaktion ausgehend von Donor **9** und den entsprechend funktionalisierten Akzeptoren dargestellt werden. Die finale Debenzylierung gelang allerdings nur für drei der Verbindungen, so dass die Galabiose mit dem Ethanolamin-**(1)** sowie Allyllinker **(2)** für die Anbindung auf den vorgestellten Arrayformaten sowie folgende Adhäsionsstudien zur Verfügung stehen. Das azidsubstituierte Disaccharid **4** kann mit Hilfe der Clickreaktion gezielt weiter funktionalisiert oder aber nach Metabolic Glycoengineering (siehe Kapitel 2.4 sowie 3.4) auf alkinmodifizierten Zellen installiert werden, so dass potentiell höher affine Verbindungen erhalten werden und Adhäsionsstudien auch auf lebenden Zellen möglich sind.

3.4 Kohlenhydrate auf Zelloberflächen: Metabolic Glycoengineering

Biologisch relevante Erkennungsprozesse auf Oberflächen zeigen eine starke Abhängigkeit von Dichte, Zusammensetzung und dreidimensionaler Präsentation der beteiligten Bindungspartner. Wichtig für die Zell-Zell-Kommunikation, aber auch Adhäsionsprozesse sind dabei komplexe Glycane sowie ihre Pendants, die kohlenhydratbindenden Proteine.

Mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Lectinen oder Antikörpern können Glycane auf Zelloberflächen^[100, 494] und Geweben^[98, 495] räumlich aufgelöst nachgewiesen werden, allerdings nur in Form qualitativer Übersichten. Die Quantifizierung und Bestimmung der Dichte der Bindungsmotive ist durch die Größe der verwendeten Proteine limitiert. So wird maximal die dichtestmögliche Oberflächenbelegung der Proteine, nicht aber die der ihnen zugrundeliegenden Kohlenhydrate detektiert. Zusätzlich ist die Signalintensität stark von der Bindungsaffinität des beobachteten Komplexes abhängig.

Das Metabolic Glycoengineering (siehe Kapitel 2.4) erlaubt dagegen die Markierung auf Einzelmolekülbasis, allerdings nur mit grober Differenzierung der Glycane nach ihrem metabolischen Ursprung (siehe Schema 2-3). Zusätzlich kann mit Hilfe dieser Technik die Oberfläche lebender Zellen gezielt modifiziert und der Einfluss definierter Bindungsmotive auf Erkennungsprozesse untersucht werden.

3.4.1 Synthese der clickbaren Kohlenhydrate

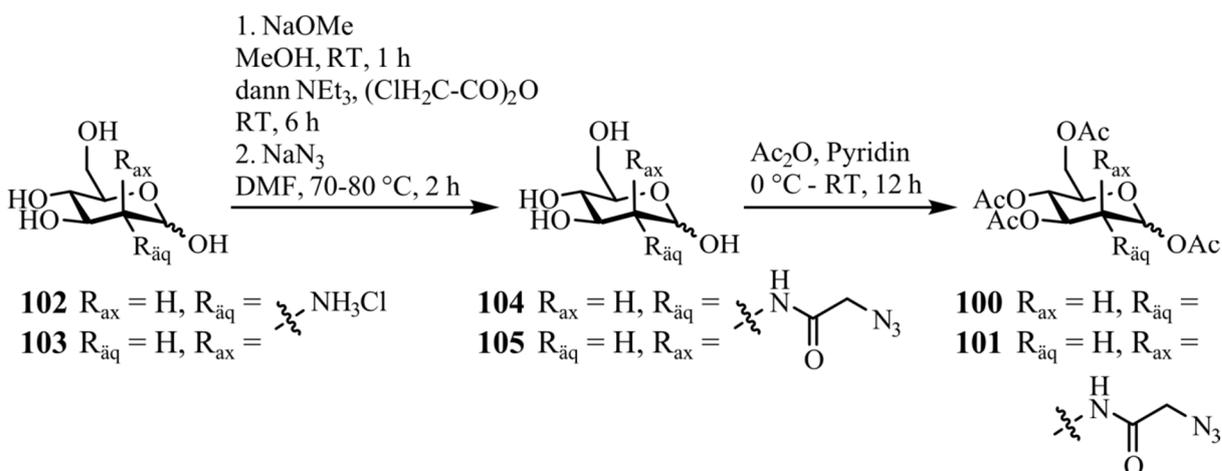
Zur Durchführung eines Metabolic Glycoengineerings werden zunächst zwei Molekülklassen benötigt: der Reporter, der eine bioorthogonale chemische Modifikation trägt und über den Stoffwechsel der Zelle ins Glycom integriert wird sowie eine Sonde mit adäquater Funktionalisierung zur Reaktion mit dem Reporter, die den selektiven Nachweis (z.B. mittels Fluoreszenzmikroskopie) erlaubt (siehe Abb. 2-18).

In der vorliegenden Arbeit wurden Azidoanaloge der Monosaccharide *N*-Acetylglucosamin und *N*-Acetylmannosamin verwendet, die die Reportergruppe in der Acylseitenkette tragen und bereits vielfach im Metabolic Glycoengineering eingesetzt wurden (siehe Kapitel 2.4).

Die Synthese der acetylierten Derivate Ac₄GlcNAz (**100**) und Ac₄ManNAz (**101**) erfolgte in Anlehnung an Protokolle von Bernardin *et al.*^[496] sowie Saxon und Bertozzi^[284] ausgehend von den Hydrochloriden der jeweiligen ungeschützten Aminozucker **102** bzw. **103** (siehe Schema 3-26). Diese wurden zunächst mit Natriummethanolat zum freien Amin deprotoniert, anschließend erfolgte die nucleophile Substitution mit Chloressigsäureanhydrid. Das instabile Intermediat wurde umgehend mit Natriumazid weiter umgesetzt und die Azidoacetylderivate **104** bzw. **105** erhalten. Ihre Isolierung aus dem Rohprodukt erwies sich aufgrund der hohen Polarität der Derivate als schwierig und war nur mit sehr hohen Ausbeuteverlusten möglich. Aus diesem Grund wurde die Reaktionsmischung mittels Säulenfiltration lediglich von unlöslichen Bestandteilen abgetrennt und der Rückstand vollständig acetyliert. Die peracetylierten Azidoanaloge wurden jeweils als Anomerengemische in Ausbeuten von 31 (Ac₄GlcNAz, α/β 2:1) bzw. 56 % (Ac₄ManNAz, α/β 2.5:1) über drei Stufen isoliert.

Obwohl die von Laughlin und Bertozzi vorgestellte alternative Syntheseroute mittels Substitution mit Azidoessigsäureanhydrid^[497] deutlich bessere Ausbeuten (meist über

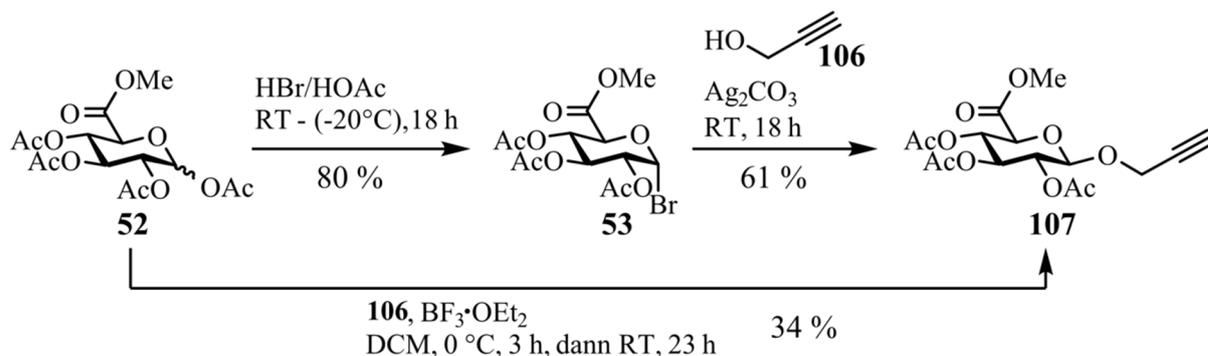
90 %^[293]) liefert, wurde aufgrund der hohen Explosionsgefahr des benötigten Reagenzes darauf verzichtet.



Schema 3-26: Synthese der acetylierten Azidoanaloga Ac₄GlcNAz (**100**) und Ac₄ManNAz (**101**).

Grundlegende Studien zum Metabolic Glycoengineering sollten mit fluoreszenzmarkierten Alkinen durchgeführt werden, deren Konjugation leicht mikroskopisch nachgewiesen werden kann. Im weiteren Verlauf der Projekte sollten aber auch neuartige Glycotope auf den Zellen präsentiert werden, um ihren Einfluss auf Interaktionsprozesse in der natürlichen Umgebung zu untersuchen. Weiterhin sollte die Polarität der Oberfläche moduliert werden, um so positive bzw. negative Überschussladungen zu erzeugen. Diese sind auch in der extrazellulären Matrix vorhanden, wo sie die Stabilität und Aktivität extrazellulärer Faktoren beeinflussen.^[498]

Als anionischer Vertreter wurde deshalb das Monosaccharid Glucuronsäure, das auch in zahlreichen Strukturen der extrazellulären Matrix vorkommt,^[499] mit einem Propargyllinker für die Clickreaktion versehen. Analog zur Reaktion mit Allylalkohol (siehe Schema 3-14) wurde der Propargylalkohol in einer Königs-Knorr-Reaktion durch Substitution des anomeren Bromids **53** eingeführt. Die direkte Glycosylierung durch den acetylierten Vorläufer **52** unter Lewisäurekatalyse (vgl. Schema 3-3) gelingt ebenfalls, allerdings bleibt die Ausbeute der einstufigen Synthese mit 34 % deutlich hinter der der zweistufigen Sequenz (49 %) zurück (siehe Schema 3-27).



Schema 3-27: Zwei- bzw. einstufige Synthese der Propargylglucuronsäure **107**.

Die Abspaltung der Schutzgruppen erfolgte ebenfalls analog zur Allylverbindung unter Zemplén-Bedingungen^[395] sowie anschließender Behandlung mit wässriger Natronlauge. Die funktionalisierte Glucuronsäure **82** konnte in nahezu quantitativer Ausbeute (98 % über zwei Stufen) isoliert werden konnte.

Diskussion der spektroskopischen Daten

Die Charakteristika der NMR-Spektren der Glucuronsäure sowie des Propargyllinkers wurden bereits anhand analoger Verbindungen in den Kapiteln 3.2.2.1 und 3.3.1 diskutiert und werden deshalb hier nicht erneut aufgegriffen.

Die Azidoanaloga Ac₄GlcNAz und Ac₄ManNAz liegen jeweils als Anomerengemisch vor, so dass in den Spektren jeweils doppelte Signalsätze beobachtet werden. Die anomeren Protonen des Glucosederivats **100** resonieren bei 6.21 (H1_α, ³J = 3.7 Hz) bzw. 5.79 ppm (H1_β, ³J = 8.7 Hz) und werden anhand der Größe ihrer Kopplungskonstante den jeweiligen Stereoisomeren zugeordnet. Im Bereich von 5.14-5.30 ppm schließen sich die Protonen H3 und H4 an, die jeweils zwei große axiale-axiale Kopplungen um 10 Hz zeigen. H2_α und H2_β, die bei 4.45 bzw. 4.21 ppm resonieren besitzen dagegen mit dem amidischen Proton (verbreitertes Dublett bei 6.41 bzw. 6.38 ppm) einen dritten Kopplungspartner und zeigen die Struktur eines Dublett von Dublett von Dublett. Charakteristisch sind zudem die beiden Singulett mit einem Integral von zwei, die bei 3.93 bzw. 3.91 ppm auftreten; sie werden der Methyleninheit der amidischen Seitenkette zugeordnet.

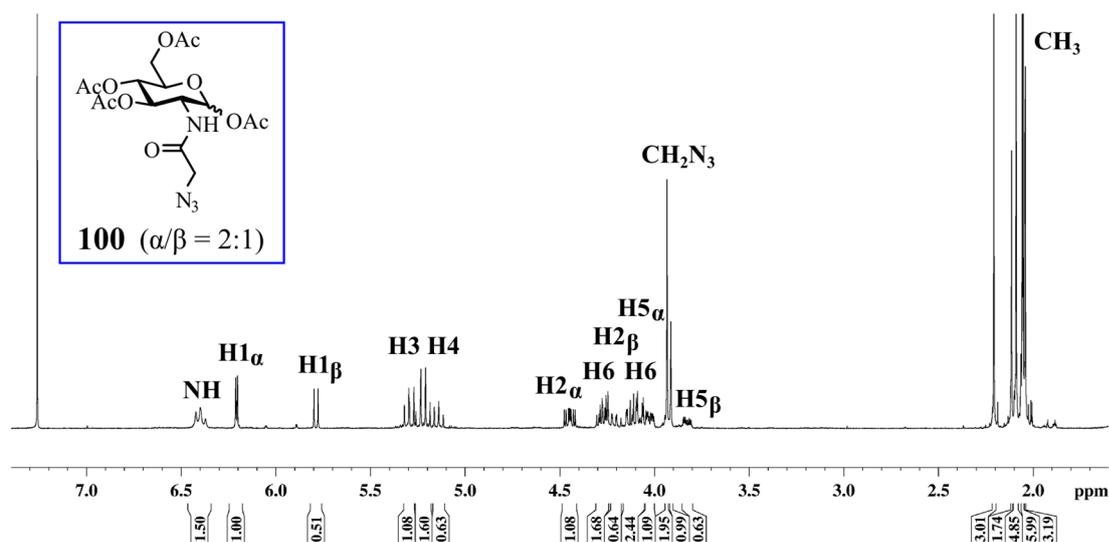


Abb. 3-44: ¹H-NMR-Spektrum des Azidoanaloges Ac₄GlcNAz. Der Zucker liegt als Gemisch der beiden Anomere vor.

Die entsprechenden Kohlenstoffe der CH₂-Gruppe resonieren bei 52.62 bzw. 52.76 ppm in enger Nachbarschaft der Kohlenstoffe C2. Etwa 10 ppm weiter tieffeldverschoben sind die Signale der CH₂-Gruppen C6 zu finden, denen sich erneut im Abstand von etwa 10 ppm die Signale für C3, C4 und C5 anschließen. Die anomeren Kohlenstoffe C1_α und C1_β resonieren mit einem weiteren deutlichen Tieffeldshift bei 92.40 bzw. 90.44 ppm. Flankiert wird das Spektrum am linken Rand von den Signalen der Carbonylkohlenstoffe um 170 ppm, am rechten Rand dagegen von den Signalen der Methylgruppen um 21 ppm (siehe Abb. 3-45).

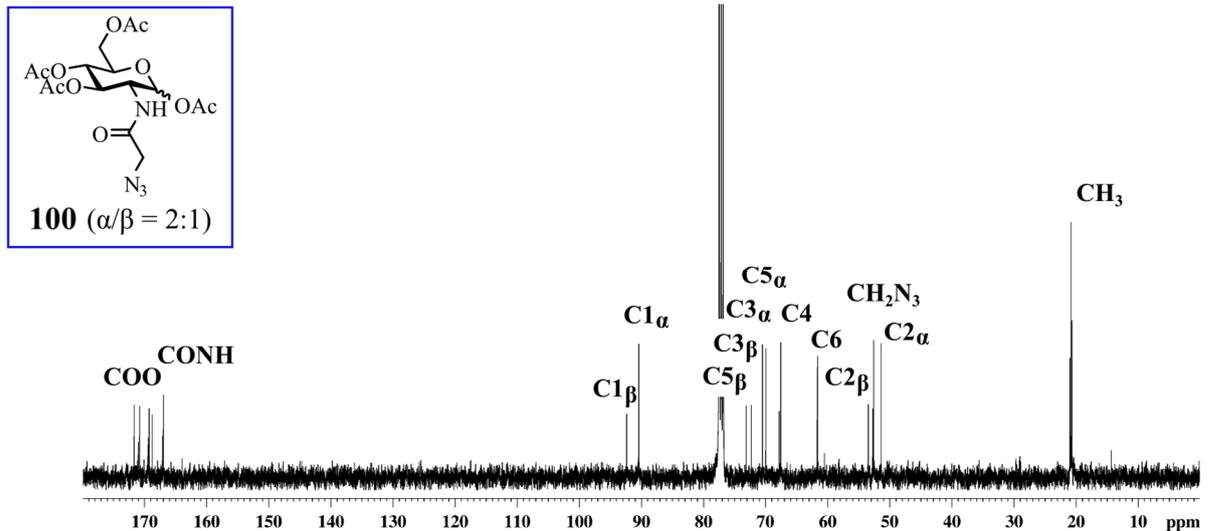


Abb. 3-45: ^{13}C -NMR-Spektrum des Azidoanalogs Ac_4GlcNAz . Der Zucker liegt als Anomerengemisch vor.

Vergleichbare Signale werden auch für das Mannosederivat **101** beobachtet. Die beiden anomeren Protonen H1_α und H1_β resonieren bei 6.04 bzw. 5.88 ppm und zeigen, bedingt durch die äquatoriale Position des benachbarten H2 , deutlich kleinere Kopplungskonstanten von 1.9 bzw. 1.7 Hz. Die zugehörigen Signale der Kohlenstoffe C1_α und C1_β treten ebenfalls im Tieffeld bei 91.48 bzw. 90.43 ppm auf.

3.4.2 Glycoengineering eukaryotischer Zellen

Verschiedene eukaryotische Zelllinien wurden in Anwesenheit der Azidoanaloga Ac_4GlcNAz bzw. Ac_4ManNAz kultiviert und der erfolgreiche Einbau der Azidfunktion in Glycane der Zelloberfläche durch Clickreaktion mit alkinmodifizierten Fluoreszenzfarbstoffen nachgewiesen (siehe Kapitel 2.4, Schema 2-3 sowie Abb. 2-18).

Die Bedingungen für die kupferkatalysierte Reaktion auf der Oberfläche lebender Zellen wurden von *Marcus Gutmann* und *Sebastian Letschert* hinsichtlich Zellviabilität und Signal-Hintergrundverhältnis optimiert.^[500-501] So genügt bereits eine relativ kurze Inkubationsdauer von fünf Minuten für eine stabile und selektive Färbung der Zellmembran (belegt durch FACS-Analyse und konfokale Fluoreszenzmikroskopie). Zudem werden in Anwesenheit des polaren, stabilisierenden Liganden Tris[(1-hydroxypropyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin (THPTA, siehe Abb. 2-19) Kupferkonzentrationen von bis zu 200 μM auch über einen längeren Zeitraum von den Zellen toleriert.^[500-501] Erst bei einer Inkubationszeit von mehr als 20 min wurden deutliche Membranschäden sowie ein stark reduzierter Zellstoffwechsel detektiert. Durch die Bedingungen der Clickreaktion induzierte Langzeitschäden wurden anhand der Verfolgung verschiedener Apoptosemarker ebenfalls ausgeschlossen.^[500]

Die mit einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop erhaltenen Aufnahmen der Zellen zeigen allerdings nur eine gleichmäßige und diffuse Fluoreszenz der Membran (siehe Abb. 3-46). Dichte und Verteilung der markierten Glycane werden nicht sichtbar. Dies ist der Wellennatur des Lichts geschuldet, die für eine beugungslimitierte Auflösungsgrenze von etwa 200 nm sorgt.^[376] Zwei Punkte, die dichter beieinander liegen werden nicht mehr isoliert aufgelöst sondern liefern nur ein gemittelt Signal. Organisierte Membrandomänen, die für

eine Reihe von Lipiden und Proteinen bereits nachgewiesen wurden und zahlreiche biologische Funktionen erfüllen, sind allerdings meist deutlich kleiner. Ihre Größenordnung liegt im Bereich von etwa 10-200 nm.^[502-504]

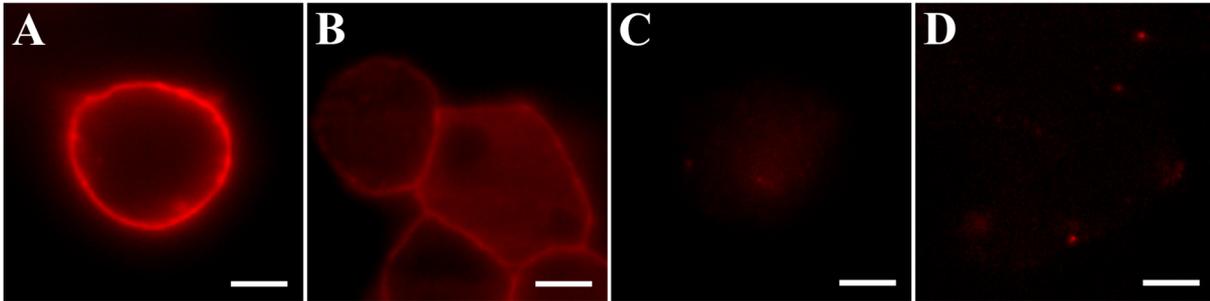


Abb. 3-46: Nachweis der durch Metabolic Glycoengineering mit Ac₄GlcNAz auf der Membran von Neuroblastomazellen (SK-N-MC) installierten Azidfunktionen mittels kupferkatalysierter Clickreaktion mit Alexa647-Alkin. A) Unter Standardbedingungen (20 µM Alkin, 50 µM CuSO₄, 250 µM THPTA, 2.5 mM Natriumascorbat, 5 min) geklickt zeigt die Membran eine intensive Fluoreszenz. Die unter Verzicht auf THPTA (B), Kupfersulfat (C) sowie den Azidozucker (D) durchgeführten Kontrollen zeigen nur eine mäßige bis vernachlässigbare Signalintensität. Die Aufnahmen wurden von Sebastian Letschert zur Verfügung gestellt (Skalierung 5 µm).^[505]Fehler! Hyperlink-Referenz ungültig.

Die Kenntnis der räumlichen Verteilung von Membranglycanen auf molekularer Ebene verspricht ein vertieftes Verständnis verschiedener auf Kohlenhydratinteraktionen beruhender Erkennungsprozesse, etwa in Infektionen und malignen sowie autoimmunen Erkrankungen.^[506-507]

Die Auflösung und Darstellung derart kleiner Strukturen gelingt mit Hilfe spezieller Mikroskopieverfahren, die das Beugungslimit als intrinsische Schranke durch den Einsatz deterministischer oder stochastischer Methoden umgehen. Auf diese Weise wird die Hochauflösung bis hin zum Nachweis einzelner Moleküle möglich.^[508-509]

Deterministische Methoden wie die von Hell⁵ entwickelte STED (*stimulated emission depletion*)^[511] sowie GSD (*ground state depletion*)^[512] sorgen durch die Überlagerung zweier Lichtpulse für eine starke Fokussierung des Anregungsstrahls, mit dem die Oberfläche rasterartig untersucht wird. Das zusammengesetzte Bild ist damit nicht mehr von der Beugungsgrenze sondern dem erzielten Radius des Anregungsstrahls in seiner Auflösung begrenzt, so dass die Abbildung von Strukturen im einstelligen Nanometerbereich möglich wird.^[513] Die stochastischen Methoden SPDM (*spectral precision distance microscopy*),^[514] (f)PALM (*(fluorescence) photo activated localization microscopy*)^[515-516] oder (d)STORM (*(direct) stochastic optical reconstruction microscopy*)^[377-378, 517] erlauben dagegen die Aufnahme größerer Bildausschnitte im Weitfeld. Einzelne Fluorophore werden statistisch verteilt zur Emission angeregt und somit zeitlich isoliert und lokalisiert. Das Gesamtbild ergibt sich schließlich durch Überlagerung vieler tausend Einzelaufnahmen.

Exkurs: dSTORM

Für eine hochaufgelöste dSTORM-Aufnahme können zahlreiche konventionelle Fluoreszenzfarbstoffe (z.B. der AlexaFluor- oder ATTO-Reihe) verwendet werden. Eine grundlegende Voraussetzung ist ihre (Foto)Schaltbarkeit, sie müssen also sowohl einen

⁵ 2014 gemeinsam mit Eric Betzig und William Moerner für die Entwicklung der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet.^[510]

fluoreszierenden („an“) als auch einen stabilen nichtfluoreszierenden („aus“) Zustand besitzen. Zudem dürfen zu jedem Zeitpunkt der Messung nur wenige isolierte Fluorophore eine Emission zeigen. Eine Möglichkeit zur experimentellen Realisierung ist in Abb. 3-47C dargestellt: Durch Einstrahlung von Licht wird der Fluorophor vom Grundzustand 1F_0 in den ersten angeregten Zustand 1F_1 angehoben. Von dort kann er entweder unter Emission eines Photons (k_{fl}) in den Grundzustand zurückkehren oder durch Intersystem Crossing (k_{ISC}) den energieärmeren Triplettzustand 3F_1 besetzen. Von dort ist der strahlende Übergang in den Grundzustand spinverboten, wird aber durch Wechselwirkung mit Sauerstoff ermöglicht. In sauerstofffreier reduzierender Umgebung, die Thiole wie β -Mercaptoethanol enthält, wird durch Reduktion zum stabilen Radikalanion $F^{\cdot-}$ (k_{red}) die Lebensdauer des „aus“-Zustands massiv verlängert, so dass sich nahezu alle Fluorophore dort befinden. Der Grundzustand 1F_0 kann entweder durch Oxidation (k_{ox}) oder Einstrahlung ins Absorptionsmaximum von $F^{\cdot-}$ ($\lambda_{max} \approx 350-550 \text{ nm}$)^[518] gezielt repopuliert werden.

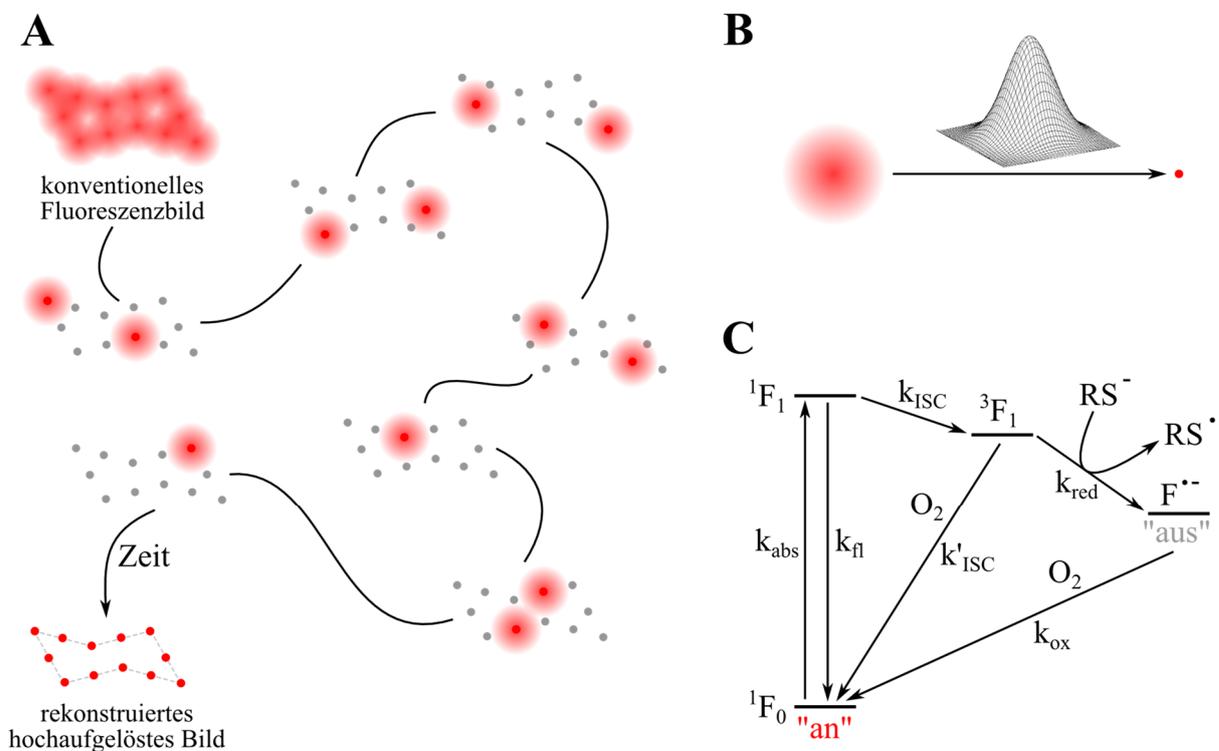


Abb. 3-47: Prinzip der Erzeugung hochauflösender Bilder mittels *d*STORM. Die sich räumlich überlagernden Signale der einzelnen Fluorophore werden zeitlich getrennt voneinander detektiert. Aus zahlreichen Einzelaufnahmen kann so das hochauflösende Bild rekonstruiert werden (A). Zu diesem Zweck wird der Ursprung jedes einzelnen Fluoreszenzsignals mit Hilfe einer zweidimensionalen Gaußfunktion lokalisiert (B). Die Messungen werden unter sauerstofffreien, reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass sich zu jedem Zeitpunkt der Großteil der Fluorophore in einem nichtfluoreszierenden „aus“-Zustand (grau) befindet und nur ein geringer Anteil zur Fluoreszenz angeregt werden kann (C). Darstellung modifiziert nach van de Linde *et al.*^[378]

Auf diese Weise sind zu jedem Zeitpunkt nur wenige, räumlich getrennt detektierbare Fluorophore aktiv (siehe Abb. 3-47A). Der Ursprung jedes einzelnen Fluoreszenzsignals wird mit Hilfe einer zweidimensionalen Gaußfunktion lokalisiert und die hochauflösende Aufnahme schließlich durch Addition zahlreicher Einzelbilder (typischerweise 10.000-20.000 Bilder, aufgenommen mit einer Rate von ca. 50 Hz) erzeugt. So wird eine Auflösung im niedrigen zweistelligen Nanometerbereich (10-20 nm) erzielt, die lediglich durch die

Präzision des Lokalisationsalgorithmus sowie die laterale Mobilität der Fluorophore beschränkt wird.

Die Arbeiten zur Fluoreszenzmarkierung und hochauflösenden Mikroskopie von Zelloberflächenglycanen wurden von *Sebastian Letschert* durchgeführt und beschrieben.^[505] Die Ergebnisse werden deshalb hier nur kurz aufgegriffen.

Humane Neuroblastomazellen (SK-N-MC) wurden mit den Azidoanaloga Ac₄GlcNAz, Ac₄ManNAz bzw. Ac₄GalNAz inkubiert und unter optimierten Bedingungen mit alkinmodifiziertem Alexa647 geklickt. Die Zellen zeigten jeweils eine homogene Verteilung der markierten Zucker über die gesamte Basalmembran; im Gegensatz zu bekannten Membranproteinen wurde keine Clusterbildung beobachtet.

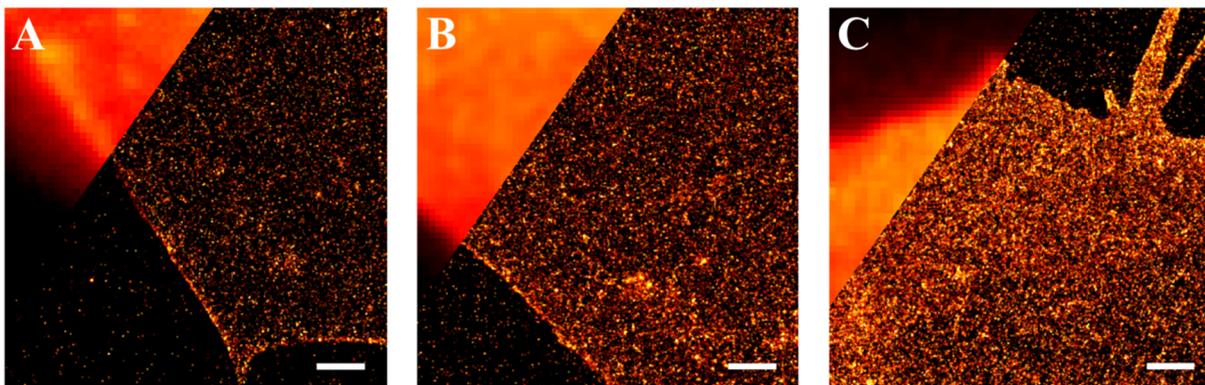


Abb. 3-48: Konventionelle Weitfeldfluoreszenzaufnahme (linke obere Ecke) sowie hochauflösende dSTORM-Darstellung der Basalmembran von Neuroblastomazellen (SK-N-MC) nach Inkubation mit A) Ac₄GlcNAz, B) Ac₄ManNAz bzw. C) Ac₄GalNAz sowie Clickreaktion mit alkinmodifiziertem Alexa647. Für alle drei Kohlenhydrate wird eine homogene Verteilung der Fluoreszenzlokalisierungen beobachtet, ihre Dichte unterscheidet sich allerdings deutlich. Die Aufnahmen wurden von *Sebastian Letschert* zur Verfügung gestellt (Skalierung 1 μm).^[505]

Aus den hochaufgelösten Aufnahmen konnte die Gesamtanzahl der Einzelmoleküllokalisierungen bestimmt und damit die Dichte der Glycane abgeschätzt werden. Diese zeigt eine starke Abhängigkeit vom eingesetzten Monosaccharid, wobei für Ac₄GalNAz mit etwa 1500-1700 Lokalisationen/ μm^2 die höchste Dichte beobachtet wurde. Ac₄GlcNAz und Ac₄ManNAz zeigten mit ca. 600 bzw. 1100 Lokalisationen/ μm^2 einen erheblich geringeren Labelgrad. Dies deutet auf verschiedene metabolische Zielstrukturen der drei Monosaccharide hin und spiegelt zudem die Zusammensetzung der Glycokalyx der Neuroblastomazellen.^[519] So wird Ac₄GlcNAz bevorzugt in intrazelluläre O-Glycane integriert und deshalb möglicherweise zu einem geringeren Anteil auf der Membran wiedergefunden, während Ac₄ManNAz und Ac₄GalNAz zahlreiche Membranproteine und -lipide adressieren. Damit beinhalten die Aufnahmen keine Informationen über die exakte Struktur der markierten Glycane, sondern erlauben nur eine grobe Klassifizierung. Eine zusätzliche Differenzierung von Subgruppen ist durch Inkubation mit verschiedenen fluoreszenzmarkierten Lectinen in Mehrfarbenexperimenten^[520-521] zu erwarten.

Die genaue Kenntnis der Oberflächenstruktur der (krankhaft veränderten) Zellen würde neue diagnostische sowie therapeutische Möglichkeiten auf Glycanebene eröffnen.^[35, 522-523] Gewebe könnten so möglicherweise selektiv angesteuert,^[345] aber auch durch die gezielte Modifikation der Glycokalyx von außen in ihren Signalwegen^[524] und Adhäsionseigenschaften beeinflusst werden.

Die Konjugation therapeutischer Proteine (Wachstumsfaktoren) mittels Metabolic Glycoengineering könnte ein interessanter Ansatzpunkt zur Steuerung ihrer Langzeitwirkung sein.

3.4.3 Glycoengineering prokaryotischer Zellen

Nicht nur die Glycokalyx eukaryotischer Zellen kann durch das Metabolic Glycoengineering gezielt beeinflusst werden. Auch Glycane der prokaryotischen Zellwand wurden bereits mit entsprechend funktionalisierten Kohlenhydratanaloga adressiert (siehe Kapitel 2.4). Eine Differenzierung gegenüber Eukaryoten ist durch die geschickte Wahl der verwendeten Saccharide möglich, indem entweder ausschließlich prokaryotisch vorkommende Strukturen wie 3-Desoxy-D-manno-oct-2-ulopyranosonsäure (Kdo, siehe Abb. 2-6) adressiert oder aber Unterschiede der Aufnahme- und Metabolisierungseffizienz genutzt werden.

Mit dem Ziel, durch den Eingriff in die Zelloberfläche von Bakterien auch deren Adhäsionseigenschaften, wichtige Parameter in Kolonisierungs- und Infektionsprozessen, zu beeinflussen, wurde die Eignung verschiedener Gram-positiver sowie Gram-negativer Bakterienspezies für das Metabolic Glycoengineering untersucht. Hierfür wurden Analoga des *N*-Acetylglucosamins verwendet, da dieses Monosaccharid in zahlreichen bakteriellen Zellwandglycanen, unter anderem dem Peptidoglycan, gefunden wird (siehe Kapitel 2.1).

Als Modellorganismen dienten *S. aureus* als Vertreter der Gram-positiven sowie *E. coli* als Gram-negatives Bakterium. Sie wurden in Gegenwart der Azidoanaloga Ac₄GlcNAz (**1**) bzw. GlcNAz sowie der Grundverbindung GlcNAc kultiviert und anschließend unter Kupferkatalyse mit dem alkinmodifizierten Fluoreszenzfarbstoff Tetramethylrhodamin (TAMRA) geklickt.

Während für *E. coli* keinerlei Färbung erkennbar war, konnte *S. aureus* unter Verwendung von GlcNAz, nicht aber der beiden anderen GlcNAc-Derivate, erfolgreich markiert werden (siehe Abb. 3-49).

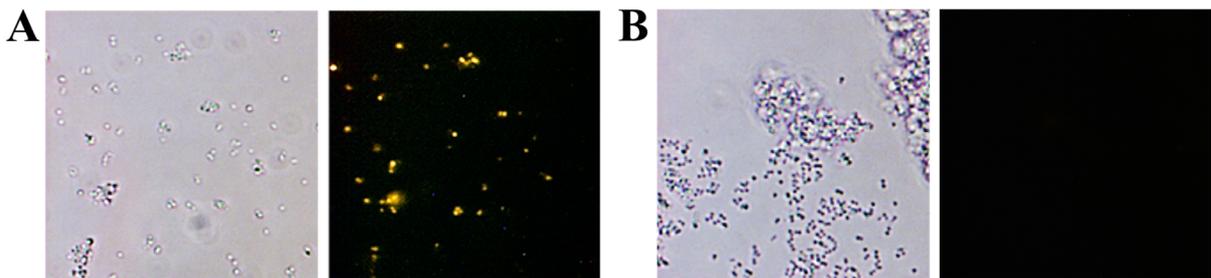


Abb. 3-49: Selektive Markierung von *S. aureus* durch Metabolic Glycoengineering. Die Bakterien wurden in Gegenwart von GlcNAz (A) bzw. GlcNAc (B) inkubiert und mit alkinmodifiziertem Tetramethylrhodamin (TAMRA) geklickt. Lediglich für den Azidozucker ist eine Fluoreszenz der Zellen zu beobachten.

Im Gegensatz zu eukaryotischen Zellen wird der acetylierte Azidozucker Ac₄GlcNAz von den verwendeten Bakterien vermutlich unzureichend aufgenommen bzw. umgesetzt.

Worauf der beobachtete Unterschied zwischen den Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien sowie zwischen dem acetylierten und freien GlcNAz zurückzuführen ist, wurde nicht näher untersucht. Die Aufnahme und Umsetzung von Ac₄GlcNAz durch Gram-negative *H. pylori* wurde bereits zuvor von der Gruppe um Dube beschrieben,^[369-370] so dass der Transport durch die Zellwand kein limitierender Faktor zu sein scheint. Andererseits

beschrieben Mas Pons *et al.* Versuche mit ebenfalls Gram-negativen *L. pneumophila*, in denen ausschließlich die nicht acetylierte Variante eines Azidoanalog zur Markierung der Zellen führte.^[366] Die Frage nach der Anwesenheit und Aktivität intrazellulärer unspezifischer Esterasen für Bakterien ist weiterhin strittig. Arbeiten von Antonczak *et al.* belegen zumindest für *E. coli* keine derartige Aktivität,^[525] was den Einbau von Ac₄GlcNAz per se unwahrscheinlich macht. Ob dieser Befund Allgemeingültigkeit für alle Gram-negativen Bakterien besitzt und auch für Gram-positive gilt, wurde bisher nicht abschließend geklärt.

Die für *S. aureus* beobachtete Präferenz des nichtacetylierten GlcNAz steht im klaren Kontrast zum bevorzugten Einbau acetylierter Analoga in eukaryotischen Zellen (siehe Kapitel 2.4) und liefert damit einen therapeutischen Nutzen – sofern die Möglichkeit besteht, durch Metabolic Glycoengineering mit GlcNAz Infektionsprozesse von *S. aureus* entsprechend zu beeinflussen.

Aus diesem Grund wurde in weiteren Versuchen die Auswirkung der metabolisch veränderten Zelloberfläche auf die Adhäsion der Bakterien gegenüber humanen Zellen untersucht. Ausgehend vom Modell einer Blaseninfektion wurden humane Blasenepithelzellen (T24) gewählt. *S. aureus* wurden wie beschrieben mit GlcNAz bzw. GlcNAc inkubiert und mit dem Alkin von Alexa488 geklickt. Verschiedene Kontrollen unter Verzicht auf den Alkinfarbstoff bzw. die weiteren Reagenzien (CuSO₄, TBTA, Natriumascorbat) wurden ebenfalls durchgeführt. Die derart vorbehandelten Bakterien wurden in Anlehnung an ein Protokoll von Schierack *et al.*^[526] auf T24 inkubiert und die Anzahl der nach einem Waschprozess verbleibenden adhärenierten *S. aureus* durch Auszählen bestimmt.

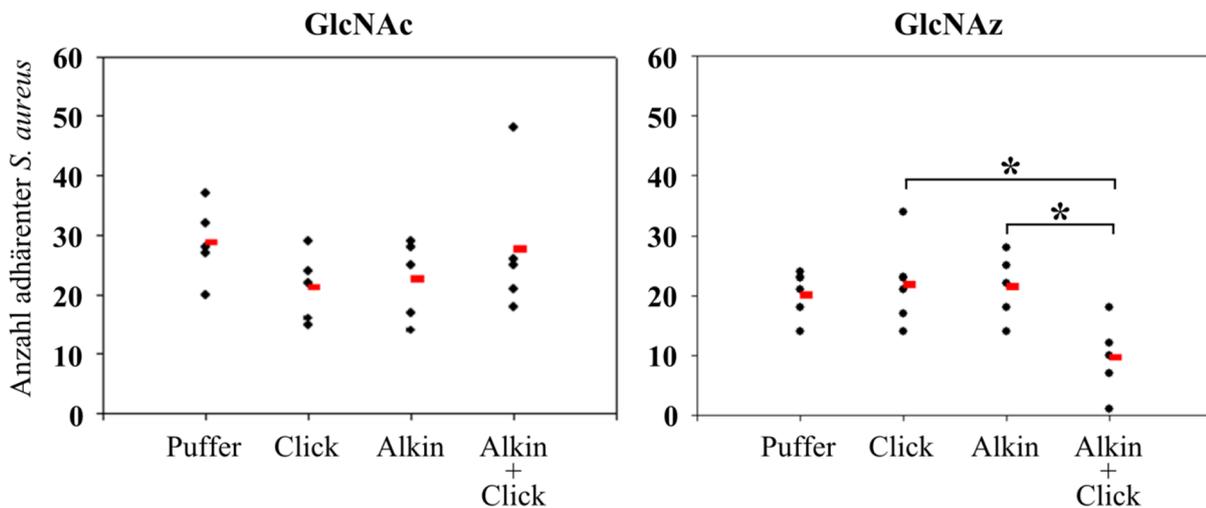


Abb. 3-50: Quantifizierung der Adhäsion von *S. aureus* auf T24-Zellen nach Inkubation mit GlcNAc bzw. GlcNAz und anschließender Clickreaktion mit Alexa488-Alkin. Die Inkubation mit dem Zucker ohne weitere Behandlung („Puffer“) sowie die Bedingungen der Clickreaktion („Click“) und der Alkinfarbstoff („Alkin“) beeinflussten die Anzahl adhärenierter Bakterien nicht signifikant. Erst die Kombination des inkorporierten Azidozuckers mit der Clickreaktion in Anwesenheit des Alkins („Alkin + Click“) führte zu einer Reduktion um etwa 50 %. Die Versuche wurden als Quintuplikate durchgeführt, die Mittelwerte sind durch den roten Balken markiert. * kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p = 0.05$, Methode nach Holm-Sidak).

Nur nach Inkubation der Bakterien mit GlcNAz und anschließender Clickreaktion mit dem Alkin wurde ein signifikanter Effekt festgestellt, die Zahl adhärenierter Bakterien reduzierte sich nahezu auf die Hälfte. Die Einwirkung von GlcNAc, die Bedingungen der Clickreaktion

sowie die Anwesenheit des Alkins allein zeigten dagegen keinen Einfluss auf das Adhäsionsverhalten.

Daraus folgt, dass der Azidozucker in Oberflächenglycanstrukturen von *S. aureus* integriert wurde, die für seine erfolgreiche Adhäsion auf humanen Zellen (mit)verantwortlich sind. Durch die Clickreaktion mit dem sterisch anspruchsvollen Fluoreszenzfarbstoff werden diese Strukturen abgeschirmt, so dass es zu einer partiellen Unterdrückung von Adhäsionsprozessen kommt.

Bisher sind allerdings die adressierten Zielstrukturen des Glycoengineerings unbekannt. Kandidaten unter den Zellwandkomponenten des Gram-positiven Bakteriums, deren Einfluss auf Adhäsionsprozesse bekannt ist bzw. diskutiert wird, sind Proteine der MSCRAMM-Familie (*microbial surface component recognizing adhesive matrix molecule*),^[527] das Zellwandpolymer Murein (Peptidoglycan, siehe Kapitel 2.1, Abb. 2-4), Teichonsäuren (siehe Abb. 2-5)^[528-530] und extrazelluläre Polysaccharide (EPS) wie das Poly-*N*-acetylglucosamin (PNAG).^[531] Zur Identifizierung der Komponenten sind weitere biochemische Studien nötig, die durch das Glycoengineering unterstützt werden können. Wird anstelle des Fluoreszenzfarbstoffs ein Erkennungsmotiv wie Biotin^[532] oder FLAG^[370] geklickt, können die Zielstrukturen anhand dessen aus dem komplexen Gemisch abgetrennt und zum Beispiel massenspektrometrisch untersucht werden. Auf diese Weise ergeben sich neue Angriffspunkte für die Bekämpfung auch antibiotikaresistenter Bakterien, deren prominentester Vertreter (MRSA) ebenfalls zu *S. aureus* zählt.

Die Methode des Metabolic Glycoengineerings bietet zahlreiche Möglichkeiten zur Untersuchung eukaryotischer sowie prokaryotischer Glycanstrukturen, vorwiegend auf der Oberfläche der Zellen. Dort spielen sie eine wichtige Rolle in zahlreichen Wechselwirkungs- und Erkennungsprozessen mit hoher Relevanz für Infektionen und Tumorerkrankungen.

Zum ersten Mal wurde in den vorgestellten Arbeiten in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Sauer (Universität Würzburg) die Dichte und Verteilung von Glycanen auf humanen Zellen (Neuroblastoma) durch Einzelmolekülmarkierung und hochauflösende *d*STORM-Mikroskopie sichtbar gemacht. Laufende Untersuchungen beschäftigen sich unter anderem mit der Induktion und Rolle größerer Cluster in Anwesenheit tumorrelevanter Proteine wie Galectin (siehe auch Kapitel 3.2.2.3) oder bakterieller Erreger.

Zudem konnte am Modellsystem des Gram-positiven *S. aureus* ein direkter Zusammenhang zwischen veränderten Oberflächenglycanen und Adhäsionseigenschaften, einer wichtigen Voraussetzung für jeden Infektionsprozess, gezeigt werden. Die Methode des Glycoengineering bietet hier die Möglichkeit zur systematischen Untersuchung bisher unbekannter bakterieller Glycanstrukturen, die als neuartige Angriffsziele zur Bekämpfung der Erreger unter Umgehung der bekannten Resistenzmechanismen genutzt werden können.

3.5 Synthese zweier Nitroxolin-Konjugate als Referenzverbindungen

Auch konventionelle Antibiotika werden weiterhin zur Therapie bakterieller Infektionen eingesetzt. Bereits seit 1967 wird der Wirkstoff Nitroxolin (5-Nitrochinolin-8-ol) in der oralen Standardtherapie (rezidivierender) Harnwegsinfekte eingesetzt. Seine bakteriostatische Wirkung ist auf die Chelatisierung zweiwertiger Metallionen wie Mg^{2+} und Ca^{2+} und die damit verbundene Störung der Integrität der bakteriellen Zellwand – insbesondere der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien – zurückzuführen.^[379] Zudem wird die Adhäsion von Bakterien auf der humanen Blasenwand inhibiert.^[533-534] Im Gegensatz zu anderen Standardantibiotika wie Trimethoprim sowie den Fluorchinolonen wurde für *E. coli*, den Hauptauslöser der Infekte, bisher keine Resistenzentwicklung beobachtet,^[535-536] so dass Nitroxolin wieder verstärkt zum Einsatz kommt.

Wie alle anderen oral aufgenommenen Verbindungen auch unterliegt der Wirkstoff der Biotransformation zur Steigerung der Wasserlöslichkeit exogener lipophiler Moleküle, so dass die Ausscheidung über die Harnwege bzw. den Darm erleichtert wird. Dabei wird zwischen Phase I- und Phase II-Metaboliten unterschieden. Erstere entstehen durch Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse, wobei verschiedenste funktionelle Gruppen wie Alkohole, Thiole, Amine oder Carbonsäuren eingeführt werden. Zur weiteren Steigerung der Wasserlöslichkeit werden die Phase I-Metabolite bzw. bereits zuvor passend funktionalisierte Verbindungen mit hydrophilen endogenen Substraten konjugiert. Alkohole werden dabei hauptsächlich mit Sulfatgruppen sowie Glucuronsäure versehen, meist ist die Sulfatierung der bevorzugte Biotransformationsweg.^[537-538]

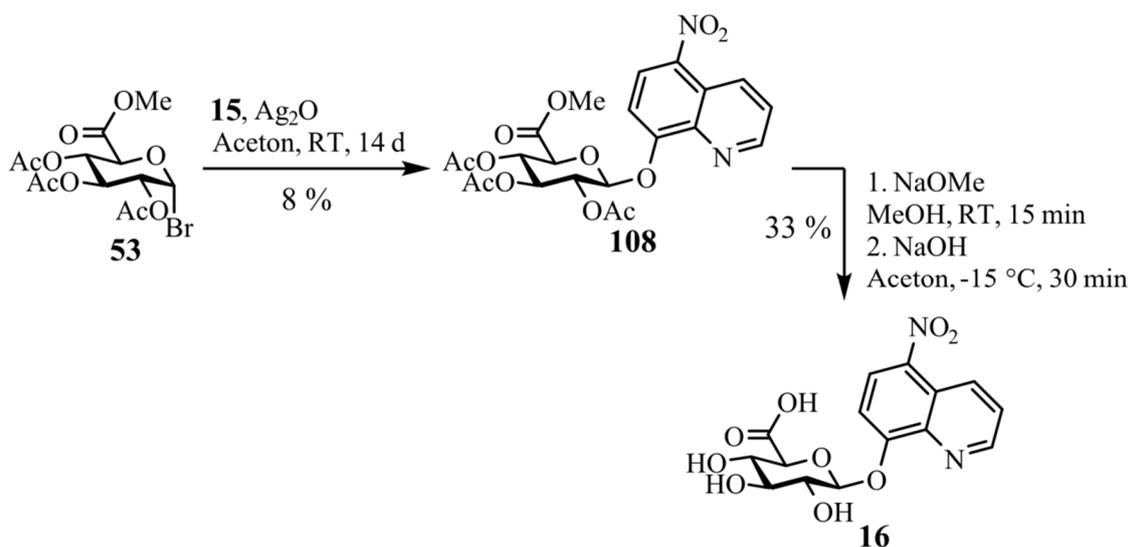
Aus diesem Grund wird nur ein geringer Anteil der ursprünglich verabreichten Wirkstoffdosis unverändert an ihrem Wirkort, der Blase, vorgefunden. Basierend auf den beschriebenen Mechanismen wurden verschiedenste Metabolite postuliert und konnten durch ¹⁴C-Markierungsexperimente sowie spektrophotometrisch^[539-541] und massenspektrometrisch^[542] nachgewiesen werden.

Zur Verifizierung der Struktur sowie der Möglichkeit einer quantitativen Analytik der beiden Hauptmetabolite, der sulfatierten sowie glucuronidierten Konjugate, im Urin sollten die beiden Verbindungen chemisch-synthetisch dargestellt werden. Weiterhin sollten sie zur Untersuchung des Wirkprofils der beiden Komponenten *in vitro* genutzt werden.

Die enzymatische Synthese des β -verknüpften Glucuronsäurekonjugats unter Verwendung von Leberliposomen (diese enthalten die Glucuronosyltransferase) wurde bereits 1975 von Milivojevic *et al.* beschrieben, das Produkt allerdings nicht charakterisiert.^[543]

Die chemisch-synthetische Kupplung zwischen Nitroxolin (**15**) und dem Bromid der Glucuronsäure **53** wurde in Anlehnung an Schmidt und Monneret^[544] unter Königs-Knorr-Bedingungen mit Silber(I)oxid in Aceton durchgeführt. Der elektronenarme Aromat sorgt für eine geringe Nucleophilie der phenolischen Hydroxylgruppe, so dass erst nach deutlich verlängerter Reaktionszeit ein merklicher Umsatz festgestellt wurde. Nach 14 Tagen wurde die Reaktion abgebrochen und das Nitroxolinderivat **108** nach Säulenchromatographie in einer Ausbeute von 8 % isoliert. Dieser Schritt bedarf somit weiterer Optimierung; einerseits kann die Reaktivität der Hydroxylgruppe durch Zugabe einer Base wie Silber- oder

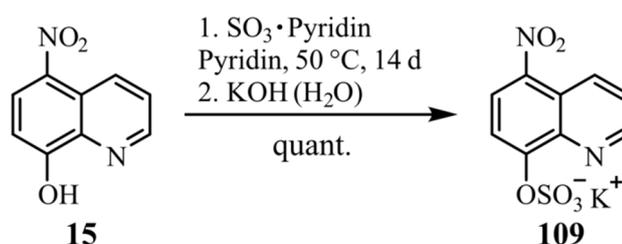
Cäsiumcarbonat^[545] erhöht werden, alternativ ist auch die Verwendung des deutlich reaktiveren Trichloracetimidats für die Kupplung (vgl. etwa Lucas *et al.*^[546]) möglich.



Schema 3-28: Synthese des Glucuronsäurekonjugats **16**.

Die Abspaltung der Schutzgruppen wurde analog zu bereits beschriebenen Synthesen mit basischem Natriummethanolat unter Zemplén-Bedingungen sowie wässriger Natronlauge (siehe Schema 3-28) durchgeführt.

Die Sulfatierung des Nitroxolins erfolgte durch Addition von Schwefeltrioxid aus dem entsprechenden Pyridinkomplex.^[547] Der nach der Reaktion als Feststoff isolierte Rückstand wurde mit wässrigem Kaliumhydroxid zum Kaliumsalz des Nitroxolinsulfats umgesetzt.^[548] Die Reaktion lieferte das gewünschte Produkt in quantitativer Ausbeute.



Schema 3-29: Darstellung des Nitroxolinsulfats **109**.

Diskussion der spektroskopischen Daten

Die charakteristischen Signale in den NMR-Spektren der Glucuronsäure wurden bereits anhand analoger Verbindungen in Kapitel 3.2.2.1 diskutiert und werden deshalb hier nicht erneut betrachtet.

Alle Nitroxolinderivate zeigen das typische Muster eines zweifach substituierten Chinolins mit Seitenketten an C5 und C8. Alle Protonen resonieren im aromatischen Bereich mit Verschiebungen zwischen 7 und 9.5 ppm. Die beiden benachbarten Protonen H6 und H7 besitzen jeweils nur einen Kopplungspartner und resonieren als Dubletts um 8.5 und 7.2-8.0 ppm mit einer Kopplungskonstante von 8.7-9.0 Hz. Durch die Substitution an der

Hydroxylgruppe verschiebt sich H7 ins tiefere Feld; während das Proton der Grundverbindung **15** bei 7.19 ppm resoniert, wird es für die glucuronidierten Derivate auf etwa 7.5 ppm und für die sulfatierte Verbindung **109** auf 7.99 ppm verschoben.

Die Protonen H2, H3 und H4 besitzen jeweils zwei Kopplungspartner über drei bzw. vier Bindungen und zeigen damit die Struktur eines Dubletts von Dubletts. Dabei zeigen sich deutliche Unterschiede in der Größe der Kopplungskonstanten. Während die 3J -Kopplung zwischen H3 und H4 bei fast neun Hertz liegt, ist die 4J -Kopplung zwischen H2 und H4 mit 1.2-1.6 Hz deutlich kleiner. Die 3J -Kopplung zwischen H2 und H3 liegt mit etwa 4 Hz dazwischen. Die Verschiebung dieser drei Protonen ändert sich mit der Substitution zum Glucuronid bzw. Sulfat nur marginal. H4 resoniert jeweils am linken Rand des Spektrums um 9.1 ppm, H2 nur wenig hochfeldverschoben um 9 ppm, H3 jedoch bei deutlich höherem Feld um 7.8 ppm.

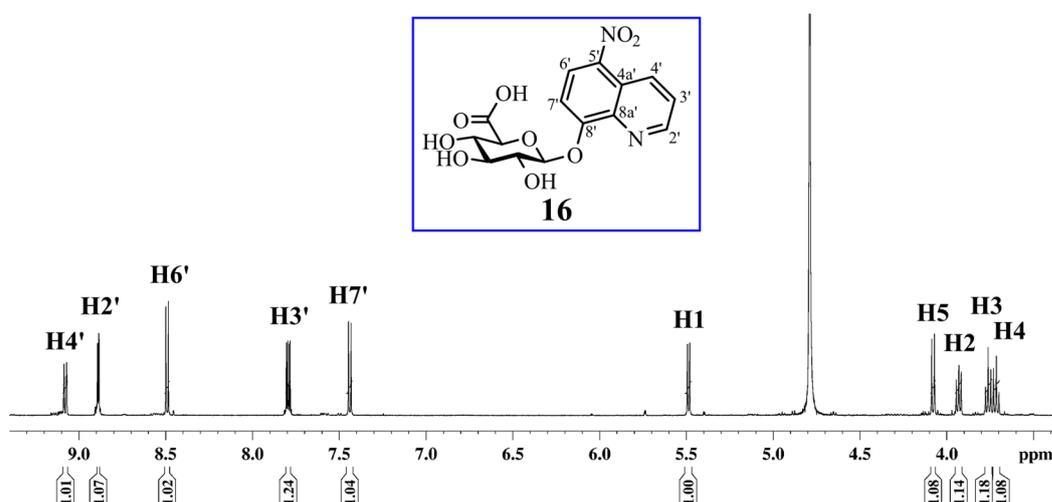


Abb. 3-51: ^1H -NMR-Spektrum des glucuronidierten Nitroxolins **16**.

Auch die Kohlenstoffe des Nitroxolinanteils resonieren alle im aromatischen Bereich zwischen 110 und 160 ppm. Am höchsten verschoben ist dabei C8, das durch den stark elektronenziehenden Effekt des benachbarten Sauerstoffs entschirmt wird.

Durch die Einführung der Glucuronsäure bzw. der Sulfatgruppe wird das Signal um 2-3 bzw. 5 ppm zu leicht höherem Feld verschoben. Auch die Kohlenstoffe C6 und C7 erfahren durch die Substitution einen leichten Shift. Während C6 wie C8 zu höherem Feld tendiert, verschiebt sich C7 ins tiefere Feld.

Die erfolgreiche Kupplung zum β -Glucuronid **16** wird zudem anhand der 2D-Spektren (HMBC, NOESY) belegt, die entsprechende Kreuzsignale zwischen dem Glycananteil und dem Aglycon aufweisen. Für die Sulfatgruppe ist dies leider nicht möglich, da sie keine NMR-aktiven Kerne besitzt. Ihre Anwesenheit wurde deshalb anhand des Massenspektrums (ESI-negativ) belegt, dessen Basispeak bei m/z 268.98754 dem Molekulanion ohne Kalium zugeordnet werden kann.

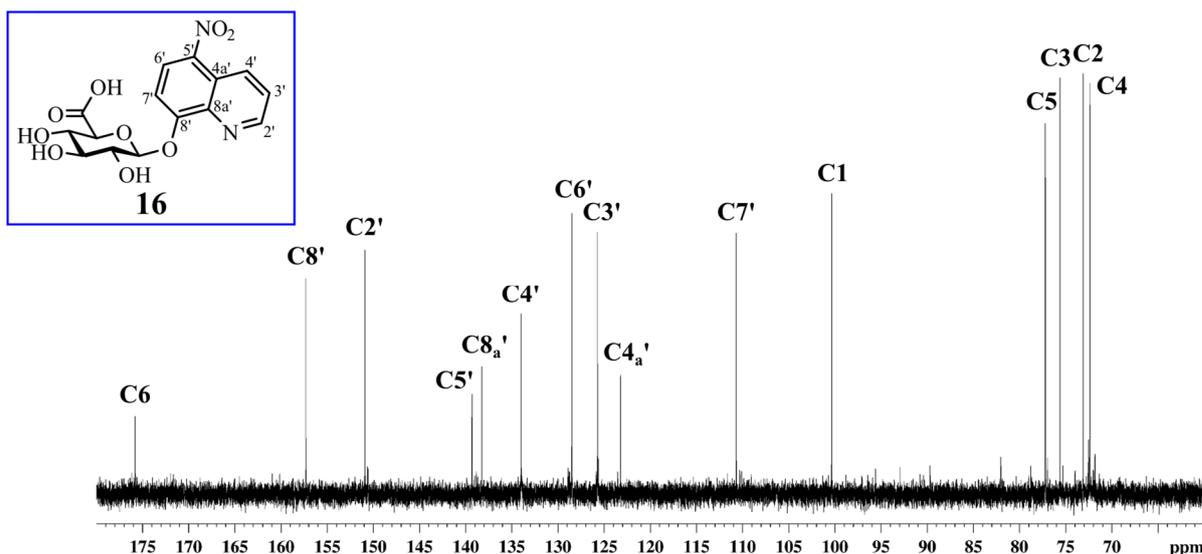


Abb. 3-52: ^{13}C -NMR-Spektrum des glucuronidierten Nitroxolins **16**.

Weiterhin ist zu beachten, dass das Sulfat **109** in wässriger Lösung sowie in DMSO nicht stabil ist und spontan SO_3 eliminiert; bereits nach kurzer Zeit konnten im NMR-Spektrum Anteile der Ausgangsverbindung **15** nachgewiesen werden. Für weitere Analysen, insbesondere quantitative Messungen, sollte deshalb jeweils eine frisch hergestellte Lösung des Nitroxolinsulfats verwendet werden.

Die beiden dargestellten Nitroxolinderivate **16** und **109** stehen damit als Referenz für quantitative LC-MS-Studien zur Verfügung, so dass die Konzentrationen der beiden Hauptmetabolite im Urin bestimmt werden können. Dies wurde in Kooperation mit der Rosen Pharma GmbH (St. Ingbert) für das in dieser Arbeit dargestellte Sulfat **109** bereits von Wagenlehner *et al.* gezeigt, die nach Gabe einer einmaligen oralen Dosis von 250 mg Nitroxolin (**15**) bis zu 28 mg/l des Sulfats im Urin nachwies. Dies übersteigt bei weitem die Konzentration der Grundverbindung, die mit maximal 0.5 mg/l detektiert wurde. Für das Glucuronid **16** wird anhand relativer Messungen eine Konzentration postuliert, welche die des Sulfats nochmals deutlich übersteigt.^[542] Mit der Entwicklung der Syntheseroute für das glucuronidierte Nitroxolin steht die Verbindung ebenfalls für quantitative Messungen zur Verfügung, um die Daten zu ergänzen.

Bereits zum jetzigen Zeitpunkt wird allerdings deutlich, dass die Konzentration der beiden Metabolite am Wirkort des Antibiotikums die der zugrundeliegenden Verbindung bei weitem übersteigt. Damit tragen sie mit hoher Wahrscheinlichkeit entscheidend zur bakteriostatischen Wirkung des Arzneistoffs bei. Zur Überprüfung dieser Hypothese sowie der Bestimmung des Wirkprofils der beiden Verbindungen wurden in der Gruppe von Dr. Tobias Ölschläger (Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg) erste Versuchsreihen *in vitro* im Infektionsmodell durchgeführt. Das Modell quantifiziert die Adhäsion von *E. coli* auf T24-Blasenepithelzellen (vgl. auch Kapitel 3.4.3) in Gegenwart definierter Konzentrationen des Wirkstoffs und seiner Metabolite. Basierend auf den so gewonnenen Ergebnissen kann die Dosierungsempfehlung des Arzneistoffs neu evaluiert und gegebenenfalls angepasst werden, um eine möglichst effektive antimikrobielle Wirkung zu erzielen.

Für neu entwickelte Antiinfektiva auf Basis des in Kapitel 3.3 vorgestellten Galabiosemotivs dienen Nitroxolin und seine Metabolite als Referenz zur Einordnung der Wirksamkeit.

Neben der Behandlung bakterieller Infektionen erlebt der Wirkstoff Nitroxolin zudem eine zweite Renaissance als Angiogenese- und Tumorchemmer und wurde für den Einsatz in der Onkologie neu patentiert. Seine Wirkung wurde sowohl *in vitro* an verschiedenen Zelllinien^[549] als auch *in vivo* im Mausmodell belegt und beruht auf der Inhibition zweier an der Zellteilung beteiligter Proteine (MetAP2 und SIRT1)^[550] sowie der Steigerung der Konzentration intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS).^[549] Bhat *et al.* identifizierten *in vitro* zudem ein Derivat des Nitroxolins, das Dimethylsulfamat, als aussichtsreichen Kandidaten für die Angiogenesehemmung. In weiteren *in vivo*-Studien in der Maus soll sein Potential zur Angiogenesehemmung sowie in Xenograft-Modellen seine Wirksamkeit gegenüber diversen Tumorgeweben untersucht werden.^[551]

Da für Nitroxolin insbesondere die Verwendung für die Therapie von Blasenkrebs diskutiert wird,^[550] sollten die beiden vorgestellten Metabolite in entsprechende Studien einbezogen werden. Wie am Beispiel des Dimethylsulfamats gezeigt, bietet die Derivatisierung der phenolischen Hydroxylgruppe das Potential zur Modulierung und sogar Steigerung der Wirksamkeit der Grundverbindung.

4 Zusammenfassung

Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen sind häufig entscheidend beteiligt an verschiedenen einer Infektion oder malignen Erkrankung zugrunde liegenden molekularen Erkennungsprozessen, die zu Adhäsion, Zell-Zell-Interaktion sowie Immunreaktion und -toleranz führen.^[27, 34, 77, 79-80] Trotz der hohen Relevanz für Diagnostik und Therapie dieser Erkrankungen sind die betreffenden Strukturen und Mechanismen bisher nur ungenügend untersucht und verstanden. Ziel dieser stark interdisziplinär angelegten Arbeit war es daher, Methoden der Fachbereiche Chemie und Pharmazie, Biologie und Medizin, aber auch Physik zu kombinieren, um Kohlenhydraterkennungsprozesse im Detail zu untersuchen und auf dieser Basis strukturell neuartige diagnostische und therapeutische Anwendungen zu entwerfen.

Die hochkomplexe Zusammensetzung einer Zelloberfläche wurde zunächst auf ihren Glycananteil reduziert und stark vereinfacht auf der Oberfläche sogenannter Glyochips imitiert. Die verwendeten Systeme auf Basis einer Gold- bzw. Glasoberfläche ergänzen sich optimal in ihrer Eignung für komplementäre analytische Methoden wie Massenspektrometrie sowie quantifizierbare Fluoreszenzspektroskopie.

Der Übergang auf die lebende Zelloberfläche gelang mit Hilfe des Metabolic Glycoengineering, das die kovalente Präsentation definierter Motive durch eine Cycloaddition zwischen zwei bioorthogonalen Reaktionspartnern (z.B. Azid und Alkin) ermöglicht.

Auf diese Weise wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Sauer (Universität Würzburg) zunächst die Dichte und Verteilung verschiedener Oberflächenglycane auf humanen Zellen mittels hochauflösender Fluoreszenzmikroskopie (*d*STORM) bestimmt. Diese Parameter zeigten im Modell des Glyochips einen entscheidenden Einfluss auf Bindungsereignisse und multivalente Erkennung und zählen auch auf natürlichen Zelloberflächen – in engem Zusammenhang mit der lateralen und temporalen Dynamik der Motive – zu den wichtigen Faktoren molekularer Erkennungsprozesse.

Die gezielte Modifikation zellulärer Oberflächenglycane eignet sich aber auch selbst als Methode zur Beeinflussung molekularer Wechselwirkungsprozesse. Dies wurde anhand des humanpathogenen Bakteriums *S. aureus* gezeigt, dessen Adhäsion auf Epithelzellen der Blasenwand durch Metabolic Glycoengineering partiell unterdrückt werden konnte.

In einem ergänzenden Projekt wurden zwei potentielle Metabolite eines konventionellen Antibiotikums – des Nitroxolins – mit bakteriostatischer sowie antiadhäsiver Wirksamkeit dargestellt. Diese dienten als Referenzsubstanzen zur Verifizierung der postulierten Struktur der Derivate, werden aber auch selbst auf ihr Wirkprofil hin untersucht. Gleichzeitig stehen sie zusammen mit der Grundverbindung zudem als Referenz für die Wirkstärke potentieller neu entwickelter Antiadhäsiva zur Verfügung.

Die erzielten Ergebnisse der einzelnen Teilprojekte dieser Arbeit werden im Folgenden zusammengefasst.

Projekt A:**Aufbau eines Glycochips für massenspektrometrische Untersuchungen und Screenings**

Der Glycochip auf Basis einer elektrisch leitenden Goldoberfläche bietet die Möglichkeit zur massenspektrometrischen Untersuchung von Kohlenhydrat-Bindungsprozessen und eignet sich als Screeningplattform für enzymatische Transformationen. Sein Aufbau erlaubt die schnelle und ressourcenschonende Parallelanalyse von bis zu 64 Proben; Reaktionen auf dem Chip werden ebenfalls im Parallelverfahren in geringen Volumina von ca. 1 µl durchgeführt. Zur Immobilisierung auf der Oberfläche des Chips wurde eine Auswahl von Mono- und Disacchariden (siehe Abb. 4-1) – ausgehend von ihren jeweiligen peracetylierten Vorläufern – mit einem Ethanolaminlinker versehen.

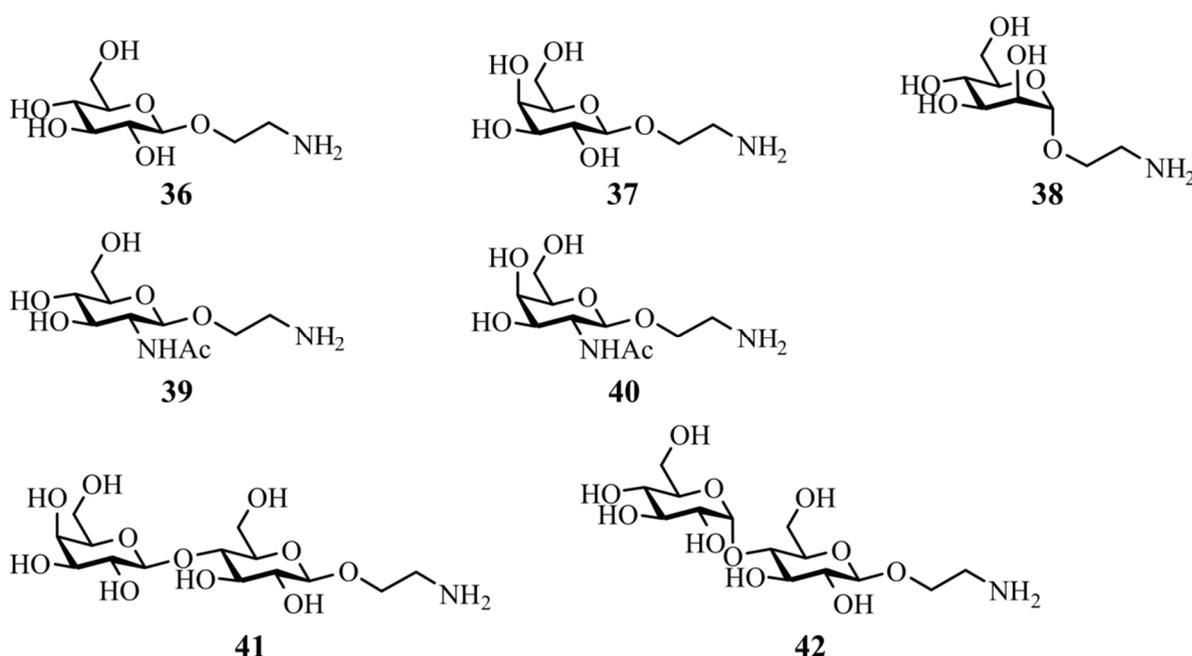


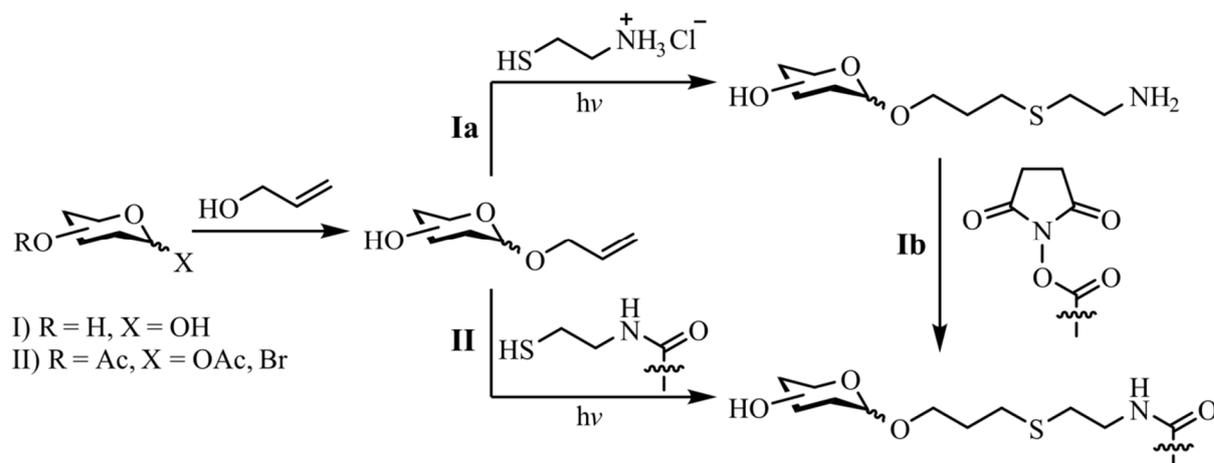
Abb. 4-1: Übersicht der dargestellten Mono- und Disaccharide für die Anbindung auf dem Goldchip. Die Kohlenhydrate wurden jeweils mit einem Ethanolaminlinker versehen.

Die Kohlenhydrate wurden über eine SAM (selbstorganisierende Monolage), bestehend aus zwei verschiedenen langen und unterschiedlich terminierten langkettigen Alkylthiolen (Spacer und Linker), auf der Goldoberfläche immobilisiert. Die Darstellung des Disaccharids *N*-Acetyllactosamin erfolgte dagegen direkt auf dem Chip durch enzymatische Übertragung eines Galactoserests auf *N*-Acetylglucosamin. Der Aufbau der Monolage sowie die Anbindung der Kohlenhydrate wurden jeweils mittels MALDI-Massenspektrometrie verfolgt. Der so mit fünf Monosacchariden sowie drei Disacchariden funktionalisierte Goldchip wird in laufenden Arbeiten gemeinsam mit *Dr. Maria Ortiz-Soto* (Universität Würzburg) zum Screening eines von ihr erzeugten Sets humaner Sialyltransferasevarianten genutzt. Erste positive Ergebnisse belegen eine erfolgreiche Übertragungsreaktion auf den Akzeptor *N*-Acetyllactosamin, womit gleichzeitig zum ersten Mal eine auf dem Goldchip aktive Sialyltransferase gefunden wurde.

Weitere Arbeiten zur Optimierung des Systems und die Ausweitung auf ein breiteres Akzeptoren- sowie Enzymvariantenspektrum werden momentan durchgeführt.

Projekt B:**Aufbau eines Glyochips für die qualitative und quantitative Untersuchung von Kohlenhydrat-Bindungsprozessen**

Der Glyochip auf Basis eines Glasobjektträgers erlaubt die Detektion und Quantifizierung von Kohlenhydraterkennungsereignissen komplementär zum System des Goldchips anhand der Messung der Fluoreszenzintensität eines entsprechend markierten Bindungspartners. Dabei werden ebenfalls nur geringe Mengen der Glycane und ihrer Bindungspartner benötigt, auch die parallele Durchführung zahlreicher Einzelexperimente auf einem Chip ist möglich. Zur Anbindung auf der Oberfläche wurde ebenfalls ein aminterminierter Linker verwendet, allerdings zeigte sich im direkten Vergleich ein längerer Linker als das für die Arbeiten auf dem Goldchip verwendete Ethanolamin geeigneter, um die Glycane ausreichend flexibel und sterisch unbeeinflusst zu präsentieren. Dieser Linker wurde in einem zweistufigen Verfahren aufgebaut; zunächst wurde Allylkohol einer Glycosylierungsreaktion unterworfen, anschließend durch photochemische Addition von Cysteamin verlängert. Diese Reaktion muss nicht zwingend vor der Immobilisierung der Glycane auf dem Chip durchgeführt werden. Stattdessen ist die UV-Reaktion auch direkt auf einer thiolterminierten Oberfläche möglich. So werden jeweils ein synthetischer Schritt sowie die teilweise schwierige Isolierung des freien Amins vermieden (siehe Schema 4-1).



Schema 4-1: Die photochemische Erweiterung des Linkers kann sowohl in Lösung (Ia) als auch auf der vorbehandelten Chipoberfläche an der festen Phase (II) durchgeführt werden. II bietet gegenüber dem zweistufigen Verfahren Ia-Ib den Vorteil, dass das freie Amin nicht isoliert werden muss.

Die so mit Kohlenhydraten funktionalisierte Oberfläche ist vielfältig einsetzbar und wurde für die Untersuchung verschiedenster Bindungsprozesse verwendet und etabliert.

Zur Validierung des Systems wurde zunächst in Anlehnung an eine von Liang *et al.*^[164] beschriebene Methode die Bindungsstärke des Lectins ConA gegenüber Mannose quantifiziert. Die experimentell bestimmte Dissoziationskonstante $K_{D,surf}$ zeigte mit 79 nM (SD = 18 nM) eine sehr gute Übereinstimmung mit den Literaturdaten (83 nM).

Basierend auf diesem Ergebnis wurde das Spektrum der Bindungspartner erweitert und in Zusammenarbeit mit Dr. Dorith Claes (Universität Hamburg) das Bindungsprofil verschiedener, von ihr dargestellter synthetischer Lectine auf Basis eines tripodalen Adamantangerüsts mit bis zu drei Benzoboroxol-Einheiten^[432] untersucht. Im qualitativen

Assay mit fünf Mono- und zwei Disacchariden (siehe Abb. 4-2) wurde Galactose (bzw. LacNAc, das ebenfalls terminal Galactose trägt) als bevorzugtes Bindungsmotiv identifiziert, während Mannose nur eine schwache, alle weiteren verwendeten Glycane keine Affinität aufwiesen. Diese Selektivität ist auf die Anwesenheit einer *cis*-Diolstruktur (3-OH, 4-OH für Galactose; 2-OH, 3-OH für Mannose) zurückzuführen, die mit den Benzoboroxolen einen relativ stabilen, ungespannten cyclischen Ester ausbildet.

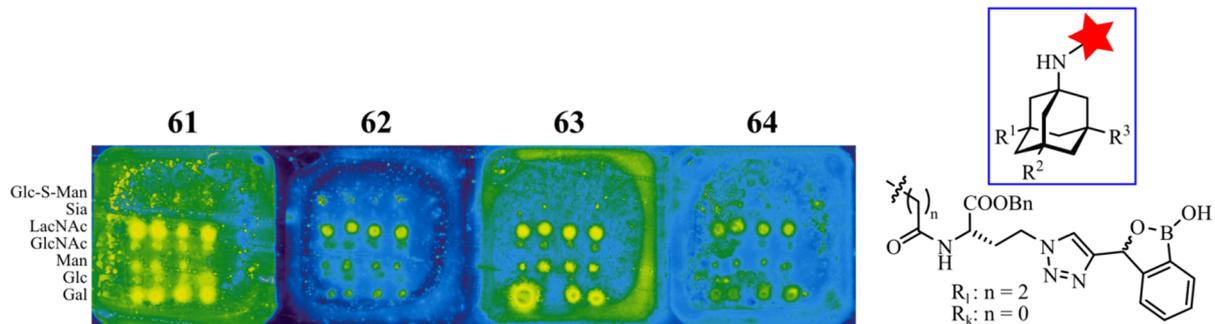


Abb. 4-2: Fluoreszenzintensität (Falschfarbendarstellung) des Glycochips nach Inkubation mit den von *Dr. Dorith Claes* dargestellten^[432, 435] Boronoliganden. Deutlich erkennbar ist eine Präferenz für LacNAc, Galactose sowie Mannose.

Für die drei Boroxole mit der qualitativ höchsten Affinität wurde zudem die Bindungsstärke gegenüber Galactose quantitativ bestimmt und $K_{D,surf}$ -Werte von 185 nM für das Dimer **62**, 48 nM für das lange Trimer **63** sowie 108 nM für das kurze Trimer **64** erhalten.^[435] Diese Affinitäten liegen in einem Bereich, der auch für viele natürliche kohlenhydratbindende Proteine, die Lectine gefunden wird. Möglicherweise finden die synthetischen Lectine somit in der Zukunft eine Applikation in der medizinischen Diagnostik und Therapie. Begleitend zur Entwicklung der synthetischen Strukturen eignet sich der Glycochip zur Charakterisierung ihrer Bindungseigenschaften.

Der Glycochip eignet sich aber auch selbst als diagnostisches Tool, etwa zum Nachweis tumorassoziierter Proteine oder bakterieller Pathogene.

Galectine sind kohlenhydratbindende Proteine, die über die Bindung an *N*-Acetylglucosamin- bzw. Lactosemotive auf Zelloberflächen zahlreiche Signal- und Kommunikationsprozesse steuern. Insbesondere die Überexpression von Galectin-1 wird dabei mit malignen Erkrankungen und deren gesteigerter Aggressivität in Verbindung gebracht. Aus diesem Grund wurden von *Dr. Nadja Bertleff-Zieschang* (Universität Würzburg) mit Hilfe des rationalen Ligandendesigns eine Reihe auf LacNAc basierender, höher affiner Strukturen entwickelt.^[444] Ihr Potential zur Detektion klinisch relevanter Serumspiegel des Zielproteins Gal-1 wurde auf dem Glycochip evaluiert.

Obwohl SPR-Messungen nur eine geringe Steigerung der Affinität der designten Liganden gegenüber den natürlichen Bindungsmotiven Lactose und LacNAc ergaben, war zu erwarten, dass die multivalente Präsentation auf der Chipoberfläche diesen Effekt potenzieren und eine Diskriminierung ermöglichen kann.

Hierzu wurde zunächst die Bindung des fluoreszenzmarkierten Proteins auf den Glycanen nachgewiesen. In der Tat wurden die neuartigen Liganden erkannt, während für Lactose und LacNAc kein Signal erhalten wurde (siehe Abb. 4-3 links).

Klinisch deutlich relevanter ist allerdings der Nachweis des nativen Proteins, der in einem Sandwich-Aufbau mittels spezifischer Antikörper gelang (siehe Abb. 4-3 rechts). Auch die Diskriminierung der beiden strukturell ähnlichen Galectine Gal-1 und Gal-3 war auf diese Weise möglich.

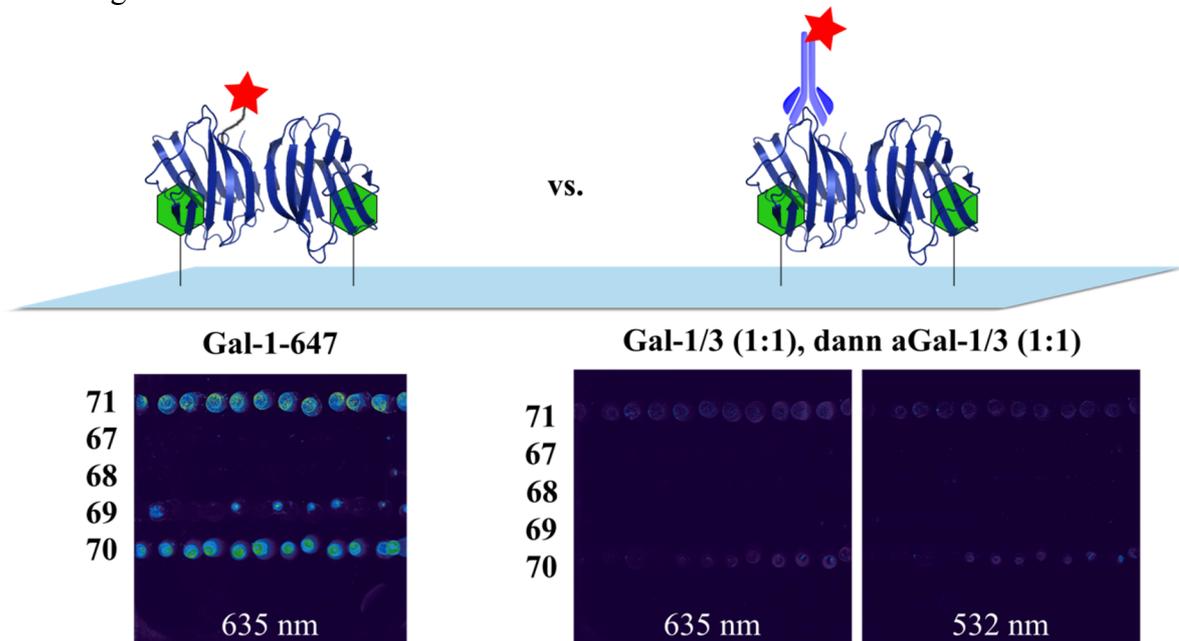


Abb. 4-3: Nachweis des tumorassoziierten Proteins Galectin-1 auf dem Glycochip. Der Nachweis der Bindung gelang sowohl mit dem fluoreszenzmarkierten Protein (links) als auch im Sandwich-Aufbau mit unmarkiertem Protein und einem fluoreszenzmarkierten spezifischen Antikörper (rechts, aGal-1: Alexa647; aGal-3: Alexa555). Die Anregung der beiden Farbstoffe erfolgte bei 635 bzw. 532 nm.

In Kooperation mit *Prof. Dr. Jörg Wischhusen* (Universitätsklinikum Würzburg) wurden zudem erste Experimente zum Nachweis klinisch relevanter Galectin-Konzentrationen aus Zellen einer Prostatakarzinom-Linie durchgeführt. Die Sensitivität des Verfahrens bedarf allerdings weiterer Optimierung; im Anschluss sollen Studien mit Proben von Tumorpatienten durchgeführt werden, so dass der vorgestellte Glycochip möglicherweise Eingang in die klinische Diagnostik Galectin-assoziiertes (maligner) Erkrankungen findet.

Nicht nur die Anbindung isolierter Proteine, auch die Adhäsion ganzer Zellen an Bindungsmotive, die auf dem Chip präsentiert werden, ist möglich. In ersten Studien mit verschiedenen humanpathogenen Bakterien (*E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *N. gonorrhoeae*) wurde die Bindung von *E. coli* auf Mannose nachgewiesen. Diese Affinität beruht auf der Anwesenheit der Typ 1-Pili an der Oberfläche des Bakteriums. Solche kohlenhydratbindenden Proteine, die für die Adhäsion auf humanen Zellen sorgen und damit eine Infektion initiieren, werden für eine Vielzahl von Pathogenen postuliert, bisher sind allerdings nur wenige dieser Strukturen bekannt. Mit einem erweiterten Set an auf dem Glycochip präsentierten Bindungsmotiven können die Strukturen sowie ihre Bindungspräferenzen charakterisiert werden. Damit eignet sich der Chip für die Identifizierung von Pathogenen anhand ihres Adhäsions-„Fingerabdrucks“, was eine schnelle Diagnose und entsprechende Behandlungsoptionen ermöglichen sollte.

In Ergänzung zu seiner klassischen Anwendung als Glycochip wurde der Glas-Microarray für eine Reihe weiterer Studien genutzt.

So wurden in einem invertierten Versuchsaufbau mannosebindende Proteine auf der Oberfläche immobilisiert und ihre Affinität gegenüber zwei von *Carsten Fleck* (Universität Hamburg) dargestellten, tripodalen Mannosestrukturen quantifiziert. Diese unterschieden sich lediglich in der Länge der verwendeten Linkereinheit, die die Flexibilität der präsentierten Motive bestimmt. Mit Dissoziationskonstanten $K_{D,surf}$ von 0.53 und 0.50 μM wurde die höchste Affinität gegenüber dem tetrameren ConA gefunden, die dimeren Lectine PSA und LcH zeigten im Schnitt um eine Größenordnung höhere $K_{D,surf}$ -Werte.^[463] Im Vergleich zur monomeren Referenzverbindung, deren Affinität für eine Quantifizierung nicht ausreichte, sorgt die trivalente Präsentation und geometrische Vororganisation der Bindungsmotive für eine deutliche Steigerung der Affinität (Multivalenzeffekt). Die erzielten Bindungsstärken sind mit Werten im niedrigen mikromolaren Bereich noch zu gering für eine medizinisch relevante Applikation der Verbindungen, allerdings erscheint das Konzept der multivalenten, geometrisch vororganisierten Präsentation von Bindungsmotiven vielversprechend für weitere Studien, die von Affinitätsmessungen auf dem Lectinchip begleitet werden.

Weiterhin wurden gemeinsam mit *Dr. Stephanie Bank* (Universität Würzburg) initiale Versuche zur Bindung der von ihr aus natürlichen Quellen isolierten und mit einem Biotinlinker funktionalisierten *N*-Glycane auf einem Streptavidin-modifizierten Chip durchgeführt. Die komplexen mannosereichen Strukturen konnten erfolgreich mit ConA nachgewiesen werden, so dass der Glycochip als eine der Massenspektrometrie komplementäre Analysemethode die Charakterisierung natürlicher Glycane ergänzend unterstützt.^[469]

Auch eine chemisch-synthetische Sekundärfunktionalisierung der Chipoberfläche ist möglich. Zu diesem Zweck wurde ein Azidoanalogon der Mannose mit einem Aminlinker versehen und auf dem Glaträger immobilisiert. Dort wurde es einer klassischen Huisgen-Sharpless-Meldal-Reaktion mit einem Alkin unterworfen. Erste Versuche zur Definition der Reaktionsbedingungen wurden von *Dr. Tessa Lühmann* und *Gabriel Jones* (Universität Würzburg) mit alkinsubstituierten Fluoreszenzfarbstoffen durchgeführt. Durch die kovalente Anbindung des Farbstoffs, aber auch alkinmodifizierter Glycane konnte zudem die Erkennung des zugrunde liegenden Mannosemotivs durch ConA unterdrückt werden. Der Chip eignet sich damit als ein definiert weiter funktionalisierbares Modell einer zellulären Glycokalyx.

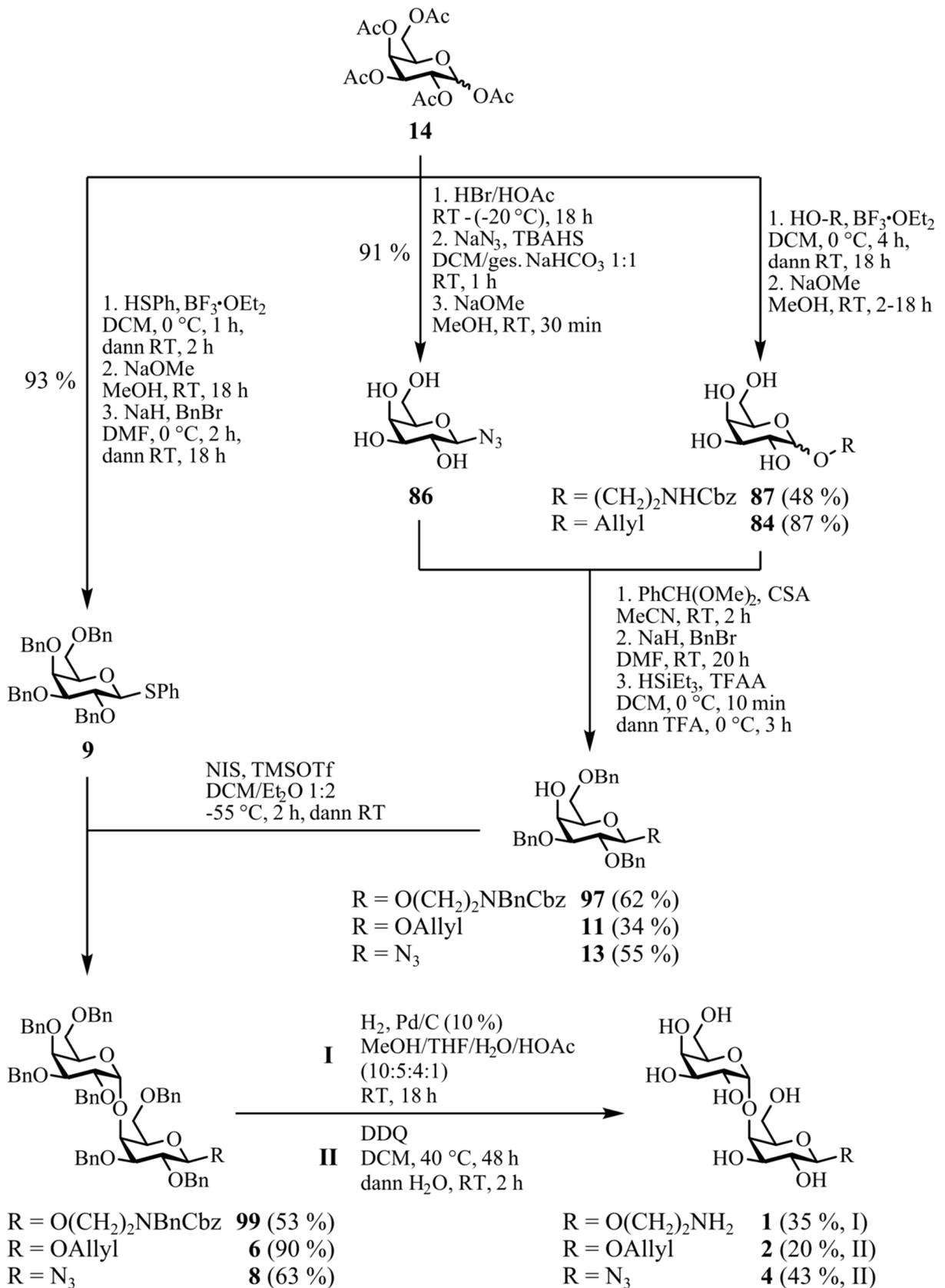
In diesem Zusammenhang wird in laufenden Arbeiten von *Dr. Tessa Lühmann* und *Gabriel Jones* das mit einer Alkin-Seitenkette ausgestattete Protein FGF-2, ein extrazellulärer Wachstumsfaktor, auf der Oberfläche immobilisiert. Dort wird sein Einfluss auf die *in vitro*-Stimulation der Zellproliferation untersucht, um biokompatible und die Geweberegeneration aktivierende Beschichtungen für medizinische Implantate zu entwickeln.

Das Microarrayformat des Glycochips auf einer Glasoberfläche wurde, wie gezeigt, in einer Vielzahl unterschiedlicher Varianten zur Detektion und Charakterisierung von Kohlenhydrat-Erkennungsereignissen verwendet.

Eine Reihe der hier etablierten Techniken eignet sich für die Anwendung in der medizinischen Diagnostik, aber auch in der Therapie maligner Erkrankungen und Infektionen. Laufende Studien beschäftigen sich bereits mit dem Übergang zu klinisch relevanten Fragestellungen und Anwendungen.

Projekt C:

Synthese des Galabiosemotivs mit diversen Linkern für Glycochips und Clickreaktionen



Schema 4-2: Synthese des Galabiosemotivs mit diversen Linkern für den Glycochip sowie das Metabolic Glycoengineering.

Galabiose, ein Disaccharid aus zwei α -1,4-glycosidisch verknüpften Galactoseeinheiten, wird von Epithelzellen des humanen Harnwegssystems präsentiert. Uropathogene *E. coli* (UPEC) besitzen mit PapG ein Adhäsın, das selektiv diese Struktur bindet und so für die Adhäsion der Bakterien sorgt, die im Folgenden eine Infektion auslösen.

Für Bindungsstudien auf der Oberfläche der bereits vorgestellten Chipsysteme sowie die Präsentation auf lebenden Zelloberflächen mittels Metabolic Glycoengineering wurden drei Galabiosederivate, die mit einem entsprechenden Linker versehen sind, dargestellt.

Die Disaccharide wurden, den in Kapitel 3.1 (Schema 3-1) diskutierten retrosynthetischen Überlegungen folgend, in einer konvergenten Synthesesequenz aufgebaut. Ihr Schlüsselschritt bestand in der stereoselektiven Kupplung der beiden funktionalisierten Galactosederivate, die beide ausgehend von peracetylierter Galactose **14** durch gezielte Schutzgruppenmanipulationen dargestellt wurden.

Ein viertes Derivat, das einen Propargyllinker trägt, wurde ebenfalls gekuppelt, allerdings gelang der finale Schritt zur Entfernung der Benzylschutzgruppen bisher nicht. Für die drei Derivate **99**, **6** und **8** war dies mittels katalytischer Hydrierung bzw. oxidativ unter Verwendung von DDQ möglich (siehe Schema 4-2).

Die Derivate stehen damit für die Immobilisierung auf den vorgestellten Glycochip-Formaten sowie Zelloberflächen und anschließende Bindungsstudien zur Verfügung bzw. werden bereits dafür verwendet.

Projekt D:

Metabolic Glycoengineering humaner Zellen zur Untersuchung der Dichte und Verteilung von Oberflächenglycanen

Das Metabolic Glycoengineering ermöglicht die kovalente Derivatisierung der Glycokalyx lebender Zellen.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Sauer (insbesondere *Sebastian Letschert*, Universität Würzburg) wurden die Glycane humaner Neuroblastomazellen (SK-N-MC) durch Azidoanaloga (Ac_4GlcNAz , Ac_4ManNAz und Ac_4GalNAz) adressiert und mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Durch Kombination mit der hochauflösenden Mikroskopietechnik *d*STORM war es so erstmals möglich, Dichte und Verteilung der markierten Kohlenhydrate auf der Zelloberfläche mit einer Auflösung von etwa 20 nm zu bestimmen.

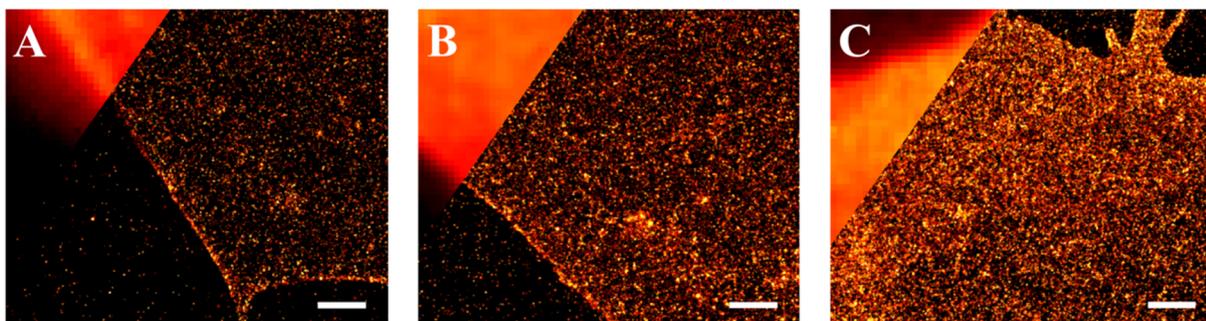


Abb. 4-4: Neuroblastoma (SK-N-MC) wurden mit A) Ac_4GlcNAz , B) Ac_4ManNAz bzw. C) Ac_4GalNAz inkubiert sowie mit Alexa647-Alkin geklickt. Es wird jeweils eine homogene Verteilung der Fluoreszenzlokalisationen, allerdings mit unterschiedlicher Dichte, beobachtet. Die Aufnahmen wurden von *Sebastian Letschert* zur Verfügung gestellt (Skalierung 1 μm).

Auffällig ist die in allen drei Fällen beobachtete homogene Verteilung der Fluoreszenzlokalisationen über die gesamte Basalmembran der Zellen (siehe Abb. 4-4); im Gegensatz zu anderen untersuchten Membranbestandteilen (Proteinen) wurde keine Clusterbildung detektiert. Die Dichte der Lokalisationen zeigte eine starke Abhängigkeit vom eingesetzten metabolischen Vorläufer, wobei die mit 1500-1700 Lokalisationen/ μm^2 höchste Dichte für Ac₄GalNAz gefunden wurde. Ac₄GlcNAz und Ac₄ManNAz erzeugten lediglich ca. 600 bzw. 1100 Lokalisationen/ μm^2 .^[505]

Dies spiegelt zum einen die Zusammensetzung der Glycokalyx der verwendeten Zelllinie wider, andererseits adressieren die eingesetzten Azidoanaloga vermutlich verschiedene Subgruppen der präsentierten Glycane. Während Ac₄ManNAz und Ac₄GalNAz zahlreiche Membranproteine und -lipide adressieren, wird Ac₄GlcNAz bevorzugt in intrazelluläre O-Glycane integriert und deshalb vermutlich zu einem geringeren Anteil auf der Oberfläche der Zelle nachgewiesen. Weiterhin liefern die Aufnahmen keine detaillierten Informationen zur exakten Struktur und Verteilung der markierten Glycane, sondern erlauben nur eine qualitative Klassifizierung. Die weitere Differenzierung einzelner Subgruppen sollte anhand der selektiven Bindung verschiedener fluoreszenzmarkierter Lectine in Mehrfarbexperimenten möglich sein.

Laufende Arbeiten beschäftigen sich zudem mit der Induktion und Rolle von Clustern in Anwesenheit tumorrelevanter Proteine und bakterieller Erreger. Kenntnisse der Oberflächenstruktur der (krankhaft veränderten) Zellen könnten so zu einem vertieften Verständnis der molekularen Zusammenhänge und Erkennungsprozesse während einer Erkrankung führen und künftig neue diagnostische und therapeutische Möglichkeiten auf Glycanebene eröffnen. So könnten die Zielgewebe möglicherweise mit Hilfe ihrer einzigartigen Glycanstrukturen selektiv von Wirkstoffen adressiert werden. Andererseits ist es vorstellbar, durch die gezielte Modifikation der Glycokalyx von außen in Signalwege und Adhäsionsprozesse der Zellen und Gewebe einzugreifen und diese selektiv zu modifizieren.

Die Konjugation therapeutischer Proteine – etwa Wachstumsfaktoren – mittels Metabolic Glycoengineering sowie die gezielte Modifikation der extrazellulären Matrix könnte zudem ein interessanter Ansatzpunkt zur Steuerung ihrer Langzeitwirkung sein.

Projekt E:

Metabolic Glycoengineering von Bakterien und Untersuchung von Adhäsionsprozessen

Die Modifikation der Zelloberflächenglycane ermöglicht aber auch die gezielte Beeinflussung interzellulärer Wechselwirkungen.

In Kooperation mit *Dr. Tobias Ölschläger* (Universität Würzburg) wurde die Oberfläche des humanpathogenen Bakteriums *S. aureus* mittels Metabolic Glycoengineering gezielt strukturell verändert. Nach der Inkubation der Zellen mit dem Azidoanalogon GlcNAz wurde die Clickreaktion mit den alkinmodifizierten Fluoreszenzfarbstoffen Tetramethylrhodamin (TAMRA) bzw. Alexa488 durchgeführt. Diese Modifikation reduzierte im *in vitro*-Modell die Adhäsion der Bakterien auf Blasenepithelzellen (T24) signifikant um nahezu 50 % (siehe Abb. 4-5).^[552]

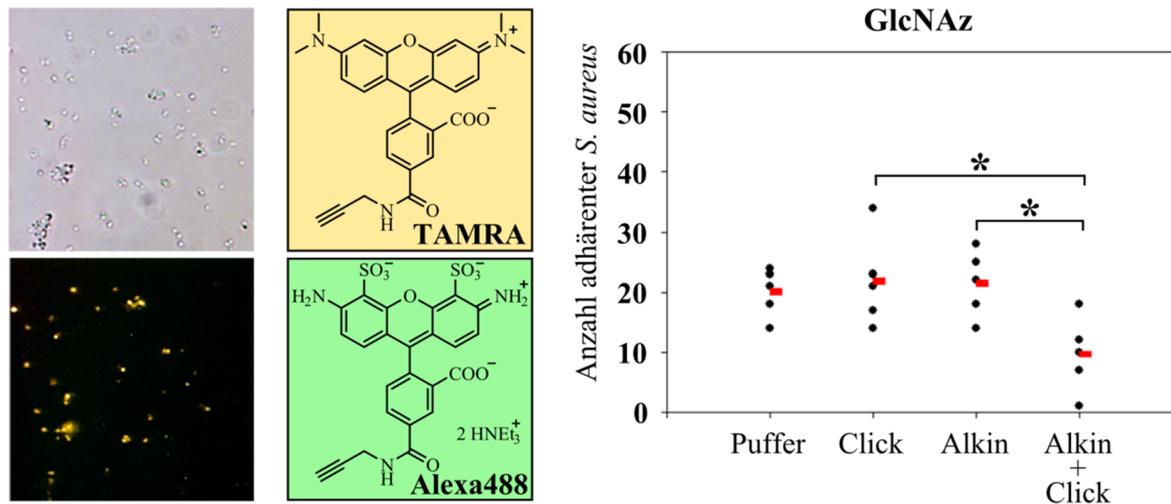


Abb. 4-5: Nach der Inkubation mit GlcNAz wurden die auf der Zelloberfläche von *S. aureus* präsentierten Azidfunktionen unter Clickbedingungen mit einem alkinmodifizierten Fluoreszenzfarbstoff (TAMRA bzw. Alexa488, Strukturen angegeben) markiert (links, Hellfeld- und korrespondierende Fluoreszenzaufnahme nach Reaktion mit TAMRA). Diese Markierung sorgte für eine signifikante Reduktion der Anzahl adhärennder Bakterien auf T24 (rechts).

Das für eukaryotische Zellen verwendbare peracetylierte Analogon Ac₄GlcNAz führte dagegen nicht zu einer Markierung der bakteriellen Oberfläche.

Die Identität der adressierten Glycanstrukturen auf *S. aureus* ist bisher unbekannt, eine Auswahl potentieller Kandidaten wird aber auf den Einbau des Azidozuckers hin untersucht, um neue Angriffspunkte zur Bekämpfung auch antibiotikaresistenter Bakterien zu identifizieren.

Auch die durch die Wahl des Azidoanalogons ermöglichte Diskriminierung zwischen verschiedenen Organismen lässt sich möglicherweise therapeutisch nutzen, indem einzelne pathogene Bakterienstämme gezielt adressiert werden, symbiotische Stämme (und auch der menschliche Körper) dagegen unbeeinflusst bleiben.

Die bisher vorgestellten Teilprojekte dieser Dissertation dienten jeweils der Untersuchung und Identifizierung von Kohlenhydrat-Erkennungsprozessen auf diversen Oberflächen. Neben den Modellen der Glycochips wurden auch Glycanstrukturen auf lebenden Zellen charakterisiert und mittels Metabolic Glycoengineering gezielt strukturell verändert.

Diese Ansätze führen möglicherweise zu einem vertieften Verständnis von Adhäsions-, Zell-Zell-Interaktions- und Infektionsprozessen auf molekularer Ebene sowie der Entwicklung neuartiger diagnostischer und therapeutischer Ansätze.

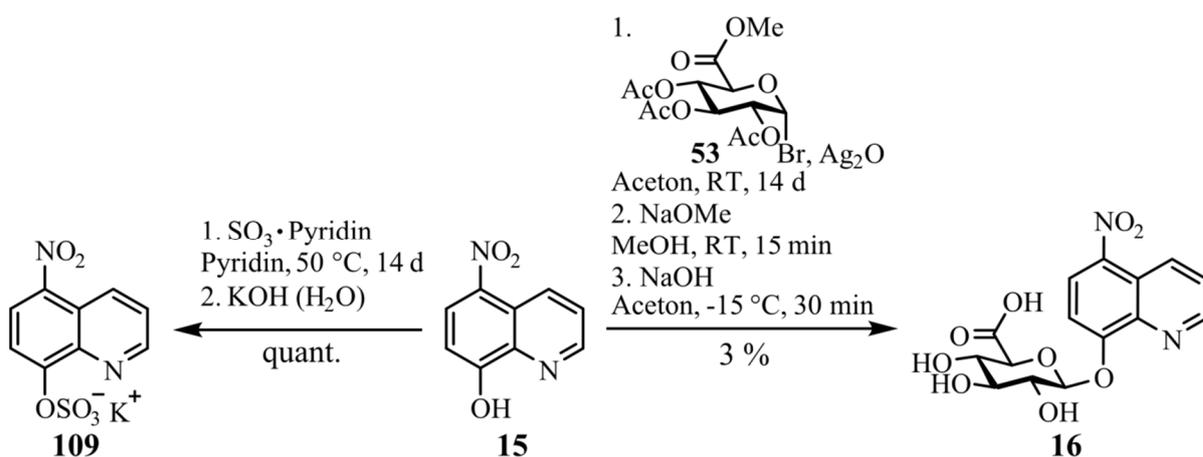
Projekt F:

Synthese zweier Nitroxolinanaloge als Referenz für quantitative LC-MS-Studien und die Untersuchung ihres antibakteriellen Potentials

Doch auch auf dem Gebiet der konventionellen Behandlungsformen sind zahlreiche Details des Metabolismus und Wirkspektrums bekannter Arzneistoffe weiterhin unbekannt. So wird das Antibiotikum Nitroxolin bereits seit 1967 erfolgreich in der Behandlung unkomplizierter Harnwegsinfekte eingesetzt; hier wirkt es als Antibiotikum und Antiadhäsivum.

Trotz seiner verbreiteten Nutzung wurden die Metabolite des Wirkstoffs bisher weder strukturell charakterisiert noch auf ihr Wirkspektrum hin untersucht. Aus diesem Grund wurden die zwei postulierten Hauptmetabolite, ein Sulfat sowie ein Glucuronid des Nitroxolins dargestellt.

Die Synthese des Sulfats erwies sich als unproblematisch, die Addition von Schwefeltrioxid führte quantitativ zum gewünschten Produkt. Die Kupplung der Glucuronsäure mit dem elektronenarmen Aromaten unter Königs-Knorr-Bedingungen lieferte dagegen das gewünschte Konjugat nur in 8 % Ausbeute, auch bei der Entfernung der Schutzgruppen wurden über zwei Stufen nur 33 % des gewünschten Produkts isoliert.



Schema 4-3: Synthese der beiden postulierten Hauptmetabolite des Antibiotikums Nitroxolin.

Die Syntheseroute bietet also noch Optimierungspotential, nichtsdestotrotz konnte die Struktur der beiden postulierten Metabolite verifiziert werden.

Die beiden Verbindungen wurden von Wagenlehner *et al.* bereits als Referenzen für die Analytik von Urinproben verwendet, um die Zusammensetzung des Metabolitengemischs quantitativ zu charakterisieren.^[542] Nach einmaliger Gabe einer oralen Dosis von 250 mg Nitroxolin (**15**) konnten sie bis zu 28 mg/l des Sulfats **17** im Urin nachweisen. Die Grundverbindung wurde dagegen mit maximal 0.5 mg/l detektiert. Ausgehend von relativen Messungen wurde für das Glucuronid **16** als zweitem Hauptmetaboliten eine Konzentration postuliert, welche die des Sulfats nochmals deutlich übersteigt. Diese Daten bedürfen weiterer Untersuchungen, um auch die Konzentration des Glucuronsäurekonjugats im Urin zu quantifizieren.^[542]

Die Studie belegt aber bereits jetzt die Vermutung, dass die Konzentration der beiden Metabolite am Wirkort des Antibiotikums die der Grundverbindung bei weitem übersteigt. Damit tragen sie mit hoher Wahrscheinlichkeit entscheidend zur bakteriostatischen Wirkung des Arzneistoffs bei. Zur Überprüfung dieser Hypothese sowie der Bestimmung des Wirkprofils der beiden Verbindungen wurden in der Gruppe von Dr. Tobias Ölschläger (Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg) erste Versuchsreihen *in vitro* im Infektionsmodell durchgeführt. Das Modell quantifiziert die Adhäsion von *E. coli* auf T24-Blasenepithelzellen (vgl. auch Kapitel 3.4.3) in Gegenwart definierter Konzentrationen des Wirkstoffs und seiner Metabolite. Basierend auf den so gewonnenen Ergebnissen

kann die Dosierungsempfehlung des Arzneistoffs neu evaluiert und gegebenenfalls angepasst werden, um eine möglichst effektive antimikrobielle Wirkung zu erzielen.

Für neu entwickelte Antiinfektiva auf Basis des in Kapitel 3.3 vorgestellten Galabiosemotivs dienen Nitroxolin und seine Metabolite als Referenz zur Definition der Wirkstärke.

Aktuelle Studien belegen zudem eine antiangiogenetische sowie antiproliferative Wirkung des Nitroxolins und einiger seiner Derivate. Damit sind die dargestellten Metabolite und ihr Wirkspektrum auch für eine onkologische Anwendung interessant.

Fazit und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Auswahl von Kohlenhydraterkennungsprozessen auf der artifiziellen Oberfläche von Glychips, aber auch auf nativen Zellen auf molekularer Ebene untersucht.

Die organisch-synthetisch dargestellten Kohlenhydratmotive und -analoge wurden unter Beteiligung zahlreicher Kooperationspartner und Nutzung verschiedenster analytischer Methoden wie quantitativen Fluoreszenzarrays, MALDI-Massenspektrometrie sowie hochauflösender Fluoreszenzmikroskopie verwendet, um Bindungsereignisse zu detektieren und auch quantitativ zu erfassen.

Die bearbeiteten Projekte tragen als einzelne Puzzleteile jeweils spezifische Details zum besseren Verständnis medizinisch relevanter kohlenhydratbasierter Erkennungsprozesse bei (siehe Abb. 4-6). Dieses Wissen kann zukünftig als Basis für die Entwicklung neuartiger diagnostischer und therapeutischer Verfahren dienen. Vor allem die Glychips besitzen das Potential für eine Anwendung in der Früherkennung von Tumoren^[80] und Infektionskrankheiten,^[240] bedürfen aber insbesondere hinsichtlich ihrer Sensitivität noch der Optimierung.

Auch die Ausweitung der Bibliothek der präsentierten Glycanstrukturen eröffnet dem System zusätzliche Einsatzmöglichkeiten. Die hohe Relevanz der Methode wird durch die Arbeit des Consortium for Functional Glycomics (CFG) belegt, wo die kontinuierliche Erweiterung des Arrays angestrebt wird. Zudem stehen der dort entwickelte Glychip und die daraus gewonnenen Ergebnisse der gesamten wissenschaftlichen Gemeinschaft zur Verfügung. So können neue kohlenhydratbindende Strukturen – auch auf Pathogenen – identifiziert und als Targets gezielt adressiert oder als neuartige Vakzine verwendet werden.

Die Entwicklung neuartiger, glycanbasierter Antiadhäsiva, deren Bindungsverhalten parallel auf artifiziellen wie auch nativen Oberflächen evaluiert wird, adressiert als Fernziel ebenfalls eine therapeutische Anwendung. Große Hoffnungen weckt dieser Ansatz insbesondere in der Bekämpfung multiresistenter Keime, die aufgrund der lange vernachlässigten Entwicklung neuer Antibiotika zunehmend schwierig wird.

Auch in der Therapie maligner Erkrankungen wird mit zunehmendem Verständnis der glycanabhängigen molekularen Erkennungsprozesse mit einem Durchbruch gerechnet. Erste Studien zum Einsatz von Kohlenhydratmotiven als Vakzin sowie zur Verwendung glycanbindender Antikörper befinden sich bereits in der klinischen Phase.^[80]

Die Untersuchung von Kohlenhydraterkennungsprozessen auf zellulärer Ebene ist weiterhin von grundlegender Bedeutung für das Verständnis der komplexen molekularen Vorgänge bei Zell-Zell-Interaktionen jeglicher Art. Mikroskopietechniken wie *d*STORM ermöglichen hier die Untersuchung von Clusterbildung und -verhalten während zellulärer Wechselwirkungen mit bisher unerreichter räumlicher Auflösung.

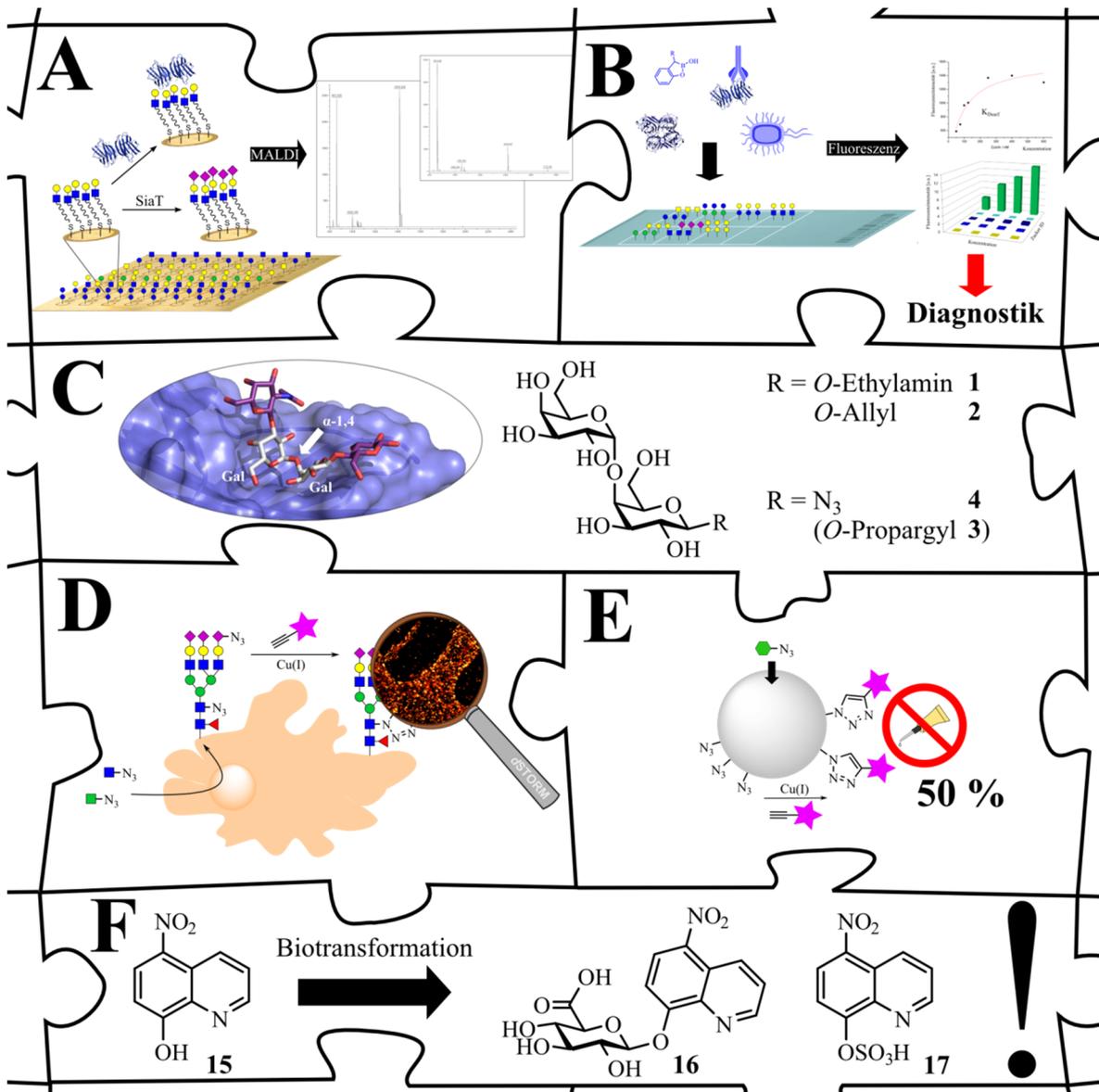


Abb. 4-6: Übersicht der bearbeiteten Teilprojekte und der erzielten Ergebnisse. Eine Auswahl von Kohlenhydraten wurde mit einem Linker funktionalisiert und auf dem Goldchip immobilisiert. Dort wurde sie für das Aktivitätsscreening humaner Sialyltransferasen verwendet. Erste erfolgreiche Übertragungsreaktionen konnten nachgewiesen werden (A). Der funktionalisierte Glaschip wurde erfolgreich als Modellsystem zur Evaluierung und Quantifizierung von Bindungsereignissen eingesetzt. Dabei wurde eine Vielzahl von Bindungspartnern (Lectine, synthetische Boronlectine, tumorassoziierte Proteine, Pathogene) verwendet, um Bindungspräferenzen zu detektieren und K_D -Werte zu bestimmen (B). Galabiose, das Hauptbindungsmotiv uropathogener *E. coli* (UPEC) wurde chemisch-synthetisch dargestellt und mit diversen Linkern für den Einsatz auf dem Glycochip sowie für das Metabolic Glycoengineering versehen (C). Die Oberflächenglycane humaner Neuroblastomzellen wurden durch Metabolic Glycoengineering adressiert und mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Mit Hilfe der hochauflösenden Mikroskopietechnik *d*STORM wurden erstmals Daten zur Dichte und Verteilung der Glycane mit einer Auflösung von ca. 20 nm gewonnen (D). Die gezielte Modifizierung der Oberflächenglycane von *S. aureus* führte zu einer signifikanten Reduktion der Adhäsion des Bakteriums auf humanen Epithelzellen (E). Die beiden postulierten Hauptmetabolite des konventionellen Antibiotikums und Antiadhäsivums Nitroxolin wurden erfolgreich dargestellt und in ersten Studien zur Strukturverifizierung sowie quantitativen Analytik von Urinproben verwendet (F).

Die gezielte Modulierung der Oberfläche sowohl eukaryotischer als auch prokaryotischer Zellen durch Metabolic Glycoengineering eröffnet weitere Strategien zur Behandlung von Tumor- und Infektionskrankheiten. So können Erkennungsmotive möglicherweise gezielt maskiert oder auch installiert werden, um Bindungsereignisse zwischen Zellen zu unterbinden oder auch definiert zu stimulieren.

Mit zunehmender Kenntnis kohlenhydratabhängiger zellulärer Prozesse und Interaktionen werden die komplexen und hochinteressanten Glycanstrukturen künftig sicher eine Schlüsselposition in zahlreichen medizinischen Anwendungen einnehmen.

5 Summary

Interactions between carbohydrates and proteins often are crucial factors in the molecular recognition processes of infectious diseases or cancer, leading to adhesion and cell cell interaction, as well as immune response and immune tolerance.^[27, 34, 77, 79] Despite of their high pertinence for diagnostics and successful therapeutic treatment of those diseases, the structures and mechanisms involved are still insufficiently studied and poorly understood. So it was the aim of this strongly interdisciplinary oriented dissertation, to study carbohydrate recognition processes on molecular basis and in detail by combining methods from different scientific schools like chemistry and pharmacy, biology and medicine, as well as physics. Based on the achieved results innovative diagnostic and therapeutic applications should be proposed.

Initially the highly complex structural composition of a living cells' surface was reduced to its' glycan fraction and mimicked on the surface of so-called glycochips in a very simplified manner. Two systems, based on gold and glass surfaces respectively, were used due to their complementary applicability for different analytical methods like mass spectrometry and quantitative fluorescence spectroscopy.

The step forward towards living cell surfaces was achieved by metabolic glycoengineering, a method that enables the covalent installation of defined binding motifs by performing a cycloaddition between two bioorthogonal reaction partners (e.g. azide and alkyne).

In cooperation with the group of *Prof. Dr. Markus Sauer* (Universität Würzburg) this technique was used to determine the density and spatial distribution of different cell surface glycans on human cell lines with high resolution fluorescence microscopy (*d*STORM). In the glycochip model these parameters exhibited a key value for binding processes and multivalent recognition. Even on native cell surfaces they are crucial factors of molecular recognition processes – closely related to the lateral and temporal dynamics of the structural motifs.

In addition the specific modification of cell surface glycans itself can be used to manipulate molecular interaction processes. This could be shown for the human pathogenic bacterium *Staphylococcus aureus* by significant reduction of its adhesion potential towards epithelial cells derived from the human bladder after metabolic glycoengineering.

Finally a supplementary project aimed to synthesize two prior postulated metabolites of the conventional antibiotic agent nitroxoline that shows bacteriostatic as well as antiadhesive effects. They were used as reference compounds to verify the postulated structure of the two derivatives and currently undergo further studies concerning their intrinsic mode of action. In addition to the parent molecule they also serve as reference compounds to estimate the potential of novel antiadhesives.

The results obtained from the single projects of this work are summarized in some detail in the following chapter.

Project A:**Development of a glycochip suitable for mass spectrometry analytics and screenings**

The glycochip based on an electrically conducting gold surface is suitable for mass spectrometry analysis of carbohydrate recognition and binding processes and can as well be used as a screening platform for enzymatic transformations. Its' design is applicable for the parallel analysis of up to 64 samples, being both fast and easy on resources; chemoenzymatic reactions can be performed in parallel as well, requiring only small reaction volumina of about 1 μl .

A selection of mono- and disaccharides (see Fig. 5-1) was coupled to an ethanolamine linker, starting from their fully acetylated precursors, in order to bind them to the chip surface.

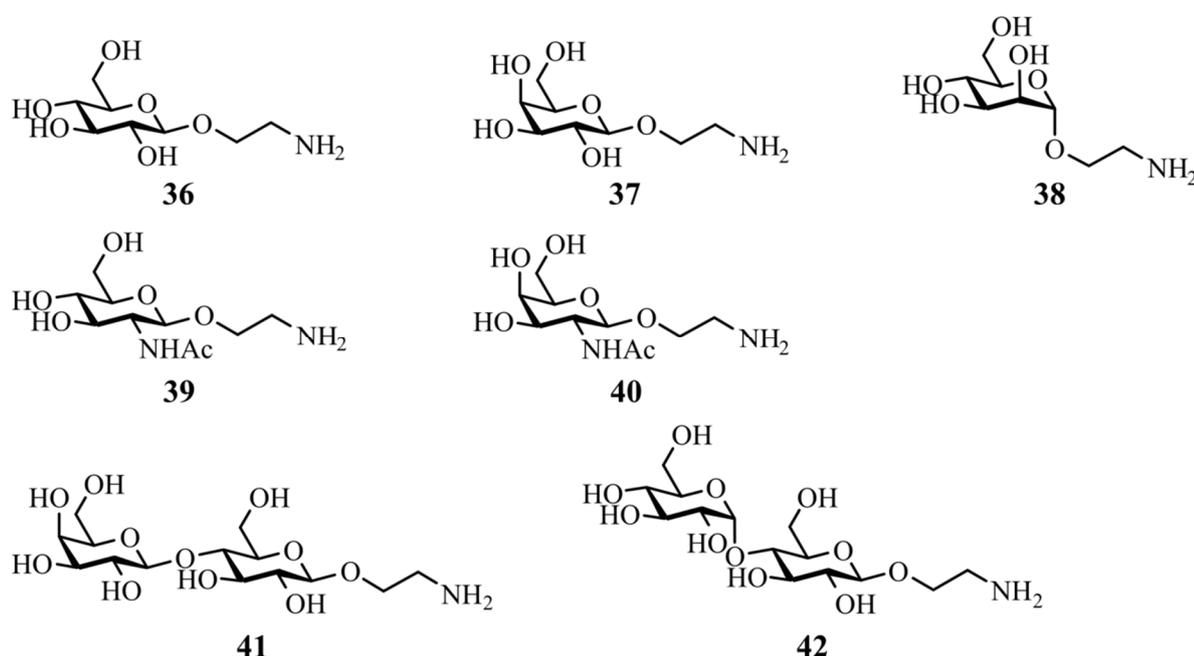


Fig. 5-1: Overview of the mono- and disaccharides prepared for immobilization on the gold chip. All of the carbohydrates were coupled to ethanolamine as linker moiety.

The carbohydrates were immobilized on top of a SAM (self assembling monolayer), which was composed of two alkylthiols, differing in length and terminating functionality (so-called spacer and linker). The disaccharide *N*-acetyllactosamine however was synthesized on the chip surface itself via enzymatic transfer of a galactose moiety onto *N*-acetylglucosamine. The construction of the monolayer as well as the attachment of the carbohydrates was monitored via MALDI mass spectrometry. The gold chip presenting five monosaccharides and three disaccharides is currently under investigation together with *Dr. Maria Ortiz-Soto* (Universität Würzburg) and in particular used for the screening of a set of human sialyl transferases she produced recombinantly.

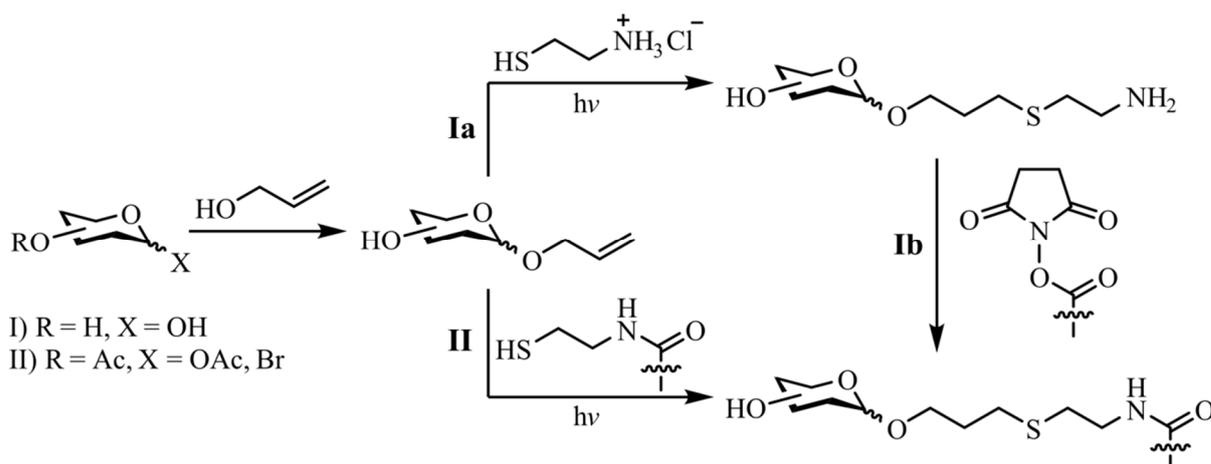
First positive results prove the successful transfer of sialic acid onto the acceptor *N*-acetyllactosamine, which also shows the first sialyl transferase active on a gold chip.

Further investigation towards optimizing the method and expanding the range of acceptors and enzyme variants are currently performed.

Project B:**Development of a glycochip suitable for qualitative and quantitative studies of carbohydrate binding processes**

The glycochip based on a glass slide can be used for detection and quantification of carbohydrate recognition processes with analytics complementary to the gold chip. The detected parameter is the fluorescence intensity of a suitably tagged binding partner. As it is true for the gold chip, only small amounts of glycans and binding partners are needed and numerous individual experiments can be performed in parallel on one single chip.

The linker used for immobilization to the surface also terminates in an amine functionality, however a slightly longer spacing unit proved to be better suited to present the glycans sufficiently flexible and sterically unimpeded. The linker was introduced in a two-step approach; after glycosylation of allyl alcohol, cysteamine was photochemically added to the double bond. The second reaction step does not have to be performed before coupling the glycans to the chip surface. Indeed the UV reaction can as well be carried out on a surface presenting terminal thiol functionalities. Thus for every glycan one synthetic step, but also the often challenging isolation of the free amine can be avoided (see Scheme 5-1).



Scheme 5-1: The photochemical elongation of the linker can be performed in solution (Ia) as well as on solid support of the pretreated chip surface (II). Compared to the two-step procedure Ia-Ib, II takes additional advantage from avoiding the need to isolate the free amine.

This carbohydrates presenting surface can be utilized for a variety of purposes; it was used and established to investigate miscellaneous binding processes.

First of all the system was validated according to a procedure described by Liang *et al.*,^[164] who determined the affinity of the plant lectin ConA for mannose in a quantitative approach. The obtained dissociation constant $K_{D,surf}$ was 79 nM (SD = 18 nM) and showed reasonable accordance to the literature data (83 nM).

Based on these preliminary results the array of binding partners was expanded together with *Dr. Dorith Claes* (Universität Hamburg) who had synthesized several synthetic lectins starting from a tripodal adamantyl scaffold that contained up to three benzoboroxole moieties.^[432] Their binding profile was first studied in a qualitative assay, that included five mono- and two disaccharides (see Fig. 5-2). Galactose (as well as LacNAc that also contains a terminal galactose moiety) was identified as preferred binding motif, while mannose showed

only weak affinity and all of the other glycans featured no affinity at all. This selectivity can be attributed to the presence of a *cis*-diol (3-OH, 4-OH in galactose; 2-OH, 3-OH in mannose), that is able to form a rather stable cyclic ester with the benzoboroxoles without generating significant ring strain.

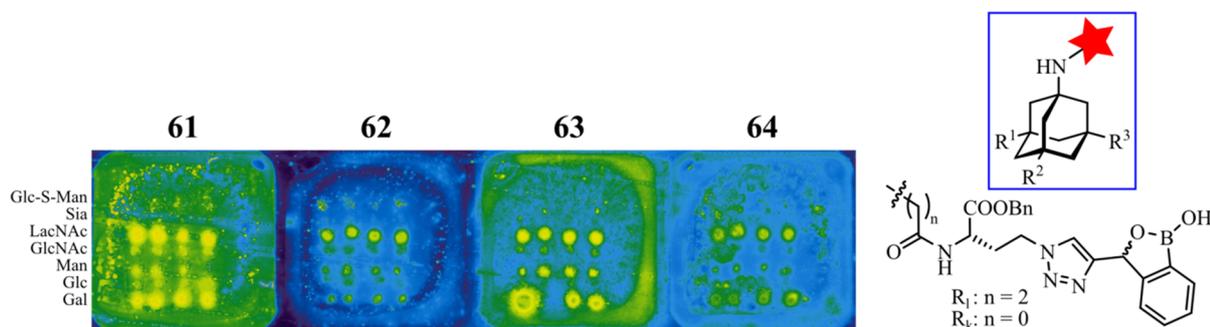


Fig. 5-2: Fluorescence intensities (false colour coded) of the glycochip after incubation with the boronoligomers synthesized by *Dr. Dorith Claes*.^[432, 435] The preference for LacNAc, galactose and mannose is clearly perceptible.

Three of the boroxoles exhibiting qualitatively determined highest affinities were further investigated and their binding towards galactose was measured quantitatively. $K_{D,surf}$ values of 185 nM for dimer **62**, 48 nM for long trimer **63** and 108 nM for short trimer **64** were obtained.^[435] The affinities of the synthetic compounds are thus in the same range that is found for many naturally occurring carbohydrate binding proteins, the lectins. In the future they may possibly find an application in clinical diagnostics and therapy. Accompanying further developments of the synthetic lectin structures the glycochip is applicable to characterize their binding properties.

On the other hand the glycochip can also be used as a diagnostic tool itself, e.g. for detection of tumor associated proteins or bacterial pathogens.

Galectins are carbohydrate binding proteins that recognize *N*-acetyllactosamine as well as lactose motifs on cell surfaces and by that regulate numerous signaling and communication pathways. Especially the overexpression of galectin-1 is often associated with cancer and its enhanced aggressiveness. On that score *Dr. Nadja Bertleff-Zieschang* (Universität Würzburg) developed a set of LacNAc-based structures with increased affinity by using the concept of rational ligand design.^[444] Their potential to detect clinically relevant serum concentrations of the protein galectin-1 was evaluated on the glycochip.

Although prior SPR studies revealed only a minor enhancement in the affinity of the designed ligands compared to the natural binding motifs lactose and LacNAc, we expected further increase of this effect due to the multivalent presentation of the carbohydrate on the chip surface. This should facilitate a discrimination of the different structures.

First of all binding of the protein, tagged with a fluorescent dye, towards the glycans was verified. Indeed the novel ligands were recognized and gave a significant signal, while lactose and LacNAc could not be detected (see Fig. 5-3, left part).

However the detection of the native protein seems to be more relevant for a clinical application of the system and could be achieved in a sandwich structure using specific antibodies (see Fig. 5-3, right part). Thus also the discrimination of the two structurally similar galectins Gal-1 and Gal-3 was possible.

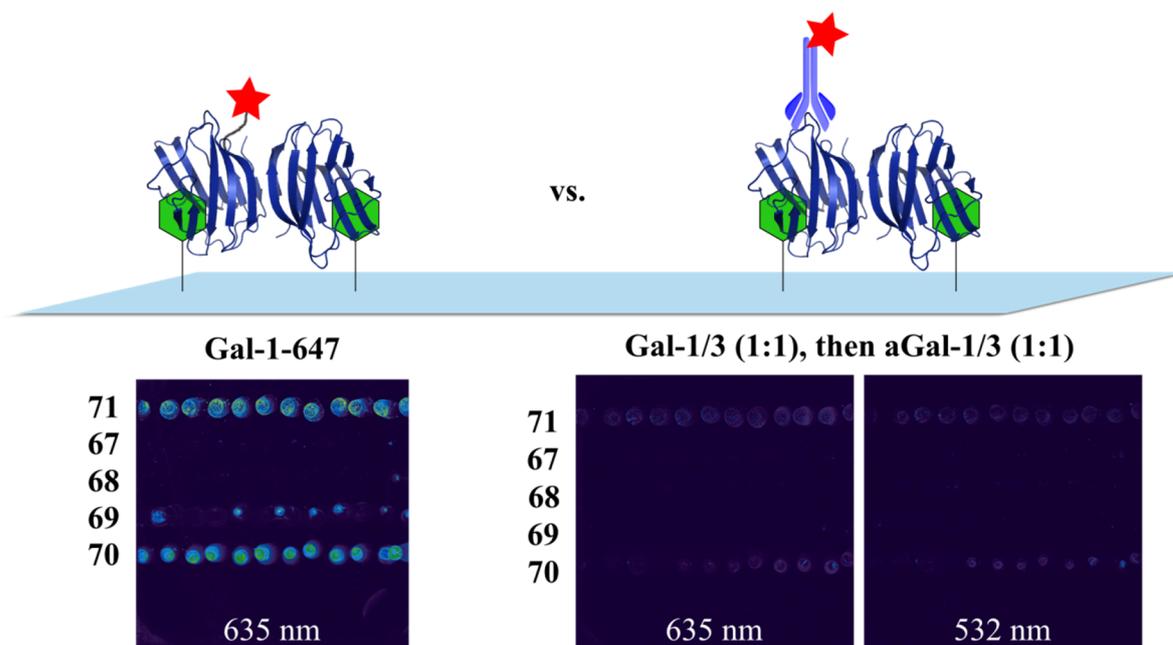


Fig. 5-3: Detection of the tumor associated protein galectin-1 on the glycochip was successful with both the fluorescently labeled protein (left part) as well as in a sandwich structure with unlabeled protein and a fluorescently tagged antibody (right part, aGal-1: Alexa647; aGal-3: Alexa555). The fluorescent dyes were excited at 635 and 532 nm, respectively.

Moreover initial experiments to detect clinically relevant concentrations of galectin derived from a prostate cancer cell line were performed together with *Prof. Dr. Jörg Wischhusen* (Universitätsklinikum Würzburg). Still the method needs further optimization of the analytical sensitivity, yet studies using samples from tumor patients will be realized subsequently. So the presented glycochip may possibly find its way into clinical diagnostics of galectin-associated (malignant) diseases.

However, not only binding of isolated proteins, but also adhesion of whole cells towards binding motifs, which are presented on the chip surface, is possible. First studies including various human pathogenic bacteria (*E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *N. gonorrhoeae*) could prove binding of *E. coli* on mannose. This affinity can be attributed to the presence of type 1 pili on the bacterial surface. Such carbohydrate binding proteins, which cause adhesion on human cells and thereby initiate an infection process, are postulated for a multitude of pathogens; still only a small subset of such structures is known. An extended set of binding motifs presented on the glycochip may be able to study and characterize the protein structures as well as their binding preferences. Hence the chip is suitable to identify pathogens depending on their adhesion-“fingerprint”, so to enable faster diagnostics and appropriate treatment options in the future.

Complementary to its original application as glycochip the glass-based microarray was used for a series of further studies.

In an inverted experimental setup mannose binding proteins were immobilized onto the surface. Their affinities towards two tripodal mannose presenting compounds (synthesized by *Carsten Fleck*, Universität Hamburg) were quantified. The structures differed just in the length of their spacing unit, which regulates the special flexibility of the presented glycan motifs. Highest affinities were found with the tetrameric protein ConA, corresponding to

dissociation constants $K_{D,surf}$ of 0.53 and 0.50 μM , respectively. The dimeric lectins PSA and LcH showed $K_{D,surf}$ values one order of magnitude higher. While the monomeric reference compound showed no quantifiable affinity, the trivalent presentation and geometric preorganization of the binding motifs explains the significant increase in affinity (multivalency effect). However the determined affinities are only in the low micromolar range and by that too weak for a medically relevant application of the compounds.^[463] Still the concept of a multivalent, geometrically preorganized presentation of binding motifs is a promising basis for further studies, which may be accompanied by affinity determination on the lectin chip.

Furthermore together with *Dr. Stephanie Bank* (Universität Würzburg) initial studies were performed in order to bind *N*-glycans, which she isolated from natural sources and coupled to a biotin functionalized linker, onto a streptavidin modified chip surface. The complex mannose rich structures were successfully detected with ConA. Hence the glycochip can support the characterization of naturally occurring glycans as an analytical method complementary to mass spectrometry.^[469]

Even a chemical secondary functionalization of the chip surface is possible. For this purpose an analogue of mannose, containing an azide functionality was coupled to an amine linker and immobilized on the glass slide, where it was transformed in a classical Huisgen-Sharpless-Meldal reaction with an alkyne. First studies to define suitable reaction conditions were performed by *Dr. Tessa Lühmann* and *Gabriel Jones* (both Universität Würzburg). They used an easily detectable alkyne modified fluorescent dye. After the covalent coupling of the dye, but also of alkyne modified glycans it was moreover possible to suppress the recognition of the underlying mannose motif by ConA. Consequently the chip is suitable for a use as model of a cell surface glycocalyx that can be further functionalized.

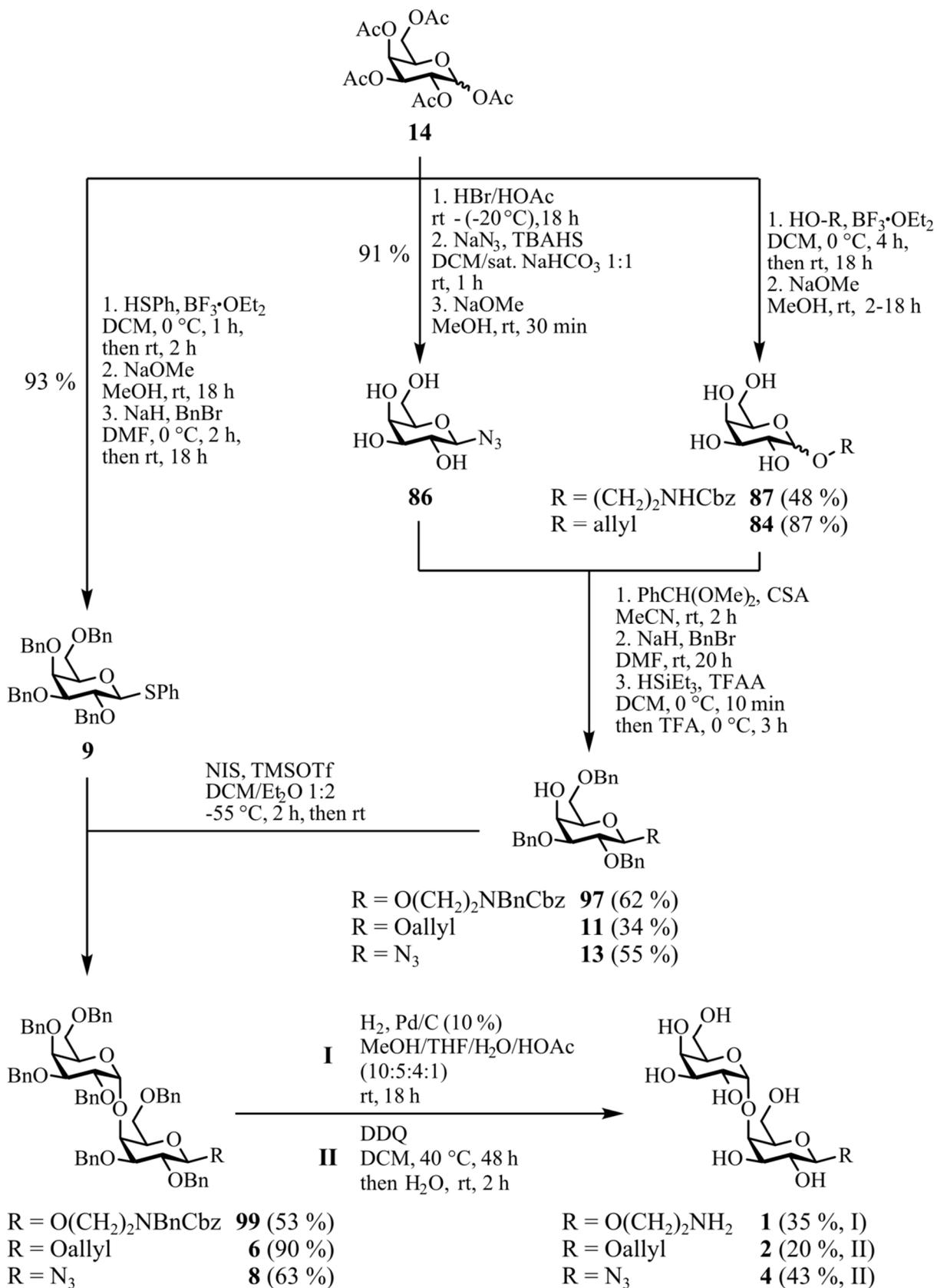
In this context ongoing experiments of *Dr. Tessa Lühmann* and *Gabriel Jones* deal with the immobilization of the protein FGF-2 (an extracellular growth factor) on the surface. Therefore the protein was equipped with an alkyne side chain on one of its amino acids. Its influence on the stimulation of cell proliferation shall be studied *in vitro* in order to develop biocompatible surface coatings for medical implants that stimulate tissue regeneration.

The microarray system of the glycochip on a glass slide was used in a variety of modifications in order to detect and characterize carbohydrate recognition events.

A number of techniques established in this dissertation is suitable for applications in clinical diagnostics as well as in therapeutic attempts of cancer and infectious diseases. Ongoing studies yet address first ideas towards clinically relevant questions and applications.

Project C:

Synthesis of the galabiose motif with diverse linkers for glycochips and click reactions



Scheme 5-2: Synthesis of the galabiose motif with diverse linkers for glycochips and metabolic glycoengineering.

Galabiose, a disaccharide build up from two galactose moieties linked by an α -1,4 glycosidic bond, is presented on epithelial cells of the human urinary tract. Uropathogenic *E. coli* (UPEC) express an adhesin (PapG) which binds this structure with high selectivity. This ensures adhesion of bacteria and subsequently leads to an infection.

Three derivatives of galabiose, equipped with an adequate linker were synthesized for binding studies on the surface of the recently described chips as well as for presentation on living cells' surfaces via metabolic glycoengineering.

The disaccharides were prepared in a convergent sequence following the retrosynthetic considerations discussed in chapter 3.1 (see Schema 3-1). Key step of the route was the stereoselective coupling of the two prefunctionalized galactose derivatives, that both were synthesized starting from fully acetylated galactose **14** using several protecting group manipulations.

A fourth derivative carrying a propargyl linker was also coupled to the disaccharide, however the final step, deprotection of the benzyl groups wasn't successful so far. This conversion was only possible for the other three compounds **99**, **6**, and **8** via catalytic hydrogenation and oxidatively using DDQ, respectively (see Scheme 5-2).

Now the derivatives can be used for immobilization on the previously described glycochip systems and cell surfaces, where further binding studies can be performed.

Project D:

Metabolic glycoengineering of human cells and investigation of the density and distribution of cell surface glycans

Metabolic glycoengineering enables the covalent derivatisation of living cells' glycocalyx. Together with the Sauer group (in particular *Sebastian Letschert*, Universität Würzburg) the glycans of human neuroblastoma cells (SK-N-MC) were addressed by the azido analoga Ac₄GlcNAz, Ac₄ManNAz and Ac₄GalNAz and furthermore labeled with a fluorescent dye. In combination with the high resolution microscopy technique *d*STORM it was for the first time possible to determine density and spatial distribution of the tagged carbohydrates on the cell surface with so far unmatched resolution of about 20 nm.

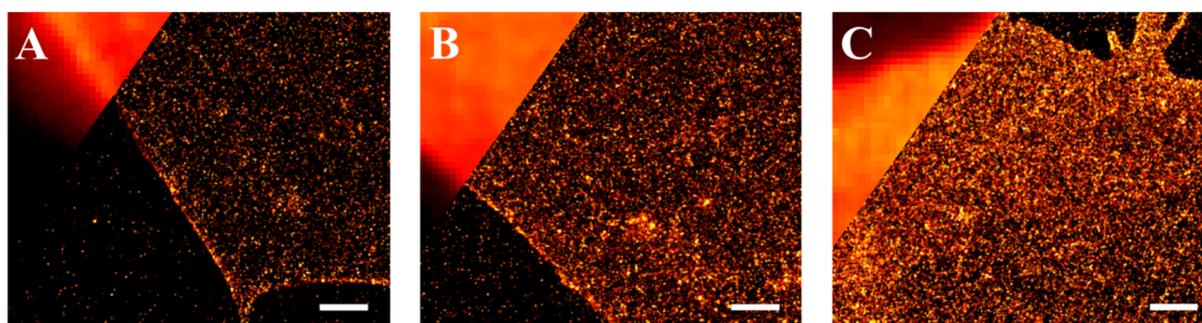


Fig. 5-4: Neuroblastoma cells (SK-N-MC) were incubated with A) Ac₄GlcNAz, B) Ac₄ManNAz, and C) Ac₄GalNAz, respectively, followed by click reaction with alkyne modified Alexa647. In all three cases a homogeneous distribution of the fluorescence localisations is observed, however the density of localisations differs significantly. Images were provided by *Sebastian Letschert* (scale bar 1 μ m).

Remarkable is the homogenous distribution of fluorescence localisations over the whole basal membrane of the cells, that is observed in all three cases (see Fig. 5-4); in clear contrast to other prior investigated membrane components (proteins) no cluster formation was detected. The density of the localisations shows a strong dependence on the used metabolic precursor. While the highest density with 1500-1700 localisations/ μm^2 was observed for Ac₄GalNAz, only about 600 and 1100 localisations/ μm^2 were found for Ac₄GlcNAz and Ac₄ManNAz, respectively.^[505]

On the one hand this result reflects the molecular composition of the glycocalyx of the used cell line, on the other hand the three azido analogues probably address different subpopulations of the presented glycans. While Ac₄ManNAz and Ac₄GalNAz target numerous membrane proteins and lipids, Ac₄GlcNAz is preferably integrated into intracellular O-glycans and thereby presumably only a reduced percentage can be detected on the cell surface. Further on the images contain no detailed information about the precise structure and distribution of the labeled glycans but only permit a qualitative classification. Further discrimination of single subpopulations should be possible by incubation with selectively binding and also fluorescently labeled lectins in multicolor experiments.

Ongoing projects moreover deal with the induction and role of membrane clusters in the presence of tumor related proteins and bacterial pathogens. Knowing the surface structure of (pathologically altered) cells could lead to an enhanced comprehension of the molecular coherences and recognition processes during a disease. Thus in the future new diagnostic and therapeutic possibilities based on glycan structures may be established. The target tissues could possibly be selectively addressed with active agents on the basis of their unique glycan structures. Otherwise one can imagine to interfere with signal pathways and adhesion processes of cells and tissues by specific modification of the glycocalyx and hereby selectively influence crucial cellular events.

Conjugation of therapeutic proteins like growing factors via metabolic glycoengineering as well as the defined modification of the extracellular matrix may also be an interesting attempt to regulate their long time effects.

Project E:

Metabolic glycoengineering of bacteria and examination of adhesion processes

Modification of cell surface glycans also enables the specific manipulation of intercellular interactions.

Together with *Dr. Tobias Ölschläger* (Universität Würzburg) the surface structure of the human pathogenic bacterium *S. aureus* was specifically altered by metabolic glycoengineering. After incubation with the azido analogue GlcNAz the click reaction was performed with the alkyne modified fluorescent dyes tetramethylrhodamine (TAMRA) and Alexa488, respectively. In an *in vitro* model the adhesion of the bacteria towards epithelial cells of the human bladder (T24) was significantly reduced by nearly 50 % (see Fig. 5-5).^[552]

In contrast, the acetylated analogue Ac₄GlcNAz, that can be used to label eukaryotic cells, did not lead to any labeling of the bacterial surface.

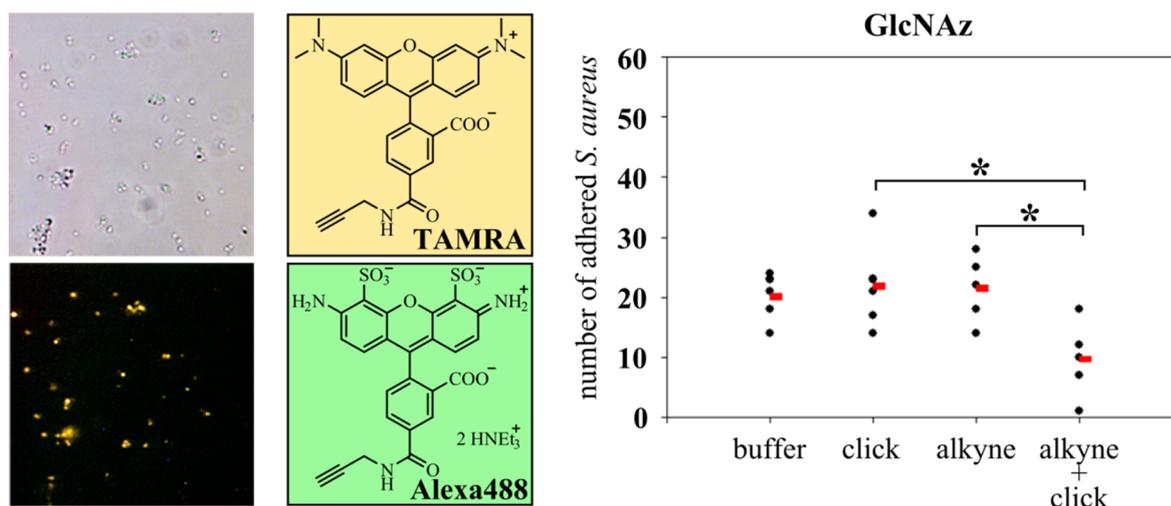


Fig. 5-5: After incubation with GlcNAz the azide functionalities, presented on the cell surface of *S. aureus*, were labeled with an alkyne modified fluorescent dye (TAMRA or Alexa488, structures shown) under click conditions (left part, brightfield and corresponding fluorescent image after reaction with TAMRA). The tagging significantly reduced the number of bacteria adhering to T24 (right part).

Still the identity of the tagged glycan structures on *S. aureus* is unknown. A selection of potential candidates is currently explored for the incorporation of the azido sugar, so possibly new targets in the fight against (even antibiotic resistant) bacteria may be identified.

Also the selection of the azido analogue allows for the discrimination between different organisms, which may be further used in therapeutic attempts: individual pathogenic bacteria strains may be addressed selectively, while symbiotic strains (as well as the human body) are not negatively affected.

The projects discussed in this summary so far dealt with one common topic: the analysis and identification of carbohydrate recognition processes on diverse surfaces. Besides the model systems of glycochips living cells were used to characterize their carbohydrate structures and specifically alter them via metabolic glycoengineering.

These approaches may possibly lead to an intensified comprehension of adhesion, cell cell interaction and infection processes on molecular level as well as the development of new diagnostic and therapeutic attempts.

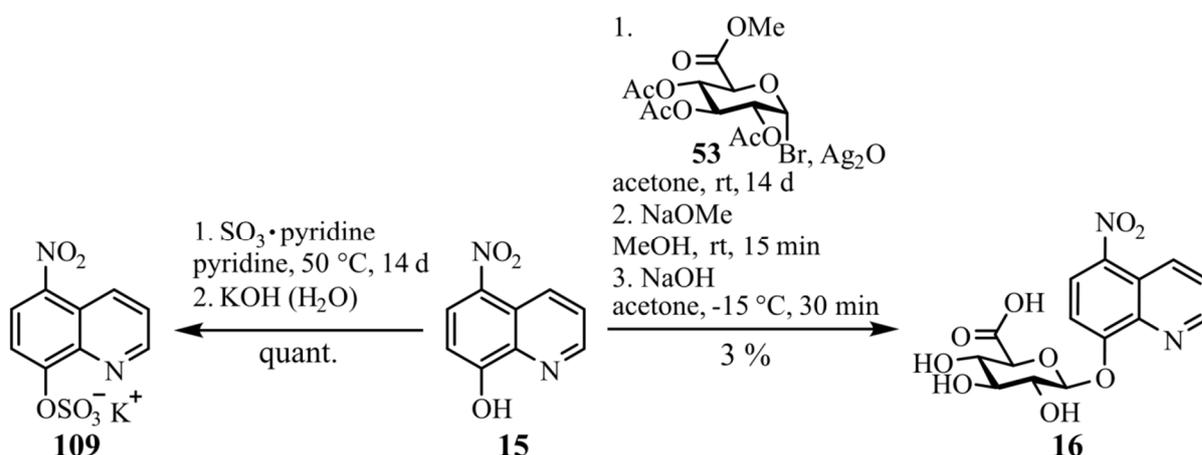
Project F:

Synthesis of two nitroxoline analogues as reference compounds for quantitative LC-MS studies and analysis of their antibacterial potential

Also in the area of conventional therapeutic strategies many details concerning metabolism and mode of action of well-known pharmaceutical agents are still undiscovered. The antibiotic nitroxoline, for example, is used successfully for the treatment of uncomplicated urinary tract infections since 1967; it works as an antibiotic as well as an antiadhesive.

Despite of its' common application, the metabolites of the active agents so far were neither characterized nor was their specific mode of action investigated. For that reason two formerly postulated main metabolites, a sulfate and a glucuronide of nitroxoline, were synthesized.

The synthesis of the sulfate structure was quite unproblematic, electrophilic addition of sulfur trioxide quantitatively generated the desired product. Coupling of the glucuronic acid with the electron deficient aromatic nitroxoline under Königs-Knorr conditions on the other hand gave the desired conjugate in only 8 % yield. Also the two-step deprotection procedure yielded only 33 % of the desired product.



Scheme 5-3: Synthesis of the two formerly postulated main metabolites of the antibiotic agent nitroxoline.

Hence the synthetic route still needs to be further improved, nevertheless the structure of the two postulated metabolites could be verified.

Both compounds were used as reference substances for the analysis of urine samples by Wagenlehner *et al.* who aimed to characterize the composition of the metabolite mixture in a quantitative manner.^[542] After administration of a single oral dose containing 250 mg nitroxoline (**15**) up to 28 mg/l of sulfate **17** were detected in the urine samples. In contrast the parent compound was found with maximum 0.5 mg/l. Assuming from relative measurements the concentration of the glucuronide **16** was estimated to clearly exceed that of the sulfate. These data need to be further investigated, in order to quantify the concentration of the conjugate with glucuronic acid in urine samples.^[542]

Anyhow the study already proves the assumption, that the concentration of the two main metabolites of nitroxoline clearly exceeds the concentration of their parent compound in its' place of action, the urinary tract. This means it is highly probable that they contribute to the bacteriostatic activity of the pharmaceutical agent. To test this hypothesis, initial series of experiments were performed in the group of Dr. Tobias Ölschläger (Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg). The *in vitro* infection model quantitatively determines the adhesion of *E. coli* on T24 (bladder) epithelial cells (also see chapter 3.4.3) in the presence of defined amounts of the active agent and its' metabolites. Based on the results the dose recommendation of the drug may be reevaluated and adjusted if necessary, so the most effective antimicrobial effect can be achieved.

Nitroxoline and its metabolites may also serve as reference compounds to determine the potency of newly developed anti-infectives based on the galabiose motif already discussed in chapter 3.3.

Besides, current studies proved an antiangiogenic and antiproliferative activity of nitroxoline and some of its derivatives. The two metabolites therefore may also be interesting for oncological studies and applications.

Conclusion and future perspectives

During the work on the presented dissertation a selection of carbohydrate recognition processes on artificial surfaces (glycochips) as well as on native cells was investigated on molecular level.

The carbohydrate motifs and analogues synthesized organic-synthetically were used in numerous projects with a considerable number of cooperation partners. Several kinds of analytical methods including fluorescence assays, MALDI mass spectrometry and high resolution fluorescence microscopy were utilized to detect binding events and to capture them quantitatively.

Every single project adds a new piece to the jigsaw puzzle of understanding specific details of medically relevant carbohydrate based recognition events (see Fig. 5-6). This knowledge may serve as base for the development of new diagnostic as well as therapeutic tools. Especially the glycochips hold the capability for applications in early detection of tumors^[80] and infectious diseases,^[240] but need to be further optimized in their analytical sensitivity.

Expansion of the library of presented glycan structures also opens new scopes for the application of the technique. The high relevance of the method is verified by the effort of the Consortium for Functional Glycomics (CFG), who aim to extend the array continuously. Furthermore, their glycochip and the results obtained from it are available to the whole scientific community. Newly discovered carbohydrate binding structures – also on pathogens – may thus be discovered and addressed as specific targets or used as new kinds of vaccines.

The development of new glycan based antiadhesiva – in parallel with the evaluation of their binding properties on artificial as well as native surfaces – provides long-term goals like therapeutic applications. Especially in the fight against drug resistant (also multiresistant) pathogens – which is constantly getting harder after a long period of time with neglect in antibiotics development – the attempt stirs up hope.

For the treatment of tumor diseases the increasing comprehension of glycan dependent molecular recognition processes also rises hope for a breakthrough. First trials using carbohydrate motifs as vaccines as well as utilizing glycan binding antibodies already reached the clinical phase.^[80]

The investigation of carbohydrate recognition events on a cellular level is also of fundamental importance to understand the highly complex molecular processes in cell cell interactions of all kind. Microscopy techniques like *d*STORM enable the investigation of cluster formation and behavior during cellular interactions with a spatial resolution unreached so far.

The specific modulation of eukaryotic and prokaryotic cell surfaces by metabolic glycoengineering provides further strategies to treat tumors and infectious diseases. It may be possible to mask and/or install certain recognition motifs in order to prevent or stimulate defined binding events between cells.

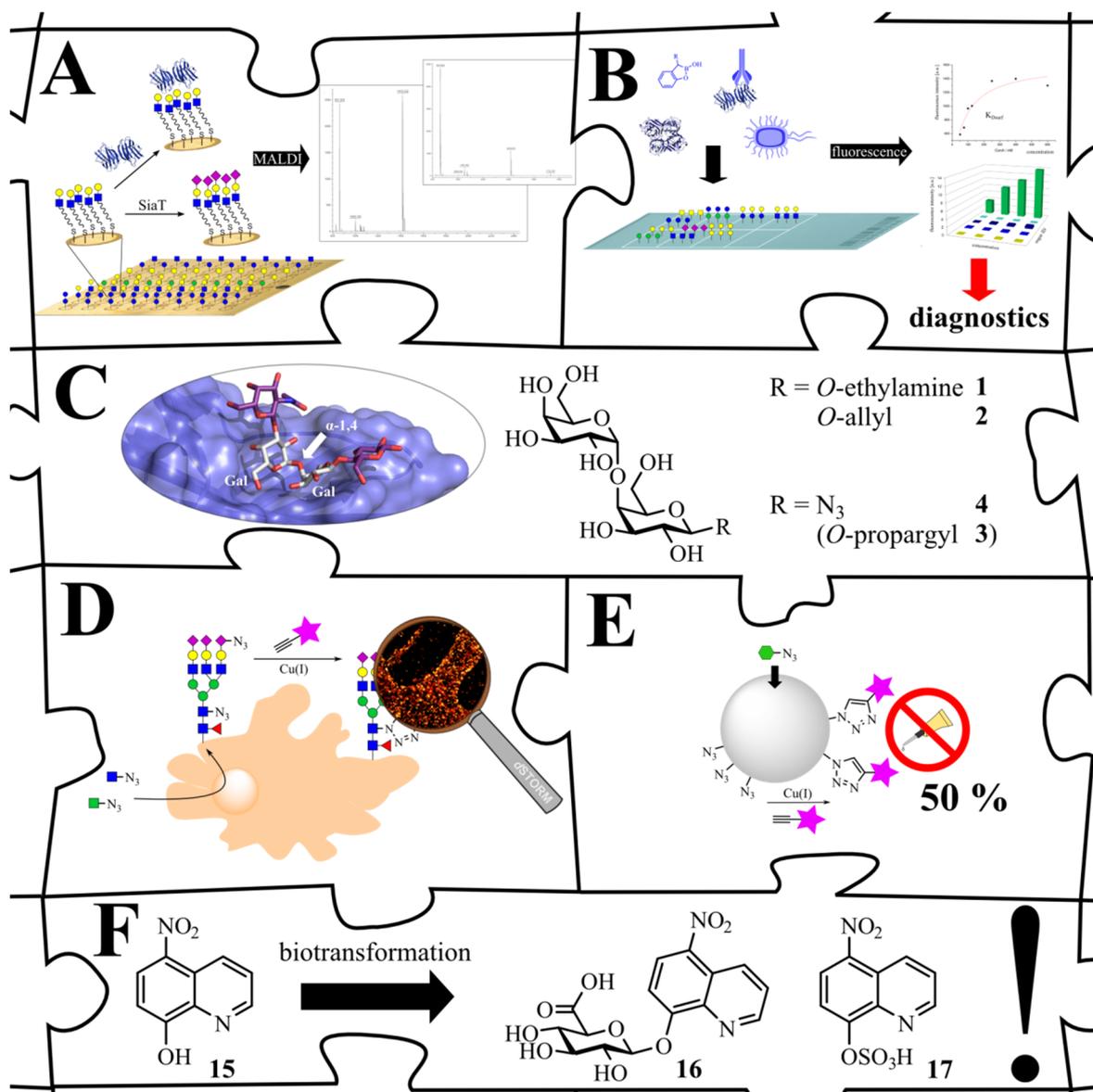


Fig. 5-6: Summary of the thesis projects and the achieved results. A selection of carbohydrates was coupled to a linker and immobilized on the gold chip. The functionalized surface was used for an activity screening of human sialyl transferases. First successful transfer reactions were detected (A). The functionalized glass chip was used as model system to evaluate and quantify binding events. A variety of binding partners (lectins, synthetic boronolactins, tumor associated proteins, pathogens) was utilized to detect binding preferences and to determine K_D values (B). Galactose, the main binding motif of uropathogenic *E. coli* (UPEC) was synthesized and equipped with diverse linker moieties for an application on the glycochip and for metabolic glycoengineering (D). Cell surface glycans of human neuroblastoma were addressed by metabolic glycoengineering and tagged with a fluorescent dye. With the high resolution fluorescence microscopy technique *d*STORM density and distribution of the glycans were imaged with a resolution of about 20 nm for the first time (D). Selective modification of the cell surface glycans of *S. aureus* caused a significant reduction of bacterial adhesion on human epithelial cells (E). The two formerly postulated main metabolites of the conventional antibiotic and antiadhesivum nitroxoline were successfully synthesized. They were used in first studies to verify the postulated structures and to quantify metabolite concentrations in urine samples (F).

With increasing knowledge of carbohydrate dependent cellular processes and interactions the highly complex but also highly interesting glycan structures will undoubtedly gain a key position in numerous medical applications.

6 Experimentalteil

6.1 allgemeine Arbeits- und Messtechniken

6.1.1 Geräte und Materialien

Kernresonanzspektroskopie

Bruker AVANCE 400 FT-NMR-Spektrometer (^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz)

Bruker DMX 600 FT-NMR-Spektrometer (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz)

NMR-Spektren wurden bei 25 °C (DMX 600) bzw. 27 °C (AVANCE 400) aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen δ sind in ppm, Kopplungskonstanten J in Hz angegeben. Als interner Standard dienten bei ^1H -Spektren die Resonanzsignale der Restprotonen der verwendeten deuterierten Lösungsmittel [$\delta(\text{CDCl}_3) = 7.26$ ppm, $\delta([\text{d}_6]\text{DMSO}) = 2.50$ ppm, $\delta([\text{d}_6]\text{Aceton}) = 2.05$ ppm, $\delta([\text{d}_4]\text{Methanol}) = 3.31$ ppm, $\delta(\text{D}_2\text{O}) = 4.79$ ppm] sowie bei ^{13}C -Spektren die der Kohlenstoffe [$\delta(\text{CDCl}_3) = 77.16$ ppm, $\delta([\text{d}_6]\text{DMSO}) = 39.52$ ppm, $\delta([\text{d}_6]\text{Aceton}) = 29.84$ ppm, $\delta([\text{d}_4]\text{Methanol}) = 49.00$ ppm]. ^{13}C -Spektren in D_2O wurden auf zugegebenes $[\text{d}_6]\text{Aceton}$ ($\delta = 30.89$ ppm) bzw. $[\text{d}_4]\text{Methanol}$ ($\delta = 49.50$ ppm) referenziert. Für die Signalmultiplizitäten wurden folgende Abkürzungen verwendet: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett, br. = verbreitertes Signal sowie sich daraus ergebende Kombinationen.

Die Zuordnung der Signale erfolgte teilweise mit Hilfe von DEPT-135-, COSY-, HSQC-, HMBC-, TOCSY- und NOESY-Spektren.

Massenspektrometrie

Elektronenspray-Ionisation (ESI)

Bruker Daltonics MicroTOF Focus II

Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (MALDI)

Bruker Daltonics autoflex II

UV-Lampe für Photoreaktionen

Lamag Handlampe (254 nm)

Spritzenpumpe

kd Scientific KDS 100

Vakuumpumpen

vacuubrand Membran- und Ölpumpen diverser Typen

Zentrifugen

Eppendorf MiniSpin
Heraeus Fresco 17
Heraeus Multifuge 1L-R
Sigma 1-15
VWR Galaxy Mini

Gefriertrocknung

Christ alpha 2-4 Ldplus

Vakuumkonzentrator

Thermo Savant DNA120 SpeedVac Concentrator

Zubehör für Goldchips

AB Sciex 64-Well Gold Plate (V503476)
AB Sciex Adapter für Applied Biosystems 64-Well Gold Plate (V700314)
Bruker Adapter für Applied Biosystems 96-Well (MTP AB Adapter, Part-No. 26762)
Thiole (Spacer **132** und Linker **131**)
ProChimia Surfaces Sp. z o.o. (Auftragssynthese)

Zubehör für Glaschips

Chips

PolyAn SuperStreptavidin Substrate Slide
SCHOTT NEXTERION[®] Slide H bzw. Slide H MPX-16; Slide P

Print- und Inkubationssystem

Schleicher & Schuell MicroCASTer[™] 8-Pin System
Schleicher & Schuell Bio Science Chip Clip[™]
SCHOTT NEXTERION[®] 16-well self-adhesive superstructure

Array-Reader

Axon Instruments/Molecular Devices Corp. GenePix[®] Personal 4100A
Auswertung und Datenextraktion erfolgten mit GenePix[™] Pro 4.1.

Antikörper

Bioss polyklonale Antikörper (Kaninchen), Bezug über *antibodies-online.com*
Anti-Galectin 1 (Alexa647) & Anti-Galectin 3 (Alexa555)

Sterilbank

Thermo Scientific Safe 2020 Class II

Überkopffrotator

Laborbrand 28000 L28

Inkubatoren

Thermo Scientific MaxQ8000
VWR INCU-Line

Mikroskopie

Zeiss Axiophot mit AxioCam Icc 1-Kameraeinheit
Zeiss Axiovert 25

6.1.2 Lösungsmittel und Chemikalien

Vorbehandlung von Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Chemikalien wie vom Hersteller erhalten und ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Alle Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert und, wo angegeben, nach Standardmethoden unter Schutzgasatmosphäre getrocknet.

Schutzgas

Linde Stickstoff (99.996 %)

Dünnschichtchromatographie (DC)

Macherey-Nagel POLYGRAM® SIL G/UV₂₅₄
Macherey-Nagel ALUGRAM® Xtra SIL G/UV₂₅₄
Merck TLC Silica gel 60 RP-18 F₂₅₄S

Je nach Bedarf wurden DC-Platten auf Kieselgelbasis bzw. RP-18 (inverse Phase) eingesetzt. Die Detektion erfolgte entweder durch Fluoreszenzlöschung bei 254 nm oder durch Anfärben mit geeigneten Färbereagenzien. Lösungsmittelgemische sind in Volumenanteilen (v/v) angegeben.

Säulenchromatographie

Acros Silica gel C18-RP, 17 % C, 0.8 mmol/g (0.04-0.063 mm)
Bio-Rad Laboratories GmbH Biogel P2
Macherey-Nagel Kieselgel 60 (0.04-0.063 mm)

Säulenchromatographische Trennungen wurden an Kieselgel, RP-18 oder Biogel auf Säulen verschiedener Durchmesser und Länge durchgeführt. Die verwendeten Lösungsmittelgemische sind in Volumenanteilen (v/v) angegeben.

6.1.3 Medien und Puffer

Medien für Prokaryoten

LB-Medium	10 g/l Trypton 5.0 g/l Hefeextrakt 5.0 g/l NaCl
B-Medium	10 g/l Trypton 5.0 g/l Hefeextrakt 5.0 g/l NaCl 1.0 g/l K ₂ HPO ₄ 1.0 g/l Glucose

Medien für Eukaryoten

PAA MEM (+ Earle's Salt, + L-Glutamin) mit Zusatz von 10 % FCS

PAA McCoy's 5A (+ L-Glutamin) mit Zusatz von 10 % FCS

PAA RPMI 1640 (+ L-Glutamin) mit Zusatz von 10 % FCS sowie 100 U/ml Penicillin/Streptomycin

PAA Trypsin/EDTA (0.05/0.02 % in PBS)

Puffer

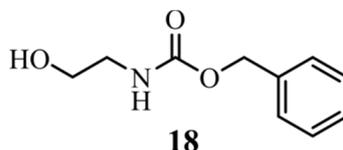
PBS-Puffer (pH 7.5)	2.7 mM KCl 137 mM NaCl 4.3 mM Na ₂ HPO ₄ 1.4 mM KH ₂ PO ₄
PBST-Puffer (pH 7.5)	PBS 0.05 % Tween 20
Print-Puffer Slide H (pH 8.5)	150 mM Phosphat 0.01 % Tween 20
Print-Puffer Slide P (pH 8.5)	Print-Puffer Slide H 5 % Glycerin
Blocking-Puffer Slide H (pH 8.5)	100 mM H ₃ BO ₃ 25 mM Ethanolamin
Blocking-Puffer Slide P (pH 8.5)	Blocking-Puffer Slide H 0.01 % Tween-20
MES-Puffer (0.5 M, pH 7)	500 mM 2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure pH-Wert mit NaOH eingestellt
HEPES-Puffer (0.5 M, pH 7)	500 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure pH-Wert mit NaOH eingestellt
Tris-HCl-Puffer (0.5 M, pH 7.5)	500 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan pH-Wert mit HCl eingestellt

6.2 Synthesevorschriften

Die Benennung der Substanzen erfolgte in Anlehnung an die Nomenklatur-Regeln der IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*).^[17] Kohlenhydrate, deren anomeres Zentrum mit einem weiteren Zucker verknüpft ist, wurden als Substituenten betrachtet und mit wachsender Entfernung zum namensgebenden Bestandteil mit ', '' usw. gekennzeichnet. Die Bezeichnung der Aglycone wurde, wo nötig, gesondert angegeben.

6.2.1 Synthese von Kohlenhydraten zur Konjugation auf dem Goldchip

6.2.1.1 Benzyl-2-hydroxyethylcarbammat (18)



Ethanolamin (**110**, 2.00 ml, 2.04 g, 33.4 mmol) wurde unter Schutzgas in trockenem DCM (30 ml) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Chlorameisensäurebenzylester (Cbz-Chlorid, 3.80 ml, 4.56 g, 26.7 mmol) wurde in trockenem DCM (15 ml) gelöst und innerhalb 2 h mittels Spritzenpumpe zugetropft. Die Lösung wurde innerhalb von 12 h langsam auf RT gebracht, im Scheidetrichter auf ges. NaHCO₃ gegossen, die wässrige Phase dreimal mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das als farbloses Öl erhaltene Produkt (4.93 g, 25.3 mmol, 95 % [Lit.^[384] 100 %]) kristallisierte im Eisbad aus.

Summenformel: C₁₀H₁₃NO₃ (195.22 g/mol)

R_f-Wert: 0.47 (DCM/MeOH 92:8)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.37-7.29 (m, 5H, CH_{Ar}), 5.19 (br., 1H, NH), 5.11 (s, 2H, CH₂-Ph), 3.71 (t, 2H, *J* = 5.1 Hz, CH₂-OH), 3.35 (dt, 2H, *J* = 5.1, 5.2 Hz, CH₂-NH), 2.06 (br. s, 1H, OH) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 157.28 (CO), 136.51 (C_{Ar}, q), 128.69, 128.33, 128.26 (3x CH_{Ar}), 67.07 (CH₂-Ph), 62.46 (CH₂-OH), 43.65 (CH₂-NH) ppm.

MS (MALDI): *m/z* ber. für C₁₀H₁₄NO₃ [M+H]⁺: 196.096; gef.: 196.106.

allgemeine Versuchsvorschrift A (Acetylierung mit Ac₂O/NaOAc)

Der Zucker wurde mit Natriumacetat in Ac₂O suspendiert und für 4 h unter Reflux erhitzt (140 °C). Die abgekühlte Mischung wurde auf Eiswasser gegossen und 18 h bei RT gerührt, dabei setzte sich am Boden ein klebriger Feststoff ab. Dieser wurde durch mehrfaches Ausschütteln mit DCM extrahiert, die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde aus MeOH umkristallisiert.

allgemeine Versuchsvorschrift B (Acetylierung mit Ac₂O/Pyridin)

Der Zucker wurde in Pyridin gelöst, nach Zugabe von Ac₂O (5 Äq) wurde über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in EE bzw. DCM aufgenommen und mit ges. NaHCO₃, 0.1 M CuSO₄ und Wasser gewaschen. Die wässrige Phase wurde mehrfach reextrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

allgemeine Versuchsvorschrift C (Glycosylierung mit Bortrifluorid-Diethyletherat)

Der peracetylierte Zucker wurde mit Benzyl-2-hydroxyethylcarbammat (**18**, 1.2 Äq) unter Schutzgas in trockenem DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. BF₃·OEt₂ wurde innerhalb von 30 min mittels Spritzenpumpe zugetropft, das Reaktionsgemisch über Nacht langsam auf RT gebracht. Die Lewissäure wurde mit NEt₃ gequencht, die Lösung mit DCM verdünnt und mit ges. NaHCO₃, Wasser und Brine gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Cy/EE 4:1-3:2) getrennt.

allgemeine Versuchsvorschrift D (Glycosylierung via Trichloracetimidat)

Die Einführung des Ethanolamin-Linkers mittels Trichloracetimidat-Methode erfolgte in vier Schritten (D1-D4).

[D1] Der peracetylierte Zucker wurde im Vakuum getrocknet, unter Schutzgas in trockenem DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. HBr in Essigsäure (32 %, 5 Äq) wurde langsam zugetropft und die Lösung über Nacht langsam auf RT gebracht. Das Reaktionsgemisch wurde auf Eis gegossen, zweimal mit Wasser, je einmal mit ges. NaHCO₃ und Brine gewaschen und die vereinigten wässrigen Phasen mit DCM reextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das erhaltene Bromid ohne zusätzliche Reinigung weiter umgesetzt.

[D2] Der bromierte Zucker wurde in Aceton/H₂O (v/v 1:1) gelöst, nach Zugabe von Silbercarbonat (1.5 Äq) wurde die Suspension bei RT über Nacht gerührt. Nach Zugabe von DCM wurde der graue Feststoff abfiltriert und die Lösung mit Wasser und Brine gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mehrfach mit DCM reextrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der in anomerer Position deacetylierte Zucker wurde ohne zusätzliche Reinigung weiter umgesetzt.

[D3] Der erhaltene Zucker wurde im Vakuum getrocknet, unter Schutzgas in trockenem DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. Trichloracetonitril (20 Äq, getrocknet über Molsieb 3 Å) und

DBU (1 Äq, getrocknet über Molsieb 4 Å) wurden zugegeben und die Lösung für 1 h bei 0 °C gerührt. Nach Zugabe von Aktivkohle wurde über Celite filtriert und der Rückstand im Vakuum eingeengt. Der Trichloracetimidat-aktivierte Zucker wurde nach Säulenchromatographie (Cy/EE 1:1) erhalten und aufgrund seiner hohen Hydrolyseempfindlichkeit möglichst umgehend weiter umgesetzt.

[D4] Der aktivierte Zucker wurde unter Schutzgas in trockenem DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. Nach Zugabe von Benzyl-2-hydroxyethylcarbammat (**18**, 2 Äq) und BF₃·OEt₂ (1.5 Äq) wurde 1 h bei 0 °C gerührt, mit DCM verdünnt und die Lösung mit Wasser, ges. NaHCO₃ und Brine gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit DCM reextrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Cy/EE 1:1) gereinigt.

allgemeine Versuchsvorschrift E (Glycosylierung via Oxazolin)

Die Einführung des Ethanolamin-Linkers mittels Oxazolin-Methode erfolgte in zwei Schritten (E1-E2), wobei das Oxazolin als Rohprodukt isoliert und direkt weiter umgesetzt wurde.

[E1] Der peracetylierte Aminozucker wurde unter Schutzgas in trockenem DCM gelöst, nach Zugabe von etwas Molsieb 4 Å und TMSOTf (3.5 Äq) wurde über Nacht unter Reflux erhitzt (45 °C). Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt, mit NEt₃ gequench, mit DCM verdünnt und mit ges. NaHCO₃ sowie Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen über Na₂SO₄ wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das erhaltene Oxazolin ohne zusätzliche Reinigung weiter umgesetzt.

[E2] Das Oxazolin wurde unter Schutzgas in trockenem DCM gelöst und nach Zugabe von etwas Molsieb 4 Å sowie Benzyl-2-hydroxyethylcarbammat (**18**, 1.5 Äq) 30 min bei RT gerührt. TMSOTf (0.55 Äq) wurde zugegeben, die Lösung über Nacht bei RT gerührt, anschließend auf 0 °C gekühlt und mit NEt₃ gequench. Die Reaktionsmischung wurde mit DCM verdünnt, mit ges. NaHCO₃ sowie Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Cy/EE 5:1) getrennt.

allgemeine Versuchsvorschrift F (Deacetylierung mit Natriummethanolat)

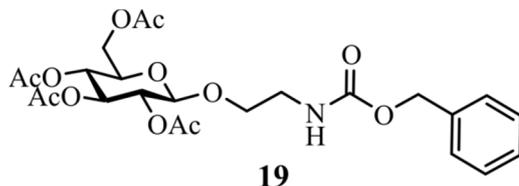
Der acetylierte Zucker wurde unter Schutzgas in trockenem Methanol gelöst und nach Zugabe von Natriummethanolat (0.5 M in Methanol; 0.075 Äq für Monosaccharide, 0.15 Äq für Disaccharide) 2 h bei RT gerührt. Die Lösung wurde mit saurem Ionentauscher (Dowex HCR-W2, H⁺-Form) neutralisiert, filtriert und im Vakuum eingeengt. Falls nötig wurde der Rückstand mittels Säulenchromatographie (DCM/MeOH 10:1-5:1) getrennt.

allgemeine Versuchsvorschrift G (Hydrierung der Cbz-Schutzgruppe)

Der Cbz-geschützte Zucker wurde unter Schutzgas in trockenem Methanol gelöst und mit 10 Massenprozent Pd/C (10 % Pd) versetzt. Der Kolben wurde mit Wasserstoff gespült und die Suspension mit aufgesetztem Wasserstoffballon über Nacht bei RT gerührt. Der Feststoff wurde mittels Zentrifugation entfernt und mehrfach mit Methanol gewaschen, die vereinigten Fraktionen im Vakuum eingeengt. Falls nötig wurde der Rückstand mittels Säulenchromatographie (WIE - MeOH) getrennt.

6.2.1.2 1-O-(2-Aminoethyl)- β -D-glucopyranosid (36)

2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-1-O-(2-benzoyloxycarbonylaminoethyl)- β -D-glucopyranosid (19)



β -D-Glucosepentaacetat (**111**, 500 mg, 1.28 mmol) wurde mit Benzyl-2-hydroxyethylcarbammat (**18**, 300 mg, 1.54 mmol) und $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (812 μl , 6.40 mmol) in DCM (10 ml) laut allgemeiner Versuchsvorschrift C umgesetzt. Das Produkt wurde als farbloser öliges Feststoff (272 mg, 517 μmol , 40 %) isoliert. Die bereinigte Ausbeute (137 mg **111** konnten reisolieren) betrug 56 % [Lit.^[381] 36 %].

Summenformel: $\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{NO}_{12}$ (525.50 g/mol)

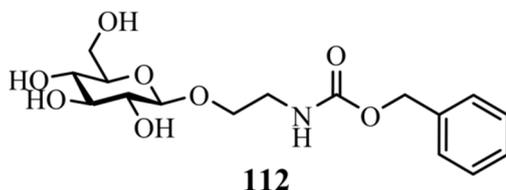
R_f-Wert: 0.01 (Cy/EE 3:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.35-7.29 (m, 5H, CH_{Ar}), 5.19 (dd, 1H, J = 9.6, 9.6 Hz, H3), 5.17 (br. s, 1H, NH), 5.10 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 5.06 (dd, 1H, J = 9.6, 9.9 Hz, H4), 4.97 (dd, 1H, J = 8.0, 9.6 Hz, H2), 4.48 (d, 1H, J = 8.0 Hz, H1), 4.22 (dd, 1H, J = 4.9, 12.3 Hz, H6_a), 4.14 (dd, 1H, J = 2.5, 12.3 Hz, H6_b), 3.89-3.84 (m, 1H, O- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 3.72-3.66 (m, 1H, O- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 3.67 (ddd, 1H, J = 2.5, 4.9, 9.9 Hz, H5), 3.46-3.32 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 2.05, 2.02, 2.00, 1.99 (4x s, 3H, CH_3) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 170.76, 170.35, 169.58, 169.52 (4x COCH_3), 156.52 (CONH), 136.62 (C_{Ar} , q), 128.67, 128.31, 128.28 (3x CH_{Ar}), 101.22 (C1), 72.81 (C3), 72.07 (C5), 71.42 (C2), 69.67 (O- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 68.46 (C4), 66.90 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$), 62.00 (C6), 41.06 ($\text{CH}_2\text{-NH}$), 20.81, 20.72 (4x CH_3) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für $\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{NaNO}_{12}$ [$\text{M}+\text{Na}$]⁺: 548.17385; gef.: 548.17357, Δ ppm: 0.51.

1-O-(2-Benzoyloxycarbonylaminoethyl)- β -D-glucopyranosid (112)



Glucosederivat **19** (240 mg, 457 μmol) wurde mit NaOMe (70.0 μl , 34.0 μmol) in Methanol (6 ml) laut allgemeiner Versuchsvorschrift F umgesetzt. Das Produkt wurde nach Säulenchromatographie als farbloses Öl (118 mg, 330 μmol , 72 % [Lit.^[381] 90 %]) isoliert.

Summenformel: $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{NO}_8$ (357.36 g/mol)

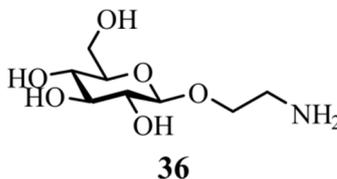
R_f-Wert: 0.35 (DCM/MeOH 4:1)

¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 7.35-7.26 (m, 5H, CH_{Ar}), 5.08 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.26 (d, 1H, J = 7.8 Hz, H1), 3.94-3.89 (m, 1H, O-CH_{2a}-CH₂), 3.85 (dd, 1H, J = 2.0, 11.9 Hz, H6a), 3.65 (dd, 1H, J = 5.4, 11.9 Hz, H6b), 3.67-3.62 (m, 1H, O-CH_{2b}-CH₂), 3.40 (ddd, 1H, J = 4.2, 6.1, 14.2 Hz, CH_{2a}-NH), 3.35 (dd, 1H, J = 9.0, 9.0 Hz, H3), 3.34-3.27 (m, 1H, CH_{2b}-NH), 3.30-3.24 (m, 2H, H4, H5), 3.18 (dd, 1H, J = 7.8, 9.0 Hz, H2) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD): δ = 158.97 (CO), 138.36 (C_{Ar, q}), 129.46, 128.97, 128.83 (3x CH_{Ar}), 104.56 (C1), 77.97 (C4), 77.93 (C3), 75.10 (C2), 71.57 (C5), 70.00 (O-CH₂-CH₂), 67.48 (CH₂-Ph), 62.68 (C6), 42.03 (CH₂-NH) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für C₁₆H₂₃NaNO₈ [M+Na]⁺: 380.13159; gef.: 380.13037, Δ ppm: 3.2.

1-O-(2-Aminoethyl)- β -D-glucopyranosid (36)



Glucosederivat **112** (100 mg, 280 μ mol) wurde mit Pd/C (10 mg) in Methanol (3.5 ml) laut allgemeiner Versuchsvorschrift G hydriert. Das Produkt wurde nach Säulenchromatographie (WIE - WIE/MeOH 1:1 - MeOH) als farbloser glasartiger Feststoff (46.0 mg, 206 μ mol, 74 % [Lit.^[381] 97 %]) erhalten.

Summenformel: C₈H₁₇NO₆ (223.22 g/mol)

R_f-Wert: 0.02 (WIE)

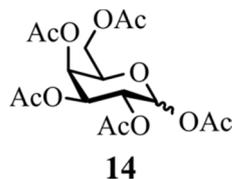
¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 4.27 (d, 1H, J = 7.8 Hz, H1), 3.91 (ddd, 1H, J = 4.4, 5.7, 10.3 Hz, O-CH_{2a}-CH₂), 3.85 (dd, 1H, J = 1.7, 11.9 Hz, H6a), 3.68-3.64 (m, 1H, H6b), 3.61 (ddd, 1H, J = 4.2, 6.4, 10.3 Hz, O-CH_{2b}-CH₂), 3.39-3.35 (m, 1H, H3), 3.29-3.27 (m, 2H, H4, H5), 3.20 (dd, 1H, J = 7.8, 9.1 Hz, H2), 2.86-2.76 (m, 2H, CH₂-NH₂) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD): δ = 104.50 (C1), 77.93 (C5), 77.92 (C3), 75.11 (C2), 72.31 (O-CH₂-CH₂), 71.60 (C4), 62.71 (C6), 42.25 (CH₂-NH₂) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für C₈H₁₇NaNO₆ [M+Na]⁺: 246.09481; gef.: 246.09466, Δ ppm: 0.61.

6.2.1.3 1-O-(2-Aminoethyl)- β -D-galactopyranosid (37)

1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl-D-galactopyranosid (14)



D-Galactose (**113**, 10.0 g, 55.5 mmol) wurde mit Ac₂O (26.2 ml, 278 mmol) in Pyridin (130 ml) laut allgemeiner Versuchsvorschrift B umgesetzt. Das Produkt wurde nach Säulenchromatographie (Cy/EE 2:1) als weißer Feststoff (21.6 g, 55.4 mmol, quant. [Lit.^[553] quant.]) isoliert. Dabei wurden drei Fraktionen erhalten: 9.18 g reines α -Anomer, 8.31 g α/β -Gemisch (4:1) sowie 4.14 g α/β -Gemisch (2:1).

Summenformel: C₁₆H₂₂O₁₁ (390.34 g/mol)

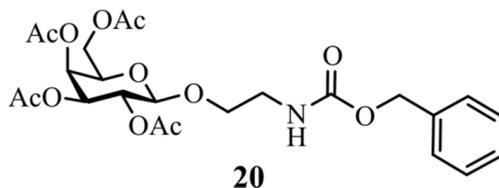
R_f-Wert: α 0.21 (Cy/EE 2:1), β 0.17 (Cy/EE 2:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = [α -Anomer] 6.38 (d, 1H, J = 1.7 Hz, H1), 5.50 (dd, 1H, J = 1.1, 2.7 Hz, H4), 5.34-5.33 (m, 2H, H2, H3), 4.33 (ddd, 1H, J = 1.1, 6.7, 6.7 Hz, H5), 4.12 (dd, 1H, J = 6.7, 11.3 Hz, H6_a), 4.08 (dd, 1H, J = 6.7, 11.3 Hz, H6_b), 2.16, 2.15, 2.04, 2.02, 2.00 (5x s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = [α -Anomer] 170.50, 170.28, 170.26, 170.01, 169.05 (5x COCH₃), 89.89 (C1), 68.93 (C5), 67.59 (C4), 67.53 (C2), 66.61 (C3), 61.40 (C6), 21.02, 20.79, 20.77, 20.74, 20.67 (5x CH₃) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für C₁₆H₂₂NaO₁₁ [M+Na]⁺: 413.10543; gef.: 413.10523, Δ ppm: 0.48.

2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-1-O-(2-benzoyloxyethylcarbamoylaminoethyl)- β -D-galactopyranosid (20)



D-Galactosepentaacetat (**14**, 5.00 g, 12.8 mmol) wurde mit Benzyl-2-hydroxyethylcarbammat (**18**, 3.00 g, 15.4 mmol) und BF₃·OEt₂ (8.12 ml, 64.0 mmol) in DCM (100 ml) laut allgemeiner Versuchsvorschrift C umgesetzt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff (3.26 g, 6.20 mmol, 48 %) isoliert. Die bereinigte Ausbeute (970 mg **14** konnten reisoliert werden) betrug 60 % [Lit.^[381] 62 %].

Summenformel: C₂₄H₃₁NO₁₂ (525.50 g/mol)

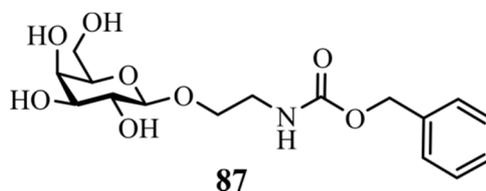
R_f-Wert: 0.05 (Cy/EE 2:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.38-7.29 (m, 5H, CH_{Ar}), 5.38 (dd, 1H, J = 1.0, 3.4 Hz, H4), 5.18 (dd, 1H, J = 7.9, 10.5 Hz, H2), 5.17 (br. s, 1H, NH), 5.10 (s, 2H, CH₂-Ph), 5.00 (dd, 1H, J = 3.4, 10.5 Hz, H3), 4.45 (d, 1H, J = 7.9 Hz, H1), 4.08-4.17 (m, 2H, H_{6ab}), 3.90-3.86 (m, 2H, H5, O-CH_{2a}-CH₂), 3.72-3.66 (m, 1H, O-CH_{2b}-CH₂), 3.46-3.33 (m, 2H, CH₂-NH), 2.15, 2.03, 2.00, 1.98 (4x s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 170.51, 170.34, 170.23, 169.74 (4x COCH₃), 156.4 (CONH), 136.63 (C_{Ar}, q), 128.69, 128.33 (3x CH_{Ar}), 101.72 (C1), 70.98 (C5), 70.93 (C3), 69.61 (O-CH₂-CH₂), 68.99 (C2), 67.14 (C4), 66.93 (CH₂-Ph), 61.48 (C6), 41.06 (CH₂-NH), 20.82, 20.79, 20.78, 20.70 (4x CH₃) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für C₂₄H₃₁NaNO₁₂ [M+Na]⁺: 548.17385; gef.: 548.17352, Δ ppm: 0.60.

1-O-(2-Benzoyloxycarbonylaminoethyl)- β -D-galactopyranosid (87)



Galactosederivat **20** (3.20 g, 6.09 mmol) wurde mit NaOMe (913 μ l, 457 μ mol) in Methanol (90 ml) laut allgemeiner Versuchsvorschrift F umgesetzt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (2.17 g, 6.07 mmol, quant. [Lit.^[381] quant.]) isoliert.

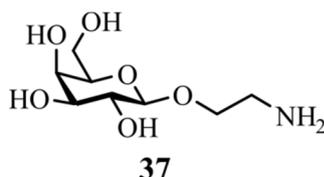
Summenformel: C₁₆H₂₃NO₈ (357.36 g/mol)

R_f-Wert: 0.27 (DCM/MeOH 4:1)

¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 7.35-7.27 (m, 5H, CH_{Ar}), 5.07 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.22 (d, 1H, J = 7.4 Hz, H1), 3.94-3.89 (m, 1H, O-CH_{2a}-CH₂), 3.83 (dd, 1H, J = 1.0, 3.2 Hz, H4), 3.76 (dd, 1H, J = 6.8, 11.3 Hz, H_{6a}), 3.71 (dd, 1H, J = 5.4, 11.3 Hz, H_{6b}), 3.65 (ddd, 1H, J = 4.1, 6.6, 10.6 Hz, O-CH_{2b}-CH₂), 3.53 (dd, 1H, J = 7.4, 9.7 Hz, H2), 3.52-3.49 (m, 1H, H5), 3.47 (dd, 1H, J = 3.2, 9.7 Hz, H3), 3.43-3.28 (m, 2H, CH₂-NH) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD): δ = 158.88 (CO), 138.27 (C_{Ar}, q), 129.43, 128.94, 128.80 (3x CH_{Ar}), 105.05 (C1), 76.63 (C5), 74.79 (C3), 72.52 (C2), 70.22 (C4), 69.87 (O-CH₂-CH₂), 67.45 (CH₂-Ph), 62.45 (C6), 42.01 (CH₂-NH) ppm.

MS (MALDI): m/z ber. für C₁₆H₂₃NaNO₈ [M+Na]⁺: 380.132; gef.: 380.166.

1-O-(2-Aminoethyl)- β -D-galactopyranosid (37)


Galactosederivat **87** (170 mg, 476 μ mol) wurde mit Pd/C (17 mg) in Methanol (6 ml) laut allgemeiner Versuchsvorschrift G hydriert. Das Produkt wurde nach Säulenchromatographie (WIE - WIE/MeOH 1:1 - MeOH) als farbloser öliges Feststoff (80.0 mg, 358 μ mol, 75 % [Lit.^[381] 93 %]) erhalten.

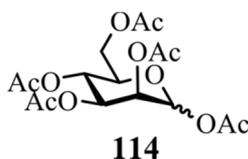
Summenformel: C₈H₁₇NO₆ (223.22 g/mol)

R_f-Wert: 0.06 (WIE)

¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 4.24 (d, 1H, J = 7.5 Hz, H1), 3.92 (ddd, 1H, J = 5.0, 5.0, 10.3 Hz, O-CH_{2a}-CH₂), 3.84 (dd, 1H, J = 1.0, 3.3 Hz, H4), 3.76 (dd, 1H, J = 6.9, 11.4 Hz, H6_a), 3.72 (dd, 1H, J = 5.4, 11.4 Hz, H6_b), 3.63 (ddd, 1H, J = 5.3, 5.3, 10.3 Hz, O-CH_{2b}-CH₂), 3.54 (dd, 1H, J = 7.5, 9.8 Hz, H2), 3.53-3.50 (m, 1H, H5), 3.48 (dd, 1H, J = 3.3, 9.8 Hz, H3), 2.83 (br. s, 2H, CH₂-NH) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD): δ = 105.14 (C1), 76.69 (C5), 74.87 (C3), 72.59 (C2), 72.16 (O-CH₂-CH₂), 70.28 (C4), 62.50 (C6), 42.28 (CH₂-NH₂) ppm.

MS (MALDI): m/z ber. für C₈H₁₈NO₆ [M+H]⁺: 224.113; gef.: 224.138.

6.2.1.4 1-O-(2-Aminoethyl)- α -D-mannopyranosid (38)
1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl-D-mannopyranosid (114)


D-Mannose (**43**, 1.00 g, 5.55 mmol) wurde mit Ac₂O (2.62 ml, 27.8 mmol) in Pyridin (7 ml) laut allgemeiner Versuchsvorschrift B umgesetzt. Das Produkt wurde als farbloses öliges Feststoff (1.99 g, 5.10 mmol, 92 % [Lit.^[381] 97 %]) erhalten, das Anomerenverhältnis α/β betrug 1:4.

Summenformel: C₁₆H₂₂O₁₁ (390.34 g/mol)

R_f-Wert: 0.13 (Cy/EE 2:1)

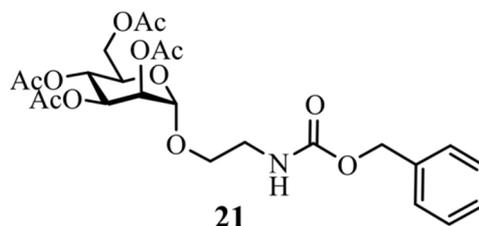
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = [α -Anomer] 5.86 (d, 1H, J = 1.1 Hz, H1), 5.48 (dd, 1H, J = 1.1, 3.3 Hz, H2), 5.32-5.26 (m, 1H, H4), 5.13 (dd, 1H, J = 3.3, 10.0 Hz, H3), 4.30 (dd, 1H, J = 5.4, 12.5 Hz, H6_a), 4.14 (dd, 1H, J = 2.4, 12.5 Hz, H6_b), 3.80 (ddd, 1H, J = 2.4, 5.4, 9.8 Hz, H5), 2.21, 2.10, 2.09, 2.04, 2.00 (5x s, 3H, CH₃); [β -Anomer] 6.08 (d, 1H, J = 1.6 Hz,

H1), 5.38-5.34 (m, 2H, H3, H4), 5.26-5.25 (m, 1H, H2), 4.28 (dd, 1H, $J = 4.9, 12.4$ Hz, H6a), 4.10 (dd, 1H, $J = 2.5, 12.4$ Hz, H6b), 4.07-4.03 (m, 1H, H5), 2.17, 2.17, 2.09, 2.05, 2.00 (5x s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = [\alpha\text{-Anomer}] 171.27, 170.32, 169.92, 168.70, 168.50$ (5x CO), 90.58 (C1), 73.47 (C5), 70.80 (C3), 68.33 (C2), 65.59 (C4), 62.23 (C6), 21.17, 20.87, 20.85, 20.80, 20.66 (5x CH₃) [$\beta\text{-Anomer}] 170.76, 170.11, 169.86, 169.66, 168.18$ (5x CO), 90.77 (C1), 70.77 (C5), 68.89 (C3), 68.50 (C2), 65.73 (C4), 62.27 (C6), 20.98, 20.89, 20.83, 20.78, 20.76 (5x CH₃) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für C₁₆H₂₂NaO₁₁ [M+Na]⁺: 413.10543; gef.: 413.10516, Δ ppm: 0.65.

2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-1-O-(2-benzyloxycarbonylaminoethyl)- α -D-mannopyranosid (21)



D-Mannosepentaacetat (**114**, 500 mg, 1.28 mmol) wurde mit Benzyl-2-hydroxyethylcarbammat (**18**, 300 mg, 1.54 mmol) und BF₃·OEt₂ (812 μ l, 6.40 mmol) in DCM (10 ml) laut allgemeiner Versuchsvorschrift C umgesetzt. Das Produkt wurde als farbloses Öl (322 mg, 613 μ mol, 48 % [Lit.^[381] 57 %]) erhalten.

Summenformel: C₂₄H₃₁NO₁₂ (525.50 g/mol)

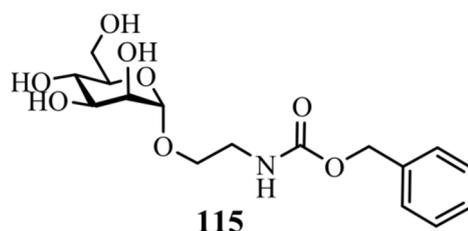
R_f-Wert: 0.07 (Cy/EE 2:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.37\text{-}7.31$ (m, 5H, CH_{Ar}), 5.31 (dd, 1H, $J = 3.3, 10.0$ Hz, H3), 5.26 (dd, 1H, $J = 9.7, 10.0$ Hz, H4), 5.24 (dd, 1H, $J = 1.7, 3.3$ Hz, H2), 5.15 (br. s, 1H, NH), 5.12 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.82 (d, 1H, $J = 1.7$ Hz, H1), 4.25 (dd, 1H, $J = 5.7, 12.2$ Hz, H6a), 4.09 (dd, 1H, $J = 2.4, 12.2$ Hz, H6b), 3.96 (ddd, 1H, $J = 2.4, 5.7, 9.7$ Hz, H5), 3.80-3.72 (m, 1H, O-CH_{2a}-CH₂), 3.58 (ddd, 1H, $J = 3.8, 6.6, 10.4$ Hz, O-CH_{2b}-CH₂), 3.49-3.35 (m, 2H, CH₂-NH), 2.15, 2.08, 2.03, 1.99 (4x s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 170.74, 170.16, 170.05, 169.83$ (4x COCH₃), 156.47 (CONH), 136.53 (C_{Ar}, q), 128.69, 128.33, 128.31 (3x CH_{Ar}), 97.94 (C1), 69.56 (C2), 69.10 (C3), 68.92 (C5), 67.91 (O-CH₂-CH₂), 67.05 (CH₂-Ph), 66.29 (C4), 62.67 (C6), 40.85 (CH₂-NH), 21.00, 20.83, 20.82, 20.81 (4x CH₃) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für C₂₄H₃₁NaNO₁₂ [M+Na]⁺: 548.17385; gef.: 548.17432, Δ ppm: 0.86.

1-O-(2-Benzoyloxycarbonylaminoethyl)- α -D-mannopyranosid (115)



Mannosederivat **21** (310 mg, 590 μ mol) wurde mit NaOMe (88.0 μ l, 44.0 μ mol) in Methanol (8 ml) laut allgemeiner Versuchsvorschrift F umgesetzt. Das Produkt wurde nach Säulenchromatographie als farbloses Öl (173 mg, 484 μ mol, 82 % [Lit.^[381] 95 %]) erhalten.

Summenformel: C₁₆H₂₃NO₈ (357.36 g/mol)

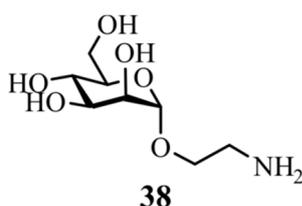
R_f-Wert: 0.43 (DCM/MeOH 4:1)

¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 7.35-7.26 (m, 5H, CH_{Ar}), 5.07 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.76 (d, 1H J = 1.5 Hz, H1), 3.82 (dd, 1H, J = 2.3, 11.7 Hz, H6_a), 3.81 (dd, 1H, J = 1.5, 3.3 Hz, H2), 3.75 (ddd, 1H, J = 4.9, 6.2, 10.3 Hz, O-CH_{2a}-CH₂), 3.70 (dd, 1H, J = 3.3, 9.3 Hz, H3), 3.69 (dd, 1H, J = 5.6, 11.7 Hz, H6_b), 3.61 (dd, 1H, J = 9.3, 9.4 Hz, H4), 3.56-3.49 (m, 2H, H5, O-CH_{2b}-CH₂), 3.39-3.27 (m, 2H, CH₂-NH) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD): δ = 158.96 (CO), 138.36 (C_{Ar}, q), 129.46, 128.96, 128.80 (3x CH_{Ar}), 101.71 (C1), 74.72 (C5), 72.55 (C3), 72.08 (C2), 68.60 (C4), 67.51, 67.47 (O-CH₂-CH₂, CH₂-Ph), 62.90 (C6), 41.71 (CH₂-NH) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für C₁₆H₂₃NaNO₈ [M+Na]⁺: 380.13159; gef.: 380.13138, Δ ppm: 0.55.

1-O-(2-Aminoethyl)- α -D-mannopyranosid (38)



Mannosederivat **115** (130 mg, 364 μ mol) wurde mit Pd/C (13 mg) in Methanol (6 ml) laut allgemeiner Versuchsvorschrift G hydriert. Das Produkt wurde nach Säulenchromatographie (WIE - MeOH) als farbloser glasartiger Feststoff (81.0 mg, 363 μ mol, quant. [Lit.^[381] 93 %]) isoliert.

Summenformel: C₈H₁₇NO₆ (223.22 g/mol)

R_f-Wert: 0.01 (WIE)

¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 4.77 (d, 1H, J = 1.7 Hz, H1), 3.84 (dd, 1H, J = 2.3, 11.8 Hz, H6_a), 3.83 (dd, 1H, J = 1.7, 3.3 Hz, H2), 3.77 (ddd, 1H, J = 4.9, 5.8, 10.0 Hz, O-CH_{2a}-CH₂), 3.71 (dd, 1H, J = 3.3, 9.1 Hz, H3), 3.70 (dd, 1H, J = 5.7, 11.8 Hz, H6_b), 3.61 (dd,

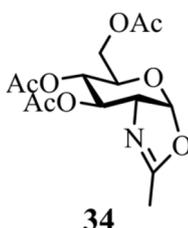
^1H , $J = 9.1, 9.4$ Hz, H4), 3.56-3.52 (m, 1H, H5), 3.46 (ddd, 1H, $J = 4.8, 6.0, 10.0$ Hz, O- $\text{CH}_{2\text{b}}$ - CH_2), 2.86-2.77 (m, 2H, CH_2 - NH_2) ppm.

^{13}C -NMR (100 MHz, MeOD): $\delta = 101.76$ (C1), 74.73 (C5), 72.61 (C3), 72.11 (C2), 70.18 (O- CH_2 - CH_2), 68.68 (C4), 62.96 (C6), 42.13 (CH_2 - NH_2) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{NO}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 224.11286; gef.: 224.11295, Δ ppm: 0.40.

6.2.1.5 2-Acetamido-1-*O*-(2-aminoethyl)-2-deoxy- β -D-glucopyranosid (39)

4,5-Dihydro-2-methyl-(3,4,6-tri-*O*-acetyl-1,2-dideoxy- α -D-glucopyranoso)-[2,1-*d*]-1,3-oxazol (34)



Peracetyliertes β -D-Glucosamin (**116**, 437 mg, 1.12 mmol) wurde mit TMSOTf (709 μl , 3.92 mmol) in DCM (8 ml) laut allgemeiner Versuchsvorschrift E1 umgesetzt. Oxazolin **34** wurde als rötliches Öl (361 mg, 1.10 mmol, 98 % [Lit.^[554] 77 %]) erhalten.

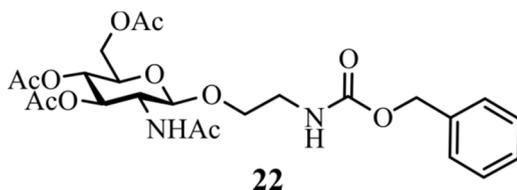
Summenformel: $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{NO}_8$ (329.30 g/mol)

R_f -Wert: 0.37 (EE/Cy 10:1)

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.97$ (d, 1H, $J = 7.4$ Hz, H1), 5.26 (dd, 1H, $J = 2.3, 2.4$ Hz, H3), 4.93 (ddd, 1H, $J = 1.2, 2.3, 9.2$ Hz, H4), 4.18-4.17 (m, 2H, H6_{ab}), 4.16-4.12 (m, 1H, H2), 3.63-3.58 (m, 1H, H5), 2.11, 2.10 (2x s, 3H, CH_3 [Ac]), 2.09, 2.09 (2x s, gesamt 3H, CH_3 [Oxazolin]), 2.08 (s, 3H, CH_3 [Ac]) ppm.

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 170.76, 169.70, 169.37$ (3x COO), 166.86 (CON), 99.57 (C1), 70.53 (C3), 68.53 (C4), 67.71 (C5), 65.11 (C2), 63.50 (C6), 21.06, 20.99, 20.90 (3x CH_3 [Ac]), 14.11 (CH_3 [Oxazolin]) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{NaNO}_8$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 352.10029; gef.: 352.10029, Δ ppm: 0.00.

2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-1-O-(2-benzyloxycarbonylaminoethyl)-2-deoxy- β -D-glucopyranosid (22)


Oxazolin **34** (361 mg, 1.10 mmol) wurde mit Benzyl-2-hydroxyethylcarbammat (**18**, 329 mg, 1.68 mmol) und TMSOTf (108 μ l, 605 μ mol) in DCM (8 ml) laut allgemeiner Versuchsvorschrift E2 weiter umgesetzt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff (196 mg, 374 μ mol, 34 %) isoliert.

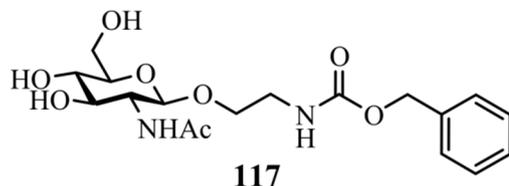
Summenformel: C₂₄H₃₂N₂O₁₁ (524.52 g/mol)

R_f-Wert: 0.07 (EE/Cy 4:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.36-7.29 (m, 5H, CH_{Ar}), 5.48 (d, 1H, J = 8.8 Hz, NHAc), 5.26 (t, 1H, J = 5.7 Hz, NHCbz), 5.18 (dd, 1H, J = 9.8, 9.9 Hz, H3), 5.10 (s, 2H, CH₂-Ph), 5.06 (dd, 1H, J = 9.8, 9.8 Hz, H4), 4.58 (d, 1H, J = 8.3 Hz, H1), 4.22 (dd, 1H, J = 4.8, 12.3 Hz, H6_a), 4.13 (dd, 1H, J = 2.5, 12.3 Hz, H6_b), 3.93-3.87 (m, 1H, H2), 3.87 (ddd, 1H, J = 3.6, 6.1, 10.1 Hz, O-CH_{2a}-CH₂), 3.71-3.65 (m, 1H, O-CH_{2b}-CH₂), 3.66 (ddd, 1H, J = 2.5, 4.8, 9.8 Hz, H5), 3.50-3.43 (m, 1H, CH_{2a}-NH), 3.36-3.29 (m, 1H, CH_{2b}-NH), 2.06, 2.03, 2.03, 1.89 (4x s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 171.17, 170.81, 170.60, 169.46 (4x COCH₃), 156.64 (CO[Cbz]), 136.70 (C_{Ar}, q), 128.66, 128.31, 128.29 (3x CH_{Ar}), 101.30 (C1), 72.51 (C3), 72.10 (C5), 69.19 (O-CH₂-CH₂), 68.53 (C4), 66.85 (CH₂-Ph), 62.17 (C6), 54.72 (C2), 40.91 (CH₂-NH), 23.41 (CH₃CON), 20.83, 20.80, 20.74 (3x CH₃COO) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für C₂₄H₃₂NaN₂O₁₁ [M+Na]⁺: 547.18983; gef.: 547.19032, Δ ppm: 0.90.

2-Acetamido-1-O-(2-benzyloxycarbonylaminoethyl)-2-deoxy- β -D-glucopyranosid (117)


Glucosaminderivat **22** (185 mg, 353 μ mol) wurde mit NaOMe (43.0 μ l, 21.0 μ mol) in Methanol (4 ml) laut allgemeiner Versuchsvorschrift F umgesetzt. Das Produkt wurde nach Säulenchromatographie als weißer Feststoff (105 mg, 263 μ mol, 75 % [Lit.^[381] 99 %]) erhalten.

Summenformel: C₁₈H₂₆N₂O₈ (398.41 g/mol)

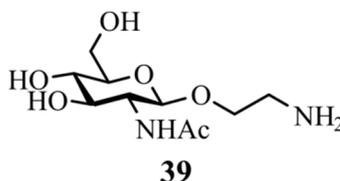
R_f-Wert: 0.51 (DCM/MeOH 4:1)

¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 7.36-7.29 (m, 5H, CH_{Ar}), 5.08 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.40 (d, 1H, J = 8.3 Hz, H1), 3.88 (dd, 1H, J = 2.2, 11.9 Hz, H6a), 3.88-3.83 (m, 1H, O-CH_{2a}-CH₂), 3.68 (dd, 1H, J = 5.7, 11.9 Hz, H6b), 3.65 (dd, 1H, J = 8.3, 10.3 Hz, H2), 3.64-3.58 (m, 1H, O-CH_{2b}-CH₂), 3.45 (dd, 1H, J = 8.4, 10.3 Hz, H3), 3.36-3.25 (m, 4H, H4, H5, CH₂-NH), 1.95 (s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD): δ = 174.02 (COCH₃), 158.79 (CO[Cbz]), 138.28 (C_{Ar}, q), 129.46, 129.00, 128.86 (3x CH_{Ar}), 102.87 (C1), 77.97 (C5), 75.99 (C3), 72.04 (C4), 69.49 (O-CH₂-CH₂), 67.48 (CH₂-Ph), 62.72 (C6), 57.32 (C2), 41.93 (CH₂-NH), 23.00 (CH₃) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für C₁₈H₂₆NaN₂O₈ [M+Na]⁺: 421.15814; gef.: 421.15785, Δ ppm: 0.69.

2-Acetamido-1-O-(2-aminoethyl)-2-deoxy- β -D-glucopyranosid (39)



Glucosamin **117** (100 mg, 251 μ mol) wurde mit Pd/C (10 mg) in Methanol (4.5 ml) laut allgemeiner Versuchsvorschrift G hydriert. Das Produkt wurde als weißer Feststoff (66.2 mg, 250 μ mol, quant. [Lit.^[381] 96 %]) erhalten.

Summenformel: C₁₀H₂₀N₂O₆ (264.28 g/mol)

R_f-Wert: 0.01 (WIE)

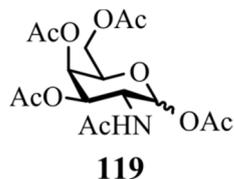
¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 4.41 (d, 1H, J = 8.4 Hz, H1), 3.88 (dd, 1H, J = 2.0, 11.9 Hz, H6a), 3.90-3.85 (m, 1H, O-CH_{2a}-CH₂), 3.68 (dd, 1H, J = 5.5, 11.9 Hz, H6b), 3.66 (dd, 1H, J = 8.4, 10.3 Hz, H2), 3.59 (ddd, 1H, J = 4.3, 6.1, 10.3 Hz, O-CH_{2b}-CH₂), 3.45 (dd, 1H, J = 8.4, 10.3 Hz, H3), 3.34-3.29 (m, 1H, H4), 3.29-3.25 (m, 1H, H5), 2.85-2.75 (m, 2H, CH₂-NH₂), 1.99 (s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD): δ = 173.86 (CO), 102.94 (C1), 78.01 (C5), 76.04 (C3), 72.14 (C4), 72.11 (O-CH₂-CH₂), 62.81 (C6), 57.43 (C2), 42.23 (CH₂-NH₂), 22.97 (CH₃) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für C₁₀H₂₁N₂O₆ [M+H]⁺: 265.13941; gef.: 265.13954, Δ ppm: 0.49.

6.2.1.6 2-Acetamido-1-*O*-(2-aminoethyl)-2-deoxy- β -D-galactopyranosid (40)

2-Acetamido-1,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-2-deoxy-D-galactopyranosid (119)



N-Acetyl-D-galactosamin (**118**, 500 mg, 2.27 mmol) wurde mit Ac₂O (1.07 ml, 11.33 mmol) in Pyridin (5 ml) laut allgemeiner Versuchsvorschrift B acetyliert. Das Produkt wurde als farbloser schaumiger Feststoff (775 mg, 1.99 mmol, 88 %) erhalten, das Anomerenverhältnis α/β betrug 92:8.

Summenformel: C₁₆H₂₃NO₁₀ (389.36 g/mol)

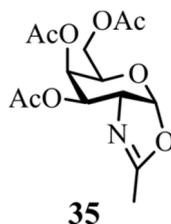
R_f-Wert: 0.18 (EE/Cy 20:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = [α -Anomer] 6.22 (d, 1H, J = 3.6 Hz, H1), 5.42 (dd, 1H, J = 1.4, 3.2 Hz, H4), 5.38 (br. d, 1H, J = 9.2 Hz, NH), 5.22 (dd, 1H, J = 3.2, 11.6 Hz, H3), 4.73 (ddd, 1H, J = 3.6, 9.2, 11.6 Hz, H2), 4.26-4.22 (m, 1H, H5), 4.12 (dd, 1H, J = 6.8, 11.2 Hz, H6_a), 4.06 (dd, 1H, J = 6.7, 11.2 Hz, H6_b), 2.18, 2.17 (2x s, 3H, CH₃), 2.03 (s, 6H, 2x CH₃), 1.95 (s, 3H, NHCOCH₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = [α -Anomer] 171.36, 170.35, 170.12, 168.89 (5x CO), 91.54 (C1), 68.74 (C5), 68.02 (C3), 66.88 (C4), 61.45 (C6), 47.19 (C2), 23.34 (NHCOCH₃), 21.10, 20.89, 20.83, 20.78 (4x CH₃) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für C₁₆H₂₃NaNO₁₀ [M+Na]⁺: 412.12142; gef.: 412.12105, Δ ppm: 0.90.

4,5-Dihydro-2-methyl-(3,4,6-tri-*O*-acetyl-1,2-dideoxy- α -D-galactopyranoso)-[2,1-*d*]-1,3-oxazol (35)



Peracetyliertes D-Galactosamin (**119**, 500 mg, 1.28 mmol) wurde mit TMSOTf (813 μ l, 4.49 mmol) in DCM (10 ml) laut allgemeiner Versuchsvorschrift E1 umgesetzt. Oxazolin **35** wurde als rötliches Öl (419 mg, quant. [Lit.^[555] 85 %]) erhalten.

Summenformel: C₁₄H₁₉NO₈ (329.30 g/mol)

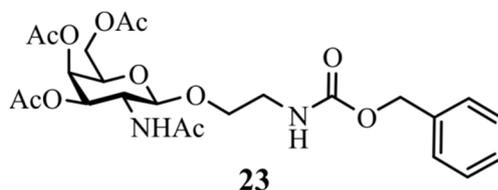
R_f-Wert: 0.17 (EE/Cy 4:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 5.97 (d, 1H, J = 6.8 Hz, H1), 5.44 (dd, 1H, J = 3.0, 3.2 Hz, H4), 4.89 (dd, 1H, J = 3.2, 7.5 Hz, H3), 4.24-4.20 (m, 1H, H5), 4.17 (dd, 1H, J = 6.9, 11.0 Hz, H6a), 4.09 (dd, 1H, J = 5.7, 11.0 Hz, H6b), 4.00-3.95 (m, 1H, H2), 2.10 (s, 3H, CH₃ [Ac]), 2.04 (s, 6H, CH₃ [Ac]), 2.03, 2.03 (2x s, gesamt 3H, CH₃ [Oxazolin]) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 170.58, 170.24, 169.89 (3x COO), 166.50 (CON), 101.59 (C1), 71.92 (C3), 69.63 (C5), 65.43 (C4), 63.73 (C2), 61.70 (C6), 20.89, 20.80, 20.67 (3x CH₃ [Ac]), 14.54 (CH₃ [Oxazolin]) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für C₁₄H₂₀NO₈ [M+H]⁺: 330.11834; gef.: 330.11823, Δ ppm: 0.33.

2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-1-O-(2-benzoyloxycarbonyl-aminoethyl)-2-deoxy- β -D-galactopyranosid (23)



Oxazolin **35** (415 mg, 1.26 mmol) wurde mit Benzyl-2-hydroxyethylcarbammat (**18**, 376 mg, 1.93 mmol) und TMSOTf (128 μ l, 706 μ mol) in DCM (10 ml) laut allgemeiner Versuchsvorschrift E2 weiter umgesetzt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff (411 mg, 784 μ mol, 61 %) erhalten.

Summenformel: C₂₄H₃₂N₂O₁₁ (524.52 g/mol)

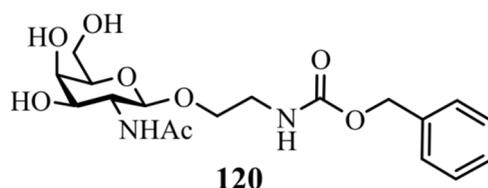
R_f-Wert: 0.07 (EE/Cy 10:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.36-7.31 (m, 5H, CH_{Ar}), 5.42 (d, 1H, J = 8.7 Hz, NHAc), 5.34 (dd, 1H, J = 0.8, 3.0 Hz, H4), 5.27 (br. t, 1H, J = 5.7 Hz, NHCbz), 5.15 (dd, 1H, J = 3.0, 11.5 Hz, H3), 5.10 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.60 (d, 1H, J = 8.2 Hz, H1), 4.13 (d, 2H, J = 6.6 Hz, H6), 4.07-4.00 (m, 1H, H2), 3.92-3.86 (m, 1H, O-CH_{2a}-CH₂), 3.89 (dt, 1H, J = 0.8, 6.6 Hz, H5), 3.70-3.65 (m, 1H, O-CH_{2b}-CH₂), 3.51-3.43 (m, 1H, CH_{2a}-NH), 3.38-3.30 (m, 1H, CH_{2b}-NH), 2.14, 2.03, 2.01, 1.90 (4x s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 170.84, 170.66, 170.52, 170.33 (4x COCH₃), 156.61 (CO[Cbz]), 136.63 (C_{Ar, q}), 128.61, 128.24, 128.20 (3x CH_{Ar}), 101.52 (C1), 70.87 (C5), 70.13 (C3), 69.01 (O-CH₂-CH₂), 66.77 (C4, CH₂-Ph), 61.65 (C6), 51.24 (C2), 40.88 (CH₂-NH), 23.40, 20.74, 20.72 (4x CH₃) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für C₂₄H₃₂NaN₂O₁₁ [M+Na]⁺: 547.18983; gef.: 547.18963, Δ ppm: 0.37.

2-Acetamido-1-O-(2-benzyloxycarbonylaminoethyl)-2-deoxy-β-D-galactopyranosid (120)



Galactosamin **23** (270 mg, 515 μmol) wurde mit NaOMe (77.0 μl, 39.0 μmol) in Methanol (8 ml) laut allgemeiner Versuchsvorschrift F deacetyliert. Das Produkt wurde als weißer Feststoff (165 mg, 414 μmol, 80 %) isoliert.

Summenformel: C₁₈H₂₆N₂O₈ (398.41 g/mol)

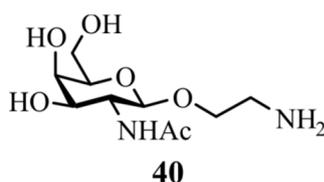
R_f-Wert: 0.29 (DCM/MeOH 4:1)

¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 7.35-7.27 (m, 5H, CH_{Ar}), 5.07 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.36 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, H1), 3.91 (dd, 1H, *J* = 8.4, 10.7 Hz, H2), 3.86 (dd, 1H, *J* = 5.3, 10.6 Hz, O-CH_{2a}-CH₂), 3.82 (dd, 1H, *J* = 0.8, 3.3 Hz, H4), 3.77 (dd, 1H, *J* = 6.8, 11.4 Hz, H6_a), 3.72 (dd, 1H, *J* = 5.3, 11.4 Hz, H6_b), 3.62 (dd, 1H, *J* = 5.2, 10.6 Hz, O-CH_{2b}-CH₂), 3.57 (dd, 1H, *J* = 3.3, 10.7 Hz, H3), 3.48 (ddd, 1H, *J* = 0.8, 5.3, 6.8 Hz, H5), 3.31-3.29 (m, 2H, CH₂-NH), 1.95 (s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD): δ = 174.38 (COCH₃), 158.83 (CO[Cbz]), 138.33 (C_{Ar}, q), 129.48, 129.01, 128.88 (3x CH_{Ar}), 103.18 (C1), 76.78 (C5), 73.26 (C3), 69.63 (C4), 69.40 (O-CH₂-CH₂), 67.49 (CH₂-Ph), 62.52 (C6), 54.29 (C2), 41.98 (CH₂-NH), 23.01 (CH₃) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für C₁₈H₂₆NaN₂O₈ [M+Na]⁺: 421.15814; gef.: 421.15821, Δppm: 0.17.

2-Acetamido-1-O-(2-aminoethyl)-2-deoxy-β-D-galactopyranosid (40)



Galactosamin **120** (140 mg, 351 μmol) wurde mit Pd/C (14 mg) in Methanol (5.5 ml) laut allgemeiner Versuchsvorschrift G hydriert. Das Produkt wurde als weißer Feststoff (85.0 mg, 322 μmol, 92 %) isoliert.

Summenformel: C₁₀H₂₀N₂O₆ (264.28 g/mol)

R_f-Wert: 0.01 (WIE)

¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 4.37 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, H1), 3.93 (dd, 1H, *J* = 8.4, 10.7 Hz, H2), 3.87 (ddd, 1H, *J* = 4.3, 5.9, 10.2 Hz, O-CH_{2a}-CH₂), 3.83 (dd, 1H, *J* = 0.8, 3.3 Hz, H4), 3.78 (dd, 1H, *J* = 6.9, 11.4 Hz, H6_a), 3.73 (dd, 1H, *J* = 5.3, 11.4 Hz, H6_b), 3.59

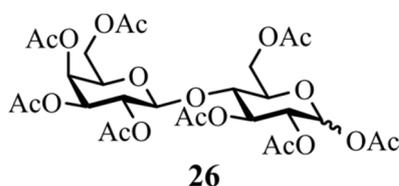
(dd, 1H, $J = 3.3, 10.7$ Hz, H3), 3.58 (ddd, 1H, $J = 4.4, 6.0, 10.2$ Hz, O-CH_{2b}-CH₂), 3.49 (ddd, 1H, $J = 0.8, 5.3, 6.9$ Hz, H5), 2.83-2.72 (m, 2H, CH₂-NH₂), 1.98 (s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD): $\delta = 174.21$ (CO), 103.29 (C1), 76.79 (C5), 73.27 (C3), 71.87 (O-CH₂-CH₂), 69.67 (C4), 62.58 (C6), 54.36 (C2), 42.26 (CH₂-NH₂), 23.00 (CH₃) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für C₁₀H₂₁N₂O₆ [M+H]⁺: 265.13941; gef.: 265.13938, Δ ppm: 0.11.

6.2.1.7 1-O-(2-Aminoethyl)-4-O-(β -D-galactopyranosyl)- β -D-glucopyranosid (41)

1,2,3,6-Tetra-O-acetyl-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl)- β -D-glucopyranosid (26)



D-Lactose (**121**, 5.00 g, 14.6 mmol) wurde mit Natriumacetat (5.00 g, 61.0 mmol) in Ac₂O (90 ml, 954 mmol) laut allgemeiner Versuchsvorschrift A umgesetzt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff (9.50 g, 14.0 mmol, 96 % [Lit.^[381] 78 % als reines β -Anomer]) erhalten. Die erste Fraktion (5.41 g) enthielt nahezu ausschließlich das β -Anomer, während die zweite Fraktion (4.09 g) als Gemisch der Anomere (α/β 2:1) isoliert wurde. Die Charakterisierung bezieht sich auf das β -Anomer.

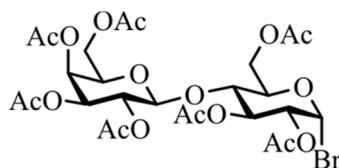
Summenformel: C₂₈H₃₈O₁₉ (678.59 g/mol)

R_f-Wert: 0.36 (EE/Cy 2:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = [\beta$ -Anomer] 5.67 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, H1), 5.35 (dd, 1H, $J = 1.1, 3.5$ Hz, H4'), 5.24 (dd, 1H, $J = 9.1, 9.3$ Hz, H3), 5.11 (dd, 1H, $J = 7.9, 10.4$ Hz, H2'), 5.04 (dd, 1H, $J = 8.3, 9.3$ Hz, H2), 4.95 (dd, 1H, $J = 3.5, 10.4$ Hz, H3'), 4.48 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz, H1'), 4.45 (dd, 1H, $J = 2.1, 12.1$ Hz, H6_a), 4.14 (dd, 1H, $J = 6.4, 11.2$ Hz, H6'a), 4.13 (dd, 1H, $J = 4.8, 12.1$ Hz, H6_b), 4.08 (dd, 1H, $J = 7.2, 11.2$ Hz, H6'b), 3.89-3.85 (m, 1H, H5'), 3.85 (dd, 1H, $J = 9.1, 9.9$ Hz, H4), 3.76 (ddd, 1H, $J = 2.1, 4.8, 9.9$ Hz, H5), 2.88 (d, 1H, $J = 0.6$ Hz, OH), 2.15, 2.12, 2.10, 2.07, 2.05, 2.04, 2.03, 1.96 (8x s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = [\beta$ -Anomer] 170.51, 170.46, 170.28, 170.21, 169.76, 169.70, 169.16, 169.00 (8x CO), 101.12 (C1'), 91.70 (C1), 75.83 (C4), 73.67 (C5), 72.80 (C3), 71.12 (C3'), 70.92 (C5'), 70.69 (C2), 69.17 (C2'), 66.76 (C4'), 61.90 (C6), 61.00 (C6'), 20.98, 20.96, 20.90, 20.78, 20.76, 20.74, 20.65 (8x CH₃) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für C₂₈H₄₂NO₁₉ [M+NH₄]⁺: 696.23455; gef.: 696.23425, Δ ppm: 0.43.

2,3,6-Tri-O-acetyl-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-1-brom-1-deoxy- α -D-glucopyranosid (27)

27

D-Lactoseoctaacetat (**26**, 1.00 g, 1.47 mmol) wurde mit HBr/HOAc (1.35 ml, 7.37 mmol) in DCM (10 ml) laut allgemeiner Versuchsvorschrift D1 umgesetzt. Bromid **27** wurde als weißer Feststoff (1.03 g, 1.47 mmol, quant. [Lit.^[381] 94 %]) erhalten.

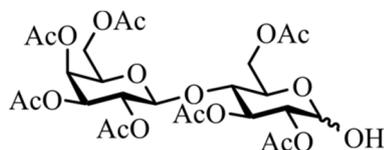
Summenformel: C₂₆H₃₅BrO₁₇ (699.45 g/mol)

R_f-Wert: 0.19 (Cy/EE 1:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 6.53 (d, 1H, J = 4.1 Hz, H1), 5.56 (dd, 1H, J = 9.7, 9.8 Hz, H3), 5.36 (dd, 1H, J = 1.0, 3.5 Hz, H4'), 5.13 (dd, 1H, J = 7.9, 10.4 Hz, H2'), 4.97 (dd, 1H, J = 3.5, 10.4 Hz, H3'), 4.77 (dd, 1H, J = 4.1, 9.8 Hz, H2), 4.52 (d, 1H, J = 7.9 Hz, H1'), 4.52-4.48 (m, 1H, H6_a), 4.23-4.17 (m, 2H, H5, H6_b), 4.16 (dd, 1H, J = 6.7, 11.3 Hz, H6'_a), 4.09 (dd, 1H, J = 7.2, 11.3 Hz, H6'_b), 3.91-3.87 (m, 1H, H5'), 3.87 (dd, 1H, J = 9.7, 9.7 Hz, H4), 2.16, 2.13, 2.09, 2.07, 2.06, 2.06, 1.97 (7x s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 169.49, 169.32, 169.28, 169.22, 169.12, 168.36, 168.11 (7x CO), 99.97 (C1'), 85.55 (C1), 74.14 (C4), 72.17 (C5), 70.18 (C3'), 70.05 (C2), 70.00 (C5'), 68.80 (C3), 68.24 (C2'), 65.80 (C4'), 60.24 (C6), 60.06 (C6'), 19.95, 19.82, 19.81, 19.78, 19.64 (7x CH₃) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für C₂₆H₃₉BrNO₁₇ [M+NH₄]⁺: 716.13959; gef.: 716.13971, Δ ppm: 0.17.

2,3,6-Tri-O-acetyl-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-D-glucopyranose (28)

28

Lactosebromid **27** (800 mg, 1.14 mmol) wurde mit Silbercarbonat (473 mg, 1.72 mmol) in Aceton/H₂O (1:1, 22 ml) laut allgemeiner Versuchsvorschrift D2 umgesetzt. Das Hydrolyse-Produkt wurde als weißer schaumiger Feststoff (280 mg, 440 μ mol, 39 % [Lit.^[393] quant.]) erhalten, das Anomerenverhältnis α/β betrug 2:1. Die Charakterisierung bezieht sich auf das α -Anomer.

Summenformel: C₂₆H₃₆O₁₈ (636.56 g/mol)

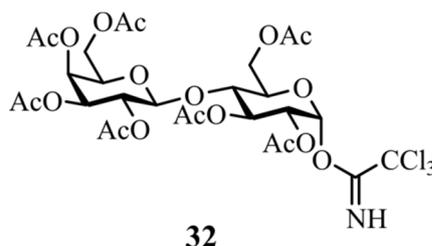
R_f-Wert: 0.10 (Cy/EE 1:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = [α -Anomer] 5.52 (dd, 1H, J = 9.4, 10.1 Hz, H3), 5.37 (d, 1H, J = 3.6 Hz, H1), 5.35 (dd, 1H, J = 0.8, 3.4 Hz, H4'), 5.12 (dd, 1H, J = 7.9, 10.4 Hz, H2'), 4.96 (dd, 1H, J = 3.4, 10.4 Hz, H3'), 4.84 (dd, 1H, J = 3.6, 10.1 Hz, H2), 4.51 (d, 1H, J = 7.9 Hz, H1'), 4.50 (dd, 1H, J = 2.0, 11.9 Hz, H6_a), 4.20-4.16 (m, 1H, H5), 4.15 (dd, 1H, J = 6.1, 11.1 Hz, H6'_a), 4.12 (dd, 1H, J = 5.1, 11.9 Hz, H6_b), 4.08 (dd, 1H, J = 7.5, 11.1 Hz, H6'_b), 3.89-3.85 (m, 1H, H5'), 3.77 (dd, 1H, J = 9.4, 9.6 Hz, H4), 2.15, 2.13, 2.08, 2.06, 2.05, 2.04, 1.96 (7x s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = [α -Anomer] 170.60, 170.50, 170.40, 170.33, 170.24, 169.72, 169.15 (7x CO), 101.15 (C1'), 90.32 (C1), 76.44 (C4), 71.44 (C2), 71.22 (C3'), 70.84 (C5'), 69.71 (C3), 69.33 (C2'), 68.48 (C5), 66.82 (C4'), 62.03 (C6), 61.00 (C6'), 21.03, 21.02, 20.89, 20.77, 20.65 (7x CH₃) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für C₂₆H₃₆NaO₁₈ [M+Na]⁺: 659.17939; gef.: 659.17784, Δ ppm: 2.35.

2,3,6-Tri-O-acetyl-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-1-O-(2,2,2-trichloracetimidato)- α -D-glucopyranosid (32)



Lactose **28** (200 mg, 314 μ mol) wurde mit Trichloracetonitril (630 μ l, 6.28 mmol) und DBU (47.0 μ l, 314 μ mol) in DCM (5 ml) laut allgemeiner Versuchsvorschrift D3 weiter umgesetzt. Der als Trichloracetimidat aktivierte Zucker **32** wurde als farbloser glasartiger Feststoff (200 mg, 256 μ mol, 82 %) erhalten und umgehend weiter umgesetzt.

Summenformel: C₂₈H₃₆Cl₃NO₁₈ (780.94 g/mol)

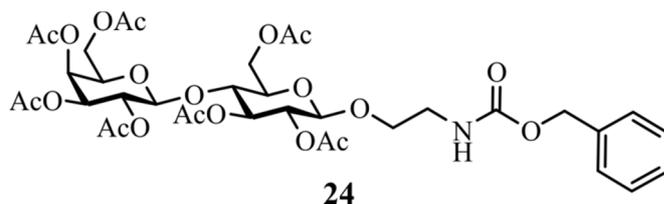
R_f-Wert: 0.27 (Cy/EE 1:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.65 (s, 1H, NH), 6.49 (d, 1H, J = 3.8 Hz, H1), 5.56 (dd, 1H, J = 9.7, 9.9 Hz, H3), 5.36 (dd, 1H, J = 1.0, 3.5 Hz, H4'), 5.13 (dd, 1H, J = 7.9, 10.4 Hz, H2'), 5.06 (dd, 1H, J = 3.8, 9.9 Hz, H2), 4.96 (dd, 1H, J = 3.5, 10.4 Hz, H3'), 4.52 (d, 1H, J = 7.9 Hz, H1'), 4.51-4.46 (m, 1H, H6'_a), 4.18-4.07 (m, 4H, H5, H6_{ab}, H6'_b), 3.90-3.85 (m, 2H, H4, H5'), 2.16, 2.11, 2.07, 2.07, 2.04, 2.01, 1.97 (7x s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 170.48, 170.38, 170.28, 170.23, 170.21, 169.49, 169.20 (7x CO), 161.17 (C=NH), 101.40 (C1'), 93.08 (C1), 90.87 (CCl₃), 76.08 (C4), 71.30 (C3'), 71.09 (C5), 70.90 (C5'), 70.15 (C2), 69.75 (C3), 69.31 (C2'), 66.76 (C4'), 61.68 (C6'), 60.94 (C6), 21.03, 20.96, 20.82, 20.79, 20.66, 20.62 (7x CH₃) ppm.

MS (MALDI): m/z ber. für C₂₈H₃₆Cl₃NaNO₁₈ [M+Na]⁺: 802.089; gef.: 802.031.

2,3,6-Tri-O-acetyl-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl)-1-O-(2-benzyloxycarbonylaminoethyl)-β-D-glucopyranosid (24)



Trichloracetimidat **32** (195 mg, 250 μmol) wurde mit Benzyl-2-hydroxyethylcarbammat (**18**, 97.0 mg, 499 μmol) und $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (47.0 μl, 375 μmol) in DCM (3 ml) laut allgemeiner Versuchsvorschrift D4 umgesetzt. Das Kupplungsprodukt **24** wurde als weißer Feststoff (95.0 mg, 117 μmol, 47 %) erhalten.

Summenformel: $\text{C}_{36}\text{H}_{47}\text{NO}_{20}$ (813.75 g/mol)

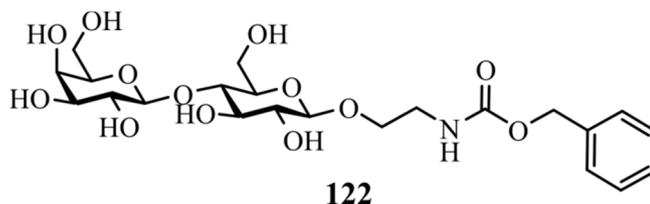
R_f-Wert: 0.11 (Cy/EE 1:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.37-7.28 (m, 5H, CH_{Ar}), 5.34 (dd, 1H, *J* = 1.0, 3.4 Hz, H4'), 5.18 (br. s, 1H, NH), 5.17 (dd, 1H, *J* = 9.4, 9.5 Hz, H3), 5.10 (dd, 1H, *J* = 7.8, 10.5 Hz, H2'), 5.09 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.95 (dd, 1H, *J* = 3.4, 10.5 Hz, H3'), 4.86 (dd, 1H, *J* = 8.0, 9.5 Hz, H2), 4.49 (dd, 1H, *J* = 1.9, 12.0 Hz, H6_a), 4.47 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, H1'), 4.44 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H1), 4.12 (dd, 1H, *J* = 6.4, 11.1 Hz, H6'_a), 4.07 (dd, 1H, *J* = 7.3, 11.1 Hz, H6'_b), 4.06 (dd, 1H, *J* = 5.2, 12.0 Hz, H6_b), 3.86 (ddd, 1H, *J* = 1.0, 6.4, 7.3 Hz, H5'), 3.81 (ddd, 1H, *J* = 4.5, 5.9, 10.4 Hz, O-CH_{2a}-CH₂), 3.76 (dd, 1H, *J* = 9.4, 9.7 Hz, H4), 3.69 (ddd, 1H, *J* = 3.8, 6.3, 10.4 Hz, O-CH_{2b}-CH₂), 3.57 (ddd, 1H, *J* = 1.9, 5.2, 9.7 Hz, H5), 3.43-3.30 (m, 2H, CH₂-NH), 2.14, 2.07, 2.05 (3x s, 3H, CH₃), 2.03 (s, 6H, 2x CH₃), 1.99, 1.96 (2x s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 170.49, 170.47, 170.25, 170.18, 169.86, 169.83, 169.19 (7x COCH₃), 156.47 (CONH), 136.62 (C_{Ar}, q), 128.66, 128.31, 128.27 (3x CH_{Ar}), 101.23 (C1'), 101.00 (C1), 76.31 (C4), 72.86 (C5), 72.78 (C3), 71.75 (C2), 71.10 (C3'), 70.85 (C5'), 69.69 (O-CH₂-CH₂), 69.25 (C2'), 66.88 (CH₂-Ph), 66.74 (C4'), 62.02 (C6), 60.93 (C6'), 41.08 (CH₂-NH), 20.91, 20.76, 20.74, 20.63 (7x CH₃) ppm.

HRMS (ESI-pos): *m/z* ber. für $\text{C}_{36}\text{H}_{47}\text{NaNO}_{20}$ [M+Na]⁺: 836.25836; gef.: 836.25879, Δppm: 0.51.

1-O-(2-Benzoyloxycarbonylaminoethyl)-4-O-(β -D-galactopyranosyl)- β -D-glucopyranosid (122)



Lactosederivat **24** (70.0 mg, 86.0 μ mol) wurde mit NaOMe (26.0 μ l, 13.0 μ mol) in Methanol (2 ml) laut allgemeiner Versuchsvorschrift F deacetyliert. Das Produkt wurde nach Säulen-chromatographie als farbloser Feststoff (30.2 mg, 58.0 μ mol, 68 % [Lit.^[381] 94 %]) erhalten.

Summenformel: C₂₂H₃₃NO₁₃ (542.49 g/mol)

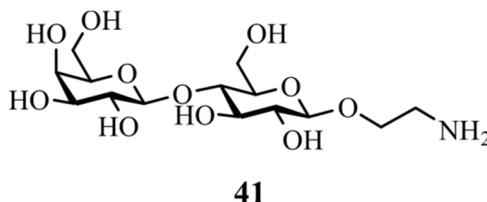
R_F-Wert: 0.24 (DCM/MeOH 5:1)

¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 7.35-7.27 (m, 5H, CH_{Ar}), 5.08 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.36 (d, 1H, J = 7.4 Hz, H1'), 4.31 (d, 1H, J = 7.9 Hz, H1), 3.93-3.82 (m, 4H, O-CH_{2a}-CH₂, H4', H6_{ab}), 3.79 (dd, 1H, J = 7.5, 11.5 Hz, H6'_a), 3.71 (dd, 1H, J = 4.6, 11.5 Hz, H6'_b), 3.65 (ddd, 1H, J = 4.1, 6.7, 10.6 Hz, O-CH_{2b}-CH₂), 3.61-3.52 (m, 4H, H3, H4, H2', H5'), 3.50 (dd, 1H, J = 3.2, 9.7 Hz, H3'), 3.44-3.38 (m, 2H, H5, CH_{2a}-NH), 3.34-3.28 (m, 1H, CH_{2b}-NH), 3.26 (dd, 1H, J = 7.9, 8.8 Hz, H2) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD): δ = 158.96 (CO), 138.31 (C_{Ar,q}), 129.46, 128.98, 128.82 (3x CH_{Ar}), 105.10 (C1'), 104.30 (C1), 80.53 (C4), 77.05 (C5'), 76.44 (C5), 76.17 (C3), 74.76 (C3'), 74.73 (C2), 72.51 (C2'), 70.32 (C4'), 70.06 (O-CH₂-CH₂), 67.49 (CH₂-Ph), 62.51 (C6'), 61.75 (C6), 41.97 (CH₂-NH) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für C₂₂H₃₃NaNO₁₃ [M+Na]⁺: 542.18441; gef.: 542.18427, Δ ppm: 0.26.

1-O-(2-Aminoethyl)-4-O-(β -D-galactopyranosyl)- β -D-glucopyranosid (41)



Lactose **122** (29.0 mg, 56.0 μ mol) wurde mit Pd/C (5 mg) in Methanol (1 ml) laut allgemeiner Versuchsvorschrift G hydriert. Das Produkt wurde als farbloser schaumiger Feststoff (20.0 mg, 52.0 μ mol, 93 % [Lit.^[381] 98 %]) erhalten.

Summenformel: C₁₄H₂₇NO₁₁ (385.37 g/mol)

R_F-Wert: 0.02 (WIE)

¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 4.37 (d, 1H, J = 7.4 Hz, H1'), 4.33 (d, 1H, J = 7.9 Hz, H1), 3.94 (ddd, 1H, J = 4.3, 5.4, 10.5 Hz, O-CH_{2a}-CH₂), 3.91 (dd, 1H, J = 2.6, 12.1 Hz, H6_a),

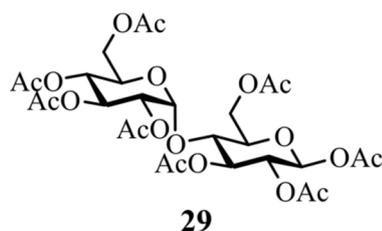
3.85 (dd, 1H, $J=4.2, 12.1$ Hz, H6_b), 3.83 (dd, 1H, $J=0.9, 3.2$ Hz, H4'), 3.78 (dd, 1H, $J=7.5, 11.5$ Hz, H6'_a), 3.71 (dd, 1H, $J=4.6, 11.5$ Hz, H6'_b), 3.66 (ddd, 1H, $J=4.3, 6.3, 10.5$ Hz, O-CH₂-CH₂), 3.61-3.58 (m, 1H, H5'), 3.58 (dd, 1H, $J=8.8, 8.8$ Hz, H4), 3.55 (dd, 1H, $J=7.4, 9.7$ Hz, H2'), 3.54 (dd, 1H, $J=8.8, 8.9$ Hz, H3), 3.49 (dd, 1H, $J=3.2, 9.7$ Hz, H3'), 3.45-3.41 (m, 1H, H5), 3.29 (dd, 1H, $J=7.9, 8.9$ Hz, H2), 2.93-2.83 (m, 2H, CH₂-NH₂) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD): $\delta = 105.12$ (C1'), 104.28 (C1), 80.60 (C4), 77.09 (C5'), 76.50 (C5), 76.24 (C3), 74.79, 74.78 (C2, C3'), 72.53 (C2'), 71.47 (O-CH₂-CH₂), 70.32 (C4'), 62.51 (C6'), 61.83 (C6), 42.04 (CH₂-NH₂) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für C₁₄H₂₈NO₁₁ [M+H]⁺: 386.16569; gef.: 386.16546, Δ ppm: 0.60.

6.2.1.8 1-O-(2-Aminoethyl)-4-O-(α -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosid (42)

1,2,3,6-Tetra-O-acetyl-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosid (29)



D-Maltose-Monohydrat (**123**, 5.40 g, 15.0 mmol) wurde mit Natriumacetat (5.00 g, 61.0 mmol) in Ac₂O (90 ml, 954 mmol) laut allgemeiner Versuchsvorschrift A acetyliert. Das Produkt wurde als weißer Feststoff (7.62 g, 11.23 mmol, 75 %) erhalten. Es wurde ausschließlich das β -Anomer isoliert.

Summenformel: C₂₈H₃₈O₁₉ (678.59 g/mol)

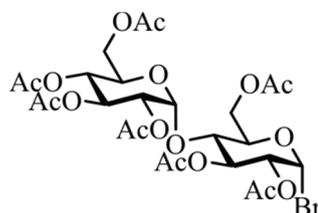
R_f-Wert: 0.33 (EE/Cy 1:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 5.74$ (d, 1H, $J=8.1$ Hz, H1), 5.40 (d, 1H, $J=4.0$ Hz, H1'), 5.35 (dd, 1H, $J=9.7, 10.5$ Hz, H3'), 5.29 (dd, 1H, $J=8.9, 9.1$ Hz, H3), 5.05 (dd, 1H, $J=9.7, 10.0$ Hz, H4'), 4.97 (dd, 1H, $J=8.1, 9.1$ Hz, H2), 4.85 (dd, 1H, $J=4.0, 10.5$ Hz, H2'), 4.45 (dd, 1H, $J=2.6, 12.2$ Hz, H6_a), 4.23 (dd, 1H, $J=3.8, 12.5$ Hz, H6'_a), 4.22 (dd, 1H, $J=4.5, 12.2$ Hz, H6_b), 4.04 (dd, 1H, $J=2.4, 12.5$ Hz, H6'_b), 4.03 (dd, 1H, $J=8.9, 9.5$ Hz, H4), 3.94 (ddd, 1H, $J=2.4, 3.8, 10.0$ Hz, H5'), 3.83 (ddd, 1H, $J=2.6, 4.5, 9.5$ Hz, H5), 2.13, 2.09, 2.09, 2.04, 2.02, 2.01, 2.01, 1.99 (8x s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 170.71, 170.65, 170.57, 170.20, 170.02, 169.74, 169.58, 168.94$ (8x CO), 95.89 (C1'), 91.45 (C1), 75.40 (C3), 73.18 (C5), 72.65 (C4), 71.12 (C2), 70.18 (C2'), 69.48 (C3'), 68.75 (C5'), 68.16 (C4'), 62.70 (C5), 61.64 (C5'), 21.00, 20.93, 20.93, 20.80, 20.71, 20.67 (8x CH₃) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für $C_{28}H_{42}NO_{19}$ $[M+NH_4]^+$: 696.23455; gef.: 696.23485, Δ ppm: 0.43.

2,3,6-Tri-O-acetyl-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-glucopyranosyl)-1-brom-1-deoxy- α -D-glucopyranosid (30)



30

β -D-Maltoseoctaacetat (**29**, 2.00 g, 2.95 mmol) wurde mit HBr/HOAc (2.70 ml, 14.7 mmol) in DCM (20 ml) laut allgemeiner Versuchsvorschrift D1 bromiert. Das Produkt wurde als weißer schaumiger Feststoff (1.93 g, 2.76 mmol, 94 %) erhalten.

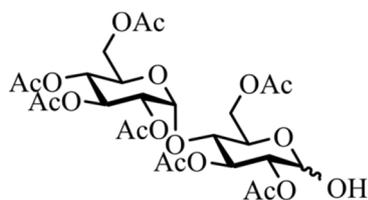
Summenformel: $C_{26}H_{35}BrO_{17}$ (699.45 g/mol)

R_f-Wert: 0.44 (Cy/EE 1:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 6.50 (d, 1H, J = 4.0 Hz, H1), 5.61 (dd, 1H, J = 9.2, 9.7 Hz, H3), 5.42 (d, 1H, J = 4.0 Hz, H1'), 5.38 (dd, 1H, J = 9.7, 10.5 Hz, H3'), 5.08 (dd, 1H, J = 9.7, 10.1 Hz, H4'), 4.87 (dd, 1H, J = 4.0, 10.5 Hz, H2'), 4.72 (dd, 1H, J = 4.0, 9.7 Hz, H2), 4.52 (dd, 1H, J = 3.8, 13.7 Hz, H6_a), 4.29-4.22 (m, 3H, H5, H6_b, H6'_a), 4.06 (dd, 1H, J = 9.2, 9.2 Hz, H4), 4.06 (dd, 1H, J = 2.5, 12.4 Hz, H6'_b), 3.95 (ddd, 1H, J = 2.5, 3.2, 10.1 Hz, H5'), 2.15, 2.10, 2.08, 2.07, 2.04, 2.03, 2.01 (7x s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 170.83, 170.63, 170.42, 170.00, 169.65, 169.58 (7x CO), 95.96 (C1'), 86.20 (C1), 72.72 (C5), 72.52 (C3), 71.79 (C4), 71.20 (C2), 70.19 (C2'), 69.43 (C3'), 68.83 (C5'), 68.12 (C4'), 62.03 (C6), 61.53 (C6'), 21.00, 20.91, 20.82, 20.78, 20.73 (7x CH₃) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für $C_{26}H_{39}BrNO_{17}$ $[M+NH_4]^+$: 716.13959; gef.: 716.14009, Δ ppm: 0.70.

2,3,6-Tri-O-acetyl-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-glucopyranosyl)-D-glucopyranose (31)

31

Maltosebromid **30** (1.00 g, 1.43 mmol) wurde mit Silbercarbonat (591 mg, 2.15 mmol) in Aceton/H₂O (1:1, 15 ml) laut allgemeiner Versuchsvorschrift D2 umgesetzt. Das Hydrolyseprodukt **31** wurde als weißer Feststoff (680 mg, 1.07 mmol, 75 %) erhalten. Das Anomerenverhältnis α/β betrug 1:2.7.

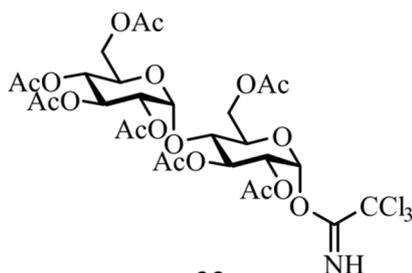
Summenformel: C₂₆H₃₆O₁₈ (636.56 g/mol)

R_f-Wert: 0.17 (Cy/EE 1:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = [β -Anomer] 5.41 (d, 1H, J = 4.0 Hz, H1'), 5.36 (dd, 1H, J = 9.6, 10.5 Hz, H3'), 5.31 (dd, 1H, J = 9.0, 9.2 Hz, H3), 5.06 (dd, 1H, J = 9.6, 10.2 Hz, H4'), 4.86 (dd, 1H, J = 4.0, 10.5 Hz, H2'), 4.79 (dd, 1H, J = 7.8, 7.9 Hz, H1), 4.73 (dd, 1H, J = 7.9, 9.2 Hz, H2), 4.49 (dd, 1H, J = 2.7, 12.1 Hz, H6_a), 4.25 (dd, 1H, J = 4.1, 12.5 Hz, H6'_a), 4.24 (dd, 1H, J = 4.8, 12.1 Hz, H6_b), 4.06 (dd, 1H, J = 2.3, 12.5 Hz, H6'_b), 4.00 (dd, 1H, J = 9.0, 9.6 Hz, H4), 3.97 (ddd, 1H, J = 2.3, 4.1, 10.2 Hz, H5'), 3.75 (ddd, 1H, J = 2.7, 4.8, 9.6 Hz, H5), 3.30 (d, 1H, J = 7.8 Hz, OH), 2.15, 2.10, 2.06, 2.05, 2.03, 2.02, 2.00 (7x s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = [β -Anomer] 171.03, 170.73, 170.66, 170.12, 170.05, 169.58 (7x CO), 95.76 (C1'), 95.19 (C1), 74.81 (C3), 74.09 (C2), 72.87 (C4), 72.66 (C5), 70.17 (C2'), 69.48 (C3'), 68.76 (C5'), 68.18 (C4'), 63.02 (C6), 61.66 (C6'), 21.03, 20.99, 20.82, 20.74 (7x CH₃) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für C₂₆H₄₀NO₁₈ [M+NH₄]⁺: 654.22399; gef.: 654.22439, Δ ppm: 0.61.

2,3,6-Tri-O-acetyl-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-glucopyranosyl)-1-O-(2,2,2-trichloracetimidato)- α -D-glucopyranosid (33)

33

Maltoseheptaacetat **31** (435 mg, 683 μ mol) wurde mit Trichloracetonitril (1.37 ml, 13.7 mmol) und DBU (102 μ l, 683 μ mol) in DCM (10 ml) laut allgemeiner

Versuchsvorschrift D3 umgesetzt. Der aktivierte Zucker **33** wurde als gelblicher, schaumiger Feststoff (428 mg, 548 μmol , 80 %) isoliert und umgehend weiter umgesetzt.

Summenformel: $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{Cl}_3\text{NO}_{18}$ (780.94 g/mol)

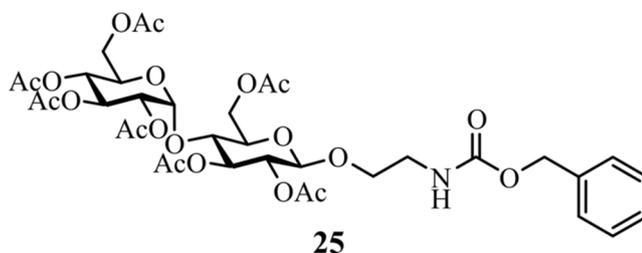
R_f-Wert: 0.35 (Cy/EE 1:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 8.67$ (s, 1H, NH), 6.48 (d, 1H, $J = 3.7$ Hz, H1), 5.61 (dd, 1H, $J = 9.0, 9.9$ Hz, H3), 5.44 (d, 1H, $J = 4.0$ Hz, H1'), 5.39 (dd, 1H, $J = 9.6, 10.5$ Hz, H3'), 5.07 (dd, 1H, $J = 9.6, 10.1$ Hz, H4'), 5.02 (dd, 1H, $J = 3.7, 9.9$ Hz, H2), 4.88 (dd, 1H, $J = 4.0, 10.5$ Hz, H2'), 4.50 (dd, 1H, $J = 2.2, 12.1$ Hz, H6_a), 4.25 (dd, 1H, $J = 3.4, 12.5$ Hz, H6'_a), 4.24 (dd, 1H, $J = 3.8, 12.1$ Hz, H6_b), 4.21-4.17 (m, 1H, H5), 4.07 (dd, 1H, $J = 9.0, 9.7$ Hz, H4), 4.06 (dd, 1H, $J = 2.5, 12.5$ Hz, H6'_b), 3.96 (ddd, 1H, $J = 2.5, 3.4, 10.1$ Hz, H5'), 2.13, 2.10, 2.07, 2.03, 2.02, 2.01, 1.99 (7x s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 170.75, 170.64, 170.50, 170.11, 169.81, 169.58$ (7x CO), 161.10 (C=NH), 95.98 (C1'), 92.98 (C1), 90.88 (CCl₃), 72.42 (C4), 72.16 (C3), 70.74 (C5), 70.33 (C2), 70.18 (C2'), 69.54 (C3'), 68.76 (C5'), 68.19 (C4'), 62.46 (C6), 61.59 (C6'), 21.05, 20.92, 20.82, 20.75, 20.72, 20.53 (7x CH₃) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{Cl}_3\text{NaNO}_{18}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 802.08902; gef.: 802.08874, Δppm : 0.35.

2,3,6-Tri-O-acetyl-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-glucopyranosyl)-1-O-(2-benzyloxycarbonylaminoethyl)- β -D-glucopyranosid (25)



Trichloracetimidat-aktivierte Maltose **33** (400 mg, 512 μmol) wurde mit Benzyl-2-hydroxyethylcarbammat (**18**, 200 mg, 1.02 mmol) und $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (97.0 μl , 768 μmol) in DCM (7 ml) laut allgemeiner Versuchsvorschrift D4 umgesetzt. Kupplungsprodukt **25** wurde als farbloser, glasartiger Feststoff (324 mg, 398 μmol , 78 %) isoliert.

Summenformel: $\text{C}_{36}\text{H}_{47}\text{NO}_{20}$ (813.75 g/mol)

R_f-Wert: 0.16 (Cy/EE 1:1)

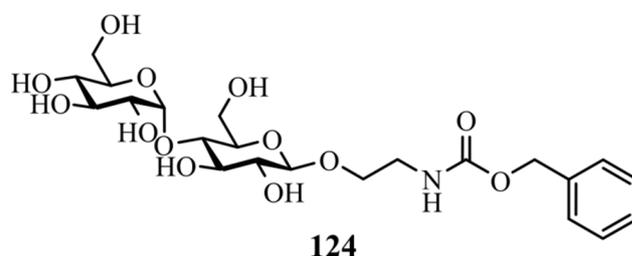
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.37$ -7.30 (m, 5H, CH_{Ar}), 5.40 (d, 1H, $J = 4.0$ Hz, H1'), 5.36 (dd, 1H, $J = 9.8, 10.5$ Hz, H3'), 5.23 (dd, 1H, $J = 9.2, 9.3$ Hz, H3), 5.18 (t, 1H, $J = 4.4$ Hz, NH), 5.11 (s, 2H, CH₂-Ph), 5.05 (dd, 1H, $J = 9.8, 9.9$ Hz, H4'), 4.85 (dd, 1H, $J = 4.0, 10.5$ Hz, H2'), 4.80 (dd, 1H, $J = 7.9, 9.3$ Hz, H2), 4.50 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz, H1), 4.49 (dd, 1H, $J = 2.6, 12.2$ Hz, H6_a), 4.25 (dd, 1H, $J = 3.9, 12.5$ Hz, H6'_a), 4.17 (dd, 1H, $J = 4.5, 12.2$ Hz, H6_b), 4.04 (dd, 1H, $J = 2.2, 12.5$ Hz, H6'_b), 3.97 (dd, 1H, $J = 9.2, 9.4$ Hz, H4), 3.97-

3.93 (m, 1H, H5'), 3.86-3.81 (m, 1H, O-CH_{2a}-CH₂), 3.73-3.68 (m, 1H, O-CH_{2b}-CH₂), 3.63 (ddd, 1H, *J* = 2.6, 4.5, 9.4 Hz, H5), 3.40-3.35 (m, 2H, CH₂-NH), 2.09 (s, 6H, 2x CH₃), 2.04, 2.03, 2.00, 2.00, 1.97 (5x s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 170.67, 170.60, 170.31, 170.09, 169.87, 169.56 (7x COCH₃), 156.48 (CONH), 136.64 (C_{Ar}, q), 128.70, 128.34, 128.28 (3x CH_{Ar}), 100.78 (C1), 95.72 (C1'), 75.37 (C3), 72.72 (C4), 72.40 (C5), 72.26 (C2), 70.15 (C2'), 69.77 (O-CH₂-CH₂), 69.47 (C3'), 68.70 (C5'), 68.16 (C4'), 67.07 (CH₂-Ph), 62.79 (C6), 61.63 (C6'), 41.12 (CH₂-NH), 21.19, 21.03, 20.90, 20.82, 20.74, 20.72, 20.71 (7x CH₃) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für C₃₆H₅₁N₂O₂₀ [M+NH₄]⁺: 831.30297; gef.: 831.30318, Δppm: 0.25.

1-O-(2-Benzoyloxycarbonylaminoethyl)-4-O-(α-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosid (124)



Maltose **25** (325 mg, 399 μmol) wurde mit NaOMe (120 μl, 60.0 μmol) in Methanol (10 ml) laut allgemeiner Versuchsvorschrift F deacetyliert. Produkt **124** wurde nach Säulen-chromatographie als farbloser, schaumiger Feststoff (178 mg, 343 μmol, 86 %) isoliert.

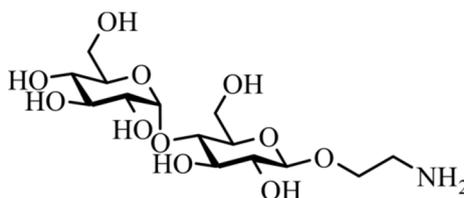
Summenformel: C₂₂H₃₃NO₁₃ (542.49 g/mol)

R_F-Wert: 0.15 (DCM/MeOH 5:1)

¹H-NMR (600 MHz, MeOD): δ = 7.36-7.28 (m, 5H, CH_{Ar}), 5.15 (d, 1H, *J* = 3.8 Hz, H1'), 5.08 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.28 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, H1), 3.91 (ddd, 1H, *J* = 4.4, 6.1, 10.4 Hz, O-CH_{2a}-CH₂), 3.87 (dd, 1H, *J* = 1.7, 12.2 Hz, H6_a), 3.82 (dd, 1H, *J* = 1.8, 11.3 Hz, H6'_a), 3.80 (dd, 1H, *J* = 4.7, 12.2 Hz, H6_b), 3.70-3.63 (m, 2H, H5', O-CH_{2b}-CH₂), 3.66 (dd, 1H, *J* = 5.9, 11.3 Hz, H6'_b), 3.62 (dd, 1H, *J* = 9.2, 9.3 Hz, H3), 3.61 (dd, 1H, *J* = 9.3, 9.35 Hz, H3'), 3.53 (dd, 1H, *J* = 9.2, 9.3 Hz, H4), 3.44 (dd, 1H, *J* = 3.8, 9.5 Hz, H2'), 3.40 (ddd, 1H, *J* = 4.2, 6.2, 14.2 Hz, CH_{2a}-NH), 3.38-3.35 (m, 1H, H5), 3.33-3.28 (m, 1H, CH_{2b}-NH), 3.27 (dd, 1H, *J* = 9.3, 9.6 Hz, H4'), 3.24 (dd, 1H, *J* = 7.8, 9.3 Hz, H2) ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, MeOD): δ = 158.96 (CONH), 138.35 (C_{Ar}, q), 129.47, 129.00, 128.86 (3x CH_{Ar}), 104.49 (C1), 102.96 (C1'), 81.26 (C4), 77.64 (C3), 76.58 (C5), 75.07 (C3'), 74.80 (C5'), 74.66 (C2), 74.16 (C2'), 71.49 (C4'), 70.08 (O-CH₂-CH₂), 67.49 (CH₂-Ph), 62.75 (C6'), 62.07 (C6), 42.02 (CH₂-NH) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für C₂₂H₃₃NaNO₁₃ [M+Na]⁺: 542.18441; gef.: 542.18404, Δppm: 0.68.

1-O-(2-Aminoethyl)-4-O-(α -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosid (42)**42**

Maltose **124** (120 mg, 231 μ mol) wurde mit Pd/C (12 mg) in Methanol (4.5 ml) laut allgemeiner Versuchsvorschrift G hydriert. Das Produkt wurde als farbloser schaumiger Feststoff (58.8 mg, 153 μ mol, 66 %) isoliert.

Summenformel: C₁₄H₂₇NO₁₁ (385.37 g/mol)

R_f-Wert: 0.02 (WIE)

¹H-NMR (600 MHz, MeOD): δ = 5.16 (d, 1H, J = 3.8 Hz, H1'), 4.30 (d, 1H, J = 7.8 Hz, H1), 3.93 (ddd, 1H, J = 4.2, 5.6, 10.4 Hz, O-CH_{2a}-CH₂), 3.89 (dd, 1H, J = 2.1, 12.2 Hz, H6_a), 3.84-3.81 (m, 1H, H6'_a), 3.81 (dd, 1H, J = 4.8, 12.2 Hz, H6_b), 3.70-3.63 (m, 3H, H5', H6'_b, O-CH_{2b}-CH₂), 3.63 (dd, 1H, J = 9.0, 9.6 Hz, H3), 3.61 (dd, 1H, J = 9.3, 9.6 Hz, H3'), 3.53 (dd, 1H, J = 9.0, 9.6 Hz, H4), 3.44 (dd, 1H, J = 3.8, 9.6 Hz, H2'), 3.39 (ddd, 1H, J = 2.1, 4.8, 9.6 Hz, H5), 3.27 (dd, 1H, J = 9.3, 9.4 Hz, H4'), 3.26 (dd, 1H, J = 7.8, 9.3 Hz, H2), 2.90-2.84 (m, 2H, CH₂-NH₂) ppm.

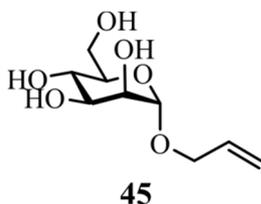
¹³C-NMR (150 MHz, MeOD): δ = 104.43 (C1), 102.96 (C1'), 81.32 (C4), 77.70 (C3), 76.63 (C5), 75.07 (C3'), 74.81 (C5'), 74.70 (C2), 74.16 (C2'), 71.53 (O-CH₂-CH₂), 71.50 (C4'), 62.75 (C6'), 62.14 (C6), 42.08 (CH₂-NH₂) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für C₁₄H₂₈NO₁₁ [M+H]⁺: 386.16569; gef.: 386.16471, Δ ppm: 2.54.

6.2.2 Synthese von Kohlenhydraten zur Konjugation auf dem Glaschip

6.2.2.1 1-*O*-3-(2-Aminoethylthio)-propyl- α -D-mannopyranosid (49) und 1-*O*-3-(2-Aminoethylthio)-propyl-6-azido-6-deoxy- α -D-mannopyranosid (50)

1-*O*-Allyl- α -D-mannopyranosid (45)



D-Mannose (**43**, 5.00 g, 27.8 mmol) wurde in Allylalkohol (**44**, 9.48 ml, 139 mmol) suspendiert und nach Zugabe von Acetylchlorid (182 μ l, 2.55 mmol) 4 h bei 90 °C refluxiert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der gelb-braune Rückstand mittels Säulenchromatographie (EE/MeOH 6:1) getrennt und das Produkt als farbloser glasartiger Feststoff (3.54 g, 16.07 mmol, 58 %) erhalten.

Summenformel: C₉H₁₆O₆ (220.22 g/mol)

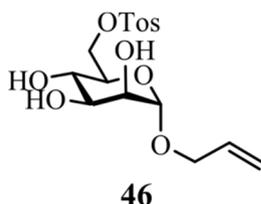
R_F-Wert: 0.13 (EE/MeOH 6:1)

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ = 6.03 (dddd, 1H, J = 5.5, 6.3, 10.4, 17.3 Hz, CH=CH₂), 5.41 (dddd, 1H, J = 1.5, 1.6, 1.6, 17.3 Hz, CH=CH_{2,trans}), 5.33 (dddd, 1H, J = 1.2, 1.2, 1.6, 10.4 Hz, CH=CH_{2,cis}), 4.96 (d, 1H, J = 1.8 Hz, H1), 4.29 (dddd, 1H, J = 1.2, 1.6, 5.5, 12.8 Hz, CH_{2a}-CH=CH₂), 4.12 (dddd, 1H, J = 1.2, 1.5, 6.3, 12.8 Hz, CH_{2b}-CH=CH₂), 3.99 (dd, 1H, J = 1.8, 3.5 Hz, H2), 3.93 (dd, 1H, J = 1.6, 12.1 Hz, H6_a), 3.87-3.83 (m, 1H, H3), 3.82-3.78 (m, 1H, H6_b), 3.71-3.69 (m, 2H, H4, H5) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O): δ = 132.97 (CH=CH₂), 118.13 (CH=CH₂), 98.71 (C1), 72.49 (C4), 70.26 (C3), 69.72 (C2), 67.81 (CH₂-CH=CH₂), 66.46 (C5), 60.60 (C6) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für C₉H₁₆NaO₆ [M+Na]⁺: 243.08391; gef.: 243.08459, Δ ppm: 2.80.

1-*O*-Allyl-6-*O*-tosyl- α -D-mannopyranosid (46)



Allylmannose **45** (1.68 g, 7.63 mmol) wurde unter Schutzgas in trockenem Pyridin (20 ml) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Tosylchlorid (1.90 g, 9.97 mmol) wurde in trockenem DCM (30 ml) gelöst und innerhalb von 4 h zugetropft, die Reaktionsmischung wurde über Nacht auf RT gebracht. Nach Zugabe von DCM und Wasser wurden die Phasen getrennt, die

wässrige Phase mit DCM extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit 1 M HCl, ges. NaHCO₃ sowie Brine gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingedunstet. Nach Säulenchromatographie (EE) wurde das Tosylat **46** als farbloser glasartiger Feststoff (1.71 g, 4.57 mmol, 60 % [Lit.^[426] 62 %]) erhalten.

Summenformel: C₁₆H₂₂O₈S (374.41 g/mol)

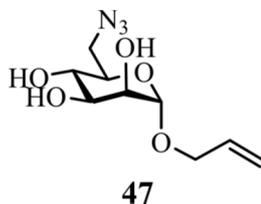
R_F-Wert: 0.64 (EE/MeOH 6:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.81 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, CH_{Ar}), 7.34 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, CH_{Ar}), 5.85 (dddd, 1H, *J* = 5.2, 6.0, 10.5, 17.2 Hz, CH=CH₂), 5.26 (dddd, 1H, *J* = 1.6, 1.6, 1.6, 17.2 Hz, CH=CH_{2,trans}), 5.21-5.17 (m, 1H, CH=CH_{2,cis}), 4.84 (d, 1H, *J* = 1.5 Hz, H1), 4.38 (dd, 1H, *J* = 3.7, 11.1 Hz, H6_a), 4.27 (dd, 1H, *J* = 1.4, 11.1 Hz, H6_b), 4.14-4.09 (m, 1H, CH_{2a}-CH=CH₂), 3.97-3.91 (m, 1H, CH_{2b}-CH=CH₂), 3.94 (dd, 1H, *J* = 1.5, 3.2 Hz, H2), 3.84-3.73 (m, 3H, H3, H4, H5), 2.45 (s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 145.13 (C_{Ar, q} [CSO₃]), 133.55 (CH=CH₂), 132.92 (C_{Ar, q} [CCH₃]), 130.03, 128.16 (2x CH_{Ar}), 117.89 (CH=CH₂), 99.12 (C1), 71.81 (C4), 70.78 (C2), 70.26 (C5), 69.45 (C6), 68.36 (CH₂-CH=CH₂), 67.44 (C3), 21.79 (CH₃) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für C₁₆H₂₂NaO₈S [M+Na]⁺: 397.09276; gef.: 397.09340, Δppm: 1.61.

1-O-Allyl-6-azido-6-deoxy-α-D-mannopyranosid (**47**)



47

Tosylmannose **46** (1.00 g, 2.67 mmol) wurde in DMF (30 ml) gelöst und nach Zugabe von Natriumazid (2.60 g, 40.1 mmol) 45 h bei 60 °C gerührt. Die Suspension wurde filtriert, das Lösungsmittel mit Toluol coevaporiert. Säulenchromatographie (EE) des Rückstands lieferte Azidomannose **47** als gelbes Öl (499 mg, 2.04 mmol, 76 % [Lit.^[426] 54 %]).

Summenformel: C₉H₁₅N₃O₅ (245.23 g/mol)

R_F-Wert: 0.28 (EE)

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ = 6.04 (dddd, 1H, *J* = 5.5, 6.0, 10.5, 17.3 Hz, CH=CH₂), 5.42 (dddd, 1H, *J* = 1.4, 1.4, 1.5, 17.3 Hz, CH=CH_{2,trans}), 5.34 (dddd, 1H, *J* = 1.3, 1.4, 1.4, 10.5 Hz, CH=CH_{2,cis}), 5.01 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz, H1), 4.30 (dddd, 1H, *J* = 1.4, 1.5, 5.5, 12.9 Hz, CH_{2a}-CH=CH₂), 4.16 (dddd, 1H, *J* = 1.3, 1.4, 6.0, 12.9 Hz, CH_{2b}-CH=CH₂), 4.04 (dd, 1H, *J* = 1.7, 3.4 Hz, H2), 3.89 (ddd, 1H, *J* = 3.0, 9.2, 9.6 Hz, H5), 3.88 (dd, 1H, *J* = 3.4, 9.7 Hz, H3), 3.65 (dd, 1H, *J* = 9.6, 9.7 Hz, H4), 3.51 (dd, 1H, *J* = 3.0, 13.3 Hz, H6_a), 3.22 (dd, 1H, *J* = 9.2, 13.3 Hz, H6_b) ppm.

^{13}C -NMR (100 MHz, D_2O): $\delta = 133.29$ ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 118.34 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 99.25 (C1), 70.14 (C3), 69.94 (C2), 68.59 (C5), 68.53 ($\text{CH}_2\text{-CH}=\text{CH}_2$), 68.29 (C4), 40.59 (C6) ppm.

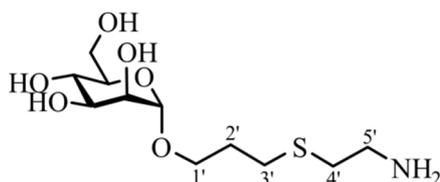
HRMS (ESI-pos): m/z ber. für $\text{C}_9\text{H}_{18}\text{NO}_5$ $[\text{M}-(\text{N}_2)+3\text{H}]^+$: 220.11795; gef.: 220.11842, Δppm : 2.14.

Das Molekül spaltet unter den ESI-Messbedingungen vermutlich Stickstoff ab und wird als Ammonium ($+3\text{H}$) $^+$ detektiert.

allgemeine Versuchsvorschrift H (Photoreaktion zwischen Allylzucker und Cysteamin)

Der Allylzucker wurde mit Cysteamin-Hydrochlorid (**48**, 7 Äq) in qH_2O gelöst und im Quarzkolben mit UV-Licht (254 nm, 350 W) bestrahlt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand (mehrfach) mittels Säulenchromatographie getrennt.

1-O-3-(2-Aminoethylthio)-propyl- α -D-mannopyranosid (49)



49

Allylmannose **45** (942 mg, 4.28 mmol) wurde mit Cysteamin·HCl (**48**, 3.40 g, 29.9 mmol) in qH_2O (10 ml) laut allgemeiner Versuchsvorschrift H umgesetzt. Nach mehrfacher Säulenchromatographie (Biogel, dann RP-18, $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 5:1) wurde das Produkt als farbloses Öl (859 mg, 2.89 mmol, 68 %) erhalten.

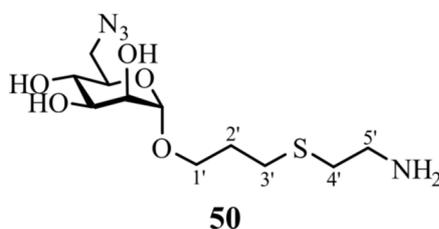
Summenformel: $\text{C}_{11}\text{H}_{23}\text{NO}_6\text{S}$ (297.37 g/mol)

R_f -Wert: 0.00-0.16 (RP-18, H_2O)

^1H -NMR (400 MHz, D_2O): $\delta = 4.90$ (d, 1H, $J = 1.7$ Hz, H1), 3.97 (dd, 1H, $J = 1.7, 3.4$ Hz, H2), 3.92 (dd, 1H, $J = 1.4, 12.2$ Hz, H6a), 3.89 - 3.77 (m, 3H, H3, H6b, H1'a), 3.71 - 3.62 (m, 3H, H4, H5, H1'b), 2.93 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz, H5'ab), 2.74 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz, H4'ab), 2.72 - 2.68 (m, 2H, H3'ab), 2.00 - 1.89 (m, 2H, H2'ab) ppm.

^{13}C -NMR (100 MHz, D_2O): $\delta = 99.75$ (C1), 72.80 (C5), 70.63 (C3), 70.07 (C2), 66.75 (C4), 66.17 (C1'), 60.93 (C6), 39.45 (C5'), 32.77 (C4'), 28.58 (C2'), 27.62 (C3') ppm.

MS (MALDI): m/z ber. für $\text{C}_{11}\text{H}_{24}\text{NO}_6\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 298.132; gef.: 298.072.

1-O-3-(2-Aminoethylthio)-propyl-6-azido-6-deoxy- α -D-mannopyranosid (50)

Allylmannose **47** (160 mg, 652 μ mol) wurde mit Cysteamin·HCl (**48**, 520 mg, 4.58 mmol) in qH₂O (2 ml) laut allgemeiner Versuchsvorschrift H umgesetzt. Nach Säulenchromatographie (RP-18, MeCN/H₂O 10:1) wurde das Produkt als gelbliches Öl (130 mg, 403 μ mol, 62 %) erhalten.

Summenformel: C₁₁H₂₂N₄O₅S (322.38 g/mol)

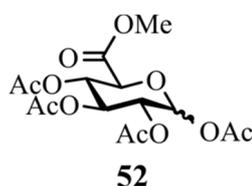
R_f-Wert: 0.00-0.19 (RP-18, MeCN/H₂O 10:1)

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ = 4.96 (d, 1H, J = 1.7 Hz, H1), 4.03 (dd, 1H, J = 1.7, 3.3 Hz, H2), 3.90-3.83 (m, 3H, H3, H5, H1'_a), 3.70-3.64 (m, 1H, H1'_b), 3.65 (dd, 1H, J = 9.7, 9.7 Hz, H4), 3.51 (dd, 1H, J = 3.0, 13.3 Hz, H6_a), 3.28 (t, 2H, J = 6.7 Hz, H5'_{ab}), 3.23 (dd, 1H, J = 8.7, 13.3 Hz, H6_b), 2.92 (t, 2H, J = 6.7 Hz, H4'_{ab}), 2.75 (t, 2H, J = 7.2 Hz, H3'_{ab}), 2.03-1.92 (m, 2H, H2'_{ab}) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O): δ = 99.84 (C1), 70.19 (C3), 69.94 (C2), 68.51 (C5), 68.19 (C4), 66.32 (C1'), 40.56 (C6), 38.34 (C5'), 28.28 (C2'), 28.20 (C4'), 27.43 (C3') ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für C₁₁H₂₅N₂O₅S [M-(N₂)+3H]⁺: 297.14897; gef.: 297.14850, Δ ppm: 1.58.

Das Molekül spaltet unter den ESI-Messbedingungen vermutlich Stickstoff ab und wird als Ammonium (+3H)⁺ detektiert.

6.2.2.2 1-O-Allyl- β -D-glucuronsäure (55)**1,2,3,4-Tetra-O-acetyl-D-glucuronsäuremethylester (52)**

D-Glucuronsäure- γ -lacton (**51**, 10.0 g, 56.8 mmol) wurde unter Schutzgas in trockenem Methanol (60 ml) suspendiert und nach Zugabe von NaOMe (100 mg, 1.85 mmol) 2 h bei RT gerührt. Die jetzt klare gelbe Lösung wurde im Vakuum eingengt und der Rückstand in Ac₂O (40 ml) aufgenommen. Unter Kühlung ($T < 40$ °C) wurde langsam Perchlorsäure (240 μ l, 4.23 mmol), gelöst in Ac₂O (6 ml), zugetropft, die Reaktionsmischung anschließend über Nacht bei RT gerührt, dabei begann ein weißer Feststoff auszukristallisieren. Zur Vervollständigung der Kristallisation wurde die Mischung auf -20 °C gekühlt. Der Feststoff

wurde mittels Büchnertrichter abfiltriert und mit eiskaltem Et₂O gewaschen. Die Mutterlauge wurde auf Eis gegossen, mit festem NaHCO₃ neutralisiert, die Lösung mehrfach mit DCM extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde aus heißem Isopropanol umkristallisiert, nach dem Filtrieren mit Et₂O verrieben und erneut filtriert, um verbliebene Verunreinigungen zu entfernen. Die Mutterlauge wurde im Vakuum eingengt und säulenchromatographisch (Cy/EE 3:1) getrennt. Während durch Kristallisation ausschließlich das β-Anomer von **52** isoliert wurde, lieferte die anschließende Säulenchromatographie nahezu reines α-Anomer. Gesamt wurden 14.7 g (39.0 mmol, 69 % [Lit.^[429] 83 %]) eines weißen Feststoffs isoliert.

Summenformel: C₁₅H₂₀O₁₁ (376.31 g/mol)

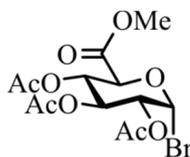
R_f-Wert: 0.08 (Cy/EE 3:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = [α-Anomer] 6.39 (d, 1H, *J* = 3.7 Hz, H1), 5.52 (dd, 1H, *J* = 9.5, 10.2 Hz, H3), 5.22 (dd, 1H, *J* = 9.5, 10.2 Hz, H4), 5.12 (dd, 1H, *J* = 3.7, 10.2 Hz, H2), 4.41 (dd, 1H, *J* = 0.4, 10.2 Hz, H5), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 2.18, 2.04, 2.04, 2.01 (4x s, 3H, COCH₃); [β-Anomer] 5.77 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz, H1), 5.31 (dd, 1H, *J* = 9.0, 9.2 Hz, H3), 5.24 (dd, 1H, *J* = 9.2, 9.3 Hz, H4), 5.14 (dd, 1H, *J* = 7.7, 9.0 Hz, H2), 4.18 (d, 1H, *J* = 9.3 Hz, H5), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 2.11 (s, 3H, COCH₃), 2.04 (s, 6H, 2x COCH₃), 2.03 (s, 3H, COCH₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = [α-Anomer] 170.14, 169.65, 169.52, 168.60 (4x COCH₃), 167.38 (C6), 88.94 (C1), 70.56 (C5), 69.29 (C4), 69.13 (C3), 69.04 (C2), 53.15 (OCH₃), 20.94, 20.79, 20.60, 20.54 (4x COCH₃); [β-Anomer] 170.03, 169.53, 169.30, 168.95 (4x COCH₃), 166.94 (C6), 91.54 (C1), 73.18 (C5) 72.00 (C3), 70.34 (C2), 69.08 (C4), 53.15 (OCH₃), 20.90, 20.70, 20.67, 20.60 (4x COCH₃) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für C₁₅H₂₀NaO₁₁ [M+Na]⁺: 399.08978; gef.: 399.08952, Δppm: 0.65.

2,3,4-Tri-O-acetyl-1-brom-1-deoxy-α-D-glucuronsäuremethylester (**53**)



53

Glucuronsäure **52** (2.00 g, 5.31 mmol) wurde unter Schutzgas mit HBr in Essigsäure (32 %, 5 ml, 27.3 mmol) versetzt und bei RT gerührt, bis der Feststoff gänzlich gelöst war. Die rotbraune Lösung wurde 18 h bei -20 °C gelagert, das Lösungsmittel anschließend im Vakuum entfernt (Essigsäure unbedingt in einer Kühlfalle kondensieren!). Der Rückstand wurde in Chloroform aufgenommen, die Lösung mit ges. NaHCO₃ und Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde aus Ethanol umkristallisiert und Bromid **53** als weißer Feststoff (1.69 g, 4.25 mmol, 80 % [Lit.^[429] 85 %]) erhalten.

Summenformel: C₁₃H₁₇BrO₉ (397.17 g/mol)

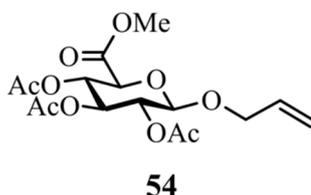
R_F-Wert: 0.73 (DCM/MeOH 97:3)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 6.64 (d, 1H, *J* = 4.1 Hz, H1), 5.61 (dd, 1H, *J* = 9.6, 9.9 Hz, H3), 5.24 (dd, 1H, *J* = 9.6, 10.3 Hz, H4), 4.85 (dd, 1H, *J* = 4.1, 9.9 Hz, H2), 4.58 (dd, 1H, *J* = 0.5, 10.3 Hz, H5), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 2.09, 2.05, 2.04 (3x s, 3H, COCH₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 169.80, 169.77, 169.58 (3x COCH₃), 166.80 (C6), 85.51 (C1), 72.21 (C5), 70.47 (C2), 69.47 (C3), 68.65 (C4), 53.26 (OCH₃), 20.73, 20.58 (3x COCH₃) ppm.

HRMS (ESI-pos): *m/z* ber. für C₁₃H₂₁BrNO₉ [M+NH₄]⁺: 414.03942; gef.: 414.03934, Δppm: 0.19.

2,3,4-Tri-O-acetyl-1-O-allyl-β-D-glucuronsäuremethylester (54)



Glucuronsäurebromid **53** (600 mg, 1.51 mmol) wurde unter Schutzgas in trockenem Allylalkohol (**44**, 3.20 ml, 46.8 mmol) gelöst und über Molsieb (3 Å) 30 min bei RT gerührt. Nach Zugabe von Silbercarbonat (729 mg, 2.64 mmol) wurde 18 h gerührt. Die Suspension wurde über Celite filtriert, mit Aceton nachgewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (Cy/EE 5:1-1:1) getrennt und Allylglucuronsäure **54** als farbloser kristalliner Feststoff (315 mg, 841 μmol, 56 %) erhalten.

Summenformel: C₁₆H₂₂O₁₀ (374.34 g/mol)

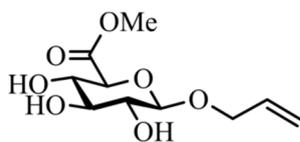
R_F-Wert: 0.23 (Cy/EE 2:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 5.84 (dddd, 1H, *J* = 4.8, 6.2, 10.5, 17.3 Hz, CH=CH₂), 5.30-5.23 (m, 3H, H3, H4, CH=CH_{2,trans}), 5.21 (dddd, 1H, *J* = 1.4, 1.4, 1.5, 10.5 Hz, CH=CH_{2,cis}), 5.06-5.02 (m, 1H, H2), 4.61 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, H1), 4.36 (dddd, 1H, *J* = 1.5, 1.7, 4.8, 13.2 Hz, CH_{2a}-CH=CH₂), 4.10 (dddd, 1H, *J* = 1.4, 1.4, 6.2, 13.2 Hz, CH_{2b}-CH=CH₂), 4.06-4.01 (m, 1H, H5), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 2.05, 2.02, 2.02 (3x s, 3H, COCH₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 170.30, 169.51, 169.39 (3x COCH₃), 167.43 (C6), 133.26 (CH=CH₂), 118.00 (CH=CH₂), 99.68 (C1), 72.81 (C5), 72.27 (C3), 71.40 (C2), 70.28 (CH₂-CH=CH₂), 69.61 (C4), 53.04 (OCH₃), 20.79, 20.76, 20.65 (3x COCH₃) ppm.

MS (MALDI): *m/z* ber. für C₁₆H₂₂NaO₁₀ [M+Na]⁺: 397.111; gef.: 397.130.

1-O-Allyl-β-D-glucuronsäuremethylester (56)



56

Glucuronsäure **54** (100 mg, 267 μmol) wurde unter Schutzgas in trockenem Methanol gelöst, nach Zugabe von NaOMe (0.5 M in Methanol, 135 μl, 68.0 μmol) wurde 15 min bei RT gerührt. Die Lösung wurde mit saurem Ionentauscher (Dowex HCR-W2, H⁺-Form) neutralisiert, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde als hellgelber glasartiger Feststoff (65.8 mg, 265 μmol, 99 %) erhalten.

Summenformel: C₁₀H₁₆O₇ (248.23 g/mol)

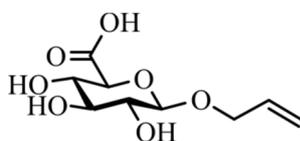
R_f-Wert: 0.67 (WIE)

¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 5.95 (dddd, 1H, *J* = 5.3, 6.1, 10.5, 17.3 Hz, CH=CH₂), 5.32 (dddd, 1H, *J* = 1.5, 1.6, 1.6, 17.3 Hz, CH=CH_{2,trans}), 5.17 (dddd, 1H, *J* = 1.4, 1.5, 1.7, 10.5 Hz, CH=CH_{2,cis}), 4.37 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, H1), 4.31 (dddd, 1H, *J* = 1.6, 1.7, 5.3, 12.9 Hz, CH_{2a}-CH=CH₂), 4.12 (dddd, 1H, *J* = 1.4, 1.6, 6.1, 12.9 Hz, CH_{2b}-CH=CH₂), 3.83 (d, 1H, *J* = 9.7 Hz, H5), 3.78 (s, 3H, CH₃), 3.54 (dd, 1H, *J* = 9.1, 9.7 Hz, H4), 3.38 (dd, 1H, *J* = 9.1, 9.1 Hz, H3), 3.25 (dd, 1H, *J* = 7.8, 9.1 Hz, H2) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD): δ = 171.21 (C6), 135.45 (CH=CH₂), 117.65 (CH=CH₂), 103.80 (C1), 77.31 (C3), 76.78 (C5), 74.71 (C2), 73.12 (C4), 71.40 (CH₂-CH=CH₂), 52.79 (CH₃) ppm.

MS: Der Methylester zerfällt bereits bei neutralem pH-Wert in Methanol spontan, weshalb kein Massenspektrum aufgenommen wurde.

1-O-Allyl-β-D-glucuronsäure (55)



55

Glucuronsäure **56** (65 mg, 262 μmol) wurde in Aceton (5 ml) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Nach Zugabe von 1 M NaOH (300 μl, 300 μmol) wurde 10 min gerührt, währenddessen fiel ein feiner weißer Niederschlag aus. Dieser wurde durch Neutralisation mit 0.1 M HCl wieder gelöst. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, und der Rückstand mittels Säulenchromatographie (WIE-MeOH) gereinigt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff (32.0 mg, 137 μmol, 52 %) isoliert.

Summenformel: C₉H₁₄O₇ (234.20 g/mol)

R_f-Wert: 0.06 (WIE)

¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 5.98 (dddd, 1H, J = 5.3, 6.1, 10.5, 17.2 Hz, CH=CH₂), 5.34 (dddd, 1H, J = 1.5, 1.6, 1.6, 17.2 Hz, CH=CH_{2,trans}), 5.16 (dddd, 1H, J = 1.3, 1.4, 1.6, 10.5 Hz, CH=CH_{2,cis}), 4.44 (dddd, 1H, J = 1.4, 1.6, 5.3, 12.9 Hz, CH_{2a}-CH=CH₂), 4.33 (d, 1H, J = 7.9 Hz, H1), 4.16 (dddd, 1H, J = 1.3, 1.5, 6.1, 12.9 Hz, CH_{2b}-CH=CH₂), 3.60 (d, 1H, J = 8.7 Hz, H5), 3.46 (dd, 1H, J = 8.6, 8.7 Hz, H4), 3.42 (dd, 1H, J = 8.6, 8.6 Hz, H3), 3.26 (dd, 1H, J = 7.9, 8.6 Hz, H2) ppm.

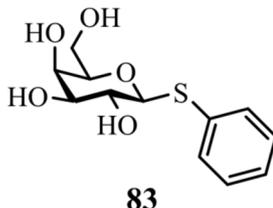
¹³C-NMR (100 MHz, MeOD): δ = 176.87 (C6), 135.73 (CH=CH₂), 117.53 (CH=CH₂), 103.29 (C1), 77.79 (C3), 76.06 (C5), 74.80 (C2), 73.59 (C4), 71.24 (CH₂-CH=CH₂) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für C₉H₁₄NaO₇ [M+Na]⁺: 257.06317; gef.: 257.06314, Δ ppm: 0.12.

6.2.3 Synthese der Galabiose-Derivate

6.2.3.1 2,3,4,6-Tetra-*O*-benzyl-1-deoxy-1-thiophenyl- β -D-galactopyranosid (9)

1-Deoxy-1-thiophenyl- β -D-galactopyranosid (83)



D-Galactosepentaacetat (**14**, 4.00 g, 10.3 mmol) wurde mit Thiophenol (1.60 ml, 15.7 mmol) unter Schutzgas in trockenem DCM (20 ml) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Innerhalb von 1 h wurde BF₃·OEt₂ (1.60 ml, 12.6 mmol) zugetropft, die Reaktionsmischung langsam auf RT gebracht und weitere 2 h gerührt. Die Lösung wurde mit DCM verdünnt, je zweimal mit 2 M NaOH sowie Wasser gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde unter Schutzgas in trockenem Methanol (20 ml) gelöst und nach Zugabe von NaOMe (0.5 M in Methanol, 200 μ l, 100 μ mol) über Nacht bei RT gerührt. Die Lösung wurde mit saurem Ionentauscher (Dowex HCR-W2, H⁺-Form) neutralisiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Thiogalactose **83** wurde als weißer Feststoff (2.69 g, 9.88 mmol, 96 % [Lit.^[477] 81 %]) erhalten.

Summenformel: C₁₂H₁₆O₅S (272.32 g/mol)

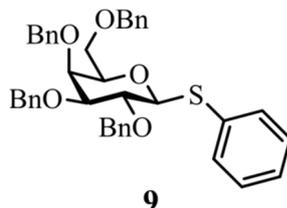
R_f-Wert: 0.36 (Cy/EE 2:1)

¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 7.56-7.53 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.31-7.21 (m, 3H, CH_{Ar}), 4.58 (d, 1H, J = 9.6 Hz, H1), 3.90 (dd, 1H, J = 1.1, 3.3 Hz, H4), 3.76 (dd, 1H, J = 6.8, 11.4 Hz, H6_a), 3.71 (dd, 1H, J = 5.4, 11.4 Hz, H6_b), 3.61 (dd, 1H, J = 9.3, 9.6 Hz, H2), 3.56 (ddd, 1H, J = 1.1, 5.4, 6.8 Hz, H5), 3.50 (dd, 1H, J = 3.3, 9.3 Hz, H3) ppm.

^{13}C -NMR (100 MHz, MeOD): $\delta = 136.06$ ($\text{C}_{\text{Ar, q}}$), 132.15, 129.84, 128.01 (3x CH_{Ar}), 90.31 (C1), 80.63 (C5), 76.37 (C3), 71.03 (C2), 70.44 (C4), 62.63 (C6) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{NaO}_5\text{S}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 295.06107; gef.: 295.06091, Δppm : 0.54.

2,3,4,6-Tetra-O-benzyl-1-deoxy-1-thiophenyl- β -D-galactopyranosid (9)



Unter Schutzgas wurde Natriumhydrid (60 % in Paraffinöl, 2.51 g, 62.8 mmol) zweimal mit trockenem Toluol gewaschen, in trockenem DMF (25 ml) suspendiert und auf 0 °C gekühlt. Thiogalactose **83** (3.29 g, 12.1 mmol) und Benzylbromid (7.18 ml, 60.4 mmol) wurden jeweils in DMF (6 ml) gelöst und nacheinander langsam zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde langsam auf RT gebracht und 18 h gerührt. Die Suspension wurde auf Eiswasser gegossen, der ausgefallene Feststoff abfiltriert, mit Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet. Galactosederivat **9** wurde als weißer Feststoff (7.43 g, 11.7 mmol, 97 % [Lit.^[477] 90 %]) erhalten.

Summenformel: $\text{C}_{40}\text{H}_{40}\text{O}_5\text{S}$ (632.81 g/mol)

R_f-Wert: 0.37 (Cy/EE 5:1)

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.58$ -7.55 (m, 2H, $\text{CH}_{\text{Ar, Thio}}$), 7.39-7.27 (m, 20H, CH_{Ar}), 7.20-7.17 (m, 3H, $\text{CH}_{\text{Ar, Thio}}$), 4.97 (d, 1H, $J = 11.5$ Hz, CH_2 -Ph), 4.79 (d, 1H, $J = 10.2$ Hz, CH_2 -Ph), 4.76-4.70 (m, 3H, CH_2 -Ph), 4.64 (d, 1H, $J = 9.6$ Hz, H1), 4.60 (d, 1H, $J = 11.5$ Hz, CH_2 -Ph), 4.48 (d, 1H, $J = 11.7$ Hz, CH_2 -Ph), 4.42 (d, 1H, $J = 11.7$ Hz, CH_2 -Ph), 3.98 (dd, 1H, $J = 0.5, 2.9$ Hz, H4), 3.94 (dd, 1H, $J = 9.4, 9.6$ Hz, H2), 3.59-3.67 (m, 4H, H3, H5, H6_{ab}) ppm.

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 138.94, 138.50, 138.43, 138.05$ (4x $\text{C}_{\text{Ar, q}}$), 134.33 ($\text{C}_{\text{Ar, q-S}}$), 131.66, 128.92, 128.57, 128.56, 128.48, 128.47, 128.34, 128.06, 127.97, 127.94, 127.87, 127.83, 127.78, 127.72, 127.60, 127.17 (CH_{Ar}), 87.89 (C1), 84.37 (C3), 77.37 (C2), 77.28 (C5), 75.79 (CH_2 -Ph), 74.61 (CH_2 -Ph), 73.79 (C4), 73.74 (CH_2 -Ph), 72.91 (CH_2 -Ph), 68.94 (C6) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für $\text{C}_{40}\text{H}_{44}\text{NO}_5\text{S}$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$: 650.29347; gef.: 650.29416, Δppm : 1.06.

allgemeine Versuchsvorschrift I (Einführung einer 4,6-Benzyliden-Schutzgruppe)

Das Galactosederivat wurde in Acetonitril suspendiert, Benzaldehyddimethylacetal (1.82 Äq) und Campher-10-sulfonsäure (CSA, 0.045 Äq) zugegeben und für 2 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von NEt_3 gestoppt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Falls nötig wurde der Rückstand durch Säulenchromatographie (DCM/MeOH 50:1) gereinigt.

allgemeine Versuchsvorschrift J (Benzylierung)

Unter Schutzgas wurde Natriumhydrid (60 % in Paraffinöl, 4 Äq) zweimal mit trockenem Toluol gewaschen und in trockenem THF bzw. DMF suspendiert. Der 4,6-benzylidengeschützte Zucker und Benzylbromid (8 Äq) wurden jeweils in THF bzw. DMF gelöst und nacheinander langsam zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde für 20 h bei RT gerührt, mit Methanol gequench und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Chloroform aufgenommen und mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde mehrfach mit Chloroform extrahiert, die vereinigten organischen Phasen zweimal mit Wasser gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Falls nötig wurde der Rückstand durch Säulenchromatographie (DCM/MeOH 50:1) gereinigt.

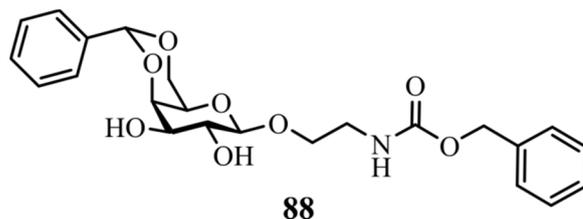
allgemeine Versuchsvorschrift K (Öffnung eines 4,6-Benzylidens zum 4-OH)

Der benzylidengeschützte Zucker wurde unter Schutzgas in trockenem DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. Nach Zugabe von Triethylsilan (TES, 6 Äq) und Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA, 1 Äq) wurde 10 min bei 0 °C gerührt, bevor Trifluoressigsäure (TFA, 5 Äq) langsam zugetropft wurden. Die Reaktionsmischung wurde für weitere 3 h bei 0 °C gehalten, anschließend langsam auf 15 °C erwärmt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von NEt_3 gestoppt, die Lösung mit DCM verdünnt und mit ges. NaHCO_3 gewaschen. Die wässrige Phase wurde dreimal mit DCM extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie getrennt.

allgemeine Versuchsvorschrift L (Kupplung zum Galabiose-Disaccharid)

Der 4-OH-Zucker wurde mit thiophenylaktivierter Galactose **9** (1.2 Äq) unter Schutzgas in trockenem DCM (1 Volumenteil) gelöst und mit *N*-Iodsuccinimid (NIS, 1.2 Äq) in trockenem Diethylether (2 Volumenteil) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde auf -55 °C gekühlt und langsam TMSOTf (0.2 Äq) zugegeben. Die Lösung wurde für 1 h bei -55 °C gehalten, die Reaktion mit NEt_3 (5 Äq) gestoppt und für 1 h weiter bei -55 °C gerührt, anschließend langsam auf RT gebracht. Die Lösung wurde mit DCM verdünnt, mit 6 % $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ sowie ges. NaHCO_3 gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der ölige Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (Cy/EE in verschiedenen Volumenverhältnissen) getrennt, um das α -verknüpfte Disaccharid zu erhalten.

**6.2.3.2 1-O-(2-Aminoethyl)-4-O-(α -D-galactopyranosyl)- β -D-galactopyranosid (1)
4,6-O-Benzyliden-1-O-(2-benzyloxycarbonylaminoethyl)- β -D-galactopyranosid (88)**



Galactosederivat **87** (850 mg, 2.38 mmol) wurde mit Benzaldehyddimethylacetal (646 μ l, 4.33 mmol) und CSA (24.9 mg, 107 μ mol) laut allgemeiner Versuchsvorschrift I in Acetonitril (15 ml) umgesetzt (die Mischung lag während der gesamten Reaktionsdauer als milchige Suspension vor). Benzyliden **88** wurde nach Säulenchromatographie als weißer Feststoff (955 mg, 2.14 mmol, 90 %) erhalten.

Summenformel: C₂₃H₂₇NO₈ (445.46 g/mol)

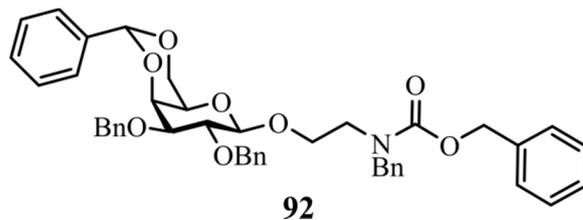
R_f-Wert: 0.35 (DCM/MeOH 9:1)

¹H-NMR (400 MHz, [d₆]DMSO): δ = 7.47-7.43 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.39-7.29 (m, 8H, CH_{Ar}), 7.26 (br. t, 1H, J = 5.8 Hz, NH), 5.55 (s, 1H, CH-Ph), 5.03 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.97 (d, 1H, J = 4.0 Hz, C2-OH), 4.89 (d, 1H, J = 6.0 Hz, C3-OH), 4.21 (d, 1H, J = 7.7 Hz, H1), 4.06 (dd, 1H, J = 0.6, 3.6 Hz, H4), 4.04 (br. s, 2H, O-CH_{2ab}-CH₂), 3.78 (ddd, 1H, J = 5.7, 5.8, 10.1 Hz, CH_{2a}-NH), 3.52-3.44 (m, 3H, H3, H5, CH_{2b}-NH), 3.37 (ddd, 1H, J = 4.0, 7.7, 9.6 Hz, H2), 3.28-3.16 (m, 2H, H_{6ab}) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, [d₆]DMSO): δ = 156.16 (CO), 138.60 (C_{Ar, q} [Benzyliden]), 137.11 (C_{Ar, q} [Cbz]), 128.54, 128.34, 127.85, 127.75, 126.23 (CH_{Ar}), 103.30 (C1), 99.72 (CH-Ph), 75.90 (C4), 71.70 (C3), 70.02 (C2), 68.55 (O-CH₂-CH₂), 67.82 (CH₂-NH), 65.97 (C5), 65.31 (CH₂-Ph), 40.36 (C6) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für C₂₃H₂₇NaNO₈ [M+Na]⁺: 468.16289; gef.: 468.16269, Δ ppm: 0.43.

1-O-(2-Benzyl-2-benzyloxycarbonylaminoethyl)-2,3-di-O-benzyl-4,6-O-benzyliden- β -D-galactopyranosid (92)



Galactose **88** (910 mg, 2.04 mmol) wurde mit NaH (60 % in Paraffinöl, 654 mg, 16.4 mmol) und Benzylbromid (971 μ l, 8.17 mmol) in DMF (25 ml) laut allgemeiner Versuchsvorschrift J umgesetzt. Neben den beiden Alkoholfunktionen wurde dabei auch der Stickstoff des

Carbamats benzyliert. Produkt **92** wurde nach Säulenchromatographie als farbloses Öl (1.24 g, 1.74 mmol, 85 %) erhalten.

Summenformel: C₄₄H₄₅NO₈ (715.83 g/mol)

R_F-Wert: 0.14 (Cy/EE 1:1)

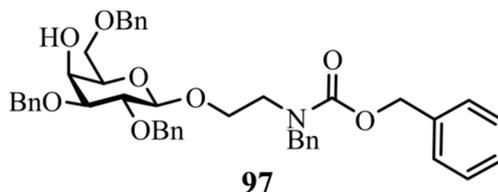
¹H-NMR (400 MHz, [d₆]DMSO): δ = 7.46-7.43 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.41-7.15 (m, 23H, CH_{Ar}), 5.64 (s, 1H, CH-Ph), 5.13 (br. s, 1H, CH₂-Ph), 5.06 (br. s, 1H, CH₂-Ph), 4.79-4.60 (m, 4H, CH₂-Ph), 4.53 (s, 2H, N-CH₂-Ph), 4.49-4.39 (m, 2H, H1, H4), 4.08-4.06 (m, 2H, H_{6ab}), 3.94-3.85 (m, 1H, O-CH_{2a}-CH₂), 3.70-3.64 (m, 2H, H3, O-CH_{2b}-CH₂), 3.53-3.42 (m, 4H, H2, H5, CH₂-CH_{2ab}-N) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, [d₆]DMSO): δ = 155.54 (CO), 140.05, 139.82, 138.94, 138.56, 138.43 (5x C_{Ar}, q), 128.65, 128.42, 128.11, 127.97, 127.73, 127.46, 127.39, 127.35, 127.30, 127.18, 126.14 (CH_{Ar}), 102.69 (C1), 99.74 (CH-Ph), 78.55 (C3), 78.05 (C5), 73.97 (CH₂-Ph), 72.36 (C4), 70.08 (CH₂-Ph), 68.49 (C6), 66.87 (O-CH₂-CH₂), 66.39 (CH₂-Ph), 65.77 (C2), 50.51 (N-CH₂-Ph), 45.97 (CH₂-CH₂-N) ppm.

MS (MALDI): m/z ber. für C₄₄H₄₅NaNO₈ [M+Na]⁺: 738.304; gef.: 738.273.

Aufgrund der geringen Löslichkeit der Verbindung in den zur Verfügung stehenden deuterierten Lösungsmitteln war eine starke Signalverbreiterung, insbesondere im ¹H-NMR-Spektrum, zu beobachten.

1-O-(2-Benzyl-2-benzyloxycarbonylaminoethyl)-2,3,6-tri-O-benzyl-β-D-galactopyranosid (97)



Die benzylierte Galactose **92** (500 mg, 698 μmol) wurde mit Triethylsilan (669 μl, 4.19 mmol), TFAA (98.0 μl, 698 μmol) und TFA (269 μl, 3.49 mmol) laut allgemeiner Versuchsvorschrift K in DCM (10 ml) umgesetzt. Der 4-OH-entschützte Zucker **97** wurde nach Säulenchromatographie (DCM/MeOH 100:1) als gelbliches Öl (405 mg, 564 μmol, 81 %) isoliert.

Summenformel: C₄₄H₄₇NO₈ (717.85 g/mol)

R_F-Wert: 0.27 (Cy/EE 7:3)

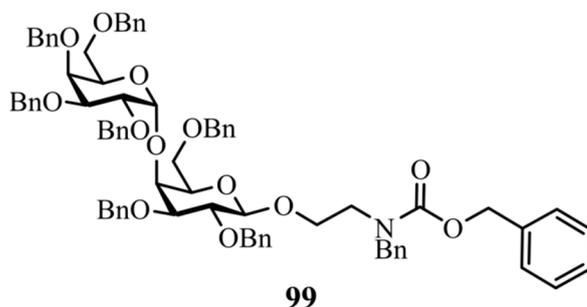
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.37-7.12 (m, 25H, CH_{Ar}), 5.17 (s, 1H, CH₂-Ph), 5.13 (s, 1H, CH₂-Ph), 4.88-4.80 (m, 1H, CH₂-Ph), 4.74-4.68 (m, 1H, CH₂-Ph), 4.71 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.64-4.60 (m, 1H, N-CH_{2a}-Ph), 4.56 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.56-4.52 (m, 1H, N-CH_{2b}-Ph), 4.36-4.25 (m, 1H, H1), 4.06-3.90 (m, 1H, O-CH_{2a}-CH₂), 4.02 (br. s, 1H, H4), 3.80-3.60 (m, 4H, H2, H6_{ab}, O-CH_{2b}-CH₂), 3.54-3.45 (m, 4H, H3, H5, CH₂-CH_{2ab}-N), 2.49 (br. s, 1H, OH) ppm.

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 156.49$ (CO), 138.11, 137.99, 137.96 (C_{Ar} , q), 128.67, 128.63, 128.60, 128.47, 128.07, 128.00, 127.93, 127.76, 127.41 (CH_{Ar}), 103.93 (C1), 80.76 (C3), 79.15 (C2), 75.35 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$), 73.87 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$), 73.24 (C5), 72.57 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$), 69.20 (C6), 67.96 (O- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 67.41 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$), 66.90 (C4), 51.61 (N- $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 47.24, 46.14 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für $\text{C}_{44}\text{H}_{47}\text{NaNO}_8$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 740.31939; gef.: 740.32049, Δppm : 1.49.

Aufgrund der geringen Löslichkeit der Verbindung in den zur Verfügung stehenden deuterierten Lösungsmitteln war eine starke Signalverbreiterung, insbesondere im ^1H -NMR-Spektrum, zu beobachten.

1-O-(2-Benzyl-2-benzyloxycarbonylaminoethyl)-2,3,6-tri-O-benzyl-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl- α -D-galactopyranosyl)- β -D-galactopyranosid (99)



Galactoseakzeptor **97** (385 mg, 613 μmol) wurde mit Donor **9** (466 mg, 736 μmol), *N*-Iodsuccinimid (166 mg, 736 μmol) und TMSOTf (22.0 μl , 123 μmol) laut allgemeiner Versuchsvorschrift L in DCM (11 ml) und Diethylether (22 ml) umgesetzt. Nach Säulenchromatographie (Cy/EE 20:1-10:1) wurde das α -verknüpfte Disaccharid **99** als gelbliches Öl (377 mg, 328 μmol , 53 %) erhalten.

Summenformel: $\text{C}_{78}\text{H}_{81}\text{NO}_{13}$ (1240.50 g/mol)

R_f -Wert: 0.15 (Cy/EE 4:1)

^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.35\text{-}7.12$ (m, 45H, CH_{Ar}), 5.17-5.10 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$ [Cbz]), 5.04 (br., 1H, H1'), 4.91 (d, 1H, $J = 11.2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.88 (d, 1H, $J = 11.9$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.86-4.73 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.79 (d, 1H, $J = 12.5$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.74 (br., 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.70 (d, 1H, $J = 11.9$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.62 (dd, 1H, $J = 8.2, 15.5$ Hz, N- $\text{CH}_{2\text{a}}\text{-Ph}$), 4.57 (br. m, 1H, N- $\text{CH}_{2\text{b}}\text{-Ph}$), 4.55 (d, 1H, $J = 11.1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.53 (d, 1H, $J = 12.1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.43 (ddd, 1H, $J = 4.3, 4.5, 8.7$ Hz, H5'), 4.35-4.17 (m, 3H, H1, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.15 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.13-4.06 (m, 3H, H3', H4', H5), 4.02-3.96 (m, 3H, H4, H2', O- $\text{CH}_{2\text{a}}\text{-CH}_2$), 3.91-3.77 (m, 1H, H6a), 3.68-3.62 (m, 2H, H2, H6b), 3.56 (dd, 1H, $J = 8.5, 8.7$ Hz, H6'a), 3.58-3.34 (m, 4H, H3, O- $\text{CH}_{2\text{b}}\text{-CH}_{2\text{ab}}$), 3.25 (dd, 1H, $J = 4.5, 8.5$ Hz, H6'b) ppm.

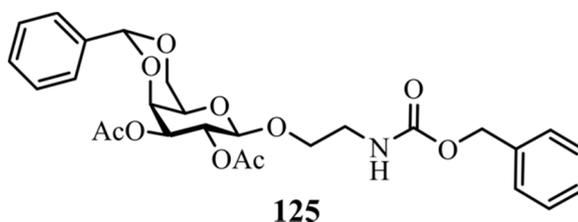
^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 156.65, 156.39$ (CO [Cbz]), 139.12, 138.97, 138.88, 138.85, 138.75, 138.26, 138.19 (C_{Ar} , q [OBn]), 138.12, 137.98 (C_{Ar} , q [NBn]), 136.89, 136.76 (C_{Ar} , q [Cbz]), 128.68, 128.65, 128.55, 128.53, 128.43, 128.42, 128.40, 128.37, 128.28,

128.22, 128.12, 128.06, 128.03, 127.99, 127.78, 127.75, 127.65, 127.53, 127.51, 127.48, 127.47, 127.32 (CH_{Ar}), 104.32 (C1), 100.74, 100.72 (C1'), 81.00, 80.96 (C3), 79.33, 79.32 (C3'), 79.06 (C2), 76.72 (C4), 75.31, 75.25 (CH₂-Ph), 75.05 (CH₂-Ph), 75.02 (C2'), 74.79 (C4'), 73.91, 73.90 (CH₂-Ph), 73.77, 73.71 (C5), 73.36 (CH₂-Ph), 73.19 (CH₂-Ph), 72.49 (CH₂-Ph), 72.39 (CH₂-Ph), 69.50, 69.47 (C5'), 68.29 (C6), 68.11 (C6'), 68.08 (O-CH₂-CH₂), 67.44, 67.37 (CH₂-Ph [Cbz]), 51.61, 51.54 (N-CH₂-Ph), 47.30, 46.20 (CH₂-CH₂-N) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für C₇₈H₈₅N₂O₁₃ [M+NH₄]⁺: 1257.60462; gef.: 1257.60555, Δppm: 0.74.

Im ¹H-Spektrum wurden teilweise Linienverbreiterungen, im ¹³C-Spektrum teilweise Liniendopplungen der Signale beobachtet, die auf zwei nebeneinander vorliegende stabile Konformere hindeuten (evtl. Konformationsumkehr am sterisch gehinderten Stickstoff).

1-O-(2-Benzoyloxycarbonylaminoethyl)-2,3-di-O-acetyl-4,6-O-benzyliden-β-D-galactopyranosid (125)



Galactose **88** (2.26 g, 5.07 mmol) wurde in Pyridin (45 ml) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Nach Zugabe von Essigsäureanhydrid (10 ml, 106 mmol) wurde weitere 4 h bei 0 °C gerührt, die Mischung dann langsam auf RT gebracht. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in DCM aufgenommen und dreimal mit 0.5 M HCl, zweimal mit ges. NaHCO₃ sowie zweimal mit 5 % CuSO₄ gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. **125** wurde als weißer Feststoff (2.69 g, 5.07 mmol, quant.) isoliert.

Summenformel: C₂₇H₃₁NO₁₀ (529.54 g/mol)

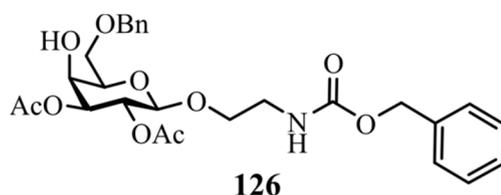
R_f-Wert: 0.25 (DCM/MeOH 50:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.52-7.49 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.40-7.31 (m, 8H, CH_{Ar}), 5.50 (s, 1H, CH-Ph), 5.36 (dd, 1H, *J* = 8.0, 10.4 Hz, H2), 5.23 (br. t, 1H, *J* = 4.9 Hz, NH), 5.10 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.95 (dd, 1H, *J* = 3.6, 10.4 Hz, H3), 4.49 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H1), 4.37 (dd, 1H, *J* = 0.9, 3.6 Hz, H4), 4.31 (dd, 1H, *J* = 1.4, 12.5 Hz, H6_a), 4.04 (dd, 1H, *J* = 1.7, 12.5 Hz, H6_b), 3.91 (ddd, 1H, *J* = 3.9, 5.9, 9.9 Hz, O-CH_{2a}-CH₂), 3.72-3.66 (m, 1H, O-CH_{2b}-CH₂), 3.50 (ddd, 1H, *J* = 0.9, 1.4, 1.7 Hz, H5), 3.46-3.33 (m, 2H, CH₂-NH), 2.07, 2.00 (2x s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 170.85, 169.67 (2x COCH₃), 156.53 (CONH), 137.55 (C_{Ar, q} [Benzyliden]), 136.73 (C_{Ar, q} [Cbz]), 129.21, 128.59, 128.31, 128.16, 126.45 (CH_{Ar}), 101.43 (C1), 101.17 (CH-Ph), 73.40 (C4), 71.98 (C3), 68.95 (C6), 68.89 (O-CH₂-CH₂), 68.69 (C2), 66.75 (CH₂-Ph), 66.58 (C5), 41.03 (CH₂-NH), 20.97, 20.83 (2x CH₃) ppm.

MS (ESI-pos): m/z ber. für C₂₇H₃₅N₂O₁₀ [M+NH₄]⁺: 547.22862; gef.: 547.22839, Δppm: 0.42.

1-O-(2-Benzoyloxycarbonylaminoethyl)-2,3-di-O-acetyl-6-O-benzyl-β-D-galactopyranosid (126)



Die acetylierte Galactose **125** (250 mg, 472 μmol) wurde mit Triethylsilan (452 μl, 2.83 mmol), TFAA (182 μl, 2.36 mmol) und TFA (67.0 μl, 472 μmol) laut allgemeiner Versuchsvorschrift K in DCM (1.5 ml) umgesetzt. Der ringgeöffnete Zucker **126** wurde nach Säulenchromatographie (DCM/MeOH 100:1) als farbloses Öl (109 mg, 205 μmol, 43 %) erhalten.

Summenformel: C₂₇H₃₃NO₁₀ (531.55 g/mol)

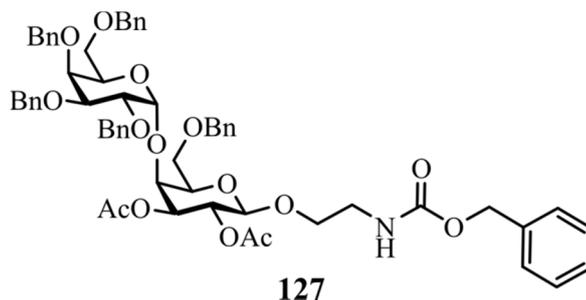
R_f-Wert: 0.10 (DCM/MeOH 50:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.35-7.27 (m, 10H, CH_{Ar}), 5.34 (br. t, 1H, *J* = 6.1 Hz, NH), 5.26 (dd, 1H, *J* = 7.9, 10.2 Hz, H₂), 5.09 (s, 2H, CH₂-Ph [Cbz]), 4.92 (dd, 1H, *J* = 3.2, 10.2 Hz, H₃), 4.52 (s, 2H, CH₂-Ph [Bn]), 4.43 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, H₁), 4.13 (ddd, 1H, *J* = 1.0, 3.2, 4.1 Hz, H₄), 3.86 (ddd, 1H, *J* = 4.8, 5.1, 10.2 Hz, O-CH_{2a}-CH₂), 3.77-3.66 (m, 4H, H₅, H_{6ab}, O-CH_{2b}-CH₂), 3.42-3.37 (m, 2H, CH₂-NH), 2.62 (d, 1H, *J* = 4.1 Hz, OH), 2.09, 2.00 (2x s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 170.31, 169.83 (2x COCH₃), 156.57 (CO [Cbz]), 137.57 (C_{Ar, q} [Bn]), 136.73 (C_{Ar, q} [Cbz]), 128.66, 128.64, 128.23, 128.10, 127.93 (CH_{Ar}), 101.78 (C₁), 73.92 (CH₂-Ph [Bn]), 73.44 (C₃), 73.26 (C₅), 69.67 (O-CH₂-CH₂), 69.48 (C₂), 69.25 (C₆), 68.15 (C₄), 66.84 (CH₂-Ph [Cbz]), 41.24 (CH₂-NH), 21.00, 20.84 (2x CH₃) ppm.

MS (ESI-pos): m/z ber. für C₂₇H₃₃NaNO₁₀ [M+Na]⁺: 554.19967; gef.: 554.19986, Δppm: 0.34.

1-O-(2-Benzyloxycarbonylaminoethyl)-2,3-di-O-acetyl-6-O-benzyl-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl- α -D-galactopyranosyl)- β -D-galactopyranosid (127)



Galactosylakzeptor **126** (90.0 mg, 169 μ mol) wurde mit Donor **9** (129 mg, 203 μ mol), *N*-Iodsuccinimid (45.7 mg, 203 μ mol) und TMSOTf (6.13 μ l, 34.0 μ mol) laut allgemeiner Versuchsvorschrift L in DCM (3.1 ml) und Diethylether (6.2 ml) umgesetzt. Nach Säulenchromatographie (Cy/EE 15:1-4:1) wurde das Disaccharid **127** als farbloses Öl (113 mg, 107 μ mol, 63 %) isoliert.

Summenformel: C₆₁H₆₇NO₁₅ (1054.18 g/mol)

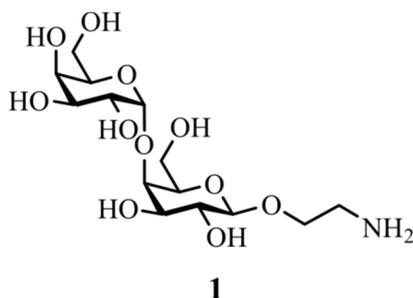
R_f-Wert: 0.22 (Cy/EE 2:1)

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 7.37-7.13 (m, 30H, CH_{Ar}), 5.43 (t, 1H, *J* = 5.3 Hz, NH), 5.23 (dd, 1H, *J* = 7.8, 10.7 Hz, H₂), 5.07 (s, 2H, CH₂-Ph [Cbz]), 4.91 (d, 1H, *J* = 11.3 Hz, CH₂-Ph), 4.88 (dd, 1H, *J* = 3.0, 10.7 Hz, H₃), 4.83 (d, 1H, *J* = 3.4 Hz, H₁'), 4.82 (d, 1H, *J* = 11.8 Hz, CH₂-Ph), 4.75 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.61 (d, 1H, *J* = 11.8 Hz, CH₂-Ph), 4.55 (d, 1H, *J* = 11.3 Hz, CH₂-Ph), 4.22 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.41 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, H₁), 4.30 (dd, 1H, *J* = 5.1, 8.7 Hz, H₅'), 4.19 (d, 1H, *J* = 12.0 Hz, CH₂-Ph), 4.16 (d, 1H, *J* = 12.0 Hz, CH₂-Ph), 4.12 (br. s, 1H, H₄'), 4.09 (d, 1H, *J* = 3.0 Hz, H₄), 4.07 (dd, 1H, *J* = 2.6, 10.3 Hz, H₃'), 4.03 (dd, 1H, *J* = 3.4, 10.3 Hz, H₂'), 3.82 (ddd, 1H, *J* = 5.0, 5.2, 10.5 Hz, OCH_{2a}-CH₂N), 3.78 (dd, 1H, *J* = 6.4, 9.6 Hz, H_{6a}), 3.73 (ddd, 1H, *J* = 5.0, 5.2, 10.5 Hz, OCH_{2b}-CH₂N), 3.68 (dd, 1H, *J* = 6.4, 6.5 Hz, H₅), 3.63 (dd, 1H, *J* = 8.7, 8.7 Hz, H_{6'a}), 3.59 (dd, 1H, *J* = 6.5, 9.6 Hz, H_{6b}), 3.44 (dd, 1H, *J* = 5.1, 8.7 Hz, H_{6'b}), 3.40 (ddd, 2H, *J* = 5.0, 5.2, 5.3 Hz, CH₂-NH), 1.99, 1.91 (2x s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ = 170.77, 169.68 (2x COCH₃), 156.63 (CO [Cbz]), 138.92, 138.82, 138.77, 138.04, 137.94 (5x C_{Ar, q} [Bn]), 136.76 (C_{Ar, q} [Cbz]), 128.61, 128.51, 128.49, 128.47, 128.41, 128.34, 128.33, 128.22, 128.18, 128.15, 128.04, 127.86, 127.81, 127.71, 127.64, 127.63, 127.60, 127.56 (CH_{Ar}), 101.80 (C₁), 100.40 (C₁'), 79.04 (C₃'), 76.34 (C₂'), 75.12 (CH₂-Ph), 74.82 (C₄), 74.68 (C₄'), 74.20 (C₅), 73.88 (CH₂-Ph), 73.61 (CH₂-Ph), 73.13 (CH₂-Ph), 72.66 (C₃), 72.60 (CH₂-Ph), 69.69 (O-CH₂-CH₂), 69.65 (C₅'), 69.54 (C₂), 68.10 (C₆, C₆'), 66.76 (CH₂-Ph [Cbz]), 41.38 (CH₂-NH), 20.88, 20.73 (2x CH₃) ppm.

MS (ESI-pos): m/z ber. für C₆₁H₆₇NaNO₁₅ [M+Na]⁺: 1076.44029; gef.: 1076.43936, Δ ppm: 0.86.

1-O-(2-Aminoethyl)-4-O-(α -D-galactopyranosyl)- β -D-galactopyranosid (1)



Pd/C (10 % Pd, 400 mg) wurde in MeOH/THF/H₂O/HOAc (10:5:4:1, 30 ml) suspendiert und durch Behandlung im Ultraschallbad (15 min) aktiviert. Galabiose **99** (250 mg, 202 μ mol), gelöst in 50 ml desselben Lösungsmittels wurde zugegeben, der Kolben mit Wasserstoff gespült und die Suspension mit aufgesetztem Wasserstoffballon über Nacht bei RT gerührt. Der Feststoff wurde mittels Zentrifugation entfernt und mehrfach mit Methanol gewaschen, die vereinigten Fraktionen im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde mehrfach säulenchromatographisch (WIE-MeOH; RP-18, MeCN/H₂O 10:1-4:1 + 1 % NEt₃) getrennt. Galabiose **1** wurde als gelber, schaumiger Feststoff (27.0 mg, 70.0 μ mol, 35 %) isoliert.

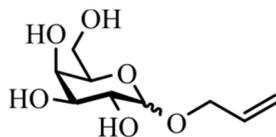
Summenformel: C₁₄H₂₇NO₁₁ (385.37 g/mol)

R_f-Wert: 0.06 (RP-18, MeCN/H₂O 4:1 + 1 % NEt₃)

¹H-NMR (600 MHz, D₂O): δ = 4.96 (d, 1H, J = 4.0 Hz, H1'), 4.51 (d, 1H, J = 7.8 Hz, H1), 4.36 (ddd, 1H, J = 0.9, 5.9, 6.8 Hz, H5'), 4.11 (ddd, 1H, J = 4.1, 6.0, 11.3 Hz, O-CH_{2a}-CH₂), 4.05 (d, 1H, J = 3.2 Hz, H4), 4.03 (dd, 1H, J = 0.9, 3.2 Hz, H4'), 3.93-3.83 (m, 5H, H6_{ab}, H2', H3', O-CH_{2b}-CH₂), 3.79 (dd, 1H, J = 4.9, 7.4 Hz, H5), 3.75 (dd, 1H, J = 3.2, 10.3 Hz, H3), 3.72 (dd, 1H, J = 5.9, 11.4 Hz, H6'_a), 3.70 (dd, 1H, J = 6.8, 11.4 Hz, H6'_b), 3.59 (dd, 1H, J = 7.8, 10.3 Hz, H2), 3.20-3.13 (m, 2H, CH_{2ab}-NH₂) ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, D₂O): δ = 103.07 (C1), 100.48 (C1'), 77.53 (C4), 75.39 (C5), 72.41 (C3), 71.06 (C2), 71.02 (C5'), 69.32 (C3'), 69.12 (C4'), 68.78 (C2'), 67.52 (O-CH₂-CH₂), 60.69 (C6'), 60.41 (C6), 39.85 (CH₂-NH₂) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für C₁₄H₂₈NO₁₁ [M+H]⁺: 386.16569; gef.: 386.16547, Δ ppm: 0.57.

6.2.3.3 1-*O*-Allyl-4-*O*-(α -D-galactopyranosyl)- β -D-galactopyranosid (2)1-*O*-Allyl-D-galactopyranosid (84)

84

D-Galactosepentaacetat (**14**, 7.00 g, 17.9 mmol) und Allylalkohol (**44**, 4.90 ml, 71.7 mmol) wurden unter Schutzgas in trockenem DCM (140 ml) gelöst und auf 0 °C gekühlt. $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (3.41 ml, 26.9 mmol) wurde innerhalb von 2 h zugetropft, das Reaktionsgemisch für weitere 2 h bei 0 °C gerührt, anschließend über Nacht auf RT gebracht. Die Lösung wurde auf Eiswasser gegossen und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde viermal mit DCM extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit Wasser, ges. NaHCO_3 und erneut Wasser gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und im Vakuum eingedunstet. Der Rückstand enthielt einfach und mehrfach acetylierte Derivate des gewünschten Produkts **84**. Er wurde unter Schutzgas in trockenem Methanol (70 ml) gelöst und nach Zugabe von Natriummethanolat (0.5 M in Methanol, 1.79 ml, 897 μmol) 18 h bei RT gerührt. Die Lösung wurde mit saurem Ionentauscher (Dowex HCR-W2, H^+ -Form) neutralisiert, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Allylgalactose **84** wurde als farbloses Öl (3.45 g, 15.7 mmol, 87 %) im Anomerenverhältnis α/β 1:3 erhalten.

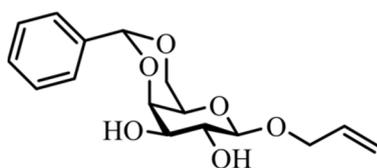
Summenformel: $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_6$ (220.22 g/mol)

R_f -Wert: 0.11 (Hex/MTBE 1:1)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOD): δ = [α -Anomer] 5.98 (dddd, 1H, J = 5.2, 6.1, 10.4, 17.3 Hz, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.36-5.30 (dm, 1H, J = 17.3 Hz, $\text{CH}=\text{CH}_2$,_{trans}), 5.17 (dddd, 1H, J = 1.4, 1.4, 1.8, 10.4 Hz, $\text{CH}=\text{CH}_2$,_{cis}), 4.87 (d, 1H, J = 3.3 Hz, H1), 4.23 (dddd, 1H, J = 1.4, 1.5, 5.2, 13.0 Hz, $\text{CH}_2\text{a}-\text{CH}=\text{CH}_2$), 4.04 (dddd, 1H, J = 1.4, 1.4, 6.1, 13.0 Hz, $\text{CH}_2\text{b}-\text{CH}=\text{CH}_2$), 3.89 (dd, 1H, J = 1.2, 3.0 Hz, H4), 3.83-3.80 (m, 1H, H2), 3.78-3.75 (m, 2H, H3, H5), 3.71-3.68 (m, 2H, H6_{ab}); [β -Anomer] 5.97 (dddd, 1H, J = 5.2, 6.1, 10.5, 17.3 Hz, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.33 (dddd, 1H, J = 1.6, 1.7, 1.8, 17.3 Hz, $\text{CH}=\text{CH}_2$,_{trans}), 5.15 (dddd, 1H, J = 1.4, 1.5, 1.8, 10.5 Hz, $\text{CH}=\text{CH}_2$,_{cis}), 4.37 (dddd, 1H, J = 1.5, 1.7, 5.2, 12.9 Hz, $\text{CH}_2\text{a}-\text{CH}=\text{CH}_2$), 4.26 (d, 1H, J = 7.6 Hz, H1), 4.15 (dddd, 1H, J = 1.4, 1.6, 6.1, 12.9 Hz, $\text{CH}_2\text{b}-\text{CH}=\text{CH}_2$), 3.83 (dd, 1H, J = 1.0, 3.3 Hz, H4), 3.77-3.71 (m, 2H, H6_{ab}), 3.54 (dd, 1H, J = 7.6, 9.7 Hz, H2), 3.51-3.47 (m, 1H, H5), 3.46 (dd, 1H, J = 3.3, 9.7 Hz, H3) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, MeOD): δ = [α -Anomer] 135.70 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 117.47 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 99.49 (C1), 72.50 (C2), 71.53 (C3, C5), 71.10 (C4), 70.24 (C3, C5), 69.38 ($\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$), 62.75 (C6); [β -Anomer] 135.87 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 117.32 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 104.02 (C1), 76.69 (C5), 75.04 (C3), 72.53 (C2), 71.01 ($\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$), 70.32 (C4), 62.52 (C6) ppm.

MS (MALDI): m/z ber. für $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{NaO}_6$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$: 243.084; gef.: 243.084.

1-O-Allyl-4,6-O-benzyliden-β-D-galactopyranosid (89)

89

Allylgalactose **84** (α/β 1:3; 652 mg, 2.96 mmol) wurde mit Benzaldehyddimethylacetal (804 μ l, 5.39 mmol) und CSA (30.9 mg, 133 μ mol) laut allgemeiner Versuchsvorschrift I in Acetonitril (20 ml) umgesetzt (der Reaktionsfortschritt konnte anhand der vollständigen Lösung des Edukts verfolgt werden). Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie getrennt und das β -D-Galactosederivat **89** als weißer Feststoff (504 mg, 1.64 mmol, 55 % [Lit.^[478] 63 % über drei Stufen ab **14**]) erhalten. Das α -substituierte Derivat **128** konnte ebenfalls als weißer Feststoff (133 mg, 431 μ mol) isoliert werden.

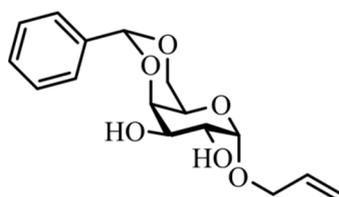
Summenformel: C₁₆H₂₀O₆ (308.33 g/mol)

R_f-Wert: 0.15 (DCM/MeOH 20:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.52-7.49 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.38-7.35 (m, 3H, CH_{Ar}), 5.97 (dddd, 1H, J = 5.3, 6.5, 10.4, 17.2 Hz, CH=CH₂), 5.56 (s, 1H, CH-Ph), 5.33 (dddd, 1H, J = 1.4, 1.6, 1.6, 17.2 Hz, CH=CH_{2,trans}), 5.23 (dddd, 1H, J = 1.3, 1.3, 1.6, 10.4 Hz, CH=CH_{2,cis}), 4.45 (dddd, 1H, J = 1.3, 1.6, 5.3, 12.6 Hz, CH_{2a}-CH=CH₂), 4.35 (dd, 1H, J = 1.6, 12.5 Hz, H_{6a}), 4.35 (d, 1H, J = 7.6 Hz, H₁), 4.22 (dd, 1H, J = 1.2, 3.8 Hz, H₄), 4.14 (dddd, 1H, J = 1.3, 1.4, 6.5, 12.5 Hz, CH_{2b}-CH=CH₂), 4.10 (dd, 1H, J = 1.9, 12.5 Hz, H_{6b}), 3.80 (dd, 1H, J = 7.6, 9.6 Hz, H₂), 3.70 (br. dd, 1H, J = 3.8, 9.6 Hz, H₃), 3.49 (dd, 1H, J = 1.2, 1.6, 1.9 Hz, H₅), 2.45 (br. s, 2H, OH) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 137.70 (C_{Ar, q}), 133.97 (CH=CH₂), 129.41, 128.40, 126.56 (CH_{Ar}), 118.21 (CH=CH₂), 101.81 (C₁), 101.66 (CH-Ph), 75.46 (C₄), 72.93 (C₃), 72.02 (C₂), 70.32 (CH₂-CH=CH₂), 69.32 (C₆), 66.91 (C₅) ppm.

MS (MALDI): m/z ber. für C₁₆H₂₀NaO₆ [M+Na]⁺: 331.115; gef.: 331.117.


128

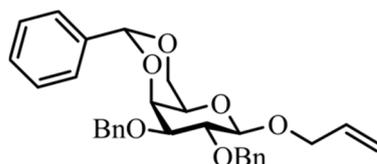
R_f-Wert: 0.20 (DCM/MeOH 20:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.52-7.48 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.39-7.35 (m, 3H, CH_{Ar}), 5.93 (dddd, 1H, J = 5.3, 6.2, 10.4, 17.2 Hz, CH=CH₂), 5.56 (s, 1H, CH-Ph), 5.32 (dddd, 1H, J = 1.6, 1.6, 1.6, 17.2 Hz, CH=CH_{2,trans}), 5.24 (dddd, 1H, J = 1.3, 1.3, 1.6, 10.4 Hz, CH=CH_{2,cis}), 5.10 (d, 1H, J = 1.6 Hz, H₁), 4.30-4.22 (m, 3H, H₃, H_{6a}, CH_{2a}-CH=CH₂), 4.12-

4.07 (m, 2H, H_{6b}, CH_{2b}-CH=CH₂), 3.93 (br. s, 2H, H₂, H₄), 3.76-3.75 (m, 1H, H₅), 2.35, 2.04 (2x br. s, 1H, OH) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 137.65 (C_{Ar, q}), 133.65 (CH=CH₂), 129.40, 128.43, 126.42 (CH_{Ar}), 118.19 (CH=CH₂), 101.49 (CH-Ph), 98.40 (C1), 76.04 (C3), 70.23, 70.00 (C2, C4), 69.50 (CH₂-CH=CH₂), 69.02 (C6), 63.19 (C5) ppm.

1-O-Allyl-2,3-di-O-benzyl-4,6-O-benzyliden-β-D-galactopyranosid (94)



94

Allylgalactose **89** (450 mg, 1.46 mmol) wurde mit NaH (60 % in Paraffinöl, 467 mg, 11.7 mmol) und Benzylbromid (693 µl, 5.84 mmol) laut allgemeiner Versuchsvorschrift J in THF (12 ml) umgesetzt. Das zweifach benzylierte Derivat **94** wurde als weißer Feststoff (666 mg, 1.36 mmol, 93 % [Lit.^[478] 93 %]) erhalten.

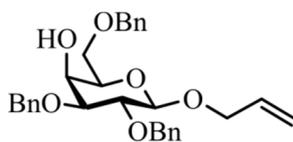
Summenformel: C₃₀H₃₂O₆ (488.57 g/mol)

R_f-Wert: 0.16 (Hex/MTBE 2:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.57-7.55 (m, 2H, CH_{Ar} [Benzyliden]), 7.41-7.28 (m, 13H, CH_{Ar}), 5.97 (dddd, 1H, *J* = 5.2, 6.0, 10.5, 17.3 Hz, CH=CH₂), 5.50 (s, 1H, CH-Ph), 5.34 (dddd, 1H, *J* = 1.6, 1.7, 1.7, 17.3 Hz, CH=CH_{2,trans}), 5.19 (dddd, 1H, *J* = 1.3, 1.4, 1.7, 10.5 Hz, CH=CH_{2,cis}), 4.95 (d, 1H, *J* = 10.8 Hz, CH₂-Ph), 4.81-4.73 (m, 3H, CH₂-Ph), 4.49-4.43 (m, 1H, CH_{2a}-CH=CH₂), 4.45 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, H₁), 4.31 (dd, 1H, *J* = 1.6, 12.3 Hz, H_{6a}), 4.15 (dddd, 1H, *J* = 1.4, 1.6, 6.0, 13.0 Hz, CH_{2b}-CH=CH₂), 4.11 (dd, 1H, *J* = 0.9, 3.7 Hz, H₄), 4.02 (dd, 1H, *J* = 1.8, 12.3 Hz, H_{6b}), 3.88 (dd, 1H, *J* = 7.8, 9.7 Hz, H₂), 3.56 (dd, 1H, *J* = 3.7, 9.7 Hz, H₃), 3.31 (ddd, 1H, *J* = 0.9, 1.6, 1.8 Hz, H₅) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 139.04, 138.64, 138.02 (3x C_{Ar, q}), 134.42 (CH=CH₂), 129.05, 128.48, 128.41, 128.28, 128.26, 127.89, 127.79, 127.67, 126.67 (CH_{Ar}), 117.30 (CH=CH₂), 102.85 (C1), 101.50 (CH-Ph), 79.42 (C3), 78.64 (C2), 75.48 (CH₂-Ph), 74.18 (C4), 72.21 (CH₂-Ph), 70.33 (CH₂-CH=CH₂), 69.40 (C6), 66.60 (C5) ppm.

HRMS (ESI-pos): *m/z* ber. für C₃₀H₃₂NaO₆ [M+Na]⁺: 511.20911; gef.: 511.20882, Δ*m*: 0.57.

1-O-Allyl-2,3,6-tri-O-benzyl-β-D-galactopyranosid (11)

11

Allylgalactose **9a** (540 mg, 1.11 mmol) wurde mit Triethylsilan (1.06 ml, 6.63 mmol), TFAA (156 μ l, 1.11 mmol) und TFA (423 μ l, 5.53 mmol) in DCM (8 ml) laut allgemeiner Versuchsvorschrift K umgesetzt. Nach Säulenchromatographie (Cy/EE 15:1) wurde das einfach entschützte Produkt **11** als gelbes Öl (358 mg, 730 μ mol, 66 %) erhalten.

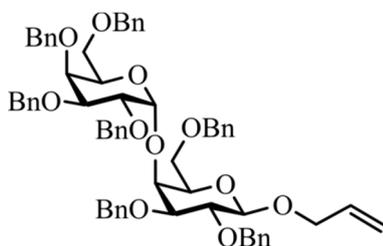
Summenformel: C₃₀H₃₄O₆ (490.59 g/mol)

R_f-Wert: 0.10 (Hex/MTBE 2:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.40-7.27 (m, 15H, CH_{Ar}), 5.97 (dddd, 1H, J = 5.1, 6.0, 10.5, 17.2 Hz, CH=CH₂), 5.34 (dddd, 1H, J = 1.6, 1.7, 1.7, 17.2 Hz, CH=CH_{2,trans}), 5.20 (dddd, 1H, J = 1.4, 1.4, 1.7, 10.5 Hz, CH=CH_{2,cis}), 4.94 (d, 1H, J = 10.9 Hz, CH₂-Ph), 4.76-4.73 (m, 3H, CH₂-Ph), 4.60 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.47-4.41 (m, 1H, CH_{2a}-CH=CH₂), 4.43 (d, 1H, J = 7.8 Hz, H1), 4.15 (dddd, 1H, J = 1.4, 1.6, 6.0, 13.0 Hz, CH_{2b}-CH=CH₂), 4.03 (dd, 1H, J = 1.0, 3.4 Hz, H4), 3.82 (dd, 1H, J = 6.0, 9.9 Hz, H6a), 3.75 (dd, 1H, J = 6.0, 9.9 Hz, H6b), 3.70 (dd, 1H, J = 7.8, 9.4 Hz, H2), 3.56 (ddd, 1H, J = 1.0, 6.0, 6.0 Hz, H5), 3.51 (dd, 1H, J = 3.4, 9.4 Hz, H3), 2.50 (br. s, 1H, OH) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 138.74, 138.16, 138.05 (3x C_{Ar}, q), 134.24 (CH=CH₂), 128.59, 128.57, 128.43, 128.30, 128.01, 127.96, 127.90, 127.89, 127.75 (CH_{Ar}), 117.27 (CH=CH₂), 102.88 (C1), 80.75 (C3), 79.12 (C2), 75.37, 73.86 (2x CH₂-Ph), 73.34 (C5), 72.59 (CH₂-Ph), 70.27 (CH₂-CH=CH₂), 69.35 (C6), 67.05 (C4) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für C₃₀H₃₄NaO₆ [M+Na]⁺: 513.22476; gef.: 513.22436, Δ ppm: 0.78.

1-O-Allyl-2,3,6-tri-O-benzyl-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl-α-D-galactopyranosyl)-β-D-galactopyranosid (6)

6

Allylgalactose **11** (420 mg, 856 μ mol) wurde mit Thiogalactose **9** (650 mg, 1.03 mmol), *N*-Iodsuccinimid (231 mg, 1.03 mmol) und TMSOTf (31.0 μ l, 171 μ mol) laut allgemeiner Versuchsvorschrift L in DCM (16 ml) und Et₂O (32 ml) umgesetzt. Das α -verknüpfte

Disaccharid **6** wurde nach Säulenchromatographie (Cy/EE 15:1) als farbloses Öl (779 mg, 769 μmol , 90 %) isoliert.

Summenformel: $\text{C}_{64}\text{H}_{68}\text{O}_{11}$ (1013.22 g/mol)

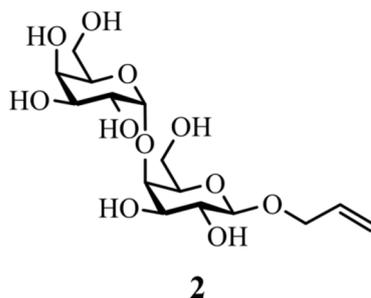
R_f-Wert: 0.28 (Cy/EE 5:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.38-7.15 (m, 35H, CH_{Ar}), 5.97 (dddd, 1H, J = 5.3, 5.8, 10.5, 17.2 Hz, CH=CH₂), 5.34 (dddd, 1H, J = 1.6, 1.7, 1.7, 17.2 Hz, CH=CH_{2,trans}), 5.19 (dddd, 1H, J = 1.3, 1.3, 1.6, 10.5 Hz, CH=CH_{2,cis}), 5.04 (d, 1H, J = 2.0 Hz, H1'), 4.91 (d, 2H, J = 10.9 Hz, CH₂-Ph), 4.88 (d, 1H, J = 10.9 Hz, CH₂-Ph), 4.80 (d, 1H, J = 12.7 Hz, CH₂-Ph), 4.78 (d, 1H, J = 10.6 Hz, CH₂-Ph), 4.76 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.68 (d, 1H, J = 11.8 Hz, CH₂-Ph), 4.55 (d, 1H, J = 11.1 Hz, CH₂-Ph), 4.55 (d, 1H, J = 11.9 Hz, CH₂-Ph), 4.45-4.39 (m, 2H, H5', CH_{2a}-CH=CH₂), 4.38 (d, 1H, J = 7.6 Hz, H1), 4.27 (d, 1H, J = 11.8 Hz, CH₂-Ph), 4.22 (d, 1H, J = 11.8 Hz, CH₂-Ph), 4.18-4.10 (m, 6H, H2', H3', H4', CH_{2b}-CH=CH₂, 2x CH₂-Ph), 4.01 (d, 1H, J = 2.9 Hz, H4), 3.98 (dd, 1H, J = 7.0, 9.4 Hz, H6_a), 3.70 (dd, 1H, J = 7.6, 10.0 Hz, H2), 3.56 (dd, 1H, J = 8.6, 8.8 Hz, H6'_a), 3.55 (dd, 1H, J = 6.3, 9.4 Hz, H6_b), 3.47 (dd, 1H, J = 6.3, 7.0 Hz, H5), 3.39 (dd, 1H, J = 2.9, 10.0 Hz, H3), 3.25 (dd, 1H, J = 4.8, 8.6 Hz, H6'_b) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 139.20, 139.08, 138.96, 138.95, 138.88, 138.37, 138.28 (7x C_{Ar}, q), 134.48 (CH=CH₂), 128.51, 128.44, 128.42, 128.39, 128.39, 128.34, 128.27, 128.21, 128.09, 127.97, 127.75, 127.71, 127.62, 127.60, 127.49, 127.46 (CH_{Ar}), 117.28 (CH=CH₂), 103.28 (C1), 100.69 (C1'), 81.12 (C3), 79.25 (C2'), 79.13 (C2), 76.81 (C3'), 75.32 (CH₂-Ph), 75.15 (C4), 75.06 (CH₂-Ph), 74.94 (C4'), 73.89 (C5), 73.82, 73.35, 73.22, 72.59, 72.46 (5x CH₂-Ph), 70.50 (CH₂-CH=CH₂), 69.48 (C5'), 68.32 (C6), 68.18 (C6') ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für $\text{C}_{64}\text{H}_{72}\text{NO}_{11}$ [M+NH₄]⁺: 1030.50999; gef.: 1030.50970, Δ ppm: 0.28.

1-O-Allyl-4-O-(α -D-galactopyranosyl)- β -D-galactopyranosid (2)



Das benzylgeschützte Disaccharid **6** (95.0 mg, 94.0 μmol) wurde mit DDQ (426 mg, 1.88 mmol) unter Schutzgas in trockenem DCM (6 ml) gelöst und 48 h unter Reflux erhitzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser (0.6 ml) gestoppt und das Gemisch weitere 2 h bei RT gerührt. Die Suspension wurde bis zur vollständigen Lösung des roten Feststoffs mit DCM und Wasser versetzt, die Phasen getrennt und die organische Phase mehrfach mit Wasser extrahiert. Die wässrige Phase wurde im Vakuum eingedampft und der Rückstand säulenchromatographisch (WIE) getrennt. Allylgalabiose **2** wurde als rötlicher Feststoff (7.30 mg, 19.0 μmol , 20 %) erhalten.

Summenformel: C₁₅H₂₆O₁₁ (382.36 g/mol)

R_f-Wert: 0.39 (WIE)

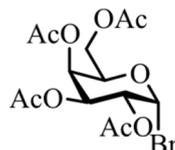
¹H-NMR (600 MHz, D₂O): δ = 5.99 (dddd, 1H, *J* = 5.5, 6.5, 10.5, 17.2 Hz, CH=CH₂), 5.39 (dddd, 1H, *J* = 1.3, 1.4, 1.5, 17.2 Hz, CH=CH_{2,trans}), 5.30-5.27 (dm, 1H, *J* = 10.5 Hz, CH=CH_{2,cis}), 4.97 (d, 1H, *J* = 3.9 Hz, H1'), 4.51 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, H1), 4.41 (dddd, 1H, *J* = 1.3, 1.4, 5.5, 12.7 Hz, CH_{2a}-CH=CH₂), 4.38-4.36 (m, 1H, H5'), 4.24 (dddd, 1H, *J* = 1.1, 1.3, 6.5, 12.7 Hz, CH_{2b}-CH=CH₂), 4.04-4.03 (m, 2H, H4, H4'), 3.92 (dd, 1H, *J* = 3.3, 10.6 Hz, H3'), 3.90 (dd, 1H, *J* = 7.6, 11.4 Hz, H6_a), 3.84 (dd, 1H, *J* = 5.2, 11.4 Hz, H6_b), 3.83 (dd, 1H, *J* = 3.9, 10.6 Hz, H2'), 3.78-3.70 (m, 3H, H5, H6'ab), 3.73 (dd, 1H, *J* = 3.0, 10.2 Hz, H3), 3.57 (dd, 1H, *J* = 7.8, 10.2 Hz, H2) ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, D₂O): δ = 133.70 (CH=CH₂), 118.80 (CH=CH₂), 102.10 (C1), 100.49 (C1'), 77.44 (C4), 75.32 (C5), 72.70 (C3), 71.22 (C2), 71.06 (C5'), 70.79 (CH₂-CH=CH₂), 69.40 (C3'), 69.25 (C4'), 68.97 (C2'), 60.79 (C6'), 60.39 (C6) ppm.

HRMS (ESI-pos): *m/z* ber. für C₁₅H₂₆NaO₁₁ [M+Na]⁺: 405.13673; gef.: 405.13654, Δ*ppm*: 0.47.

6.2.3.4 1-Azido-1-deoxy-4-*O*-(α-D-galactopyranosyl)-β-D-galactopyranosid (4)

2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-1-brom-1-deoxy-α-D-galactopyranosid (85)



85

D-Galactosepentaacetat (**14**, 7.00 g, 17.9 mmol) wurde unter Schutzgas mit HBr in Essigsäure (32 %, 3.29 ml, 17.9 mmol) versetzt und bei RT gerührt, bis der Feststoff gelöst war. Die Lösung wurde 18 h bei -20 °C gelagert, das Lösungsmittel anschließend im Vakuum entfernt (Essigsäure in einer Kühlfalle kondensieren!). Der ölige Rückstand wurde in Chloroform aufgenommen, die Lösung mit ges. NaHCO₃ und Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Galactosebromid **85** wurde als farbloses Öl (7.37 g, 17.9 mmol, quant.) erhalten.

Summenformel: C₁₄H₁₉BrO₉ (411.20 g/mol)

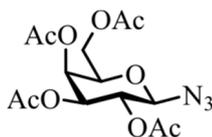
R_f-Wert: 0.22 (DCM/MeOH 150:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 6.70 (d, 1H, *J* = 4.0 Hz, H1), 5.52 (dd, 1H, *J* = 1.0, 3.3 Hz, H4), 5.41 (dd, 1H, *J* = 3.3, 10.7 Hz, H3), 5.05 (dd, 1H, *J* = 4.0, 10.7 Hz, H2), 4.49 (ddd, 1H, *J* = 1.0, 6.4, 6.6 Hz, H5), 4.19 (dd, 1H, *J* = 6.4, 11.4 Hz, H6_a), 4.11 (dd, 1H, *J* = 6.6, 11.4 Hz, H6_b), 2.15, 2.11, 2.06, 2.01 (4x s, 3H, CH₃) ppm.

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 170.45, 170.20, 170.03, 169.89$ (4x COCH_3), 88.28 (C1), 71.23 (C5), 68.16 (C3), 67.94 (C2), 67.15 (C4), 60.98 (C6), 20.88, 20.77, 20.72, 20.69 (4x CH_3) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{BrNaO}_9$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 433.01047; gef.: 433.01069, Δ ppm: 0.51.

2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-1-azido-1-deoxy- β -D-galactopyranosid (98)



98

Galactosebromid **85** (985 mg, 2.40 mmol) wurde in DCM (10 ml) gelöst, mit Natriumazid (779 mg, 12.0 mmol) sowie Tetrabutylammoniumhydrogensulfat (TBAHS, 813 mg, 2.40 mmol) versetzt und mit ges. NaHCO_3 -Lösung (10 ml) überschichtet. Das Zweiphasen-System wurde bei RT für 1 h kräftig gerührt, nach Zugabe von EE wurden die Phasen getrennt. Die organische Phase wurde mit ges. NaHCO_3 , zweimal mit Wasser sowie Brine gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde Galactoseazid **98** als farbloses Öl (878 mg, 2.35 mmol, 98 % [Lit.^[480] 96 %]) erhalten.

Summenformel: $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_9$ (373.32 g/mol)

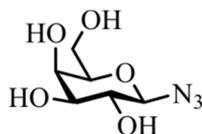
R_f -Wert: 0.19 (DCM/MeOH 150:1)

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.42$ (dd, 1H, $J = 1.1, 3.4$, H4), 5.16 (dd, 1H, $J = 8.7, 10.4$ Hz, H2), 5.04 (dd, 1H, $J = 3.4, 10.4$ Hz, H3), 4.59 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz, H1), 4.18 (dd, 1H, $J = 6.4, 14.8$ Hz, H6a), 4.16 (dd, 1H, $J = 6.9, 14.8$ Hz, H6b), 4.00 (ddd, 1H, $J = 1.1, 6.4, 6.9$ Hz, H5), 2.17, 2.09, 2.06, 1.99 (4x s, 3H, CH_3) ppm.

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 170.51, 170.25, 170.13, 169.50$ (4x COCH_3), 88.47 (C1), 73.05 (C5), 70.90 (C3), 68.24 (C2), 67.02 (C4), 61.38 (C6), 20.81, 20.79, 20.75, 20.66 (4x CH_3) ppm.

MS (MALDI): m/z ber. für $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{NaN}_3\text{O}_9$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 396.101; gef.: 396.141.

1-Azido-1-deoxy- β -D-galactopyranosid (86)



86

Acetylierte Azidogalactose **98** (293 mg, 785 μmol) wurde unter Schutzgas in trockenem Methanol (2.5 ml) gelöst und mit Natriummethanolat (0.5 M in Methanol, 39.2 μl , 20.0 μmol) versetzt. Die Mischung wurde 30 min bei RT gerührt, mit saurem Ionentauscher (Dowex

HCR-W2, H⁺-Form) neutralisiert, filtriert und im Vakuum eingengt. Azidogalactose **86** wurde als weißer Feststoff (149 mg, 726 µmol, 93 %) isoliert.

Summenformel: C₆H₁₁N₃O₅ (205.17 g/mol)

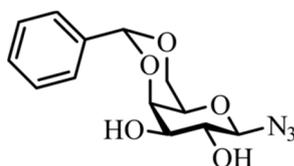
R_f-Wert: 0.11 (EE/EtOH/HOAc 80:2:3)

¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 4.42 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, H1), 3.86 (dd, 1H, *J* = 1.1, 3.0 Hz, H4), 3.78 (dd, 1H, *J* = 6.9, 11.4 Hz, H6_a), 3.72 (dd, 1H, *J* = 5.1, 11.4 Hz, H6_b), 3.61 (ddd, 1H, *J* = 1.1, 5.1, 6.9 Hz, H5), 3.46-3.53 (m, 2H, H2, H3) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD): δ = 92.61 (C1), 78.93 (C5), 74.99 (C3), 72.00 (C2), 70.24 (C4), 62.47 (C6) ppm.

HRMS (ESI-pos): *m/z* ber. für C₆H₁₁NaN₃O₅ [M+Na]⁺: 228.05909; gef.: 228.05917, Δppm: 0.35.

1-Azido-4,6-O-benzyliden-1-deoxy-β-D-galactopyranosid (91)



91

Galactoseazid **86** (370 mg, 1.80 mmol) wurde mit Benzaldehyddimethylacetal (490 µl, 3.28 mmol) und CSA (18.9 mg, 81.0 µmol) laut allgemeiner Versuchsvorschrift I in Acetonitril (12 ml) umgesetzt (das Edukt löste sich im Verlauf der Reaktion vollständig). Der Rückstand wurde aus Aceton/Hexan umgefällt, filtriert und im Vakuum getrocknet, Benzyliden **91** wurde als weißer Feststoff (530 mg, 1.80 mmol, quant.) erhalten.

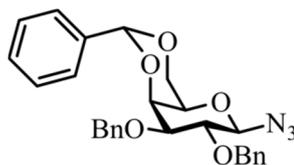
Summenformel: C₁₃H₁₅N₃O₅ (293.28 g/mol)

R_f-Wert: 0.44 (EE/EtOH/HOAc 80:2:3)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.52-7.47 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.41-7.36 (m, 3H, CH_{Ar}), 5.56 (s, 1H, CH-Ph), 4.58 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, H1), 4.38 (dd, 1H, *J* = 1.5, 12.6 Hz, H6_a), 4.25 (dd, 1H, *J* = 1.4, 3.3 Hz, H4), 4.09 (dd, 1H, *J* = 1.8, 12.6 Hz, H6_b), 3.74-3.66 (m, 2H, H2, H3), 3.60 (ddd, 1H, *J* = 1.4, 1.5, 1.8 Hz, H5), 1.82 (br. s, 2H, OH) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 137.43 (C_{Ar, q}), 129.57, 128.49, 126.51 (CH_{Ar}), 101.68 (CH-Ph), 90.38 (C1), 75.13 (C4), 73.08 (C3), 71.49 (C2), 69.06 (C6), 68.61 (C5) ppm.

MS (MALDI): *m/z* ber. für C₁₃H₁₅NaN₃O₅ [M+Na]⁺: 316.090; gef.: 316.092.

1-Azido-2,3-di-O-benzyl-4,6-O-benzyliden-1-deoxy-β-D-galactopyranosid (96)**96**

Azidogalactose **91** (500 mg, 1.71 mmol) wurde mit NaH (60 % in Paraffinöl, 546 mg, 13.6 mmol) und Benzylbromid (810 µl, 6.82 mmol) laut allgemeiner Versuchsvorschrift J in THF (15 ml) umgesetzt. Das benzylierte Derivat **96** wurde als gelblicher Feststoff (686 mg, 1.45 mmol, 85 %) isoliert.

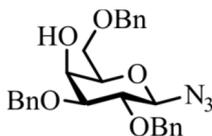
Summenformel: C₂₇H₂₇N₃O₅ (473.52 g/mol)

R_f-Wert: 0.16 (Hex/MTBE 2:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.56-7.54 (m, 2H, CH_{Ar} [Benzyliden]), 7.41-7.28 (m, 13H, CH_{Ar}), 5.49 (s, 1H, CH-Ph), 4.86 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.75 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.63 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, H1), 4.34 (dd, 1H, *J* = 1.5, 12.5 Hz, H6_a), 4.15 (dd, 1H, *J* = 1.0, 3.5 Hz, H4), 4.01 (dd, 1H, *J* = 1.7, 12.5 Hz, H6_b), 3.81 (dd, 1H, *J* = 8.5, 9.5 Hz, H2), 3.60 (dd, 1H, *J* = 3.5, 9.5 Hz, H3), 3.43 (ddd, 1H, *J* = 1.0, 1.5, 1.7 Hz, H5) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 138.28, 138.21, 137.82 (3x C_{Ar, q}), 129.24, 128.58, 128.54, 128.37, 128.32, 128.00, 127.97, 127.92, 126.61 (CH_{Ar}), 101.55 (CH-Ph), 90.50 (C1), 79.82 (C3), 77.78 (C2), 75.73 (CH₂-Ph), 73.58 (C4), 72.01 (CH₂-Ph), 69.13 (C6), 68.40 (C5) ppm.

HRMS (ESI-pos): *m/z* ber. für C₂₇H₂₇NaN₃O₅ [M+Na]⁺: 496.18429; gef.: 496.18450, Δppm: 0.42.

1-Azido-2,3,6-tri-O-benzyl-1-deoxy-β-D-galactopyranosid (13)**13**

Azidogalactose **96** (565 mg, 1.19 mmol) wurde mit Triethylsilan (1.14 ml, 7.16 mmol), TFAA (169 µl, 1.19 mmol) und TFA (457 µl, 5.97 mmol) in DCM (8.5 ml) laut allgemeiner Versuchsvorschrift K umgesetzt. Das an Position 4 entschützte Produkt **13** wurde nach Säulenchromatographie (Cy/EE 10:1) als farbloses Öl (366 mg, 770 µmol, 65 %) isoliert.

Summenformel: C₂₇H₂₉N₃O₅ (475.54 g/mol)

R_f-Wert: 0.05 (Hex/MTBE 2:1)

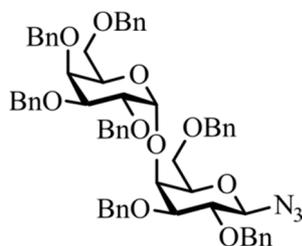
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.39-7.29 (m, 15H, CH_{Ar}), 4.86 (d, 1H, *J* = 10.8 Hz, CH₂-Ph), 4.79 (d, 1H, *J* = 10.8 Hz, CH₂-Ph), 4.73 (d, 1H, *J* = 10.7 Hz, CH₂-Ph), 4.70 (d, 1H,

$J = 10.7$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.60 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.59 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, H1), 4.07 (dd, 1H, $J = 1.0, 3.2$ Hz, H4), 3.81 (dd, 1H, $J = 5.8, 10.0$ Hz, H6a) 3.76 (dd, 1H, $J = 5.7, 10.0$ Hz, H6b), 3.65 (ddd, 1H, $J = 1.0, 5.7, 5.8$ Hz, H5), 3.63 (dd, 1H, $J = 8.5, 9.2$ Hz, H2), 3.53 (dd, 1H, $J = 3.2, 9.2$ Hz, H3) 2.56 (br. s, 1H, OH) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 138.06, 137.90, 137.68$ (3x $\text{C}_{\text{Ar}, \text{q}}$), 128.70, 128.62, 128.56, 128.32, 128.21, 128.03, 128.00, 127.98 (CH_{Ar}), 90.40 (C1), 81.07 (C3), 78.29 (C2), 75.62 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$), 75.37 (C5), 73.95 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$), 72.46 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$), 69.13 (C6), 66.80 (C4) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{NaN}_3\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 498.19994; gef.: 498.20005, Δ ppm: 0.22.

1-Azido-2,3,6-tri-O-benzyl-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl- α -D-galactopyranosyl)-1-deoxy- β -D-galactopyranosid (8)



8

Azidogalactose **13** (41.5 mg, 87.0 μmol) wurde mit Thiogalactose **9** (66.3 mg, 105 μmol), *N*-Iodosuccinimid (23.6 mg, 105 μmol) und TMSOTf (3.20 μl , 17.0 μmol) laut allgemeiner Versuchsvorschrift L in DCM (1.6 ml) und Et_2O (3.2 ml) umgesetzt. Galabiose **8** wurde nach Säulenchromatographie (Cy/EE 20:1) als farbloses Öl (55.0 mg, 55.0 μmol , 63 %) erhalten.

Summenformel: $\text{C}_{61}\text{H}_{63}\text{N}_3\text{O}_{10}$ (998.17 g/mol)

R_f-Wert: 0.21 (Cy/EE 5:1)

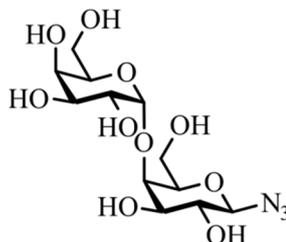
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.37\text{-}7.15$ (m, 35H, CH_{Ar}), 5.03 (d, 1H, $J = 3.4$ Hz, H1') 4.93 (d, 1H, $J = 11.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.90 (d, 1H, $J = 12.0$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.84 (d, 1H, $J = 11.0$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.81 (d, 1H, $J = 11.0$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.78 (d, 1H, $J = 12.6$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.76 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.67 (d, 1H, $J = 12.0$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.56 (d, 1H, $J = 11.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.52 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, H1), 4.52 (d, 1H, $J = 12.6$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.38 (ddd, 1H, $J = 0.9, 4.8, 8.9$ Hz, H5'), 4.25 (d, 1H, $J = 11.9$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.21 (d, 1H, $J = 11.9$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.17 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.12-4.09 (m, 2H, H2', H4'), 4.06-4.02 (m, 2H, H4, H3'), 3.97-3.92 (m, 1H, H6a), 3.63 (dd, 1H, $J = 8.4, 9.8$ Hz, H2), 3.58-3.52 (m, 3H, H5, H6b, H6'a), 3.42 (dd, 1H, $J = 2.7, 9.8$ Hz, H3), 3.26 (dd, 1H, $J = 4.8, 8.4$ Hz, H6'b) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 139.11, 138.99, 138.84, 138.35, 138.17, 138.14, 138.08$ (7x $\text{C}_{\text{Ar}, \text{q}}$), 128.55, 128.52, 128.48, 128.47, 128.45, 128.41, 128.38, 128.31, 128.24, 127.98, 127.94, 127.89, 127.86, 127.78, 127.70, 127.68, 127.63, 127.55, 127.50 (CH_{Ar}), 100.54 (C1'), 90.52 (C1), 81.41 (C3), 79.20 (C3'), 78.17 (C2), 76.76 (C2'), 75.83 (C5), 75.54, 75.06 (2x

CH₂-Ph), 74.97 (C4'), 74.25 (C4), 73.88, 73.40, 73.30, 72.63, 72.27 (5x CH₂-Ph), 69.75 (C5'), 68.20 (C6'), 67.86 (C6) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für C₆₁H₆₃KN₃O₁₀ [M+K]⁺: 1036.41450; gef.: 1036.41476, Δppm: 0.25.

1-Azido-1-deoxy-4-O-(α-D-galactopyranosyl)-β-D-galactopyranosid (4)



4

Das benzylgeschützte Disaccharid **8** (27.0 mg, 27.0 μmol) wurde mit DDQ (123 mg, 541 μmol) unter Schutzgas in trockenem DCM (1.5 ml) gelöst und 48 h unter Reflux erhitzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser (150 μl) gestoppt und das Gemisch 2 h bei RT gerührt. Die Suspension wurde bis zur vollständigen Lösung des roten Feststoffs mit DCM und Wasser versetzt, die Phasen getrennt und die organische Phase mehrfach mit Wasser extrahiert. Die wässrige Phase wurde im Vakuum eingeeengt und der Rückstand säulenchromatographisch (WIE) getrennt. Azidogalabiose **4** wurde als rötlicher Feststoff (4.30 mg, 12.0 μmol, 43 %) erhalten.

Summenformel: C₁₂H₂₁N₃O₁₀ (367.31 g/mol)

R_f-Wert: 0.33 (WIE)

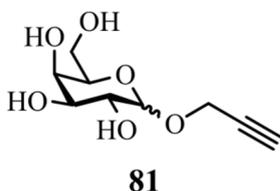
¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ = 5.01 (d, 1H, *J* = 3.8 Hz, H1'), 4.85 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz, H1), 4.39-4.35 (m, 1H, H5'), 4.12 (d, 1H, *J* = 3.1 Hz, H4), 4.08 (dd, 1H, *J* = 1.1, 3.1 Hz, H4'), 3.98-3.85 (m, 5H, H5, H6_{ab}, H2', H3'), 3.80 (dd, 1H, *J* = 3.1, 10.1 Hz, H3), 3.77 (dd, 1H, *J* = 5.9, 11.4 Hz, H6'_a), 3.74 (dd, 1H, *J* = 6.7, 11.4 Hz, H6'_b), 3.55 (dd, 1H, *J* = 8.6, 10.1 Hz, H2) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O): δ = 101.84 (C1'), 92.43 (C1), 78.88 (C4), 78.59 (C5), 73.79 (C3), 72.32 (C5'), 71.93 (C2), 70.50 (C4'), 70.36 (C3'), 70.03 (C2'), 61.93 (C6'), 61.62 (C6) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für C₁₂H₂₁NaN₃O₁₀ [M+Na]⁺: 390.11192; gef.: 390.11129, Δppm: 1.61.

6.2.3.5 2,3,6-Tri-*O*-benzyl-4-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl- α -D-galactopyranosyl)-1-*O*-propargyl- β -D-galactopyranosid (7)

1-*O*-Propargyl-D-galactopyranosid (81)



D-Galactosepentaacetat (**14**, 5.00 g, 12.8 mmol) und Propargylalkohol (**106**, 2.96 ml, 51.2 mmol) wurden unter Schutzgas in trockenem DCM (100 ml) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Innerhalb von 2 h wurde $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (2.44 ml, 19.2 mmol), das Reaktionsgemisch für weitere 2 h bei 0 °C gerührt und anschließend über Nacht auf RT gebracht. Die Lösung wurde auf Eiswasser gegossen, die Phasen getrennt und die wässrige Phase viermal mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser, ges. NaHCO_3 und erneut Wasser gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand enthielt einfach und mehrfach acetylierte Derivate des gewünschten Zuckers **81** und wurde unter Schutzgas in trockenem Methanol (50 ml) gelöst. Nach Zugabe von Natriummethanolat (0.5 M in Methanol, 500 μl , 250 μmol) wurde 3 h bei RT gerührt, die Lösung mit saurem Ionentauscher (Dowex HCR-W2, H^+ -Form) neutralisiert, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Propargylgalactose **81** wurde als gelblicher glasartiger Feststoff (2.80 g, 12.8 mmol, quant.) im Anomerenverhältnis α/β 1:10 erhalten. Die Charakterisierung bezieht sich auf das β -Anomer.

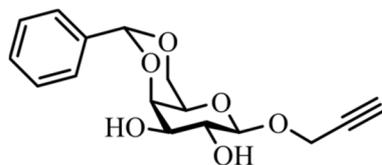
Summenformel: $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{O}_6$ (218.20 g/mol)

R_f-Wert: 0.16 (Hex/MTBE 1:1)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOD): δ = [β -Anomer] 4.44 (dd, 1H, J = 2.5, 15.6 Hz, $\text{CH}_{2a}\text{-C}\equiv\text{CH}$), 4.41 (d, 1H, J = 7.3 Hz, H1), 4.40 (dd, 1H, J = 2.5, 15.6 Hz, $\text{CH}_{2b}\text{-C}\equiv\text{CH}$), 3.83 (dd, 1H, J = 1.1, 3.2 Hz, H4), 3.77 (dd, 1H, J = 6.9, 11.4 Hz, H6_a), 3.72 (dd, 1H, J = 5.3, 11.4 Hz, H6_b), 3.53 (dd, 1H, J = 7.3, 9.7 Hz, H2), 3.51 (ddd, 1H, J = 1.1, 5.3, 6.9 Hz, H5), 3.48 (dd, 1H, J = 3.2, 9.7 Hz, H3), 2.84 (dd, 1H, J = 2.5, 2.5 Hz, $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, MeOD): δ = [β -Anomer] 102.75 (C1), 80.16 ($\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$), 76.83 (C5), 76.05 ($\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$), 74.94 (C3), 72.28 (C2), 70.28 (C4), 62.51 (C6), 56.49 ($\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{NaO}_6$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$: 241.06826; gef.: 241.06813, Δ ppm: 0.54.

4,6-O-Benzyliden-1-O-propargyl- β -D-galactopyranosid (90)**90**

Propargylgalactose **81** (α/β 1:10, 2.38 g, 10.9 mmol) wurde mit Benzaldehyddimethylacetal (2.96 ml, 19.9 mmol) und CSA (114 mg, 491 μ mol) laut allgemeiner Versuchsvorschrift I in Acetonitril (75 ml) umgesetzt (das Edukt löste sich im Verlauf der Reaktion vollständig). Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie getrennt und das β -Galactosederivat **90** als weißer Feststoff (2.56 g, 8.36 mmol, 77 %) isoliert.

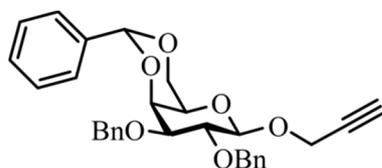
Summenformel: C₁₆H₁₈O₆ (306.31 g/mol)

R_F-Wert: 0.68 (DCM/MeOH 9:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.52-7.48 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.38-7.35 (m, 3H, CH_{Ar}), 5.56 (s, 1H, CH-Ph), 4.56 (d, 1H, J = 7.5 Hz, H1), 4.49 (dd, 1H, J = 2.4, 15.9 Hz, CH_{2a}-C \equiv CH), 4.44 (dd, 1H, J = 2.4, 15.9 Hz, CH_{2b}-C \equiv CH), 4.35 (dd, 1H, J = 1.6, 12.5 Hz, H_{6a}), 4.24 (dd, 1H, J = 1.3, 3.7 Hz, H₄), 4.10 (dd, 1H, J = 1.8, 12.5 Hz, H_{6b}), 3.81 (dd, 1H, J = 7.5, 9.6 Hz, H₂), 3.74 (dd, 1H, J = 3.7, 9.6 Hz, H₃), 3.53 (ddd, 1H, J = 1.3, 1.6, 1.8 Hz, H₅), 2.49 (br. s, 2H, OH), 2.48 (dd, 1H, J = 2.4, 2.4 Hz, CH₂-C \equiv CH) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 137.54 (C_{Ar}, q), 129.43, 128.41, 126.52 (5x CH_{Ar}), 101.64 (CH-Ph), 100.27 (C1), 78.84 (CH₂-C \equiv CH), 75.49 (CH₂-C \equiv CH), 75.36 (C4), 72.87 (C3), 71.69 (C2), 69.22 (C6), 67.01 (C5), 55.83 (CH₂-C \equiv CH) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für C₁₆H₁₈NaO₆ [M+Na]⁺: 329.09956; gef.: 329.09933, Δ ppm: 0.70.

2,3-Di-O-benzyl-4,6-O-benzyliden-1-O-propargyl- β -D-galactopyranosid (95)**95**

Propargylgalactose **90** (2.30 g, 7.51 mmol) wurde mit NaH (60 % in Paraffinöl, 2.40 g, 60.1 mmol) und Benzylbromid (3.57 ml, 30.0 mmol) laut allgemeiner Versuchsvorschrift J in THF (65 ml) umgesetzt. Das benzylierte Derivat **95** wurde nach Säulenchromatographie als weißer Feststoff (2.45 g, 5.04 mmol, 67 %) erhalten.

Summenformel: C₃₀H₃₀O₆ (486.56 g/mol)

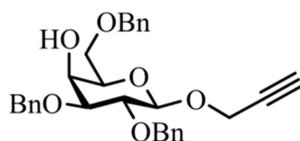
R_F-Wert: 0.70 (DCM/MeOH 50:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.56-7.54 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.44-7.27 (m, 13H, CH_{Ar}), 5.50 (s, 1H, CH-Ph), 4.96 (d, 1H, J = 10.8 Hz, CH₂-Ph), 4.80 (d, 1H, J = 12.4 Hz, CH₂-Ph), 4.75 (d, 1H, J = 10.8 Hz, CH₂-Ph), 4.74 (d, 1H, J = 12.4 Hz, CH₂-Ph), 4.66 (d, 1H, J = 7.7 Hz, H1), 4.49 (dd, 1H, J = 2.4, 15.9 Hz, CH_{2a}-C≡CH), 4.44 (dd, 1H, J = 2.4, 15.9 Hz, CH_{2b}-C≡CH), 4.31 (dd, 1H, J = 1.6, 12.3 Hz, H6a), 4.11 (dd, 1H, J = 0.9, 3.7 Hz, H4), 4.02 (dd, 1H, J = 1.7, 12.3 Hz, H6b), 3.87 (dd, 1H, J = 7.7, 9.7 Hz, H2), 3.59 (dd, 1H, J = 3.7, 9.7 Hz, H3), 3.36 (ddd, 1H, J = 0.9, 1.6, 1.7 Hz, H5), 2.43 (dd, 1H, J = 2.4, 2.4 Hz, CH₂-C≡CH) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 139.02, 138.64, 137.95 (3x C_{Ar, q}), 129.08, 128.49, 128.38, 128.37, 128.28, 127.90, 127.81, 127.67, 126.64 (CH_{Ar}), 101.49 (CH-Ph), 101.37 (C1), 79.37 (C3), 79.31 (CH₂-C≡CH), 78.37 (C2), 75.38 (CH₂-Ph), 74.94 (CH₂-C≡CH), 74.14 (C4), 72.38 (CH₂-Ph), 69.32 (C6), 66.68 (C5), 55.87 (CH₂-C≡CH) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für C₃₀H₃₀NaO₆ [M+Na]⁺: 509.19346; gef.: 509.19317, Δ ppm: 0.57.

2,3,6-Tri-O-benzyl-1-O-propargyl- β -D-galactopyranosid (**12**)



12

Propargylgalactose **95** (100 mg, 206 μ mol) wurde mit Triethylsilan (197 μ l, 1.23 mmol), TFAA (29.0 μ l, 206 μ mol) und TFA (79.0 μ l, 1.03 mmol) in DCM (1.5 ml) laut allgemeiner Versuchsvorschrift K umgesetzt. Das Produkt mit freier 4-OH-Gruppe (**12**) wurde nach Säulenchromatographie (Cy/EE 10:1) als weißer Feststoff (45.2 mg, 93.0 μ mol, 45 %) erhalten.

Summenformel: C₃₀H₃₂O₆ (488.57 g/mol)

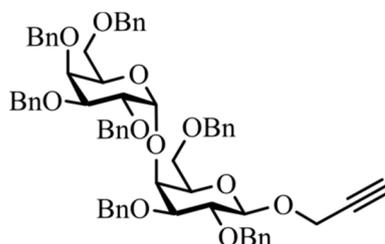
R_f-Wert: 0.11 (Cy/EE 5:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.42-7.26 (m, 15H, CH_{Ar}), 4.95 (d, 1H, J = 10.9 Hz, CH₂-Ph), 4.74 (d, 1H, J = 11.8 Hz, CH₂-Ph), 4.71 (d, 1H, J = 11.8 Hz, CH₂-Ph), 4.70 (d, 1H, J = 10.9 Hz, CH₂-Ph), 4.61 (d, 1H, J = 7.7 Hz, H1), 4.59 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.46 (dd, 1H, J = 2.4, 15.8 Hz, CH_{2a}-C≡CH), 4.41 (dd, 1H, J = 2.4, 15.8 Hz, CH_{2b}-C≡CH), 4.02 (dd, 1H, J = 1.0, 3.4 Hz, H4), 3.81 (dd, 1H, J = 6.0, 9.9 Hz, H6a), 3.73 (dd, 1H, J = 5.9, 9.9 Hz, H6b), 3.68 (dd, 1H, J = 7.7, 9.3 Hz, H2), 3.58 (ddd, 1H, J = 1.0, 5.9, 6.0 Hz, H5), 3.52 (dd, 1H, J = 3.4, 9.3 Hz, H3), 2.47 (br. s, 1H, OH), 2.44 (dd, 1H, J = 2.4, 2.4 Hz, CH₂-C≡CH) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 138.72, 138.12, 138.06 (3x C_{Ar, q}), 128.62, 128.60, 128.45, 128.42, 128.05, 127.99, 127.94, 127.78 (CH_{Ar}), 101.58 (C1), 80.70 (C3), 79.20 (CH₂-C≡CH), 78.83 (C2), 75.30 (CH₂-Ph), 74.98 (CH₂-C≡CH), 73.90 (CH₂-Ph), 73.40 (C5), 72.78 (CH₂-Ph), 69.28 (C6), 67.05 (C4), 55.91 (CH₂-C≡CH) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für C₃₀H₃₂NaO₆ [M+Na]⁺: 511.20911; gef.: 511.20898, Δppm: 0.25.

2,3,6-Tri-O-benzyl-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl-α-D-galactopyranosyl)-1-O-propargyl-β-D-galactopyranosid (7)



7

Propargylgalactose **12** (40.0 mg, 82.0 μmol) wurde mit Donor **9** (62.2 mg, 98.0 μmol), N-Iodsuccinimid (22.1 mg, 98.0 μmol) und TMSOTf (2.96 μl, 16.0 μmol) laut allgemeiner Versuchsvorschrift L in DCM (1.5 ml) und Et₂O (3 ml) umgesetzt. Propargylgalabiose **7** wurde nach Säulenchromatographie (Cy/EE 15:1) als farbloser glasartiger Feststoff (25.3 mg, 25.0 μmol, 31 %) isoliert.

Summenformel: C₆₄H₆₆O₁₁ (1011.20 g/mol)

R_f-Wert: 0.31 (Cy/EE 5:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.42-7.17 (m, 35H, CH_{Ar}), 5.05 (d, 1H, *J* = 3.0 Hz, H1'), 4.94 (d, 1H, *J* = 10.4 Hz, CH₂-Ph), 4.92 (d, 1H, *J* = 11.0 Hz, CH₂-Ph), 4.90 (d, 1H, *J* = 11.8 Hz, CH₂-Ph), 4.81 (d, 1H, *J* = 12.6 Hz, CH₂-Ph), 4.77 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.76 (d, 1H, *J* = 10.4 Hz, CH₂-Ph), 4.69 (d, 1H, *J* = 11.8 Hz, CH₂-Ph), 4.56 (d, 1H, *J* = 12.6 Hz, CH₂-Ph), 4.56 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, H1), 4.56 (d, 1H, *J* = 11.0 Hz, CH₂-Ph), 4.47 (dd, 1H, *J* = 2.4, 15.7 Hz, CH_{2a}-C≡CH), 4.45-4.40 (m, 1H, H5'), 4.38 (dd, 1H, *J* = 2.4, 15.7 Hz, CH_{2b}-C≡CH), 4.28 (d, 1H, *J* = 11.8 Hz, CH₂-Ph), 4.23 (d, 1H, *J* = 11.8 Hz, CH₂-Ph), 4.17 (d, 1H, *J* = 11.7 Hz, CH₂-Ph), 4.14 (d, 1H, *J* = 11.7 Hz, CH₂-Ph), 4.13-4.06 (m, 3H, H2', H3', H4'), 4.03 (d, 1H, *J* = 2.8 Hz, H4), 3.98 (dd, 1H, *J* = 6.7, 8.8 Hz, H6_a), 3.70 (dd, 1H, *J* = 7.6, 9.9 Hz, H2), 3.57 (dd, 1H, *J* = 7.2, 8.5 Hz, H6'_a), 3.55 (dd, 1H, *J* = 4.1, 8.8 Hz, H6_b), 3.53-3.49 (m, 1H, H5), 3.42 (dd, 1H, *J* = 2.8, 9.9 Hz, H3), 3.26 (dd, 1H, *J* = 4.8, 8.5 Hz, H6'_b), 2.45 (dd, 1H, *J* = 2.4, 2.4 Hz, CH₂-C≡CH) ppm.

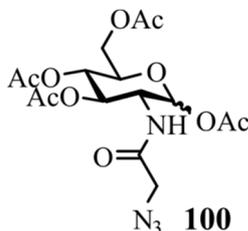
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 139.16, 138.96, 138.92, 138.88, 138.84, 138.26, 138.25 (7x C_{Ar}, q), 128.53, 128.45, 128.43, 128.40, 128.38, 128.37, 128.35, 128.27, 128.20, 128.15, 127.97, 127.79, 127.78, 127.72, 127.61, 127.53, 127.50 (CH_{Ar}), 102.00 (C1), 100.56 (C1'), 80.98 (C3), 79.39 (CH₂-C≡CH), 79.24 (C2'), 78.79 (C2), 76.74 (C3'), 75.21 (CH₂-Ph), 75.06 (CH₂-Ph), 74.90 (C4', CH₂-C≡CH), 74.81 (C4), 73.93 (CH₂-Ph), 73.90 (C5), 73.34 (CH₂-Ph), 73.25 (CH₂-Ph), 72.69 (CH₂-Ph), 72.46 (CH₂-Ph), 69.48 (C5'), 68.15 (C6'), 68.13 (C6), 56.10 (CH₂-C≡CH) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für C₆₄H₇₀NO₁₁ [M+NH₄]⁺: 1028.49434; gef.: 1028.49406, Δppm: 0.27.

6.2.4 Synthese von Kohlenhydraten für das Metabolic Glycoengineering

6.2.4.1 Azidoanaloga

1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-(2-azidoacetamido)-2-deoxy-D-glucopyranosid (*Ac₄GlcNAz*, **100**)



D-Glucosaminhydrochlorid (**102**, 500 mg, 2.32 mmol) wurde in trockenem Methanol (10 ml) mit Natriummethanolat (0.5 M in Methanol, 4.64 ml, 2.32 mmol) versetzt und 1 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von Triethylamin (337 μ l, 2.44 mmol) und Chloressigsäureanhydrid (1.98 g, 11.6 mmol) wurde für weitere 6 h bei RT gerührt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in DMF (5 ml) aufgenommen. Natriumazid (1.51 g, 23.2 mmol) wurde zugegeben und die Suspension 2 h bei 80 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mittels Säulenfiltration (WIE + 1 % wässr. Ammoniak) von unlöslichen Bestandteilen befreit. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der braune ölige Rückstand in Pyridin (30 ml) gelöst, auf 0 °C gekühlt und nach Zugabe von Ac₂O (15 ml) 12 h bei RT gerührt. Die Lösung wurde mit DCM verdünnt und je zweimal mit 1 M HCl, ges. NaHCO₃, Wasser und Brine gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingengt. Nach Säulenchromatographie (Cy/EE 3:1-1:1) wurde Ac₄GlcNAz (**100**) als farbloser Schaum (302 mg, 702 μ mol, 31 %) erhalten, das Anomerenverhältnis α/β betrug 2:1.

Summenformel: C₁₆H₂₂N₄O₁₀ (430.37 g/mol)

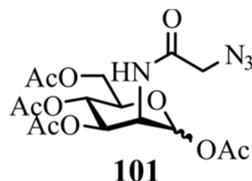
R_f-Wert: 0.07 (Cy/EE 2:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = [α -Anomer] 6.41 (br. d, 1H, J = 8.9 Hz, NH), 6.21 (d, 1H, J = 3.7 Hz, H1), 5.30 (dd, 1H, J = 9.7, 10.8 Hz, H3) 5.21 (dd, 1H, J = 9.7, 9.8 Hz, H4), 4.45 (ddd, 1H, J = 3.7, 8.9, 10.8 Hz, H2), 4.27 (dd, 1H, J = 4.1, 12.5 Hz, H6_a), 4.08 (dd, 1H, J = 2.4, 12.5 Hz, H6_b), 4.02 (ddd, 1H, J = 2.4, 4.1, 9.8 Hz, H5), 3.93 (s, 2H, CH_{2ab}-N₃), 2.21, 2.06, 2.05, 2.09 (4x s, 3H, CH₃); [β -Anomer] 6.38 (br. d, 1H, J = 9.4 Hz, NH), 5.79 (d, 1H, J = 8.7 Hz, H1) 5.23 (dd, 1H, J = 9.6, 10.5 Hz, H3), 5.14 (dd, 1H, J = 9.6, 9.7 Hz, H4), 4.28 (dd, 1H, J = 4.7, 12.6 Hz, H6_a), 4.21 (ddd, 1H, J = 8.7, 9.4, 10.5 Hz, H2), 4.13 (dd, 1H, J = 2.5, 12.6 Hz, H6_b), 3.91 (s, 2H, CH_{2ab}-N₃), 3.83 (ddd, 1H, J = 2.5, 4.7, 9.7 Hz, H5), 2.11, 2.09, 2.04, 2.04 (4x s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = [α -Anomer] 171.67, 170.79, 169.26, 168.78 (4x COO), 166.97 (CON), 90.44 (C1), 70.51 (C3), 69.99 (C5), 67.58 (C4), 61.65 (C6), 52.62 (CH₂N₃), 51.42 (C2), 21.03, 20.82, 20.72, 20.70 (4x CH₃); [β -Anomer] 170.99, 170.76, 169.43, 169.39 (4x COO), 167.14 (CON), 92.40 (C1), 73.13 (C5), 72.31 (C3), 67.82 (C4), 61.75 (C6), 53.48 (C2), 52.76 (CH₂N₃), 21.00, 20.85, 20.72, 20.70 (4x CH₃) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für $C_{16}H_{22}NaN_4O_{10}$ $[M+Na]^+$: 453.12281; gef.: 453.12242, Δ ppm: 0.86.

1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-(2-azidoacetamido)-2-deoxy-D-mannopyranosid ($Ac_4ManNAz$, **101)**



D-Mannosaminhydrochlorid (**103**, 500 mg, 2.32 mmol) wurde in trockenem Methanol (10 ml) mit Natriummethanolat (0.5 M in Methanol, 4.64 ml, 2.32 mmol) versetzt und 1 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von Triethylamin (337 μ l, 2.44 mmol) und Chloressigsäureanhydrid (1.98 g, 11.6 mmol) wurde für weitere 6 h bei RT gerührt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in DMF (5 ml) aufgenommen. Natriumazid (1.51 g, 23.2 mmol) wurde zugegeben und die Suspension 2 h bei 70 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mittels Säulenfiltration (WIE + 1 % wässr. Ammoniak) von unlöslichen Bestandteilen befreit. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der gelbe ölige Rückstand in Pyridin (15 ml) gelöst, auf 0 °C gekühlt und nach Zugabe von Ac_2O (7.5 ml) 4 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum (Wasserbadtemperatur max. 25 °C) entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (DCM-DCM/MeOH 50:1-20:1, dann erneut DCM-DCM/MeOH 50:1) getrennt. $Ac_4ManNAz$ (**101**) wurde als gelblicher Schaum (556 mg, 1.29 mmol, 56 %) erhalten, das Anomerenverhältnis α/β betrug 2.5:1.

Summenformel: $C_{16}H_{22}N_4O_{10}$ (430.37 g/mol)

R_f -Wert: 0.39 (DCM/MeOH 20:1)

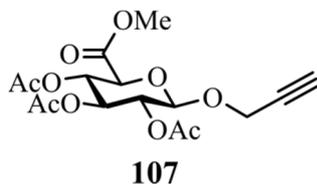
1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = [α -Anomer] 6.62 (br. d, 1H, J = 9.3 Hz, NH), 6.04 (d, 1H, J = 1.9 Hz, H1), 5.34 (dd, 1H, J = 4.3, 10.1 Hz, H3), 5.22 (dd, 1H, J = 10.1, 10.1 Hz, H4), 4.61 (ddd, 1H, J = 1.9, 4.3, 9.3 Hz, H2), 4.23 (dd, 1H, J = 4.3, 12.4 Hz, H6_a), 4.10 (dd, 1H, J = 2.5, 12.4 Hz, H6_b), 4.08-4.02 (m, 3H, H5, CH_{2ab}-N₃), 2.18, 2.10, 2.06, 2.00 (4x s, 3H, CH₃); [β -Anomer] 6.66 (br. d, 1H, J = 9.0 Hz, NH), 5.88 (d, 1H, J = 1.7 Hz, H1), 5.16 (dd, 1H, J = 9.7, 9.8 Hz, H4), 5.06 (dd, 1H, J = 3.9, 9.8 Hz, H3), 4.73 (ddd, 1H, J = 1.7, 3.9, 9.0 Hz, H2), 4.25 (dd, 1H, J = 4.7, 12.5 Hz, H6_a), 4.14 (dd, 1H, J = 2.5, 12.5 Hz, H6_b), 4.05-4.00 (m, 2H, CH_{2ab}-N₃), 3.82 (ddd, 1H, J = 2.5, 4.7, 9.7 Hz, H5), 2.11, 2.10, 2.06, 2.00 (4x s, 3H, CH₃) ppm.

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = [α -Anomer] 170.60, 170.18, 169.66, 168.20 (4x COO), 166.88 (CON), 91.48 (C1), 70.41 (C5), 68.98 (C3), 65.33 (C4), 61.95 (C6), 52.55 (CH₂-N₃), 49.43 (C2), 20.95, 20.85, 20.74, 20.69 (4x CH₃); [β -Anomer] 170.60, 170.22, 169.67, 168.43 (4x COO), 167.45 (CON), 90.43 (C1), 73.53 (C5), 71.54 (C3), 65.14 (C4), 61.85 (C6), 52.73 (CH₂-N₃), 49.85 (C2), 20.87, 20.80, 20.76, 20.67 (4x CH₃) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für $C_{16}H_{22}NaN_4O_{10}$ $[M+Na]^+$: 453.12281; gef.: 453.12293, Δ ppm: 0.26.

6.2.4.2 1-O-Propargyl- β -D-glucuronsäure (82)

2,3,4-Tri-O-acetyl-1-O-propargyl- β -D-glucuronsäuremethylester (107)



Propargylalkohol (**106**, 6.55 ml, 113 mmol) wurde unter Schutzgas mit ausgeheiztem Molsieb (3 Å) versetzt und 30 min bei RT gerührt. Glucuronsäurebromid (**53**, 1.50 g, 3.78 mmol) und Silbercarbonat (1.82 g, 6.61 mmol) wurden zugegeben und die Suspension über Nacht bei RT gerührt. Der ausgefallene schwarze Feststoff wurde durch Zentrifugation abgetrennt und mehrfach mit Aceton gewaschen. Die vereinigten Überstände wurden im Vakuum eingedunstet, der Rückstand säulenchromatographisch (Cy/EE 5:1-1:1) getrennt. Propargylglucuronsäure **107** wurde als weißer Feststoff (864 mg, 2.32 mmol, 61 %) erhalten.

Summenformel: $C_{16}H_{20}O_{10}$ (372.32 g/mol)

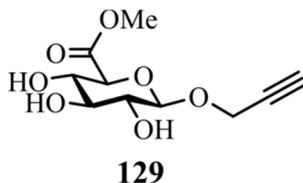
R_f-Wert: 0.51 (Cy/EE 1:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 5.29 (dd, 1H, J = 9.1, 9.3 Hz, H3), 5.23 (dd, 1H, J = 9.3, 9.4 Hz, H4), 5.03 (dd, 1H, J = 7.6, 9.1 Hz, H2), 4.84 (d, 1H, J = 7.6 Hz, H1), 4.41 (dd, 1H, J = 2.4, 16.1 Hz, $CH_{2a}-C\equiv CH$), 4.37 (dd, 1H, J = 2.4, 16.1 Hz, $CH_{2b}-C\equiv CH$), 4.07 (d, 1H, J = 9.4 Hz, H5), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 2.47 (dd, 1H, J = 2.4, 2.4 Hz, $CH_2-C\equiv CH$), 2.06, 2.02, 2.02 (3x s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 170.21, 169.51, 169.46 (3x COCH₃), 167.30 (C6), 98.14 (C1), 78.06 ($CH_2-C\equiv CH$), 75.85 ($CH_2-C\equiv CH$), 72.79 (C5), 72.12 (C3), 71.02 (C2), 69.55 (C4), 56.23 ($CH_2-C\equiv CH$), 53.05 (OCH₃), 20.77, 20.73, 20.62 (3x CH₃) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für $C_{16}H_{20}NaO_{10}$ $[M+Na]^+$: 395.09487; gef.: 395.09431, Δ ppm: 1.42.

1-O-Propargyl- β -D-glucuronsäuremethylester (129)



Glucuronsäure **107** (1.50 g, 4.03 mmol) wurde unter Schutzgas in trockenem Methanol gelöst, mit NaOMe (0.5 M in Methanol, 2.01 ml, 1.01 mmol) versetzt und 45 min bei RT gerührt. Die Lösung wurde mit saurem Ionentauscher (Dowex HCR-W2, H⁺-Form) neutralisiert, filtriert

und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde als gelbes Öl (974 mg, 3.96 mmol, 98 %) erhalten.

Summenformel: C₁₀H₁₄O₇ (246.21 g/mol)

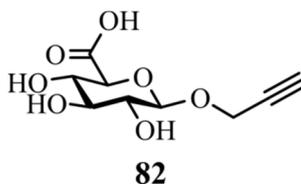
R_f-Wert: 0.83 (WIE)

¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 4.53 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz, H1), 4.40 (dd, 1H, *J* = 2.5, 15.7 Hz, CH_{2a}-C≡CH), 4.34 (dd, 1H, *J* = 2.5, 15.7 Hz, CH_{2b}-C≡CH), 3.84 (d, 1H, *J* = 9.7 Hz, H5), 3.78 (s, 3H, CH₃), 3.54 (dd, 1H, *J* = 9.1, 9.7 Hz, H4), 3.39 (dd, 1H, *J* = 9.1, 9.1 Hz, H3), 3.25 (dd, 1H, *J* = 7.7, 9.1 Hz, H2), 2.88 (dd, 1H, *J* = 2.5, 2.5 Hz, CH₂-C≡CH) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD): δ = 171.14 (C6), 102.45 (C1), 79.59 (CH₂-C≡CH), 77.25 (C3), 76.85 (C5), 76.55 (CH₂-C≡CH), 74.53 (C2), 73.11 (C4), 56.86 (CH₂-C≡CH), 52.82 (CH₃) ppm.

MS: Der Methylester zerfällt bereits bei neutralem pH-Wert in Methanol spontan, weshalb kein Massenspektrum aufgenommen wurde.

1-O-Propargyl-β-D-glucuronsäure (82)



Glucuronsäuremethylester **129** (950 mg, 3.86 mmol) wurde in Aceton (70 ml) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Nach Zugabe von 1 M NaOH (4.24 ml, 4.24 mmol) wurde 10 min gerührt; währenddessen fiel ein feiner weißer Niederschlag aus, der sich bei der Neutralisation mit 0.1 M HCl wieder löste. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand mittels Säulenchromatographie (WIE-MeOH) getrennt. Propargylglucuronsäure **82** wurde als gelblicher Feststoff (897 mg, 3.86 mmol, quant.) isoliert.

Summenformel: C₉H₁₂O₇ (232.19 g/mol)

R_f-Wert: 0.19 (WIE)

¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 4.50 (dd, 1H, *J* = 2.4, 15.7 Hz, CH_{2a}-C≡CH), 4.48 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, H1), 4.45 (dd, 1H, *J* = 2.4, 15.7 Hz, CH_{2b}-C≡CH), 3.62-3.56 (m, 1H, H5), 3.47-3.40 (m, 2H, H3, H4), 3.28-3.21 (m, 1H, H2), 2.84 (dd, 1H, *J* = 2.4, 2.4 Hz, CH₂-C≡CH) ppm.

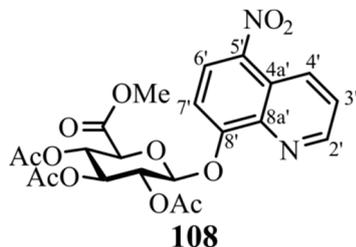
¹³C-NMR (100 MHz, MeOD): δ = 176.89 (C6), 101.93 (C1), 80.09 (CH₂-C≡CH), 77.76 (C3), 76.24 (CH₂-C≡CH), 75.97 (C5), 74.65 (C2), 73.65 (C4), 56.71 (CH₂-C≡CH) ppm.

HRMS (ESI-pos): *m/z* ber. für C₉H₁₂NaO₇ [M+Na]⁺: 255.04752; gef.: 255.04771, Δ_{ppm}: 0.75.

6.2.5 Synthese der Nitroxolin-Konjugate

6.2.5.1 1-O-(5-Nitrochinolin-8-yl)- β -D-glucuronsäure (**16**)

2,3,4-Tri-O-acetyl-1-O-(5-nitrochinolin-8-yl)- β -D-glucuronsäuremethylester (**108**)



Silber(I)oxid (870 mg, 3.75 mmol) und Molsieb (3 Å) wurden im Vakuum ausgeheizt und unter Schutzgas in trockenem Aceton suspendiert. Nach Zugabe von Glucuronsäurebromid **53** (500 mg, 1.26 mmol) und 5-Nitrochinolin-8-ol (Nitroxolin, **15**, 240 mg, 1.26 mmol) wurde 14 d bei RT gerührt. Die Suspension wurde über Celite filtriert, mehrfach mit Aceton nachgewaschen und das Filtrat im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde mehrfach säulenchromatographisch (DCM/MeOH 97:3, dann DCM/MeOH 150:1-35:1) getrennt und das Nitroxolinderivat **108** als gelb-oranger Feststoff (48.0 mg, 95.0 μ mol, 8 %) erhalten.

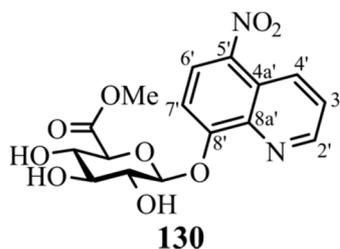
Summenformel: C₂₂H₂₂N₂O₁₂ (506.42 g/mol)

R_f-Wert: 0.23 (DCM/MeOH 97:3)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 9.12 (dd, 1H, J = 1.6, 8.9 Hz, H4'), 9.01 (dd, 1H, J = 1.6, 4.1 Hz, H2'), 8.44 (d, 1H, J = 8.7 Hz, H6'), 7.67 (dd, 1H, J = 4.1, 8.9 Hz, H3'), 7.46 (d, 1H, J = 8.7 Hz, H7'), 5.70 (d, 1H, J = 6.9 Hz, H1), 5.52-5.48 (m, 1H, H2), 5.46 (dd, 1H, J = 8.5, 9.1 Hz, H4), 5.42 (dd, 1H, J = 8.5, 8.6 Hz, H3), 4.25 (d, 1H, J = 9.1 Hz, H5), 3.68 (s, 3H, OCH₃), 2.09, 2.09, 2.06 (3x s, 3H, COCH₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 170.23, 169.49, 169.45 (3x COCH₃), 166.90 (C6), 157.34 (C8'), 150.79 (C2'), 140.66 (C5'), 140.29 (C8a'), 132.42 (C4'), 126.32 (C6'), 124.61 (C3'), 123.03 (C4a'), 113.82 (C7'), 99.73 (C1), 73.01 (C5), 71.50 (C3), 71.11 (C2), 69.03 (C4), 53.09 (OCH₃), 20.83, 20.77, 20.65 (3x COCH₃) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für C₂₂H₂₂NaN₂O₁₂ [M+Na]⁺: 529.10649; gef.: 529.10624, Δ ppm: 0.47.

1-O-(5-Nitrochinolin-8-olyl)- β -D-glucuronsäuremethylester (130)

Glucuronsäurekonjugat **108** (25.0 mg, 49.0 μ mol) wurde unter Schutzgas in trockenem Methanol (2 ml) gelöst. Nach Zugabe von NaOMe (0.5 M in Methanol, 50.0 μ l, 25.0 μ mol) wurde 15 min bei RT gerührt, anschließend mit saurem Ionentauscher (Dowex HCR-W2, H⁺-Form) neutralisiert, filtriert und das Filtrat im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (DCM/MeOH 150:1-10:1) getrennt und Produkt **130** als hellgelber Feststoff (7.20 mg, 19.0 μ mol, 38 %) erhalten.

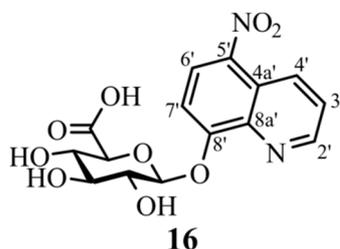
Summenformel: C₁₆H₁₆N₂O₉ (380.31 g/mol)

R_f-Wert: 0.01 (DCM/MeOH 97:3)

¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 9.16 (dd, 1H, J = 1.6, 8.9 Hz, H4'), 9.00 (dd, 1H, J = 1.6, 4.2 Hz, H2'), 8.49 (d, 1H, J = 8.9 Hz, H6'), 7.83 (dd, 1H, J = 4.2, 8.9 Hz, H3'), 7.47 (d, 1H, J = 8.9 Hz, H7'), 5.37 (d, 1H, J = 7.7 Hz, H1), 4.26 (d, 1H, J = 9.7 Hz, H5), 3.80 (dd, 1H, J = 7.7, 9.3 Hz, H2), 3.79 (s, 3H, CH₃), 3.72 (dd, 1H, J = 9.1, 9.7 Hz, H4), 3.63 (dd, 1H, J = 9.1, 9.3 Hz, H3) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD): δ = 170.61 (C6), 158.24 (C8'), 151.53 (C2'), 140.51 (C5'), 139.52 (C8a'), 134.45 (C4'), 128.26 (C6'), 125.94 (C3'), 124.06 (C4a'), 111.55 (C7'), 102.22 (C1), 76.85 (C5), 76.35 (C3), 74.21 (C2), 72.93 (C4), 52.97 (CH₃) ppm.

HRMS (ESI-pos): m/z ber. für C₁₆H₁₆NaN₂O₉ [M+Na]⁺: 403.07480; gef.: 403.07450, Δ ppm: 0.74.

1-O-(5-Nitrochinolin-8-olyl)- β -D-glucuronsäure (16)

Methylester **130** (6.40 mg, 17.0 μ mol) wurde in Aceton (1 ml) gelöst und auf -15 °C gekühlt. Nach Zugabe von 1 M NaOH (20.0 μ l, 20.0 μ mol) wurde 30 min gerührt, anschließend mit 0.1 M HCl neutralisiert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand säulenchromatographisch (WIE) getrennt, um glucuronidiertes Nitroxolin **16** als hellgelben Feststoff (5.30 mg, 14.0 μ mol, 86 %) zu erhalten.

Summenformel: C₁₅H₁₄N₂O₉ (366.28 g/mol)

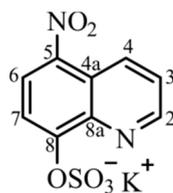
R_f-Wert: 0.09 (WIE)

¹H-NMR (600 MHz, D₂O): δ = 9.08 (dd, 1H, *J* = 1.3, 8.9 Hz, H4'), 8.89 (dd, 1H, *J* = 1.3, 4.3 Hz, H2'), 8.49 (d, 1H, *J* = 8.9 Hz, H6'), 7.79 (dd, 1H, *J* = 4.3, 8.9 Hz, H3'), 7.44 (d, 1H, *J* = 8.9 Hz, H7'), 5.49 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, H1), 4.08 (d, 1H, *J* = 9.5 Hz, H5), 3.93 (dd, 1H, *J* = 7.8, 9.2 Hz, H2), 3.76 (dd, 1H, *J* = 9.2, 9.3 Hz, H3), 3.71 (dd, 1H, *J* = 9.3, 9.5 Hz, H4) ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, D₂O): δ = 175.81 (C6), 157.33 (C8'), 150.93 (C2'), 139.32 (C5'), 138.27 (C8a'), 134.01 (C4'), 128.50 (C6'), 125.72 (C3'), 123.22 (C4a'), 110.71 (C7'), 100.36 (C1), 77.21 (C5), 75.64 (C3), 73.12 (C2), 72.37 (C4) ppm.

HRMS (ESI-neg): *m/z* ber. für C₁₅H₁₃N₂O₉ [M-H⁺]: 365.06266; gef.: 365.06292, Δppm: 0.71.

6.2.5.2 Kalium-(5-nitrochinolin-8-yl)-sulfat (109)



109

Nitroxolin (**15**, 500 mg, 2.63 mmol) wurde unter Schutzgas in trockenem Pyridin (10 ml) gelöst und nach Zugabe von SO₃-Pyridin-Komplex (840 mg, 5.31 mmol) 14 d bei 50 °C gerührt. Der beim Abkühlen ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert, mehrfach mit Toluol gewaschen und in 1 M KOH (130 ml) gelöst. Die wässrige Lösung wurde dreimal mit EE gewaschen, mit Eisessig auf pH 4 eingestellt und erneut dreimal mit EE gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit 0.1 M KOH auf pH 10 eingestellt und unter vermindertem Druck eingengt, bis ein gelber Feststoff ausfiel. Dieser wurde abfiltriert und im Vakuum getrocknet, um das Kaliumsalz des sulfatierten Nitroxolins (**109**, 812 mg, 2.63 mmol, quant.) zu erhalten.

Summenformel: C₉H₅KN₂O₆S (308.31 g/mol)

R_f-Wert: -

¹H-NMR (400 MHz, [d₆]DMSO): δ = 9.02 (dd, 1H, *J* = 1.6, 4.1 Hz, H4), 8.99 (dd, 1H, *J* = 1.6, 8.8 Hz, H2), 8.56 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz, H6), 7.99 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz, H7), 7.82 (dd, 1H, *J* = 4.1, 8.8 Hz, H3) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, [d₆]DMSO): δ = 155.30 (C8), 150.36 (C2), 139.26 (C5), 138.18 (C8a), 131.54 (C4), 126.99 (C6), 124.49 (C3), 121.96 (C4a), 113.92 (C7) ppm.

HRMS (ESI-neg): *m/z* ber. für C₉H₅N₂O₆S [M-K⁺]: 268.98683; gef.: 268.98754, Δppm: 2.6.

6.3 Glycochips

6.3.1 goldbasierte Chips

Die Anbindung der aminoterminierten Kohlenhydrate auf der Goldoberfläche sowie die Analyse mittels MALDI-MS erfolgten nach einem Protokoll von Flitsch *et al.*^[203]

6.3.1.1 SAM-Aufbau und Immobilisierung der Kohlenhydrate

Die 64-Well Gold Plates (*AB Sciex*) wurden für 30 min mit Piranhasäure (Peroxomonoschwefelsäure; konz. Schwefelsäure / 30 % Wasserstoffperoxid 3:1) behandelt, um organische Verunreinigungen von der Oberfläche zu entfernen. Anschließend wurden sie mit dest. Wasser sowie Ethanol gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet.

Die Thiole **131** (carbonsäureterminiert, „Linker“) und **132** (hydroxyterminiert, „Spacer“) wurden jeweils in DMSO (Konzentration 0.2 mg/ml) gelöst und im Verhältnis 1:3 gemischt. In jede der Vertiefungen des Goldchips wurde 1 µl der Mischung gegeben und über Nacht bei RT und dunkel inkubiert, anschließend die gesamte Oberfläche mit Ethanol gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet.

Zur Aktivierung der Carbonsäuren als NHS-Ester wurde der Chip in einer Petrischale mit EDC-Hydrochlorid (100 mM) und NHS (25 mM) in trockenem DMF (6 ml) für zwei Stunden leicht bewegt, anschließend mit Ethanol gewaschen, im Stickstoffstrom getrocknet und sofort weiterverwendet. Alternativ kann die NHS-Aktivierung auch im Spot erfolgen (je 1 µl 200 mM EDC·HCl sowie 50 mM NHS in trockenem DMF).

Die aminoterminierten Kohlenhydrate wurden in PBS gelöst (10 mM), jeweils 1 µl in die Vertiefungen des Chips gegeben und über Nacht bei RT inkubiert. Die gesamte Oberfläche wurde mit Wasser sowie Ethanol gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet.

6.3.1.2 Enzymatische Reaktionen on-Chip und Sialinsäurestabilisierung

Unter Verwendung einer Galactosyltransferase (bovine galactosyl transferase, β-1,4-GalT, *Sigma Aldrich*) wurde das oberflächengebundene *N*-Acetylglucosamin enzymatisch zum *N*-Acetyllactosamin (LacNAc) verlängert.

Dazu wurde eine Reaktionsmischung aus Donor UDP-Gal (2 mM), Mangan(II)chlorid (10 mM) und Enzym (1.1 mU) in MES- bzw. HEPES-Puffer (50 mM) hergestellt, pro Well des Chips 1 µl aufgetragen und der Chip in einer Feuchthaltekammer (mit Parafilm verschlossene Petrischale, ausgelegt mit Blottingpapier, getränkt in heißem Wasser) 18 h bei 37 °C inkubiert. Vor der Messung wurde die Oberfläche mit Wasser, PBST, Wasser und Ethanol gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet.

In Zusammenarbeit mit *Dr. Maria Ortiz-Soto* wurden Screenings zur Transferaseaktivität verschiedener von ihr rekombinant exprimierter humaner Sialyltransferasen (hST3gal1 sowie hST6gal1) durchgeführt. Dazu wurde eine Reaktionsmischung aus Donor CMP-Sia (5 bzw. 10 mM), MnCl₂ (10 mM) sowie dem entsprechenden Enzym (0.1-0.8 µg/µl) in Tris-HCl (50 mM) mit 15 % Glycerin hergestellt, pro Well des Chips 1 µl aufgetragen und der Chip in

einer Feuchthaltekammer bis zu 72 h bei 37 °C inkubiert. Die Oberfläche wurde mit Wasser, PBST, Wasser und Ethanol gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Die Stabilisierung der Sialinsäuren erfolgte durch Methylierung mit 4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholin-chlorid (DMT-MM; 100 mM in trockenem Methanol, 1 µl pro Well, 16 h bei 37 °C). Vor der Messung wurde die Oberfläche erneut mit Ethanol gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet.

6.3.1.3 Analytik mittels MALDI-MS

Die immobilisierten Kohlenhydrate auf den Wells des Goldchips wurden mit jeweils 0.5 µl THAP in Aceton (20 mg/ml) als Matrix überschichtet und das Lösungsmittel verdampft. Der Goldchip wurde in die entsprechenden Adapter eingespannt und am MALDI-Gerät mit den folgenden Einstellungen analysiert: Reflector, positiver Detektionsmodus, Signalunterdrückung für $m/z < 800$, 250-1000 Schüsse pro Spektrum

6.3.2 glasbasierte Chips

Die Untersuchung von Kohlenhydrat-Bindungsprozessen auf Oberflächen erfolgte auf NHS-aktivierten Glasslides (NEXTERION[®] Slide H bzw. Slide H MPX 16 sowie Slide P von SCHOTT), in einem Fall auf Streptavidin-beschichteten Slides (SuperStreptavidin von *PolyAn*). Die Immobilisierung aminfunktionalisierter Verbindungen (Kohlenhydrate mit Aminlinker sowie Proteine) wurde in Anlehnung an entsprechende Protokolle des Herstellers durchgeführt.^[556-557]

Zur Vermeidung von Staubablagerungen auf der Oberfläche wurden alle Arbeiten unter der Sterilbank durchgeführt.

6.3.2.1 Immobilisierung von Kohlenhydraten und Proteinen

allgemeine Arbeitstechniken

Die bei -20 °C gelagerten Glasslides wurden in der Verpackung auf RT gebracht, um die Hydrolyse der NHS-Ester durch kondensierte Luftfeuchtigkeit zu minimieren.

Die Slides wurden im Slide Holder des MicroCASTer[™] 8-Pin Systems eingespannt und die Verbindungen mit dem entsprechenden Hand Tool im Mikrokontaktverfahren aufgebracht. Die Lösungen wurden aus 96-Well-Plates bzw. im 96-Well-Format angeordneten Eppendorfgläsern (0.2 ml) aufgenommen. Dabei wurden für jede Konzentration mindestens Vierfachbestimmungen durchgeführt.

Vor jeder Verwendung wurden die Pins des Hand Tools nach dem beiliegenden Protokoll des Herstellers mit Pin Conditioner behandelt.

Die Hybridisierung erfolgte bei etwa 75 % Luftfeuchtigkeit in einem abgeschlossenen Gefäß (eine Kristallisierschale ohne Ausguss wurde etwa 2.5 cm hoch mit Kochsalz gefüllt, mit Wasser überschichtet und mit selbsthaftender Folie abgedeckt).

Zum Waschen und Zentrifugieren (2000 min^{-1} , 2 min) der Glasslides wurden Falcons (50 ml) verwendet. Die Unterteilung in Subarrays erfolgte mit dem Chip Clip™ System bzw. selbstklebenden Superstrukturen.

Die Slides wurden bis zur Messung dunkel, kühl und feucht (Falcon, 4 °C) aufbewahrt.

Fluoreszenzintensitäten wurden mit einem Microarray Scanner (GenePix® Personal 4100A) bei einer Auflösung von 10 µm/Pixel aufgenommen. Die Farbstoffe wurden mit Laserlicht der Wellenlänge 635 bzw. 532 nm angeregt, die Detektion der Fluoreszenz erfolgte jeweils rotverschoben bei 670 ± 20 bzw. 575 ± 17.5 nm.

Auswertung und Datenextraktion erfolgten mit der korrespondierenden Software (GenePix™ Pro 4.1), Datenfits wurden mit Origin Pro 9.0G durchgeführt. Für weitere Quantifizierungen wurde jeweils der Median der Fluoreszenz verwendet (F635Median).

Immobilisierung aminoterminierter Kohlenhydrate

Die aminoterminierten Zucker wurden in Print-Puffer gelöst (Konzentrationen zwischen 1 µM und 1 mM) und im jeweils angegebenen Muster auf den Slide gespottet. Dieser wurde für 1 h bei RT und 75 % Luftfeuchtigkeit inkubiert, anschließend für 18 h im Exsikator über CaCl₂ getrocknet. Der Chip wurde mit qH₂O gewaschen, für 1 h bei RT im Überkopffrotator in Blocking-Puffer bewegt, dreimal mit PBST sowie einmal mit qH₂O gewaschen und trocken zentrifugiert.

Immobilisierung allylterminierter Kohlenhydrate

Die Absättigung des Slides mit Cysteamin (10 mM in Print-Puffer) erfolgte für 18 h bei 4 °C im Überkopffrotator, anschließend wurde mit qH₂O, PBST und qH₂O gewaschen und trocken zentrifugiert. Die allylfunktionalisierten Kohlenhydrate wurden in Print-Puffer gelöst (Konzentrationen zwischen 1 mM und 10 mM) und im jeweils angegebenen Muster auf den Slide gespottet. Die Photoreaktion erfolgte bei RT und 75 % Luftfeuchtigkeit durch Bestrahlung mit einer UV-Lampe (254 nm, 350 W, 60 min-19 h), danach wurde der Slide dreimal mit PBST und einmal mit qH₂O gewaschen und trocken zentrifugiert.

Immobilisierung von Proteinen (pflanzliche Lectine sowie Galectine)

Die Lectine ConA, PSA, LcH, GNA und DC-SIGN wurden in PBS-Puffer (enthält zusätzlich je 1 mM MnCl₂, CaCl₂ und D-Mannose; jeweils 50, 100, 250 und 500 µg/ml) gelöst und auf Eis gekühlt. Sie wurden im jeweils angegebenen Muster auf den Slide gespottet, dieser wurde anschließend 1 h bei RT und 75 % Luftfeuchtigkeit inkubiert, anschließend mit PBS gewaschen und für 1 h bei 4 °C im Überkopffrotator in Blocking-Puffer bewegt. Der Chip wurde dreimal mit PBST und einmal mit PBS gewaschen und trocken zentrifugiert.

Für die Versuche mit Galectinen wurde sämtlichen verwendeten Puffern das reduzierende Reagenz Tris-(2-chlorethyl)-phosphat (TCEP, 0.2 mM) zugesetzt.

Die Galectine Gal-1, Gal-3CRD und Gal-3FL (exprimiert von *Nadja Bertleff-Zieschang* im Rahmen ihrer Doktorarbeit^[444]) wurden in PBS-Puffer (Slide H, enthält zusätzlich 1 mM D-Lactose; jeweils 1, 5, 10 und 25 µg/ml) bzw. Print-Puffer (Slide P, enthält ebenfalls 1 mM D-Lactose, gleiche Konzentrationen) gelöst und auf Eis gekühlt. Sie wurden im angegebenen

Muster auf den Slide gespottet, dieser wurde 1 h bei RT und 75 % Luftfeuchtigkeit inkubiert, mit PBS (Slide H) bzw. PBST (0.05 % Tween, Slide P) gewaschen und für 1 h bei 4 °C im Überkopffrotator in Blocking-Puffer bewegt. Der Chip wurde mit PBST und PBS (Slide H) bzw. PBST (0.1 % Tween, Slide P) gewaschen und trocken zentrifugiert.

6.3.2.2 Affinitätsstudien mit Lectinen

pflanzliche Lectine auf Kohlenhydratarrays

Die Lectine (ConA, PNA, markiert mit Alexa594 bzw. 647) wurden in PBST-Puffer (enthält zusätzlich je 1 mM MnCl₂ und CaCl₂; Konzentrationen zwischen 5 µg/ml und 80 µg/ml; 1 µg/ml □ 10 nM) gelöst und jeweils 70 µl der Lösung auf die durch die Superstruktur abgeteilten Wells gegeben. Die Slides wurden 1 h bei RT und 75 % Luftfeuchtigkeit dunkel inkubiert, die überstehende Lösung mit einer Pipette entfernt und die Wells zweimal mit je 100 µl PBST gewaschen. Die Superstruktur wurde entfernt, der Slide mit PBST, PBS und qH₂O gewaschen und trocken zentrifugiert.

humane Galectine auf Kohlenhydratarrays

Für die Versuche mit Galectinen wurde sämtlichen verwendeten Puffern das reduzierende Reagenz Tris-(2-chlorethyl)-phosphat (TCEP, 0.2 mM) zugesetzt.

Die Galectine (Gal-3CRD, Gal-3FL, Gal-1, Alexa647-markiertes Gal-1; exprimiert von *Dr. Nadja Bertleff-Zieschang* im Rahmen ihrer Doktorarbeit,^[444] fluoreszenzmarkiert von *Dr. Antonia Göhler*,^[445] Labelgrad 0.88) wurden in PBST-Puffer (Konzentrationen zwischen 20 µg/ml und 100 µg/ml) gelöst und auf Eis gekühlt. In die Wells des Slides wurden jeweils 70 µl der Lösung gegeben und der Glaschip in der Hybridisierungskammer 3 h bei 4 °C dunkel inkubiert. Die überstehende Lösung wurde mit einer Pipette entfernt, die Wells mit je 100 µl PBST gewaschen und die Superstruktur entfernt. Der Slide wurde mit PBS und qH₂O gewaschen und trocken zentrifugiert.

Antikörpernachweis der Galectine

Fluoreszenzmarkierte polyklonale IgG-Antikörper (Kaninchen, *Bioss*, aGal-1: Alexa647, aGal-3: Alexa555) wurden in PBST-Puffer (Konzentrationen zwischen 2 µg/ml und 100 µg/ml) gelöst. Je 60 µl der Lösung wurde in die Wells gegeben und der Slide in der Hybridisierungskammer 18 h bei 4 °C dunkel inkubiert. Die überstehende Lösung wurde mit einer Pipette entfernt, die Wells mit je 100 µl PBST (Slide H) bzw. PBST (2 % Tween, Slide P) gewaschen und die Superstruktur entfernt. Der Slide wurde vorsichtig mit PBS und qH₂O (Slide H) bzw. PBST (1 %, 0.5 %, 0.1 %), PBS und qH₂O (Slide P) gewaschen und trocken zentrifugiert.

Mannose-Multimere auf Lectinarrays

Die verwendeten Mannose-Verbindungen wurden von *Carsten Fleck* (AG Maison, Universität Hamburg) im Rahmen seiner Doktorarbeit dargestellt und mit PromoFluor 647

fluoreszenzmarkiert.^[463] Die Affinitätsstudien wurden im Rahmen einer Kooperation durchgeführt.

Die Verbindungen wurden in PBST (enthielt zusätzlich je 1 mM MnCl₂ und CaCl₂; Konzentrationen zwischen 50 nM und 1 mM) gelöst und pro Well 75 µl der Lösungen auf den Chip gegeben. Der Slide wurde 1 h bei RT und 75 % Luftfeuchtigkeit dunkel inkubiert, die überstehende Lösung mit einer Pipette entfernt und die Wells zweimal mit je 100 µl PBST gewaschen. Die Superstruktur wurde entfernt, der Slide mit PBS sowie qH₂O gewaschen und trocken zentrifugiert.

6.3.2.3 Affinitätsstudien mit Lectin-Mimetika

Die verwendeten Boronsäurederivate wurden von *Dr. Dorith Claes* dargestellt und mit PromoFluor 647 fluoreszenzmarkiert.^[432, 435] Die Affinitätsstudien wurden im Rahmen einer Kooperation gemeinsam durchgeführt.

Die Benzoboroxole wurden in Wasser gelöst (Konzentrationen zwischen 30 nM und 1.5 µM) und jeweils 75 µl der Lösungen in die Wells gegeben. Der Chip wurde 1 h bei RT und 75 % Luftfeuchtigkeit dunkel inkubiert. Die überstehende Lösung wurde mit einer Pipette entfernt und die Wells zweimal mit je 100 µl PBST gewaschen. Die Superstruktur wurde entfernt, der Chip mit PBS sowie qH₂O gewaschen und trocken zentrifugiert.

6.3.2.4 Affinitätsstudien mit Pathogenen

Je 500 µl einer Übernachtskultur von *E. coli* (Nissle und MG1655), *S. aureus* 8325 und *S. epidermidis* RP62A wurde in 9.5 ml LB-Medium überimpft und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 1 inkubiert (ca. 4.5 h). Die Kulturen wurden 10 min auf Eis gestellt, zentrifugiert (11000 min⁻¹, 5 min), abdekantiert und das Pellet zweimal mit PBS gewaschen. Der Rückstand wurde in PBS (enthielt zusätzlich je 1 mM MnCl₂ und CaCl₂) suspendiert (Feuchtgewicht ca. 1 mg /ml, entspricht ca. 6·10⁶ Zellen/ml) und je 200 µl in jedes Well des Slides gegeben. Der Chip wurde 1 h bei 37 °C inkubiert, die überstehende Suspension mit einer Pipette abgenommen und die Wells zweimal mit je 200 µl PBS (mit MnCl₂/CaCl₂) gewaschen. Die Superstruktur wurde entfernt, der Slide zweimal mit PBS sowie einmal mit Wasser gewaschen und trocken zentrifugiert (1000 min⁻¹, 1 min).

Die Analyse erfolgte am Hellfeldmikroskop mit Ölimmersionsobjektiv (10x sowie 40x).

Kulturen von *N. gonorrhoeae* (F3⁺, piliert sowie F3⁻, nicht piliert) wurden von *Dr. Michaela Faulstich* auf GC-Agar angelegt. Die Gonokokken wurden mit einem Watteträger von der Platte abgenommen, in 1.5 ml PBS suspendiert, sedimentiert (5000 min⁻¹, 5 min) und zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden in PBS mit einer Dichte von 6·10⁷-6·10⁹ ml⁻¹ resuspendiert und die Subarrays mit je 100 µl 90 min bei 37 °C (5 % CO₂) inkubiert. Die Suspension wurde abgenommen und der Slide zweimal mit je 100 µl PBS pro Well gewaschen.

Die Analyse erfolgte am Hellfeldmikroskop (40x).

6.3.2.5 Analyse BINH-modifizierter Glycane

Die BINH-derivatisierten Glycane Mannose **78** und Lactose **79** sowie die *N*-Glycane von Ribonuclease B 80 (dargestellt von *Dr. Stephanie Bank*)^[469] wurden in Tris-Puffer (20 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05 % Tween-20) gelöst (10, 20, 75 µg/ml [**78**, **79**] bzw. Glycane von 1 mg RNB in 50 µl) und in acht Subarrays auf den Streptavidin-modifizierten Slide gespottet. In die verbliebenen acht Subarrays wurden jeweils 0.5 µl der Lösung gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei RT wurde der Slide mit Wasser gewaschen. Die Oberfläche wurde für 2 h bei RT mit Biotin abgesättigt (1 % Biotin in 100 mM Tris-HCl, pH 9, 150 mM NaCl, 0.05 % Tween-20, 0.5 % BSA), anschließend mit Citratpuffer (15 mM NaCl, 1.5 mM Natriumcitrat, pH 7) und dreimal mit qH₂O gewaschen. Die fluoreszenzmarkierten Lectine ConA (Alexa647) und PNA (Alexa594) wurden in PBST-Puffer (enthielt zusätzlich je 1 mM MnCl₂ und CaCl₂) gelöst, aufgetragen und 1 h dunkel inkubiert. Die Slides wurden zweimal mit PBST sowie je einmal mit PBS und qH₂O gewaschen und trocken zentrifugiert.

6.3.2.6 Click-Reaktion auf dem Chip

Die kupferkatalysierte Clickreaktion zwischen immobilisierter Azidomannose **50** und den propargylfunktionalisierten Kohlenhydraten Galactose **81** (α/β 1:10) und Glucuronsäure **82** wurde in den Subarrays eines Slides durchgeführt. In Anlehnung an ein optimiertes Protokoll von *Gabriel Jones*^[476] wurden jeweils 100 µl der vorgemischten Reagenzien (50 µM CuSO₄, 250 µM THPTA, 2.5 mM Natriumascorbat, 20 µM Alkin in PBS) für 15 min bei RT dunkel inkubiert. Der Slide wurde intensiv mit PBST, PBS und qH₂O gewaschen und trocken zentrifugiert.

6.4 Metabolic Glycoengineering

6.4.1 Glycoengineering von Eukaryoten

Die Zellen wurden im entsprechenden Medium (HEp-2: MEM; T-24: McCoys 5A; SK-N-MC: RPMI 1640; Zusätze siehe 6.1.3 Medien und Puffer) bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach Erreichen von 80 % Konfluenz wurden die adhärennten Zellen mit Trypsin/EDTA von der Oberfläche der Kulturflaschen gelöst und im Verhältnis 1:10 gesplittet.

Alle weiteren Versuche wurden in 8-Well-Mikroskopieslides (*Thermo Scientific Nunc*[®] Lab-Tek[®] Chamber Slide[™] system bzw. Lab-Tek[®] II chambered coverglass) durchgeführt. Die Zellen wurden nach dem Splitten im Verhältnis 1:10 eingesät und 48 h inkubiert. Dabei wurden dem Medium die Zuckeranaloga Ac₄GlcNAz bzw. GlcNAz oder GlcNAc als Kontrolle (Endkonzentration 25 µM) zugesetzt. Das überstehende Medium wurde abgenommen, die Oberfläche 30 min bei 37 °C mit BSA (2.5 % in PBS) geblockt und dreimal mit PBS gewaschen.

Die Clickreaktion mit alkinfunktionalisierten Fluoreszenzfarbstoffen wurde in einem Gesamtvolumen von 100 µl pro Well durchgeführt. Die Reagenzien (20 µM CuSO₄, 1 mM Natriumascorbat, 20 µM TBTA bzw. THPTA, 0.2-100 µM Alkin) wurden in PBS-Puffer gemischt, auf die Oberfläche gegeben und dunkel inkubiert (5 min-1 h, RT). Die Zellen wurden mit DMSO/PBS (1:1), anschließend mehrfach mit PBS gewaschen und gegebenenfalls fixiert (4 % Formaldehyd, 0.25 % Glutaraldehyd in PBS, 1 h, RT). Die Analyse erfolgte durch Fluoreszenzmikroskopie. Hochaufgelöste dSTORM-Aufnahmen wurden von *Sebastian Letschert* (AG Sauer, Universität Würzburg) angefertigt und zur Verfügung gestellt.

6.4.2 Glycoengineering von Prokaryoten

Je 20 µl einer Übernachtskultur von *E. coli* (Nissle und MG1655) und *S. aureus* 8325 wurde in 2 ml LB-Medium (*E. coli*) bzw. B-Medium (*S. aureus*) überimpft und 2 h bei 37 °C inkubiert. Von jeder Suspension wurde 1 ml einer Verdünnung (OD₆₀₀ = 0.1) in Medium angefertigt und nach Zusatz der Zuckeranaloga Ac₄GlcNAz bzw. GlcNAz oder GlcNAc bzw. PBS als Kontrolle (Endkonzentration 50 µM) 2 h bei 37 °C inkubiert. Die Kulturen wurden zentrifugiert (14000 min⁻¹, 2 min) und das Pellet zweimal mit PBS gewaschen.

Die Clickreaktion erfolgte in 100 µl PBS nach Zugabe von CuSO₄ (200 µM), TBTA (200 µM), Natriumascorbat (400 µM) und fluoreszenzmarkiertem Alkin (10 µM). Kontrollen wurden ohne Clickreagenzien („Puffer“), unter Zusatz der Clickreagenzien (CuSO₄, TBTA, Na-Ascorbat, „Click“) bzw. ausschließlich mit Alkin („Alkin“) durchgeführt. Das Reaktionsgemisch wurde 1 h dunkel bei RT inkubiert. Die Zellen wurden pelletiert, mehrfach mit DMSO/PBS (1:1) sowie PBS gewaschen und in 30 µl PBS aufgenommen. Die Analyse erfolgte durch Fluoreszenzmikroskopie (Ölimmersionsobjektiv, 40x).

Der Adhäsionsassay wurde mit *S. aureus* auf T-24 (Blasenepithelzellen) durchgeführt.

T-24 wurden nach dem Splitten im Verhältnis 1:1 auf 8-Well-Mikroskopieslides (*Thermo Scientific Nunc*[®] Lab-Tek[®] Chamber Slide[™] system) eingesät (Gesamtvolumen 300 µl) und

36 h bei 37 °C/5 % CO₂ inkubiert. In jedes Well wurden 8 µl der vorbereiteten Bakteriensuspensionen (OD₆₀₀ = 0.1) gegeben und 2 h bei 37 °C inkubiert. Der Überstand wurde entfernt, die Zellen dreimal mit je 200 µl Medium gewaschen und 20 min in Methanol fixiert. Die Analyse erfolgte durch Hellfeld- sowie Fluoreszenzmikroskopie (Ölimmersionsobjektiv, 40x) und anschließendes Auszählen der adhärirten Bakterien im Sichtfeld. Für jedes Well wurden fünf Sichtfelder (in den vier Ecken sowie der Wellmitte lokalisiert) ausgewertet.

7 Abkürzungen und Akronyme

Å	Ångström (0.1 nm)	DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
Abb.	Abbildung	dest.	destilliert
Ac	Acetyl	DMF	Dimethylformamid
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid	DMSO	Dimethylsulfoxid
aGal-1	Antikörper gegen Galectin 1	DMTMM	4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium-chlorid
aGal-3	Antikörper gegen Galectin 3	EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimid
Alexa	Alexa Fluor [®]	EE	Ethylacetat
Äq	Äquivalent	ESI	Elektronenspray-Ionisation
AS	Aminosäure	<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und weitere)
a.u.	<i>atomic unit</i>	Et ₂ O	Diethylether
Bn	Benzyl	EtOH	Ethanol
Brine	gesättigte NaCl-Lösung	FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>	FI	Fluoreszenzintensität
bzw.	beziehungsweise	Fuc	Fucose
Cbz	Benzyloxycarbonyl	Gal	Galactose
CFG	<i>Consortium for Functional Glycomics</i>	Gal-1	Galectin 1
CMP	Cytidinmonophosphat	Gal-3	Galectin 3
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>	GalNAc	<i>N</i> -Acetylgalactosamin
CRD	<i>Carbohydrate Recognition Domain</i>	ges.	gesättigt
CSA	Campher-10-sulfonsäure	Glc	Glucose
CuAAC	Cu(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition	GlcA	Glucuronsäure
Cy	Cyclohexan	GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin
d	Tag	h	Stunde
Da	Dalton, atomare Masseneinheit	HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en	Hex	<i>n</i> -Hexan
DC	Dünnschichtchromatographie	HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
DCM	Dichlormethan	HOAc	Essigsäure
DDQ	2,3-Dichlor-5,6-dicyano-1,4-benzochinon		

HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>	R _f	Retentionsfaktor
IdoA	Iduronsäure	RP	<i>Reversed Phase</i>
K _D	Dissoziationskonstante	RT	Raumtemperatur
KDO	3-Desoxy-D-manno-oct-2- ulopyranosonsäure	SAM	<i>self assembled monolayer</i>
LPS	Lipopolysaccharid	Sia	Sialinsäure
LTA	Lipoteichonsäure	SPAAC	<i>strain promoted alkyne-azide cycloaddition</i>
M	mol/l	TAMRA	Tetramethylrhodamin
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization</i>	TBTA	Tris[(1-benzyl-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol- 4-yl)methyl]amin
Man	Mannose	TCAI	Trichloracetimidat
Me	Methyl	TCEP	Tris-(2-chlorethyl)-phosphat
MeCN	Acetonitril	TES	Triethylsilan
MeOD	[d ₄]-Methanol	TFA	Trifluoressigsäure
MeOH	Methanol	TFAA	Trifluoressigsäureanhydrid
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>	THAP	2,4,6-Trihydroxyacetophenon
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)- ethansulfonsäure	THPTA	Tris(3-hydroxypropyltriazolyl- methyl)amin
min	Minute	TMSOTf	Trimethylsilyl- trifluormethansulfonat
MS	Massenspektrometrie	ToF	<i>Time of Flight</i>
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether	Tris	Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan
MurNAc	<i>N</i> -Acetylmuraminsäure	U	<i>unit</i> (Enzymeinheit)
NEt ₃	Triethylamin	UDP	Uridindiphosphat
Neu5Ac	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure	v/v	Volumenverhältnisse
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid	wässr.	wässrig
NIS	<i>N</i> -Iodsuccinimid	WIE	Wasser/Isopropanol/ Ethylacetat (v/v/v) 1:3:6
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>	WTA	Wandteichonsäure
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement and Exchange Spectroscopy</i>	Xyl	Xylose
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>	z.B.	zum Beispiel
Pd/C	Palladium auf Aktivkohle		
PEG	Polyethylenglycol		
Ph	Phenyl		
ppm	<i>parts per million</i>		
qH ₂ O	Reinstwasser (Milli-Q)		
quant.	quantitativ		

Abkürzungen in NMR-Spektren

δ	chemische Verschiebung	m	Multipllett
s	Singulett	br.	verbreitertes Signal
d	Dublett	<i>J</i>	Kopplungskonstante
t	Triplet	C _q	quartärer Kohlenstoff
q	Quartett	Ar	aromatisches Signal

8 Literaturverzeichnis

- [1] J. B. S. Haldane, *Disease and evolution*, in Symposium sui fattori ecologici e genetici della speciazione negli animali, Supplemento a la Ricerca Scientifica Anno 19th, **1949**, 68-75.
- [2] W. M. Watkins, W. T. J. Morgan, *Nature* **1952**, *169*, 825-826.
- [3] W. M. Watkins, W. T. J. Morgan, *Nature* **1957**, *180*, 1038-1040.
- [4] A. Audfray, A. Varrot, A. Imberty, *C. R. Chim.* **2013**, *16*, 482-490.
- [5] WHO, *Antimicrobial Resistance - global report on surveillance*, Genf, **2014**.
- [6] European Antibiotic Awareness Day
<http://ecdc.europa.eu/en/EAAD/Pages/Home.aspx> (03.02.2015).
- [7] B. Spellberg, B. Taylor-Blake, *Infect. Dis. Poverty* **2013**, *2*, 3-7.
- [8] Cancer <http://www.who.int/cancer/en/> (03.02.2015).
- [9] *Essentials of Glycobiology*, 2nd ed. (Eds.: A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. R. Bertozzi, G. W. Hart, M. E. Etzler), Cold Spring Harbor (NY), **2009**.
- [10] S. Roseman, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 41527-41542.
- [11] M. D. Mager, V. LaPointe, M. M. Stevens, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 582-589.
- [12] S. T. Laughlin, J. M. Baskin, S. L. Amacher, C. R. Bertozzi, *Science* **2008**, *320*, 664-667.
- [13] J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 16793-16797.
- [14] A. Varki, N. Sharon in *Essentials of Glycobiology*, 2nd ed. (Eds.: A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. R. Bertozzi, G. W. Hart, M. E. Etzler), Cold Spring Harbor (NY), **2009**, pp. 1-22.
- [15] H. Rüdiger, H.-J. Gabius in *The Sugar Code - Fundamentals of Glycosciences* (Ed.: H.-J. Gabius), Wiley VCH, Weinheim, **2009**.
- [16] C. R. Bertozzi, D. Rabuka in *Essentials of Glycobiology*, 2nd ed. (Eds.: A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. R. Bertozzi, G. W. Hart, M. E. Etzler), Cold Spring Harbor (NY), **2009**, pp. 23-36.
- [17] A. D. McNaught, *Pure Appl. Chem.* **1996**, *68*, 1919-2008.

- [18] P. Stanley, H. Schachter, N. Taniguchi in *Essentials of Glycobiology*, 2nd ed. (Eds.: A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. R. Bertozzi, G. W. Hart, M. E. Etzler), Cold Spring Harbor (NY), **2009**, pp. 101-114.
- [19] I. Brockhausen, H. Schachter, P. Stanley in *Essentials of Glycobiology*, 2nd ed. (Eds.: A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. R. Bertozzi, G. W. Hart, M. E. Etzler), Cold Spring Harbor (NY), **2009**, pp. 115-128.
- [20] Z. Roth, G. Yehezkel, I. Khalaila, *Int. J. Carbohydr. Chem.* **2012**, 2012, Article ID 640923.
- [21] G. Patsos, A. Corfield in *The Sugar Code - Fundamentals of Glycosciences* (Ed.: H.-J. Gabius), Wiley VCH, Weinheim, **2009**.
- [22] P. Van den Steen, P. M. Rudd, R. A. Dwek, G. Opdenakker, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1998**, 33, 151-208.
- [23] A. Ceroni, K. Maass, H. Geyer, R. Geyer, A. Dell, S. M. Haslam, *J. Proteome Res.* **2008**, 7, 1650-1659.
- [24] R. L. Schnaar, A. Suzuki, P. Stanley in *Essentials of Glycobiology*, 2nd ed. (Eds.: A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. R. Bertozzi, G. W. Hart, M. E. Etzler), Cold Spring Harbor (NY), **2009**, pp. 129-142.
- [25] R. Schauer, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2009**, 19, 507-514.
- [26] A. Varki, R. Schauer in *Essentials of Glycobiology*, 2nd ed. (Eds.: A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. R. Bertozzi, G. W. Hart, M. E. Etzler), Cold Spring Harbor (NY), **2009**, pp. 199-218.
- [27] R. A. Dwek, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 683-720.
- [28] M. L. Phillips, E. Nudelman, F. C. Gaeta, M. Perez, A. K. Singhal, S. Hakomori, J. C. Paulson, *Science* **1990**, 250, 1130-1132.
- [29] Y. J. Kim, A. Varki, *Glycoconjugate J.* **1997**, 14, 569-576.
- [30] S. Hakomori, *Cancer Res.* **1996**, 56, 5309-5318.
- [31] D. H. Dube, C. R. Bertozzi, *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2005**, 4, 477-488.
- [32] H. J. An, S. R. Kronewitter, M. L. A. de Leoz, C. B. Lebrilla, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, 13, 601-607.
- [33] K. Ohtsubo, J. D. Marth, *Cell* **2006**, 126, 855-867.
- [34] L. S. Kreisman, B. A. Cobb, *Glycobiology* **2012**, 22, 1019-1030.
- [35] M. M. Fuster, J. D. Esko, *Nat. Rev. Cancer* **2005**, 5, 526-542.
- [36] K. W. Moremen, M. Tiemeyer, A. V. Nairn, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, 13, 448-462.

-
- [37] V. N. Tra, D. H. Dube, *Chem. Commun.* **2014**, 50, 4659-4673.
- [38] T. J. Silhavy, D. Kahne, S. Walker, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2010**, 2, a000414.
- [39] W. Vollmer, *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, 32, 287-306.
- [40] J. D. Esko, T. L. Doering, C. R. H. Raetz in *Essentials of Glycobiology*, 2nd ed. (Eds.: A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. R. Bertozzi, G. W. Hart, M. E. Etzler), Cold Spring Harbor (NY), **2009**, pp. 293-308.
- [41] C. Weidenmaier, A. Peschel, *Nat. Rev. Microbiol.* **2008**, 6, 276-287.
- [42] J. G. Swoboda, J. Campbell, T. C. Meredith, S. Walker, *ChemBioChem* **2010**, 11, 35-45.
- [43] G. Xia, T. Kohler, A. Peschel, *Int. J. Med. Microbiol.* **2010**, 300, 148-154.
- [44] R. R. Schmidt, C. M. Pedersen, Y. Qiao, U. Zähringer, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, 9, 2040-2052.
- [45] O. Holst, *FEMS Microbiol. Lett.* **2007**, 271, 3-11.
- [46] L. Cipolla, L. Gabrielli, D. Bini, L. Russo, N. Shaikh, *Nat. Prod. Rep.* **2010**, 27, 1618-1629.
- [47] X. Wang, P. J. Quinn, *Prog. Lipid Res.* **2010**, 49, 97-107.
- [48] R. Apweiler, H. Hermjakob, N. Sharon, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 1473, 4-8.
- [49] I. Benz, M. A. Schmidt, *Mol. Microbiol.* **2002**, 45, 267-276.
- [50] M. A. Schmidt, L. W. Riley, I. Benz, *Trends Microbiol.* **2003**, 11, 554-561.
- [51] S. Moens, J. Vanderleyden, *Arch. Microbiol.* **1997**, 168, 169-175.
- [52] J. L. Baker, E. Çelik, M. P. DeLisa, *Trends Biotechnol.* **2013**, 31, 313-323.
- [53] J. A. Iwashkiw, N. F. Voza, R. L. Kinsella, M. F. Feldman, *Mol. Microbiol.* **2013**, 89, 14-28.
- [54] M. Abu-Qarn, J. Eichler, N. Sharon, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2008**, 18, 544-550.
- [55] M. Lommel, S. Strahl, *Glycobiology* **2009**, 19, 816-828.
- [56] D. H. Dube, K. Champasa, B. Wang, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 87-101.
- [57] H. Stillmark, Dissertation, Universität Dorpat **1888**.
- [58] W. C. Boyd, R. M. Reguera, *J. Immunol.* **1949**, 62, 333-339.
- [59] *Handbook of Plant Lectins: Properties and Biomedical Applications* (Eds.: E. J. M. Van Damme, W. J. Peumans, A. Pusztai, S. Bardocz), Wiley, Chichester, **1998**.
- [60] I. J. Goldstein, C. E. Hayes, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1978**, 35, 127-340.
- [61] D. C. Kilpatrick, *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, 1572, 187-197.
- [62] H.-J. Gabius, *Eur. J. Biochem.* **1997**, 243, 543-576.
-

- [63] *Microbial Lectins and Agglutinins - Properties and Biological Activity* (Ed.: D. Mirelman), Wiley, New York, **1986**.
- [64] K. Ohlsen, T. A. Oelschlaeger, J. Hacker, A. S. Khan, *Top. Curr. Chem.* **2009**, *288*, 109-120.
- [65] *The Sugar Code - Fundamentals of Glycosciences* (Ed.: H.-J. Gabius), Wiley-VCH, Weinheim, **2009**.
- [66] F. A. Quiocho, D. K. Wilson, N. K. Vyas, *Nature* **1989**, *340*, 404-407.
- [67] F. A. Quiocho, *Pure Appl. Chem.* **1989**, *61*, 1293-1306.
- [68] W. I. Weis, K. Drickamer, *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, *65*, 441-473.
- [69] D. Andres, U. Gohlke, N. K. Broecker, S. Schulze, W. Rabsch, U. Heinemann, S. Barbirz, R. Seckler, *Glycobiology* **2013**, *23*, 486-494.
- [70] N. K. Broecker, U. Gohlke, J. J. Müller, C. Uetrecht, U. Heinemann, R. Seckler, S. Barbirz, *Glycobiology* **2013**, *23*, 59-68.
- [71] J. H. Naismith, R. A. Field, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 972-976.
- [72] A. Wellens, C. Garofalo, H. Nguyen, N. Van Gerven, R. Slättegård, J.-P. Hernalsteens, L. Wyns, S. Oscarson, H. De Greve, S. Hultgren, J. Bouckaert, *PLoS One* **2008**, *3*, e2040.
- [73] M. F. López-Lucendo, D. Solís, S. André, J. Hirabayashi, K. Kasai, H. Kaltner, H.-J. Gabius, A. Romero, *J. Mol. Biol.* **2004**, *343*, 957-970.
- [74] A. Mulder, J. Huskens, D. N. Reinhoudt, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 3409-3424.
- [75] M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, *37*, 2755-2794.
- [76] K. Drickamer, *Nat. Struct. Biol.* **1995**, *2*, 437-439.
- [77] J. D. Marth, P. K. Grewal, *Nat. Rev. Immunol.* **2008**, *8*, 874-887.
- [78] P. Gagneux, A. Varki, *Glycobiology* **1999**, *9*, 747-755.
- [79] S. R. Stowell, C. M. Arthur, R. McBride, O. Berger, N. Razi, J. Heimbürg-Molinaro, L. C. Rodrigues, J.-P. Gourdine, A. J. Noll, S. von Gunten, D. F. Smith, Y. A. Knirel, J. C. Paulson, R. D. Cummings, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 470-476.
- [80] R. Amon, E. M. Reuven, S. Leviatan Ben-Arye, V. Padler-Karavani, *Carbohydr. Res.* **2014**, *389*, 115-122.
- [81] L. Van Valen, *Evol. Theory* **1973**, *1*, 1-30.
- [82] K.-A. Karlsson, *Mol. Microbiol.* **1998**, *29*, 1-11.
- [83] N. Sharon, *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1760*, 527-537.

-
- [84] J. D. Esko, N. Sharon in *Essentials of Glycobiology*, 2nd ed. (Eds.: A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. R. Bertozzi, G. W. Hart, M. E. Etzler), Cold Spring Harbor (NY), **2009**, pp. 489-500.
- [85] http://commons.wikimedia.org/wiki/File:E._coli_fimbriae.png (03.02.2015).
- [86] L. Gross, *PLoS Biol.* **2006**, *4*, e314.
- [87] G. Zhou, W.-J. Mo, P. Sebbel, G. Min, T. A. Neubert, R. Glockshuber, X.-R. Wu, T.-T. Sun, X.-P. Kong, *J. Cell Sci.* **2001**, *114*, 4095-4103.
- [88] M. A. Mulvey, Y. S. Lopez-Boado, C. L. Wilson, R. Roth, W. C. Parks, J. Heuser, S. J. Hultgren, *Science* **1998**, *282*, 1494-1497.
- [89] X.-R. Wu, T.-T. Sun, J. J. Medina, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 9630-9635.
- [90] R. Striker, U. Nilsson, A. Stonecipher, G. Magnusson, S. J. Hultgren, *Mol. Microbiol.* **1995**, *16*, 1021-1029.
- [91] K. W. Dodson, J. S. Pinkner, T. Rose, G. Magnusson, S. J. Hultgren, G. Waksman, *Cell* **2001**, *105*, 733-743.
- [92] A. Larsson, J. Ohlsson, K. W. Dodson, S. J. Hultgren, U. Nilsson, J. Kihlberg, *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 2255-2261.
- [93] T. K. Korhonen, V. Väisänen-Rhen, M. Rhen, A. Pere, J. Parkkinen, J. Finne, *J. Bacteriol.* **1984**, *159*, 762-766.
- [94] J. Stevens, O. Blixt, L. Glaser, J. K. Taubenberger, P. Palese, J. C. Paulson, I. A. Wilson, *J. Mol. Biol.* **2006**, *355*, 1143-1155.
- [95] J. Stevens, O. Blixt, J. C. Paulson, I. A. Wilson, *Nat. Rev. Microbiol.* **2006**, *4*, 857-864.
- [96] J. Stevens, O. Blixt, L.-M. Chen, R. O. Donis, J. C. Paulson, I. A. Wilson, *J. Mol. Biol.* **2008**, *381*, 1382-1394.
- [97] K. Tharakaraman, R. Raman, K. Viswanathan, N. W. Stebbins, A. Jayaraman, A. Krishnan, V. Sasisekharan, R. Sasisekharan, *Cell* **2013**, *153*, 1475-1485.
- [98] E. Tian, K. G. Ten Hagen, *Glycobiology* **2007**, *17*, 820-827.
- [99] S. Saussez, D. Nonclercq, G. Laurent, R. Wattiez, S. André, H. Kaltner, H.-J. Gabius, R. Kiss, G. Toubreau, *Histochem. Cell Biol.* **2005**, *123*, 29-41.
- [100] A. R. Lizzi, A. M. D'Alessandro, A. Bozzi, B. Cinque, A. Oratore, G. D'Andrea, *Mol. Cell. Biochem.* **2007**, *300*, 29-37.
- [101] C. F. Dai, A. Sagwal, Y. F. Cheng, H. J. Peng, W. X. Chen, B. H. Wang, *Pure Appl. Chem.* **2012**, *84*, 2479-2498.
-

- [102] V. Král, O. Rusin, F. P. Schmidtchen, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 873-876.
- [103] M. Mazik, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1015-1017.
- [104] S. Kubik, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 1722-1725.
- [105] Y. Ferrand, E. Klein, N. P. Barwell, M. P. Crump, J. Jiménez-Barbero, C. Vicent, G.-J. Boons, S. Ingale, A. P. Davis, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 1775-1779.
- [106] N. P. Barwell, M. P. Crump, A. P. Davis, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 7673-7676.
- [107] C. Ke, H. Destecroix, M. P. Crump, A. P. Davis, *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 718-723.
- [108] C. Geffert, M. Kuschel, M. Mazik, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 292-300.
- [109] J. Lippe, M. Mazik, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 9013-9020.
- [110] Y. Ferrand, M. P. Crump, A. P. Davis, *Science* **2007**, *318*, 619-622.
- [111] B. Sookcharoenpinyo, E. Klein, Y. Ferrand, D. B. Walker, P. R. Brotherhood, C. Ke, M. P. Crump, A. P. Davis, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51*, 4586-4590.
- [112] T. D. James, M. D. Phillips, S. Shinkai, *Boronic Acids in Saccharide Recognition*, (Ed.: J. F. Stoddart), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2006**.
- [113] M. Bérubé, M. Dowlut, D. G. Hall, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 6471-6479.
- [114] A. Pal, M. Bérubé, D. G. Hall, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 1492-1495.
- [115] G. Wulff, *Pure Appl. Chem.* **1982**, *54*, 2093-2102.
- [116] M. Dowlut, D. G. Hall, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4226-4227.
- [117] G. Heinrichs, M. Schellenträger, S. Kubik, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 4177-4186.
- [118] A. T. Wright, Z. Zhong, E. V. Anslyn, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 5679-5682.
- [119] Y. Zou, D. L. Broughton, K. L. Bicker, P. R. Thompson, J. J. Lavigne, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 2048-2051.
- [120] K. L. Bicker, J. Sun, J. J. Lavigne, P. R. Thompson, *ACS Comb. Sci.* **2011**, *13*, 232-243.
- [121] S. Sueyoshi, T. Tsuji, T. Osawa, *Carbohydr. Res.* **1988**, *178*, 213-224.
- [122] J. Hirabayashi, T. Hashidate, Y. Arata, N. Nishi, T. Nakamura, M. Hirashima, T. Urashima, T. Oka, M. Futai, W. E. G. Muller, F. Yagi, K. Kasai, *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1572*, 232-254.
- [123] H. Tateno, S. Nakamura-Tsuruta, J. Hirabayashi, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 2529-2537.
- [124] E. Duverger, N. Frison, A. C. Roche, M. Monsigny, *Biochimie* **2003**, *85*, 167-179.
- [125] E. A. Smith, W. D. Thomas, L. L. Kiessling, R. M. Corn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6140-6148.
- [126] J. P. McCoy, Jr., J. Varani, I. J. Goldstein, *Anal. Biochem.* **1983**, *130*, 437-444.

- [127] C. Maierhofer, K. Rohmer, V. Wittmann, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 7661-7676.
- [128] E. Freire, O. L. Mayorga, M. Straume, *Anal. Chem.* **1990**, *62*, A950-A959.
- [129] M. L. Doyle, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1997**, *8*, 31-35.
- [130] X. Wang, E. Matei, A. M. Gronenborn, O. Ramström, M. Yan, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 4248-4252.
- [131] T. K. Dam, C. F. Brewer, *Methods Enzymol.* **2004**, *379*, 107-128.
- [132] D. Mirelman, G. Altmann, Y. Eshdat, *J. Clin. Microbiol.* **1980**, *11*, 328-331.
- [133] P. Babu, S. Sinha, A. Surolia, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 146-151.
- [134] W. H. Pohl, H. Hellmuth, M. Hilbert, J. Seibel, P. J. Walla, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 268-274.
- [135] I. Shin, S. Park, M.-R. Lee, *Chemistry* **2005**, *11*, 2894-2901.
- [136] C.-Y. Wu, P.-H. Liang, C.-H. Wong, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 2247-2254.
- [137] C. D. Rillahan, J. C. Paulson, *Annu. Rev. Biochem.* **2011**, *80*, 797-823.
- [138] L. Wang, R. D. Cummings, D. F. Smith, M. Huflejt, C. T. Campbell, J. C. Gildersleeve, J. Q. Gerlach, M. Kilcoyne, L. Joshi, S. Serna, N.-C. Reichardt, N. Parera Pera, R. J. Pieters, W. Eng, L. K. Mahal, *Glycobiology* **2014**, *24*, 507-517.
- [139] J. Hirabayashi, M. Yamada, A. Kuno, H. Tateno, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4443-4458.
- [140] *Carbohydrate Microarrays - Methods and Protocols* (Ed.: Y. Chevolut), Springer, New York, **2012**.
- [141] N. Laurent, J. Voglmeir, S. L. Flitsch, *Chem. Commun.* **2008**, 4400-4412.
- [142] K. Gruber, T. Horlacher, R. Castelli, A. Mader, P. H. Seeberger, B. A. Hermann, *ACS Nano* **2011**, *5*, 3670-3678.
- [143] A. Beaussart, S. El-Kirat-Chatel, P. Herman, D. Alsteens, J. Mahillon, P. Hols, Y. F. Dufrene, *Biophys. J.* **2013**, *104*, 1886-1892.
- [144] A. Mader, K. Gruber, R. Castelli, B. A. Hermann, P. H. Seeberger, J. O. Rädler, M. Leisner, *Nano Letters* **2012**, *12*, 420-423.
- [145] M. Mayer, B. Meyer, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, *38*, 1784-1788.
- [146] J. Angulo, C. Rademacher, T. Biet, A. J. Benie, A. Blume, H. Peters, M. Palcic, F. Parra, T. Peters, *Methods Enzymol.* **2006**, *416*, 12-30.
- [147] S. Mari, D. Serrano-Gómez, F. J. Cañada, A. L. Corbí, J. Jiménez-Barbero, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *44*, 296-298.
- [148] J. Jiménez-Barbero, J. L. Asensio, F. J. Cañada, A. Poveda, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, *9*, 549-555.
-

- [149] S. Nakamura-Tsuruta, N. Uchiyama, J. Hirabayashi, *Methods Enzymol.* **2006**, *415*, 311-325.
- [150] A. Beaussart, S. El-Kirat-Chatel, R. M. A. Sullan, D. Alsteens, P. Herman, S. Derclaye, Y. F. Dufrêne, *Nat. Protoc.* **2014**, *9*, 1049-1055.
- [151] A. M. Hassell, G. An, R. K. Bledsoe, J. M. Bynum, H. L. Carter, 3rd, S. J. Deng, R. T. Gampe, T. E. Grisard, K. P. Madauss, R. T. Nolte, W. J. Rocque, L. Wang, K. L. Weaver, S. P. Williams, G. B. Wisely, R. Xu, L. M. Shewchuk, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2007**, *63*, 72-79.
- [152] F. Ni, H. A. Scheraga, *Acc. Chem. Res.* **1994**, *27*, 257-264.
- [153] D. M. Ratner, E. W. Adams, J. Su, B. R. O'Keefe, M. Mrksich, P. H. Seeberger, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 379-382.
- [154] O. Blixt, S. Head, T. Mondala, C. Scanlan, M. E. Huflejt, R. Alvarez, M. C. Bryan, F. Fazio, D. Calarese, J. Stevens, N. Razi, D. J. Stevens, J. J. Skehel, I. van Die, D. R. Burton, I. A. Wilson, R. Cummings, N. Bovin, C.-H. Wong, J. C. Paulson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 17033-17038.
- [155] C.-Y. Huang, D. A. Thayer, A. Y. Chang, M. D. Best, J. Hoffmann, S. Head, C.-H. Wong, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 15-20.
- [156] P. H. Seeberger, D. B. Werz, *Nature* **2007**, *446*, 1046-1051.
- [157] S. Serna, S. Yan, M. Martin-Lomas, I. B. H. Wilson, N.-C. Reichardt, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 16495-16502.
- [158] S. Fukui, T. Feizi, C. Galustian, A. M. Lawson, W. Chai, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 1011-1017.
- [159] W. G. Willats, S. E. Rasmussen, T. Kristensen, J. D. Mikkelsen, J. P. Knox, *Proteomics* **2002**, *2*, 1666-1671.
- [160] A. R. de Boer, C. H. Hokke, A. M. Deelder, M. Wuhrer, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 8107-8113.
- [161] K. Drickamer, M. E. Taylor, *Genome Biol.* **2002**, *3:reviews 1034*, 1-4.
- [162] J. Etxebarría, S. Serna, A. Beloqui, M. Martin-Lomas, N.-C. Reichardt, *Chemistry* **2013**, *19*, 4776-4785.
- [163] X.-Y. Zhu, B. Holtz, Y. Wang, L.-X. Wang, P. E. Orndorff, A. Guo, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13646-13650.
- [164] P.-H. Liang, S.-K. Wang, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11177-11184.
- [165] K. Godula, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 15732-15742.
- [166] M. E. Taylor, K. Drickamer, *Glycobiology* **2009**, *19*, 1155-1162.

- [167] M. A. Pond, R. A. Zangmeister, *Talanta* **2012**, *91*, 134-139.
- [168] J. W. Wehner, M. Hartmann, T. K. Lindhorst, *Carbohydr. Res.* **2013**, *371*, 22-31.
- [169] X. Song, Y. Lasanajak, B. Xia, D. F. Smith, R. D. Cummings, *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 741-750.
- [170] M. D. Disney, P. H. Seeberger, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1701-1707.
- [171] D. J. Scurr, T. Horlacher, M. A. Oberli, D. B. Werz, L. Kroeck, S. Bufali, P. H. Seeberger, A. G. Shard, M. R. Alexander, *Langmuir* **2010**.
- [172] D. F. Smith, X. Song, R. D. Cummings, *Methods Enzymol.* **2010**, *480*, 417-444.
- [173] O. C. Grant, H. M. K. Smith, D. Firsova, E. Fadda, R. J. Woods, *Glycobiology* **2014**, *24*, 17-25.
- [174] D. Wang, S. Liu, B. J. Trummer, C. Deng, A. Wang, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 275-281.
- [175] O. Kosík, R. P. Auburn, S. Russell, E. Stratilová, S. Garajová, M. Hrmova, V. Farkaš, *Glycoconjugate J.* **2010**, *27*, 79-87.
- [176] E. L. Shipp, L. C. Hsieh-Wilson, *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 195-208.
- [177] O. Carion, J. Lefebvre, G. Dubreucq, L. Dahri-Correia, J. Correia, O. Melnyk, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 817-826.
- [178] S. Angeloni, J. L. Ridet, N. Kusy, H. Gao, F. Crevoisier, S. Guinchard, S. Kochhar, H. Sigrist, N. Sprenger, *Glycobiology* **2005**, *15*, 31-41.
- [179] A. Tyagi, X. Wang, L. Deng, O. Ramström, M. Yan, *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *26*, 344-350.
- [180] G. T. Carroll, D. Wang, N. J. Turro, J. T. Koberstein, *Langmuir* **2006**, *22*, 2899-2905.
- [181] H.-Y. Hsiao, M.-L. Chen, H.-T. Wu, L.-D. Huang, W.-T. Chien, C.-C. Yu, F.-D. Jan, S. Sahabuddin, T.-C. Chang, C.-C. Lin, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 1187-1189.
- [182] Z.-L. Zhi, A. K. Powell, J. E. Turnbull, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 4786-4793.
- [183] Z.-L. Zhi, N. Laurent, A. K. Powell, R. Karamanska, M. Fais, J. Voglmeir, A. Wright, J. M. Blackburn, P. R. Crocker, D. A. Russell, S. Flitsch, R. A. Field, J. E. Turnbull, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1568-1575.
- [184] M.-R. Lee, I. Shin, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4269-4272.
- [185] I. Ohtsuka, Y. Sadakane, M. Higuchi, N. Hada, J. Hada, N. Kakiuchi, A. Sakushima, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 894-899.
- [186] I. Ohtsuka, Y. Sadakane, N. Hada, M. Higuchi, T. Atsumi, N. Kakiuchi, *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 3829-3837.

- [187] M. J. Weissenborn, J. W. Wehner, C. J. Gray, R. Šardžík, C. E. Eyers, T. K. Lindhorst, S. L. Flitsch, *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, *8*, 753-762.
- [188] J. W. Wehner, M. J. Weissenborn, M. Hartmann, C. J. Gray, R. Šardžík, C. E. Eyers, S. L. Flitsch, T. K. Lindhorst, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 8919-8926.
- [189] T. Feizi, W. Chai, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 582-588.
- [190] A. Sanchez-Ruiz, S. Serna, N. Ruiz, M. Martin-Lomas, N.-C. Reichardt, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 1801-1804.
- [191] A. Beloqui, J. Calvo, S. Serna, S. Yan, I. B. H. Wilson, M. Martin-Lomas, N.-C. Reichardt, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 7477-7481.
- [192] K.-S. Ko, F. A. Jaipuri, N. L. Pohl, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13162-13163.
- [193] Y. Chevolut, C. Bouillon, S. Vidal, F. Morvan, A. Meyer, J. P. Cloarec, A. Jochum, J.-P. Praly, J.-J. Vasseur, E. Souteyrand, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 2398-2402.
- [194] K.-T. Huang, K. Gorska, S. Alvarez, S. Barluenga, N. Winssinger, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 56-60.
- [195] O. Blixt, B. E. Collins, I. M. van den Nieuwenhof, P. R. Crocker, J. C. Paulson, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 31007-31019.
- [196] R. A. Alvarez, O. Blixt, *Methods Enzymol.* **2006**, *415*, 292-310.
- [197] B. S. Bochner, R. A. Alvarez, P. Mehta, N. V. Bovin, O. Blixt, J. R. White, R. L. Schnaar, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 4307-4312.
- [198] S. Park, I. Shin, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 3180-3182.
- [199] S. Park, M.-R. Lee, S.-J. Pyo, I. Shin, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4812-4819.
- [200] L. G. Harris, W. C. E. Schofield, K. J. Doores, B. G. Davis, J. P. S. Badyal, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 7755-7761.
- [201] Y. Suda, A. Arano, Y. Fukui, S. Koshida, M. Wakao, T. Nishimura, S. Kusumoto, M. Sobel, *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 1125-1135.
- [202] R. Šardžík, R. Sharma, S. Kaloo, J. Voglmeir, P. R. Crocker, S. L. Flitsch, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 5425-5427.
- [203] N. Laurent, R. Haddoub, J. Voglmeir, S. Flitsch, *Methods Mol. Biol.* **2012**, *808*, 269-284.
- [204] R. G. Nuzzo, D. L. Allara, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 4481-4483.
- [205] G. E. Poirier, E. D. Pylant, *Science* **1996**, *272*, 1145-1148.
- [206] D. K. Schwartz, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2001**, *52*, 107-137.
- [207] J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, G. M. Whitesides, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1103-1169.

-
- [208] L. Ban, N. Pettit, L. Li, A. D. Stuparu, L. Cai, W. Chen, W. Guan, W. Han, P. G. Wang, M. Mrksich, *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 769-773.
- [209] C. Grabosch, M. Kind, Y. Gies, F. Schweighöfer, A. Terfort, T. K. Lindhorst, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 4006-4015.
- [210] A. Pulsipher, M. N. Yousaf, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 523-525.
- [211] L. Deng, O. Norberg, S. Uppalapati, M. Yan, O. Ramström, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 3188-3198.
- [212] B. T. Houseman, M. Mrksich, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 443-454.
- [213] K. Braun, M. Wiessler, V. Ehemann, R. Pipkorn, H. Spring, J. Debus, B. Didingier, M. Koch, G. Müller, W. Waldeck, *Drug Des. Devel. Ther.* **2008**, *2*, 289-301.
- [214] H. S. G. Beckmann, A. Niederwieser, M. Wiessler, V. Wittmann, *Chemistry* **2012**, *18*, 6548-6554.
- [215] H. S. G. Beckmann, Dissertation, Universität Konstanz **2010**.
- [216] F. Fazio, M. C. Bryan, O. Blixt, J. C. Paulson, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14397-14402.
- [217] O. Norberg, L. Deng, T. Aastrup, M. Yan, O. Ramström, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 1000-1007.
- [218] K. Godula, D. Rabuka, K. T. Nam, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 4973-4976.
- [219] Consortium for Functional Glycomics, <http://www.functionalglycomics.org/> (03.02.2015).
- [220] O. Bohorov, H. Andersson-Sand, J. Hoffmann, O. Blixt, *Glycobiology* **2006**, *16*, 21C-27C.
- [221] C.-C. Wang, J.-R. Chen, Y.-C. Tseng, C.-H. Hsu, Y.-F. Hung, S.-W. Chen, C.-M. Chen, K.-H. Khoo, T.-J. Cheng, Y.-S. E. Cheng, J.-T. Jan, C.-Y. Wu, C. Ma, C.-H. Wong, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 18137-18142.
- [222] C.-C. Wang, Y.-L. Huang, C.-T. Ren, C.-W. Lin, J.-T. Hung, J.-C. Yu, A. L. Yu, C.-Y. Wu, C.-H. Wong, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 11661-11666.
- [223] N. Shilova, M. Navakouski, N. Khasbiullina, O. Blixt, N. Bovin, *Glycoconjugate J.* **2012**, *29*, 87-91.
- [224] C.-H. Liang, S.-K. Wang, C.-W. Lin, C.-C. Wang, C.-H. Wong, C.-Y. Wu, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 1608-1612.
- [225] J. Seibel, H. Hellmuth, B. Hofer, A. M. Kicinska, B. Schmalbruch, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 310-320.
-

- [226] X. Song, B. Xia, Y. Lasanajak, D. F. Smith, R. D. Cummings, *Glycoconjugate J.* **2008**, *25*, 15-25.
- [227] X. Song, B. Xia, S. R. Stowell, Y. Lasanajak, D. F. Smith, R. D. Cummings, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 36-47.
- [228] M. Schwarz, L. Spector, A. Gargir, A. Shtevi, M. Gortler, R. T. Altstock, A. A. Dukler, N. Dotan, *Glycobiology* **2003**, *13*, 749-754.
- [229] L. Nimrichter, A. Gargir, M. Gortler, R. T. Altstock, A. Shtevi, O. Weisshaus, E. Fire, N. Dotan, R. L. Schnaar, *Glycobiology* **2004**, *14*, 197-203.
- [230] C. Grabosch, K. Kolbe, T. K. Lindhorst, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1874-1879.
- [231] S. E. Tully, M. Rawat, L. C. Hsieh-Wilson, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7740-7741.
- [232] J. C. Manimala, T. A. Roach, Z. Li, J. C. Gildersleeve, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 3607-3610.
- [233] E. W. Adams, D. M. Ratner, H. R. Bokesch, J. B. McMahon, B. R. O'Keefe, P. H. Seeberger, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 875-881.
- [234] T. H. Patwa, J. Zhao, M. A. Anderson, D. M. Simeone, D. M. Lubman, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 6411-6421.
- [235] Y. Qiu, T. H. Patwa, L. Xu, K. Shedden, D. E. Misek, M. Tuck, G. Jin, M. T. Ruffin, D. K. Turgeon, S. Synal, R. Bresalier, N. Marcon, D. E. Brenner, D. M. Lubman, *J. Proteome Res.* **2008**, *7*, 1693-1703.
- [236] J. A. Belser, O. Blixt, L.-M. Chen, C. Pappas, T. R. Maines, N. Van Hoeven, R. Donis, J. Busch, R. McBride, J. C. Paulson, J. M. Katz, T. M. Tumpey, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 7558-7563.
- [237] R. A. Childs, A. S. Palma, S. Wharton, T. Matrosovich, Y. Liu, W. Chai, M. A. Campanero-Rhodes, Y. Zhang, M. Eickmann, M. Kiso, A. Hay, M. Matrosovich, T. Feizi, *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27*, 797-799.
- [238] K. C. Bradley, C. A. Jones, S. M. Tompkins, R. A. Tripp, R. J. Russell, M. R. Gramer, J. Heimburg-Molinaro, D. F. Smith, R. D. Cummings, D. A. Steinhauer, *Virology* **2011**, *413*, 169-182.
- [239] X. Song, H. Yu, X. Chen, Y. Lasanajak, M. M. Tappert, G. M. Air, V. K. Tiwari, H. Cao, H. A. Chokhawala, H. Zheng, R. D. Cummings, D. F. Smith, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 31610-31622.
- [240] A. Geissner, C. Anish, P. H. Seeberger, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *18*, 38-45.
- [241] P.-H. Liang, C.-Y. Wu, W. A. Greenberg, C.-H. Wong, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 86-92.

-
- [242] J. Zhao, T. H. Patwa, W. Qiu, K. Shedden, R. Hinderer, D. E. Misek, M. A. Anderson, D. M. Simeone, D. M. Lubman, *J. Proteome Res.* **2007**, *6*, 1864-1874.
- [243] T. Horlacher, P. H. Seeberger, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1414-1422.
- [244] O. Blixt, J. Hoffmann, S. Svenson, T. Norberg, *Glycoconjugate J.* **2008**, *25*, 27-36.
- [245] K. T. Pilobello, L. Krishnamoorthy, D. Slawek, L. K. Mahal, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 985-989.
- [246] A. Kuno, N. Uchiyama, S. Koseki-Kuno, Y. Ebe, S. Takashima, M. Yamada, J. Hirabayashi, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 851-856.
- [247] T. Zheng, D. Peelen, L. M. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9982-9983.
- [248] J. Katrik, J. Švitel, P. Gemeiner, T. Kožár, J. Tkac, *Med. Res. Rev.* **2010**, *30*, 394-418.
- [249] G. Gupta, A. Surolia, S.-G. Sampathkumar, *OMICS* **2010**, *14*, 419-436.
- [250] J. P. Ribeiro, L. K. Mahal, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 827-831.
- [251] K. T. Pilobello, D. E. Slawek, L. K. Mahal, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 11534-11539.
- [252] K.-L. Hsu, J. C. Gildersleeve, L. K. Mahal, *Mol. BioSyst.* **2008**, *4*, 654-662.
- [253] H. Tateno, M. Toyota, S. Saito, Y. Onuma, Y. Ito, K. Hiemori, M. Fukumura, A. Matsushima, M. Nakanishi, K. Ohnuma, H. Akutsu, A. Umezawa, K. Horimoto, J. Hirabayashi, M. Asashima, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 20345-20353.
- [254] R. Yabe, Y. Itakura, S. Nakamura-Tsuruta, J. Iwaki, A. Kuno, J. Hirabayashi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *384*, 204-209.
- [255] D. Hu, H. Tateno, A. Kuno, R. Yabe, J. Hirabayashi, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 20313-20320.
- [256] M. Kilcoyne, J. Q. Gerlach, M. Kane, L. Joshi, *Anal. Methods* **2012**, *4*, 2721-2728.
- [257] T. Pochechueva, F. Jacob, D. R. Goldstein, M. E. Huflejt, A. Chinarev, R. Caduff, D. Fink, N. Hacker, N. V. Bovin, V. Heinzelmann-Schwarz, *Glycoconjugate J.* **2011**, *28*, 507-517.
- [258] P. Stanley, *Annu. Rev. Genet.* **1984**, *18*, 525-552.
- [259] S. K. P. Patnaik, P. Stanley, *Methods Enzymol.* **2006**, *416*, 159-182.
- [260] R. E. Kosa, R. Brossmer, H.-J. Groß, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *190*, 914-920.
- [261] G. Srivastava, K. J. Kaur, O. Hindsgaul, M. M. Palcic, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 22356-22361.
- [262] T. Zheng, H. Jiang, M. Gros, D. Soriano del Amo, S. Sundaram, G. Lauvau, F. Marlow, Y. Liu, P. Stanley, P. Wu, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 4113-4118.
-

- [263] N. E. Mbuu, X. Li, H. R. Flanagan-Steet, L. Meng, K. Aoki, K. W. Moremen, M. A. Wolfert, R. Steet, G.-J. Boons, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 13012-13015.
- [264] D. H. Dube, C. R. Bertozzi, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 616-625.
- [265] P. V. Chang, C. R. Bertozzi, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 8864-8879.
- [266] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974-6998.
- [267] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 666-676.
- [268] K. Lang, J. W. Chin, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 16-20.
- [269] C. P. Ramil, Q. Lin, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 11007-11022.
- [270] H. Kayser, R. Zeitler, C. Kannicht, D. Grunow, R. Nuck, W. Reutter, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 16934-16938.
- [271] O. T. Keppler, P. Stehling, M. Herrmann, H. Kayser, D. Grunow, W. Reutter, M. Pawlita, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 1308-1314.
- [272] H. Möller, V. Böhrsch, J. Bentrop, J. Bender, S. Hinderlich, C. P. R. Hackenberger, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51*, 5986-5990.
- [273] S. J. Luchansky, H. C. Hang, E. Saxon, J. R. Grunwell, C. Yu, D. H. Dube, C. R. Bertozzi, *Methods Enzymol.* **2003**, *362*, 249-272.
- [274] C. Oetke, S. Hinderlich, R. Brossmer, W. Reutter, M. Pawlita, O. T. Keppler, *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 4553-4561.
- [275] M. Bardor, D. H. Nguyen, S. Diaz, A. Varki, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 4228-4237.
- [276] C. Oetke, R. Brossmer, L. R. Mantey, S. Hinderlich, R. Isecke, W. Reutter, O. T. Keppler, M. Pawlita, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 6688-6695.
- [277] L. K. Mahal, K. J. Yarema, C. R. Bertozzi, *Science* **1997**, *276*, 1125-1128.
- [278] A. K. Sarkar, T. A. Fritz, W. H. Taylor, J. D. Esko, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 3323-3327.
- [279] A. K. Sarkar, K. S. Rostand, R. K. Jain, K. L. Matta, J. D. Esko, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 25608-25616.
- [280] B. E. Collins, T. J. Fralich, S. Itonori, Y. Ichikawa, R. L. Schnaar, *Glycobiology* **2000**, *10*, 11-20.
- [281] J. M. Baskin, K. W. Dehnert, S. T. Laughlin, S. L. Amacher, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 10360-10365.
- [282] K. W. Dehnert, B. J. Beahm, T. T. Huynh, J. M. Baskin, S. T. Laughlin, W. Wang, P. Wu, S. L. Amacher, C. R. Bertozzi, *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 547-552.
- [283] B. J. Beahm, K. W. Dehnert, N. L. Derr, J. Kuhn, J. K. Eberhart, D. Spillmann, S. L. Amacher, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, *53*, 3347-3352.

- [284] E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007-2010.
- [285] S. S. van Berkel, M. B. van Eldijk, J. C. M. van Hest, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 8806-8827.
- [286] H. Staudinger, J. Meyer, *Helv. Chim. Acta* **1919**, *2*, 635-646.
- [287] M. F. Debets, C. W. J. van der Doelen, F. P. J. T. Rutjes, F. L. van Delft, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1168-1184.
- [288] F. L. Lin, H. M. Hoyt, H. van Halbeek, R. G. Bergman, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2686-2695.
- [289] E. Saxon, S. J. Luchansky, H. C. Hang, C. Yu, S. C. Lee, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14893-14902.
- [290] P. V. Chang, J. A. Prescher, M. J. Hangauer, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8400-8401.
- [291] M. Boyce, I. S. Carrico, A. S. Ganguli, S.-H. Yu, M. J. Hangauer, S. C. Hubbard, J. J. Kohler, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 3141-3146.
- [292] J. A. Prescher, D. H. Dube, C. R. Bertozzi, *Nature* **2004**, *430*, 873-877.
- [293] S. T. Laughlin, N. J. Agard, J. M. Baskin, I. S. Carrico, P. V. Chang, A. S. Ganguli, M. J. Hangauer, A. Lo, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Methods Enzymol.* **2006**, *415*, 230-250.
- [294] A. A. Neves, H. Stöckmann, R. R. Harmston, H. J. Pryor, I. S. Alam, H. Ireland-Zecchini, D. Y. Lewis, S. K. Lyons, F. J. Leeper, K. M. Brindle, *FASEB J.* **2011**, *25*, 2528-2537.
- [295] T. P. Hopp, K. S. Prickett, V. L. Price, R. T. Libby, C. J. March, D. P. Cerretti, D. L. Urdal, P. J. Conlon, *Bio/Technology* **1988**, *6*, 1204-1210.
- [296] A. Einhauer, A. Jungbauer, *J. Chromatogr. A* **2001**, *921*, 25-30.
- [297] S. C. Hubbard, M. Boyce, C. T. McVaugh, D. M. Peehl, C. R. Bertozzi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 4945-4950.
- [298] M. M. Rochefort, M. D. Girgis, J. S. Ankeny, J. S. Tomlinson, *Glycobiology* **2014**, *24*, 62-69.
- [299] R. Huisgen, *Angew. Chem., Int. Edit. Engl.* **1963**, *2*, 565-632.
- [300] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.
- [301] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.
- [302] E. Lallana, R. Riguera, E. Fernandez-Megia, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 8794-8804.

- [303] M. Meldal, C. W. Tornøe, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2952-3015.
- [304] J. E. Hein, V. V. Fokin, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1302-1315.
- [305] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.
- [306] B. T. Worrell, J. A. Malik, V. V. Fokin, *Science* **2013**, *340*, 457-460.
- [307] A. E. Speers, B. F. Cravatt, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 535-546.
- [308] M. Sawa, T.-L. Hsu, T. Itoh, M. Sugiyama, S. R. Hanson, P. K. Vogt, C.-H. Wong, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 12371-12376.
- [309] D. C. Kennedy, C. S. McKay, M. C. B. Legault, D. C. Danielson, J. A. Blake, A. F. Pegoraro, A. Stolow, Z. Mester, J. P. Pezacki, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 17993-18001.
- [310] L. M. Gaetke, C. K. Chow, *Toxicology* **2003**, *189*, 147-163.
- [311] B. Zödl, M. Zeiner, W. Marktl, I. Steffan, C. Ekmekcioglu, *Biol. Trace Elem. Res.* **2003**, *96*, 143-152.
- [312] D. Soriano del Amo, W. Wang, H. Jiang, C. Besanceney, A. C. Yan, M. Levy, Y. Liu, F. L. Marlow, P. Wu, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 16893-16899.
- [313] V. Hong, N. F. Steinmetz, M. Manchester, M. G. Finn, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 1912-1916.
- [314] C. Besanceney-Webler, H. Jiang, T. Zheng, L. Feng, D. Soriano del Amo, W. Wang, L. M. Klivansky, F. L. Marlow, Y. Liu, P. Wu, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 8051-8056.
- [315] T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853-2855.
- [316] P. V. Chang, X. Chen, C. Smyrniotis, A. Xenakis, T. Hu, C. R. Bertozzi, P. Wu, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 4030-4033.
- [317] A. Homann, R.-u. Qamar, S. Serim, P. Dersch, J. Seibel, *Beilstein J. Org. Chem.* **2010**, *6*, 24.
- [318] T.-L. Hsu, S. R. Hanson, K. Kishikawa, S.-K. Wang, M. Sawa, C.-H. Wong, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 2614-2619.
- [319] M. A. Breidenbach, J. E. G. Gallagher, D. S. King, B. P. Smart, P. Wu, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 3988-3993.
- [320] P. Shieh, M. J. Hangauer, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 17428-17431.
- [321] P. Shieh, M. S. Siegrist, A. J. Cullen, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, 5456-5461.
- [322] K. Sivakumar, F. Xie, B. M. Cash, S. Long, H. N. Barnhill, Q. Wang, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4603-4606.

- [323] A. Krebs, J. Wilke, *Top. Curr. Chem.* **1983**, *109*, 189-233.
- [324] A. T. Blomquist, L. H. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 2153-2154.
- [325] G. Wittig, A. Krebs, *Chem. Ber.* **1961**, *94*, 3260-3275.
- [326] N. J. Agard, J. M. Baskin, J. A. Prescher, A. Lo, C. R. Bertozzi, *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 644-648.
- [327] J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 16793-16797.
- [328] J. A. Codelli, J. M. Baskin, N. J. Agard, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11486-11493.
- [329] E. M. Sletten, G. de Almeida, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 1634-1637.
- [330] X. Ning, J. Guo, M. A. Wolfert, G.-J. Boons, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 2253-2255.
- [331] J. C. Jewett, E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3688-3690.
- [332] M. F. Debets, S. S. van Berkel, S. Schoffelen, F. P. J. T. Rutjes, J. C. M. van Hest, F. L. van Delft, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 97-99.
- [333] A. Kuzmin, A. Poloukhine, M. A. Wolfert, V. V. Popik, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 2076-2085.
- [334] C. G. Gordon, J. L. Mackey, J. C. Jewett, E. M. Sletten, K. N. Houk, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 9199-9208.
- [335] F. Friscourt, P. A. Ledin, N. E. Mbua, H. R. Flanagan-Steet, M. A. Wolfert, R. Steet, G.-J. Boons, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 5381-5389.
- [336] J. Dommerholt, S. Schmidt, R. Temming, L. J. A. Hendriks, F. P. J. T. Rutjes, J. C. M. van Hest, D. J. Lefeber, P. Friedl, F. L. van Delft, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 9422-9425.
- [337] P. V. Chang, J. A. Prescher, E. M. Sletten, J. M. Baskin, I. A. Miller, N. J. Agard, A. Lo, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 1821-1826.
- [338] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3097-3099.
- [339] H. Stöckmann, A. A. Neves, S. Stairs, H. Ireland-Zecchini, K. M. Brindle, F. J. Leeper, *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 932-936.
- [340] N. E. Mbua, J. Guo, M. A. Wolfert, R. Steet, G.-J. Boons, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1912-1921.
- [341] S. T. Laughlin, C. R. Bertozzi, *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 1068-1072.
- [342] K. W. Dehnert, J. M. Baskin, S. T. Laughlin, B. J. Beahm, N. N. Naidu, S. L. Amacher, C. R. Bertozzi, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 353-357.

- [343] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046-15047.
- [344] P. V. Chang, D. H. Dube, E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9516-9518.
- [345] H. Koo, S. Lee, J. H. Na, S. H. Kim, S. K. Hahn, K. Choi, I. C. Kwon, S. Y. Jeong, K. Kim, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51*, 11836-11840.
- [346] P. M. Clark, J. F. Dweck, D. E. Mason, C. R. Hart, S. B. Buck, E. C. Peters, B. J. Agnew, L. C. Hsieh-Wilson, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11576-11577.
- [347] N. Mercer, B. Ramakrishnan, E. Boeggeman, L. Verdi, P. K. Qasba, *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 144-152.
- [348] S. S. van Berkel, A. T. J. Dirks, M. F. Debets, F. L. van Delft, J. J. L. M. Cornelissen, R. J. M. Nolte, F. P. J. T. Rutjes, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1504-1508.
- [349] A. A. Poloukhine, N. E. Mbua, M. A. Wolfert, G.-J. Boons, V. V. Popik, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15769-15776.
- [350] N. K. Devaraj, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2297-2299.
- [351] M. L. Blackman, M. Royzen, J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13518-13519.
- [352] H. Stöckmann, A. A. Neves, H. A. Day, S. Stairs, K. M. Brindle, F. J. Leeper, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 7203-7205.
- [353] R. Rossin, P. R. Verkerk, S. M. van den Bosch, R. C. M. Vulders, I. Verel, J. Lub, M. S. Robillard, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 3375-3378.
- [354] C. M. Cole, J. Yang, J. Šečkutė, N. K. Devaraj, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 205-208.
- [355] A.-K. Späte, H. Bußkamp, A. Niederwieser, V. F. Schart, A. Marx, V. Wittmann, *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 147-154.
- [356] A. Niederwieser, A.-K. Späte, L. D. Nguyen, C. Jüngst, W. Reutter, V. Wittmann, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 4265-4268.
- [357] S. Stairs, A. A. Neves, H. Stöckmann, Y. A. Wainman, H. Ireland-Zecchini, K. M. Brindle, F. J. Leeper, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 1063-1067.
- [358] Y. A. Wainman, A. A. Neves, S. Stairs, H. Stöckmann, H. Ireland-Zecchini, K. M. Brindle, F. J. Leeper, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 7297-7300.
- [359] X. Ning, R. P. Temming, J. Dommerholt, J. Guo, D. B. Ania, M. F. Debets, M. A. Wolfert, G.-J. Boons, F. L. van Delft, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 3065-3068.
- [360] C. S. McKay, J. A. Blake, J. Cheng, D. C. Danielson, J. P. Pezacki, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 10040-10042.

-
- [361] L. Lin, X. Tian, S. Hong, P. Dai, Q. You, R. Wang, L. Feng, C. Xie, Z.-Q. Tian, X. Chen, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 7266-7271.
- [362] M. S. Siegrist, B. M. Swarts, D. M. Fox, S. A. Lim, C. R. Bertozzi, *FEMS Microbiol. Rev.* **2015**, DOI: 10.1093/femsre/fuu1012.
- [363] S. Goon, B. Schilling, M. V. Tullius, B. W. Gibson, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 3089-3094.
- [364] W. Yi, X. Liu, Y. Li, J. Li, C. Xia, G. Zhou, W. Zhang, W. Zhao, X. Chen, P. G. Wang, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 4207-4212.
- [365] A. Dumont, A. Malleron, M. Awwad, S. Dukan, B. Vauzeilles, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51*, 3143-3146.
- [366] J. Mas Pons, A. Dumont, G. Sautejeau, E. Fugier, A. Baron, S. Dukan, B. Vauzeilles, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, *53*, 1275-1278.
- [367] B. M. Swarts, C. M. Holsclaw, J. C. Jewett, M. Alber, D. M. Fox, M. S. Siegrist, J. A. Leary, R. Kalscheuer, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 16123-16126.
- [368] F. Liu, A. J. Aubry, I. C. Schoenhofen, S. M. Logan, M. E. Tanner, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1317-1320.
- [369] M. B. Koenigs, E. A. Richardson, D. H. Dube, *Mol. BioSyst.* **2009**, *5*, 909-912.
- [370] K. Champosa, S. A. Longwell, A. M. Eldridge, E. A. Stemmler, D. H. Dube, *Mol. Cell. Proteomics* **2013**, *12*, 2568-2586.
- [371] P. Kaewsapsak, O. Esonu, D. H. Dube, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 721-726.
- [372] C. Besanceney-Webler, H. Jiang, W. Wang, A. D. Baughn, P. Wu, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 4989-4992.
- [373] R. Šardžik, A. P. Green, N. Laurent, P. Both, C. Fontana, J. Voglmeir, M. J. Weissenborn, R. Haddoub, P. Grassi, S. M. Haslam, G. Widmalm, S. L. Flitsch, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 4521-4524.
- [374] J. Ohlsson, J. Jass, B. E. Uhlin, J. Kihlberg, U. J. Nilsson, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 772-779.
- [375] J. Ohlsson, A. Larsson, S. Haataja, J. Alajääski, P. Stenlund, J. S. Pinkner, S. J. Hultgren, J. Finne, J. Kihlberg, U. J. Nilsson, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 886-900.
- [376] E. Abbe, *Arch. Mikrosk. Anat.* **1873**, *9*, 413-418.
- [377] M. Heilemann, S. van de Linde, M. Schüttpelz, R. Kasper, B. Seefeldt, A. Mukherjee, P. Tinnefeld, M. Sauer, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 6172-6176.
- [378] S. van de Linde, A. Löschberger, T. Klein, M. Heidbreder, S. Wolter, M. Heilemann, M. Sauer, *Nat. Protoc.* **2011**, *6*, 991-1009.
-

- [379] C. Pelletier, P. Prognon, P. Bourlioux, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, *39*, 707-713.
- [380] N. Laurent, R. Haddoub, J. Voglmeir, S. C. Wong, S. J. Gaskell, S. L. Flitsch, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2592-2596.
- [381] R. Šardžik, G. T. Noble, M. J. Weissenborn, A. Martin, S. J. Webb, S. L. Flitsch, *Beilstein J. Org. Chem.* **2010**, *6*, 699-703.
- [382] O. Blixt, K. Allin, O. Bohorov, X. Liu, H. Andersson-Sand, J. Hoffmann, N. Razi, *Glycoconjugate J.* **2008**, *25*, 59-68.
- [383] O. Blixt, S. Han, L. Liao, Y. Zeng, J. Hoffmann, S. Futakawa, J. C. Paulson, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6680-6681.
- [384] C. De Cola, A. Manicardi, R. Corradini, I. Izzo, F. De Riccardis, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 499-506.
- [385] L. K. Mydock, A. V. Demchenko, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 497-510.
- [386] K. C. Nicolaou, H. J. Mitchell, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 1576-1624.
- [387] R. U. Lemieux, C. Brice, G. Huber, *Can. J. Chem.* **1955**, *33*, 134-147.
- [388] R. U. Lemieux, C. Brice, *Can. J. Chem.* **1955**, *33*, 109-119.
- [389] W. Koenigs, E. Knorr, *Chem. Ber.* **1901**, *34*, 957-981.
- [390] R. R. Schmidt, J. Michel, *Angew. Chem., Int. Edit. Engl.* **1980**, *19*, 731-732.
- [391] S. Gerber-Lemaire, P. Vogel in *Carbohydrate Chemistry: Chemical and Biological Approaches, Vol. 35* (Eds.: A. P. Rauter, T. K. Lindhorst), RSC, Cambridge, **2009**, pp. 13-32.
- [392] I. Cumpstey, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 2503-2508.
- [393] N. Seah, P. V. Santacroce, A. Basu, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 559-562.
- [394] H. Friebolin, *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie*, 5. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, **2013**.
- [395] G. Zemplén, E. Pacsu, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1929**, *62*, 1613-1614.
- [396] C. J. Gray, M. J. Weissenborn, C. E. Eyers, S. L. Flitsch, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6378-6405.
- [397] J. H. Gross, *Mass spectrometry: a textbook*, Springer, Berlin; New York, **2004**.
- [398] H. Budzikiewicz, *Massenspektrometrie; eine Einführung*, 6. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, **2012**.
- [399] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 8. Auflage, Thieme, Stuttgart, **2012**.

- [400] R. F. DeBono, G. D. Loucks, D. Della Manna, U. J. Krull, *Can. J. Chem.* **1996**, *74*, 677-688.
- [401] M. Ortiz-Soto, unveröffentlichte Arbeiten, Universität Würzburg.
- [402] D. J. Harvey, *Mass Spectrom. Rev.* **2008**, *27*, 125-201.
- [403] A. K. Powell, D. J. Harvey, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1996**, *10*, 1027-1032.
- [404] M. Kunishima, C. Kawachi, J. Morita, K. Terao, F. Iwasaki, S. Tani, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 13159-13170.
- [405] M. Kunishima, J. Morita, C. Kawachi, F. Iwasaki, K. Terao, S. Tani, *Synlett* **1999**, 1255-1256.
- [406] M. A. Claydon, S. N. Davey, V. Edwards-Jones, D. B. Gordon, *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 1584-1586.
- [407] R. D. Holland, J. G. Wilkes, F. Rafii, J. B. Sutherland, C. C. Persons, K. J. Voorhees, J. O. Lay, Jr., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1996**, *10*, 1227-1232.
- [408] P. Seng, M. Drancourt, F. Gouriet, B. La Scola, P. E. Fournier, J. M. Rolain, D. Raoult, *Clin. Infect. Dis.* **2009**, *49*, 543-551.
- [409] P. R. Murray, *J. Mol. Diagn.* **2012**, *14*, 419-423.
- [410] A. E. Clark, E. J. Kaleta, A. Arora, D. M. Wolk, *Clin. Microbiol. Rev.* **2013**, *26*, 547-603.
- [411] W. Wang, H. Xi, M. Huang, J. Wang, M. Fan, Y. Chen, H. Shao, X. Li, *J. Thorac. Dis.* **2014**, *6*, 524-533.
- [412] S. A. Neville, A. LeCordier, H. Ziochos, M. J. Chater, I. B. Gosbell, M. W. Maley, S. J. van Hal, *J. Clin. Microbiol.* **2011**, *49*, 2980-2984.
- [413] A. Mellmann, F. Bimet, C. Bizet, A. D. Borovskaya, R. R. Drake, U. Eigner, A. M. Fahr, Y. He, E. N. Ilina, M. Kostrzewa, T. Maier, L. Mancinelli, W. Moussaoui, G. Prévost, L. Putignani, C. L. Seachord, Y. W. Tang, D. Harmsen, *J. Clin. Microbiol.* **2009**, *47*, 3732-3734.
- [414] H. Liu, Z. Du, J. Wang, R. Yang, *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 1899-1907.
- [415] J. J. Bright, M. A. Claydon, M. Soufian, D. B. Gordon, *J. Microbiol. Methods* **2002**, *48*, 127-138.
- [416] P. A. Demirev, J. S. Lin, F. J. Pineda, C. Fenselaut, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 4566-4573.
- [417] K. H. Jarman, S. T. Cebula, A. J. Saenz, C. E. Petersen, N. B. Valentine, M. T. Kingsley, K. L. Wahl, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1217-1223.
- [418] R. Schaumann, N. Knoop, G. H. Genzel, K. Losensky, C. Rosenkranz, C. S. Stîngu, W. Schellenberger, A. C. Rodloff, K. Eschrich, *Open Microbiol. J.* **2013**, *7*, 118-122.

- [419] R. T. Lee, Y. C. Lee, *Carbohydr. Res.* **1974**, *37*, 193-201.
- [420] L. Hillringhaus, Dissertation, Technische Universität Braunschweig **2008**.
- [421] E. Fischer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1893**, *26*, 2400-2412.
- [422] C. E. Hoyle, C. N. Bowman, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 1540-1573.
- [423] M. A. Tasdelen, Y. Yagci, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 5930-5938.
- [424] B. Capon, *Chem. Rev.* **1969**, *69*, 407-&.
- [425] K. K. R. Tetala, B. Chen, G. M. Visser, A. Maruska, O. Kornysova, T. A. van Beek, E. J. R. Sudholter, *J. Biochem. Biophys. Methods* **2007**, *70*, 63-69.
- [426] C.-C. Lin, F. Morís-Varas, G. Weitz-Schmidt, C.-H. Wong, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 425-433.
- [427] W. D. Cook, F. Chen, D. W. Pattison, P. Hopson, M. Beaujon, *Polym. Int.* **2007**, *56*, 1572-1579.
- [428] R. Roy, C. A. Laferriere, *Carbohydr. Res.* **1988**, *177*, C1-4.
- [429] G. N. Bollenback, J. W. Long, D. G. Benjamin, J. A. Lindquist, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 3310-3315.
- [430] SCHOTT GmbH, NEXTERION Slide H, Produktbeschreibung http://www.schott.com/nexterion/english/products/coated_slides/thin_film.html (03.02.2015).
- [431] S. Goto, H. Terada, *Spectroscopy* **2002**, *16*, 285-288.
- [432] D. Claes, Dissertation, Universität Hamburg **2013**.
- [433] F. Wienhold, D. Claes, K. Graczyk, W. Maison, *Synthesis* **2011**, 4059-4067.
- [434] D. Claes, M. Holzapfel, N. Clausen, W. Maison, *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *2013*, 6361-6371.
- [435] D. Claes, E. Memmel, M. Holzapfel, J. Seibel, W. Maison, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 2450-2457.
- [436] S. Klotzbach, Diplomarbeit, Universität Würzburg **2011**.
- [437] J. Ye, Y. Chen, Z. Liu, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, *53*, 10386-10389.
- [438] C. T. Liu, J. W. Tomsho, S. J. Benkovic, *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 4462-4473.
- [439] F. T. Liu, G. A. Rabinovich, *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 29-41.
- [440] V. L. Thijssen, B. Barkan, H. Shoji, I. M. Aries, V. Mathieu, L. Deltour, T. M. Hackeng, R. Kiss, Y. Kloog, F. Poirier, A. W. Griffioen, *Cancer Res.* **2010**, *70*, 6216-6224.

- [441] D. O. Croci, M. Salatino, N. Rubinstein, J. P. Cerliani, L. E. Cavallin, H. J. Leung, J. Ouyang, J. M. Ilarregui, M. A. Toscano, C. I. Domaica, M. C. Croci, M. A. Shipp, E. A. Mesri, A. Albini, G. A. Rabinovich, *J. Exp. Med.* **2012**, *209*, 1985-2000.
- [442] T. Dalotto-Moreno, D. O. Croci, J. P. Cerliani, V. C. Martinez-Allo, S. Dergan-Dylon, S. P. Mendez-Huergo, J. C. Stupirski, D. Mazal, E. Osinaga, M. A. Toscano, V. Sundblad, G. A. Rabinovich, M. Salatino, *Cancer Res.* **2013**, *73*, 1107-1117.
- [443] L. Astorgues-Xerri, M. E. Riveiro, A. Tijeras-Raballand, M. Serova, C. Neuzillet, S. Albert, E. Raymond, S. Faivre, *Cancer Treat. Rev.* **2014**, *40*, 307-319.
- [444] N. Bertleff-Zieschang, Dissertation, Universität Würzburg **2014**.
- [445] A. Göhler, Dissertation, Universität Würzburg **2012**.
- [446] L. Song, J.-W. Tang, L. Owusu, M.-Z. Sun, J. Wu, J. Zhang, *Clin. Chim. Acta* **2014**, *431*, 185-191.
- [447] G. Radosavljevic, V. Volarevic, I. Jovanovic, M. Milovanovic, N. Pejnovic, N. Arsenijevic, D. K. Hsu, M. L. Lukic, *Immunol. Res.* **2012**, *52*, 100-110.
- [448] S. André, S. Kojima, N. Yamazaki, C. Fink, H. Kaltner, K. Kayser, H. J. Gubius, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1999**, *125*, 461-474.
- [449] V. Veschi, M. Petroni, A. Bartolazzi, P. Altavista, C. Dominici, C. Capalbo, R. Boldrini, A. Castellano, H. P. McDowell, B. Pizer, L. Frati, I. Screpanti, A. Gulino, G. Giannini, *Cell Death Dis.* **2014**, *5*, e1100.
- [450] Y. Wang, V. Balan, X. Gao, P. G. Reddy, D. Kho, L. Tait, A. Raz, *Cell Death Dis.* **2013**, *4*, e753.
- [451] V. Balan, Y. Wang, P. Nangia-Makker, D. Kho, M. Bajaj, D. Smith, L. Heilbrun, A. Raz, E. Heath, *Oncotarget* **2013**, *4*, 542-549.
- [452] Fluorescence SpectraViewer <http://www.lifetechnologies.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html> (03.02.2015).
- [453] M. Watanabe, I. Takemasa, N. Kaneko, Y. Yokoyama, E.-I. Matsuo, S. Iwasa, M. Mori, N. Matsuura, M. Monden, O. Nishimura, *Oncol. Rep.* **2011**, *25*, 1217-1226.
- [454] S. Saussez, D. Glinoeur, G. Chantrain, F. Pattou, B. Carnaille, S. Andre, H. J. Gubius, G. Laurent, *Thyroid* **2008**, *18*, 705-712.
- [455] S. Saussez, F. Lorfevre, T. Lequeux, G. Laurent, G. Chantrain, F. Vertongen, G. Toubeau, C. Decaestecker, R. Kiss, *Oral Oncol.* **2008**, *44*, 86-93.
- [456] N. Clausse, F. van den Brûle, D. Waltregny, F. Garnier, V. Castronovo, *Angiogenesis* **1999**, *3*, 317-325.

- [457] R. A. Pacis, M. J. Pilat, K. J. Pienta, K. Wojno, A. Raz, V. Hogan, C. R. Cooper, *Prostate* **2000**, *44*, 118-123.
- [458] SCHOTT GmbH, NEXTERION HiSens Slides, Produktbeschreibung http://www.schott.com/nexterion/english/products/coated_slides/reflective/reflective.html (03.02.2015).
- [459] P. A. Ward, M. Bosmann, *Am. J. Pathol.* **2012**, *181*, 2-7.
- [460] F. Bloos, S. Sachse, A. Kortgen, M. W. Pletz, M. Lehmann, E. Straube, N. C. Riedemann, K. Reinhart, M. Bauer, *PLoS One* **2012**, *7*, e46003.
- [461] S. Cecioni, S. Faure, U. Darbost, I. Bonnamour, H. Parrot-Lopez, O. Roy, C. Taillefumier, M. Wimmerová, J. P. Praly, A. Imberty, S. Vidal, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 2146-2159.
- [462] C. Fleck, E. Franzmann, D. Claes, A. Rickert, W. Maison, *Synthesis* **2013**, *45*, 1452-1461.
- [463] C. Fleck, E. Memmel, M. Fölsing, B. Poll, T. Hackl, J. Seibel, W. Maison, *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, DOI: 10.1002/ejoc.201403517.
- [464] K. L. Hsu, K. T. Pilobello, L. K. Mahal, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 153-157.
- [465] K. L. Hsu, L. K. Mahal, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 543-549.
- [466] L. R. Ruhaak, G. Zauner, C. Huhn, C. Bruggink, A. M. Deelder, M. Wührer, *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *397*, 3457-3481.
- [467] D. J. Harvey, *J. Chromatogr. B* **2011**, *879*, 1196-1225.
- [468] S. Bank, Dissertation, Universität Würzburg **2014**.
- [469] S. Bank, E. Heller, E. Memmel, J. Seibel, U. Holzgrabe, P. Kapková, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2014**, *28*, 1745-1756.
- [470] D. Fu, L. Chen, R. A. O'Neill, *Carbohydr. Res.* **1994**, *261*, 173-186.
- [471] J. M. Prien, D. J. Ashline, A. J. Lapadula, H. Zhang, V. N. Reinhold, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2009**, *20*, 539-556.
- [472] V. Devescovi, E. Leonardi, G. Ciapetti, E. Cenni, *Chir. Organi. Mov.* **2008**, *92*, 161-168.
- [473] J. Halper, *Adv. Exp. Med. Biol.* **2014**, *802*, 59-76.
- [474] T. Imamura, *Biol. Pharm. Bull.* **2014**, *37*, 1081-1089.
- [475] J. Halper, M. Kjaer, *Adv. Exp. Med. Biol.* **2014**, *802*, 31-47.
- [476] T. Lühmann, G. Jones, unveröffentlichte Arbeiten, Universität Würzburg.
- [477] J. Ohlsson, G. Magnusson, *Carbohydr. Res.* **2000**, *329*, 49-55.
- [478] M. Rommel, A. Ernst, U. Koert, *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 4408-4430.

-
- [479] P. Bindschädler, C. Noti, E. Castagnetti, P. H. Seeberger, *Helv. Chim. Acta* **2006**, *89*, 2591-2610.
- [480] F. D. Tropper, F. O. Andersson, S. Braun, R. Roy, *Synthesis* **1992**, 618-620.
- [481] K. Slámová, P. Marhol, K. Bezouška, L. Lindkvist, S. G. Hansen, V. Křen, H. H. Jensen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 4263-4265.
- [482] F. G. Bordwell, H. E. Fried, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 4218-4223.
- [483] K. V. Rao, P. R. Patil, S. Atmakuri, K. P. R. Kartha, *Carbohydr. Res.* **2010**, *345*, 2709-2713.
- [484] R. Johnsson, D. Olsson, U. Ellervik, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 5226-5232.
- [485] P. Konradsson, D. R. Mootoo, R. E. McDevitt, B. Fraser-Reid, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1990**, 270-272.
- [486] G. H. Veeneman, S. H. van Leeuwen, J. H. van Boom, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 1331-1334.
- [487] C. E. Martin, F. Broecker, M. A. Oberli, J. Komor, J. Mattner, C. Anish, P. H. Seeberger, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 9713-9722.
- [488] M. Karskela, P. Virta, M. Malinen, A. Urtti, H. Lönnberg, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2549-2558.
- [489] M. Adinolfi, G. Barone, L. Guariniello, A. Iadonisi, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 8439-8441.
- [490] M. Niemietz, L. Perkams, J. Hoffman, S. Eller, C. Unverzagt, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 10485-10487.
- [491] M. Kraus, unveröffentlichte Arbeiten, Universität Würzburg.
- [492] P. K. Sharma, A. Kolchinski, H. A. Shea, J. J. Nair, Y. Gou, L. J. Romanczyk, Jr., H. H. Schmitz, *Org. Process Res. Dev.* **2007**, *11*, 422-430.
- [493] C. S. Rye, S. G. Withers, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9756-9767.
- [494] C. L. de Graffenried, S. T. Laughlin, J. J. Kohler, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 16715-16720.
- [495] R. K. Sinha, G. Yang, C. Alexander, R. G. Mage, *Immunology* **2006**, *119*, 461-469.
- [496] A. Bernardin, A. Cazet, L. Guyon, P. Delannoy, F. Vinet, D. Bonnaffé, I. Texier, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 583-588.
- [497] S. T. Laughlin, C. R. Bertozzi, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 2930-2944.
- [498] E. Wenk, A. R. Murphy, D. L. Kaplan, L. Meinel, H. P. Merkle, L. Uebersax, *Biomaterials* **2010**, *31*, 1403-1413.
-

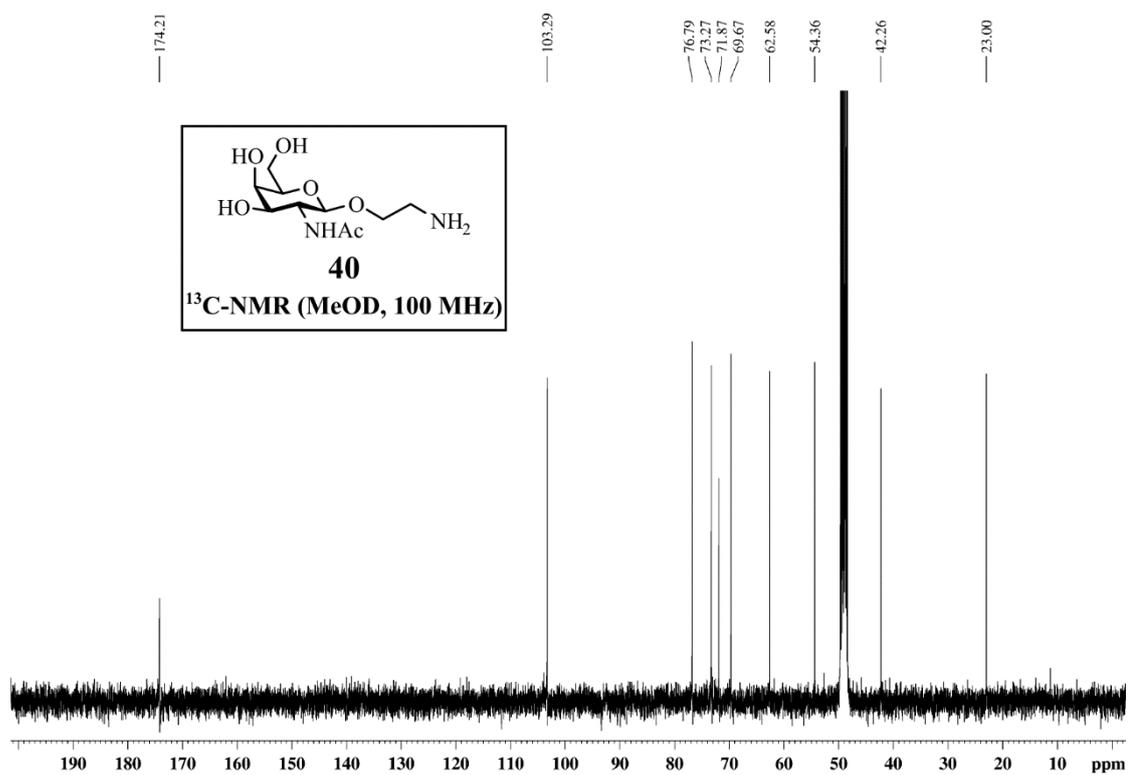
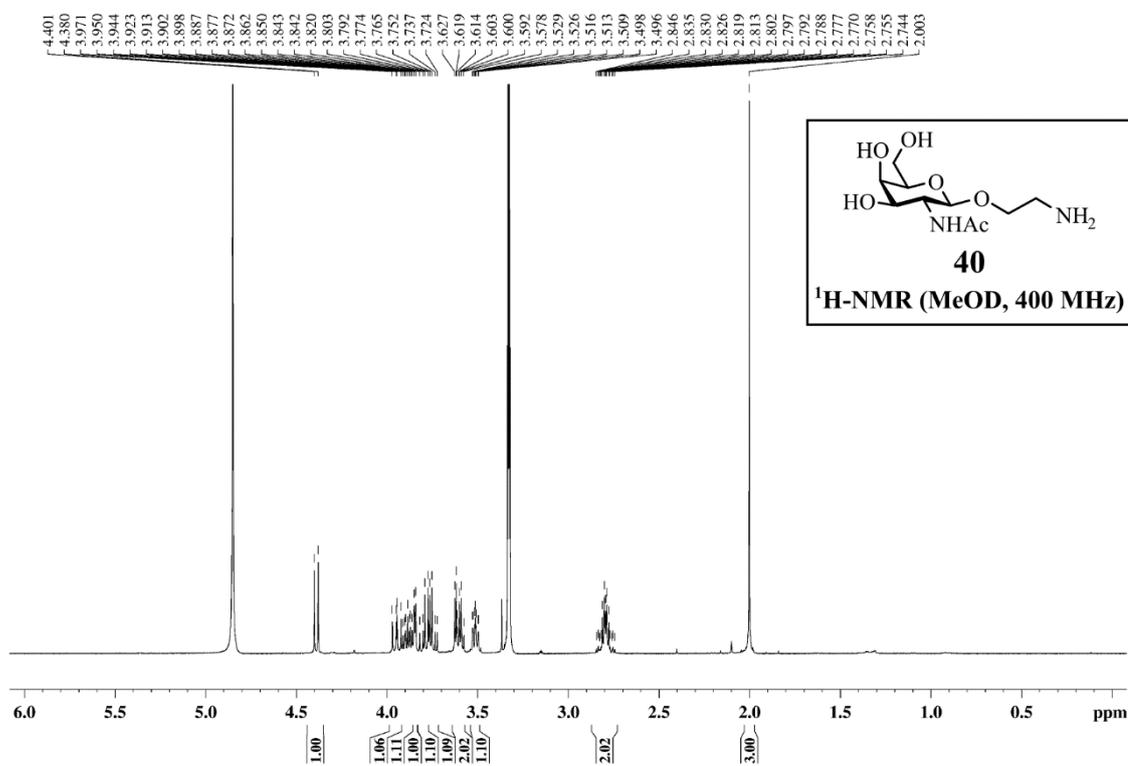
- [499] J. D. Esko, K. Kimata, U. Lindahl in *Essentials of Glycobiology*, 2nd ed. (Eds.: A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. R. Bertozzi, G. W. Hart, M. E. Etzler), Cold Spring Harbor (NY), **2009**, pp. 229-248.
- [500] M. Gutmann, unveröffentlichte Arbeiten, Universität Würzburg.
- [501] S. Letschert, unveröffentlichte Arbeiten, Universität Würzburg.
- [502] K. Jacobson, O. G. Mouritsen, R. G. W. Anderson, *Nat. Cell Biol.* **2007**, *9*, 7-14.
- [503] A. Cambi, D. S. Lidke, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 139-149.
- [504] A. Kusumi, T. K. Fujiwara, R. Chadda, M. Xie, T. A. Tsunoyama, Z. Kalay, R. S. Kasai, K. G. N. Suzuki, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **2012**, *28*, 215-250.
- [505] S. Letschert, A. Göhler, C. Franke, N. Bertleff-Zieschang, E. Memmel, S. Doose, J. Seibel, M. Sauer, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, *53*, 10921-10924.
- [506] T. K. Dam, C. F. Brewer, *Glycobiology* **2010**, *20*, 270-279.
- [507] A. Grigorian, S. Torossian, M. Demetriou, *Immunol. Rev.* **2009**, *230*, 232-246.
- [508] S. W. Hell, *Science* **2007**, *316*, 1153-1158.
- [509] S. van de Linde, M. Heilemann, M. Sauer, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2012**, *63*, 519-540.
- [510] The Official Web Site of the Nobel Prize www.nobelprize.org (03.02.2015).
- [511] T. A. Klar, S. W. Hell, *Opt. Lett.* **1999**, *24*, 954-956.
- [512] S. Bretschneider, C. Eggeling, S. W. Hell, *Phys. Rev. Lett.* **2007**, *98*, 218103.
- [513] D. Wildanger, B. R. Patton, H. Schill, L. Marseglia, J. P. Hadden, S. Knauer, A. Schönle, J. G. Rarity, J. L. O'Brien, S. W. Hell, J. M. Smith, *Adv. Mater.* **2012**, *24*, OP309-313.
- [514] P. Lemmer, M. Gunkel, D. Baddeley, R. Kaufmann, A. Urich, Y. Weiland, J. Reyman, P. Müller, M. Hausmann, C. Cremer, *Appl. Phys. B* **2008**, *93*, 1-12.
- [515] E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, H. F. Hess, *Science* **2006**, *313*, 1642-1645.
- [516] S. T. Hess, T. P. Girirajan, M. D. Mason, *Biophys. J.* **2006**, *91*, 4258-4272.
- [517] M. J. Rust, M. Bates, X. Zhuang, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 793-795.
- [518] S. van de Linde, I. Krstić, T. Prisner, S. Doose, M. Heilemann, M. Sauer, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2011**, *10*, 499-506.
- [519] N. Berois, E. Osinaga, *Front. Oncol.* **2014**, *4*, 114.
- [520] T. Klein, S. van de Linde, M. Sauer, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1861-1863.
- [521] J. Chen, J. Gao, J. Wu, M. Zhang, M. Cai, H. Xu, J. Jiang, Z. Tian, H. Wang, *Nanoscale* **2015**, DOI: 10.1039/C1034NR05970K.

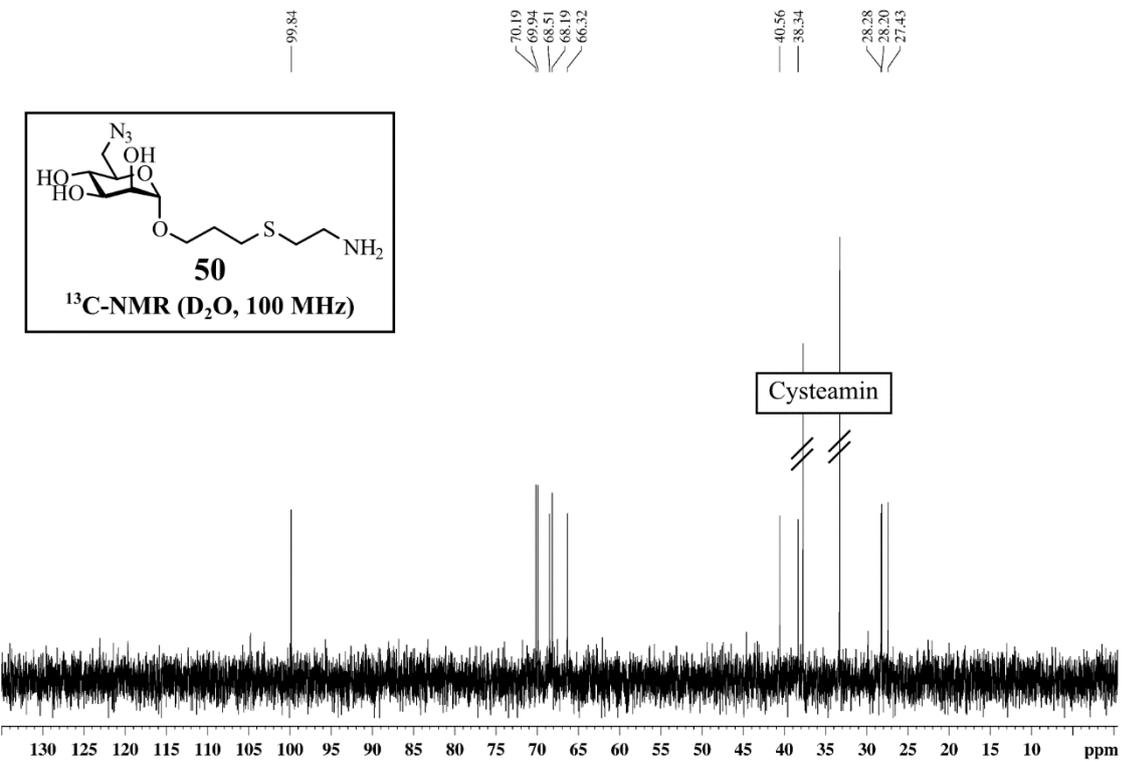
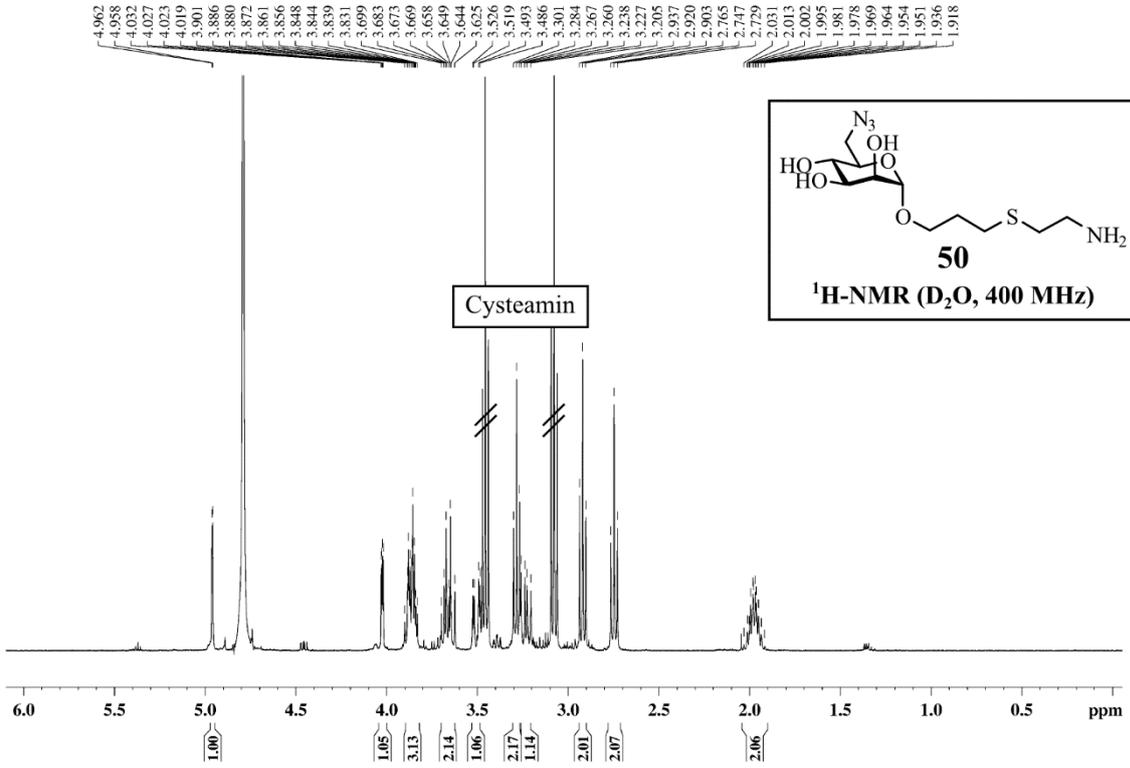
-
- [522] J. E. Hudak, S. M. Canham, C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 69-75.
- [523] J. Seibel, S. König, A. Göhler, S. Doose, E. Memmel, N. Bertleff, M. Sauer, *Expert Rev. Proteomics* **2013**, *10*, 25-31.
- [524] R. B. Parker, J. J. Kohler, *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5*, 35-46.
- [525] A. K. Antonczak, Z. Simova, E. M. Tippmann, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 28795-28800.
- [526] P. Schierack, S. Kleta, K. Tedin, J. T. Babila, S. Oswald, T. A. Oelschlaeger, R. Hiemann, S. Paetzold, L. H. Wieler, *PLoS One* **2011**, *6*, e14712.
- [527] P. Speziale, G. Pietrocola, S. Rindi, M. Provenzano, G. Provenza, A. Di Poto, L. Visai, C. R. Arciola, *Future Microbiol.* **2009**, *4*, 1337-1352.
- [528] O. P. Livins'ka, I. L. Garmasheva, N. K. Kovalenko, *Mikrobiol. Z.* **2012**, *74*, 16-22.
- [529] C. Weidenmaier, J. F. Kokai-Kun, S. A. Kristian, T. Chanturiya, H. Kalbacher, M. Gross, G. Nicholson, B. Neumeister, J. J. Mond, A. Peschel, *Nat. Med.* **2004**, *10*, 243-245.
- [530] C. Weidenmaier, A. Peschel, Y. Q. Xiong, S. A. Kristian, K. Dietz, M. R. Yeaman, A. S. Bayer, *J. Infect. Dis.* **2005**, *191*, 1771-1777.
- [531] E. A. Izano, M. A. Amarante, W. B. Kher, J. B. Kaplan, *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 470-476.
- [532] C. Gurcel, A. S. Vercoutter-Edouart, C. Fonbonne, M. Mortuaire, A. Salvador, J. C. Michalski, J. Lemoine, *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *390*, 2089-2097.
- [533] D. Karam, A. Amgar, P. Bourlioux, *Pathol. Biol.* **1988**, *36*, 452-455.
- [534] P. Bourlioux, H. Botto, D. Karam, A. Amgar, M. Camey, *Pathol. Biol.* **1989**, *37*, 451-454.
- [535] K. G. Naber, G. Schito, H. Botto, J. Palou, T. Mazzei, *Eur. Urol.* **2008**, *54*, 1164-1175.
- [536] G. Kahlmeter, H. O. Poulsen, *Int. J. Antimicrob. Agents* **2012**, *39*, 45-51.
- [537] W. Dekant, S. Vamvakas, *Toxikologie - Eine Einführung für Chemiker, Biologen und Pharmazeuten*, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, München, **2005**.
- [538] *Glucuronic acid Free and Combined: Chemistry, Biochemistry, Pharmacology, and Medicine* (Ed.: G. Dutton), Academic Press Inc., New York, **1966**.
- [539] A. Mrhar, Z. Kopitar, F. Kozjek, V. Presl, R. Karba, *Int. J. Clin. Pharmacol. Biopharm.* **1979**, *17*, 476-481.
- [540] E. Bergogne-Berezin, G. Berthelot, C. Muller-Serieys, *Pathol. Biol.* **1987**, *35*, 873-878.
-

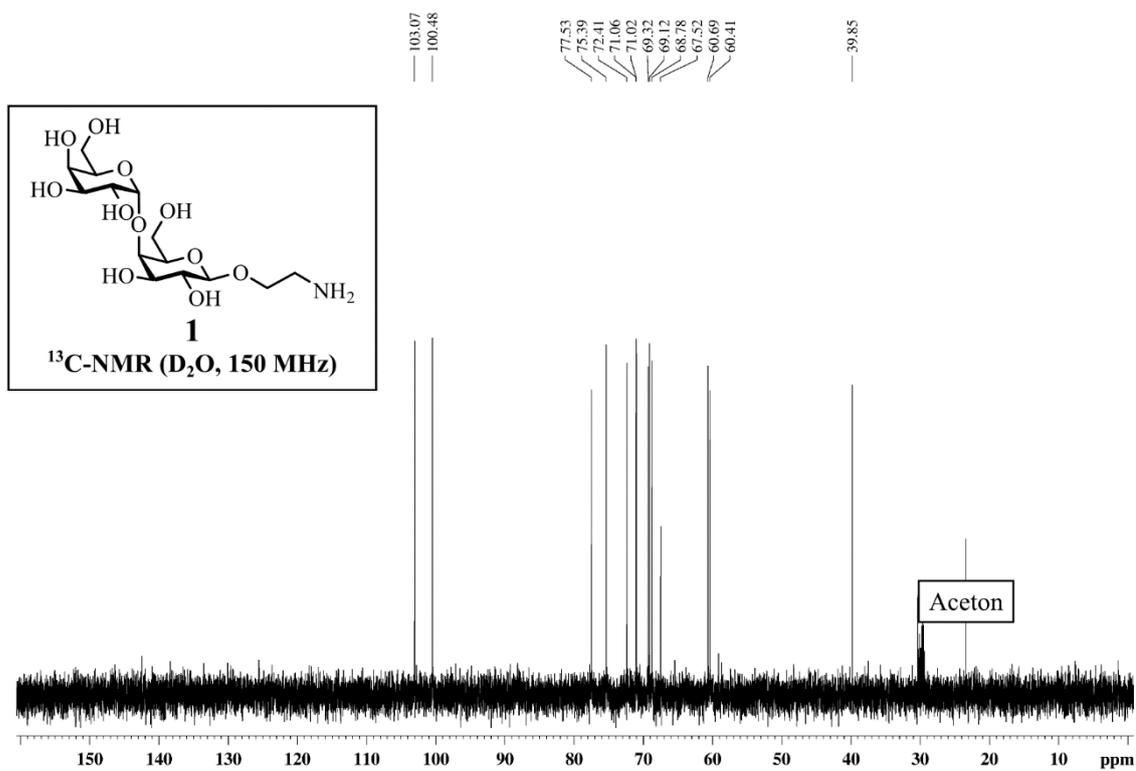
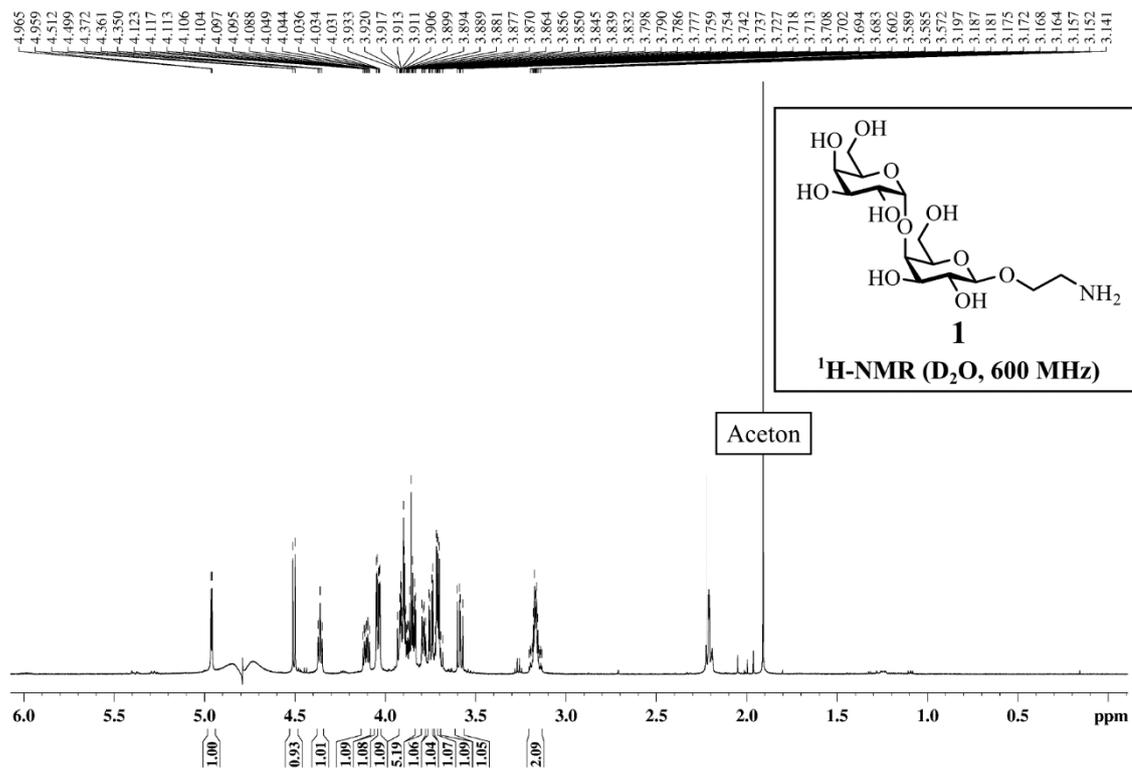
- [541] R. H. A. Sorel, C. Snelleman, A. Hulshoff, *J. Chromatogr. B* **1981**, 222, 241-248.
- [542] F. M. E. Wagenlehner, F. Münch, A. Pilatz, B. Bärmann, W. Weidner, C. M. Wagenlehner, M. Straubinger, H. Blenk, W. Pfister, M. Kresken, K. G. Naber, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, 58, 713-721.
- [543] D. Milivojevic, I. Perkavac, V. Presl, *Kem. Ind.* **1975**, 24, 359-361.
- [544] F. Schmidt, C. Monneret, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2002**, 1302-1308.
- [545] P. K. Mandal, L. Cattiaux, D. Bensimon, J. M. Mallet, *Carbohydr. Res.* **2012**, 358, 40-46.
- [546] R. Lucas, D. Alcantara, J. C. Morales, *Carbohydr. Res.* **2009**, 344, 1340-1346.
- [547] B. T. Burlingham, L. M. Pratt, E. R. Davidson, V. J. Shiner, Jr., J. Fong, T. S. Widlanski, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 13036-13037.
- [548] E. Denehy, J. M. White, S. J. Williams, *Chem. Commun.* **2006**, 314-316.
- [549] H. Jiang, J. E. Taggart, X. Zhang, D. M. Benbrook, S. E. Lind, W.-Q. Ding, *Cancer Lett.* **2011**, 312, 11-17.
- [550] J. S. Shim, Y. Matsui, S. Bhat, B. A. Nacev, J. Xu, H. C. Bhang, S. Dhara, K. C. Han, C. R. Chong, M. G. Pomper, A. So, J. O. Liu, *J. Natl. Cancer Inst.* **2010**, 102, 1855-1873.
- [551] S. Bhat, J. S. Shim, F. Zhang, C. R. Chong, J. O. Liu, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, 10, 2979-2992.
- [552] E. Memmel, A. Homann, T. A. Oelschlaeger, J. Seibel, *Chem. Commun.* **2013**, 49, 7301-7303.
- [553] S. A. Allman, H. H. Jensen, B. Vijayakrishnan, J. A. Garnett, E. Leon, Y. Liu, D. C. Anthony, N. R. Sibson, T. Feizi, S. Matthews, B. G. Davis, *ChemBioChem* **2009**, 10, 2522-2529.
- [554] L. Grant, Y. Liu, K. E. Walsh, D. S. Walter, T. Gallagher, *Org. Lett.* **2002**, 4, 4623-4625.
- [555] J. Wu, Z. Guo, *Bioconjugate Chem.* **2006**, 17, 1537-1544.
- [556] SCHOTT GmbH, NEXTERION Slide H - Protein application (04/2009), http://www.schott.com/nexterion/english/download/protokoll_slide_h_protein_1_2.pdf (03.02.2015).
- [557] NEXTERION Slide P - Antibody array application (01/2011), http://www.schott.com/nexterion/english/download/protokoll_slide_p_protein_1_3.pdf (03.02.2015).

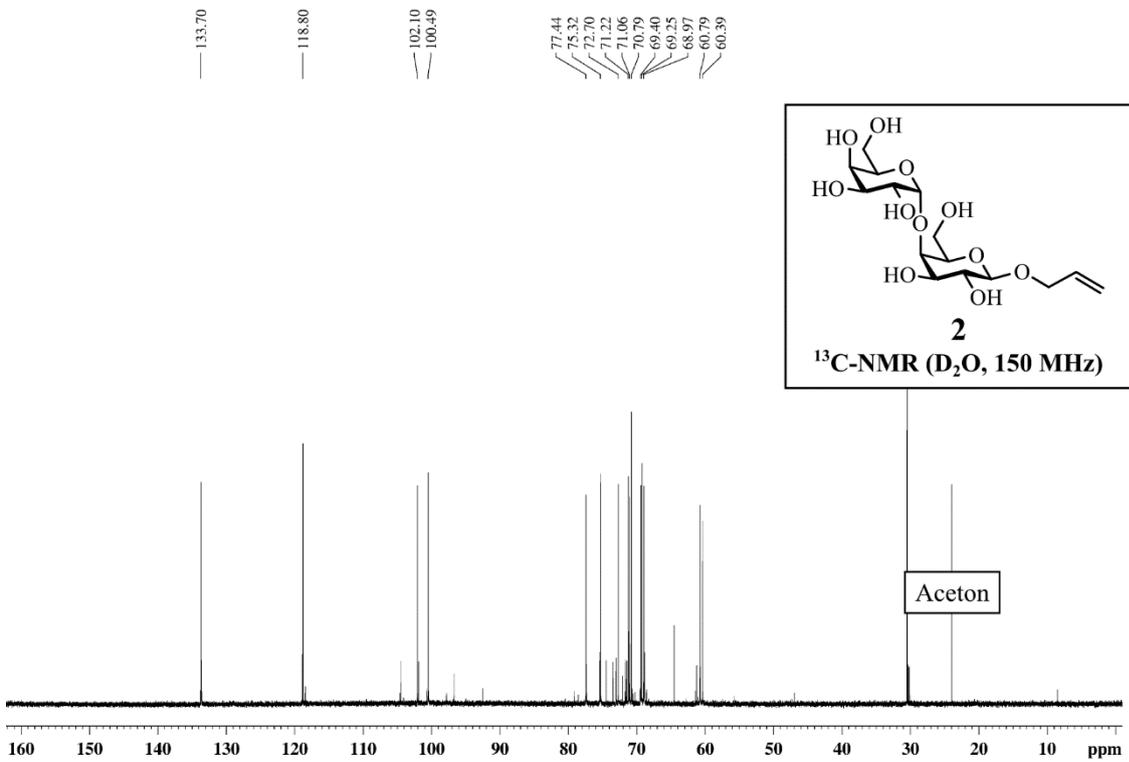
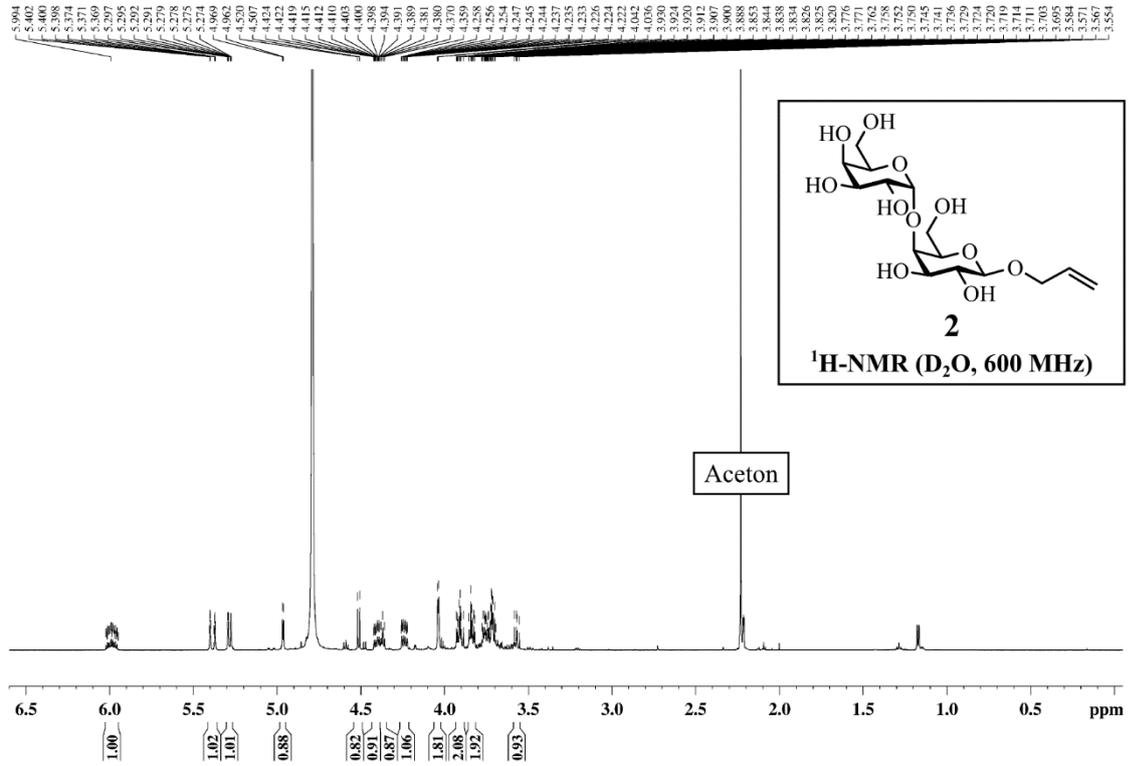
9 Anhang

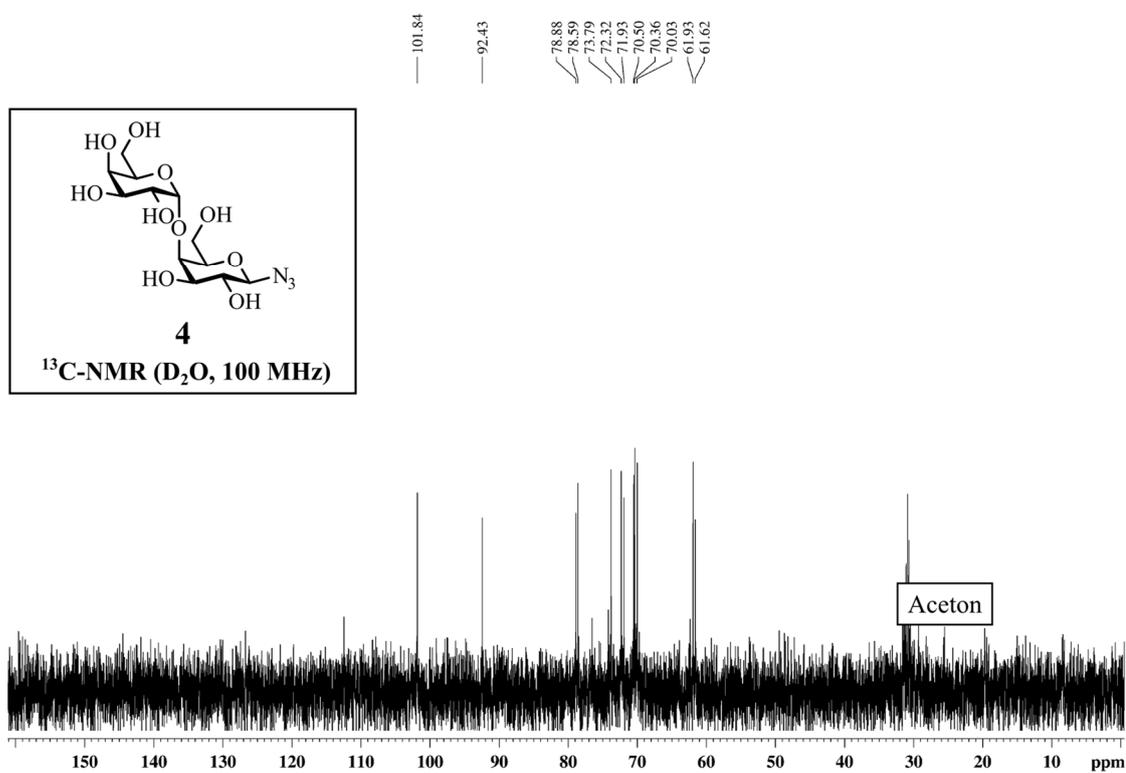
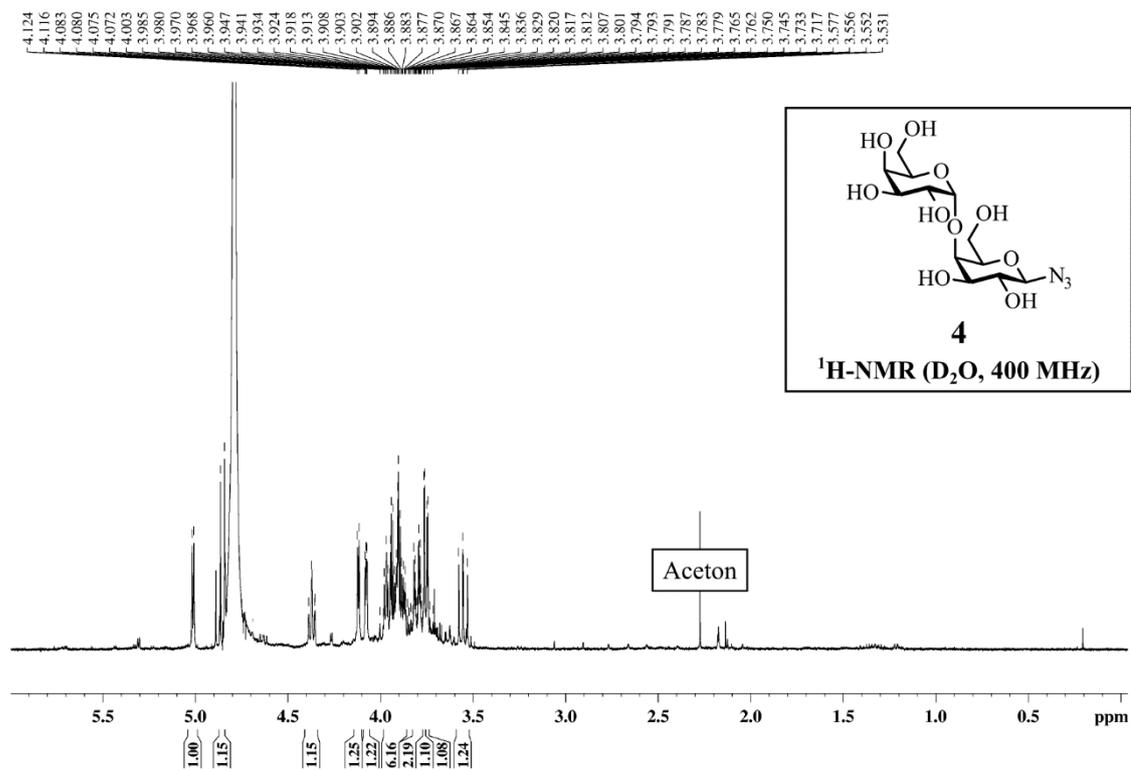
NMR-Spektren

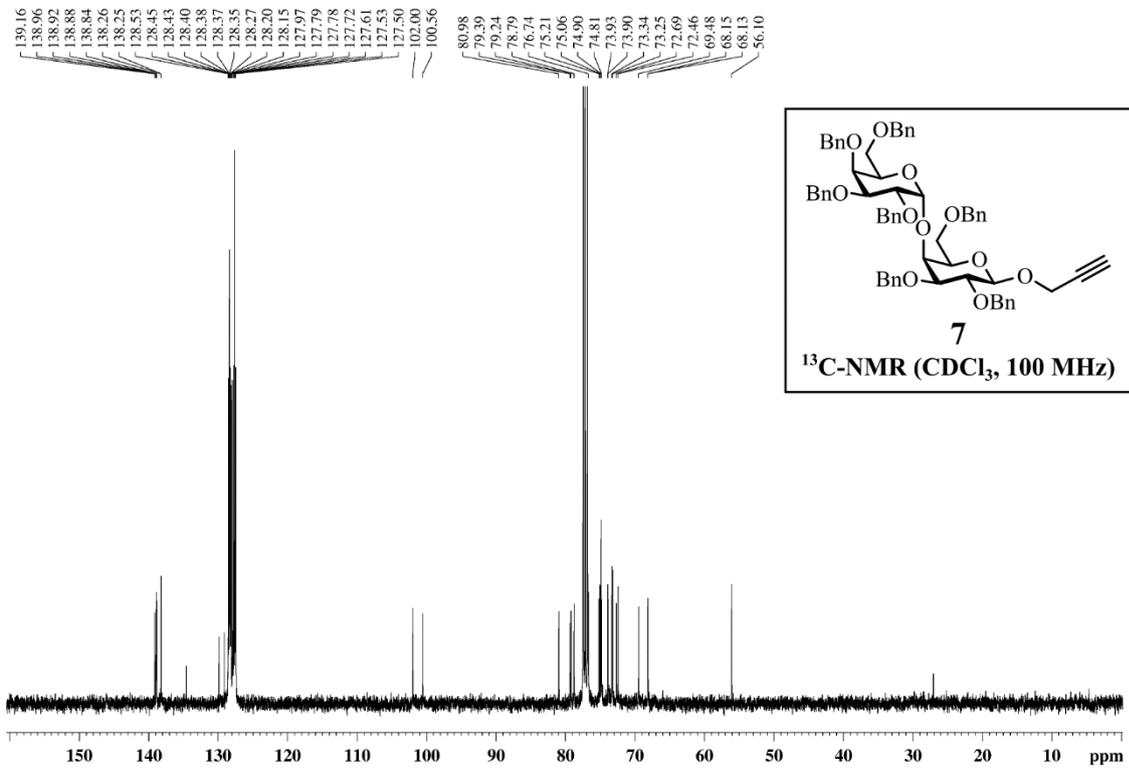
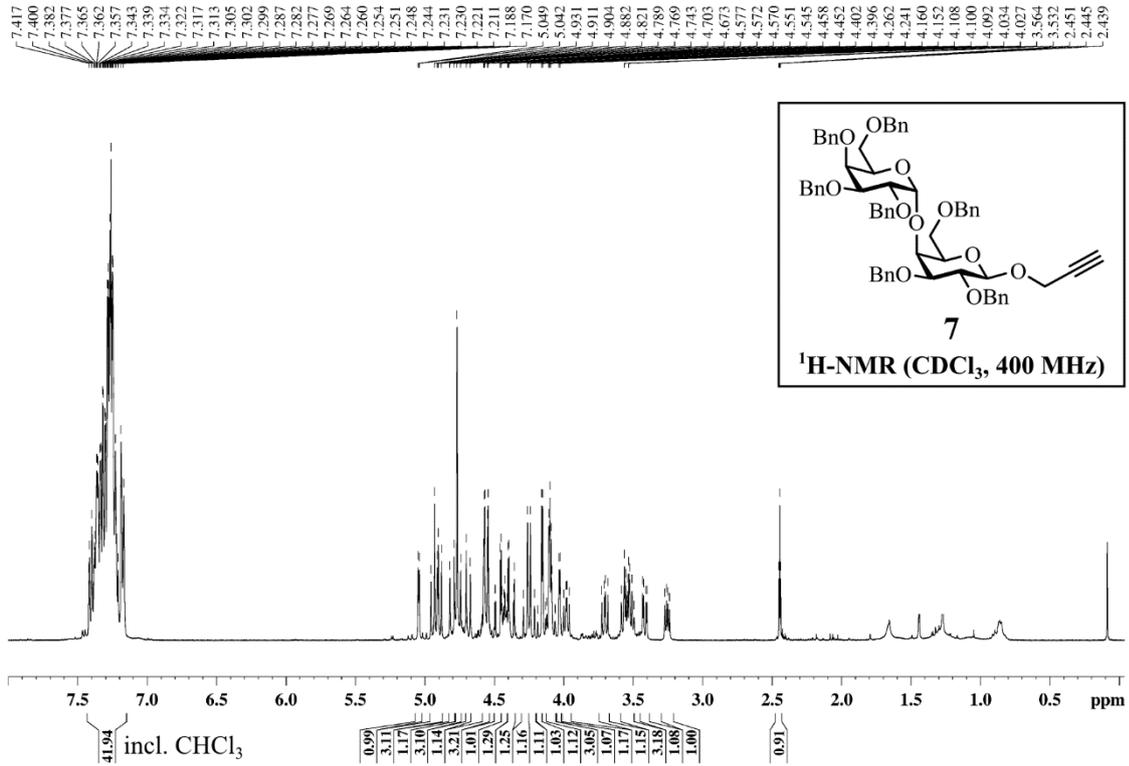


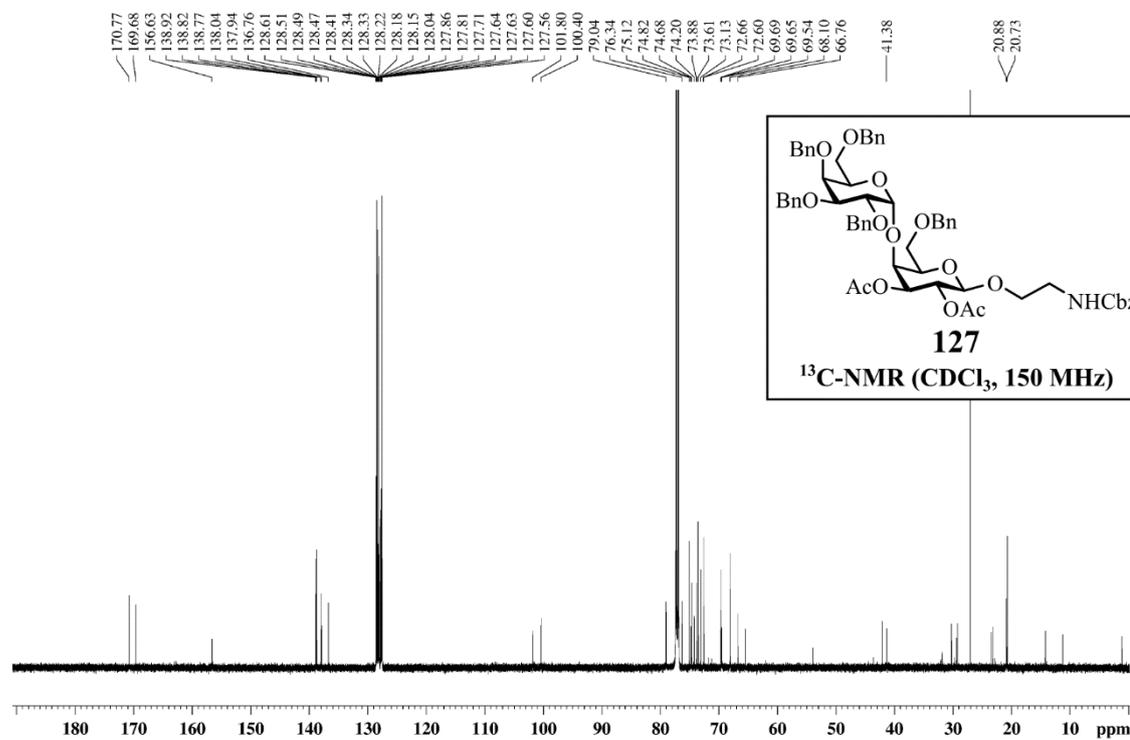
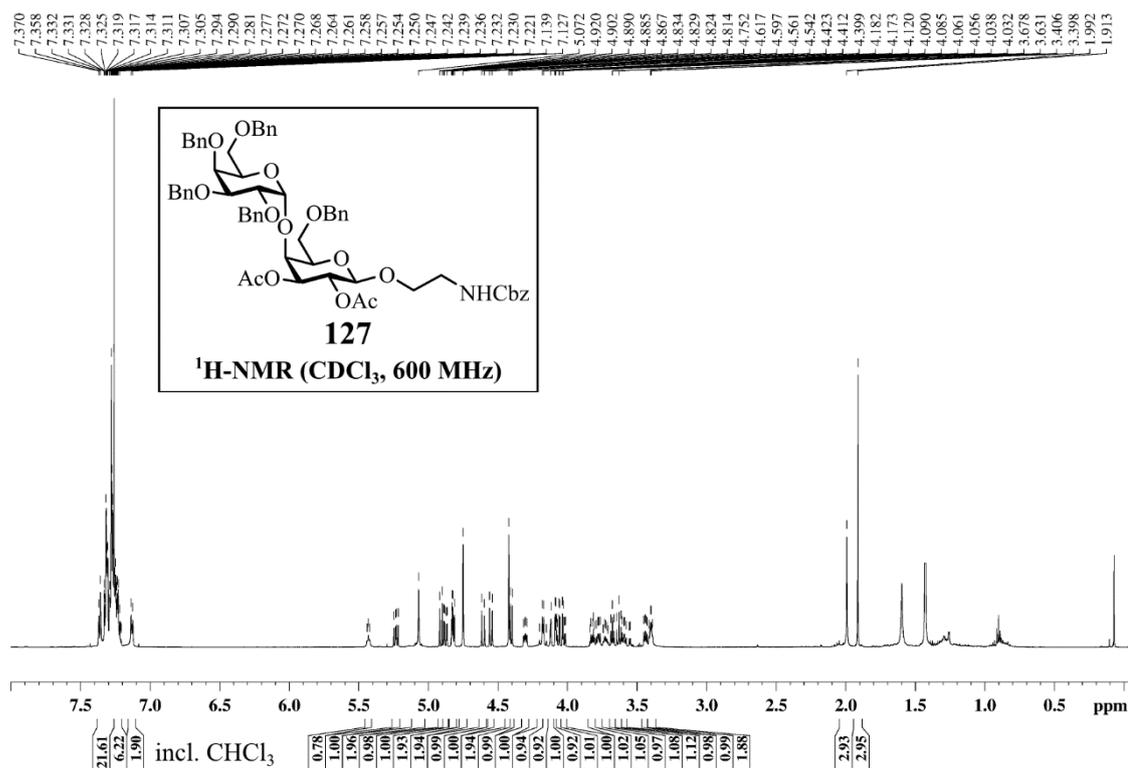


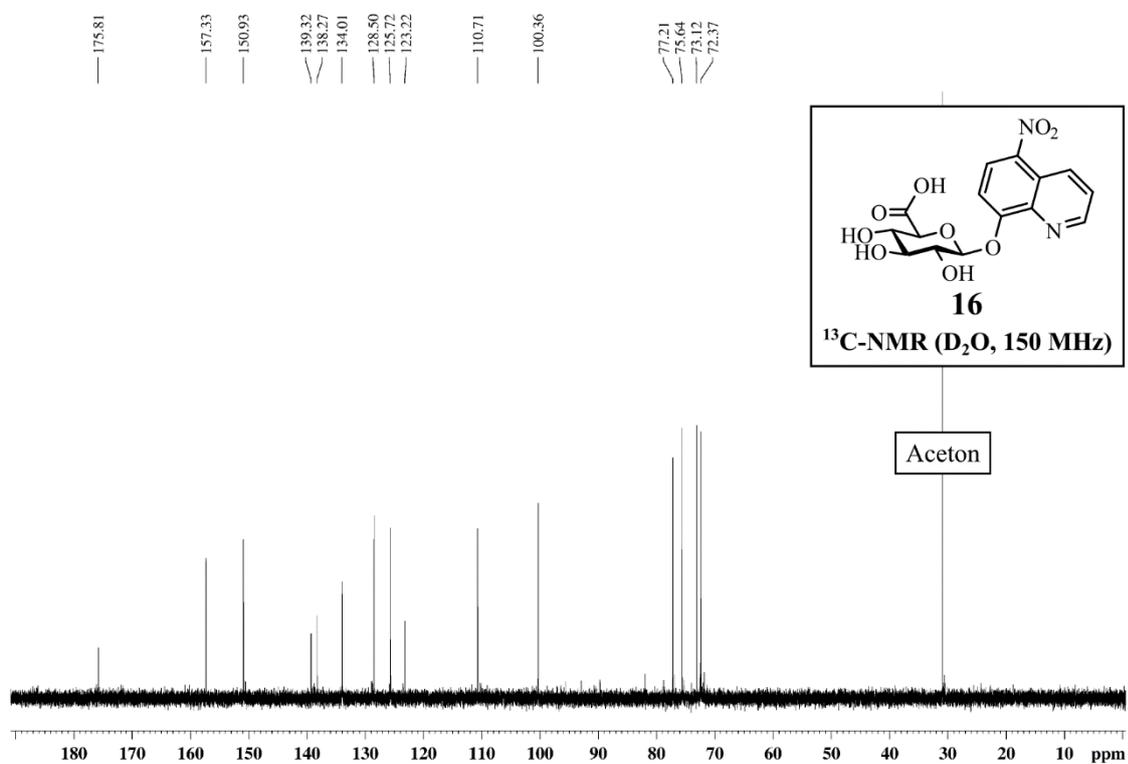
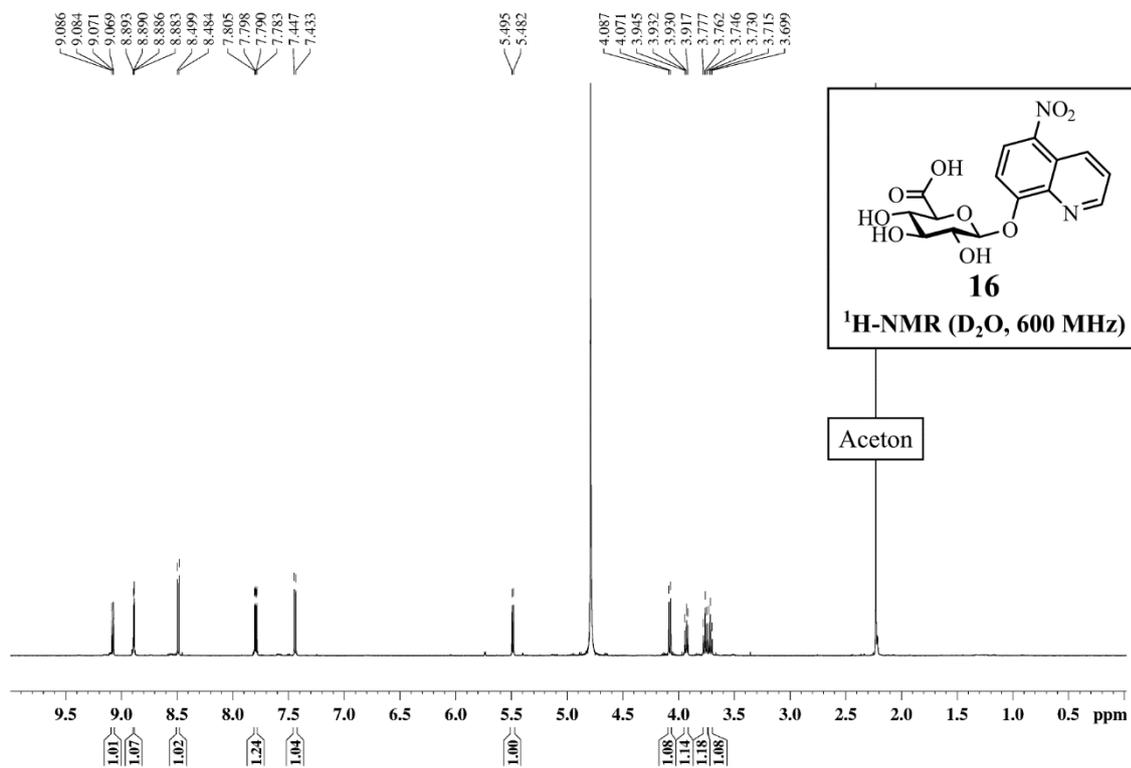


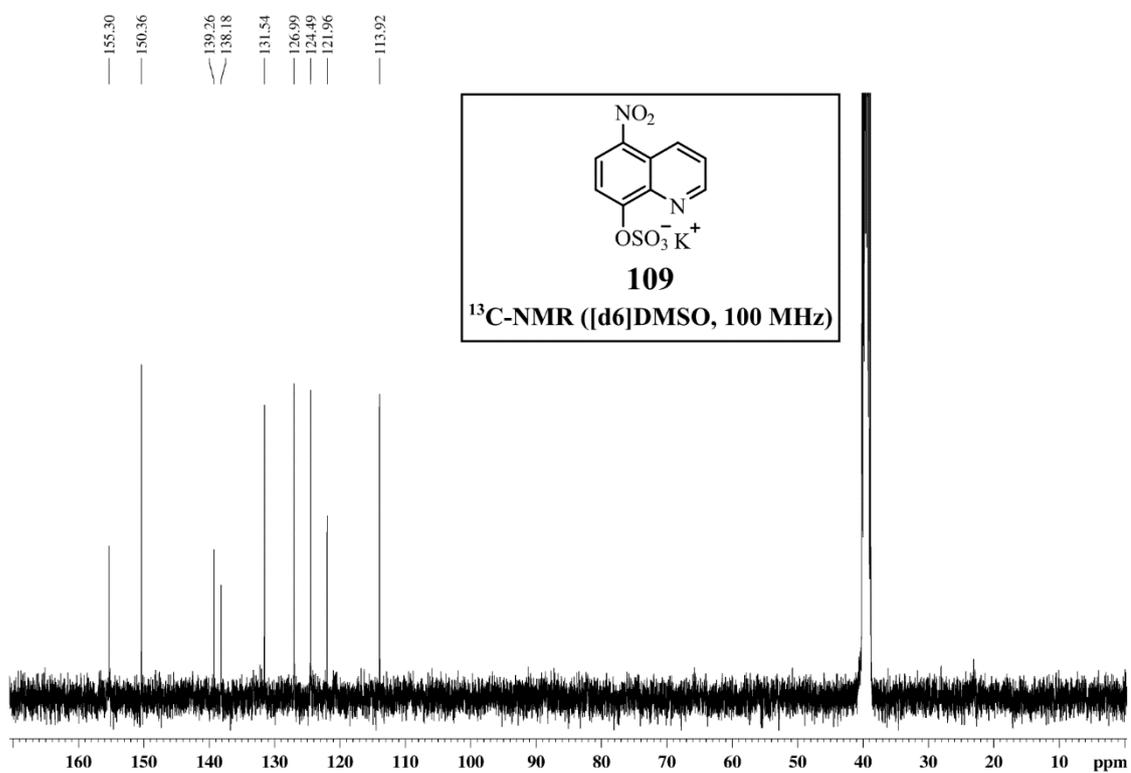
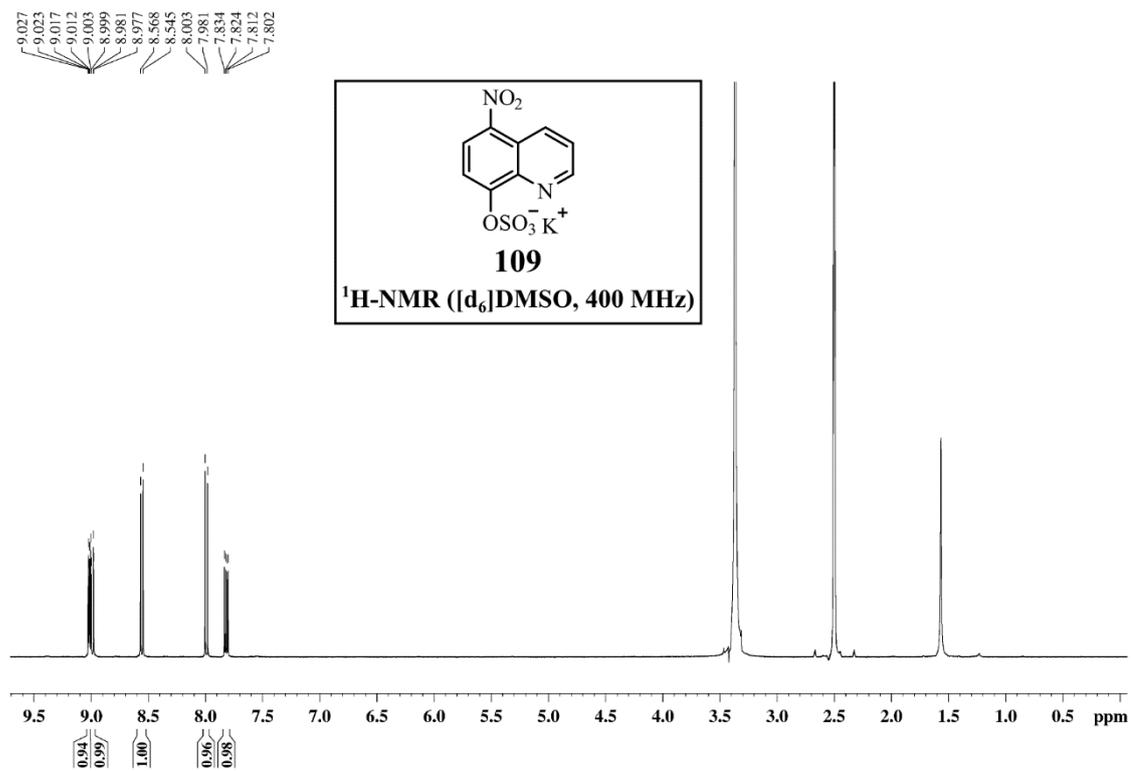












MALDI-Spektren

