



**Synthese komplexer funktionaler Mono- und Oligosaccharid-
Bausteine zur Untersuchung und Modifikation von
Membranoberflächen humaner mesenchymaler Stromazellen**

**Synthesis of complex functional mono- and oligosaccharide
components for the investigation and modification of membrane
surfaces of human mesenchymal stromal cells**

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

der Graduate School of Life Sciences,

Julius-Maximilians-Universität Würzburg,

Klasse: Biomedizin

Vorgelegt von

Jürgen Mut

aus

Krassiwoje

Würzburg 2023



Eingereicht am:

Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzende/r: Prof. Dr. Christoph Sotriffer

1. Betreuer: Prof. Dr. Jürgen Seibel

2. Betreuer: Prof. Dr. Regina Ebert

3. Betreuer: Prof. Dr. Stephan Gekle

Danksagung

Ich danke als erstes meinem Doktorvater Prof. Dr. Jürgen Seibel für die Aufnahme in sein Forschungsteam und die Möglichkeit im Verbund SFB TRR225 interdisziplinär zusammenzuarbeiten. Über die vielen Treffen auf Kloster Banz und durch die summer schools konnte ich mich mit den Professoren und anderen Doktoranden sowohl wissenschaftlich als auch privat gut austauschen. Ebenso danke ich Prof. Dr. Regina Ebert und Prof. Dr. Stephan Gekle für die Diskussionen und Ratschläge bei besagten Treffen.

Allgemein danke ich dem gesamten SFB-Team, vor allem Dr. Stephan Altmann, mit dem ich zusammen das Projekt B05 bearbeitet habe, und Natalia Wolf für ihre Fluoreszenzfarbstoffe. Prof. Dr. Ben Fabry und seinen Studenten Jennifer Elsterer und Konstantin Takors danke ich für die Messungen im mikrofluidischen Kanal. Jennifer Ritzer und Eva Hilpert waren bei organisatorischen Fragen und mit ein paar netten Worten immer für mich da.

Dr. Marc Drießen danke ich für die massenspektrometrischen Messungen der Zelllysate. Dr. Clemens Grimm danke ich für die Zusammenarbeit bei der Züchtung, Messung und Auswertung der Galectin-1 Kristalle. Prof. Dr. Lorenz Meinel danke ich für das problemlose Bereitstellen des ITC-Geräts. Zuletzt danke ich noch dem kompletten Erdgeschoss, besonders der Massen- und NMR-Abteilung, die meine Proben gemessen haben und bei Fragen diese kompetent beantworten konnten, und bei Christiana Toussaint, die mir keinen Wunsch abschlagen konnte. Der GSLS danke ich für die Aufnahme und Betreuung meiner Promotion.

Außerdem konnte Prof. Seibel, die GSLS und der SFB mir die Reise und Teilnahme an der NOS2022 in San Diego ermöglichen. Es war eine tolle Erfahrung für mich und dort konnte ich mehrere Nobelpreisträger treffen.

Besonderen Stellenwert bekommt für mich die Arbeitsgruppe, die vor allem in der Zeit während der Pandemie sehr zusammengehalten hat und wir uns gegenseitig moralisch unterstützen und helfen konnten. Mein ehemaliger Bachelorbetreuer Possi brachte mich 2016 erstmals in die Seibel-Gruppe. Von Julian Bechold konnte ich das Forschungsthema übernehmen und er konnte mich gut einarbeiten. Malte und Maria konnten mir im Biolabor immer weiterhelfen. Vor allem während des Schreibprozesses dieser Arbeit konnte Maria mir hervorragend mit Pymol helfen und war für lustige Gespräche offen. Christine hat mit mir nahezu zeitgleich die Promotion angefangen. Von ihrer zielstrebigem, motivierenden und organisierten Art konnte ich definitiv profitieren, weswegen wir uns harmonisch den Laborplatz teilen konnten. Zum Schreiben der Arbeit zogen wir auch nahezu zeitgleich aus dem Labor in den Schreibraum. Louises freundliche und manchmal trocken-lustige Art war stets eine Freude, auch Daniela war für lustige Momente zu haben. Beiden danke ich außerdem für die gemeinsame Teilnahme

am Eureka-Symposium und den häufigen Austausch von Abstracts und Postern. Sabine danke ich für den geteilten Druck bei misslungenen Synthesen und die Begeisterung zum Bouldern. Tobi ist immer ein angenehmer Gesprächspartner und für geistigen Austausch gerne zur Verfügung. Angela hat eine besondere Freude an vielen Events und ist ein herzenslieber Mensch, was den Laboralltag deutlich angenehmer gestaltete. Häufig wurde von ihr die Laborplaylist gestaltet und auf Wünsche der Kollegen geachtet. Diese wurden dann von Helmes ruiniert, der neben ein paar guten Songs auch nervtötende Lieder abspielt, die tagelang als Ohrwurm blieben. *Das geht von Kopf bis Fuß, von Kopf bis Fuß; AHAHAHAH.* Der vegane Daniel hat auch täglich versucht aus mir einen besseren Menschen zu machen, was ihm teilweise bestimmt gelungen ist. Nicht nur Kollege, sondern auch Grill- und Sportkumpel ist der gute Jonas. Durch ihn haben wir viele Interessen neben der Arbeit austauschen können, wie gemeinsames Radfahren, Schwimmen und exzessives Pumpen. Durch ihn bin ich in den Genuss des Wasserskis gekommen. Zuletzt erwähne ich hier noch unser neuestes Mitglied Marcel. Kennengelernt haben wir uns 2019 als er bei mir Bachelorarbeit machen wollte. Trotz seiner Unerfahrenheit und Naivität erfüllte seine Arbeit und sein Wesen mich mit Stolz. Wiedergesehen habe ich das kleine Küken ein Jahr später im Masterpraktikum. Zur Masterarbeit kam er wieder in die unsere Gruppe und übernahm anschließend sogar meine frei gewordene Forschungsstelle vom SFB. Ich werde immer sentimental, wenn Ich daran denke wie schnell sie doch Groß werden. Insgesamt danke ich euch allen für die tolle Zeit.

Schuld am Gelingen dieser Arbeit sind auch meine Praktikanten. Dazu danke ich in zeitlich chronologischer Reihenfolge für die synthetischen Arbeiten: Victoria Müller, Tanja Knuplez, Paul Runge, Roland Graf, Manuel Buckel, Bene Schaed, Adrian Graef (BA) und Melanie Riethmann.

Ich danke herzlich meiner Familie, meinen Eltern, die mich mental und finanziell im Studium unterstützt haben. Meinen Brüdern für die gute Zeit. Vor allem Eugen konnte mich bei Problemen gut beraten und mir alternative Denkansätze präsentieren. Alle möglichen Freunde, die mich auch durchs Studium und durch die Promotion begleitet haben. Herauspicken möchte ich hier Joni und Markus (dadurch auch Lena) für die schöne Zeit, aber auch Sara und Chris für die Fahrrad/Weintouren. Durch den SFB kennengelernt habe ich auch David, er ist einfach ein Sonnenschein. Alex und Kathi danke ich für den Kaninchenaustausch und das gegenseitige Vertrauen. Natürlich danke ich auch Vroni, meine Inspiration und Muse, die mich jeden Tag unterstützt und mit der ich am allerliebsten meine Freizeit verbringe. Tägliche Freuden sind meine zwei zuckersüßen Kaninchen, die täglich auf meine Heimkehr warten und teilweise auch die Funktion des morgendlichen Weckers ersetzen.

Inhalt

1	Einleitung	1
2	Kenntnisstand	3
2.1	Künstliche Gewebezüchtung und Biofabrikation.....	3
2.2	Saccharide	8
2.2.1	Glycosphingolipide	9
2.2.2	Glycoproteine	11
2.3	Metabolic glycoengineering	18
2.3.1	Prinzip von metabolic glycoengineering.....	18
2.3.2	Massenspektrometrie von Glycoproteinen.....	20
2.4	Click-Chemie.....	22
2.4.1	Staudinger-Reaktion.....	23
2.4.2	Copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition.....	24
2.4.3	Strain-promoted azide-alkyne cycloaddition	25
2.4.4	Inverse electron demand Diels-Alder reaction	25
2.5	Glycan-bindende Proteine	27
2.5.1	Galectine	28
2.5.2	Design eines spezifischen Liganden für Galectin-1	29
3	Motivation.....	33
4	Ergebnisse und Diskussion	35
4.1	Metabolic glycoengineering	35
4.1.1	Synthese von Monosacchariden	35
4.1.2	Glycoengineering mit nicht acetylierten Sialinsäuren.....	45
4.1.3	Glycoproteomics	48
4.2	Galectin-1.....	53
4.2.1	LacNAc-Analoga als Galectin-1 Liganden	53
4.2.2	Fluorsubstituierte, aromatische Galectin-1 Liganden	56
4.2.3	Kristallographie und isotherme Titrationskalorimetrie	62
4.2.4	Erweiterung des Galectin-Liganden.....	69
4.3	Oligosaccharide	82

4.4	Messung der Steifigkeit von Zellen nach metabolic glycoengineering.....	87
5	Zusammenfassung.....	91
6	Summary.....	99
7	Experimentalteil.....	107
7.1	Allgemeine Arbeitstechniken	107
7.1.1	Geräte	107
7.1.2	Chemikalien	108
7.2	Synthesen	110
7.2.1	Allgemeine Versuchsvorschriften	110
7.2.2	Synthese von Mannosamin-Derivaten.....	112
7.2.3	Synthese von Sialinsäure-Derivaten.....	116
7.2.4	Alternative durchgeführte Synthese von SiaNAz 8b	126
7.2.5	Synthese des LacNAc-Derivats 5	129
7.2.6	Synthese der Gal-1 Liganden.....	138
7.2.7	Synthese von Azido-funktionalisierten Gal-1 Liganden.....	170
7.2.8	Synthese von Azido-funktionalisierten Oligosacchariden.....	187
7.3	Biochemische Arbeiten.....	193
7.3.1	Züchtung der Galectin-1 Kristalle	193
7.3.2	ITC-Messungen.....	194
7.3.3	Isolierung der Glycopeptide für die LC-MS/MS.....	195
8	Literaturverzeichnis	197
9	Anhang.....	207

Überblick

Bei der Biofabrikation werden Zellen mit einem Biomaterial versetzt (vereint werden diese als Biotinte definiert) und durch additive Fertigungsmethoden wie dem 3D-Druck zu hierarchischen Strukturen aufgebaut. Zur Herstellung von künstlichen Gewebe und zukünftig auch von funktionalen Organen ist ein detailliertes Zellverständnis essentiell. Im Rahmen dieser Dissertation wurden Systeme generiert, um die Zellmembranen von mesenchymalen Stromazellen gezielt zu verändern und um die Modifikationen zu charakterisieren. Durch Inkubation mit unnatürlichen Zuckern werden diese von Zellen aufgenommen und in den Zellmetabolismus eingeschleust und auf die Glycoproteine übertragen. Diese Methode ist als *metabolic glycoengineering* bekannt.

Dazu wurden diverse humane Saccharid-Analoga mit bioorthogonalen Gruppen (Azid oder Alkin) synthetisiert. Alle in dieser Arbeit vorgestellten Moleküle wurden NMR-spektroskopisch als auch massenspektrometrisch charakterisiert.

Die acetylierten Mannosamin-Derivate konnten über zwei Stufen und die Sialinsäure-Derivate über sechs Stufen synthetisiert werden. Sialinsäuren sind die terminalen Zucker an Glycanketten von Proteinen mit wichtigen biologischen Funktionen. Im Rahmen des SFB TRR225 konnte in Kooperation mit der Gruppe von *Prof. Dr. R. Ebert* der Einbau der Saccharide in mesenchymalen Stromazellen durch Fluoreszenzmikroskopie evaluiert werden. Aufgrund des effizienteren Einbaus der Sialinsäure mit Alkingruppe gegenüber der mit Azidgruppe, wurde dieser in den folgenden massenspektrometrischen Analysen eingesetzt. Die Messungen der markierten Glycoproteine wurden von *Dr. Marc Driessen* durchgeführt und der metabolische Einbau von SiaNAI und Ac₄ManNAI in den Stromazellen gegenübergestellt. 55 Glycoproteine konnten durch SiaNAI und 94 durch Ac₄ManNAI charakterisiert werden. Ein Abgleich der Proteindatenbanken eine Anreicherung von Proteine durch Fütterung von SiaNAI die in Signaltransduktion, Zellkontakte und Differenzierung involviert sind, womit *metabolic glycoengineering* prinzipiell zur Optimierung von Biofabrikationsprozessen genutzt werden kann.

Diese Hypothese wurde weiterhin untersucht, indem die Zellsteifigkeit und damit korrelierenden Schutz vor Scherstress von metabolisch modifizierten Zellen zusammen mit der Gruppe von *Prof. Dr. B. Fabry* gemessen wurden. Die Ergebnisse wiesen eine tendenzielle Steigerung auf, jedoch konnten die Ergebnisse nicht reproduziert werden. Dies könnte durch eine Optimierung der Versuchsbedingungen behoben werden. Als Modifikation der Zellmembranen wurden hier ein Galectin-1 Liganden verwendet.

Dazu wurden diverse Galectin-1 Liganden auf Basis von Lactosamin dargestellt. Ein clickbarer Disaccharid, das zusätzlich eine Doppelbindung für spätere Erweiterungen trägt, fungiert dabei

als Grundbaustein (12 Stufen). Dieser wurde mit fluorsubstituierten, aromatischen Aziden (sechs Moleküle, jeweils sechs Stufen) oder Azide mit kleinem Rest (zwei Moleküle, jeweils zwei Stufen) umgesetzt. Röntgenkristallstrukturen von Galectin-1 mit den Liganden wurden zusammen mit *Dr. Clemens Grimm* gemessen und zeigten für die fluorierten Liganden nur partielle Elektronendichten, aber vollständige Elektronendichten für die Liganden mit kurzem Rest (PDB-ID: 8B0Z und 8B0W). Die Dissoziationskonstanten wurden durch isotherme Titrationskalorimetrie bestimmt und sind in der Größenordnung des natürlichen Liganden Lactosamin ($K_D(\text{LacNAc}) = 91 \mu\text{M}$). Die zusätzlichen Wechselwirkungen zwischen Ligand und Protein steigern die Enthalpie ΔH , werden jedoch durch verdrängtes Wasser und dem verbundenen Verlust der Entropie ΔS kompensiert.

Anschließend sollten die Galectin-1 Liganden für das *glycoengineering* durch die Einführung einer weiteren Azidgruppe angepasst werden, damit diese kovalent an die Zellmembran gebunden werden können (nach Fütterung mit Alkinzuckern). Dazu wurde einmal über fünf Stufen ein Azido-Tetrazin dargestellt, das eine orthogonale Cycloaddition mit den zuvor dargestellten Liganden an der Doppelbindung eingeht. Ein fluorsubstituierter, aromatischer Ligand wurde somit erweitert (zwei Stufen) und für die bereits erwähnten Messungen zur Zellsteifigkeit zur Verfügung gestellt. Eine weitere Modifikation der Galectin-1 Liganden ist, die Erweiterung mit einer Azidgruppe und gleichzeitig der Einführung eines Fluorophors. Dazu wurde eine orthogonale Syntheseroute entwickelt, die über das Biomolekül Lysin diese drei Eigenschaften vereint (sieben Stufen). Als Fluorophor wurde das kleine Molekül „Pacific Blue“ ausgewählt.

Zuletzt wurden ebenfalls als mögliche Derivate für metabolisch veränderte Zellen Azid-funktionalisierte Oligosaccharide (insgesamt sechs Reaktionsstufen, zwei Trisaccharide, ein Tetrasaccharid) zusammen mit *Dr. Maria Ortiz-Soto* hergestellt. Die Variationen der Glycosylierungsmotive an den Glycoproteinen erlauben eine Vielzahl spezifischer Interaktionen zwischen Proteinen und den Glycobindungspartnern, was sich wiederum auf das Zellverhalten auswirkt.

Insgesamt konnten in dieser Arbeit diverse humane Saccharid-Analoga synthetisiert und die Moleküle hinsichtlich ihrer Struktur und der biologischen Wirkung charakterisiert werden.

Overview

In the field of biofabrication, cells are mixed with biomaterials (forming bioinks) to produce hierarchical structures using additive manufacturing such as 3D printing. A detailed understanding of cells is crucial for the production of artificial tissue and, in the future, also of functional organs. In this work, systems were generated to specifically modify the cell membranes of mesenchymal stromal cells. Unnatural saccharides are introduced into the cell metabolism during incubation and transferred onto extra- and intracellular glycoproteins. This method is known as metabolic glycoengineering. For this purpose, various human saccharide analogues with a bioorthogonal group (azide or alkyne) were synthesised. All molecules presented in this work were characterised by NMR spectroscopy and mass spectrometry.

Acetylated mannosamine and sialic acid derivatives were synthesised over two and six steps, respectively. Sialic acid is the terminal saccharide in complex glycan chains of proteins and mediates biological functions. The incorporation of the synthetic saccharides in mesenchymal stromal cells were evaluated by fluorescence microscopy in cooperation with the research group of *Prof. Dr. R. Ebert* (within the framework SFB TRR225). The alkyne variant displayed a more efficient incorporation and was chosen for the following mass spectrometric analysis. Therefore, lysates from stromal cells incubated with SiaNAI or Ac₄ManNAI were measured by *Dr. Marc Driessen*. 55 and 94 glycoproteins were identified using SiaNAI and Ac₄ManNAI, respectively. A comparison of protein databases indicated an enrichment for SiaNAI labelled proteins involved in signal transduction, cell junction and differentiation and thus metabolic glycoengineering can be used to optimize biofabrication processes.

This hypothesis was also investigated by measuring the cell stiffness and the correlating protection from shear stress of modified cells with the research group of *Prof. Dr. B. Fabry*. These experiments showed a tendency to increase the stiffness, but the results could not be reproduced. A synthetic galectin-1 ligand was used as modification of the cell membrane.

For this a bifunctionalised disaccharide (12 steps) was synthesised and expanded with six fluoraromatic azides (each six steps) and two azides with short chains (each two steps). In cooperation with *Dr. Clemens Grimm* galectin-1 crystals soaked with the ligands were measured and evaluated. A complete electron density for the truncated variants (PDB-ID: 8B0Z und 8B0W). To finally enable covalent coupling to the cell membrane (after incubating cells with alkyne sugars) the ligands were further reacted in an orthogonal cycloaddition with an azido tetrazine (7 steps overall). In another synthetic route the ligand was combined with a fluorophore for visualisation (pacific blue) with the azide in the side chain (seven steps).

In total, various human saccharide analogues were synthesised and were characterised in this work with regard to their structure and biological effect.

1 Einleitung

Knapp 40 % der Deutschen besaßen im Jahr 2020 einen Organspendeausweis, der beim Eintreten eines Todesfalls den Ärzten erlaubt, Organe zu entnehmen und diese einem anderen Patienten zu transplantieren.^[1] Aufgrund bestimmter Voraussetzungen sind Organspenden verhältnismäßig selten. Erst beim seltenen Fall eines Hirntodes kann der Patient als Spender in Betracht gezogen werden. Dabei müssen die restlichen Organe bis zur Operation mit Nährstoffen und Sauerstoff durch künstliche Herz-Kreislaufsysteme versorgt werden.^[2] Hirnblutungen oder Hirnschäden sind die häufigsten Todesursachen (51.3 % und 23.4 %) von Organspendern.^[3] Außerdem muss der Spender gesund sein und viele Infektionen oder Krebserkrankungen verhindern eine sichere Übertragung des gefragten Organs.^[4]

Beispielsweise wurden im Jahr 2021 in Deutschland 1992 Nieren transplantiert, während 6593 Patienten auf eine Niere warten. Durch den fortlaufenden medizinischen Fortschritt sind ein Jahr nach der Spende 88 % und nach fünf Jahren 75 % der Nieren an den Körper des Empfängers angepasst.^[5]

Eine Lösung zur Deckung des hohen Bedarfs an Spenderorganen bietet der Ansatz der regenerativen Medizin. Ziel ist es, künstliche Organe und Gewebe zu erzeugen und benötigte Materialien auf ihre Bioverträglichkeit zu testen. So wurde im Jahr 1997 ein Polymerkonstrukt in Form eines menschlichen Ohres mit Chondrozyten (Knorpelzellen) besiedelt und 12 Wochen unter der Haut einer Maus inkubiert. Die Neubildung von Knorpel wurde beobachtet, jedoch war dieses Ohr nicht funktional, womit es letztlich nur eine Ansammlung von Zellen in der Form eines menschlichen Ohres war.^[6]

In einem weiter entwickelten Beispiel wurde einem Patienten ein künstlicher Kieferknochen hergestellt und eingesetzt. Dem Mann wurde der Unterkiefer aufgrund einer Krebserkrankung entfernt. Acht Jahre später wurde von *Wanke et al.* der fehlende Kieferknochen künstlich ersetzt. Dazu wurde ein Titannetz mit Knochenmineralien, einem Wachstumsfaktor (*bone morphogenic protein 7*) und Kollagen I befüllt. Schließlich wurde noch Knochenmark des Patienten zugegeben, dessen Stammzellen durch die Anwesenheit des Wachstumsfaktors in Knochenzellen differenzieren.^[7] Auch wenn die chemische Zusammensetzung des Gemisches nahezu mit dem eines natürlichen Knochens übereinstimmt, muss dieses zuerst reifen und die Zellen mineralisieren, um schließlich als Knochenersatz zu fungieren. Dieses wurde dem Patienten selber für sieben Wochen in den Rücken (*latissimus dorsi*) eingesetzt, wo dieses mit Blut und Nährstoffen versorgt wurde. Während den Operationen und der Reifung im Rücken des Patienten wurden keine Infektionen oder andere Komplikationen festgestellt. Das gereifte Gebilde wurde zusammen mit einem Teil des Muskels für die Blutversorgung an den

Unterkiefer angebracht. Nach knapp zwei Wochen konnte weiterhin Knochenbildung und Mineralisierung beobachtet werden. Vier Wochen nach der Montur des künstlichen Unterkiefers konnte der Patient seit neun Jahren seine erste feste Mahlzeit, trotz fehlender Zähne an der Unterseite, genießen.^[8]

Dieses Beispiel zeigt grundlegende Vorgehen, die analog zu den Prozessen im folgenden Kapitel beschriebenen Biofabrikation angewendet werden (**Schema 1**). Die Schlüsselschritte sind die Entnahme von humanen Zellen (Stammzellen), Vermischung mit einem biokompatiblen Material (Knochenmark, Kollagen I und ein Wachstumsfaktor), Nachreifung sowie Versorgung mit Nährstoffen (siebenwöchige Einlagerung in den Rücken) und schließlich der Einsatz in den Patienten (Montur des künstlichen Knochens an den fehlenden Unterkiefer).

2 Kenntnisstand

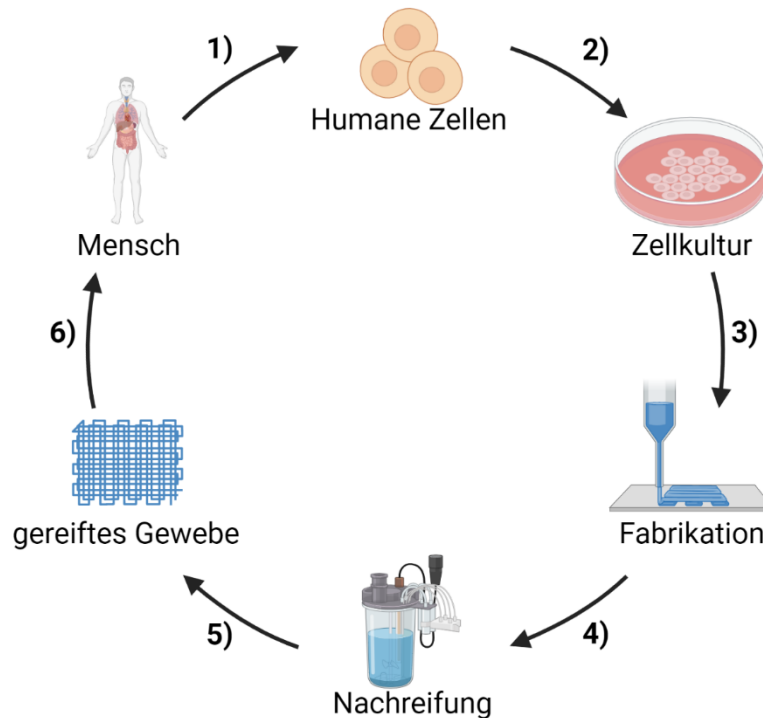
2.1 Künstliche Gewebezüchtung und Biofabrikation

Gewebezüchtung und regenerative Medizin (eng. *tissue engineering and regenerative medicine*, TERM) arbeitet an einer Lösung, um künstliche Organe zu erzeugen. Unter diesem Begriff werden mehrere Disziplinen vereint, unter anderem die Stammzellforschung, Nanotechnologie, funktionale Gerüstmaterialien und additive Fertigung.^[9] Ziel dieser Forschung ist fehlendes oder beschädigtes Körpergewebe zu ersetzen.^[10]

Gewebe bestehen aus mehreren Zelltypen und aus extrazellulärer Matrix (ECM), die meistens mit einem neuronalen Netzwerk durchwachsen und vaskularisiert (mit Blutgefäßen versorgt) sind.^[11] Die klassische Gewebezüchtung, bei der ein vorgefertigtes Gerüst mit Zellen besiedelt wird, ist nicht in der Lage, die Zellen gezielt zu platzieren und somit hierarchische Gerüste und komplexe Mikrostrukturen zu erzeugen, weswegen die Methoden weiterentwickelt werden. Additive Fertigungsmethoden wie der 3D-Druck überwinden diese Probleme und sind durch das Drucken mehrerer Schichten (*multilayer*) mit diversen Zellen in der Lage, komplexe Mikro- und Makrostrukturen zu erzeugen (**Schema 1**).^[12]

Die Biofabrikation wird in drei Phasen unterteilt. Im ersten Schritt (*pre-processing*) muss die zukünftige Form des Konstrukts geplant und modelliert werden. Parallel dazu werden einem Patienten Zellen entnommen (**1**) und diese *in vitro* kultiviert (**2**). Hier eignen sich besonders Stammzellen mit der Fähigkeit in andere Zelltypen zu differenzieren. Bei ausreichend gewachsener Anzahl an Zellen werden diese mit einem Biomaterial vermischt (**3**). Wichtig ist die Unterscheidung der Begriffe Biomaterial-Tinten und Biotinten. Von Biomaterial-Tinten wird gesprochen wenn azelluläre Konstrukte danach mit Zellen besiedelt werden oder als Implantat fungieren, wohingegen Biotinten bereits vor dem Druck lebende Zellen enthalten.^[9] In der Verarbeitungsphase (*processing*) werden die Biotinten mit einem geeigneten 3D-Drucker in das gewünschte Gerüst gebracht (**4**). Hierfür werden häufig die Druckmethoden Tintenstrahldruck, Dispensdruck und laserinduzierter Vorwärtstransfer verwendet.^[12-13] Das frisch gebildete Gerüst enthält in der Regel eine verhältnismäßig geringe Zellzahl und muss noch zum fertigen Gewebe reifen (*post-processing*, **5**). Dazu werden beispielsweise *in vitro* Bioreaktoren verwendet, die in der Lage sind, das Gerüst aus Hydrogel und Zellen mit Nährstoffen zu versorgen. So können pH-Wert, Temperatur und Sauerstoffzufuhr genau kontrolliert und die natürliche Mikroumgebung des Gewebes simuliert werden. Zuletzt kann das gereifte Gewebe dem Patienten fehlende oder beschädigte Stellen ersetzen (**6**).^[12, 14] Weiterhin werden diese Gewebe ebenfalls für *in vitro* Studien und auch für Arzneimitteluntersuchungen verwendet.^[15] Eine Weiterentwicklung der herkömmlichen 2D-

und 3D- Zellkulturen stellt der sogenannte *organ-on-a-chip* dar. Dieses mikrofluidische Zellkulturgerät simuliert die Physiologie von Gewebe und Organen, das großes Potential für die Erforschung von Krankheitsursachen und Gewebeentwicklung mit sich bringt.^[16]



Schema 1: Prinzip von Biofabrikation. **1)** Entnahme von humanen Zellen aus einem Patienten. **2)** Vermehrung der Zellen. **3)** Vermischung zu einer 3D-Druck geeigneten Biotinte und Herstellung des Konstrukts. **4)** Nachreifung des fabrizierten Konstrukts, z.B. in einem Bioreaktor. **5)** Zersetzung des Biomaterials und Reifung zu einem Gewebe. **6)** Ersatz durch künstliches Gewebe an beschädigten oder fehlenden Stellen. Erstellt mit BioRender.com

Aufgrund der Zell-ECM-Wechselwirkung ist die Wahl der Biotinte entscheidend für die Proliferation der Zellen. Zusätzlich muss diese für den Druckprozess geeignet sein, um einerseits die hohe Überlebensrate der Zellen zu garantieren und anschließend ein formstabiles 3D-Konstrukt zu bilden.^[11] Bisher wurden diverse Biotinten aus natürlichen Proteinen oder komplexen Kohlenhydraten verwendet, die in der ECM der Zelle enthalten sind wie beispielsweise Hyaluronsäuren, Alginate oder Gelatine. Aber auch synthetische Polymere werden als Biotintmaterial verwendet und können oft leichter modifiziert und somit den gewünschten rheologischen Anforderungen angepasst werden. Eine Übersicht ausgewählter Biotinten ist in **Tabelle 1** dargestellt. Häufig werden auch Kombinationen aus mehreren Polymeren für den 3D-Druck verarbeitet. Beispielsweise konnte *Schmid et al.* zeigen, dass ein Gemisch aus Alginate (0.5 %), Hyaluronsäure (0.1 %) und Gelatine (3 %) die *in vitro* Tumorumgebung hervorragend imitiert. Weiterhin konnten Formstabilitäten der 3D-Modelle sowie mit bis zu 80 % hohe Überlebenszahlen der Zellen auch nach dem Druck garantiert werden.^[17]

2. Kenntnisstand

Tabelle 1: Verwendete Biomaterialien zur Anwendung am 3D-Druck.^[11-13] Monosaccharid-Einheiten sind D-Zucker, wenn nicht anders genannt.

Biotinten	Aufbau	Besonderheit
Polysaccharide		
Hyaluronsäure	Glycosaminoglycan (GAG) aus Glucuronsäure und <i>N</i> -Acetylglycosamin	bioabbaubar, hochgradig bioaktiv, enthält Adhäsionsmotive, beeinflusst Viskosität
Alginat	Monomereinheiten Mannuronsäure und Guluronsäure	biologisch inert, Gelierung mit Ca ²⁺
Agarose	Monomereinheiten Galactose und 3,6-Anhydro-L-galactopyranose	biologisch inert, bioabbaubar, beeinflusst Viskosität, Gelierung ist thermoreversibel
Gellan	Tetrasaccharid-Wiederholungseinheit aus zwei Glucose-, Glucuronsäure- und L-Rhamnose-Einheiten	bioabbaubar, beeinflusst Viskosität
Polypeptide		
Gelatine	denaturiertes Kollagen, hauptsächlich Gly-Pro-X (X für eine beliebige Aminosäure)	bioabbaubar, enthält Adhäsionsmotive, pH-abhängige Gewinnung bestimmt die Ladung
Kollagen	Gly-Pro-X (X für eine beliebige Aminosäure)	bioabbaubar, enthält Adhäsionsmotive, pH-abhängige Aggregation (<i>fibrillogenesis</i>)
Fibrinogen/Fibrin	Glycoprotein	bioabbaubar, enthält Adhäsionsmotive
Seide	verschiedene Peptide je nach Gewinnung (Spinnenseide oder Seidenspinner-Kokon)	bioabbaubar, wenig Adhäsionsmotive
Synthetische Materialien		
Polycaprolacton	(C ₅ H ₁₀ C(O)O) _n	bioabbaubar ^[18]
Polyethylenglycol	H(OCH ₂ -CH ₂) _n OH	biologisch inert
Plooxamer (Pluronic)	Triblock-Copolymer aus Poly(ethylenoxid)	biologisch inert, häufige Verwendung als Opfermaterial
ECM Gemische		
Matrigel	Proteine und Peptide, hauptsächlich Laminin und Collagen IV	bioabbaubar, hochgradig bioaktiv, enthält Adhäsionsmotive
dECM	dezellularisierte Matrix aus verschiedenen Gewebe	bioabbaubar, bioaktiv, enthält Adhäsionsmotive

Die Entwicklung der 3D-Druckmethoden und Hydrogele erweitert die Möglichkeiten für das Forschungsgebiet der regenerativen Medizin. Zur Herstellung von vollständig funktionsfähigen

Organen müssen noch limitierende Hindernisse wie die Versorgung des gedruckten Modells im Zentrum mit Sauerstoff und Nährstoffen überwunden werden.^[9] 3D-Biodruck ist nicht nur zur Herstellung von Ersatzgewebe und künstlichen Organen von Nutzen, sondern hilft auch erkrankte künstliche Modelle *in vitro* zu erforschen.^[15] Zur Veranschaulichung des Potentials und der Möglichkeiten sind in **Tabelle 2** gedruckte Gewebetypen beispielhaft zusammengefasst.

Tabelle 2: Beispiele für 3D gedrucktes Gewebe *in vitro*.

Gewebeart	Grundlegende Errungenschaften zur Erzeugung künstlicher Gewebe
Vaskuläres Gewebe	Generierung von Blutgefäßmodellen mit einer Wanddicke von 425 µm und einem Durchmesser von 1000 µm ^[19]
Nervengewebe	Optimierung eines Hydrogel-Gemisches aus Alginat, Fibrin, Hyaluronsäure zu hoher Zellviabilität und Proliferation von Schwann-Zellen nach dem Druck ^[20]
Hautgewebe	Beobachtete Proliferation und Migration von Zellen; ^[21-24] Nutzung von mehrschichtigen Konstrukten als Hautersatz zur Wundheilung ^[25-26]
Leber	Fortsetzung von biologischen Prozessen (Harnstoff- und Albumin-Produktion) bei primären humanen Hepatozyten und Sternzellen (<i>stellate cells</i>) ^[27]
Niere	Wachstum und Bildung von Gewebe durch Besiedelung eines makroporösen Gerüsts mit epithelialen Nierenzellen und Fibroblasten ^[28]
Muskel	Verwendung von dezellularisiertem Muskelgewebe vom Schwein; ^[29-30] Förderung der Zellorientierung und Myogenese durch Zugabe von Poly(lactide-co-glycolide) zum dECM-Hydrogel; ^[31] Muskelerneuerung im Rattenmodell ^[32]
Knorpel	Förderung der Proliferation und der Osteogenese bei MSC (Hasenknochen) durch gemischtes Hydrogel aus Polycaprolacton und selbst organisierenden Proteinen; ^[33] Luftröhrentransplantat im Rattenmodell nach Reifung von gedruckten Chondrozyten, ECs und MSCs in einem Bioreaktor ^[34]
Knochen	Knochenneubildung im Kaninchenmodell durch Einsatz eines gedruckten, porösen Gerüsts aus Magnesium, Poly(lactide-co-glycolide) und β -Tricalciumphosphat ^[35]
Herz	Organisierte Struktur mit einzigartigen biomechanischen Eigenschaften durch gedruckte Rattenkardiomyozyten in einem fibrinbasierten Hydrogel mit Gelatine (Opferhydrogel) und Polycaprolacton ^[36]

Das noch relativ junge Gebiet der Biofabrikation bietet viel Potential für die zukünftigen Forschungen und diverse Anwendungsmöglichkeiten für die regenerative Medizin.^[37] Limitiert ist die Methode beim Drucken von großen Konstrukten, die bei momentaner Geschwindigkeit bis zu Tagen dauern könnte. Aufgrund der Dauer ist eine ausreichende Zellviabilität nicht

2. Kenntnisstand

garantiert. Im Gegensatz dazu ist die Herstellung von kleinen Modellen unproblematisch, denn diese benötigen nur eine Zeitspanne zwischen einigen Minuten und Stunden. Von großer Wichtigkeit sind die Untersuchungen der Zell-Biomaterial- bzw. der Zell-Matrix-Interaktionen. Die Optimierung in Hinsicht auf Zellproliferation und Zellwachstum ist essentiell für die Reifung des künstlichen Gewebes.^[12]

Die extrazelluläre Matrix ist der Gewebeanteil zwischen den Zellen und setzt sich aus Kollagenfasern, Fibronectin, Laminin, Proteoglycanen (PG) und Glycosaminoglycanen (GAG), sowie weiteren Glycoproteinen zusammen.^[38]

Die Kollagenfasern bestehen aus Proteinen mit der Wiederholungseinheit [Gly-X-Y] und bisher wurden 29 verschiedene Typen beschrieben. Drei Kollagenmoleküle sind helikal zu Fibrillen von 280 nm Länge verbunden. Kollagen-Fibrillen sind für die mechanische Belastbarkeit des Gewebes und für die Elastizität und Stabilität der Zelle notwendig.^[39] Fibronectin bildet ebenfalls Fibrillen aus und wechselwirkt mit Integrinen, die Zelladhäsion und Signaltransduktion vermitteln.^[40-41]

Proteoglycane hingegen bestehen aus einem Proteingrundkörper auf dem GAGs gebunden sind. Diese tragen größtenteils Sulfatgruppen und sind ebenfalls für die mechanische Druckfestigkeit und für die Hydratation des Gewebes notwendig.^[38] Ausnahme bildet hier die Hyaluronsäure, die keine Sulfatgruppen tragen und auch nicht an Transmembranproteine gebunden sind. Diese kann zum Beispiel an Adhäsionsmoleküle wie CD44 binden und Entzündungen und das Zellverhalten regulieren.^[42]

Die Gesamtheit der Saccharide außerhalb der Zelle wird auch als Glykokalyx zusammengefasst.^[43] Der Aufbau, die Benennung, der Metabolismus und die Funktion von Sacchariden auf Glycoproteinen wird im folgenden Kapitel näher erläutert.

2.2 Saccharide

Saccharide, Kohlenhydrate, Zucker oder Glycane sind verschiedene Namen für die Beschreibung der selben Stoffklasse. Definiert sind sie als Polyhydroxylaldehyde oder Polyhydroxylketone. Die Erforschung der Zucker brachte einige Nobelpreisträger wie *Prof. Dr. E. Fischer* 1902 für seine Arbeiten an Zucker- und Purinsynthesen^[44] oder *Prof. Dr. N. Haworth* 1937 für die Untersuchung von Kohlenhydraten und Vitamin C hervor.^[45] Nach ihnen sind heute noch geläufige Darstellungen benannt. Die Fischerprojektion beschreibt die Anordnung der Hydroxylgruppen der offenen Kette mit dem höchst oxidierten Kohlenstoff an oberste Stelle gezeichnet. Die Haworth-Projektion zeigt die Anordnung der Hydroxylgruppen nach der Bildung des Halbacetals, im Falle von Glucose zwischen O-5 und C-1 (**Abbildung 1**). Die meisten natürlichen Monosaccharide sind D-Zucker (D vom lateinischen *dexter* für rechts), am Beispiel von Glucose ist die Hydroxylgruppe OH-5 auf der rechten Seite die ausschlaggebende Gruppe für die Benennung.^[46]

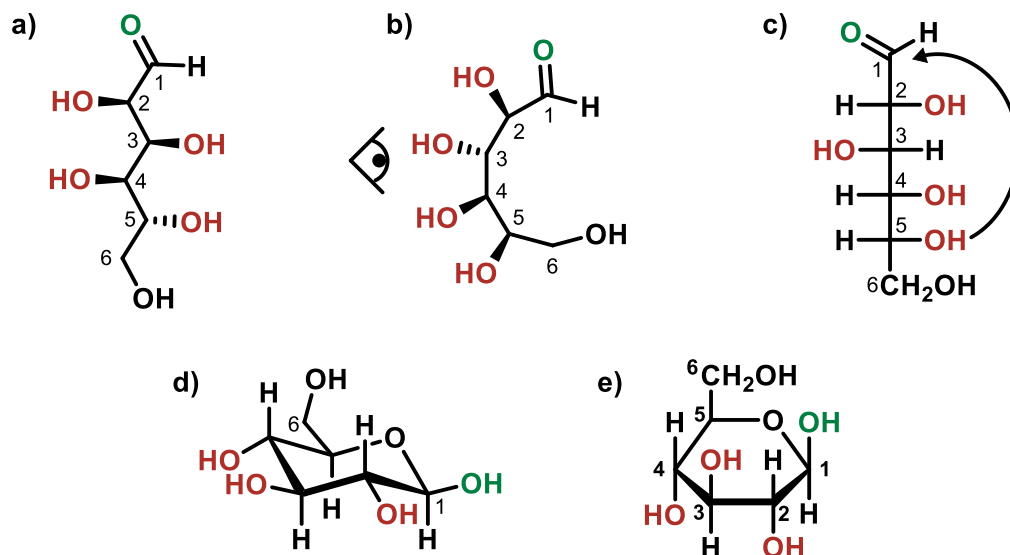


Abbildung 1: Verschiedene Darstellungen von Zuckern am Beispiel von D-Glucose: **a)** Offene Kettengleichung; **b)** Überführung in die Fischer-Projektion; **c)** Fischer-Projektion („ta tü ta ta“); **d)** Sesselstruktur nach gebildetem Acetal zwischen O-5 und C-1 als β -Anomer (OH-1 in grün ist äquatorial); **e)** Haworth-Projektion als β -Anomer (OH-1 in grün steht nach oben).^[46]

Alle einfachen Monosaccharide können mit der Summenformel $[C(H_2O)]_n$ (mit $n = 3$ bis 9) beschrieben werden und haben bei steigender Anzahl von chiralen Kohlenstoffatomen eine Vielzahl an Epimeren. Während für $n = 3$ lediglich Glyceraldehyd existiert, gibt es für $n = 6$ acht verschiedene Aldosen (Hexosen mit Aldehydgruppe). Die biologisch relevantesten Monosaccharide sind in folgender Abbildung mit dem entsprechenden etablierten Wiedererkennungssymbol dargestellt (**Abbildung 2**). Die einfachen Monosaccharide Glucose (Glc), Mannose (Man) und Galactose (Gal) werden als Kreis in blau, grün oder gelb dargestellt und die jeweiligen 2-Acetylamin-Derivate in entsprechend selbigen Farben durch ein Quadrat

2. Kenntnisstand

symbolisiert. Ohne Acetylgruppen und somit als freies Amin sind diese lediglich zur Hälfte ausgemalt (z.B. GlcN). Sialinsäure wird durch einen lila Diamanten, Xylose durch einen orangen Stern und L-Fucose durch ein rotes Dreieck repräsentiert.^[46-48]

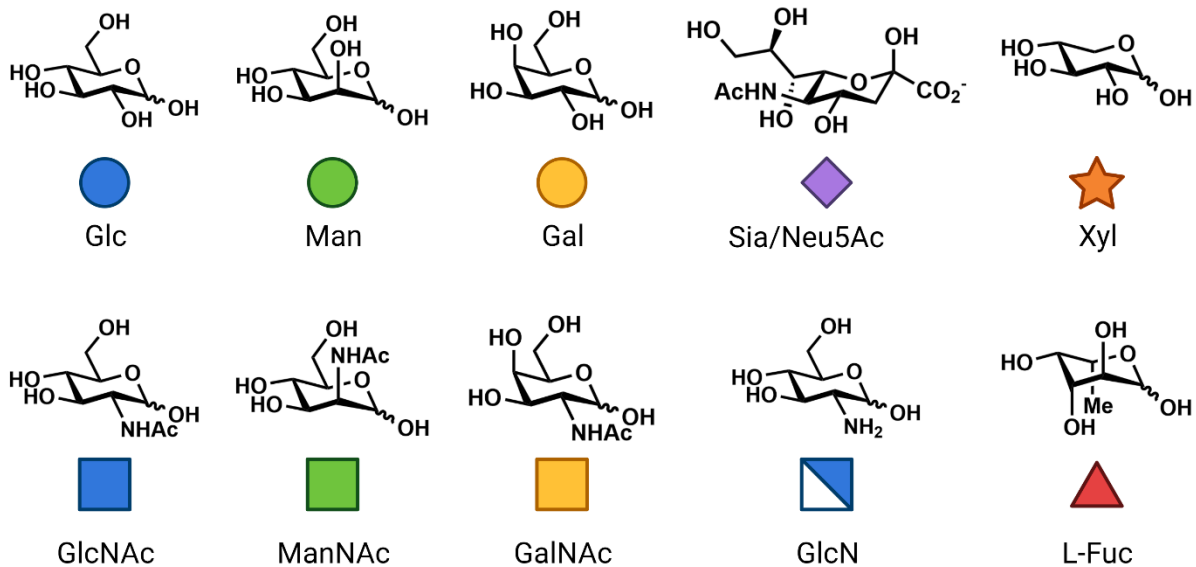


Abbildung 2: Häufig genutzte Monosaccharide mit jeweiligen etablierten Symbolen und Farben.^[47] Erstellt mit BioRender.com

Kohlenhydrate sind für Lebewesen eine unverzichtbare Energiequelle.^[49] Darüber hinaus hat die Glycosylierung von Proteinen und Lipiden einen fundamentalen Einfluss auf deren Eigenschaften und biologischen Funktionen. Die Untersuchung von Glycanen im biologischen System gibt einen Einblick in die Diversität und Strukturvielfalt und deren Zusammenspiel des Lebens.^[50]

2.2.1 Glycosphingolipide

Zellen trennen sich räumlich von ihrer Umgebung durch ihre Zellmembran ab. Diese besteht hauptsächlich aus Phospholipiden, Cholesterol und Sphingolipiden. Der Grundkörper Sphingosin kann mit einer langkettigen Fettsäure eine Amidbindung eingehen und bildet somit die Klasse der Ceramide. Die primäre Hydroxylgruppe eignet sich für Glycosylierungen, wodurch Glycosphingolipide (GSL) entstehen, die eine hydrophile Kopfgruppe sowie ein lipophiles Rückgrat haben und somit in äußeren Membranen angereichert sind. Die Glycosylierungen erfolgen dabei im endoplasmatischen Retikulum (ER) oder im Golgi-Apparat. GSL bilden die häufigste Klasse unter den Glycolipiden. Einige glycosylierte Ceramide sind beispielhaft in **Abbildung 3** abgebildet.^[51-52]

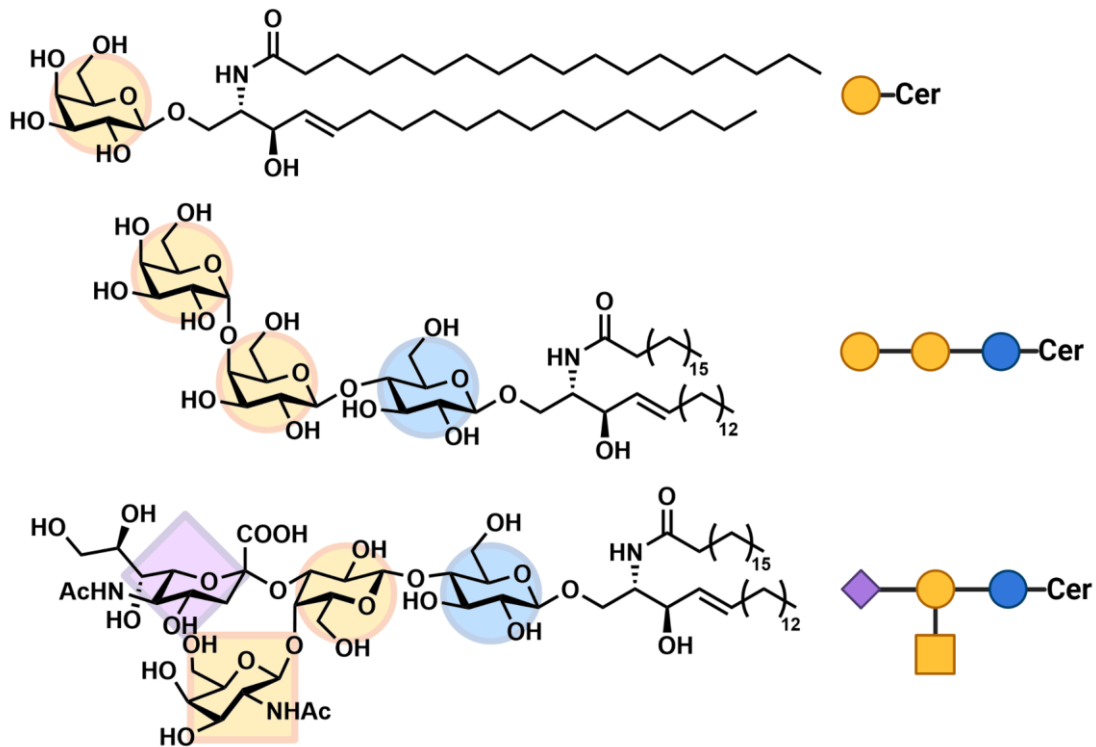


Abbildung 3: Beispielhafte Mono- und Oligosaccharide verknüpft mit Ceramid zur Bildung von GalCer, GB3 und GM2.^[51] Erstellt mit BioRender.com

GSLs sind verantwortlich für Signaltransduktion, Zell-Zell-Erkennungen und Membranorganisation.^[53] Im Gehirn von Säugetieren ist der Lipidanteil durch GalCer bis zu 16 % abgedeckt und isoliert dort die Axone von Nervenzellen.^[51-52] Globotriaosylceramide (Gb3, α 1,4Gal- β 1,4Gal- β Glu-Cer) nutzen *Escherichia coli* (Kolibakterien) als Infektionsstrategie, indem diese ein Toxin zur Bindung des Trisaccharids produzieren.^[54] Die Erbkrankheit Morbus Fabry beschreibt eine Stoffwechselstörung mit resultierender Anreicherung von Gb3 in den Lysosomen, was zu einer Reihe von Beschwerden und Krankheitserscheinungen führt.^[55] Ebenso können verzweigte Oligosaccharide mit Sialinsäuren an das Sphingolipid aufgebaut werden, wie am Beispiel von Monosialodihexosylgangliosid 2 (GM2, α 2,8Sia- β 1,4Gal(β 1,3GalNAc)- β Glc-Cer) gezeigt. Dieses ist für Zelladhäsion und Signaltransduktion zuständig. In Tumorzellen konnte die Wechselwirkung von GM2 an das Adhäsionsprotein β 1-Integrin^[56] und damit eine assoziierte Wanderung nachgewiesen werden.^[57]

Glycosylierungen von Biomolekülen steuern demnach essentielle Funktionen und erfolgen neben Lipiden auch an Proteinen.

2.2.2 Glycoproteine

Nach der Expression von Proteinen werden weitere post-translationale Modifikationen (PTM) durchgeführt. Diese können die physikalischen und chemischen Eigenschaften und somit auch die Faltung, Stabilität, Konformation und letztlich die Aktivität und Funktion beeinflussen. Zu den geläufigsten Modifikationen gehören die Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung, Sulfatierung, Amidierung, Binden von Fettsäuren und Glycosylierung.^[58-59] Beim letztgenannten wird zusätzlich zwischen *N*- und *O*- Glycanen durch die Bindung an die jeweilige Aminosäure unterschieden. *N*-Glycane binden über den Stickstoff von Asparagin (Asp, N), während *O*-Glycane über den Sauerstoff an Serin (Ser, S) oder Threonin (Thr, T) binden (**Abbildung 4**).^[60-61] Ebenfalls sind *C*-Glycane bekannt, diese stehen bislang jedoch aufgrund ihrer seltenen Erscheinung nicht im Fokus der Forschung.^[62]

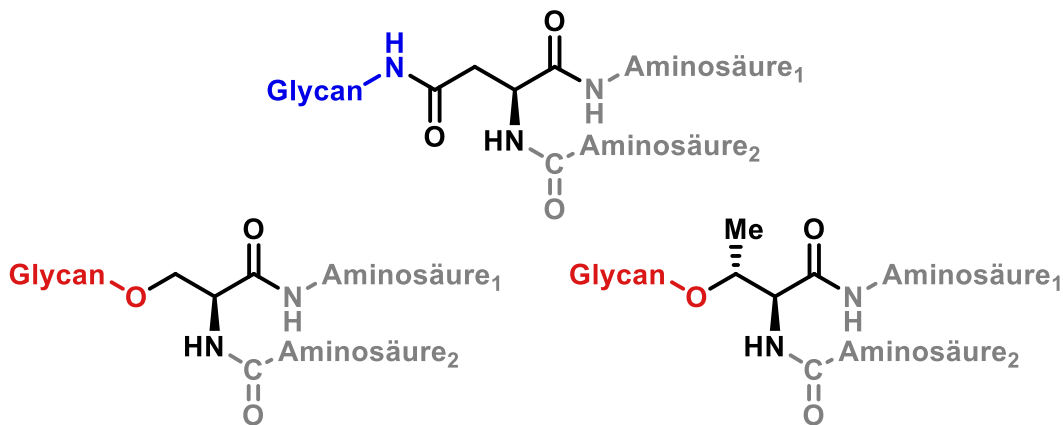


Abbildung 4: Bindung von *N*-Glycan (blau) an die Aminosäure Asparagin eines Proteins und Bindung eines *O*-Glycans (rot) an die Aminosäure Serin (links) oder Threonin (rechts) eines Proteins.

2.2.2.1 O-Glycosylierung

Bei *O*-Glycanen bindet die Hydroxylgruppe von Ser oder Thr typischerweise an ein GalNAc und bildet die *mucin-type* *O*-Glycane (*mucin*, dt.: Schleim). Die weiteren daran gebundenen Monosaccharide bei *mucin-type* *O*-Glycanen sind GalNAc, Gal, GlcNAc, Fuc und Sia. Die Saccharide Glc, Man und Xyl sind dabei nicht vertreten, während diese jedoch direkt an einem Protein *O*-verknüpft sein können.^[50, 61] *Mucin-type* *O*-Glycane binden ausschließlich über GalNAc an das Protein und erhalten bislang den größten Fokus in der Literatur.^[50]

O-Glycosylierungen erfolgen im Golgi-Apparat.^[50] Die dazu notwendigen Glycosyltransferasen sind Typ-2-Transmembranproteine, demnach befinden sich ihre *N*-terminalen Enden im Cytosol und eine katalytische Domäne im Lumen des Golgi.^[50, 63] Viele Enzyme sind in verschiedenen Bereichen des Golgi-Apparats vorhanden, wobei frühe Glycosylierungsreaktionen im *cis*-Golgi (dem ER zugewandt) und höhere Glycosylierungen im *trans*-Golgi (Plasmamembran zugewandt) stattfinden. Der einfache GalNAc-Baustein auf Ser

oder Thr ist auch als Tn-Antigen definiert. Dieser kann je nach weiteren Zucker-Bausteinen zu insgesamt acht verschiedenen Cores (dt.: Grundgerüst) erweitert werden. **Abbildung 5** zeigt die Antigene und die geläufigsten vier Cores.^[50]

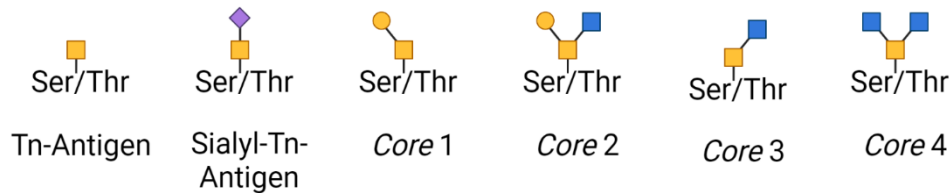


Abbildung 5: Geläufigste Cores (dt.: Grundgerüste) bei *mucin-type* O-Glycanen mit direkt gebundenem GalNAc. Erstellt mit Biorender.com

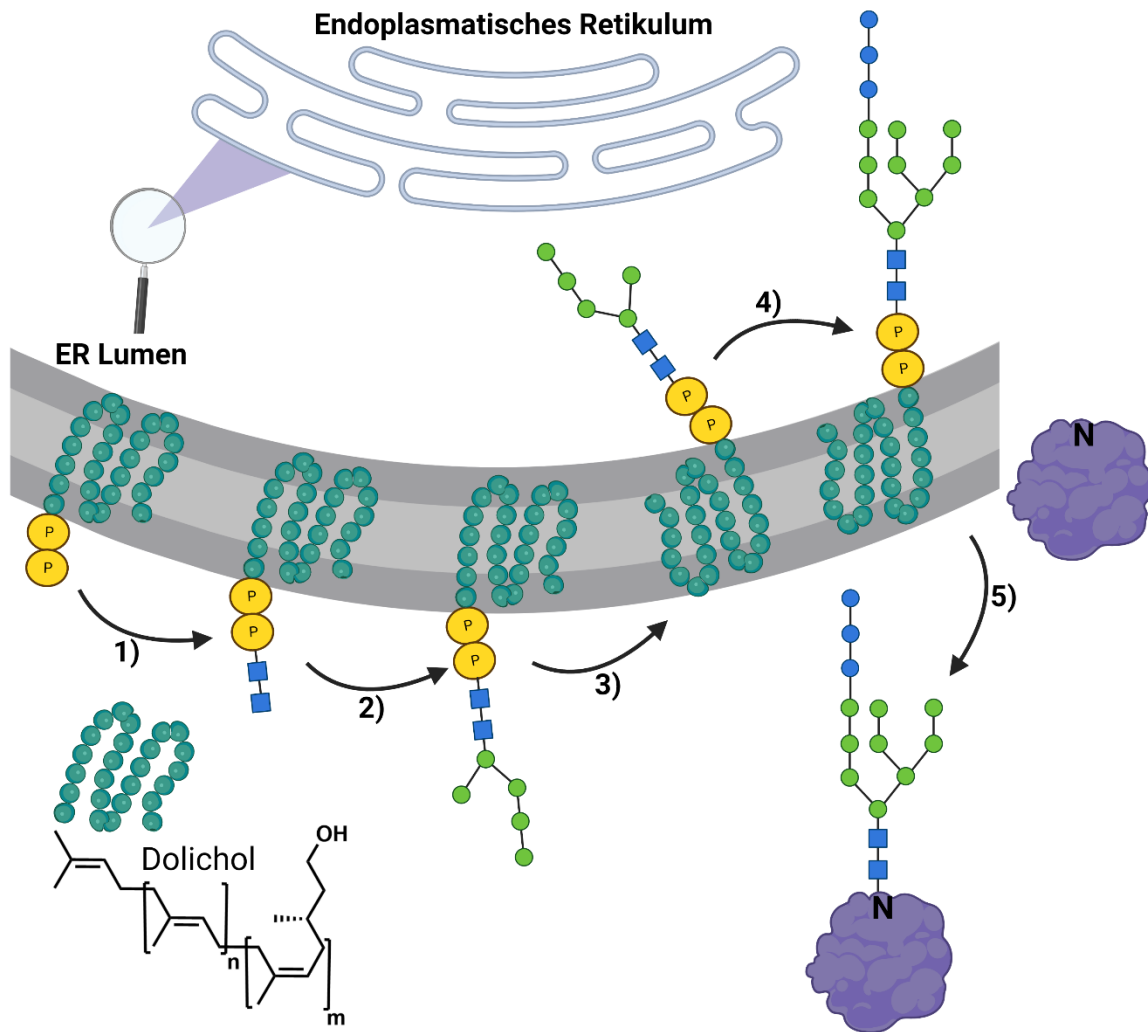
Core-1-Strukturen sind auf allen Zellen zu finden und auf von der Leber produzierten Glycoproteinen. Core-Strukturen 2-4 dekorieren primär die sekretierten und membrangebundenen Glycoproteine von Epithelzellen, insbesondere die Epithelzellen der Speicheldrüse, der Atemwege und des Magen-Darm-Trakts.^[50]

Die Cores werden mit zusätzlichen Zucker-Bausteinen erweitert. Zum Beispiel weisen die diversen Oligosaccharide häufig LacNAc (Disaccharid aus Gal-GlcNAc) und auch die wiederholende Struktur (PolyLacNAc) auf. Andere Oligosaccharide tragen Fuc, Sia oder Blutgruppenantigene wie die ABO-Lewis-Strukturen, die vor Abbau und Immunerkennung schützen oder auch als Leitmotiv für Lectine (Kohlenhydrat bindende Proteine) dienen.^[50]

2.2.2.2 N-Glycosylierung

Die N-Glycosylierung von Proteinen in Säugetieren erfolgt am rauen endoplasmatischen Retikulum (ER). Dort überträgt die Oligosaccharyltransferase (OST) ein Oligosaccharid bestehend aus 14 Monosaccharideinheiten ($\text{GlcNAc}_2\text{Man}_9\text{Glc}_3$) auf einen Asparagin-Rest eines Proteins, das die Aminosäuresequenz Asp-X-Thr/Ser enthält, wobei X einer beliebigen AS außer Prolin entspricht (**Schema 2**). Das Oligosaccharid wird vorher an der Außenmembran des ER enzymatisch aufgebaut. Als fester Anker mit der Membran verbunden dient Dolichol, welches aus *trans*- und *cis*-Isopreneinheiten aufgebaut ist. Die Hydroxylgruppe wird phosphoryliert und kann somit das erste Glucosamin binden (**1**). Weiterhin wird dieses enzymatisch auf ein Oligosaccharid, bestehend aus sieben Monomereinheiten ($\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$), erweitert (**2**). Das entstandene Dol-P-P-GlcNAc₂Man₅ wird in die Innenseite des ER, in das ER-Lumen, transferiert (**3**) und anschließend enzymatisch zum Oligosaccharid, bestehend aus 14 Einheiten ($\text{GlcNAc}_2\text{Man}_9\text{Glc}_3$), vervollständigt (**4**). Dort wird es wie oben beschrieben auf ein Asparagin-Rest eines Proteins übertragen (**5**).^[60, 64-66]

2. Kenntnisstand



Schema 2: 1) Glycosylierung von Dolicholdiphosphat an der äußeren Membran des endoplasmatischen Retikulums. 2) Reifung des Oligosaccharids. 3) Transfer aus der äußeren Membran in die innere. 4) Weitere Reifung des Oligosaccharids zum GlcNAc₂Man₉Glc₃. 5) Übertragung auf ein Glycoprotein mit der Sequenz N-X-S/T (X ist eine beliebige AS außer Prolin) durch Oligosaccharyltransferase (OST). Erstellt mit Biorender.com

Nach erfolgter Übertragung des 14-Zucker Oligosaccharids wird dieses weiterhin im ER und im Golgi-Apparat modifiziert. Zuerst werden die drei terminalen Glc-Einheiten entfernt, gefolgt von anschließendem Verlust von ein oder zwei Man-Einheiten beim Transport zum Golgi-Apparat. Bei den meisten Proteinen werden im *cis*-Golgi (dem ER zugewandt) weitere Man-Einheiten bis zur Entstehung von Man₅GlcNAc₂ entfernt. Im *medial-Golgi* können weitere Mannose-Strukturen entfernt und durch GlcNAc ersetzt werden, wodurch die Glycan-Ketten zu komplexen oder hybriden *N*-Glycanen differenziert werden (**Abbildung 6a**).^[67] Komplexe Glycan-Ketten sind stark verzweigt mit GlcNAc und können weiterhin mit den Monosacchariden Gal, GlcNAc, Sia und Fuc erweitert werden.^[67] Im Falle von Gal entsteht die Erkennungseinheit *N*-Acetyllactosamin (LacNAc), die auch durch wiederholte Addition als Poly-LacNAc vorliegt. Häufiger terminaler Zucker der Glycan-Kette ist die Sialinsäure mit

besonderer Wichtigkeit für die Zelle. Diese wird im nächsten Kapitel genauer erläutert (**Abbildung 6b**).^[67-68]

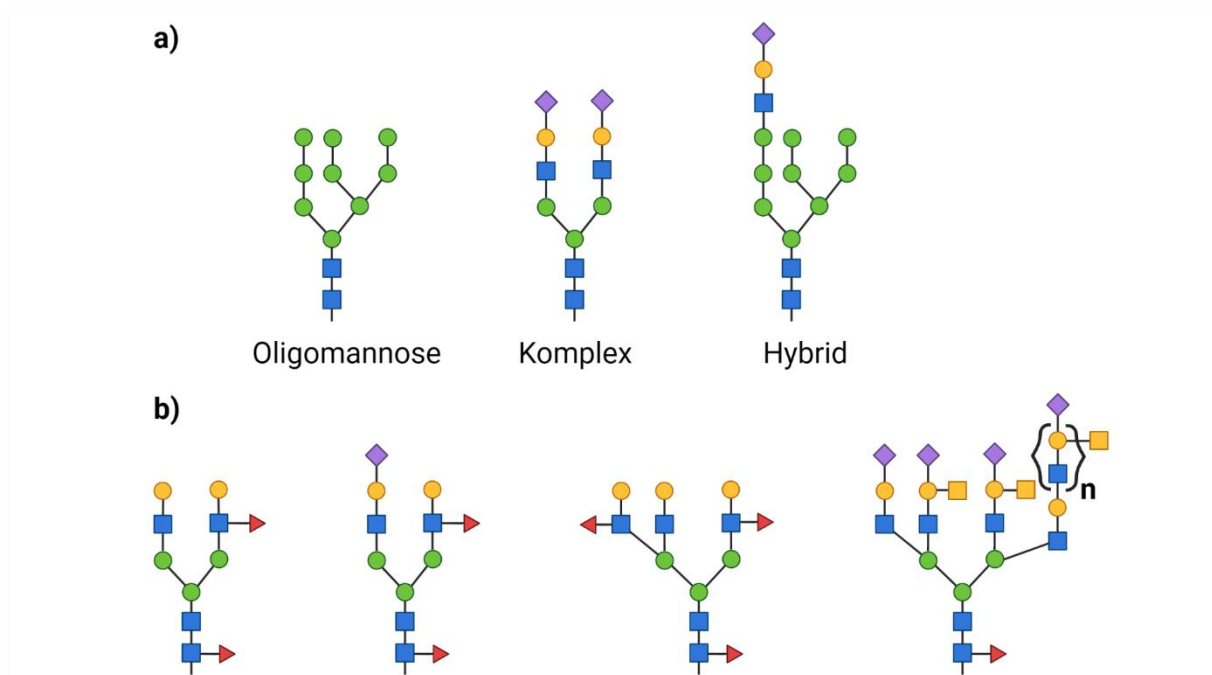


Abbildung 6: a) Unterscheidung von *N*-Glycanen in drei Typen: Oligomannose, Komplex und Hybrid. b) Typische Strukturen von höheren *N*-Glycanen.^[68-69] Erstellt mit Biorender.com

Die meisten Proteine der Zelloberfläche sind glycosyliert und vermitteln interzelluläre Kommunikation und Zelladhäsion.^[70] Beispielsweise tragen adhäsionszuständige Integrine *N*-Glycane, sodass sich eine Veränderung der Zuckerketten direkt auf die Wechselwirkung mit der Umgebung und somit auf die Zelladhäsion, Migration oder auf die Tumorentwicklung auswirkt. In Epithelzellen wurden durch erhöhte Aktivität der *N*-Acetylglycosamintransferase V (GnT-V) verzweigte Glycanketten auf den Proteinen erzeugt, resultierend in einer verringerten Zelladhäsion, sowie einer erhöhten Mobilität und Tumorigenität.^[71] Die stark verzweigten Glycane stehen in Korrelation mit Tumormetastasierung und Tumoraggressivität.^[72-73]

2.2.2.3 Sialinsäure

Unter den Monosacchariden ist der Aufbau der Sialinsäuren besonders, denn diese bestehen aus neun Kohlenstoffatomen im Grundgerüst und einer Carboxylgruppe. Der wichtigste Vertreter und biochemische Vorläufer ist *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac). Dieser ist der häufigste Vertreter beim Menschen und ist die Vorstufe für weitere Modifikationen wie Acetylierung, Methylierung, Lactonisierung, Phosphatierung, Sulfatierung oder Hydroxylierung, wodurch über 40 Derivate entdeckt wurden.^[74-75] Daher wird in vielen Publikationen, vor allem im Kontext mit menschlichen Zellen, der Oberbegriff Sialinsäure für Neu5Ac verwendet. Die *N*-Glycolylneuraminsäure existiert in vielen Wirbeltieren, Menschen nicht eingeschlossen (**Abbildung 7**).^[76]

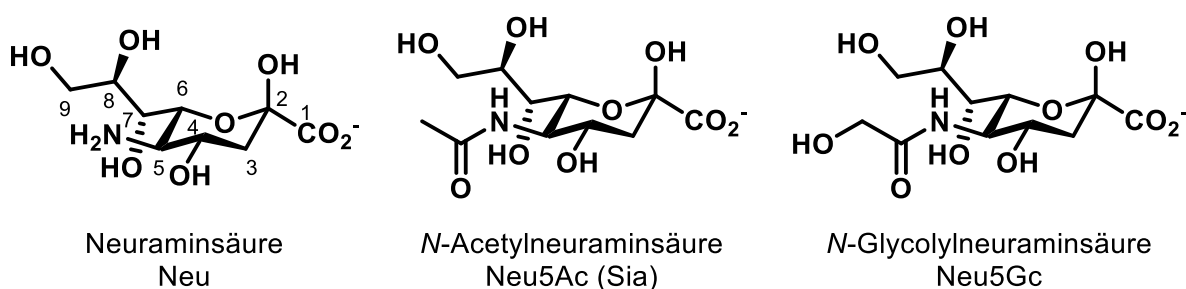
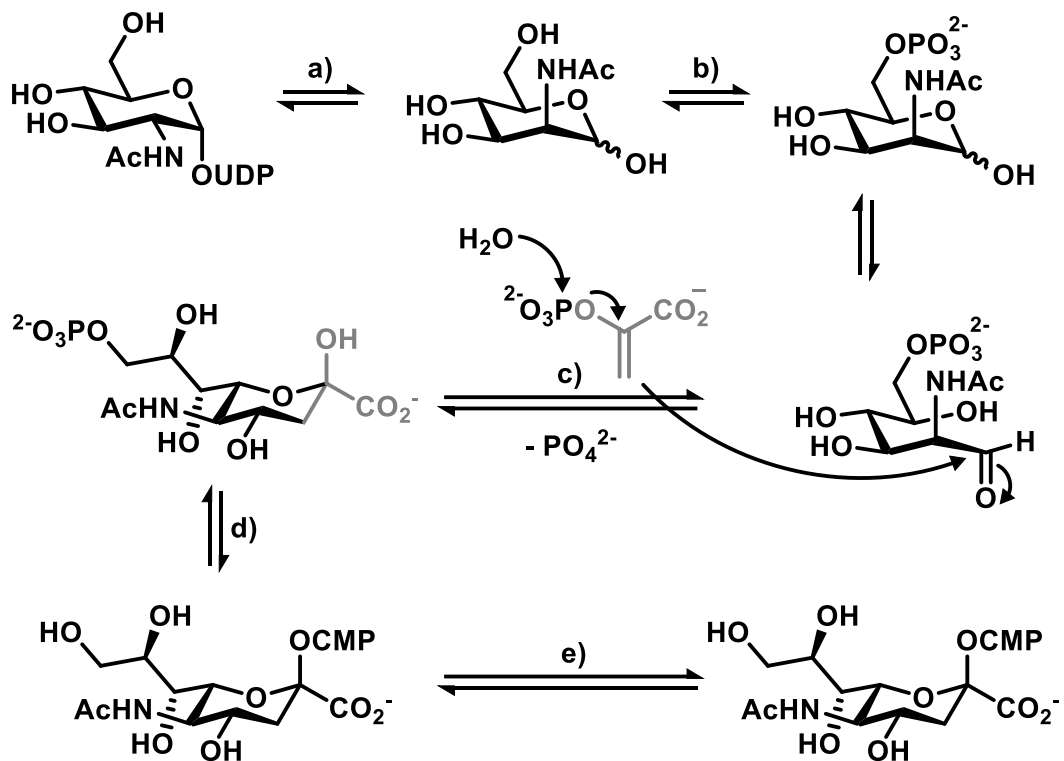


Abbildung 7: Strukturformeln von wichtigen Vertretern der Sialinsäuren: Neuraminsäure (Neu), *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), häufig als Sialinsäure (Sia) bezeichnet, und *N*-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc).

Die Biosynthese von Sialinsäure ist im Roseman-Warren-Biosyntheseweg beschrieben (**Schema 3**). Galactosamin wird mit Uridindiphosphat (UDP) aktiviert und anschließend zum Mannosamin epimerisiert (**a**). Wirkende Enzyme sind dabei UDP-GlcNAc 2-Epimerase und ManNAc-Kinase (GNE/MNK). Letzteres phosphoryliert (P) ManNAc an der Position 6 (**b**), das anschließend, katalysiert durch Neuraminsäuresynthase (*N-acetylneuraminic acid synthase*, NANS oder häufig auch SAS), aldolartig mit Phosphoenolpyruvat (PEP) zu Sia-9P reagiert (**c**). Dieses wird durch Neuraminsäure-9-phosphatase (NANP) zur freien Sialinsäure umgesetzt (**d**).^[77-78]

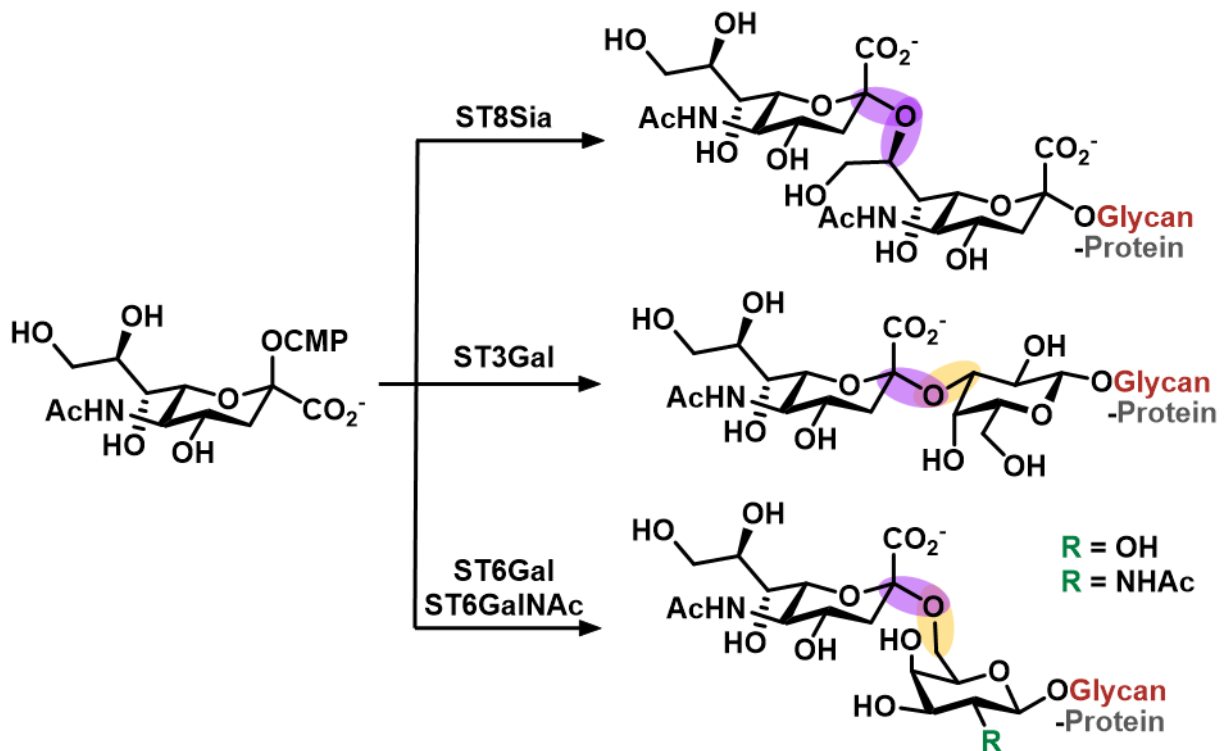
Für die Glycosylierung werden die Monosaccharide typischerweise mit den Nukleotiden Guanosin-, Uridin, Adenosintriphosphat (GTP, UTP oder ATP) im Cytosol aktiviert. Einzigartig ist die Aktivierung für Sialinsäure, die im Zellkern mit Cytidintriphosphat (CTP) erfolgt (**e**). Über die Konzentration des CMP-Sia wird darüber hinaus die Transkription des Epimerase GNE Gens kontrolliert, dieser Vorgang reguliert somit automatisch die Biosynthese von Sia. Über Vesikel wird CMP-Sia in den Golgi-Apparat transportiert und dort auf diverse Glycoproteine (oder Glycolipide) übertragen.^[79]



Schema 3: Roseman-Warren-Biosyntheseweg von Sialinsäure. **(a)** UDP-GlcNAc 2-Epimerase (GNE); **(b)** ManNAc-Kinase (MNK); **(c)** Neuraminsäuresynthase (NANS/SAS) und Phosphoenolpyruvat (PEP), Bildung des Halbacetals; **(d)** Neuraminsäure-9-phosphatase (NANP); **(e)** CMP-Sialinsäuresynthetase (CMP-SA) und CTP.^[79]

Sialyltransferasen (ST) katalysieren die Reaktion zwischen dem Donor CMP-Sia und dem jeweiligen Akzeptor unter Inversion der Konfiguration, wodurch Sia jeweils als α -Anomer gebunden ist. Je nach Akzeptor werden die Transferasen entsprechend ihrer Verbindungsstelle in vier Klassen unterschieden (**Schema 4**). So entstehen die Bindungen Sia α 2-3Sia durch ST8Sia, Sia α 2-3Gal durch ST3Gal und Sia α 2-6Gal/Sia α 2-6GalNAc durch ST6Gal/ST6GalNAc.^[80]

2. Kenntnisstand



Schema 4: Mögliche Glycosylierungen katalysiert durch Sialyltransferasen (ST) von Sia-CMP auf gebundene Zuckerreste. Die Substitution von CMP erfolgt unter Inversion, wodurch ausschließlich α -glycosidische Bindungen entstehen.

Als endständiger Zucker ist die Sialinsäure für viele biologische Wechselwirkungen verantwortlich. Sogenannte Siglecs (*sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins*) sind Proteine auf der Zelloberfläche, die sialylierte Glycane binden. Diese Interaktion ermöglicht die Erkennung von spezifischen körpereigenen oder fremden Strukturen, bei denen eine Immunreaktion ausgelöst wird.^[81] Pathogene wie Bakterien und Viren imitieren Glycane von Säugetieren, um an die Zellen zu adhären.^[82]

Selectine sind transmembrane Zelladhäsionsmoleküle (*cell adhesion molecules*, CAM) und binden an Sialyl Lewis X (Tetrasaccharid: Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4[Fuca1-3]GlcNAc), wodurch diese Thrombozyten (Blutplättchen) an geschädigtes Gewebe oder Leukozyten (weiße Blutkörperchen) an entzündete Stellen leiten.^[73, 83]

Durch die Carboxylgruppe sind Sialinsäuren negativ geladen, wodurch sie ebenfalls elektronische Einflüsse ausüben. Erythrozyten (rote Blutkörperchen) und Endothelzellen (innere Zellen der Blutgefäße) weisen beide eine hohe Dichte des Zuckers auf, wodurch sie sich physikalisch abstoßen.^[82, 84]

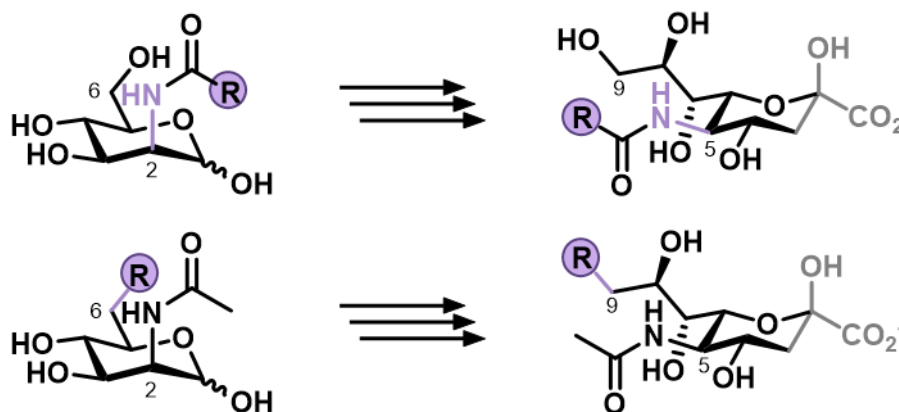
Die komplexen Zuckerstrukturen der Glycoproteine können durch synthetische Derivate ersetzt werden. Das sogenannte *metabolic glycoengineering* wird im folgenden Kapitel genauer beschrieben.

2.3 Metabolic glycoengineering

Beim *metabolic glycoengineering* (MGE) oder auch *metabolic labeling* werden Bakterien, Zellen oder Lebewesen mit unnatürlichen Monosacchariden kultiviert und somit in die Zellbiologie eingeführt.^[79] Dabei werden diverse Zucker in zahlreichen Zellkulturen zugegeben und der Einbau in die Glycocalyx wie auch die biologische Veränderung evaluiert. Unter den eingesetzten Zuckern werden hauptsächlich Derivate von GalNAc,^[85-87] GlcNAc,^[88-90] Fuc^[91-93] und ManNAc,^[94-96] sowie das daraus resultierende metabolische Produkt, Sia^[97-99] eingesetzt.^[62, 79, 100]

2.3.1 Prinzip von metabolic glycoengineering

Die Bedeutung der Sialinsäure und ihr Metabolismus wurde im vorherigen Kapitel beschrieben. Als häufiges terminales Element von Glycanketten wechselwirkt diese mit ihrer Umgebung und eignet sich daher hervorragend als Ausgangspunkt für Modifikationen. Die Synthese von Sialinsäure-Derivaten ist im Vergleich zu Mannosamin-Derivaten aufwendiger und schwieriger, weswegen häufig Mannosamin-Analoga als metabolische Vorstufe für das *glycoengineering* eingesetzt wurden. Dabei werden unnatürliche Modifikationen in der Seitenkette oder an der Position 6 toleriert und entsprechend des Roseman-Warren-Biosynthesewegs in das jeweilige Sialinsäure-Analogon metabolisiert (**Schema 5**).^[79-80, 101]

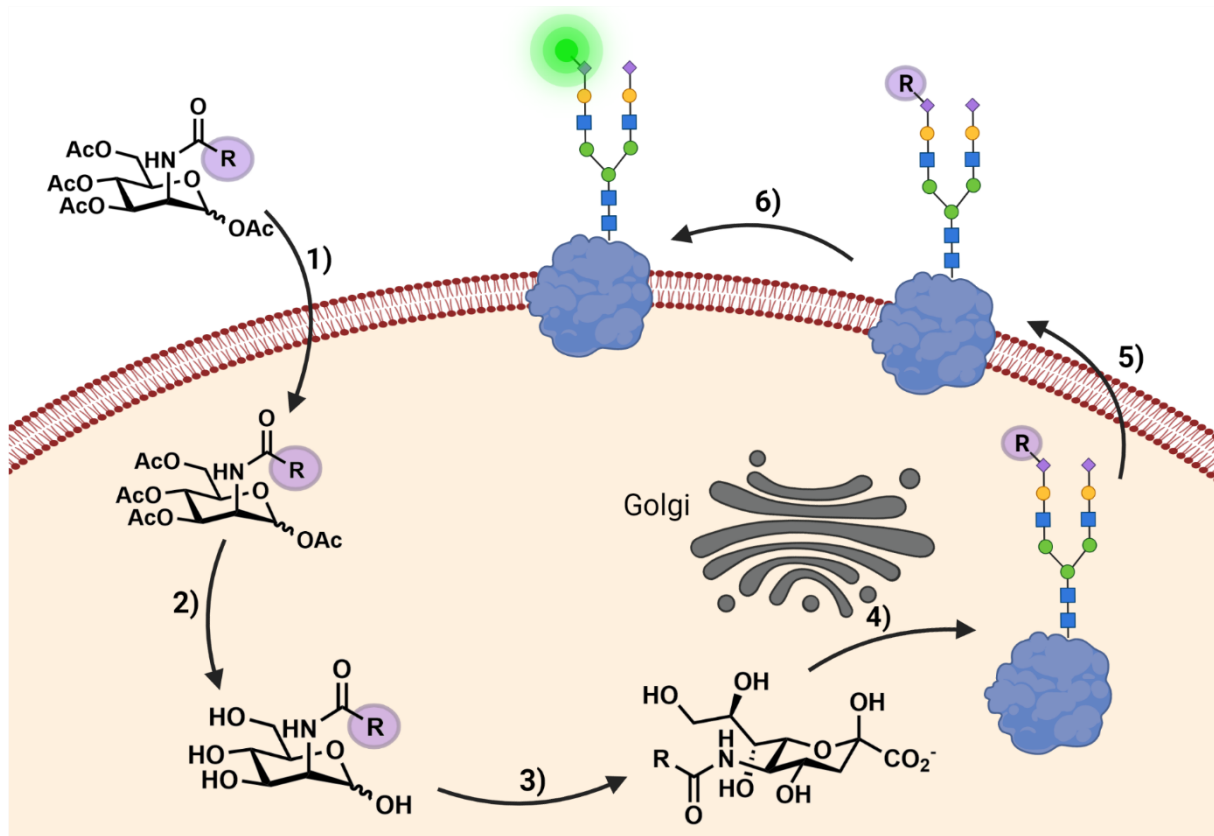


Schema 5: Derivate von Mannosamin mit bioorthogonalen Gruppen in der Seitenkette (oben) und an Position 6 (unten) metabolisiert zu den jeweiligen Sialinsäuren mit den Funktionalisierungen in der Seitenketten (oben) oder Position 9 (unten).

Zahlreiche Publikationen berichten über den Einsatz von peracetylierten Monosacchariden *in vitro*, wodurch die Moleküle aufgrund ihres unpolaren Charakters die Zellmembran penetrieren und ins Cytosol gelangen,^[90] wo Esterasen die Acetylgruppen abspalten und die synthetischen Saccharide ihre biologische Aktivität entfalten (**Schema 6** am Beispiel eines

2. Kenntnisstand

Ac₄ManNAc-Derivats).^[102] Nach weiterer Metabolisierung und Aktivierung erfolgt die Glycosylierung in den Organellen ER und Golgi-Apparat als N- und O-Glycane an die Proteine, die anschließend auf die Zelloberfläche transportiert werden. Das Kultivieren von Zellen mit unnatürlichen Zuckern erlaubt die Einführung diverser funktioneller Gruppen.



Schema 6: Prinzip von *metabolic glycoengineering*. Repräsentativ hier peracetylierte Mannosamin-Derivate mit einer bioorthogonalen Gruppe (R) in der Seitenkette. Diese kann für weitere Konjugationen und Nachweise genutzt werden. **1)** Diffusion in die Zelle; **2)** Deacetylierung im Cytosol; **3)** Biochemische Transformation zur Sialinsäure, Aktivierung im Zellkern und Transport zum Golgi-Apparat; **4)** Übertragung auf ein Glycoprotein im Golgi-Apparat durch Sialyltransferasen; **5)** Transport des ausgereiften Glycoproteins auf die Zelloberfläche oder extrazelluläre Matrix. **6)** Eingeführte bioorthogonale Gruppen (R) reagieren in Click-Reaktionen mit einem Fluorophor zur Visualisierung der Glycocalyx. Erstellt mit Biorender.com

Um das Interferieren mit dem biologischen System zu vermeiden, werden bioorthogonale funktionelle Gruppen eingeführt, die für weitere Konjugationen genutzt werden. Die geforderten Reaktionen sind unter dem Begriff Click-Chemie bekannt und werden in **Kapitel 2.4** genauer erläutert. Diese müssen eine Strukturvielfalt an Edukten zulassen, schnell und nahezu quantitativ reagieren, keine oder unbedenkliche Nebenprodukte zulassen und sie müssen sowohl Wasser als auch Sauerstoff tolerieren.^[103-104]

Eine beliebte bioorthogonale Gruppe ist das Azid. Es ist vergleichsweise klein und lässt sich durch eine Substitutionsreaktion relativ leicht in Moleküle einführen. Azido-Zucker auf der Zelloberfläche ermöglichen die Reaktion mit Phosphanen in einer Staudinger-Ligation^[105-106]

und mit Alkinen in einer Cycloaddition.^[79, 90, 100, 107-109] Ebenfalls möglich ist der Einbau von Alkin-Zuckern in die Glycocalyx.^[99, 110-112]

Somit können Fluoreszenzfarbstoffe kovalent an Glycoproteine konjugiert („clicken“) und Teile der Glycocalyx visualisiert werden.^[79, 90, 111-114] Durch Click-Chemie können auch Glycoproteine angereichert und durch Massenspektrometrie (MS, siehe **Kapitel 2.3.2**) effizient untersucht werden.^[62, 87, 115-118]

2.3.2 Massenspektrometrie von Glycoproteinen

Massenspektrometrie (MS) ist eine effiziente Methode zur Bestimmung des Proteoms, wodurch die Gesamtheit aller Proteine eines Organismus zu einem bestimmten Zeitpunkt erfasst wird (*proteomics*). Die Aminosäuresequenzen sind im Genom codiert, daher können durch *genomics* genau die möglichen Proteine bestimmt werden. Das Genom ist stabil und verändert sich nicht, während das Proteom sich durch Umwelteinflüsse ständig anpassen muss.^[119]

Vorteil der MS im Vergleich zu anderen Verfahren wie Westernblot ist das Erfassen von posttranslationalen Modifikationen (PTM) der Proteine und eine effiziente Analyse von Proteingemischen. Über 300 verschiedene PTM wie Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung, Sulfatierung, Amidierung, Binden von Fettsäuren und Glycosylierung sind bekannt, wodurch die Funktion und Stabilität stark beeinflusst wird.^[59] Im Gegensatz zu den exprimierten Proteinen werden die Glycosylierungen nicht im Genom codiert. Die hohe Struktur- und Verknüpfungsvielfalt der Monosaccharide auf den N- und O-Glycoproteinen einer Zelle zu einem definierten Zeitpunkt wird in *glycoproteomics* erfasst. Durch extrinsische Einflüsse werden die Glycane stetig angepasst.^[115]

Ein Schlüsselschritt zur Analyse ist die Anreicherung von Glycoproteinen, wofür unterschiedliche Verfahren entwickelt wurden (**Tabelle 3**).

2. Kenntnisstand

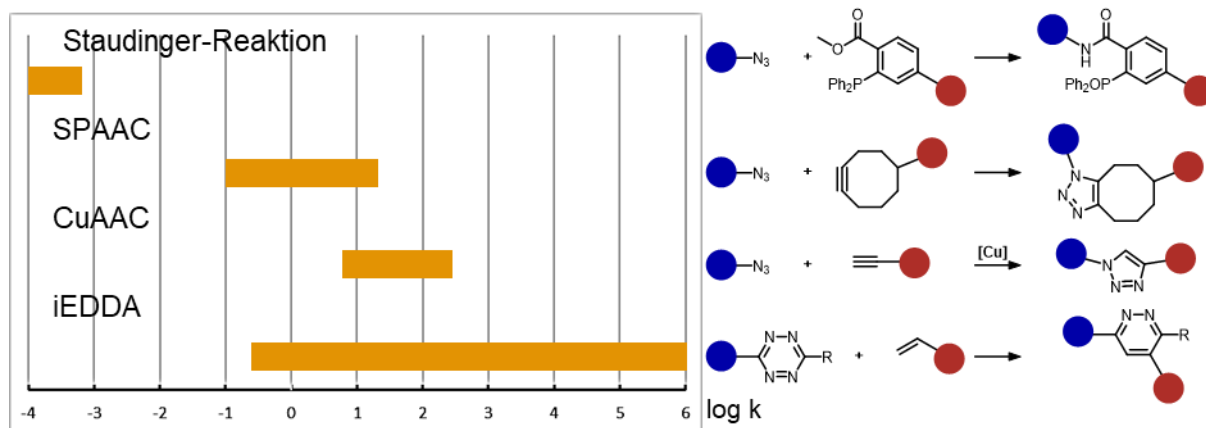
Tabelle 3: Verschiedene Strategien zur Anreicherung von Glycoproteinen. Affinitätschromatographien (blau hinterlegt), Chromatographie durch attraktive Wechselwirkung mit Trägermaterial (grün hinterlegt), chemische Reaktionen mit Zuckerresten (grau hinterlegt) und biologisch eingeführte unnatürliche Zucker (lila hinterlegt).

Methode	Prinzip
Lectine ^[120]	Affinitätschromatographie durch spezifische Wechselwirkung mit Zuckern
Inaktivierte Enzyme ^[121-122]	Affinität durch Glycosidasen die Zucker binden, diese jedoch nicht hydrolysieren
Antikörper ^[123-124]	Affinitätschromatographie durch Antigen-Wechselwirkung (z.B. Tn-Antigen)
Übergangsmetalle ^[125-126]	Affinität von Übergangsmetallen (Fe ³⁺ , Ga ³⁺ , Ti ⁴⁺ , Zr ⁴⁺) zu negativ geladenen Sauerstoff
Hydrophilie Interaktionen (HILIC ^[127] /ERLIC ^[128])	Chromatographie durch attraktive Wechselwirkung von Glycoproteinen mit hydrophiler stationärer Phase
Poröses Graphen ^[129-130] (porous graphitic carbon, PGC)	Chromatographie durch Proteinform, Ladung und Hydrophobie
Hydrazine ^[131] und Aminoxy ^[132]	Oxidation der Hydroxylgruppen von Sia zum Aldehyd und Kupplung mit Hydrazin- oder Aminoxy-Gruppen; diese sind auf einem Harz oder Vermittler mobilisiert
Borsäuren ^[133-134]	Reversible Bildung von Penta- und Hexacyclischen-Borsäureestern mit <i>cis</i> -ständigen Hydroxylgruppen
Bioorthogonale Metabolisierung ^[62, 135]	Einführung von unnatürlichen Zuckern durch MGE für Click-Reaktionen
Chemoenzymatische Markierung ^[136-137]	Enzymatische Glycosylierung mit unnatürlichen Zuckern für Click-Reaktionen

Die MS nach Anreicherung von Glycoproteinen liefert Informationen über deren Aufbau, auch bei niedrig dosierten Proben (bis zu attomolaren Konzentrationen).^[119] Die strukturelle Aufklärung von Glycoproteinen ist essentiell für das Verständnis ihrer Funktion und um die Auswirkung von Strukturveränderungen auf Krankheiten wie Tumorwachstum nachzuvollziehen und mögliche Therapieansätze zu entwickeln.^[81, 84]

2.4 Click-Chemie

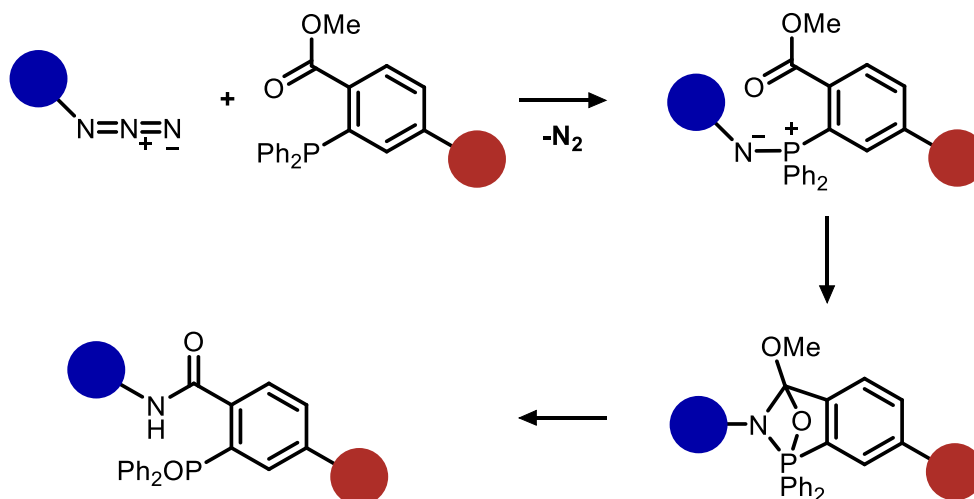
Der Begriff der Click-Chemie wurde 1999 von *Prof. Dr. B. Sharpless* auf dem 217ten Treffen der *american chemical society (ACS)* vorgestellt und gewann seither massiv an Bedeutung.^[104] Als solche werden Reaktionen bezeichnet, die eine Strukturvielfalt an Edukten zulassen, die in hohen Ausbeuten und stereospezifisch reagieren, höchstens unbedenkliche Nebenprodukte zulassen, Aufreinigungen mit geringem Aufwand ermöglichen (z.B. Umkristallisation oder Destillation) und sowohl die Anwesenheit von Wasser als auch Sauerstoff tolerieren.^[103-104] Die hohen Selektivitäten erlauben die Anwendung in biologischen Systemen, ohne dabei mit den biochemischen Prozessen des Organismus zu interferieren.^[90, 105, 138] Dafür wurde von *Prof. Dr. C Bertozzi* der Begriff *bioorthogonal labeling* (dt.: Bioorthogonale Markierung) geprägt.^[139] Im Jahre 2022 wurden *Prof. Dr. C. Bertozzi*, *Prof. Dr. B. Sharpless* und *Prof. Dr. M. Meldal* der Nobelpreis für die Entwicklung der Click-Chemie verliehen.^[140] Neben Reaktionen wie Ringöffnung von Epoxiden oder Aziridinen mit Nucleophilen, Bildung von Harnstoff-, Thioharnstoff-, Oxim-, Hydrazon- oder Amid-Derivaten aus Carbonylen oder der Thiol-En-Click-Reaktion^[141] zählen Cycloadditionen zu den geläufigsten und werden im Folgenden genauer beschrieben.^[103] **Schema 7** zeigt die jeweiligen Reaktionsgeschwindigkeiten der Staudinger-Reaktion, der CuAAC (*copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition*), der SPAAC (*strain promoted azide-alkyne cycloaddition*) und iEDDA (*inverse electron demand diels-alder reaction*).^[142]



Schema 7: Reaktionsgeschwindigkeiten der geläufigsten Click-Reaktionen.^[142]

2.4.1 Staudinger-Reaktion

1919 beschrieb Staudinger die Reaktion zwischen einem Phosphan und einem Azid, wodurch ein Phosphinimin-Derivat entsteht, das in wässrigem Milieu zum entsprechenden Amin und Phosphanoxid reagiert.^[143] Dieses Prinzip wurde weiter entwickelt und ein elektrophiler Methylester in räumliche Nähe des Phosphors eingebaut. Das Azid reagiert mit dem Phosphan unter Abspaltung von Stickstoff und bildet ein nukleophiles Aza-Ylid, welches intramolekular am elektrophilen Ester angreift und letztlich ein stabiles Amid bildet (**Schema 8**).^[105, 144]

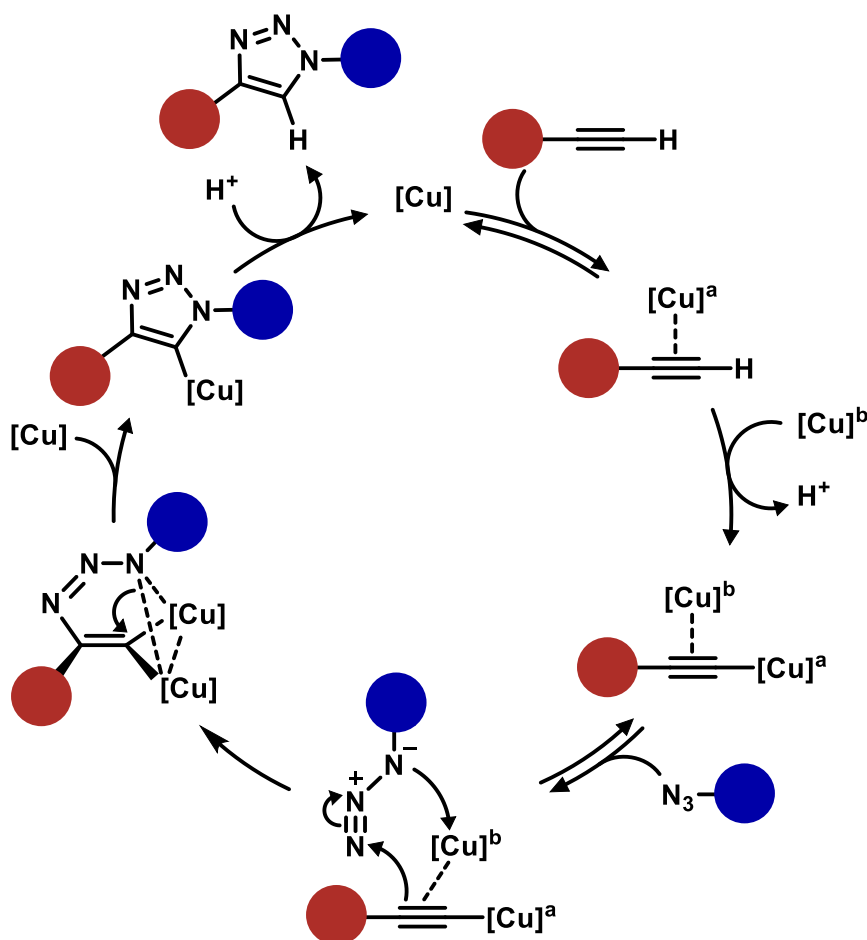


Schema 8: Reaktionsverlauf der Staudinger-Reaktion. Erste beschriebene bioorthogonale Reaktion.^[105]

Die Staudinger-Ligation ist die erste bioorthogonale Reaktion und wurde von *Bertozzi* und Mitarbeitern verwendet, die Azid-funktionalisierte Monosaccharide in glycosylierte Membranproteine einbauten, um diese anschließend mit einem Biotin-Phosphan^[105] oder mit einem FLAG-Phosphan (ein Octapeptid DYKDDDDK)^[144] reagieren zu lassen. Ein Nachteil der Methode ist die relativ geringe Reaktionsgeschwindigkeit (Vergleich **Schema 7**).

2.4.2 Copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition

Erstmals beschrieb Prof. Dr. R. Huisgen 1961 die [3+2]-Cycloaddition ungesättigter Kohlenwasserstoff-Verbindungen mit Aziden zur Bildung von 1,2,3-Triazolen.^[145] Die Reaktion verläuft erst bei hohen Temperaturen und verläuft nicht regioselektiv.^[146] Unter der Anwesenheit von Cu(I)-Ionen reagieren Azide mit terminalen Alkinen bereits bei Raumtemperatur und bilden regioselektiv 1,4-disubstituierte 1,2,3-Triazole.^[146-149] Weitere Vorteile von CuAAC sind die Toleranz gegenüber Wasser und pH-Werten zwischen 4–12. Das Cu(I) kann durch eine Reduktion von CuSO₄ mit Natriumascorbat *in situ* generiert werden.^[146, 149] Der im Jahr 2013 vorgeschlagene Mechanismus von Prof. Dr. V. Folkin unter Beteiligung von zwei Kupfer-Ionen ist in **Schema 9** abgebildet.^[147]

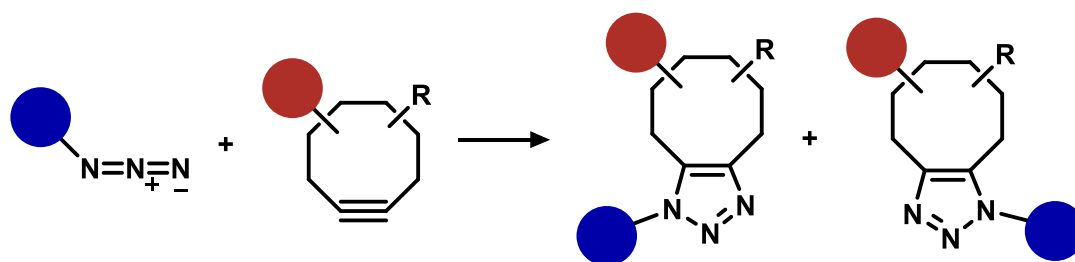


Schema 9: Mechanismus der Kupfer(I)-katalysierten Reaktion eines Azids mit einem terminalen Alkin zur Bildung eines 1,4-disubstituierten 1,2,3-Triazols.^[150]

Azide und terminale Alkine sind in der Natur kaum anzutreffen, wodurch CuAAC besonders für bioorthogonale Markierung geeignet ist und diverse Anwendungsmöglichkeiten wie die Markierung von Kohlenhydraten (*glycoengineering, glycoproteomics*)^[100, 118, 151], Aminosäuren (*proteomics*)^[152] und Sphingolipiden (*sphingolipidomics*) bietet.^[53]

2.4.3 Strain-promoted azide-alkyne cycloaddition

Im Gegensatz zu CuAAC reagiert das gespannte Cyclooctin mit einem Azid ohne die Anwesenheit von Cu(I)-Ionen aufgrund der Abweichung vom 180° Bindungswinkel gegenüber des üblichen Alkyls. Bei der kupferfreien Variante ist die Reaktionsgeschwindigkeit verhältnismäßig geringer, bietet jedoch den Vorteil, die Zytotoxizität von Cu-Ionen zu umgehen (**Schema 10**).^[142, 153]

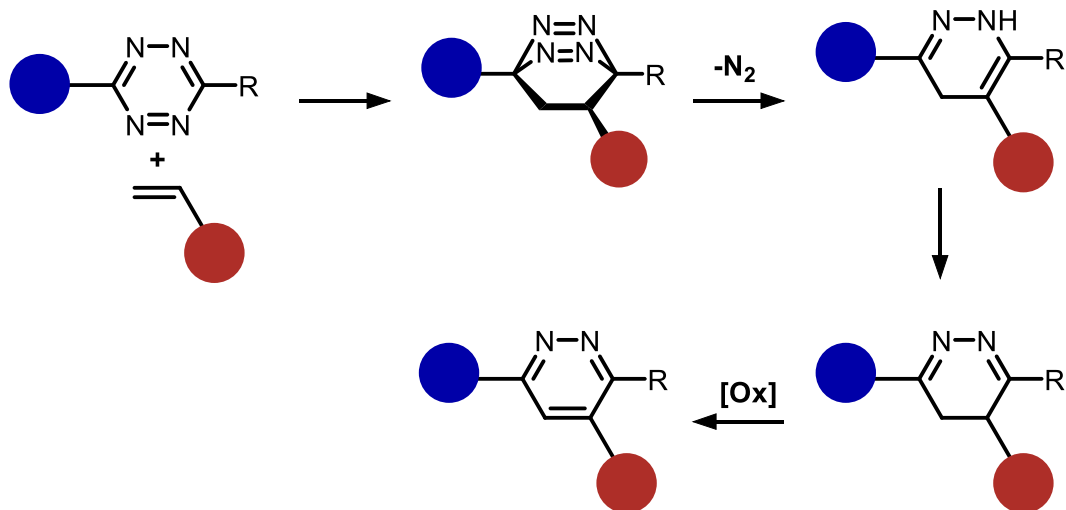


Schema 10: Reaktionsverlauf der [3+2]-Cycloaddition durch Abbau der Ringspannung eines Cyclooctin-Derivats.^[142]

Die relativ geringe Reaktionsgeschwindigkeit motivierte viele Wissenschaftler weitere gespannte Alkine zu synthetisieren. Beispielsweise zeigte das von Prof. Dr. C. Bertozzi dargestellte BARAC (biarylazacyclooctynone) eine 400-fache Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit mit Aziden gegenüber dem einfachen Cyclooctin, besaß jedoch eine geringere Stabilität.^[154-155] Cyclooctin-Derivate wurden bislang zur Konjugation von diversen Biomolekülen wie Lipiden^[156], Proteinen^[157] und Sacchariden^[90] *in vitro* und *in vivo* verwendet.

2.4.4 Inverse electron demand Diels-Alder reaction

Die Reaktion zwischen einem 1,2,4,5-Tetrazin und einem Dienophil ist die bisher am schnellsten ablaufende bioorthogonale Kopplungsmethode und erfolgt auch unkatalysiert.^[158] Bei der klassischen [4+2]-Diels-Alder-Reaktion reagiert ein elektronenreiches Dien mit einem elektronenarmen Dienophil,^[159] während bei iEDDA ein elektronenarmes Dien wie Tetrazin mit einem elektronenreichen Dienophil reagiert (**Schema 11**). Dieser Sachverhalt wird in der Literatur teilweise unterschiedlich betitelt: iEDDA (*inverse electron demand Diels-Alder reaction*)^[158, 160] oder DA_{inv}/DAR_{inv} (*Diels-Alder reaction with inverse electron demand*)^[161-162].



Schema 11: Reaktionsverlauf eines Tetrazins mit einer ungesättigten Kohlenwasserstoff-Verbindung (z.B. einem Alken).^[163]

Beispielhaft in **Schema 11** ist die Reaktion zwischen einem Alken und einem Tetrazin abgebildet. Zunächst entsteht durch die [4+2]-Addition ein Bicyklus, der sich unter Freisetzung von Stickstoff irreversibel stabilisiert. Nach einem 1,3-H-Shift erfolgt durch Oxidation mit Luftsauerstoff die Rearomatisierung.^[158]

Die Wahl des Dienophils hat einen entscheidenden Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit (Vergleich **Schema 7**). *trans*-Cycloocten (TCO) reagiert unter Abbau der Ringspannung mit Geschwindigkeiten von bis zu $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.^[158, 163-164] Dieses wurde genutzt, um unnatürliche Aminosäuren in biologische Systeme einzuführen und anschließend mit Tetrazin-modifizierten Fluoreszenzfarbstoffen anzufärben.^[165-166] TCO-markierte Aminosäuren zeigten teilweise ein hohes Hintergrundrauschen in den Fluoreszenzbildern, weil sich der unpolare Anker in der Membran festsetzt. Aus diesem Grund wurde ein hydrophileres dioxo-TCO entwickelt (**Abbildung 8**), das vergleichbare Reaktionsgeschwindigkeiten zu Tetrazinen aufweist, überschüssiges Substrat jedoch besser aus Zellen gewaschen wird und somit das Hintergrundrauschen senkt.^[167]



Abbildung 8: Strukturformeln von TCO und dioxo-TCO.

2.5 Glycan-bindende Proteine

Glycan-bindende Proteine (*glycan-binding proteins*, GBPs) werden in zwei Oberklassen eingeteilt, Lectine und Glycosaminoglycan-bindende (GAG-bindende) Proteine. GAGs sind durch Sulfat- und Carboxylgruppen negativ geladene Polysaccharide und wechselwirken elektrostatisch mit positiv geladenen Aminosäuren von Proteinen.^[168] Lectine erkennen Kohlenhydratstrukturen und können spezifisch binden.^[169]

GAGs binden an Wachstumsfaktoren, Chemokine, Zytokine und Adhäsionsmoleküle, wodurch Proteinfunktionen, Signalübertragung und Zelladhäsion gesteuert werden.^[168] Im Zeitraum dieser Promotion war die Corona-Pandemie seit Anfang 2020 in Europa ein ständiges Thema in den Nachrichten. SARS-CoV-2 dringt über die Atemwege in den Organismus ein und heftet sich mit dem Glycan-bindenden Spike-Protein an Heparansulfat der Wirtszelle.^[170] Heparansulfat ist ein Polysaccharid und besteht aus den alternierenden Monomereinheiten Glucuronsäure (partiell auch das 6-Epimer Iduronsäure) und Glucosamin.^[171-172] Die Adhäsion des Virus an die menschliche Zelle erleichtert das Eindringen über das Angiotensin-konvertierendes Enzym 2 (ACE2), ein humaner Proteinrezeptor.^[170]

Auch andere Viren wie Hepatitis C^[173] und humane Papillomviren^[174] oder Bakterien wie *Listeria monocytogenes*,^[175] welches für die Infektionskrankheit Listeriose verantwortlich ist, nutzen eigene GBPs, um an die extrazellulären und membran Polysaccharide Heparansulfat, Dermatan-sulfat oder Chondroitin-sulfat zu binden.

Die zweite Kategorie der Glycan-bindenden Proteine sind Lectine, die sich durch ihre Kohlenhydratbindestelle (*carbohydrate-recognition domain*, CRD) auszeichnen und häufig sehr spezifisch an Kohlenhydratkomplexe von Glycolipiden und Glycoproteinen binden.^[169, 176] Teilweise können GBPs nur hohe Bindungskonstanten aufweisen, wenn die Umgebung des Glycans die Wechselwirkung synergetisch begünstigt. Konkret bindet das P-Selectin nur optimal an Sialyl Lewis X unter Anwesenheit eines benachbarten sulfatierten Tyrosin-Rests am PSGL-1 Protein, während E-Selectin an selbiges Tetrasaccharid von CD44 bindet.^[177-178] Die Interaktion von Selectinen und ihren Glycokonjugaten vermittelt die Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen und steuert die Signalkaskade zu Entzündungen und Verletzungen.^[178] Durch Lectin-Ligand-Wechselwirkungen werden weitere biologische Prozesse wie Apoptose,^[179-180] Zelladhäsion,^[181-183] Endozytose,^[182] Zell-Matrix-Wechselwirkung,^[183] Immunantwort,^[181, 184] Überleben von T-Zellen^[184] und Wirt-Erreger-Wechselwirkung gesteuert.^[182, 184-185] Letztere beiden Prozesse werden von Galectinen gesteuert, die im Folgenden genauer beschrieben werden.

2.5.1 Galectine

Die Familie der Galectine weist eine hohe Homologie in ihrer Aminosäuresequenz aus ungefähr 135 Aminosäuren der Bindedomäne (*carbohydrate recognition domain*, CRD) auf und alle besitzen die Fähigkeit, β -Galactose zu binden.^[186-187] Bisher wurden in Wirbeltieren 15 Galectine identifiziert und diese in drei Klassen unterteilt. Prototypische Galectine (Galectin-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 und -15) haben jeweils eine CRD und können Dimere ausbilden, *tandem-repeat* Galectine (Galectin-4, -6, -8, -9, und -12) besitzen zwei Domänen, die durch einen Peptidlinker unterschiedlicher Aminosäurelänge (5 bis über 50) miteinander verbunden sind. Chimäres Galectin hat mit Galectin-3 nur einen Vertreter und zeichnet sich durch eine Aminosäurekette zur Ausbildung von Oligomeren mit den häufig auftretenden Aminosäuren Prolin, Glycin und Tyrosin (**Abbildung 9**) aus.^[188]

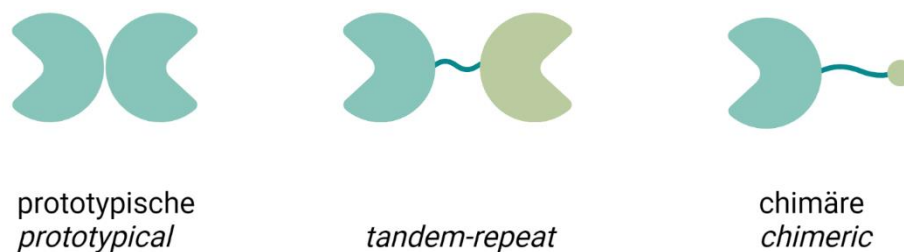


Abbildung 9: Unterteilung von Galectinen in drei Klassen. Prototypisch (Galectin-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 und -15), *tandem-repeat* (Galectin-4, -6, -8, -9, und -12) und chimär (Galectin-3). Erstellt mit BioRender.com

Durch die Wechselwirkung der CRD mit endogenen und komplexen *N*-Glycanen, tragen Galectine zur Steuerung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen sowie Signalübertragung bei.^[189-190] Dimere Galectine besitzen mehrere Bindestellen und können somit mehrere Glycoproteine verknüpfen. So führt die Bindung von Galectin an glycosylierte Proteine wie CD44 und $\alpha 5\beta 1$ -Integrin (Adhäsionsprotein) zu Oligomerisierung von Galectinen und somit zur Membrankrümmung, wodurch endozytische Gruben entstehen und Galectine über Endozytose in die Zelle gelangen.^[191] Sie werden im Cytosol exprimiert und befinden sich nicht nur auf der äußeren Plasmamembran und extrazellulären Matrix (ECM), sondern fungieren auch im Zellkern und im Cytosol. Intrazelluläres Galectin bindet häufig keine β -Galactose, kann aber dafür mit der CRD und anderen eigenen Bindestellen mit Proteinen wechselwirken. Beispielsweise beteiligen sie sich am RNA-Spleißen im Zellkern.^[192]

Erhöhte Expression von Galectin-1 (Gal-1) wurde in einigen Tumoren wie Gliomen (Tumoren des zentralen Nervensystems),^[193] Hodgkin-Lymphomen (Lymphdrüsenkrebs),^[194] Lungenkrebs,^[195] Kopf-Hals-Karzinom,^[196] Eierstockkrebs,^[197] Kaposi-Sarkom,^[198] Brustkrebs^[199] oder Prostatakrebs festgestellt.^[200] Die Überexpression von Galectinen in Tumorzellen korreliert mit der Aggressivität des Tumors und dessen Metastasierung. Ebenso

2. Kenntnisstand

aktiviert dieses durch Binden an die komplexen *N*-Glycane des VEGF-Rezeptor 2 (vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren) die Tumorangiogenese.^[201-202] Bei *Knock-Down*-Studien wurde zusätzlich gezeigt, dass bei niedriger Expression von Gal-1 und dem daraus resultierenden erhöhten Überleben von interferonproduzierenden T-Zellen der Tumor abgewehrt wird.^[203]

Das tumorassoziierte Protein rückte dadurch als möglicher Therapieansatz in den Fokus.^[204] Ein rationaler Ansatz ist die Unterdrückung seiner Funktion. Im nächsten Abschnitt werden Liganden für das Galectin-1 vorgestellt, die das Protein binden und somit inhibieren.

2.5.2 Design eines spezifischen Liganden für Galectin-1

Galectin-1 (Gal-1) ist ein kleines Protein mit einer Masse von 14.5 kDA pro Monomereinheit, welches terminale β -Galactose von komplexen Glycoproteinen auf der äußeren Zellmembran bindet. Die Bindung mit den natürlichen Substraten Lactose (Lac, Gal β 1-4Glc) oder Lactoseamin (LacNAc, Gal β 1-4GlcNAc) ist moderat mit Dissoziationskonstanten K_D im μ M bis mM Bereich. Eine kleine K_D deutet auf eine geringe Konzentration von ungebundenen Ligand und Protein und im Umkehrschluss auf eine hohe Konzentration vom gebildeten Protein-Ligand-Komplex hin.^[205-206]

$$K_D = \frac{c(\text{Ligand}) \cdot c(\text{Protein})}{c(\text{Protein-Ligand-Komplex})}$$

Derivate der natürlichen Liganden waren oftmals die Basis für weitere Modifizierungen zur Erhöhung der Bindungsaffinität und Spezifität. Im Vergleich zur natürlichen Lactose konnte beispielsweise durch Konjugation von *para*-Nitrophenol an Position 1 bereits eine doppelte Affinität zum Gal-1 erzielt werden.^[207-208]

Andere β -Galactose-Derivate zeigten eine weitaus deutlichere Steigerung der Affinität zum Gal-1 (**Abbildung 10**). Im Vergleich zur Galactose bindet Verbindung **1** 40-fach stärker an Gal-1, gleichzeitig wird durch den Triazolring eine leichte Selektivität gegenüber Gal-3 erzeugt und bindet dieses mit lediglich 10-facher Erhöhung.^[209]

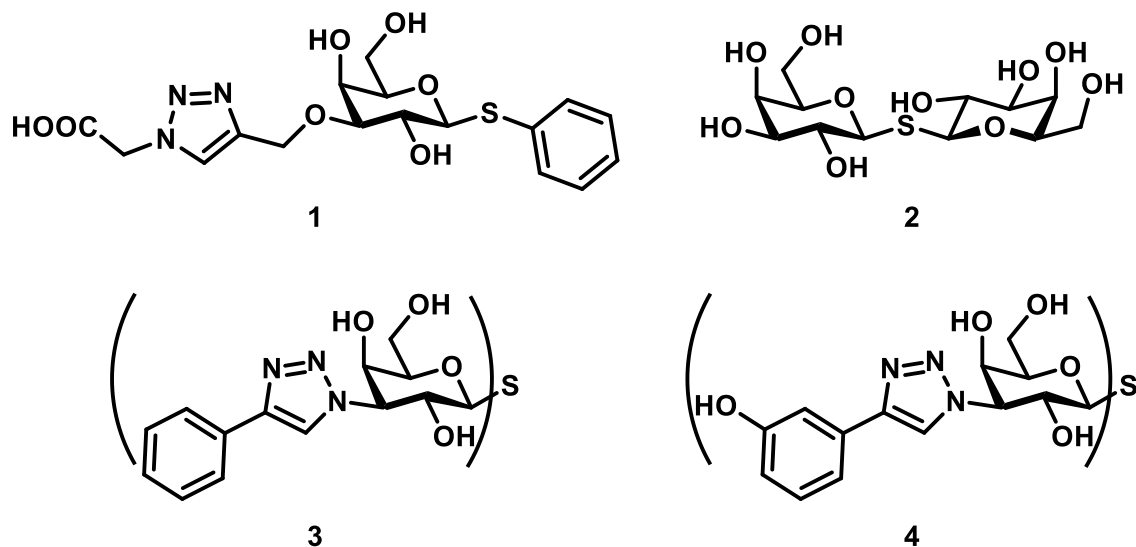


Abbildung 10: β -Galactose-Derivate als Inhibitoren für Gal-1. **1** bindet 40-fach stärker ($K_D = 250 \mu\text{M}$) im Vergleich zur Galactose.^[209] **2** bindet Gal-1 mit einer Dissoziationskonstante $K_D(\mathbf{2}) = 24 \mu\text{M}$ und seine Ableitungen **3** und **4** mit $K_D(\mathbf{3}) = 49 \text{ nM}$ und $K_D(\mathbf{4}) = 13 \text{ nM}$.^[210] Im Vergleich $K_D(\text{Gal}) = 10 \text{ mM}$ und $K_D(\text{Lac}) = 190 \mu\text{M}$.^[207]

Die Dissoziationskonstanten der natürlichen Substrate Galactose und Lactose zu Gal-1 liegen jeweils bei $K_D(\text{Gal}) = 10 \text{ mM}$ und $K_D(\text{Lac}) = 190 \mu\text{M}$.^[207] Thiodigalactosid **2** weist bereits eine stärkere Bindung mit einer $K_D(\mathbf{2}) = 24 \mu\text{M}$ auf. Die Arbeitsgruppe von *Prof. Dr. R. J. Pieters* konnte durch Einführung von aromatischen Resten an Position 3 weitere Kation- π -Interaktionen erzeugen.^[211] Die Hydroxylgruppe wurde durch ein Azid substituiert und durch CuAAC entsteht ein Triazol-Ring mit beliebig variablen Rest. **3** und **4** zeigen eine enorme Steigerung in ihrer Affinität mit $K_D(\mathbf{3}) = 49 \text{ nM}$ und $K_D(\mathbf{4}) = 13 \text{ nM}$. Dafür müssen diese Inhibitoren in ihrer Selektivität einbüßen mit Dissoziationskonstanten zu Gal-3 in gleicher Größenordnung.^[210]

Die Arbeitsgruppe *Prof. Dr. J. Seibel* modulierte und synthetisierte ein Molekül, das ebenfalls an der Position 3 der Galactose CuAAC zulässt und somit leicht modifizierbar ist. Durch Kristallstrukturen vom natürlich bindenden Lactosamin (LacNAc) mit einer Bindungskonstante von $K_D(\text{LacNAc}) = 91 \pm 5 \mu\text{M}$ wurde gezeigt, dass die Position 3 nur schwache Wechselwirkungen mit dem Protein eingeht und sich daher gut für weitere Konjugationen eignet.^[205] Durch orthogonale Schutzgruppenchemie wurde aus den jeweiligen Monosacchariden das LacNAc-Analoga mit einer Alkylgruppe an Position 3 der Galactose (3b) für CuAAC synthetisiert. Die Hydroxylgruppe an Position 1 der Glucose (1a) zeigt aus der Bindestelle heraus, wodurch dieses ebenfalls für weitere Modifikationen kandidiert. Doppelbindungen sind orthogonal zu CuAAC und lassen diverse Konjugationen wie Olefinmetathese,^[212-213] Thiol-En-Click-Reaktion^[214] oder inverse Diels-Alder-Reaktion^[158] (Vergleich **Kapitel 2.4.4 iEDDA**) zu, die für *Microarray*-Experimente oder zur Ausbildung multivalenter Inhibitoren nutzbar sind (**Abbildung 11**).^[205]

2. Kenntnisstand

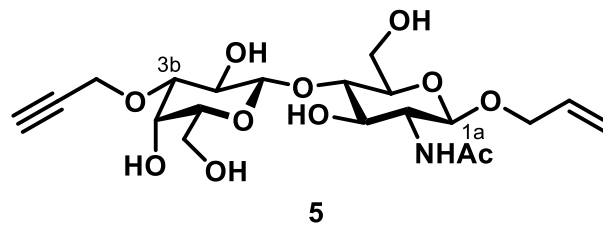


Abbildung 11: Strukturformel des LacNAc-Derivats mit Allylfunktionalisierung an anomerer Position (1a) von GlcNAc und Propargylfunktionalisierung an Position 3 von Gal. Dissoziationskonstante zum Gal-1 $K_D(5) = 107 \pm 9 \mu\text{M}$. Im Vergleich das natürliche LacNAc zum Gal-1 $K_D(\text{LacNAc}) = 91 \pm 5 \mu\text{M}$.

Affinitätsmessungen von **5** zeigten mit $K_D(5) = 107 \pm 9 \mu\text{M}$ eine nahezu unveränderte Bindungskonstante zum natürlichen Zucker $K_D(\text{LacNAc}) = 91 \pm 5 \mu\text{M}$. Zusätzlich wurde der Bindungsmodus durch eine Röntgenstruktur bestimmt (**Abbildung 12**). Die konservierte CRD von Gal-1 bindet mit den Aminosäuren His44, Asn46, Arg48, His52, Asp54, Val49, Asn61, Trp68, Glu71 und Arg73 an das Disaccharid, zusätzlich übt Trp68 mit dem Alkin π - π -Wechselwirkungen aus.^[205]

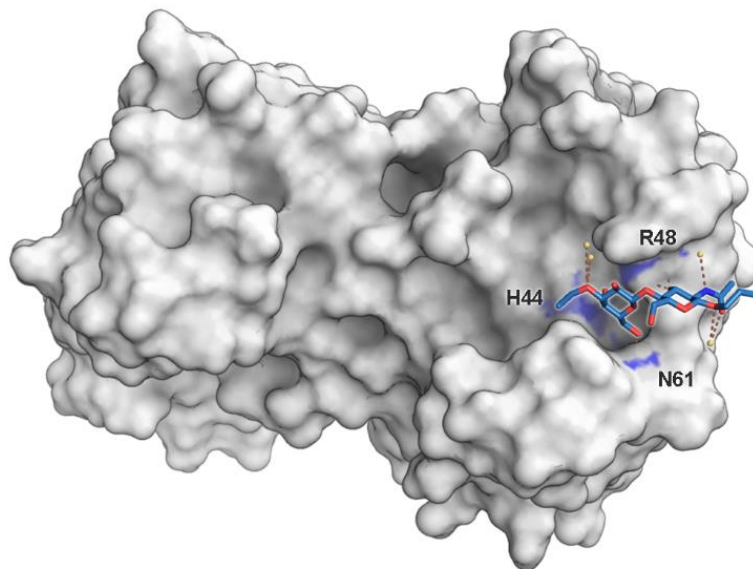


Abbildung 12: Röntgenstruktur von Galectin-1 mit synthetischem **5**. Die wechselwirkenden Aminosäuren der Bindungsdomäne sind bläulich markiert. Wasserstoffbrücken sind gestrichelt gezeigt und bindungsbeitragende Wassermoleküle als gelber Punkt dargestellt. (PDB ID: 4Q27, Auflösung 1.40 Å).

Anschließend wurden durch Reaktionen mit ausgewählten Aziden zehn potentielle Liganden dargestellt, deren Bindungskonstanten jeweils in der Größenordnung des natürlichen Substrats liegen. Die Kristallstrukturen verdeutlichten die Dominanz der CRD, wodurch die Disaccharide der zehn Konjugate jeweils den gleichen Bindungsmodus aufweisen.^[205]

Um einen weiteren Bereich der Peptidoberfläche anzusprechen wurde **5** so modifiziert, dass ein aromatischer Ring die Orientierung einer Amino-Gruppe zulässt, die nach Verlängerung mit einem internem Alkin die Aminosäure Asp125 adressiert (**Abbildung 13**).

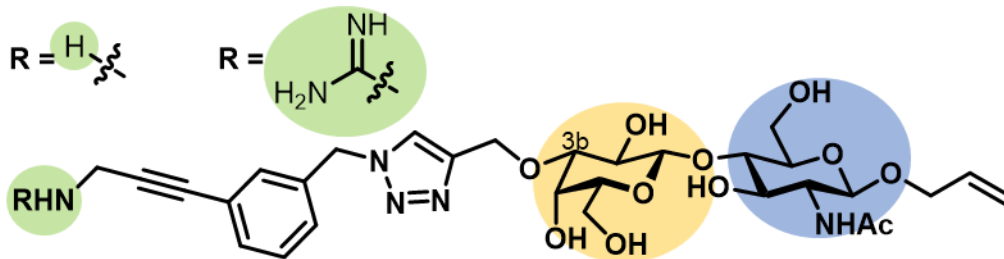


Abbildung 13: Strukturformeln der erweiterten LacNAc-Derivate. Über CuAAC wurde das Alkin erweitert und ein aromatischer Ring eingeführt mit einem starren, internen Alkin. Terminal (grün) sitzt eine Aminogruppe mit $R = H$ **6** oder eine Guanidinogruppe mit $R = C(NH)NH_2$ **7**.^[205]

Kristallstrukturen zeigen ionische Wechselwirkungen der Aminosäure Asp125 und dem terminalen Amin mit einem Abstand von 2.8 Å (**Abbildung 14**). Über ein Wassermolekül bildet der Triazolring H-Brücken zur Aminosäure Asn33 aus, während der Benzolring in räumlicher Nähe zu Asp123 ist. Die LacNAc-Struktur bei dieser Verbindung befindet sich entsprechend des natürlichen Zuckers gleichermaßen in der Bindetasche.^[205]

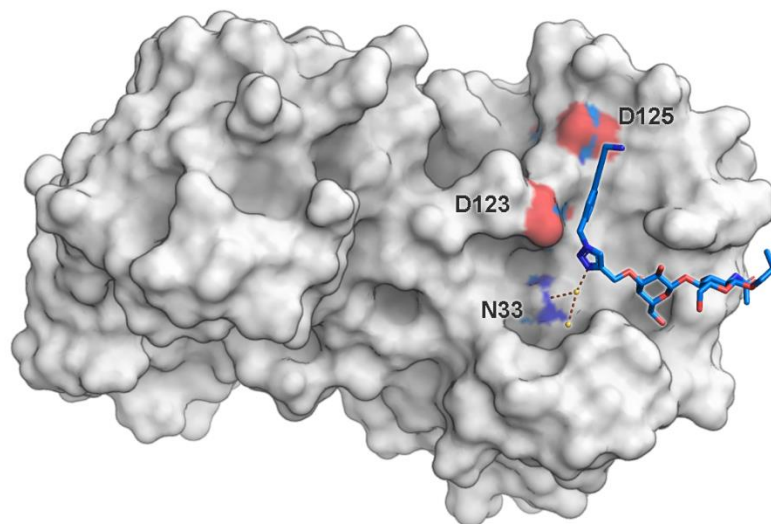


Abbildung 14: Kristallstruktur von Gal-1 mit synthetischem **6**. Die wechselwirkenden Aminosäuren der Bindungsdomäne sind bläulich und rot markiert. Wasserstoffbrücken sind gestrichelt gezeigt und bindungsbeitragende Wassermoleküle als gelber Punkt dargestellt. (PDB ID: 5MWX, Auflösung 1.29 Å).^[205]

3 Motivation

Der Bedarf an Organ- und Gewebeersatz motiviert die Wissenschaft zur künstlichen Erzeugung der lebenswichtigen Elemente. Dazu werden Zellen mit einem Biomaterial versetzt (vereint werden diese als Biotinte definiert) und durch additive Fertigungsmethoden wie dem 3D-Druck zu hierarchischen Strukturen aufgebaut.^[11] Im Rahmen der Dissertation, war das Ziel, ein System zu generieren, dass es ermöglicht, die Zellmembranen von mesenchymalen Stromazellen gezielt verändern zu können, damit sowohl Proliferation, Funktion der Zelle, Differenzierung und Steifigkeit an den Druckprozess und das Material für die Anwendung angepasst bzw. variiert werden können. Dazu sollte in dieser Arbeit *metabolic glycoengineering* (auch *metabolic labeling* genannt) durchgeführt werden.^[79]

Zur Untersuchung von Zell-Matrix-Wechselwirkung sollen diverse humane Saccharid-Derivate dargestellt werden. Dieses Projekt wurde von der Deutschen Fördergemeinschaft im Sonderforschungsbereich TRR225 Biofabrikation finanziert. Die Kooperationen sollen genutzt werden, um synthetische Zucker an biologischen Systemen zu testen.

Für das *metabolic glycoengineering* sollen diverse bioorthogonale Monosaccharide synthetisiert und strukturell als auch biosynthetisch charakterisiert werden. Im Vordergrund stehen dabei die Sialinsäuren **8** (**Abbildung 15**) neben weiteren bioorthogonalen Zuckern. Eine langkettige Seitenkette versetzt mit einer bioorthogonalen Funktion (Azid, Alkin) soll die Aufnahme in die mesenchymalen Stammzellen ermöglichen. Die Sialinsäure ist der letzte Zucker der komplexen Oligosaccharide und nimmt bei der Erkennung von Viren und Bakterien aber auch von Siglec-Liganden (*sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins*) eine besondere Stellung ein.^[82] Im Vergleich mit den metabolischen Vorstufen, den Mannosamin Derivaten, soll der Einsatz von bioorthogonalen Sialinsäuren einen höheren Einbau in die Glycoproteine ermöglichen. In diesem Zusammenhang soll ebenfalls untersucht werden, ob der metabolische Einbau mit Hilfe unterschiedlicher Monosaccharide eine Auswirkung auf die Markierung von Glycoproteinen zeigt.

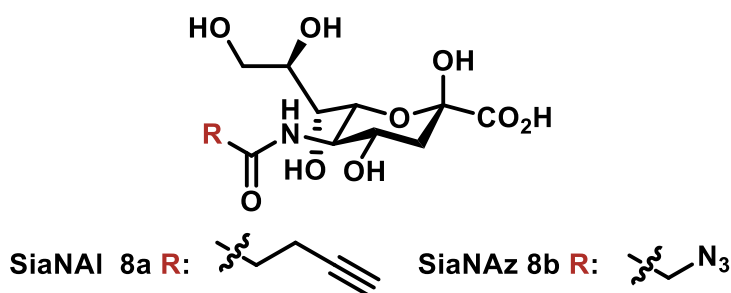


Abbildung 15: Strukturformeln der bioorthogonalen Sialinsäuren für das *metabolic glycoengineering*.

Die artifiziiellen Monosaccharide sollen im Forschungsverbund von der Forschungsgruppe Prof. Dr. R. Ebert an humanen mesenchymalen Stromazellen (hMSC) hinsichtlich Einbaueffizienz und Zellverhalten evaluiert werden.

Nach erfolgreichem Einbau der Monosaccharide in die Glycocalyx der Außenmembran sollen die mit bioorthogonalen Gruppen versehenen hMSC mit Liganden konjugiert werden, die eine Steuerung der Adhäsion und/oder die Steifigkeit der Zelle zu erwarten lassen. Als komplexe Liganden sollten dazu Galectin-1 Liganden entwickelt werden. Galectin-1 soll im Kontext mit hMSC und Tumoren genauer untersucht werden.

Die Synthese der Gal-1 Liganden wurde teilweise bereits in der eigenen Masterarbeit 2018 bearbeitet.^[215] Die Synthesen sollen vollendet und die Moleküle charakterisiert werden (**Abbildung 16**). Zusätzlich sollen die Affinitäten zum Protein mittels isothermer Kalorimetrie bestimmt und Röntgenstrukturen der Protein-Ligand-Komplexe untersucht werden.

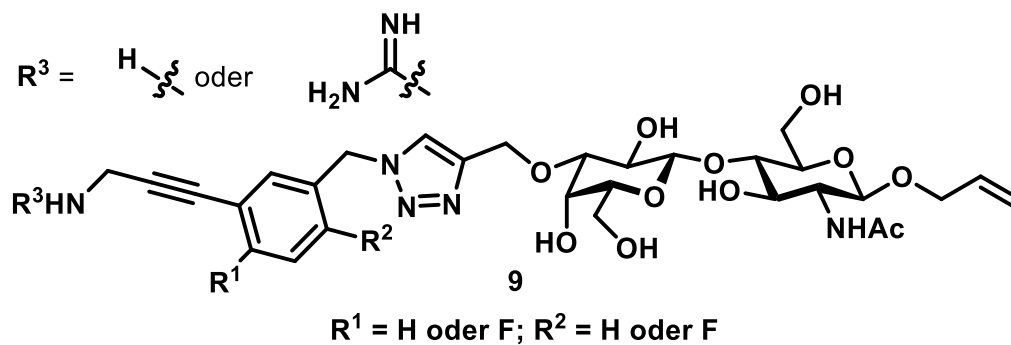


Abbildung 16: Strukturformeln der Gal-1 Liganden.

Für eine kovalente Konjugation auf die Zelloberflächen sollen die Galectin-1 Liganden um eine bioorthogonale Gruppe erweitert werden. Dafür dient die Doppelbindung, die keine Wechselwirkungen mit dem Gal-1 ausbildet.

Diese sollen anschließend zur Zellmodifikation genutzt und der Effekt evaluiert werden. Durch diverse Kooperation im Verbund können Messungen der Zellsteifigkeit bei Prof. Dr. B. Fabry erfolgen.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Metabolic glycoengineering

Das erste Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung von bioorthogonal funktionalisierten Monosacchariden, die für das *metabolic glycoengineering* an humanen mesenchymalen Stromazellen (hMSC) oder auch telomerase-immortalisierte Zellen (hMSC-TERT) geeignet sind.

4.1.1 Synthese von Monosacchariden

Für Untersuchungen zum metabolischen Einbau in humane mesenchymale Stromazellen (hMSC) oder auch telomerase-immortalisierte Zellen (hMSC-TERT) wurden geeignete Monosaccharide hergestellt. Die Azidozucker *Ac*₄*GalNAz* **10** und *Ac*₄*GlcNAz* **11** sind kommerziell erhältlich, wohingegen die Mannosaminderivate **12a** und **12b** dargestellt wurden. (**Abbildung 17**).

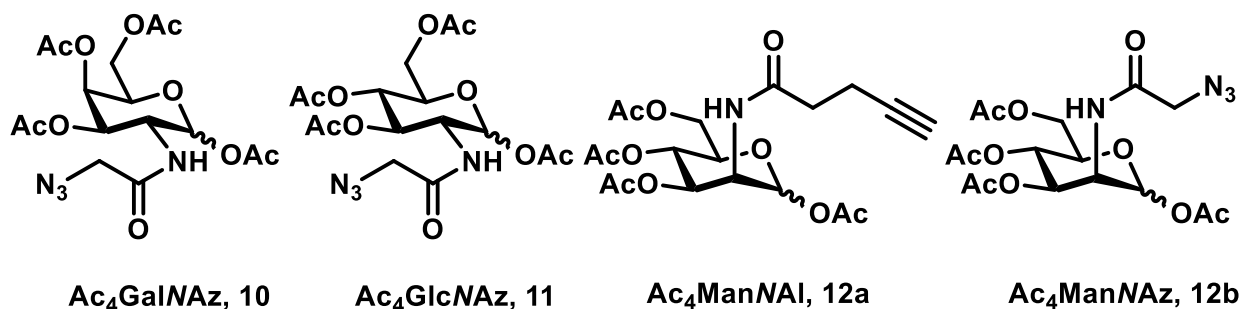
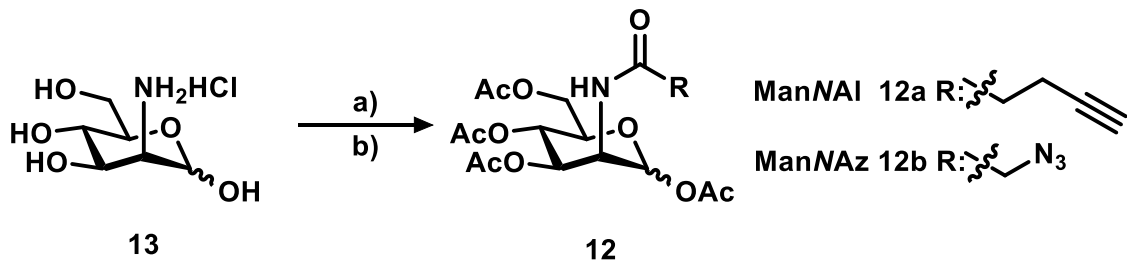


Abbildung 17: Strukturformel ausgewählter bioorthogonaler Monosaccharide.

4.1.1.1 Acetylierte Monosaccharide

In der Literatur wurden für das *glycoengineering* häufig die Azidozucker *Ac*₄*GalNAz* **10**, *Ac*₄*GlcNAz* **11**, und *Ac*₄*ManNAz* **12b** verwendet.^[87, 90, 119] Die Azidogruppe erlaubt weitere Modifikationen durch Staudinger-Ligation, CuAAC oder SpAAC.^[103, 105, 154] *Ac*₄*ManNAz* **12b** und *Ac*₄*ManNAI* **12a** mit einem Alkin (Pentyn) wurden synthetisiert, um die Vielfalt der Reaktionsmöglichkeiten auf der Zelloberfläche zu erweitern.

Dazu wurde Mannosaminhydrochlorid zuerst mit einer *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) aktivierten Säure (Azidoessigsäure oder Pentinsäure) in MeOH und Na₂CO₃ als Hilfsbase zur Reaktion gebracht. Nach Aufreinigung wurde das Amid mit Ac₂O und Pyridin peracetyliert (**Schema 12**) und nach Säulenchromatographie über Kieselgel mit Gesamtausbeuten von 78 % oder 85 % erhalten.



Schema 12: Synthese von bioorthogonalen Mannosamin-Derivaten. **a)** Pentinsäure-NHS-ester oder Azidoessigsäure-NHS-ester, Na_2CO_3 , MeOH, RT, 16 h, 85 % für **12a** und 78 % für **12b**. **b)** Ac_2O , Py, RT, 16 h, quant.

Zur Visualisierung eignen sich Cyanin-Fluoreszenzfarbstoffe, die eine Zellverträglichkeit und Wasserlöslichkeit aufweisen (**Abbildung 18**). Das Cy5-Azid **14** wurde von *Dr. Natalia Wolf* aus der Arbeitsgruppe *Prof. Dr. J. Seibel* zur Verfügung gestellt.^[216] Cy3-Alkin **15** wurden kommerziell erworben.

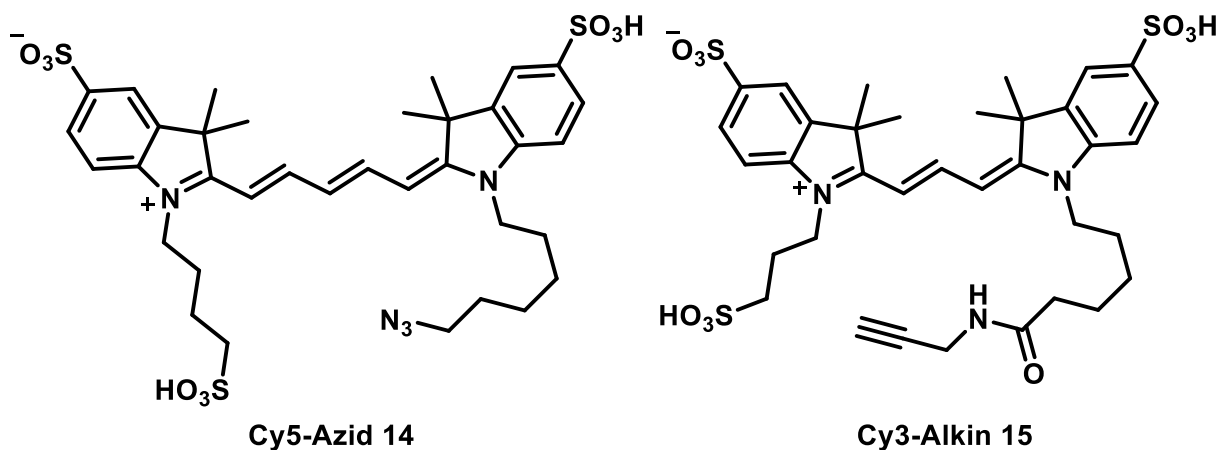


Abbildung 18: Strukturformel der eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe zur Färbung der Zellen.

Die peracetylierten Monosaccharide wurden für 72 h in der Zelllinie hMSC-TERT kultiviert und der Einbau anschließend durch Click-Reaktion mit einem Farbstoff nachgewiesen. Dazu wurden die Zellen für 5 min mit dem entsprechenden Fluoreszenzfarbstoff, CuSO_4 , Natriumascorbat (NaAsc) und der Kupferligand Tris(3-hydroxypropyltriazolymethyl)amin (THPTA) zur Senkung der Schwermetalltoxizität versetzt. Überschüssiger Farbstoff wurde durch dreimaliges Waschen der Zellen mit Phosphatpuffer (*phosphate buffered saline*, PBS) entfernt. Diese Arbeiten wurden von *Dr. Stephan Altmann* aus der Arbeitsgruppe *Prof. Dr. R. Ebert* im Rahmen seiner Promotion durchgeführt.^[100]

Die Zellen wurden für die Fluoreszenzaufnahmen mit einer Lösung aus Formaldehyd und Glycerinaldehyd fixiert. Die Verwendung von Mannosamin zeigt unter ansonsten gleichen Bedingungen eine stärkere Färbung der Glycocalyx im Vergleich zu den anderen

4. Ergebnisse und Diskussion

Monosacchariden (**Abbildung 19**). Mannosamin wird in die entsprechende Sialinsäure metabolisiert und in *N*- und *O*-Glycoproteinen auf die Zelloberfläche gebracht, während GalNAz und GlcNAz bevorzugt in cytosolische *O*-Glycoproteinen eingebaut werden, die demnach für die *in vitro* Click-Reaktion nicht zur Verfügung stehen.^[80] Andere Zelllinien jedoch zeigten hervorragende Färbung der Oberflächen durch Fütterung mit Ac₄GlcNAz oder Ac₄GalNAz, was auf eine zellspezifische Aufnahme und Einbau der jeweiligen Zellen hindeutet.^[80]

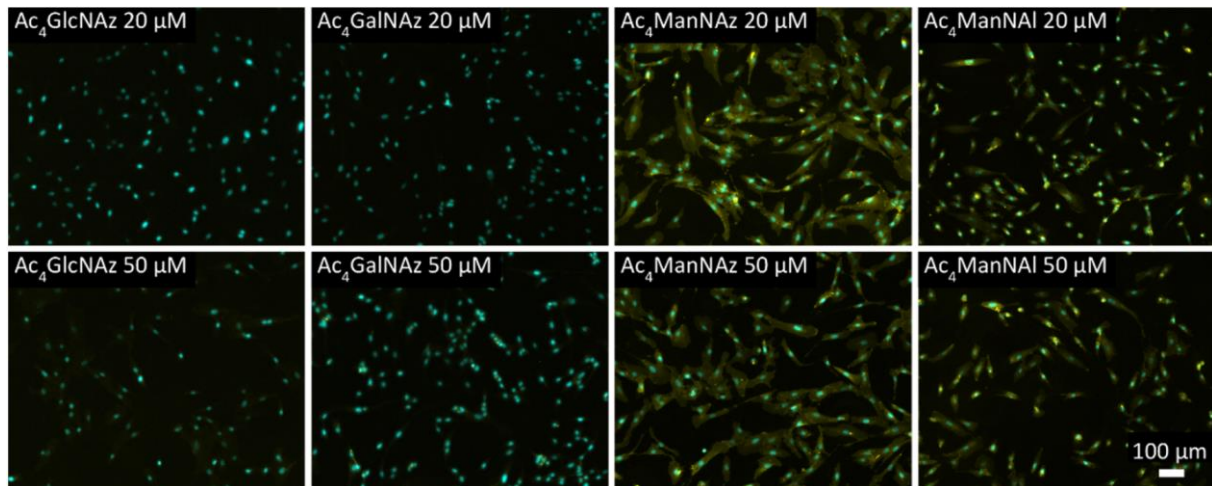


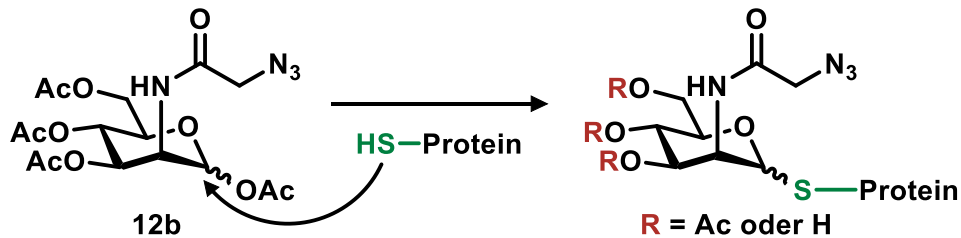
Abbildung 19: Fluoreszenzaufnahmen von hMSC-TERT nach 72 h Inkubation mit bioorthogonalen Monosacchariden in 20 µM- oder 50 µM-Konzentration. Gelbes Fluoreszenzsignal entsteht nach CuAAC mit Cy3-Alkin **15** oder Cy5-Azid **14** für 5 min. Zur Entfernung von ungebundenem Farbstoff wurden die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen. Blaues Fluoreszenzsignal durch Zellkernfärbung (DAPI). Diese Abbildung wurde von *Dr. Stephan Altmann* erzeugt und aus *Altmann et al.* entnommen, das als *open access article* im *International Journal of Molecular Science* publiziert wurde.^[100]

Stromazellen können in andere Zelltypen differenzieren, weswegen *Dr. Stephan Altmann* weiterhin die Auswirkung der Zucker auf die Multipotenz analysierte. Die Differenzierung zu Osteoblasten (Knochenzellen) kann durch Färbung mit Alizarinrot nachgewiesen werden.^[217] Dabei bindet Alizarin an das Calcium der Knochen und lässt dieses hellrot erscheinen. Weiterhin wird die Differenzierung zu Adipozyten (Fettzellen) durch Färbung mit dem Bisazofarbstoff *Oil Red O* visualisiert, indem dieses Triglyceride dunkelrot färbt.^[218]

Die Experimente zeigten keine Auswirkungen der Zucker bei 20 µM- oder 50 µM-Konzentration auf die osteogene oder adipogene Differenzierung. Zusätzlich wurde von *Dr. Stephan Altmann* die Genexpression von sieben Genen untersucht, bei denen in der Literatur bereits über eine veränderte Expression nach Zugabe von **12b** berichtet wurde.^[219] Auch hier wurde keine signifikante Veränderung festgestellt, so dass *glycoengineering* mit Mannosaminen keinen negativen Einfluss auf die Zellbiologie und die Differenzierung der hMSC-TERT hat.^[100]

Zahlreiche Publikationen verwendeten aufgrund ihrer Membranpermeabilität peracetylierte Monosaccharide für das *glycoengineering*. 2018 konnten *Prof. Dr. C. Wang* und *Prof. Dr. X.*

Chen einen wichtigen Nachteil dieser Zucker zeigen, indem sie eine vorher nicht beachtete unspezifische Nebenreaktion nachwiesen. Nukleophile Thiole von Cysteinresten reagieren mit der anomeren Position und substituieren dort das Acetat (**Schema 13**). Zusätzlich konnten partiell deacetylierte Zucker auf den Proteinen detektiert werden.^[118]



Schema 13: S-Glycosylierung von Cysteinresten an Proteinen durch Ac₄ManNAz.^[118]

Diese Reaktion wurde ebenfalls bei Zugabe von Ac₄ManNAz **12b** zum Zelllysat beobachtet, wodurch eine enzymatische S-Glycosylierung ausgeschlossen wurde, da beim Lysat die Enzyme inaktiv sind. Zusätzlich konnte bei der Verwendung von nicht-acetylierten Zuckern sowohl *in vitro* als auch im Zelllysat keine Glycosylierung am Cystein beobachtet werden, weswegen die Autoren die Verwendung von ungeschützten Zuckern vorschlugen.^[118]

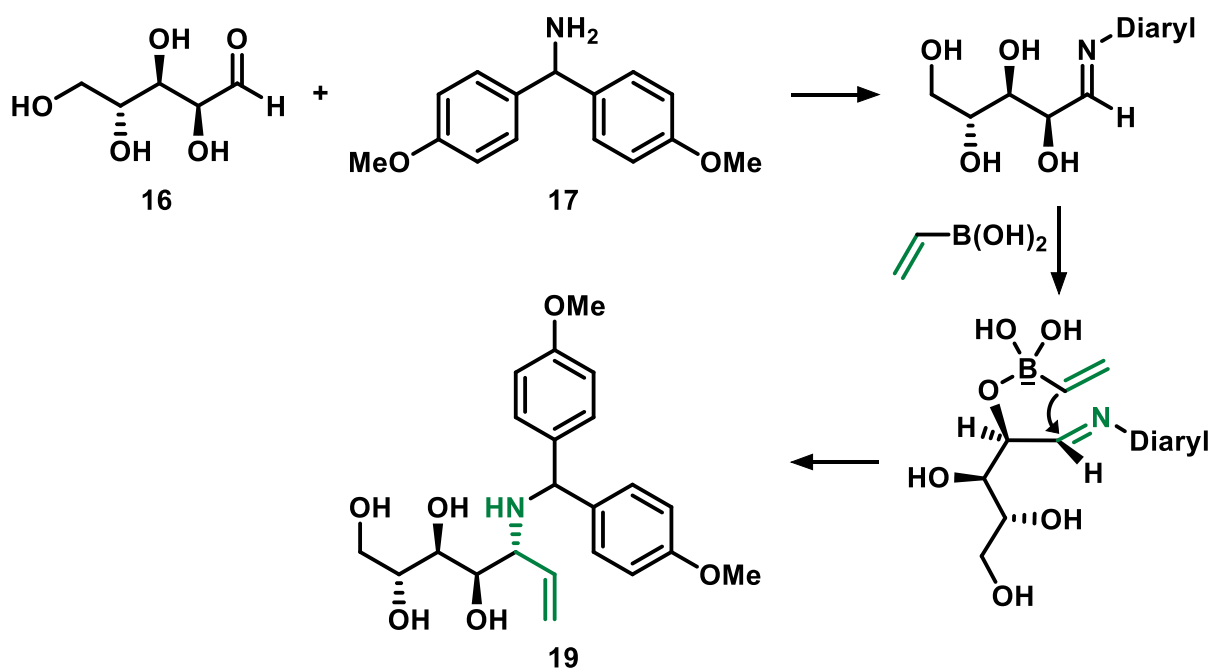
Dazu sollten die bioorthogonalen Mannosamin-Analoga vor ihrer Acetylierung für das *glycoengineering* getestet werden. Diese werden im Roseman-Warren-Biosyntheseweg in die entsprechende Sialinsäure metabolisiert und terminieren häufig die Glycanketten von Oberflächenproteinen. Zusätzlich sollten die bioorthogonalen Sialinsäuren synthetisiert und evaluiert werden. Mögliche Vorteile sind ein schnellerer Einbau^[112] und eine erhöhte Selektivität, da ManNAc durch Epimerasen im Gleichgewicht mit GlcNAc^[220] und somit auch mit GalNAc stehen^[79, 221], die häufig auch als O-Glycoprotein im Cytosol enden.^[80]

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1.1.2 Sialinsäure-Derivate

Zur Darstellung von Sialinsäuren können verschiedene Strategien verfolgt werden, von totalsynthetischen über partiell enzymatische Reaktionspfade.^[101, 222] In dieser Arbeit wurde die Synthesestrategien von *Wong et al.* und *Homann et al.* verfolgt.^[99, 223]

Der erste Syntheseschritt sieht eine Mehrkomponentenreaktion vor, bei der drei Reaktionsschritte ohne Aufarbeitung durchgeführt werden. D-Arabinose **16** wurde mit 1.00 Äq. Arylamin **17** und mit 2.00 Äq. Vinyltributylborsäureester **18** in einer Petasisreaktion für 72 h bei 50 °C in wässrigem Ethanol (80 % EtOH) zur Reaktion gebracht. Dabei reagiert der Aldehyd zuerst zum Imin. Die Borsäure wird hydrolysiert und koordiniert danach am benachbarten Sauerstoff, wodurch der anschließende nukleophile Angriff zu einem nahezu diastereomerenreinen Molekül **19** führt (**Schema 14**). Die eingeführte Doppelbindung steht für vorgesehene Cycloadditionsreaktionen zur Verfügung.^[223]



Schema 14: Stereoselektive Petasis-Reaktion, EtOH/H₂O, 50 °C, 72 h. D-Arabinose **16** wird mit einer Vinylgruppe und einem Amin erweitert.^[223]

Entsprechend der Literaturvorschrift haben die Experimentatoren der Gruppe *Wong et al.* ohne Aufarbeitung Trifluoressigsäure (TFA) hinzugegeben und die Reaktionslösung für 16 h auf 50 °C erhitzt. Das entstandene primäre Amin (Vergleich **21** aus **Schema 15**) reagiert anschließend mit einer aktivierten Säure zu einem stabilen Amid. Das Lösungsmittel wurde anschließend entfernt und die aktivierte Säure mit Na₂CO₃ als Hilfsbase in Methanol für 1 h bei RT zur Reaktion gebracht. Für die dreistufige Synthese wurden hier Ausbeuten von 50-60 % angegeben.^[223] Dieser beschriebene Syntheseweg konnte nicht reproduziert werden und musste verbessert werden.

Beim ersten Teilschritt dieser Synthese wurde eine deutliche Braunfärbung beobachtet und Edukt **16** konnte auf der DC (Dünnschichtchromatographie) nicht mehr detektiert werden, dafür ein neuer Fleck (*spot*) **19**, der positiv auf Zuckerrfärbung oder Oxidationsfärbung reagiert. Eine Vergleichsprobe wurde entnommen und dem Reaktionsgemisch TFA hinzugegeben. Nach über 16 h konnte der *spot* der Zwischenstufe **19** immer noch detektiert werden, weswegen die Reaktionszeit auf 40 h erweitert wurde. Anschließend wurde entsprechend der Vorschrift das Lösungsmittel entfernt und 2.00 Äq. der entsprechenden Säure (Pentinsäure oder Azidoessigsäure) als *N*-Hydroxysuccinimid-Ester (NHS-Ester) und Hilfsbase in Methanol zugegeben. Auf der DC konnten nach 1 h mehrere *spots* detektiert werden. Zur Sicherstellung einer quantitativen Reaktion wurde das Gemisch weitere 16 h gerührt und die doppelte Stoffmenge an aktivierter Säure zugegeben. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde ein dunkelrot-bräunliches Öl erhalten, dessen Komponenten säulenchromatographisch aufgetrennt wurden. Die Zielmoleküle **23** konnten in mehreren Anläufen jeweils in Ausbeuten von 7-19 % isoliert werden und mussten dabei mindestens zwei Mal säulenchromatographisch gereinigt werden. Weiterhin wurde die Zwischenstufe **19** in 5-13 % isoliert, obwohl die Reaktionszeit für die saure Abspaltung des Aryls mehr als verdoppelt und auch die Konzentration der Säure erhöht wurde.

Als effizientere Route zeichnete sich die Isolierung von **19** nach der Petasis-Reaktion aus (**Schema 14**). Dieses konnte nach einer Säulenfiltration mit einem Überschuss an Ac₂O und Pyridin per-*O*-acetyliert werden (**a**). Acetylierungen von Zuckern verlaufen weitgehend quantitativ und verändern die Polarität, weswegen die Produkte mit Dichlormethan (DCM) oder Essigsäureethylester (EE) aus der wässrigen Phase extrahiert werden können, während die Bor-Salze in wässriger Lösung verbleiben. Zusätzlich erfolgt die Entschützung meistens mit NaOMe und das Produkt wird nach Aufarbeitung quantitativ erhalten. Somit konnte die peracetylierte Verbindung **20** mit 59 % Ausbeute synthetisiert werden (**Schema 15**). Ein weiterer Vorteil durch die unpolaren Eigenschaften zeigte die saure Abspaltung des Diaryl-Restes. Diese erfolgte in DCM und verfärbte sich nach Zugabe von TFA rötlich. Nach 10 min konnte das Edukt auf der DC nicht mehr detektiert werden (**b**). Im Vergleich dazu sieht die Literaturvorschrift hierfür eine Reaktionszeit von 16 h im wässrigen Milieu vor.^[223]

Das erhaltene primäre Amin **21** wurde mit 1.50 Äq. der jeweiligen Säuren zur Reaktion gebracht, nachdem diese mit HATU in DIPEA und *N,N*-Dimethylformamid (DMF) aktiviert wurden. Die Amide **22** wurden mit bis zu 73 % Ausbeute isoliert (**c**) und die Acetylgruppen anschließend mit einem Überschuss NaOMe (**d**) entfernt. Mit Ionentauscher wurde die Lösung neutralisiert und die Olefine **23** in quantitativen Ausbeuten erhalten. Die ¹H-NMR-Spektren sind in **Abbildung 20** abgebildet. Die Allylprotonen sind bei etwa 6.0 ppm und 5.2-5.3 ppm tieffeldverschoben und können durch ihr Kopplungsmuster (ddd) und ihren Kopplungskonstanten (17.3 Hz für *H*-1_{trans} und 10.5 Hz *H*-1_{cis}) von *H*-2 zugeordnet werden.

4. Ergebnisse und Diskussion

Das Multiplett *H*-3 kann durch die Korrelation im HMBC zu *C*-1 und *C*-2 bei 136.6 und 116.7 ppm identifiziert werden. Die Protonen *H*-7 sind diastereotop und erscheinen als zwei Signale mit der typischen geminalen Kopplung von 11.0 Hz. Das Kopplungsmuster vom benachbarten *H*-6 ist ein ddd. *H*-4 und *H*-5 können durch Korrelationen im COSY zugeordnet werden. Für Azid **23b** resoniert *H*-2' als Singulett bei 3.97 ppm, während diese bei Alkin **23a** als Multiplett mit *H*-3' bei 2.44–2.50 ppm zusammenfallen. Das Alkinproton *H*-5' ist als Multiplett bei 2.30 ppm zu sehen.

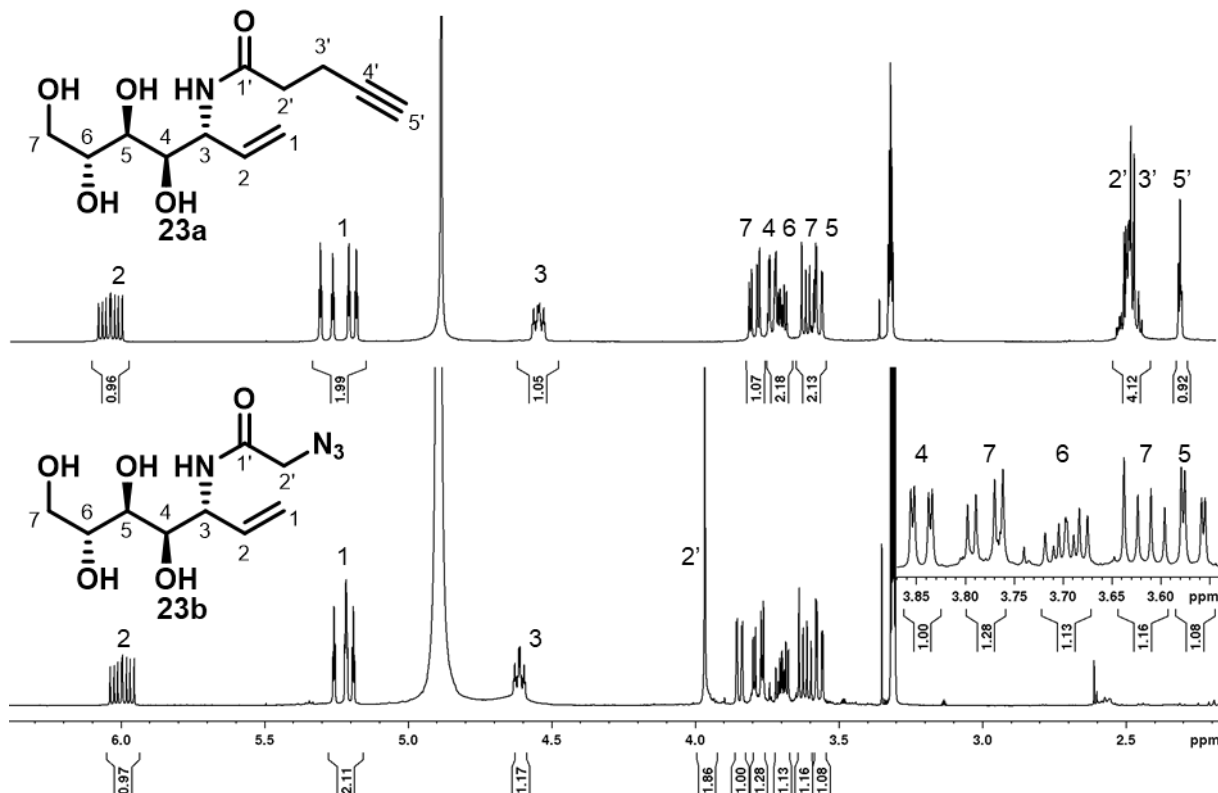
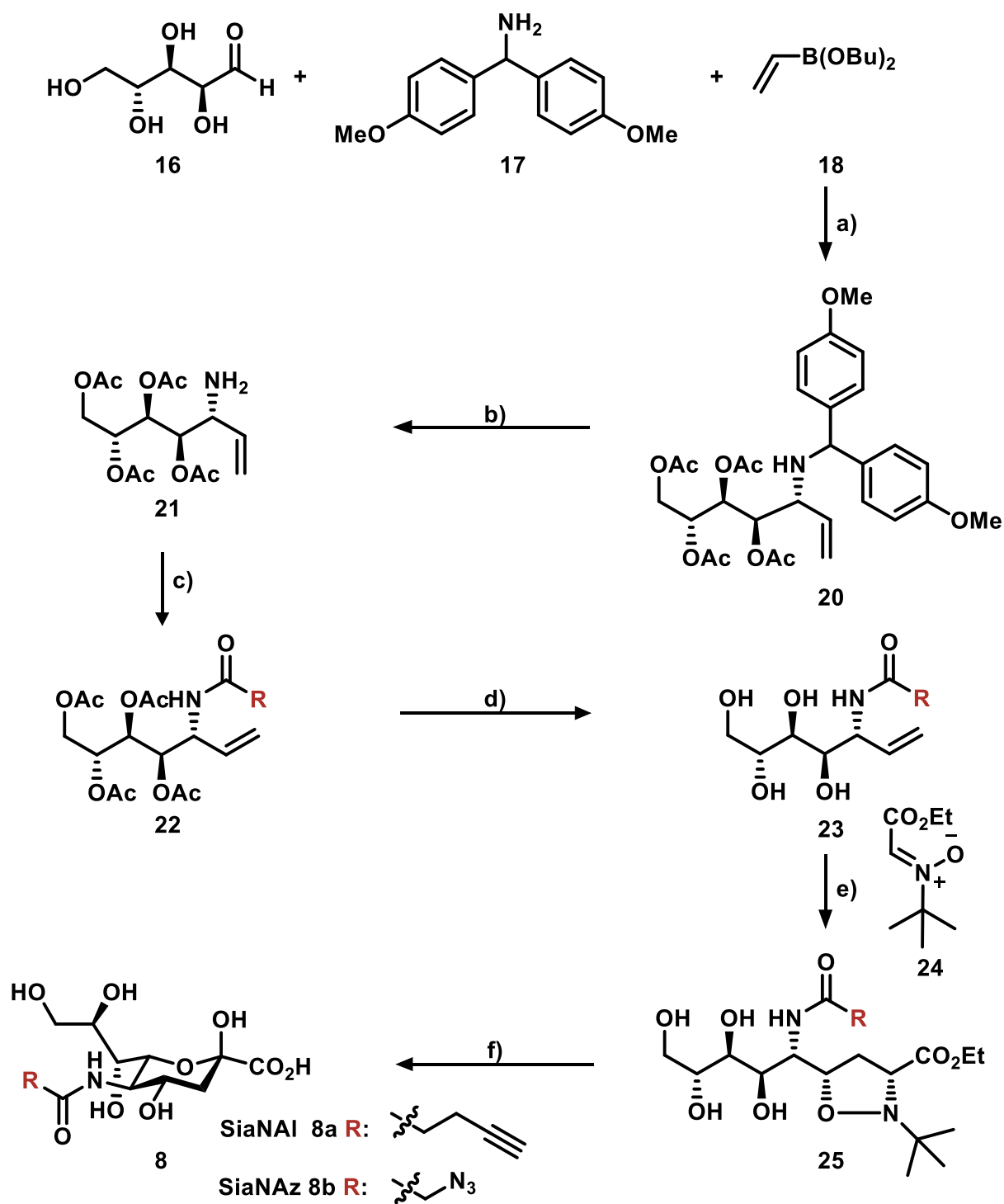


Abbildung 20: ¹H-NMR-Spektren (400 MHz, MeOD) der Verbindungen **23**.

Im folgenden Schritt wurden die Olefine **23** entsprechend der Literaturvorschrift mit 2.00 Äq. Nitron **24** für 2 Wochen bei 30 °C in einer [3+2]-Cycloaddition zur Reaktion gebracht (**e**). Die Azidogruppe ist orthogonal zum Nitron, weswegen **25b** mit einer Ausbeute von 69 % isoliert wurde, während das Alkin ebenfalls mit dem Nitron reagierte. Trotzdem wurde das gewünschte Produkt **25a** mit 54 % Ausbeute erhalten. Durch die sterisch anspruchsvolle *tert*-Butylgruppe verläuft die Cyclisierung zum jeweiligen Isoxazolidin stereoselektiv. In den ¹H-NMR-Spektren (hier nicht abgebildet, siehe Experimentalteil) fehlen die Signale der olefinischen Protonen, dafür resonieren die Protonen der *tert*-Butylgruppe charakteristisch als Singulett bei 1.29 ppm.

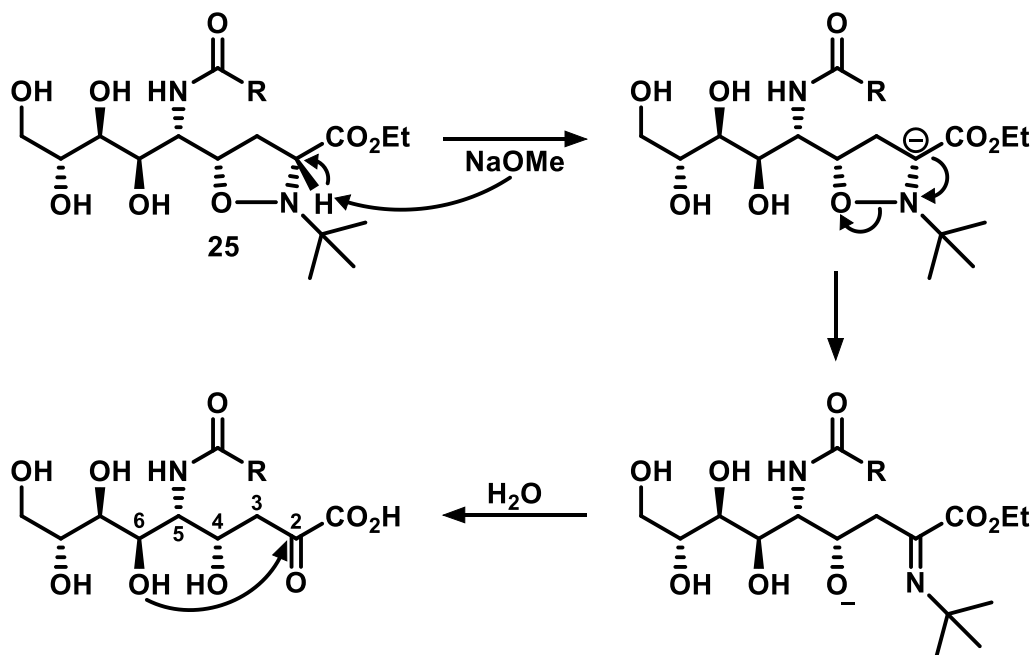


Schema 15: Synthese der Sialinsäure-Derivate mit bioorthogonalen Gruppen in der Seitenkette von C-5. a) EtOH, H₂O, 1 d, 50 °C; dann Ac₂O, Py, RT, 20 h, 59 %; b) TFA, DCM, 10 min, RT, quant.; c) Azidoessigsäure oder Pentinsäure, HATU, DIPEA, DMF, RT, 15 h, 52–73 %; d) NaOMe, MeOH, RT, 30 min, quant. e) Nitron **24**, Dioxan, 30 °C, 2–4 Wochen, 54–69 %; f) NaOMe, 24 h, RT, dann H₂O, 24 h, RT, 77–82 %.

Im letzten Reaktionsschritt wurde das α -Proton des Esters im basischen Milieu deprotoniert, wodurch sich ein Imin und das Alkoholat bilden. Um eine quantitative Reaktion zu garantieren, wurde ein Überschuss an NaOMe eingesetzt und die Reaktionszeit auf 24 h erhöht. Anschließend wurde durch Zugabe von Wasser das Imin zum Keton hydrolysiert. Das

4. Ergebnisse und Diskussion

entstehende NaOH verseift den Ester zur Carbonsäure (**Schema 16**). Wie alle Saccharide bilden auch Sialinsäuren hexacyclische Acetale zwischen C-2 und OH-6. (Vergleich **Schema 15**).



Schema 16: Mechanismus der basischen Spaltung von Isoxazolidin **25** mit anschließender Hydrolyse des Imins und Verseifung des Esters.

Die Diskussion der NMR-Daten (**Abbildungen 21 und 22**) erfolgt repräsentativ anhand von Verbindung **8b**, da sich lediglich die Seitenkette unterscheidet. Der Erfolg der Reaktion ist an den fehlenden Signalen für die *tert*-Butylgruppe und des Ethylesters zu erkennen. Für Sialinsäure charakteristisch sind die beiden Protonen *H*-3, die vergleichsweise hochfeldverschoben bei etwa 1.8 und 2.2 ppm mit einer geminalen Kopplung von 12.1 Hz resonieren. Das axiale Proton koppelt zusätzlich mit 12.0 Hz zu *H*-4, das äquatoriale hingegen mit einer wesentlich kleineren *cis*-Kopplung von 4.7 Hz. C-3 resoniert bei 41.0 ppm. Die quartären Kohlenstoffatome des Amids und der Säure sind stark tieffeldverschoben und resonieren bei 171.6 und 173.6 ppm. Die typische Verschiebung für das Kohlenstoffatom des Acetals ist bei 96.6 ppm zu sehen und ist auch durch die Korrelation zu *H*-3 bestätigt.

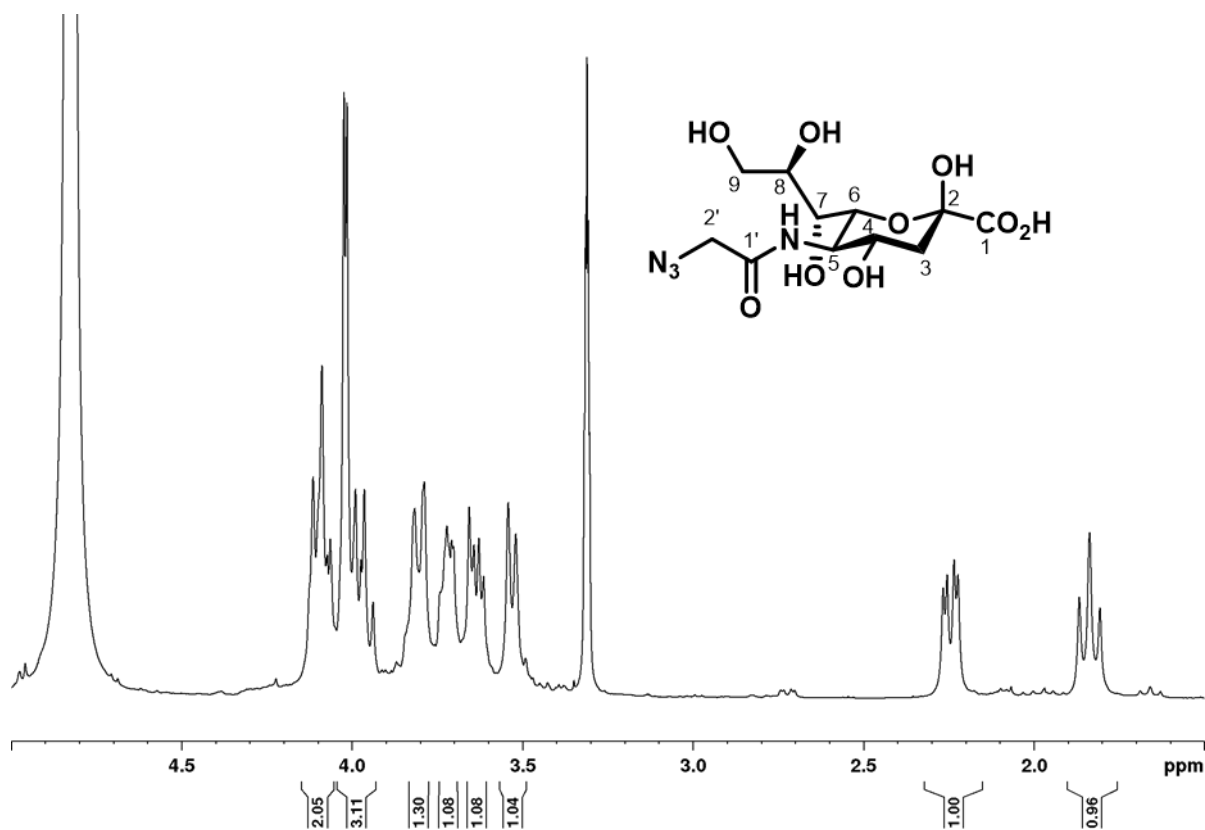


Abbildung 21: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, MeOD) der Verbindung SiaNAz **8b**.

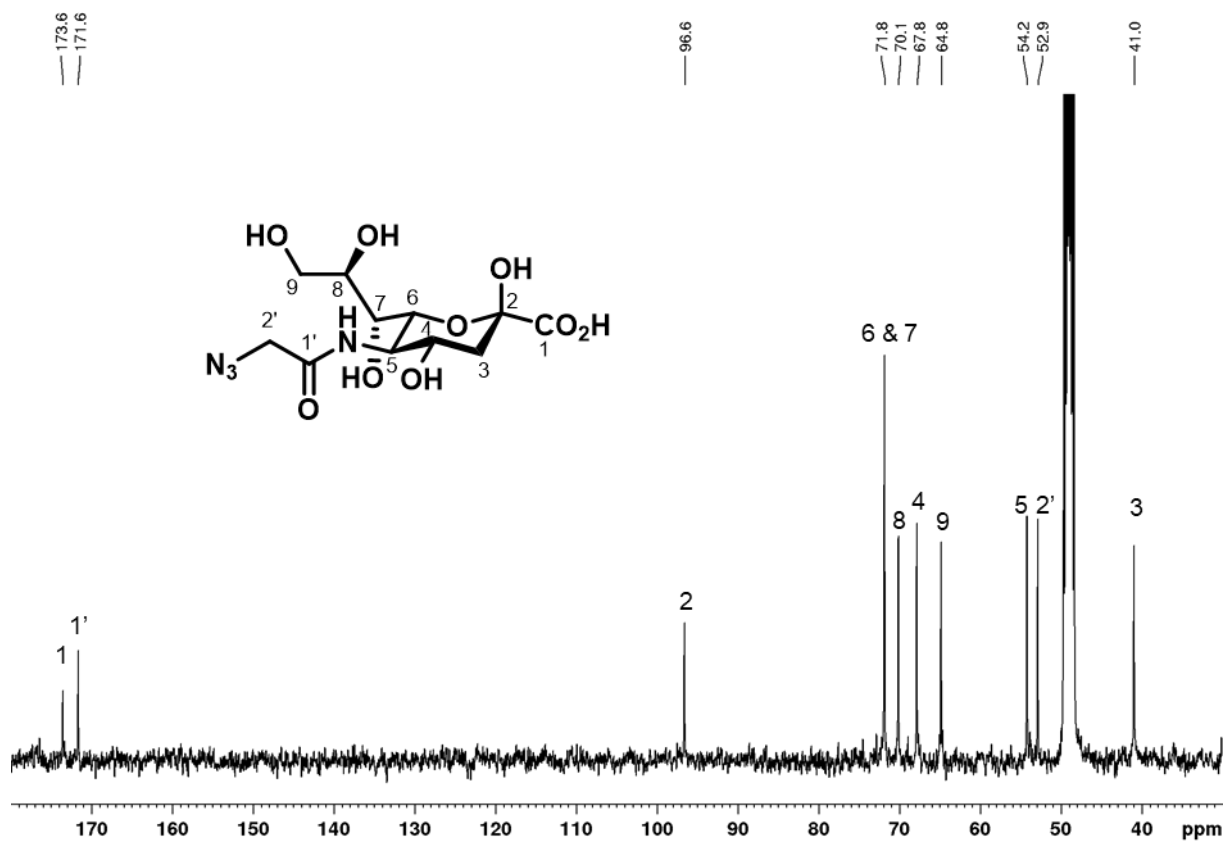


Abbildung 22: ^{13}C -NMR-Spektrum (100 MHz, MeOD) der Verbindung SiaNAz **8b**.

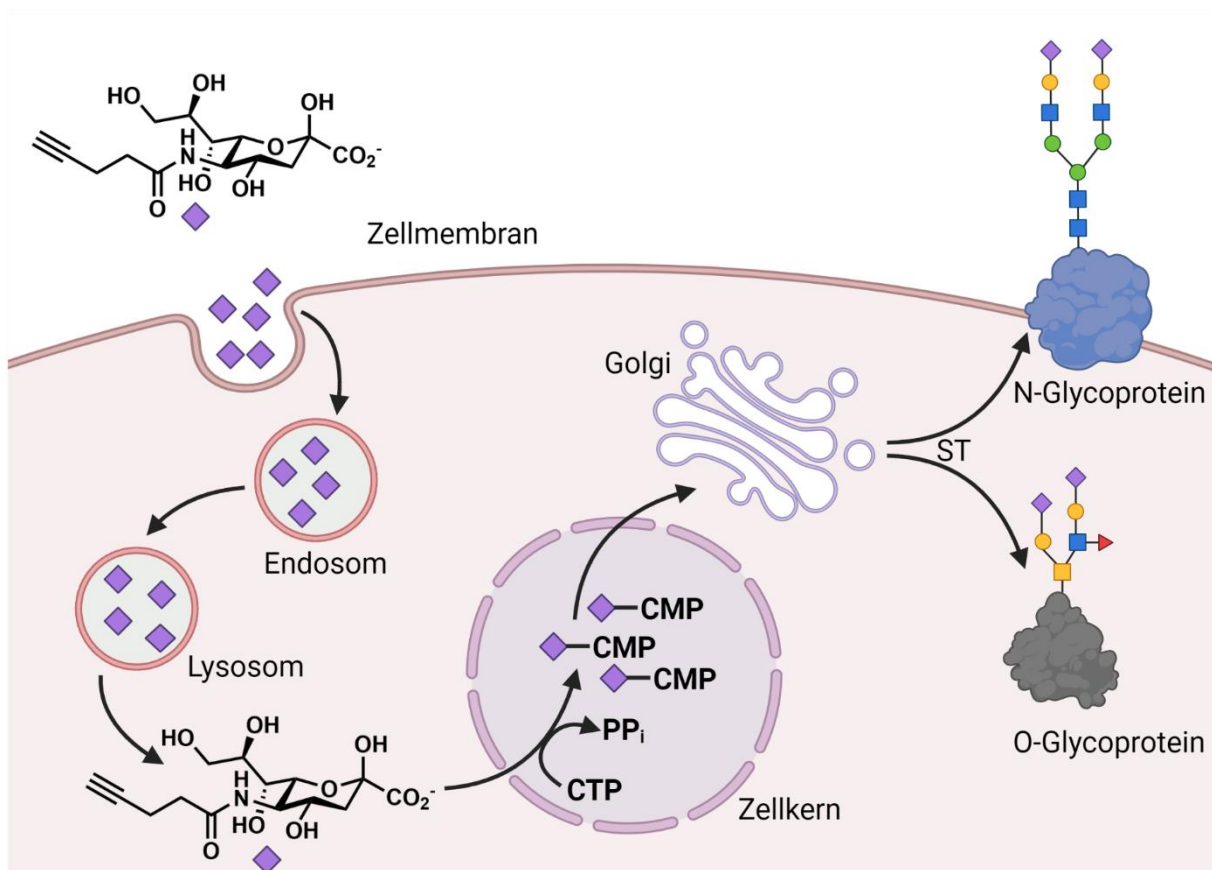
4. Ergebnisse und Diskussion

Über 2D-Korrelationsspektren können die weiteren ^1H - und ^{13}C -Signale zugeordnet werden. Aufgrund des anomeren Gemisches und der sehr ähnlichen Verschiebungen können manche Kopplungskonstanten wie z.B. die geminale Kopplung für $H-9$ nicht bestimmt werden. Dennoch sind die Signale der Kohlenstoffatome aufgelöst und C-6 bis C-9 resonieren zwischen 64.8 und 71.8 ppm. C-5 hat mit 54.2 ppm eine typische Verschiebung für C-N-Bindungen, genauso wie C-2' bei 52.9 ppm.

Die bioorthogonalen Sialinsäuren wurden nach erfolgreicher Synthese und Vollcharakterisierung für das *metabolic glycoengineering* eingesetzt und evaluiert.

4.1.2 Glycoengineering mit nicht acetylierten Sialinsäuren

Die nicht-acetylierten Sialinsäuren werden über Endozytose (**Schema 17**) in die Zellen aufgenommen und penetrieren nicht passiv durch die Zellmembran. Die passive Aufnahme von peracetylierten Monosacchariden am Beispiel von Mannosamin-Derivaten ist in **Schema 6** aus **Kapitel 2.3.1** abgebildet.



Schema 17: Die Aufnahme von nicht-acetylierten Sialinsäuren am Beispiel von SiaNAI über Endozytose und Eingliederung in den Zellmetabolismus. Aktivierung durch Cytidintriphosphat (CTP) im Zellkern und Transport zum Golgi-Apparat. Übertragung auf Glycoproteine durch Sialyltransferasen (ST). Erstellt mit BioRender.com

Ein erfolgreicher Nachweis der unnatürlich eingebauten Sialinsäuren **8** durch Reaktion mit dem entsprechenden Fluoreszenzfarbstoff konnte erst bei Konzentrationen ab 1.0 mM während der Inkubation erreicht werden (**Tabelle 4**). Für die Zelllinie wurden nahezu identische Fluoreszenzaufnahmen und Intensitäten aufgenommen wie bei den Primärzellen. Zusätzlich muss bedacht werden, dass der Sialinsäure-Haushalt der Zellen hierbei massiv manipuliert wird, wie *Bork et al.* bereits zeigte, als sie die Konzentration an intrazellulärer Sialinsäure durch Inkubation von 10 mM ManNAc über 50 h hinweg drastisch erhöhten. Parallel dazu wurde ebenfalls eine hohe Sialylierung am neutralen Zelladhäsionsmolekül (NCAM) beobachtet.^[224] Die unter normalen Bedingungen stattfindende Kontrolle der Sia-Konzentration durch Inhibition von GNE (Schlüssel-Enzym beim Roseman-Warren-Biosyntheseweg) verliert ihre Wirkung unter den künstlich erzeugten Bedingungen.^[79, 224] Im vorliegenden Fall wurden Stammzellen mit 0.5 – 2.0 mM SiaNAI **8a** oder SiaNAz **8b** versetzt. Diese können im Gegensatz zum Mannosamin-Analogon direkt im Zellkern aktiviert und durch Sialyltransferasen auf Proteine konjugiert werden.^[79]

Tabelle 4: Fluoreszenzintensität relativ zur Kontrolle. Daten wurden von *Dr. Stephan Altmann* erzeugt und zur Verfügung gestellt.

hMSC-TERT	SiaNAz	1.16	1.38	1.41
		1.15	1.55	1.59
		1.09	1.26	1.93
	SiaNAI	2.55	4.10	2.20
		1.58	2.25	3.44
		1.19	1.49	5.83
hMSC	SiaNAz	1.46	1.85	2.15
		1.52	2.10	2.24
	SiaNAI	1.76	2.50	6.72
		2.45	3.82	6.80
		1.81	2.61	5.37

Durch die Fütterung der Zellen mit Sia-Konzentration ab 1.0 mM konnten diese visualisiert werden. Der Einbau von SiaNAI **8a** ist im Vergleich zu SiaNAz **8b** deutlich effizienter. Bei 2.0 mM Konzentration wurde für erstes ein fast doppelt so starkes Fluoreszenzsignal für die Zelllinie und fast dreifache erhöhtes Fluoreszenzsignal für die Primärzellen festgestellt. Der Trend wurde in der Literatur bereits beobachtet.

Bertozzi et al. berichtete, dass der Zusatz von Ac₄ManNAI zur metabolischen Markierung der Sialinsäure führt und effizienter erfolgt als mit Ac₄ManNAz. Hierbei handelt es sich allerdings um peracetylierte Mannosamin-Derivate. Mögliche Ursachen könnten eine konzentrationsabhängige Reaktionsgeschwindigkeit sein. Diese Vermutung wurde jedoch verworfen, da eine niedrige Konzentration an Alkin und eine höhere an Azid eine langsamere

4. Ergebnisse und Diskussion

Reaktion versprechen und widersprüchlich dazu in diesem Experiment, sowie in der Literatur, das gefütterte Alkin (verhältnismäßig niedrige Konzentration) und Zugabe des Azido-Fluorphors (hohe Konzentration) stärker zu sehen sind.^[110]

Die Pentinsäure hat im Vergleich zur Azidoessigsäure mehr Rotationsfreiheitsgrade und wird wahrscheinlich von der CMP-Sialinsäuresynthetase oder den diversen Sialyltransferasen schneller gebunden und somit schneller metabolisiert.

Die Experimente zeigen, dass beide Verbindungen **8** für das *metabolic glycoengineering* geeignet und folglich chemische Reaktionen optimal durchführbar sind. Die Zellviabilität und Apoptose ist bei den Primärzellen (hMSC) kaum beeinflusst, während die Zelllinie (hMSC-TERT) bei hohen Konzentrationen von 1.0 und 2.0 mM gesenkte Viabilität und Apoptose durch SiaNAI beobachtet wurde.

Ebenfalls ist das Differenzierungsverhalten der Zellen auch bei hohen Konzentrationen unverändert. Interessant ist darüber hinaus zu klären, ob sich die Unterschiede bei der Markierung der Glycoproteine ergeben zwischen der Metabolisierung der Mannosamin-Derivate und der Sialinsäure-Analoga.

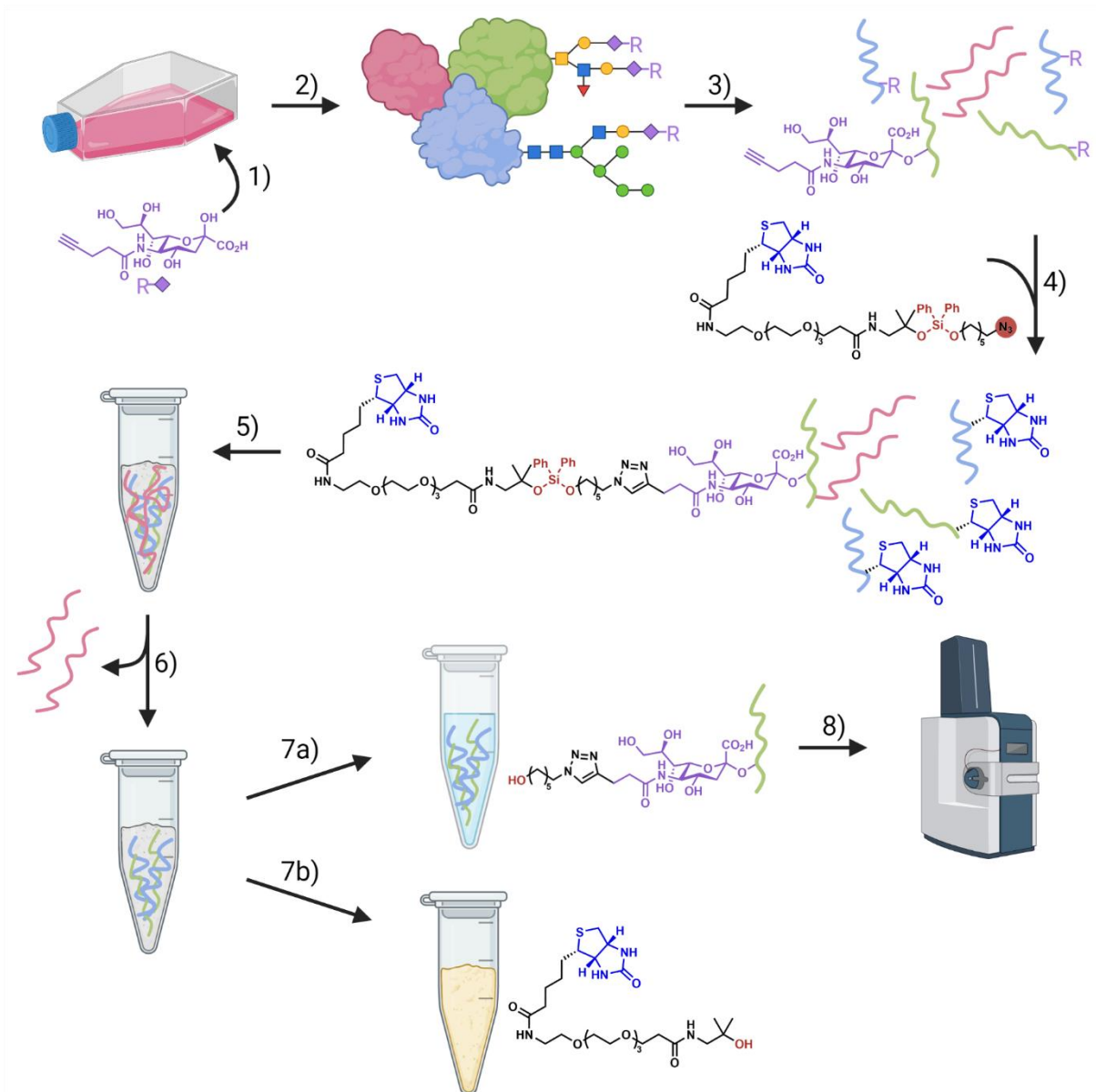
Dazu wurden im nächsten Schritt die markierten Glycoproteine identifiziert.

4.1.3 Glycoproteomics

Beim *metabolic glycoengineering* werden verschiedene Zucker in den jeweiligen Zelllinien unterschiedlich metabolisiert.^[73] Der Einbau unnatürlicher Zucker wurde bei hMSC bisher nur qualitativ nachgewiesen und eine genaue Analyse der markierten Glycoproteine war daher der nächste rationale Schritt. Somit wurden die synthetisierten Zucker Ac₄ManNAI **12a** und SiaNAI **8a** für weitere Untersuchungen ausgewählt, da SiaNAI **8a** eine effizientere Markierung bei hMSC zeigte als das entsprechende Azid-Analoga **8b**. Acetylierte Monosaccharide wie Ac₄ManNAI **12a** (oder Ac₄ManNAz **12b**) wurden in der Literatur häufig für massenspektrometrisch analysiert.^[62, 119] Diese penetrieren durch die Zellmembran und werden im Cytosol deacetyliert und zur Sialinsäure metabolisiert.^[79-80] Zusätzlich ist eine unspezifische Reaktion mit Cysteinresten möglich,^[118] wodurch die Gegenüberstellung von Ac₄ManNAI und SiaNAI Einblick in den Zuckermetabolismus liefern kann.

Die hMSC-TERT wurden von *Dr. Stephan Altmann* mit Ac₄ManNAI **12a** (20 µM) oder SiaNAI **8a** (1.0 mM, **Schema 18**) für drei Tage entsprechend der vorangegangenen Experimente inkubiert **(1)** und anschließend die Zellysate gewonnen **(2)**. Die Glycoproteine wurden in Eigenarbeiten isoliert. Dazu wurden die Lysate über Nacht mit Trypsin versetzt, welches die Proteine enzymatisch in kleinere Peptidfragmente zersetzt (siehe Experimentaltail *S-Trap protocol*), indem die C-terminalen Enden der Aminosäuren Arginin und Lysin hydrolysiert werden **(3)**.^[225] Durch Einbau der synthetischen Saccharide trugen die markierten Glycopeptide ein Alkin, das für CuAAC zur Verfügung stand. Dieses wurde im Anschluss unter Click-Bedingung mit Biotin-Azid für 3.5 h zur Reaktion gebracht **(4)**, eine etablierte Methode um markierte Proteine bzw. Peptide mit einem IsoTaG (*isotope targeted glycoproteomics*) anzureichern.^[135, 226] Die geklickten Moleküle helfen außerdem bei der späteren massenspektrometrischen (MS) Analyse der Proben durch Erkennung der spezifischen Verknüpfung an den Glycanketten.^[151, 227-228] In diesem Fall bildete sich ein Triazolring an der Seitenkette des Zuckers, an dem kovalent ein Hydroxyhexyl-Rest gebunden ist **(7a)**. Der Lösung wurde ein Streptavidin-Agarose-Harz zur Absorption von Biotin zugegeben und weitere 14 h inkubiert **(5)**. Die Dissoziationskonstante K_D für Streptavidin und Biotin liegt in der Größenordnung von 10⁻¹⁵ M, eine der stärksten nicht kovalenten Bindungen.^[229] Überschüssige Biomoleküle wurden durch Waschen vom Harz entfernt **(6)**. Letztlich wurden die Glycopeptide durch Zugabe von Ameisensäure (2 %) und Spaltung des Silicium-Ankers freigesetzt **(7)**. Die erhaltenen Proben wurden anschließend durch LC-MS/MS von *Dr. Marc Drießen* analysiert **(8)**.

4. Ergebnisse und Diskussion



Schema 18: Isolierung der Glycoproteine für die massenspektrometrische Analyse. **1)** Kultivierung von hMSC-TERT mit SiaNAI **8a** (bzw. in einer anderen Zellkultur Ac₄ManNAI **12a**) und Einbau des Zuckers in die Glycoproteine; **2)** Gewinnung von Zelllysaten (Glycoproteine in grün und blau); **3)** Versetzung mit Trypsin zur Spaltung in kleinere Glycopeptide; **4)** CuAAC mit Biotin-Azid (Biotin in blau und Azidogruppe rot hinterlegt); **5)** Absorption des geknüpften Biotins durch Streptavidin-Harz; **6)** Entfernung der ungebundenen Peptide; **7a)** Isolierung der Glycopeptide durch Abspaltung des Silylethers (rot) mit 2 %iger HCOOH; **7b)** Absorbierter Biotin-Rest am Harz; **8)** Massenspektrometrie der Glycopeptide. Erstellt mit BioRender.com

Durch die Messungen konnten insgesamt 339 Proteine erfasst werden, von denen 119 als Glycoproteine identifiziert wurden. 55 Proteine wurden durch Inkubation von **8a** markiert und werden somit der Fraktion SiaNAI zugeordnet, während 94 Proteine aus der Fraktion Ac₄ManNAI zugeordnet werden (**Abbildung 23**). Hierbei wurde lediglich eine Überschneidung von 30 Proteinen beobachtet, obwohl anhand einigen Berichten, das Mannosamin in das entsprechende Sialinsäure-Analoga metabolisiert werden sollte (Vergleich **Kapitel 2.3.1**). Eine Liste der Proteine kann dem **Anhang 9** entnommen werden. Im Experiment von *Bork et al.*

wurden Zellen für 48 h mit eine 10 mM Lösung aus ManNAc inkubiert, wobei eine Steigerung von ungebundener Sialinsäure in den Zellen gemessen wurde. Bei Erhöhung der Konzentration bis zu 50 mM steigt auch die Menge an ungebundener Sialinsäure, was wahrscheinlich auf eine Sättigung von endständigen Galactose-Einheiten der Glycoproteine zurückzuführen ist.^[224] Ähnlich wird auch bei einer Inkubation der Zellen mit 1.0 mM SiaNAI **8a** für 72 h ein gesteigerter Grad an Sialylierung angenommen. Zusätzlich wird das Schlüsselenzym GNE für Sialinsäure-Biosynthese inhibiert, weswegen den Zellen hauptsächlich die unnatürliche Variante zur Verfügung steht.^[230]

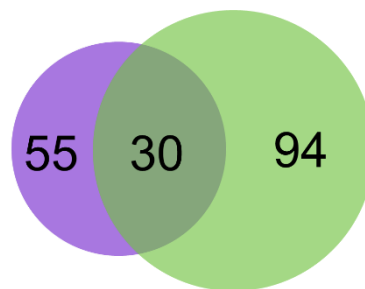


Abbildung 23: Mengendiagramm der identifizierten Glycoproteine durch Inkubation von SiaNAI **8a** (lila) oder Ac₄ManNAI **12a** (grün).

Die zuvor berichtete S-Glycosylierung lässt hier die Vermutung zu, dass durch Ac₄ManNAI eine teilweise fehlerhafte Markierung erfolgte, die nicht auf einen metabolischen Einbau, sondern auf eine unspezifische chemische Reaktion zurückzuführen ist. Die Daten der Massenspektrometrie gaben für diese Hypothese keinen endgültigen Aufschluss. Aufgrund der geringeren Anzahl an markierten Glycoproteinen durch SiaNAI, ist eine höhere Selektivität durch Bevorzugung bestimmter Proteinklassen möglich. Weiterhin muss Ac₄ManNAI neben den enzymatischen Entfernungen der Acetylgruppen anschließend erst zu SiaNAI metabolisiert werden.^[79, 102]

Um diese Überlegungen zu stützen, wurde die *gene ontology* (GO) der UniProt-Datenbank genutzt, welches die „zelluläre Komponente“ (*cell component*) und die „molekulare Funktion“ (*molecular functions*) für die einzelnen Proteine beinhaltet und miteinander vergleicht. Diese Datenbank sammelt Informationen für die biologische bzw. biomedizinische Forschung über die Proteinsequenzen, Expression und deren Funktion.^[231] Die GO-Termini bzw. *annotations* wurden für die jeweiligen Zuckerfraktionen quantifiziert. Die Originalsprache soll hierbei erhalten bleiben, weswegen die folgenden Terme auf Englisch sind (**Abbildung 24**). Beispielsweise gehören 63 % der Proteine aus Ac₄ManNAI-Fraktion zu „Cytosol“, während es für Proteine aus der SiaNAI-Fraktion 58 % sind. In der folgenden Abbildung sind die einzelnen GO-Terme der relativen Verhältnisse der Zucker-Fraktionen zugeordnet. Dabei ist die relative Gesamtverteilung auf 100 % normiert.

4. Ergebnisse und Diskussion

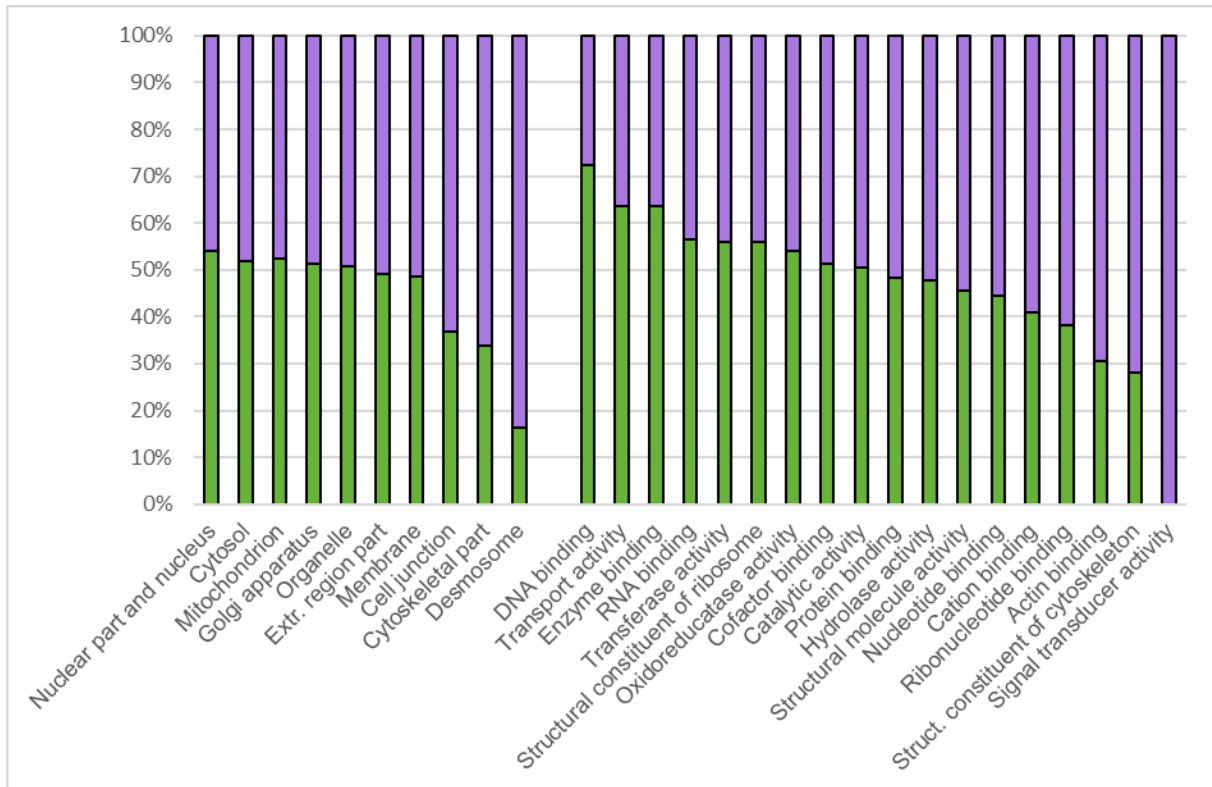


Abbildung 24: GO-Termini (*annotations*) aus UniProt für *cellular component* (links) and *molecular function* (rechts). Die relativen Verhältnisse der identifizierten Glycoproteine der Ac₄ManNAI **12a**-Fraktion (grün) und der SiaNAI **8a**-Fraktion (lila).

Aus der Abbildung können Unterschiede bei den *cell components* (links) bei „*cell junction*“, „*cytoskeletal part*“ und „*desmosome*“ sowie bei den *molecular function* bei „*DNA binding*“, „*cation binding*“, „*actin binding*“ und „*signal transducer activity*“ festgestellt werden.

Bis auf „*DNA-binding*“ sind hier die genannten GO-Termini für Proteine der SiaNAI **8a**-Fraktion dominierend. Cytosolische und nucleosolische Glycoproteine sind typischerweise O-GlcNAc-Glycane.^[232] Interessanterweise sind Sialinsäure, entsprechend der Tendenz der Abbildung, auf der Zellmembran und in der extrazellulären Matrix essentiell für biologische Prozesse wie Zelladhäsion und Signaltransduktion.^[84] Dort wechselwirken sie mit Bindungspartner Siglecs und Selectinen (Vergleich **Kapitel 2.2.2.3**). Die Übertragung von Sialinsäuren auf Galactose-Reste durch ST6Gal1 ist in humanen pluripotenten Stammzellen entscheidend für die Differenzierung.^[233] ST6Gal1 reguliert beispielsweise die Sialylierung von β 1-Integrin,^[84] ein Adhäsionsmolekül und Differenzierungsmarker,^[234] welches ebenfalls in unserem Experiment als Glycoprotein in Stromazellen identifiziert wurde. Weitere Adhäsionsverbindungen^[235] sowie die Ausbildung von Desmosomen^[236] sind Ca²⁺ abhängige Mechanismen, bei der die beteiligten Glycoproteine ebenfalls sialyliert sind. Durch die negative Ladung des Zuckers können die Kationen auf der Zelloberfläche gebunden werden,^[237-238] weswegen die Proteine,

die darauf gebundenen Zucker und die Kationen synergetisch zu den biologischen Prozessen beitragen.^[84, 239]

Der Versuch wurde als Pilot-Experiment nur einmal durchgeführt, weshalb die einzelnen Proteine hier im Detail nicht weiter ausgeführt und diskutiert werden. Zusammenfassend wurden hMSC-TERT mit zwei verschiedenen Zuckern inkubiert und die Glycopeptide durch eine Click-Reaktion mit der eingeführten bioorthogonalen Gruppe isoliert. Das Experiment weist einen Unterschied an Proteinen auf, die durch verschiedene Monosaccharide beim *metabolic glycoengineering* adressiert werden. Die Daten deuten auf eine Selektivität durch die Verwendung von ungeschützten Sialinsäuren hin, die in der Lage sein könnten, die Zellen in ihrer Adhäsion, Signaltransduktion und im Falle von Stammzellen auch in ihrer Differenzierung zu manipulieren.

Nicht bei allen Glycoproteinen ist die Sialinsäure stets das terminale Saccharid in der Glycankette. Bei Abwesenheit enden diese häufig mit der Galactose bzw. mit Lactosamin.^[69] Diese Muster werden von Galectinen gebunden.^[240] Speziell in hMSC ist das Gal-1 einer der am meisten exprimierten Proteine.^[241] Daher sollte auf Basis des natürlichen LacNAc-Motivs ein Inhibitor bzw. Ligand mit erhöhter Affinität synthetisiert werden. Die Synthesen, Analyse der Bindungsmodi, Bestimmung der Affinitäten und Erweiterung des Liganden sind im folgenden Kapitel beschrieben.

4.2 Galectin-1

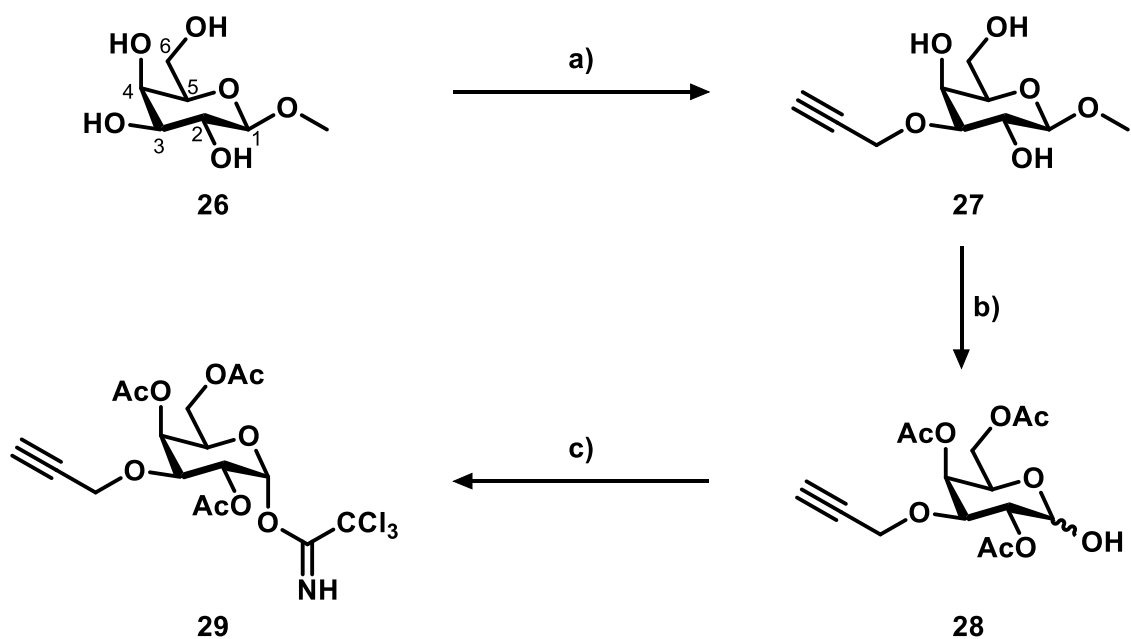
Die Wechselwirkungen von Glycanen mit Lectinen steuern diverse biologische Prozesse wie Adhäsion, Signaltransduktion oder Zell-Matrix-Interaktionen.^[169] Galectin-1 (Gal-1) gehört zur Familie der β -Galactose bindenden Lectine.^[186] Die Korrelation von Tumorwachstum und Metastasierung mit erhöhter Gal-1 Expression stellt dieses in den Fokus vieler Forschungsgruppen (Vergleich **Kapitel 2.5.1**).^[242] Zusätzlich wurde gezeigt, dass Gal-1 in humanen mesenchymalen Stromazellen (hMSC) eines der häufigsten exprimierten Proteine mit immunmodulatorischen Funktionen ist.^[241]

Ein Ziel dieser Arbeit war die Synthese eines Liganden, der Gal-1 mit einer höheren Affinität und Selektivität als das natürliche Substrat LacNAc bindet.

4.2.1 LacNAc-Analoga als Galectin-1 Liganden

Um die Funktion von Gal-1 zu beeinflussen, wurde ein Ligand bzw. Inhibitor auf Basis des natürlichen Zuckermotivs LacNAc moduliert. Die Synthese des LacNAc-Analogons **5** erfolgte bereits durch *Dr. Nadja Bertleff-Zieschang* und *Julian Bechold* (Vergleich **Kapitel 2.5.2**).^[205] Die etablierte Route wurde bereits selbstständig in der Masterarbeit 2018 durchgeführt und ist im Folgenden zusammengefasst.^[215]

Die Methylgalactose **26** wurde in Position 3 mit einer Alkylgruppe für spätere Click-Reaktionen versehen und in Position 1 aktiviert, damit dieses als Glycosylierungsdonor fungiert (**Schema 19**). Im ersten Schritt wurden die *cis*-ständigen Hydroxylgruppen von **26** mit Bu_2SnO komplexiert, wodurch die Nukleophilie von *OH*-3 stark erhöht wird. Dieses substituiert selektiv das Brom von Propargylbromid (**a**). Die Zugabe von überschüssigem Ac_2O mit katalytischen Mengen H_2SO_4 öffnet das Vollacetal, wodurch dieses und die freien Hydroxylgruppen acetyliert wurden. Die Acetylgruppe an Position 1 ist das beste Elektrophil und reagierte nahezu selektiv mit nukleophilem 1,3-*N,N*-Dimethyl-1,3-diaminopropan, womit die anomere Position von **28** eine freie Hydroxylgruppe aufweist (**b**). Diese wurde mit einem Überschuss an Trichloracetonitril mit 1.00 Äq. DBU als Hilfsbase in α -Position aktiviert (**c**), wodurch die Glycosylierung selektive β -Saccharide darstellt.^[205]

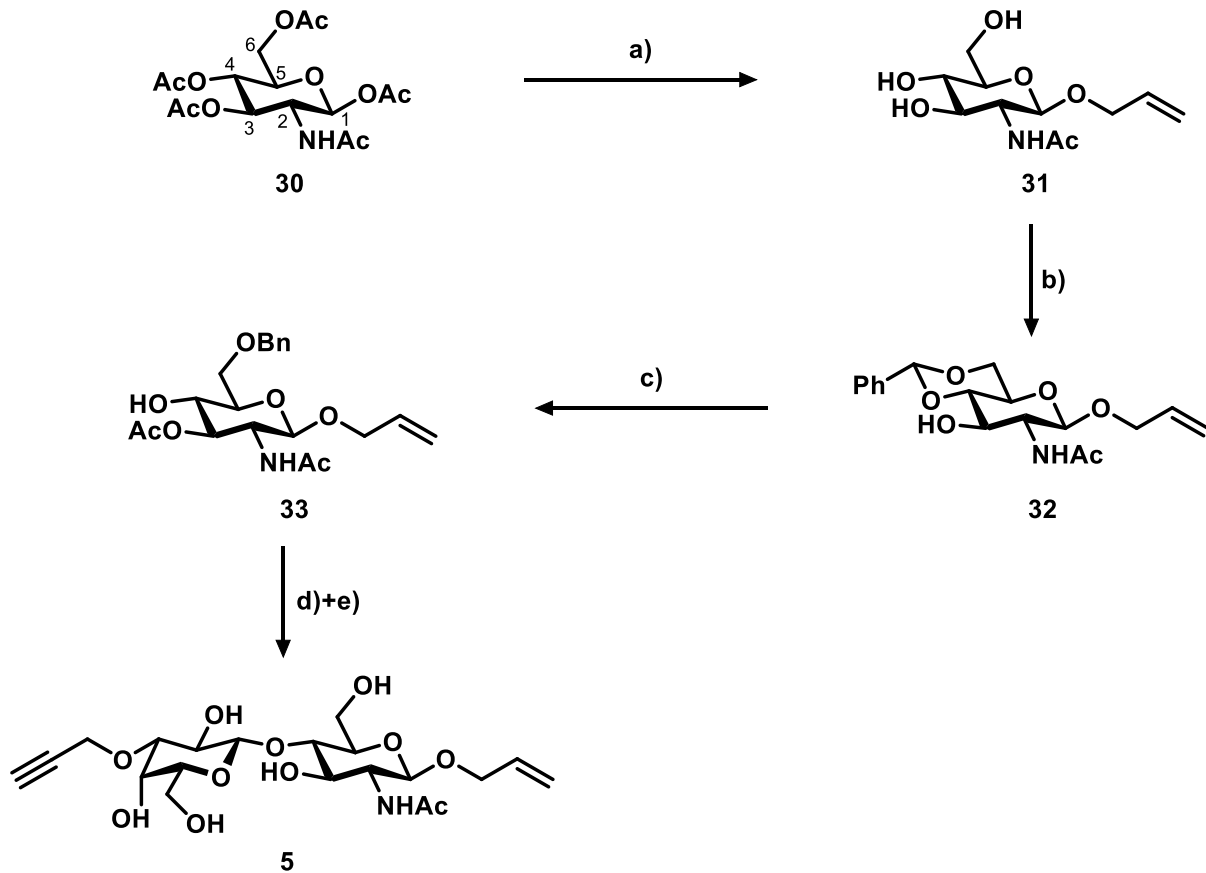


Schema 19: Synthese von Galactose-Donor **29**. **a)** Bu_2SnO , MeOH, 90°C , 4 h; dann Propargylbromid, DMF, 42°C , 3 d, 70 %; **b)** 1: Ac_2O , H_2SO_4 , RT, 17 h, quant.; 2: 1,3-*N,N*-Dimethyl-1,3-diaminopropan, DCM, RT, 1.5 h, 52 %; **c)** DBU, Cl_3CN , DCM, RT, 2 h, 67 %.

Für die Kupplung von LacNAc ($\text{Gal}\beta 1,4\text{GlcNAc}$) muss der Glucosamin-Baustein selektiv mit der Position 4 reagieren. Ausgehend von Ac_4GlcNAc **30** sind dafür mehrere orthogonale Schritte notwendig (**Schema 20**). Im ersten Schritt wird die anomere Position mit einer Doppelbindung für spätere Konjugationsmöglichkeiten versehen. Dazu wurde **30** in DCM und mit der Lewis-Säure Trimethylsilyltrifluormethansulfonat (TMS-OTf) zur Reaktion gebracht. Dem entstandenen Oxazolin wurde ohne Aufarbeitung ein Überschuss an Allylalkohol zugegeben, welcher nukleophil an der anomeren Position angriff und selektiv das β -Glycan bildete. Anschließend wurden die Acetylgruppen von **31** durch NaOMe verseift (**a**). Die Hydroxylgruppen von **32** OH-4 und OH-6 können mit Carbonyl-Verbindungen hexacyclische Acetale bilden. Hier reagierten diese unter Säurekatalyse mit Benzaldehyd (**b**). Anschließend wurde OH-3 mit einem Überschuss Ac_2O in Pyridin geschützt. Eine selektive Reduktion des Acetals erfolgte durch Zugabe von Trifluoressigsäure (TFA) und Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA). Dieses koordinierte zwischen den Sauerstoffatomen O-3 und O-4 , wodurch die Bindung zwischen O-4 und dem Acetal-C geschwächt wurde. Das Reduktionsmittel Et_3SiH übertrug das Hydrid auf das Acetal-C und spaltete die gelockerte Bindung, wodurch der Benzylether bei O-6 und die freie Hydroxylgruppe OH-4 entstanden (**c**). Die Kupplung der Monomere **29** und **33** zum Disaccharid erfolgte unter Zugabe von 1.00 Äq $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$ (**d**). Zuletzt wurden noch die verbleibenden Schutzgruppen entfernt. Typischerweise reagiert der Benzylether unter reduktiven Bedingungen (z.B. H_2 , Pd/C) zu Toluol und dem entsprechenden Alkohol. Da hier auch die ungesättigten Kohlenwasserstoffe reduziert würden, wurde hier die

4. Ergebnisse und Diskussion

Abspaltung mit einem Überschuss an DDQ durchgeführt. Die Acetylgruppen wurden mit NaOMe verseift (**e**).^[205]



Schema 20: Synthese von LacNAc-Derivat **5**, mit „clickbarem“ Alkinrest an C-3 der Gal-Einheit und Allylfunktion an der anomeren Position der GlcNAc-Einheit. **a)** 1: TMS-OTf, DCM, 45 °C, 3 d, dann Allylalkohol, DCM, 45 °C, 4 h, 50 %; 2: NaOMe, MeOH, RT, 20 min, quant.; **b)** PhCH(OMe)₂, CSA, MeCN, RT, 3 d, 68 %; **c)** 1: Ac₂O, Py, RT, 18 h, quant.; 2: TFA, TFAA, Et₃SiH, DCM, 0 °C, 5 h, 80 %; **d)** **29 (Galactose-Donor)**, BF₃·OEt₂, DCM, RT, 1 h, 37 %; **e)** 1: DDQ, DCM, 45 °C, 48 h, 77 %; 2: NaOMe, MeOH, RT, 30 min, 94 %.

In vorangegangenen Arbeiten wurden von *Dr. Nadja Bertleff-Zieschang* und *Julian Bechold* über CuACC das Alkin **5** mit einer Vielzahl an Aziden konjugiert. Unter anderem wurden die Zielverbindungen **6** und **7** synthetisiert (**Abbildung 25**) und der Bindungsmodus durch Kristallstrukturen untersucht. Diese beiden Liganden wechselwirken über einen größeren Bereich der Proteinoberfläche. Die Dissoziationskonstanten sind mit $104 \pm 23 \mu\text{M}$ (**Amin 6**) und $117 \pm 20 \mu\text{M}$ (**Guanidin 7**) im Vergleich zum natürlichen Substrat mit $81 \pm 12 \mu\text{M}$ jedoch nicht wesentlich verändert.^[205]

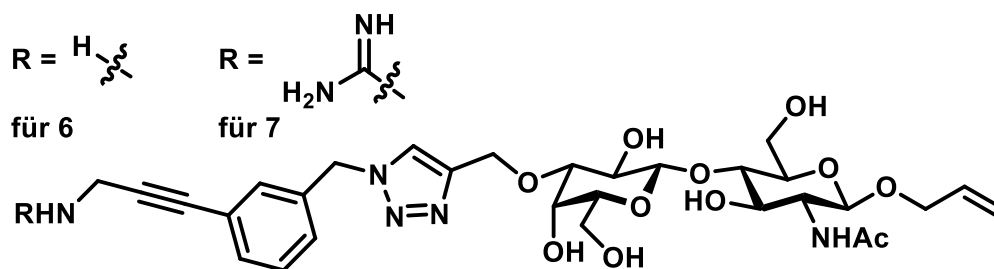


Abbildung 25: Strukturformel der Gal-1 Liganden **6** und **7**.

Im Rahmen der Masterarbeit 2018 „Synthese von Fluor-substituierten, aromatischen Galectin-1 Inhibitoren“ wurde auf Basis dieser Moleküle der aromatische Ring mit Fluoratomen versehen.^[215]

4.2.2 Fluorsubstituierte, aromatische Galectin-1 Liganden

Die Bindungstasche von **6** (Vergleich **Abbildung 14** in **Kapitel 2.5.2**) zeigt die Wechselwirkung zwischen Asp123 und dem Aromaten. Fluor ist das elektronegativste Element und entzieht seinen Bindungspartner die Elektronendichte. Durch Substitution der aromatischen Protonen durch Fluoratome wird der Ring positiv polarisiert, wodurch eine stärkere Wechselwirkung zur negativ geladenen Carboxylgruppe von Asp zu erwarten ist. Zusätzlich sind Fluoratome auch in der Lage, Wasserstoffbrückenbindungen (H-Brücken) zu bilden, die jedoch im Vergleich zu Stickstoff- oder Sauerstoffatomen oft nur eine schwache Interaktion versprechen.^[243-244]

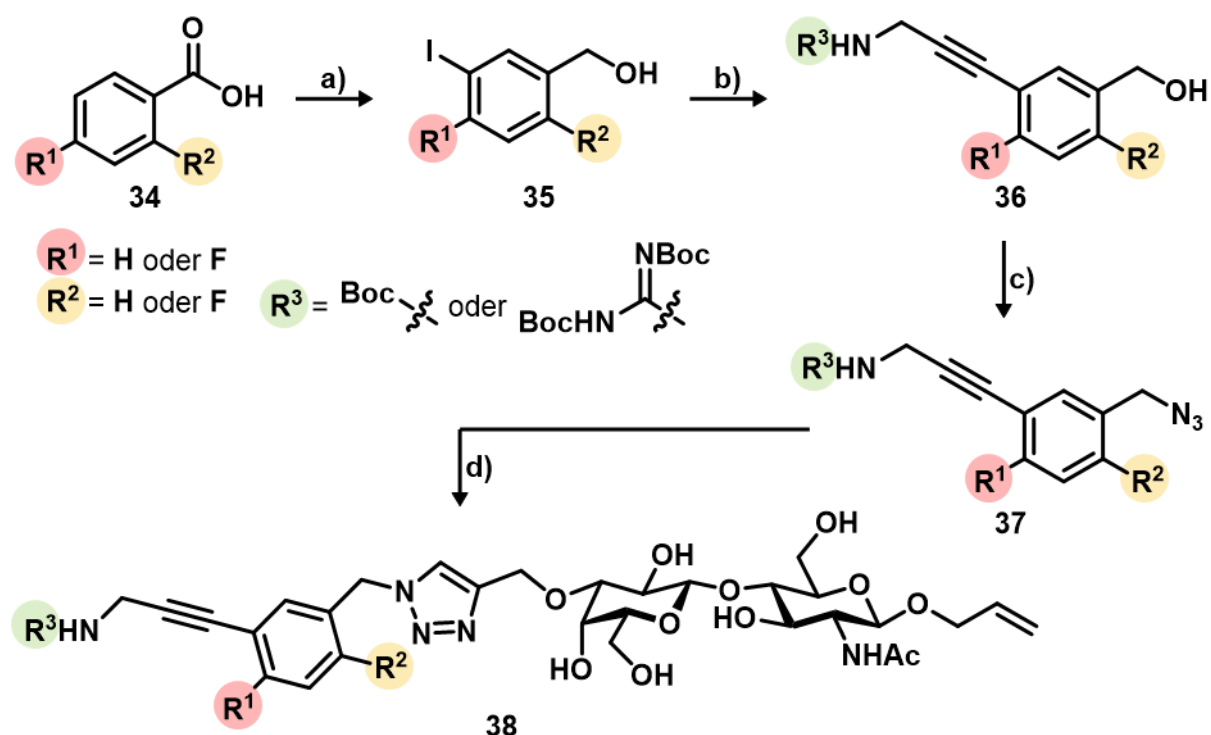
Für die Click-Reaktion mit **5** wurden fluoraromatische Azide synthetisiert, analog zu den modulierten Molekülen **6** und **7** (**Schema 21**). Die Synthese wurde bereits in der Masterarbeit 2018 durchgeführt und wird im Folgenden zusammengefasst. Die NMR-Spektren einer Azido-Verbindung **37** und einer geklickten und entschützten Endverbindung **39** werden repräsentativ diskutiert.

2,4-Difluorbenzoesäure **34a**, 2-Fluorbenzoesäure **34b** oder 4-Fluorbenzoesäure **34c** wurden im ersten Schritt mit *N*-Iodsuccinimid (NIS) in H₂SO₄ bei 0 °C umgesetzt.^[245] Der –M-Effekt der Carboxylgruppe ist *meta* dirigierend und durch den Einsatz von 1.10 Äq NIS konnte Mehrfach-Iodierung verhindert werden. Die Carboxylgruppe wurde anschließend mit einem Überschuss BH₃ in Tetrahydrofuran (THF) bei RT zur Hydroxylgruppe reduziert (**a**).^[246]

Nachfolgend wurden die Iodaryle in einer Sonogashira-Kupplung mit *N*-Boc-propargylamin (BocNH-CH₂C≡C) oder *N,N'*-Diboc-propargylguanidin (BocNHC(NBoc)NH-CH₂C≡C) zur Reaktion gebracht. Diese Namensreaktion ermöglicht die Palladium- und Kupfer-katalysierte Kreuzkupplung von terminalen Alkinen und Arylhalogeniden.^[247-248] Die Reaktion wurde mit

4. Ergebnisse und Diskussion

katalytischen Mengen $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$ und CuI in THF/NEt_3 bei RT durchgeführt (**b**).^[249] Aufgrund der höheren Reaktivität von Iod konnte kein Kreuzkupplungsprodukt zwischen den Alkinen und dem Fluoraryl beobachtet werden. Insgesamt wurden sechs Verbindungen **36a-f** synthetisiert. Für die CuAAC muss die Hydroxylgruppe durch ein Azid substituiert werden. Die direkte Substitution ist nicht möglich, da Alkohole keine guten Abgangsgruppen sind. Deshalb wird diese im ersten Schritt mit 1.50 Äq CBr_4 und 1.5 Äq. PPh_3 in einer Appel-Reaktion durch Brom ersetzt^[250] und anschließend ohne Isolierung der Zwischenstufe mit 2.50 Äq. NaN_3 bei 75°C umgesetzt (**c**).^[251] Die sechs dargestellten Azide **37a-f** wurden unter etablierten Click-Bedingungen mit **5** geknüpft.^[205]



Schema 21: Synthese von Fluor-substituierten, aromatischen Gal-1 Liganden ausgehend von den drei Edukten 2,4-Difluorbenzoesäure **34a** ($\text{R}^1 = \text{F}$ und $\text{R}^2 = \text{F}$); 2-Fluorbenzoesäure **34b** ($\text{R}^1 = \text{H}$, $\text{R}^2 = \text{F}$), 4-Fluorbenzoesäure **34c** ($\text{R}^1 = \text{F}$, $\text{R}^2 = \text{H}$). **a**) 1: NIS , H_2SO_4 , 2-4 h, 0°C , 61–91 %; 2: BH_3 in THF , 16 h, RT, 73-90 %; **b**) $\text{BocNH-CH}_2\text{C}\equiv\text{C}$ oder $\text{BocNHC(NBoc)NH-CH}_2\text{C}\equiv\text{C}$, $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$, CuI , THF , NEt_3 , 16 h, RT, 33-67 %; **c**) 1: CBr_4 , PPh_3 , DCM , 16 h, RT; dann NaN_3 , DMF , 2 h, 75°C , 33–71 % über zwei Stufen; **d**) **5**, NaAsc , CuSO_4 , $t\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$, 2 h, RT, 52–82 %.

Die aromatischen Signale von Azid **37c** sind anhand ihrer Kopplungsmuster im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zuzuordnen (**Abbildung 26**). ^{19}F koppelt ebenfalls mit den aromatischen Protonen, weswegen $H-5$ in ein Dublett von Dubletts (dd) mit einer Kopplung von 8.6 Hz zu $H-4$ und 9.3 Hz zu F aufspaltet. $H-4$ ist als ddd zu sehen und koppelt ebenso zu $H-5$ mit 8.5 Hz, zu F mit 5.1 Hz und $H-2$ mit 2.1 Hz. Die Kopplungskonstanten von $H-2$ zu $H-4$ sind 2.0 Hz und zu F 7.0 Hz. Das ^1H -Spektrum wurde in CDCl_3 aufgenommen, weswegen das Amidproton bei 4.80 ppm zu sehen ist. Die benzyliischen Protonen $H-1''$ resonieren bei 4.36 ppm als Singulett

(s) und korrelieren im HMBC mit C-1, C-2 und C-6. Durch die Kopplung des Amidprotons erscheinen *H*-3' als d mit 4.9 Hz. Die *tert*-Butylgruppe resoniert bei 1.46 ppm als Singulett. Im ¹³C-NMR-Spektrum (**Abbildung 27**) ist die ¹J Kopplung mit 251 Hz bei 160.4 ppm für C-6 charakteristisch. Die anderen aromatischen Kohlenstoffe resonieren ebenfalls als Dubletts im Bereich zwischen 135–115 ppm. Durch 2D-Korrelationspektren konnten diese zugeordnet werden. Die quartären Alkin- und das *tert*-Butylkohlenstoffatom (C-1', C-2' und C-5') sind bei 80–86 ppm zu sehen. C-1'' resoniert bei 48.3 ppm als Dublett durch das Fluor, während C-3' weiter hochfeldverschoben bei 31.2 ppm ist. Die drei äquivalenten C-6' haben eine Verschiebung von 28.5 ppm.

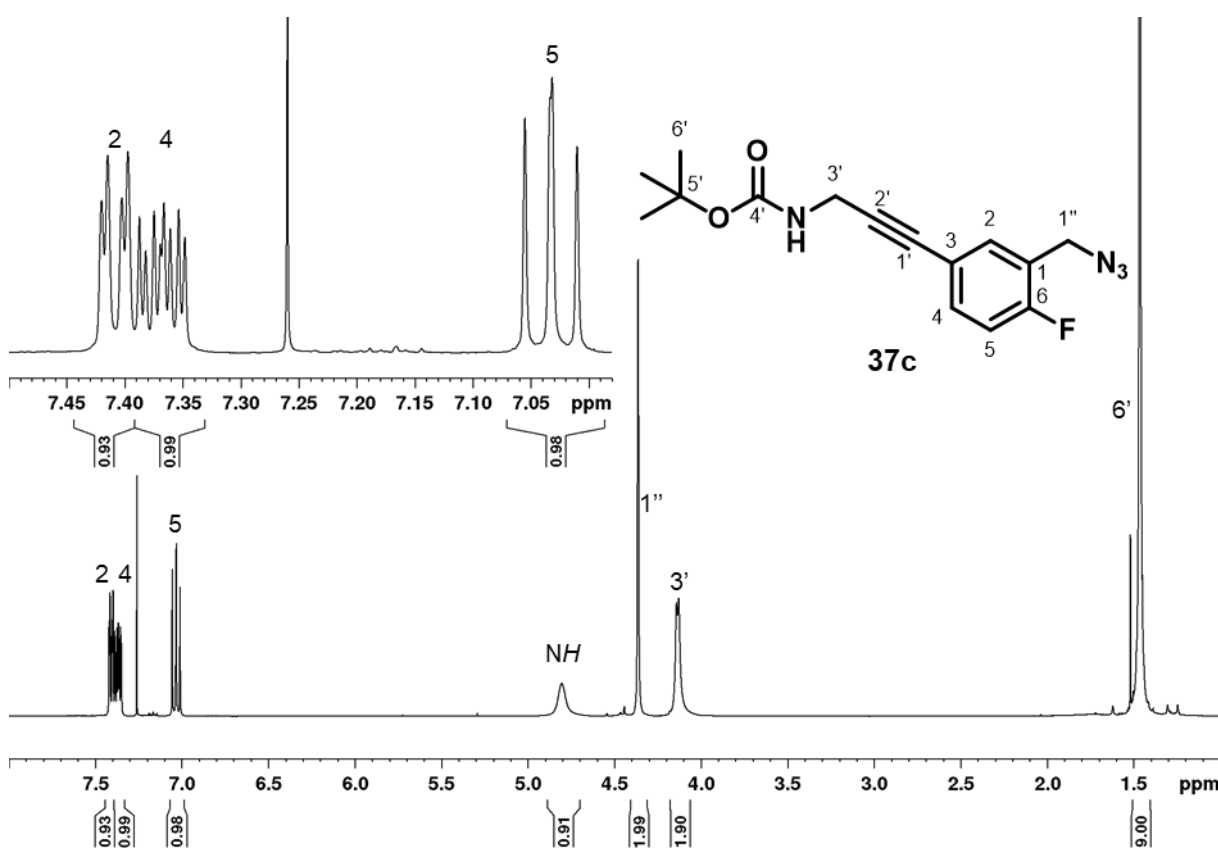


Abbildung 26: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl₃) der Verbindung **37c**.

4. Ergebnisse und Diskussion

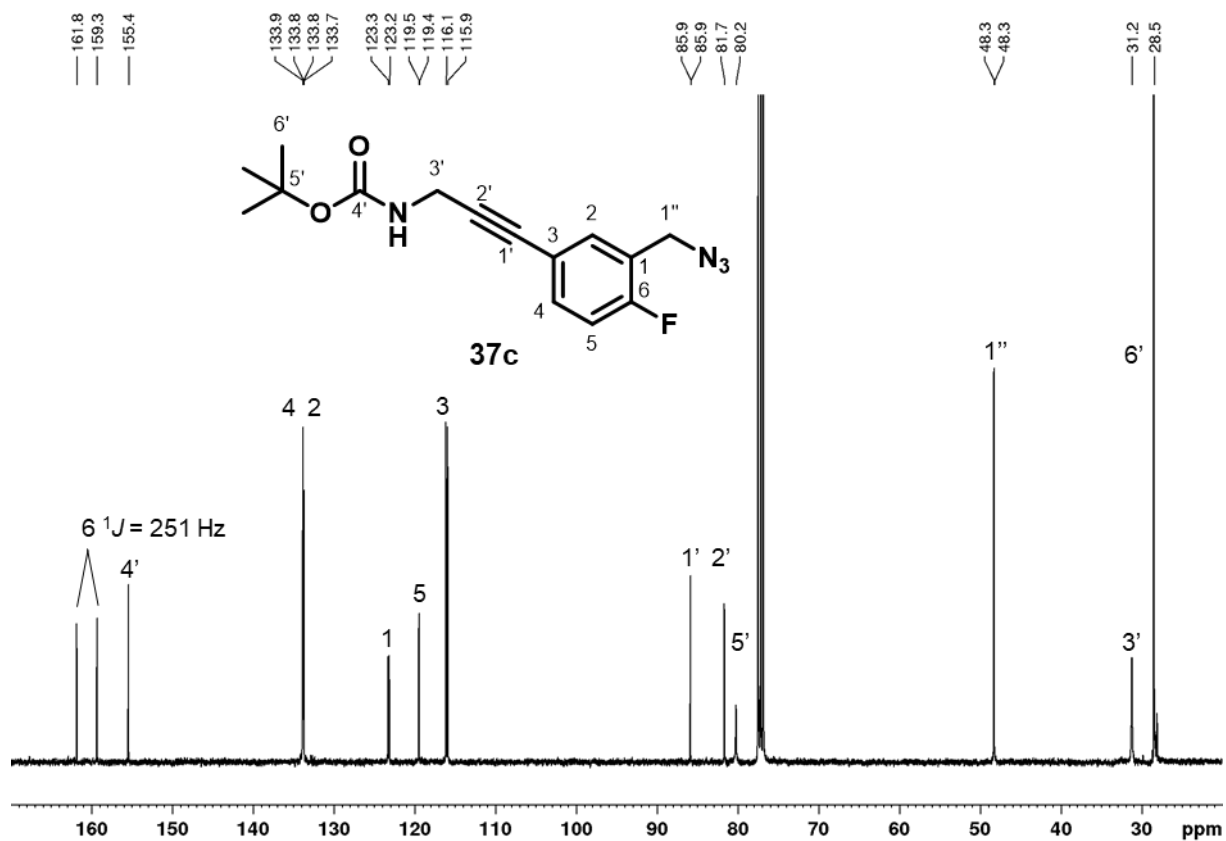
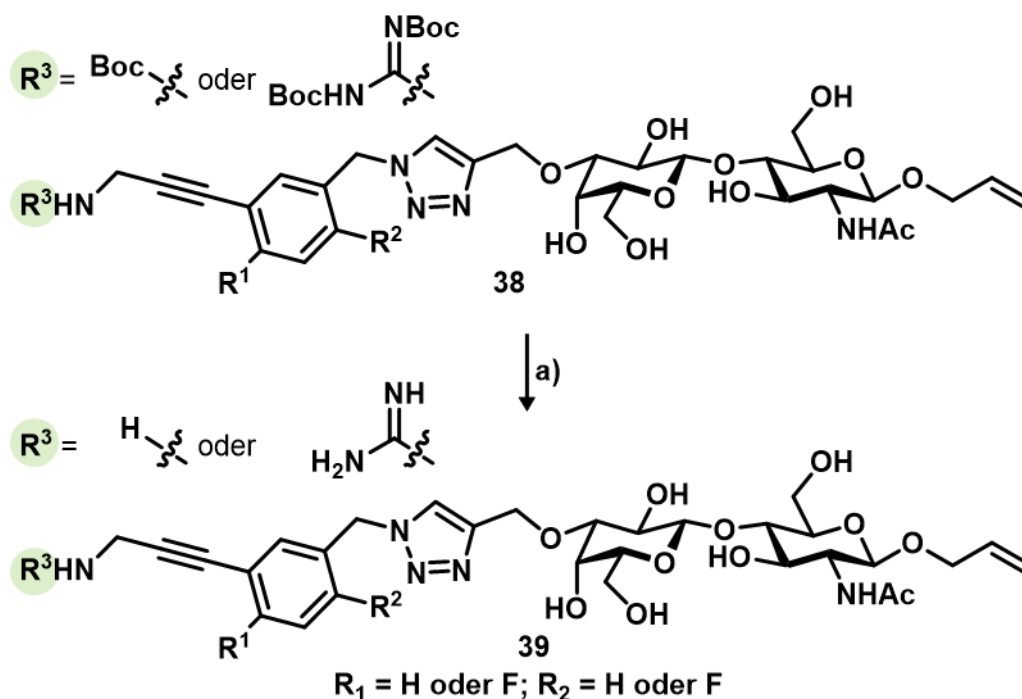


Abbildung 27: ^{13}C -NMR-Spektrum (100 MHz, CDCl_3) der Verbindung **37c**.

Zum Finalisieren der Liganden wurde unter sauren Bedingungen die Boc-Schutzgruppe entfernt. Dazu wurden die Vorläufer **37a-f** in 30 % wässriger TFA-Lösung bei RT gerührt. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels DC-Kontrolle überprüft und die Reaktionen nach 1-2 h beendet, wobei die doppelte Entfernung der Boc-Gruppen zum Guanidin beachtet werden musste (**Schema 22**). Eine Hydrolyse der beiden Acetale zwischen den Monosacchariden oder der Allylgruppe wurden unter diesen Bedingungen nicht beobachtet.



Schema 22: Finalisierung der Galectin-1 Liganden **39** mit Fluoratomen im Aromaten. a) 30 % TFA/H₂O, RT, 1–2 h, 88–99 %.

Repräsentativ sind die NMR-Spektren von Amin **39c** abgebildet (**Abbildung 28 und 29**). Durch die Azid-Alkin-Cyclisierung entsteht ein Triazol-Ring. Das Proton am Triazol-Ring zeigt bei einer Resonanz von 8.07 ppm die höchste Tieffeldverschiebung. Das Alkinproton von **5** bei 2.88 ppm wird nicht mehr detektiert. Die aromatischen Protonen erscheinen ähnlich zu ihrer Vorstufe **37c**, ebenso wie das Singulett *H-1''* bei 5.69 ppm. Die Allylprotonen resonieren im typischen Bereich für olefinische Protonen. Die Protonen *H-1''* korrelieren im HMBC mit *C-3''* und mit *C-3b*. Proton *H-3b* überlagert mit *H-5a* bei 3.36–3.40 ppm, dennoch kann dort ein Dublett von Dubletts interpretiert werden. Bei Galactose steht die Hydroxylgruppe *OH-4* axial, wodurch *H-3b* sowohl eine *trans*-Kopplung zu *H-2b* (9.6 Hz) als auch eine *cis*-Kopplung zu *H-4b* (3.2 Hz) hat. Entsprechend konnten die Zuckersignale durch 2D-Spektren zugeordnet werden. Diese resonieren im Bereich zwischen 4.13–3.31 ppm, ausgenommen der anomeren Protonen, die jeweils als Dublett bei 4.44 (*H-1a*) und 4.40 ppm (*H-1b*) resonieren. Die Methylgruppe des *N*-Acetats erscheint als Singulett bei 1.97 ppm. Das fehlende Signal der *tert*-Butylgruppe bei 1.45 ppm beweist die erfolgreiche Entschützung.

Die Kohlenstoffatome konnten ebenfalls durch 2D-Spektren zugeordnet werden. Die Signale des Disaccharids sind bei Verschiebungen von 82.6–56.6 ppm zu sehen. Die Ausnahme bilden hier wieder die anomeren Positionen mit 105.0 (*C-1b*) und 101.9 (*C-1a*). Bei 82.0 und 86.1 ppm resonieren die Kohlenstoffe des internalen Alkins *C-1d* und *C-2d*.

4. Ergebnisse und Diskussion

Die aromatischen Signale des Benzol-Rings sind der Vorstufe **37c** sehr ähnlich. Auch hier ist die auffällige 1J -Kopplung von 251 Hz für C-6c zu beobachten. Zusätzlich entstehen durch die Click-Reaktion zwei weitere aromatische Signale, C-2'' und C-3'' bei 146.6 und 124.8 ppm. Der quartäre Kohlenstoff der Acetylgruppe resoniert typisch für Amide bei 173.6 und die Methylgruppe bei 22.9 ppm.

Die Verbindungen wurden nach Aufreinigung durch Säulenchromatographie über *reverse phase* 18 (RP-18) jeweils als TFA-Salz isoliert, das in den ^{19}F -NMR-Spektren jeweils ein zusätzliches Signal bei -77.0 ppm zeigt. Alle Verbindungen der vorgestellten Syntheseroute konnten massenspektrometrisch detektiert werden.

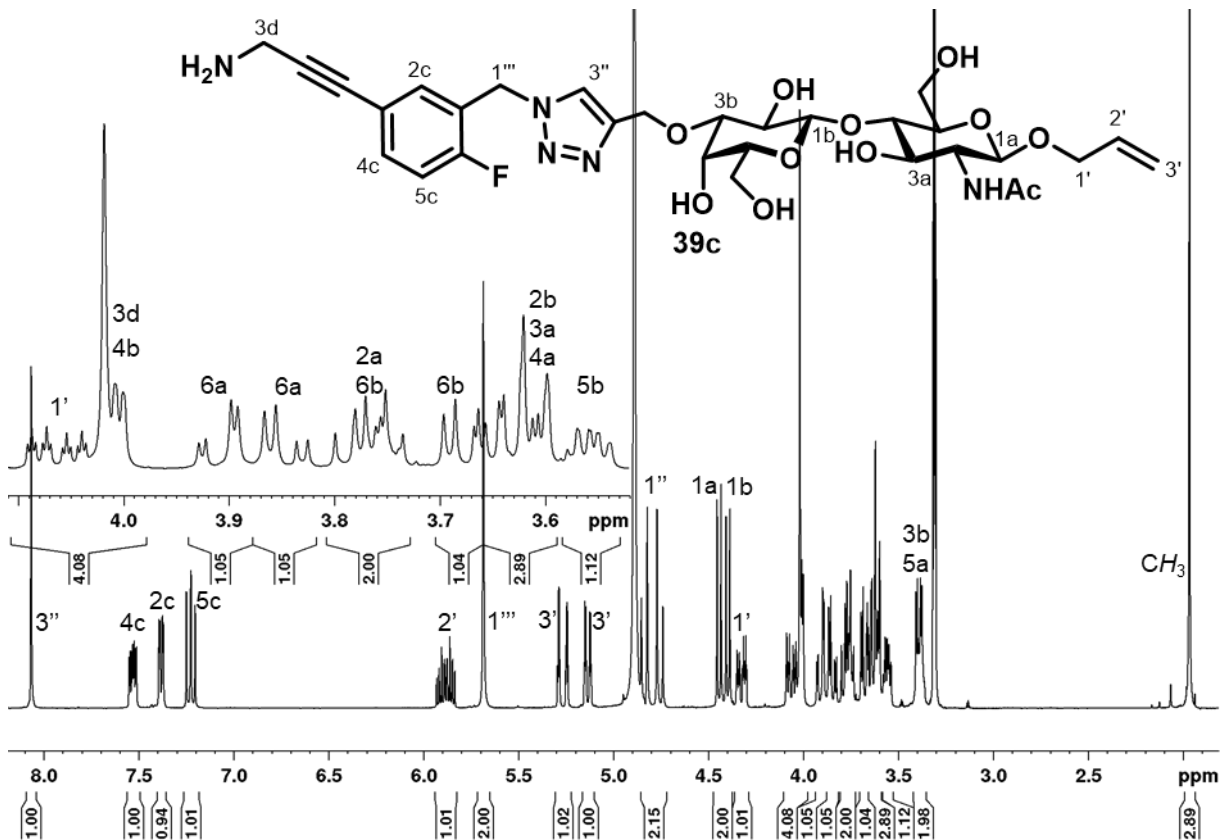


Abbildung 28: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, MeOD) der Verbindung **39c**.

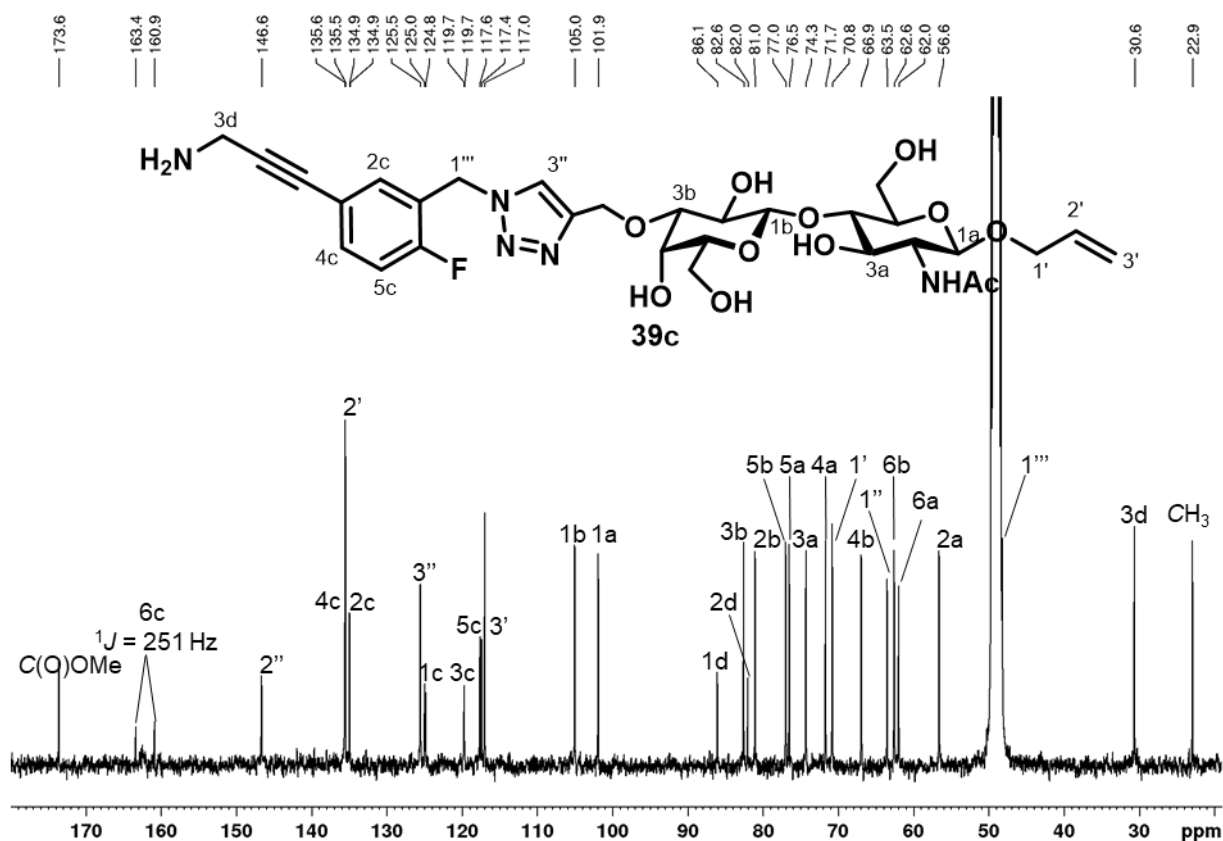


Abbildung 29: ^{13}C -NMR-Spektrum (100 MHz, MeOD) der Verbindung **39c**.

Anschließend wurde der Bindungsmodus anhand von Kristallstrukturen bestimmt und die Affinität durch isotherme Titrationskalorimetrie (*isothermal titration calorimetry*, ITC) zum Protein Galectin-1 gemessen.

4.2.3 Kristallographie und isotherme Titrationskalorimetrie

Zur Bestimmung der Wechselwirkung wurden Kristalle von Galectin-1 gezüchtet und diese anschließend mit den Liganden versetzt. Dieser Vorgang wird als *soaking* bezeichnet (dt: einweichen, tränken) und bietet hier gegenüber der Co-Kristallisation den Vorteil, dass die Proteinkristall unter bereits etablierten Bedingungen wachsen und erst anschließend mit mehreren verschiedenen Liganden versetzt werden.^[252] Auf diese Weise müssen keine neuen Kristallisationsbedingungen optimiert werden. Die Kristallisation des Gal-1, sowie die Messungen und Auswertungen der Röntgenstrukturdaten erfolgten zusammen mit *Dr. Clemens Grimm* und *Julian Bechold*. Zum Heranzüchten der Galectin-1-Kristalle wurden Gasphasendiffusion am hängenden Tropfen mit einer Proteinkonzentration von 20 mg/mL in 2.20 M Ammoniumsulfat-Puffer, 100 mM BisTris (pH = 5) und 1 % β -Mercaptoethanol verwendet. Innerhalb von zwei Wochen wurden bei 16 °C Größen bis von mehreren 100 μm erreicht.

4. Ergebnisse und Diskussion

Für das anschließende *soaking* wurden die ausgereiften Protein-Kristalle für 30 min mit den jeweiligen Liganden versetzt. Diese wurden bereits im Cryo-Puffer zugegeben, dieser enthält statt Wasser 25 % Glycerin und schützt die Protein-Ligand-Komplexe vor Zerstörung durch expandierendes Wasser beim Einfrieren. Die Proben wurden anschließend am Bessy II in Berlin vermessen. Die fluoraromatischen Liganden **39a-f** weisen für die LacNAc-Struktur und das Triazol hervorragende Elektronendichten auf, während für den Aromaten und den Linker keine Elektronendichte zu detektieren ist (**Abbildung 30**).

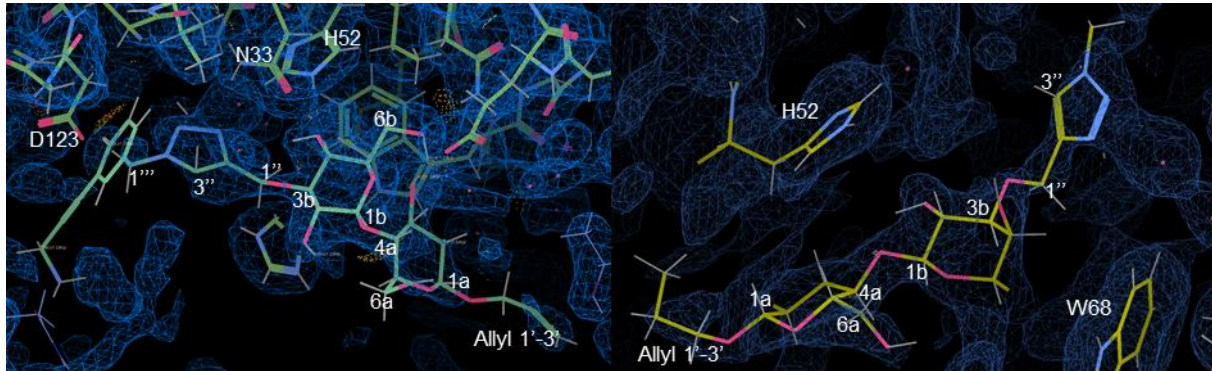


Abbildung 30: Kristallstruktur mit Elektronendichtekarte (blau) am Beispiel des Liganden **39c** in Coot. **Links:** Vollständiger Ligand mit definierter Elektronendichte am Anker und am Triazolring. Für den Aromaten und den Linker sind keine Zusammenhänge mehr zu erkennen. **Rechts:** Andere Perspektive des Liganden mit abgeschnittener Ligand-Struktur. Die Elektronendichte des Leitmotivs LacNAc ist jeweils hervorragend aufgelöst.

Für alle fluoraromatischen Liganden **39a-f** konnten keine vollständige Struktur erzeugt werden. Aufgrund der Fluoratome entstehen destruktive Wechselwirkungen, wodurch sich der Aromat am sp^3 -hybridisiertem Kohlenstoff C-1'' vom Protein wegdreht und unspezifische Konformationen einnimmt. Diese konnten somit in der Röntgenstrukturanalyse nicht erfasst werden, jedoch kann Anhand der Röntgenstruktur von Gal-1 mit dem Liganden **6** (PDB-ID: 5mwx) die Wechselwirkungen nachvollzogen werden (**Abbildung 31**). Die Sauerstoffatome von Ser29 zeigen Abstände zum Kohlenstoff von ca. 4 Å und auch die Heteroatome von Val31 und Leu32 zeigen Abstände von 5.0 und 6.5 Å zum anderen fluorierten Kohlenstoff. Die Abstoßung der negativen Ladungen erklärt die unspezifischen Konformationen, die in der Röntgenstrukturanalyse nicht erfasst wurden.

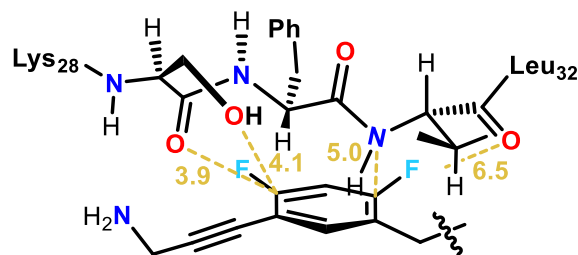


Abbildung 31: Mögliche Wechselwirkung der Fluoratome entsprechend der Lage des Aromaten von Ligand **6** mit Gal-1. Die Abstände der fluorierten Kohlenstoffatome zu den Heteroatomen des Proteins sind abgebildet (gelb). Eine Abstoßung der negativen Ladungen erklärt die unspezifischen Konformationen.

Zusätzlich sollte die Bindungsstärke der Liganden **39a-f** zu Galectin-1 gemessen werden. Für Lectine wurde isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) häufig genutzt, da diese Methode sowohl die Affinitätskonstante K_A (oder auch Dissoziationskonstante $K_D = 1/K_A$) als auch Enthalpie ΔH , Entropie ΔS und die Stöchiometrie n bestimmt.

$$\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln(K_A) = \Delta H - T \cdot \Delta S$$

Das Gerät besteht aus einer Mess- und einer Referenzzelle in einem adiabatischen Mantel (ohne Wärmeaustausch mit der Umgebung). Die Messzelle enthält die Proteinlösung, während über die drehbare Kanüle der Ligand titriert wird (**Abbildung 32**). Die dadurch entstehende Wärme der Messzelle wird von der Referenzzelle durch Energiezufuhr kompensiert, um isotherme Bedingungen zu halten ($\Delta T = 0$).^[206]

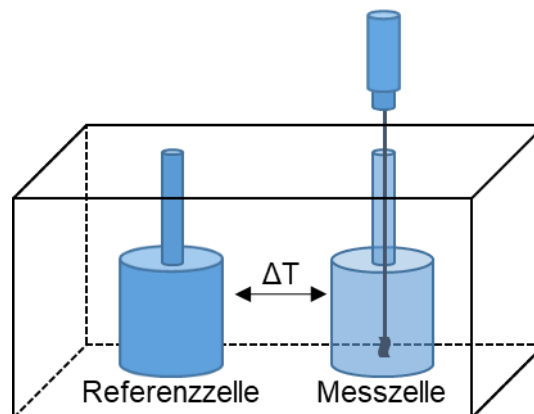


Abbildung 32: Schematischer Aufbau einer isothermen Titrationskalorimetrie (ITC). Die Messzelle ist mit Proteinlösung befüllt, während der Ligand über die drehbare Kanüle zugegeben wird. Die dadurch entstehende Wärmeänderung wird bei der Referenzzelle ausgeglichen.

Die Wärmeleistung ($\mu\text{J/s}$) jeder Injektion wird gegen die Zeit aufgetragen und ergibt das ITC-Diagramm (**Abbildung 33 links**). Um entstehende Dissoziationswärme durch Konzentrationsunterschiede zu verhindern, wurde der Puffer des dialysierten Proteins ebenfalls für den Liganden verwendet. Die ersten Komplexbildungen zwischen Protein und Ligand führen zu einer deutlichen Änderung der Energie. Durch Absättigung der Bindestellen wird stetig weniger Energie freigesetzt. Zur Auswertung der Messung wird die individuelle Injektionswärme auf die eingesetzte Stoffmenge bezogen (kcal/mol) und gegen das Stoffmengenverhältnis zwischen Ligand und Protein aufgetragen. Aus der entstehenden sigmoidalen Kurve lassen sich die Enthalpie ΔH , die Dissoziationskonstante K_D und die Stöchiometrie n bestimmen (**Abbildung 33 rechts**).^[206]

4. Ergebnisse und Diskussion

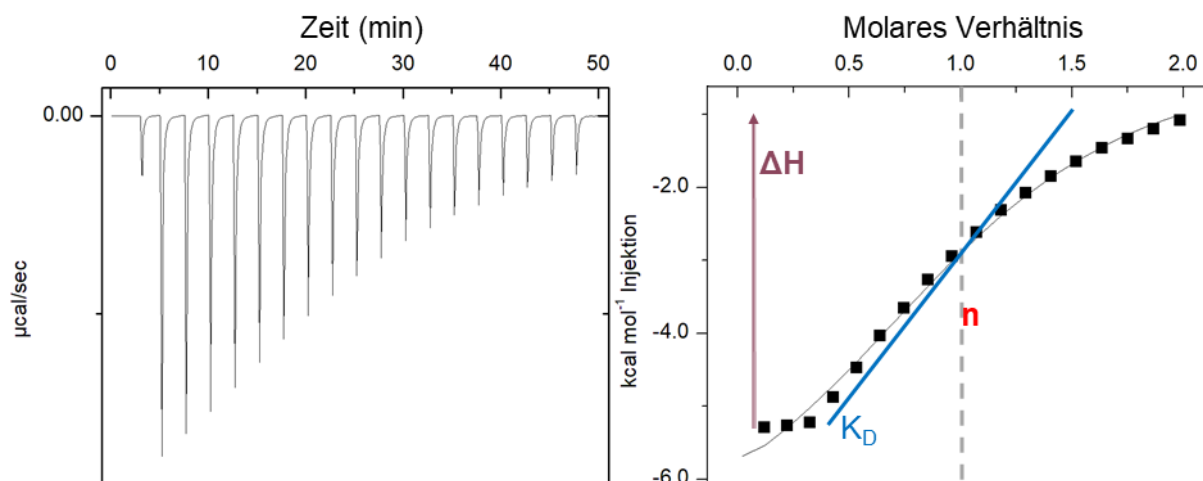


Abbildung 33: ITC-Diagramm. **Links:** Die erforderliche Energie, um beide Zellen auf isotherme Bedingungen zu halten. Eine Wärmeänderung entsteht durch Titration des Liganden. **Rechts:** Integrierte Wärmeänderung pro Injektion und sigmoidale angepasste Kurve. n : Stöchiometrie, Mittelpunkt der Kurve; K_D : Dissoziationskonstante, Steigung der Kurve am Mittelpunkt; ΔH : Enthalpie, direkt bestimmbar durch die frei gewordene Wärme.

Die Liganden **39a-f** wurden in 20 mM des identischen Protein-Puffers gelöst und einer 1.0 mM Lösung an Galectin-1 titriert. Die Affinitäten sind in **Tabelle 5** zusammengefasst. Eine kleinere Dissoziationskonstante K_D deutet auf eine starke Komplexbildung hin (Vergleich **Kapitel 2.5.2**).

Tabelle 5: Affinitäten durch ITC-Messungen zwischen Liganden **39a-f** zum Galectin-1. Die angegebenen Werte sind die Dissoziationskonstanten K_D in $[\mu\text{M}]$.

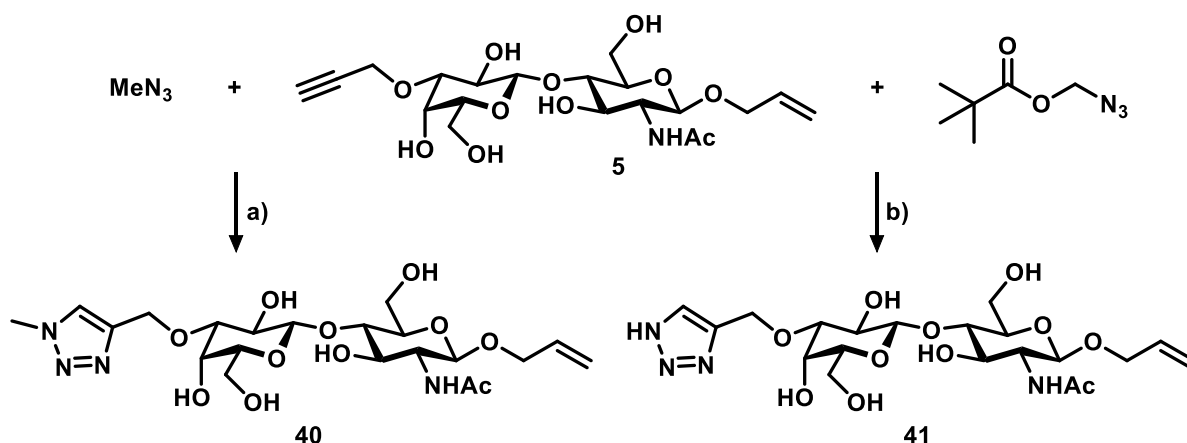
Terminale Gruppe R^3 und aromatische Atome R^1/R^2	39a $R^1 = F$ 39b $R^2 = F$	39c $R^1 = H$ 39d $R^2 = F$	39e $R^1 = F$ 39f $R^2 = H$
Amino $R^3 = H$	155 ± 8	151 ± 22	175 ± 4
Guanidino $R^3 = \text{NH}_2(\text{NH})\text{C}$	162 ± 20	238 ± 44	208 ± 12

Die Ergebnisse bestätigen eine geringfügig schlechtere Bindung der fluorierten Liganden im Vergleich zum bereits publiziertem **6** ($K_D(\mathbf{6}) = 104 \pm 23 \mu\text{M}$)^[205], liegen jedoch in der gleichen Größenordnung. Dieser Ligand hat etwa die gleiche Affinität wie das natürliche LacNAc ($K_D(\text{LacNAc}) = 91 \pm 5 \mu\text{M}$)^[205], da einerseits die Enthalpie ΔH durch die neue Wechselwirkung zwar erhöht ist, der Verlust von Entropie ΔS durch verdrängtes Wasser aber diesen kompensiert. Deswegen ist ΔG und somit auch K_A nahezu unverändert.

Die schlechtere Bindung der fluorierten Liganden wird auch durch die Kristallstrukturen bestätigt. Das LacNAc-Motiv trägt am meisten zur Bindung mit dem Protein bei, während der erweiterte Linker keine erheblichen attraktiven Wechselwirkungen aufzeigt. Die Fluorierung des Aromaten schwächt demnach die Interaktionen und erniedrigt die Affinität.

Alle Liganden weisen eine konservierte Wechselwirkung des Disaccharids mit der Bindetasche und des Triazol-Rings auf. Dieser bildet H-Brücken über ein Wassermolekül mit N33 aus. Der Entropieverlust durch verdrängtes Wasser soll minimiert werden, indem der Rest am Triazol eine sterisch weniger anspruchsvolle Gruppe hat. Dazu sollten die Verbindungen **40** mit einer Methylgruppe und **41** mit einem Wasserstoffatom dargestellt werden. Für die Reaktion mit Methylazid muss dieses generiert und in Lösung gehalten werden. Eine saubere Isolierung und Charakterisierung ist aufgrund der Detonationsgefahr nicht zu empfehlen. Dazu wird Methyljodid in THF vorgelegt und NaN_3 in H_2O hinzugeetropt. Die Lösung wird über Nacht bei RT gerührt, um einen quantitativen Umsatz zu gewährleisten. Anschließend wird **5** im Unterschuss unter bekannten Click-Bedingungen hinzugegeben und für 1 h zur Reaktion gebracht (**Schema 23 a**).

Das unsubstituierte Triazol ist nicht über die Reaktion mit N_3^- zugänglich, ebenso ist eine Reaktion mit HN_3 wegen der hohen Toxizität nicht zu empfehlen. Dafür konnte **5** mit Azidomethylpivalat zur Reaktion gebracht werden. Die folgende Umesterung mit NaOMe spaltet das Zwischenprodukt in Methylpivalat, Formaldehyd und das gewünschte Produkt **41 (b)**.



Schema 23: Synthese von Galectin-1 Liganden mit kurzem Rest am Triazol. **a)** MeI, NaN_3 , THF, H_2O , RT, 16 h; dann **5**, NaAsc, CuSO_4 , RT, 1 h, 67 %; **b)** **1: 5**, Azidomethylpivalat, NaAsc, CuSO_4 , *t*-BuOH/ H_2O , 1 h, RT, 90 %; **2:** NaOMe, MeOH, RT, 3 h, 66 %.

Gezüchtete Kristalle von Galectin-1 wurden nach vorherig beschriebener Prozedur mit diesen gekürzten Liganden versetzt und am Elektronen-Synchrotron in Hamburg vermessen. Die aufgelösten Strukturen sind in **Abbildung 34** gezeigt.

4. Ergebnisse und Diskussion

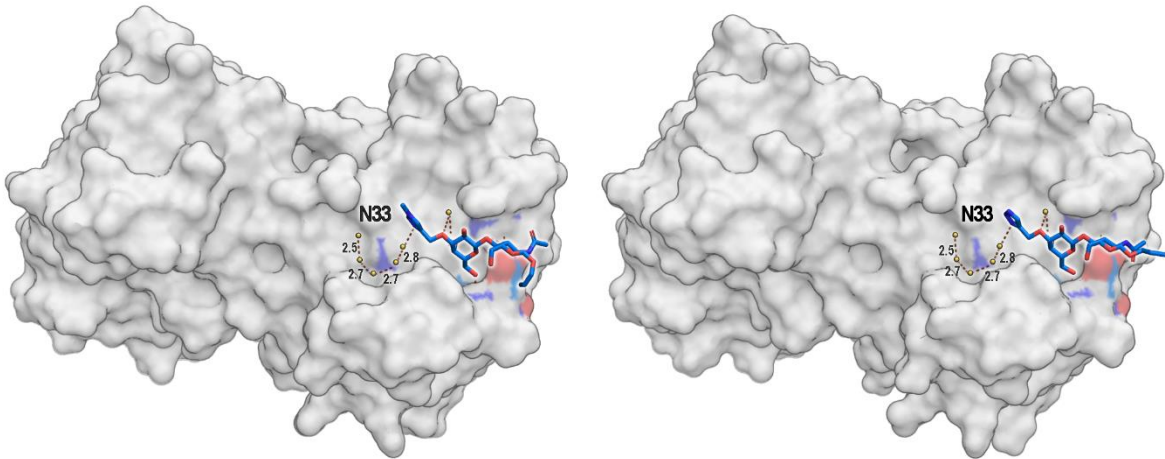


Abbildung 34: Kristallstrukturen der Moleküle **40** (PDB ID: 8B0Z, Auflösung: 1.23 Å, $K_D = 128 \pm 9 \mu\text{M}$) und **41** (PDB ID: 8B0W, Auflösung: 1.53 Å, $K_D = 238 \pm 55 \mu\text{M}$).

Die LacNAc-Einheiten beider Verbindungen wechselwirken gemäß dem natürlichen Saccharid. Der Triazol-Ring wechselwirkt über ein Wassermolekül mit der Aminosäure Asn 33. Weiterhin bildet dieses Wassermolekül mit einer Kette von weiteren verankerten Wassermolekülen ein stabiles Gerüst. Die Molekülabstände sind mit jeweils 2.5–2.8 Å zueinander im optimalen Abstand für H-Brücken. Die Dissoziationskonstanten sind mit $128 \pm 9 \mu\text{M}$ und $238 \pm 55 \mu\text{M}$ ebenfalls in der Größenordnung der LacNAc-basierenden Liganden. Durch die H-Brücken der Wassermoleküle ist der Triazol-Rest für alle beschriebenen Liganden konserviert.^[205] Der große Unterschied der Dissoziationskonstanten lässt sich lediglich durch die Methylgruppe am Triazolring erklären. Beim 1,2,3-H-Triazol **41** können zwei Tautomere auftreten, die 1H- und 2H-Form. Dabei dominiert in wässriger Lösung die 2H-Form (**Abbildung 35**).^[253] Dieses Gleichgewicht stört die H-Brückenbildung zwischen dem Wassermolekül auf der Oberfläche des Galectin-1 und dem Triazol **41**. Dieses Gleichgewicht ist im Triazol **40** durch die Methylgruppe an Position 3 unterbunden, sodass die Wasserstoffbrücke zwischen dem Triazol-Ring in **40** und dem Wassermolekül permanent ausgebildet ist.

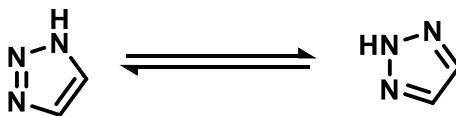


Abbildung 35: Tautomerie von 1H-1,2,3-Triazol (links) und das in wässriger Lösung dominante 2H-1,2,3-Triazol (rechts).

Dennoch konnten in dieser Arbeit erfolgreich mehrere Liganden synthetisiert und durch ITC-Messungen und Kristallographie neue Erkenntnisse gewonnen werden. Fluoratome im

aromatischen Ring führen zu destruktiven Wechselwirkungen und einem Konformationswechsel des Linkers. Die Erweiterung über die *OH-3b* der Galactose-Einheit erbrachte keine Erhöhung der Affinität. Durch die neuen möglichen Wechselwirkungen steigt die Bindungsenthalpie ΔH , wird jedoch durch den Entropieverlust ΔS des verdrängten Wassers kompensiert (**Abbildung 36**). Obwohl eine höhere Selektivität durch die Nutzung der Oberfläche erzeugt wird, werden die Wassermoleküle verdrängt, womit sich die Entropie erniedrigt und die Dissoziationskonstante erhöht.

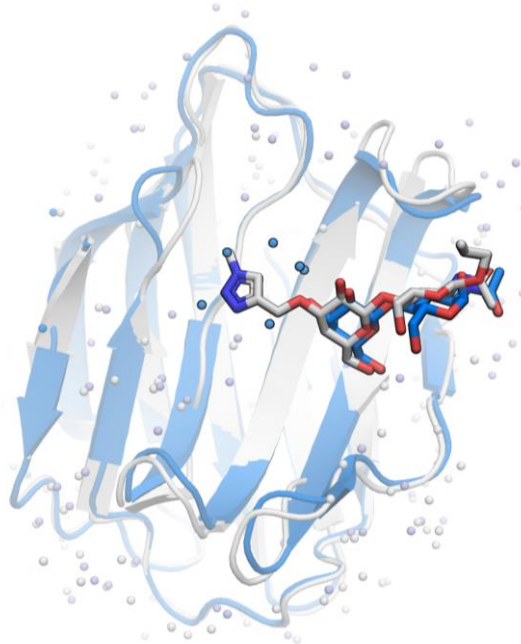


Abbildung 36: Überlagerte Röntgenstrukturen des natürlichen Liganden LacNAc (blau) und des synthetischen Liganden **41**. Dunkelblaue Punkte entsprechen je einem Wassermolekül, das durch den Triazol-Ring verdrängt wurde.

Eine Steigerung der Bindungsaffinität könnte durch Modifikation an der LacNAc-Einheit erzeugt werden. Die Substitution der Hydroxylgruppen durch Amino- oder Acetamidgruppen könnte einerseits die Anzahl der H-Brücken und somit die Bindung erhöhen und andererseits Akzeptoren von H-Brücken einführen. Solche Überlegungen müssen vor der aufwendigen Synthese jedoch moduliert und berechnet werden.

LacNAc-Einheiten vermitteln durch Wechselwirkungen mit Lectinen, wie das Gal-1, diverse biologische Interaktionen. Die beschriebenen hMSC und hMSC-TERT (Vergleich **Kapitel 4.1**) exprimieren dieses Protein. Im Folgenden sollte daher ein Ligand über die unbeteiligte Allylgruppe funktionalisiert werden, damit dieser für CuAAC in *glycoengineered cells* (Zellen die mit einem unnatürlichen Zucker inkubiert wurden) zur Verfügung steht.

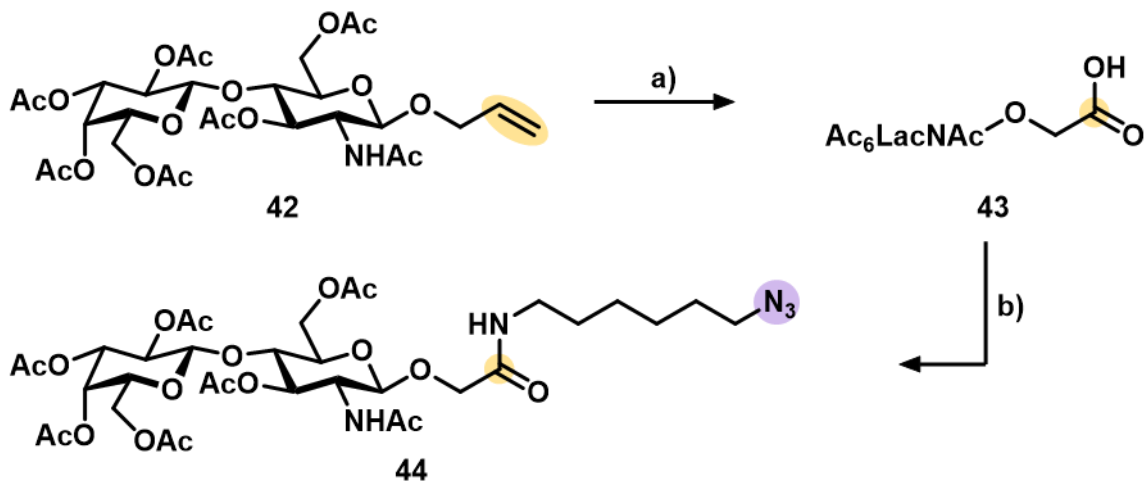
4.2.4 Erweiterung des Galectin-Liganden

Das *metabolic glycoengineering* (Vergleich **Kapitel 4.1**) bei hMSC zeigte einen effizienteren Einbau von SiaNAI **8a** im Vergleich zum SiaNAz **8b**. Für die weitere Konjugation an lebenden Zellen ist daher eine Fütterung mit Alkin-Zuckern und anschließender Click-Reaktion mit Aziden sinnvoll.

Stromazellen weisen eine hohe Expression an Galectin-1 auf.^[241] Um diese in der extrazellulären Matrix zu adressieren, müssen die Liganden **39a-f**, bzw. **40** und **41** entsprechend um eine Azidgruppe erweitert werden, um sie an *glycoengineered cells* (Zellen mit einem metabolisch eingebauten unnatürlichen Zucker) kovalent zu binden.

4.2.4.1 Azid-Funktionalisierung durch Oxidation der Doppelbindung

Die Liganden **39a-f** tragen an der Position der GlcNAc-Einheit ein Olefin. Dieses kann mit einer Reihe an Reaktionen wie Thiol-En,^[214] Kreuzmetathese,^[212] Cyclisierung^[158] oder Oxidation weiter funktionalisiert werden. In einem Vorversuch wurde AllylLacNAc **42** mit einem Überschuss an NaIO₄ mit katalytischen Mengen an RuCl₃ zur Säure oxidiert^[254] und diese anschließend in einer Amidkupplung mit 6-Azidohexylaminhydrochlorid umgesetzt (**Schema 24**). Zur Aktivierung der Säure wurde HATU in DMF und DIPEA verwendet.



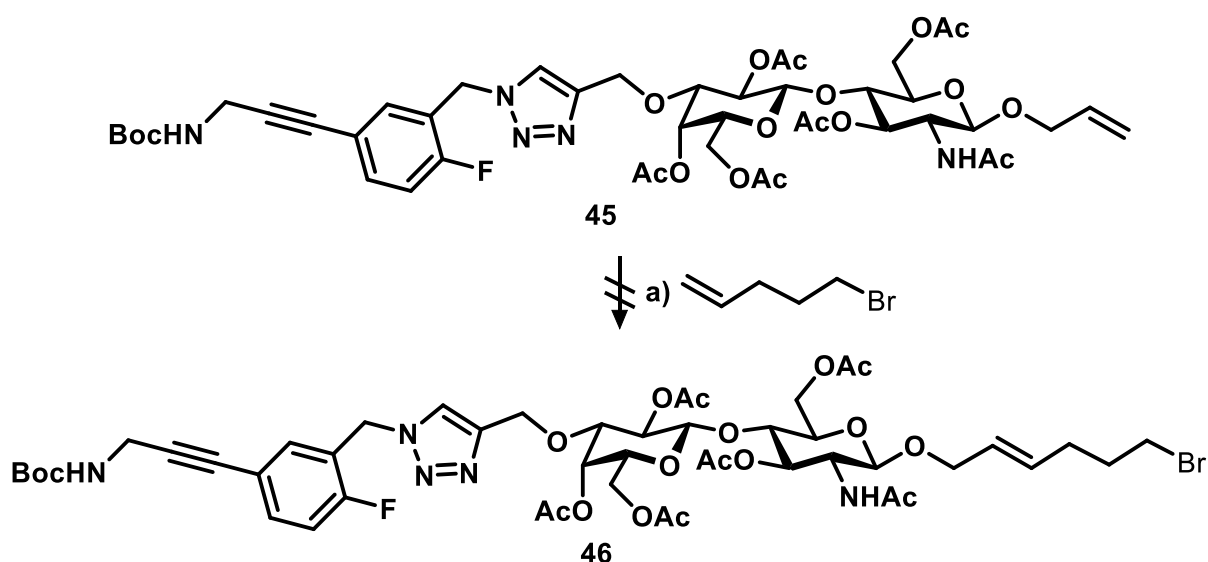
Schema 24: Synthese von azidofunktionalisiertem LacNAc. **a)** RuCl₃, NaIO₄, H₂O, MeCN, DCM, AcOH, RT, 3 h; **b)** 6-Azido-hexylaminhydrochlorid, HATU, DIPEA, DMF, 0 °C→RT, 16 h, 37 % (2 Stufen).

Die erfolgreiche Synthese ist jedoch nicht für alle Edukte anwendbar, da NaIO₄ ebenfalls interne Alkine oder Alkohole oxidiert und sich deshalb nicht für die Liganden **39a-f** eignet.

4.2.4.2 Azid-Funktionalisierung durch Kreuzmetathese

Eine weitere Möglichkeit Alkene zur Reaktion zu bringen, ist die Kreuz- bzw. Olefinmetathese. Bei dieser Katalyse reagieren typischerweise zwei terminale Alkene inter- oder intramolekular unter Abspaltung von Ethen miteinander, wodurch eine Kettenverlängerung erfolgt oder eine cyclische Verbindung entsteht.^[212] Die Entwicklung dieser Methode ist bedeutend für die organische Synthese, weswegen die Ruthenium-Katalysatoren nach dem Entwickler Grubbs benannt wurden.^[255] Diese Reaktion ist trotz des Namens nicht selektiv für Olefine sondern toleriert auch Alkine als Reagenz.^[213, 256] Sonderfälle zeigen jedoch auch eine selektive Reaktion zwischen zwei Doppelbindungen, trotz Anwesenheit eines Alkins. Konkret wurde die Selektivität durch räumliche Nähe der gewünschten Reaktionspartner und somit einer intramolekularen Knüpfung begünstigt.^[257]

Im vorliegenden Fall wurde eine Diskriminierung des internen Alkins zugunsten der frei zugänglichen Allylgruppe vermutet. Grubbs-Metathesen werden häufig in DCM als Lösungsmittel durchgeführt, dafür wurde Verbindung **39c** mit einem Überschuss an Ac₂O und Pyridin quantitativ acetyliert. Daraufhin sollte die Allylfunktion mit einem Überschuss an 5-Brom-1-penten unter Grubbs-Bedingungen zur Reaktion gebracht werden (**Schema 25**). Ein Überschuss an Linker soll der Dimerisierung von **45** vorbeugen und das entstehende 1,8-Dibrom-4-octen säulenchromatographisch entfernt werden. Das eingeführte Bromatom kann anschließend in einer S_N2-Reaktion mit NaN₃ substituiert werden.



Schema 25: Grubbs-Metathese. a) 5-Brom-1-penten, Grubbs II, DCM, 45 °C, 3 h, 0 %.

Nach 3 h Reaktionszeit zeigte die DC einen zweiten *spot*. Das Edukt war nicht quantitativ abreagiert und der Umsatz konnte auch durch weitere Zugabe von 5-Brom-1-penten, Katalysator oder längere Reaktionszeit nicht erhöht werden. Eine Probe der Reaktion wurde

4. Ergebnisse und Diskussion

aufgearbeitet und das neu entstandene Produkt $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopisch (**Abbildung 37**) und massenspektrometrisch (**Abbildung 38**) untersucht, wobei das Produkt nicht vom Edukt abgetrennt wurde.

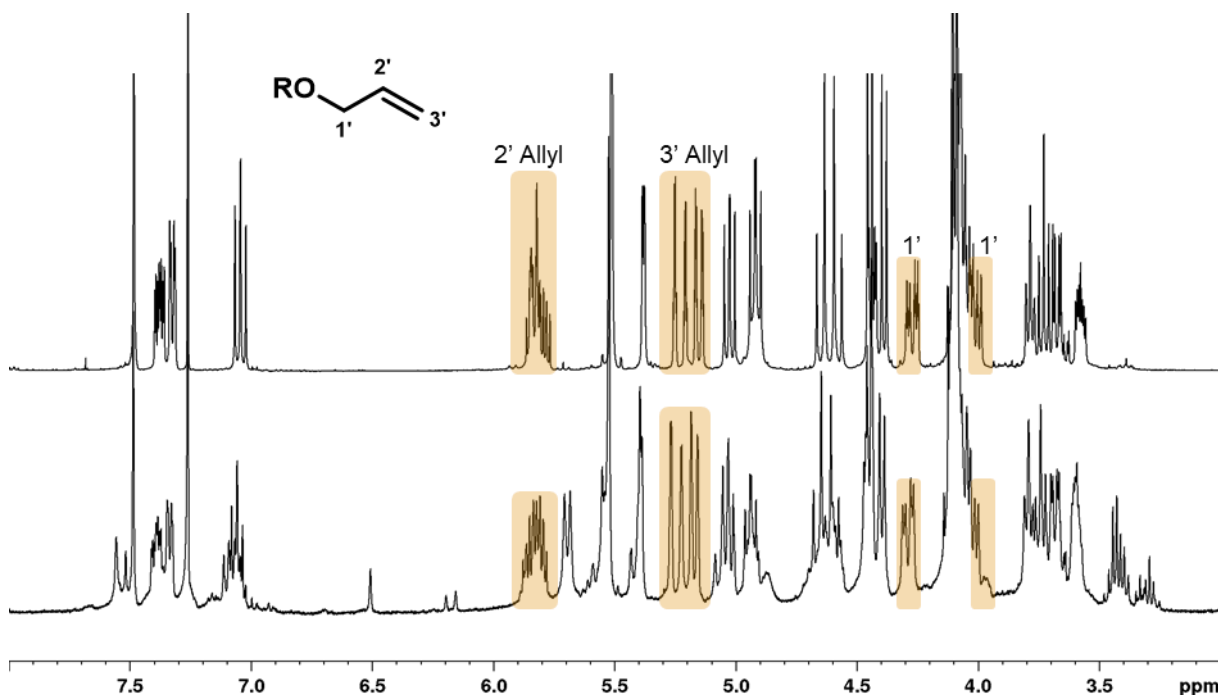


Abbildung 37: Ausschnitte aus den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (400 MHz, CDCl_3) des Edukts 45 (oben) und dem Reaktionsgemisch der Kreuzmetathese (unten). Integrale der Allylprotonen zeigen keine Veränderung, die auf eine erfolgreiche Reaktion schließen lassen.

Der Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren zeigt, dass die Allylgruppe an der Reaktion nicht beteiligt war, da die Signale gleiche Intensitäten und die Intergrale dieser Protonen zu den anderen Integralen passende Verhältnisse aufweisen. Zusätzlich konnte neben dem Edukt bei $[\text{E}+\text{Na}]^+$ 998 m/z ein Signal bei 1146 und 1148 m/z (Nebenprodukt, NP) gemessen werden. Das gewünschte Produkt würde die Massen $[\text{P}+\text{Na}]^+$ 1118 und 1120 m/z im Spektrum zeigen. Der beschriebene Mechanismus in der Literatur lässt das in **Abbildung 38** abgebildete Molekül vermuten,^[258] dessen berechnete Molekülmasse mit der gemessenen übereinstimmt und auf eine Reaktion mit dem Alkin schließen lässt.

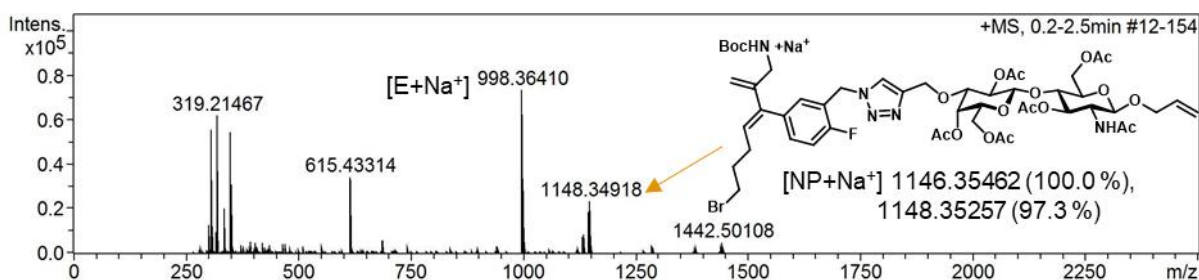


Abbildung 38: Massenspektrum der Grubbs-Metathese. Abgebildetes postuliertes Nebenprodukt zu den Massen. Im Vergleich die Massen des erwarteten Produkts: 1118.32332 (100.0 %) und 1120.32127 (97.3 %).

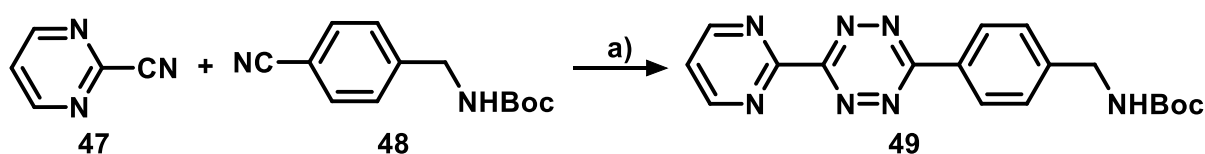
4.2.4.3 iEDDA mit Pyrimidin-Tetrazin

Durch die Bildung von Nebenprodukten und keines nachweisbaren erwünschten Produkts wurde die Olefin-Metathese als Strategie verworfen.

Weiterhin ist jedoch die Reaktion mit Tetrazinen in einer Diels-Alder Reaktion mit inversen Elektronenbedarf möglich. Auch hier ist eine Nebenreaktion mit dem internen Alkin möglich, die aufgrund der sterischen Wechselwirkung deutlich langsamer ablaufen sollte.

Zunächst sollte ein Tetrazin mit einer Azidogruppe dargestellt werden. Der Pyrimidin-Rest von Verbindung **49** erhöht die Reaktionsgeschwindigkeit der Cyclisierung und soll zusätzlich das interne Alkin von **39c** durch sterische Hinderung diskriminieren. Pyrimidin- oder Pyridin substituierte Tetrazine wurden auch für Click-Reaktionen in lebenden Zellen verwendet.^[259-260]

Die asymmetrische Tetrazin-Synthese wurde bereits mit Ausbeuten von 7 %^[260] und 11 %^[261] durchgeführt. Die Vorschrift mit der höheren Erfolgserwartung wurde durchgeführt und aufgrund der Bildung von symmetrischen Nebenprodukten ebenfalls nur sehr niedrige Ausbeuten (3–6 %) erzielt. Die beiden Nitrile **47** und **48** wurden jeweils mit einem Überschuss an Hydrazinhydrat bei 70 °C zur Reaktion gebracht. Hauptsächlich wurden die Nebenprodukte der Homokupplungen beobachtet (**Schema 26**).



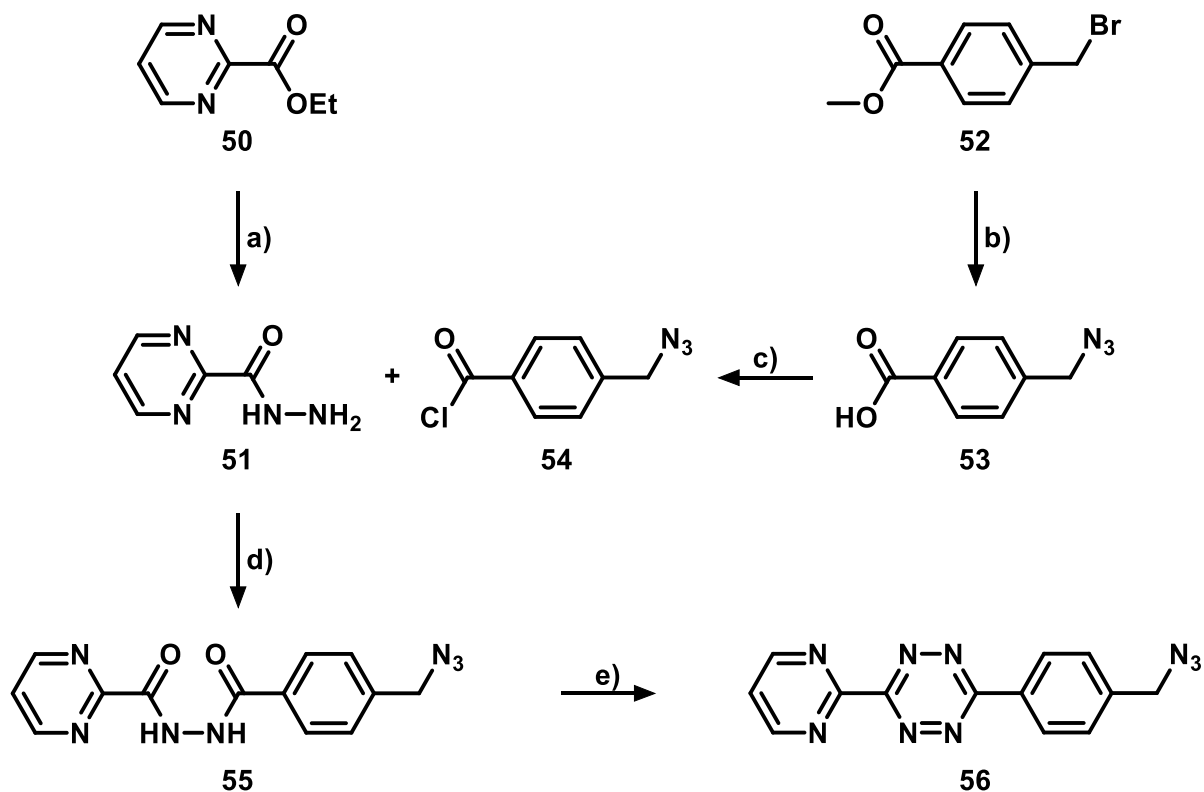
Schema 26: Synthese von Tetrazin **49**. a) $\text{H}_2\text{NNH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, EtOH, 70 °C, 7 h, dann NaNO_2 , AcOH, H_2O , 0 °C, 1 h, 3-6 % (über zwei Stufen).

Für die folgenden Reaktionsschritte (saure Boc-Entschützung zum Amin und Umwandlung zum Azid) war diese direkte asymmetrische Synthese aufgrund der geringen Ausbeuten keine effiziente Reaktionsführung. Eine erfolgreiche Synthesestrategie gelang durch die selektive Aktivierung und Kupplung der einzelnen Aromaten (**Schema 27**). Dazu wurde 2-Carboxylethylesterpyrimidin **50** in der Mikrowelle zum Hydrazid **51** umgesetzt. Im Gegensatz zum Nitril reagiert dieses mit keinem weiteren Hydrazinmolekül, um Dimere oder Oligomere zu bilden (**a**).

Parallel dazu wurde das Bromatom bei 4-(Bromomethyl)methylbenzoat **52** in einer Mikrowellenreaktion (130 °C, 300 W, 20 min) durch ein Azid substituiert und der Ester unter wässrig basischen Bedingungen verseift (**b**). Die Säure **53** wurde mit Oxalylchlorid (COCl_2) aktiviert (**c**) und bei RT unter Zugabe von Hilfsbase NEt_3 mit **51** zur Reaktion gebracht (**d**). Zuletzt wurde das doppelte Hydrazid **55** bzw. die *N-N'*-verknüpften Amide mit einem

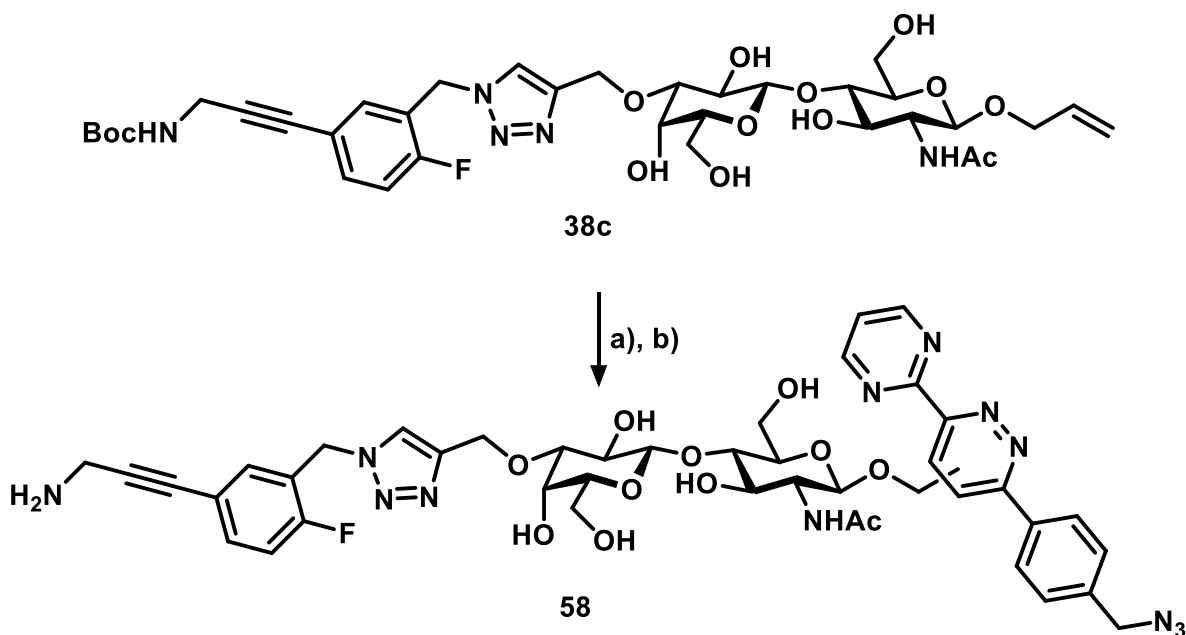
4. Ergebnisse und Diskussion

Überschuss PCl_5 bei $135\text{ }^\circ\text{C}$ aktiviert. Anschließend erfolgte durch einen Überschuss an $\text{H}_2\text{NNH}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ der Ringschluss mit anschließender Oxidation mit NaNO_2 unter sauren Bedingungen zum Azido-Tetrazin **56** (**e**).



Schema 27: Synthese von Azido-Tetrazin **56**. **a)** $\text{H}_2\text{NNH}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$, EtOH, MW, $95\text{ }^\circ\text{C}$, 30 min, 99 %; **b)** NaN_3 , DMF, MW, $130\text{ }^\circ\text{C}$, 20 min, dann NaOH, RT, 16 h, 84 % (über zwei Stufen); **c)** $(\text{COCl})_2$, DMF, DCM, $45\text{ }^\circ\text{C}$, 2 h direkte Verwendung; **d)** **54**, NEt_3 , DCM, RT, 4 h, 41 %. **e)** PCl_5 , Tol, $135\text{ }^\circ\text{C}$, 3 h, dann $\text{H}_2\text{NNH}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$, DCM, RT, 2 h, dann NaNO_2 , AcOH, H_2O , $0\text{ }^\circ\text{C}$, 30 min, 34 %.

Anschließend wurde dieses mit **38c** zur Reaktion gebracht. Endständige Doppelbindungen reagieren im Gegensatz zu gespannten Doppelbindungen wie in *trans*-Cycloocten (TCO) nur sehr langsam. Daher wurde die Reaktion bei $60\text{ }^\circ\text{C}$ für 48 h durchgeführt (**Schema 28a**). Die Verwendung eines kleinen Überschusses **38c** (1.10–1.20 Äq.) führte zum quantitativen Umsatz von Tetrazin **56** und gleichzeitiger Minimierung von Nebenprodukten. Eine doppelte Cyclisierung mit dem internen Alkin konnte massenspektrometrisch verfolgt werden (Nebenprodukt + Na^+ : 1314.4900; Produkt **57** + Na^+ : 1049.3851). Durch den Überschuss konnte verbleibendes Edukt und geringfügig entstandenes Nebenprodukt säulenchromatographisch und mittels präparativer DC abgetrennt werden. Die Boc-Schutzgruppe wurde mit 50 % TFA in MeOH abgespalten. Das Produkt **58** wurde über RP-18 Kieselgel gereinigt und als roter Feststoff isoliert.



Schema 28: Orthogonale Cycloaddition des ausgewählten Galectin-Ligandens **39c** mit Azido-Tetrazin **56** zur Konjugation des Liganden auf Zelloberflächen. **a)** **56**, MeOH, DCM, 60 °C, 48 h, 58 %; **b)** TFA, MeOH, RT, 16 h, 76 %.

Die $^1\text{H-NMR}$ Spektren des Edukts **38c**, der Zwischenstufe **57** und der Zielverbindung **58** sind in **Abbildung 39** gezeigt.

Die Allylgruppe reagiert mit dem Tetrazin **56** unter Abspaltung von N_2 . Das Fehlen der Signale der Allylprotonen deutet auf eine erfolgreiche Cycloaddition hin. Zusätzlich erfahren die Signale der $H-1'$ Protonen eine Tieffeldverschiebung und überlagern dort mit den Protonen $H-1''$ und dem Wassersignal des Lösungsmittels.

Eine Nebenreaktion mit dem internen Alkin wurde in der Masse nachgewiesen, bei der isolierten Verbindung jedoch sind die Kohlenstoffsignale des Alkins bei 81.3 und 87.6 ppm vorhanden. Die Azidobenzylgruppe resoniert als Singulett bei 4.01 ppm. Die restlichen aromatischen Protonen resonieren tieffeldverschoben und sind gegenüber den Signalen vom fluorierten Aromaten gut zu unterscheiden.

Die Signale des Disaccharids sind nahezu unverändert (Vergleich $^1\text{H-NMR}$ - und $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren in den **Abbildungen 28** und **29** im **Kapitel 4.2.2**). Im letzten Syntheseschritt wurde die Boc-Schutzgruppe entfernt, weswegen das Signal der *tert*-Butylgruppe bei 1.50 ppm in der Zielverbindung nicht mehr zu sehen ist.

Zusätzlich zu den NMR-Daten konnten alle Verbindungen massenspektrometrisch nachgewiesen werden.

4. Ergebnisse und Diskussion

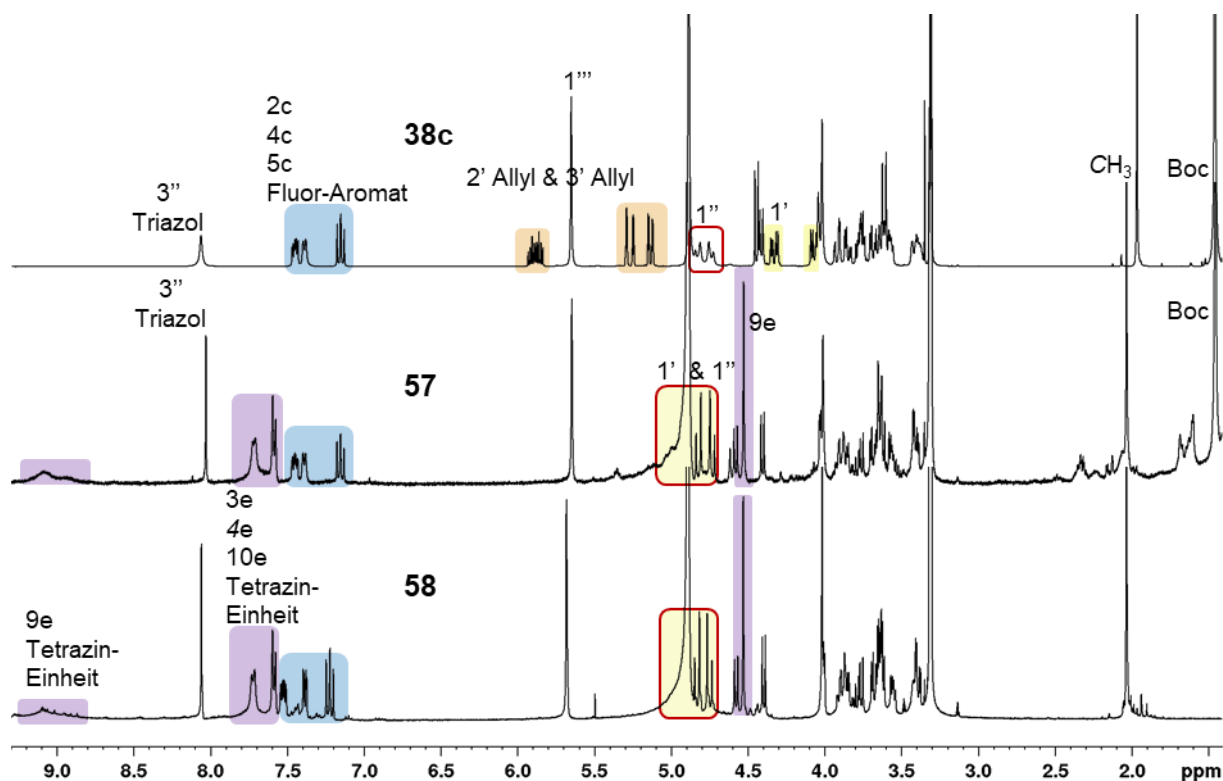


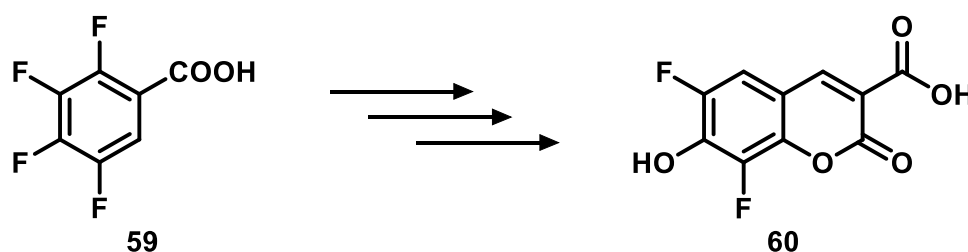
Abbildung 39: $^1\text{H-NMR}$ Spektren (400 MHz, MeOD) der Verbindungen **38c**, **57** und **58**.

Durch geschickte Synthesestrategie wurde ein Galectin-1 Ligand erfolgreich um eine Azidogruppe erweitert. Diese steht für bioorthogonale Reaktionen zur Verfügung. Durch *metabolic glycoengineering* manipulierte Zellen wurden mit der dargestellten Verbindung konjugiert, wodurch eine Anreicherung an Bindungsmotiven für Galcetin-1 auf der Zelloberfläche von hMSC-TERT entstehen, die das Protein in hohem Maße exprimieren. Diese Verbindung wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. Dr. R. Ebert und Prof. Dr. B. Fabry über CuAAC auf die Stammzellen gebunden und die Auswirkung auf die Steifigkeit der Zellen gemessen (**Kapitel 4.4**).

Durch kovalente Bindung mit einem Fluoreszenzfarbstoff lässt sich der bioorthogonale Ligand weiterhin verbessern. Dazu wurde ein Molekül moduliert und synthetisiert, welches geschickt die Liganden-Einheit mit einem Fluorophor und einer Azidogruppe vereint.

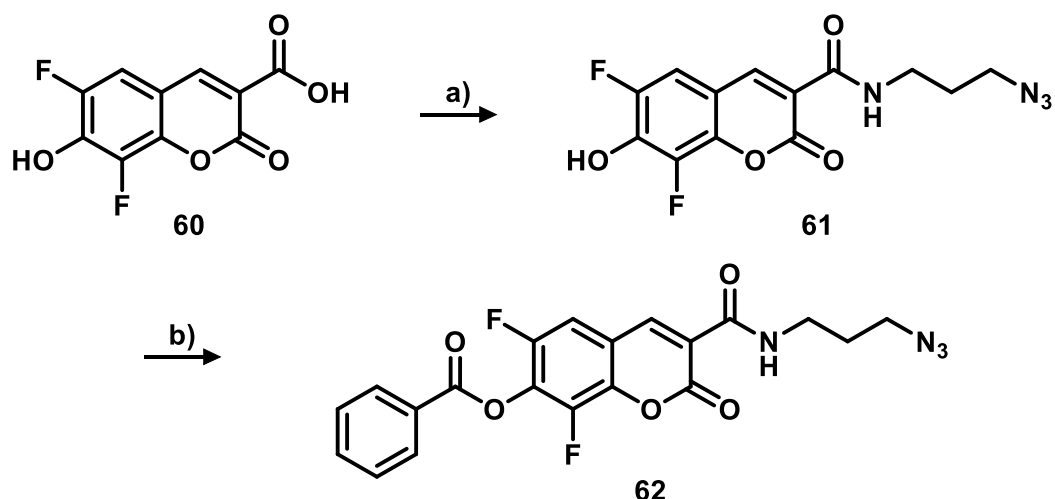
4.2.4.4 Fluoreszierender Galectin-1 Ligand zur Visualisierung in Zellen

Zusätzlich war es von Interesse einen Galectin-1 Liganden zu synthetisieren, der sowohl bioorthogonal konjugierbar ist als auch gleichzeitig optisch nachverfolgt werden kann. Durch die kovalente Bindung eines Fluorophors wird dieses gewährleistet. Das Coumarin-Derivat „Pacific Blue“ **AG10** ist klein genug, um die Ligand-Protein-Wechselwirkung nicht zu stören. Im Rahmen der Bachelorarbeit von *Adrian Graef*^[262] betreut durch *Jürgen Mut* im Arbeitskreis von *Prof. Dr. J. Seibel* wurde dieses ähnlich zu bereits publizierten Vorschriften synthetisiert (**Schema 29**).^[263]



Schema 29: Synthese des Fluorophors „Pacific Blue“ **60** durch *Adrian Graef*.

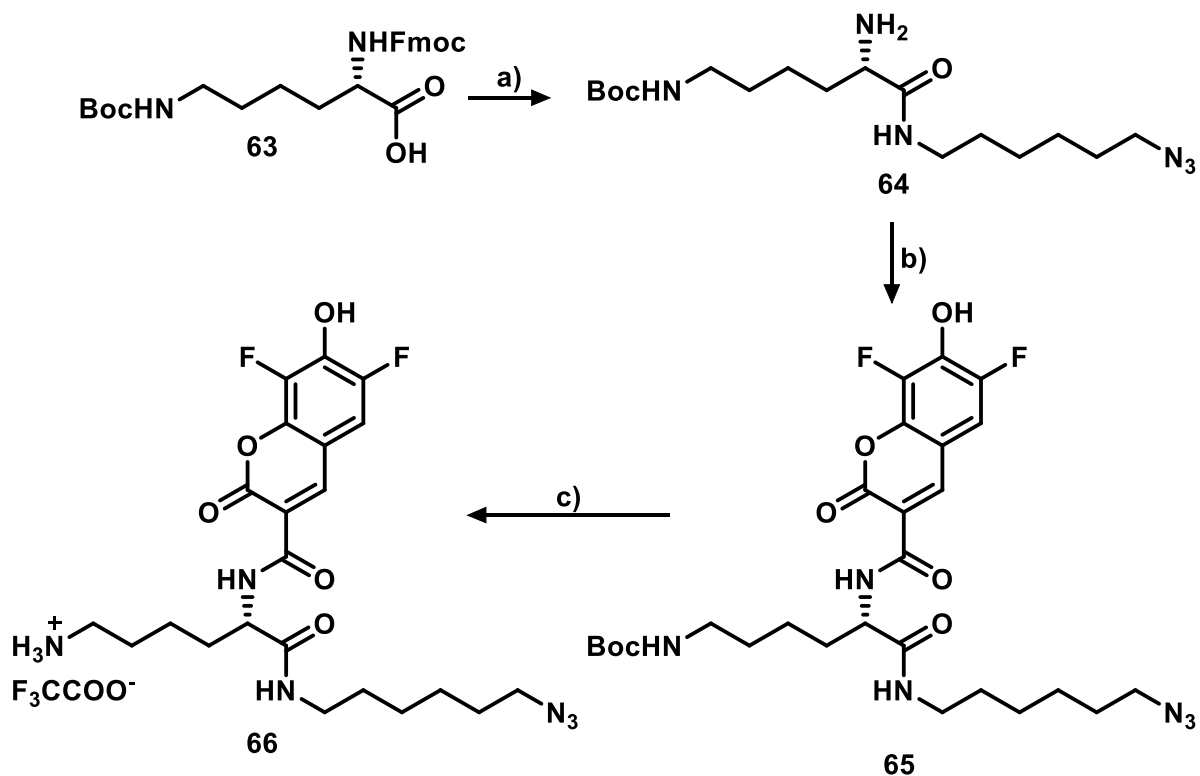
Die Arbeiten von *Adrian Graef* zeigten eine einfache Möglichkeit, bioorthogonale Gruppen über Amid-Kupplungen mit der Säure einzuführen (**Schema 30**).^[262] Eine weitere Modifikation an der aromatischen Hydroxylgruppe ist nicht sinnvoll, da das Molekül z.B. durch Veresterung mit Benzoylchlorid die Fähigkeit zu fluoreszieren verliert. Das Absorptionsmaximum von **60** liegt bei 400 nm und das Emissionsmaximum bei 447 nm.^[263]



Schema 30: Funktionalisierung des Fluorophors **60** durch *Adrian Graef*. Verlust der Fluoreszenz durch Benzoylierung der aromatischen Hydroxylgruppe bei **62**. **a)** 3-Azidopropylamin, HATU, DMF, DIPEA, RT, 18 h, 58 %; **b)** Benzoylchlorid, Pyridin, DCM, RT, 3 d, 78 %.

4. Ergebnisse und Diskussion

Die Modifikation muss demnach über die Carboxylgruppe erfolgen. Aminosäuren erlauben ebenfalls orthogonale Reaktionen durch Schutzgruppen-Chemie und bilden stabile Amidbindungen. Die Aminosäure Lysin wurde ausgewählt, da sie zwei nukleophile Aminogruppen und eine elektrophile Carboxylgruppe enthält, wodurch diverse Verknüpfungsmöglichkeiten gegeben sind. Die Aminogruppen des kommerziell erworbenen Lysin-Derivats **63** können unter pH-spezifischen Bedingungen selektiv entschützt werden. Im ersten Schritt wurde die Carboxylgruppe mit HATU aktiviert und mit 6-Azidoethylamin verknüpft. Anschließend wurde Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin abgespalten (**Schema 31a**) und das primäre Amin **64** mit „Pacific Blue“ **60** zur Reaktion gebracht (**b**). Zur Minimierung der sterischen Wechselwirkung zwischen dem Gal-1 Liganden und dem Fluorophor, eignet sich die Aminogruppe der Seitenkette. Durch Zugabe von TFA wird dieses freigesetzt (**c**). Das Amin **66** wurde säulenchromatographisch über RP-18 gereinigt und wurde als TFA-Salz isoliert.



Schema 31: Synthese von **66** zur Konjugation mit Biomolekülen über eine Amidkupplung. **a)** 1: 6-Azidoethylamin, HATU, DMF, DIPEA, RT, 2 h, 97 %; 2: Piperidin, DMF, RT, 3 h, 90 %; **b)** HATU, DMF, DIPEA, RT, 2 h; **c)** TFA, DCM, 1 h, 33 % (über zwei Stufen).

Die zwei aromatischen Protonen *H*-3 und *H*-5 der Verbindung **66** resonieren im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (**Abbildung 40**) bei 8.71 ppm als Singulett und bei 7.40 ppm aufgrund der Kopplungen mit den Fluoratomen als Dublett von Dubletts. Die Kopplungskonstanten sind dabei 10.1 Hz für das Fluoratom in der *ortho*-Position und 1.7 Hz für das Fluoratom in der *para*-Position. Ebenso spalten durch den Einfluss der Fluoratome die Kohlenstoffsignale C-4 – C-9 im $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (**Abbildung 41**) auf. Am auffälligsten sind jeweils die

Kopplungen der Kohlenstoffatome C-6 und C-8 mit 1J -Kopplungskonstanten von etwa 250 Hz. Das Signal von C-7 ist das einzige mit zwei 2J -Kopplungskonstanten von 21.2 und 12.6 Hz.

Die Carbonyl-Kohlenstoffatome C-1 und C-10 bei 161.8 und 163.6 ppm korrelieren im HMBC-Spektrum beide mit H-3. Diese können durch die Korrelation von H-5a zu C-10 unterschieden werden. Zusätzlich korreliert H-5a im HMBC-Spektrum mit C-6a, welches bei 173.4 ppm resoniert. Im 1H -NMR-Spektrum erscheint H-5a als Dublett von Dubletts, da aufgrund des Stereozentrums die Protonen H-4a diastereotop sind. Deswegen resonieren die H-4a jeweils als Multipllett von 1.99–1.90 und bei 1.87–1.78 ppm.

Bis auf die terminalen CH₂-Gruppen (1a, 7a und 12a) überlagern die aliphatischen Protonen im aliphatischen Bereich zwischen 1.77–1.32 ppm. Durch die Nutzung der COSY-, HSQC- und HMBC-Spektren können die Kohlenstoffatome zugeordnet werden. Für diese Verbindung liefern C-9a und C-10a ein Signal bei 27.4 ppm, da mit einer vergleichsweise hohen Signalintensität auffällt. Auch die Signale C-1a und C-7a erscheinen bei sehr ähnlichen Verschiebungen bei 40.5 und 40.4 ppm. Beide binden an ein Amin- oder Amid-Stickstoffatom. Das α -Kohlenstoffatom der Aminosäure C-5a resoniert durch den Einfluss der Carbonylgruppe tieffeldverschoben bei 54.9 ppm, während C-12a durch die Azidogruppe bei 52.3 ppm resoniert.

Wie bereits angedeutet, resonieren die Protonen der terminalen CH₂-Gruppen H-1a, H-7a und H-12a jeweils als Triplet im Bereich zwischen 3.30–2.91 ppm. Die Kopplungskonstanten entsprechen jeweils einer typischen 3J -Kopplung von etwa 7 Hz.

Aufgrund der säulenchromatographischen Aufreinigung über RP-18 mit einem TFA-haltigen Laufmittel wurde Fluorophor **66** als TFA-Salz isoliert. Dieses ist ein gelbes Pulver, das sehr gut in polaren Lösungsmitteln wie H₂O oder MeOH löslich ist.

Im ^{19}F -NMR-Spektrum ist das TFA bei -76.9 und die aromatischen Fluoratome von **66** bei -137.2 und -154.4 ppm zu sehen. Zusätzlich sind die Kohlenstoffatome der TFA-Moleküle im ^{13}C -NMR-Spektrum jeweils als Quartett bei 163.0 ppm mit $^2J = 34.5$ Hz und bei 118.2 ppm mit $^1J = 293.4$ Hz zu sehen.

4. Ergebnisse und Diskussion

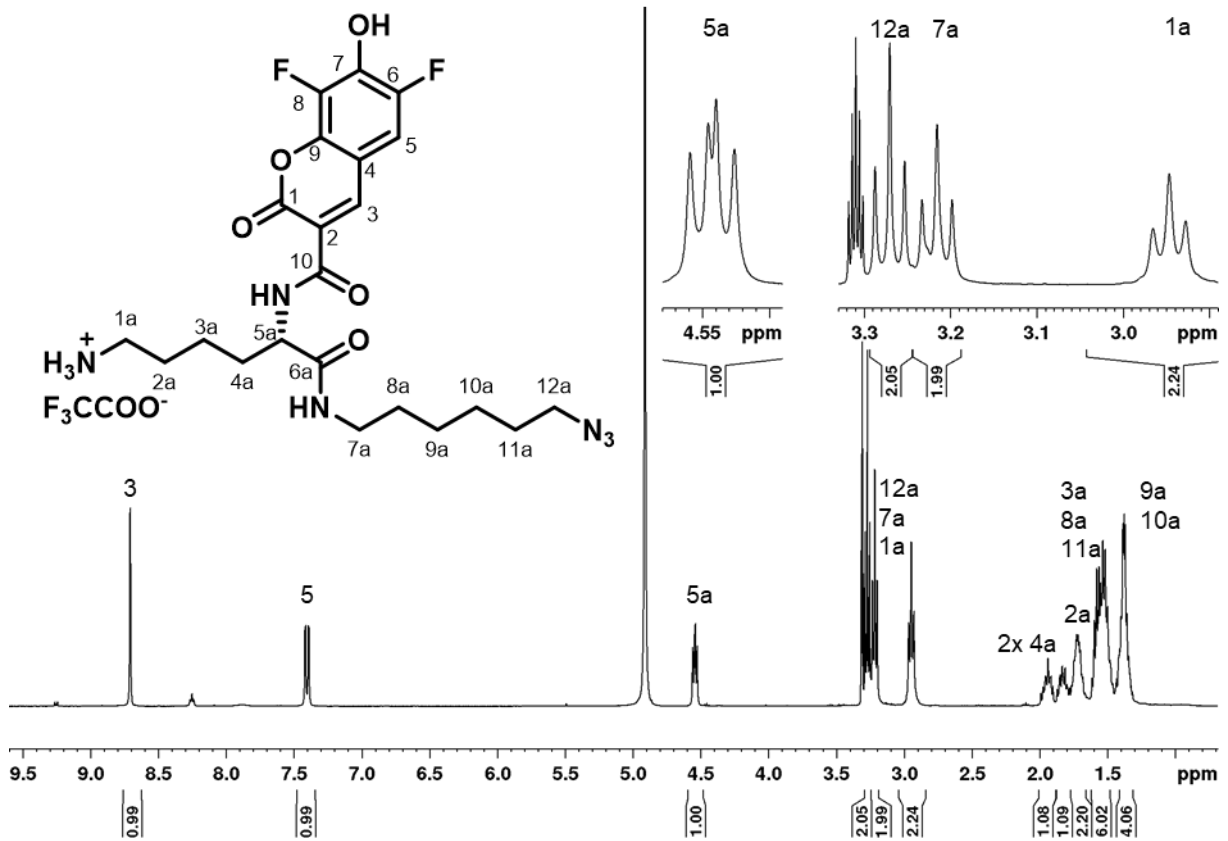


Abbildung 40: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (400 MHz, MeOD) von Verbindung 66.

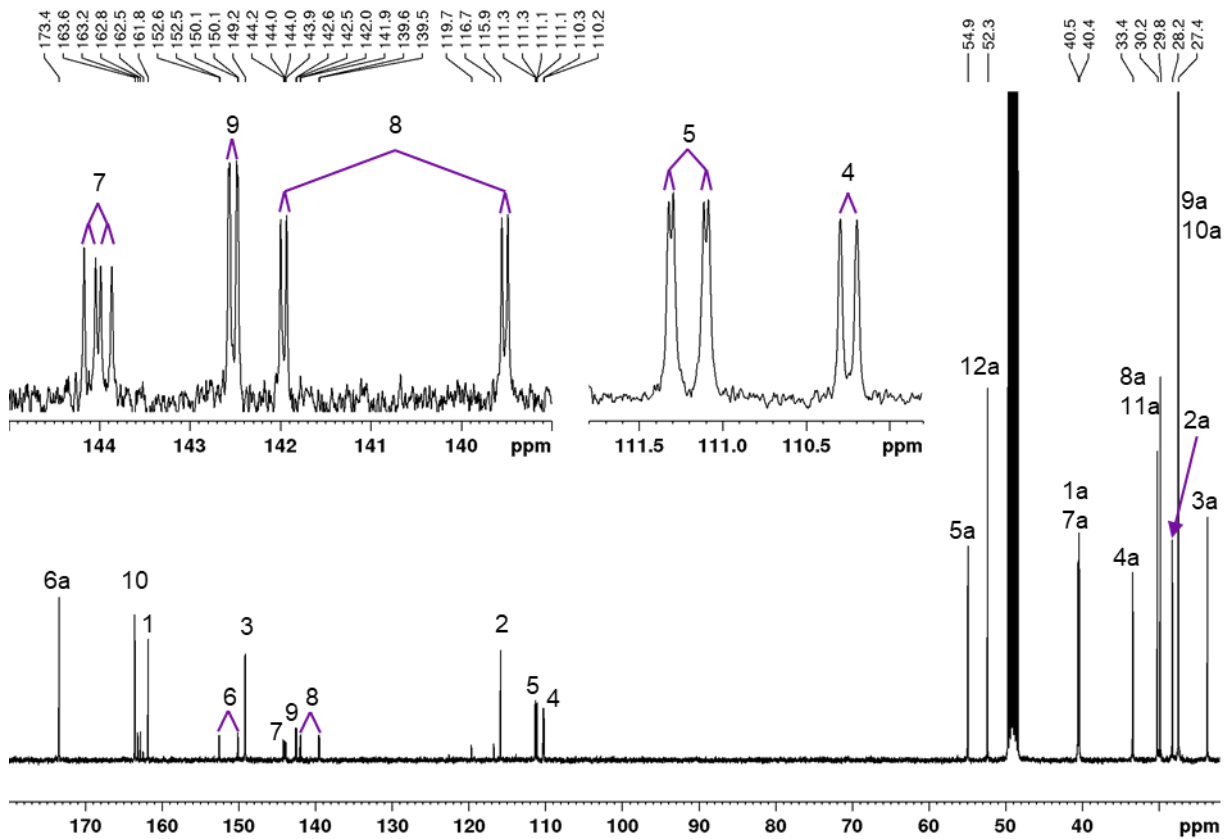
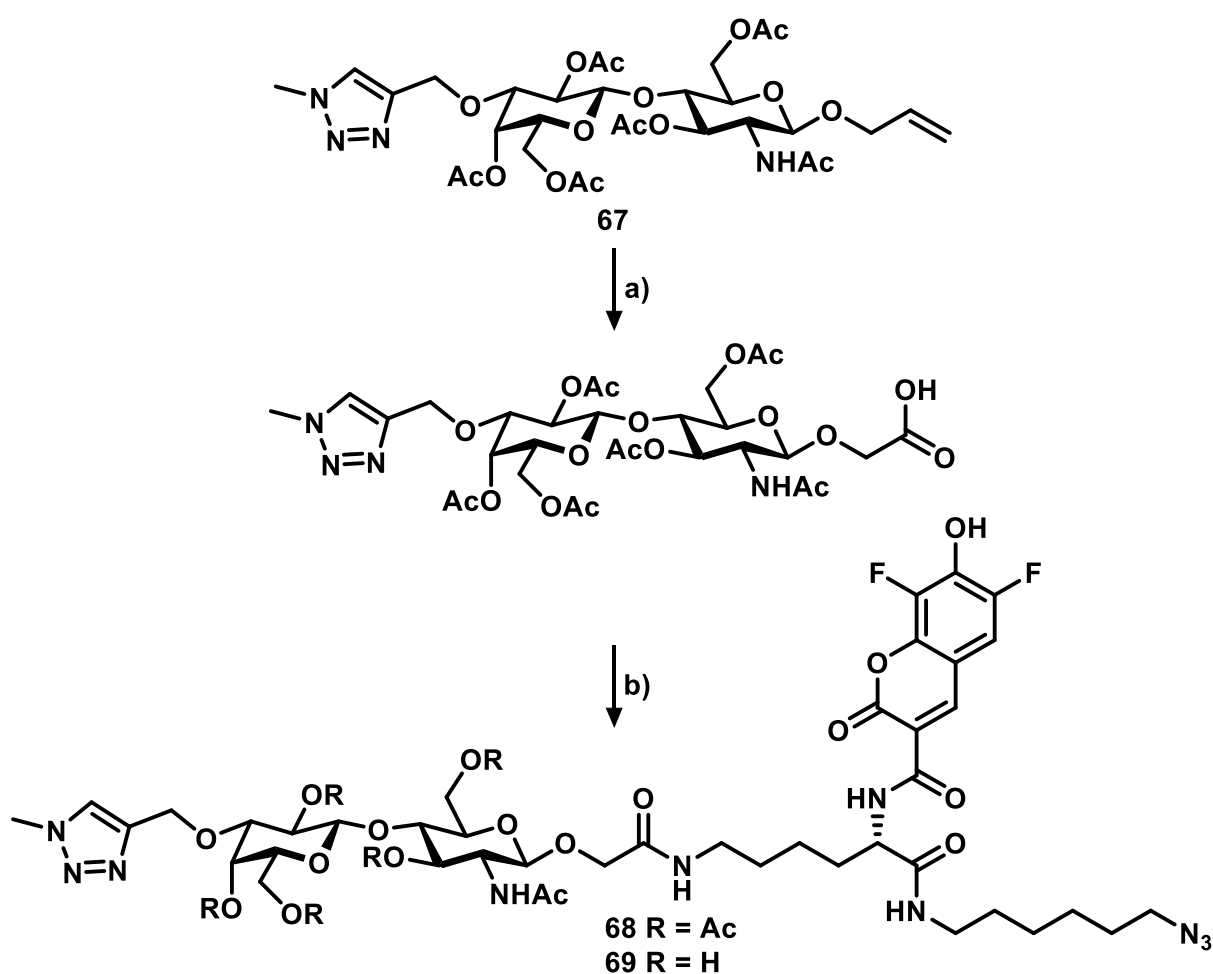


Abbildung 41: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (100 MHz, MeOD) von Verbindung 66.

Die peracetylierte Verbindung **67** wurde entsprechend der Bedingung des Vorversuchs (**Kapitel 4.1** Verbindung **44**) mit NaIO_4 und RuCl_3 zur Säure oxidiert. Diese wurde nicht isoliert, sondern direkt mit HATU und DIPEA in DMF aktiviert und anschließend mit Amin **66** zur Reaktion gebracht (**Schema 32 a**). Das Produkt **68** wurde auch nach wiederholter säulenchromatographischer Reinigung nicht sauber isoliert. Jedoch wurde die Molekülmasse des Produkt bei m/z für $[\text{M}+\text{Na}]^+$ bei 1245.42593 ($|\Delta m/z| = 0.84$ ppm) nachgewiesen. Alle Fraktionen mit der gewünschten Verbindung wurden vereint und die Acetylgruppen mit NaOMe-Lösung entfernt (**b**). Die Verbindung **69** wurde anschließend zwei Mal säulenchromatographisch über RP-18 gereinigt und letztlich erfolgreich isoliert. Die Molekülmasse von 1011.38950 ($|\Delta m/z| = 1.81$ ppm) bestätigt den Erfolg der Synthese.



Schema 32: Knüpfung eines Galectin-1 Liganden **40** mit einem Fluorophor. **a)** RuCl_3 , NaIO_4 , H_2O , MeCN , DCM , HCl , RT , 3 h; **b)** 1: Amin **66**, HATU, DIPEA, DMF, $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 16 h; 2: NaOMe, MeOH, RT , 30 min, 16 % (über drei Stufen).

Im Folgenden sind die ^1H -NMR-Spektren der Verbindungen **40**, **66** und **69** zum besseren Vergleich abgebildet (**Abbildung 42**). Die NMR-Spektren des Saccharids **40**, als auch von **69** sind nahezu identisch mit den zuvor diskutierten NMR-Spektren des Saccharids **39c** in den

4. Ergebnisse und Diskussion

Abbildungen 28 und **29**. Durch die Oxidation des Olefins sind die Protonen $H-2'$ und $H-3'$ nicht mehr zu erkennen. Bei **40** koppelten die Protonen $H-1'$ mit diesen und erschien daher als Multiplett, während bei **69** die Protonen $H-1'$ diastereotop sind mit Verschiebungen von 4.28 sowie 4.01 ppm und geminalen Kopplungen von $^2J = 15.1$ Hz (orange). Das Kohlenstoffatom der neu gebildeten Amidbindung $C-2'$ resoniert bei 171.9 ppm.

Weiterhin geht aus **Abbildung 42** hervor, dass die Protonen der benachbarten CH_2 -Gruppe des Amins (Protonen $H-1a$ bzw. $H-1d$, blau hinterlegt) eine Tieffeldverschiebung erfahren. Diese überlagern im Bereich zwischen 3.30–3.19 ppm mit den Protonen $H-7d$ und $H-12d$. Von den erwähnten Signalen abgesehen, setzt sich das 1H -NMR-Spektrum von **69** aus den beiden 1H -NMR-Spektren von **40** und **66** zusammen. Dazu sollen einige charakteristische Signale erwähnt werden. Das Triazol-Proton $H-3''$ resoniert bei etwa 8.0 ppm (gelb), während die beiden Protonen des Fluorophors bei etwa 8.7 sowie 7.4 ppm erscheinen (lila). Die anomeren Protonen der GlcNAc- und Gal-Einheit sowie das α -Proton der Lysin-Einheit resonieren ungefähr bei 4.5 ppm (rot). Zuletzt sind die Methylgruppen am Triazol (CH_3-4'') bei etwa 4.1 ppm und die Methylgruppe am Acetat von GlcNAc bei etwa 2.0 ppm zu sehen.

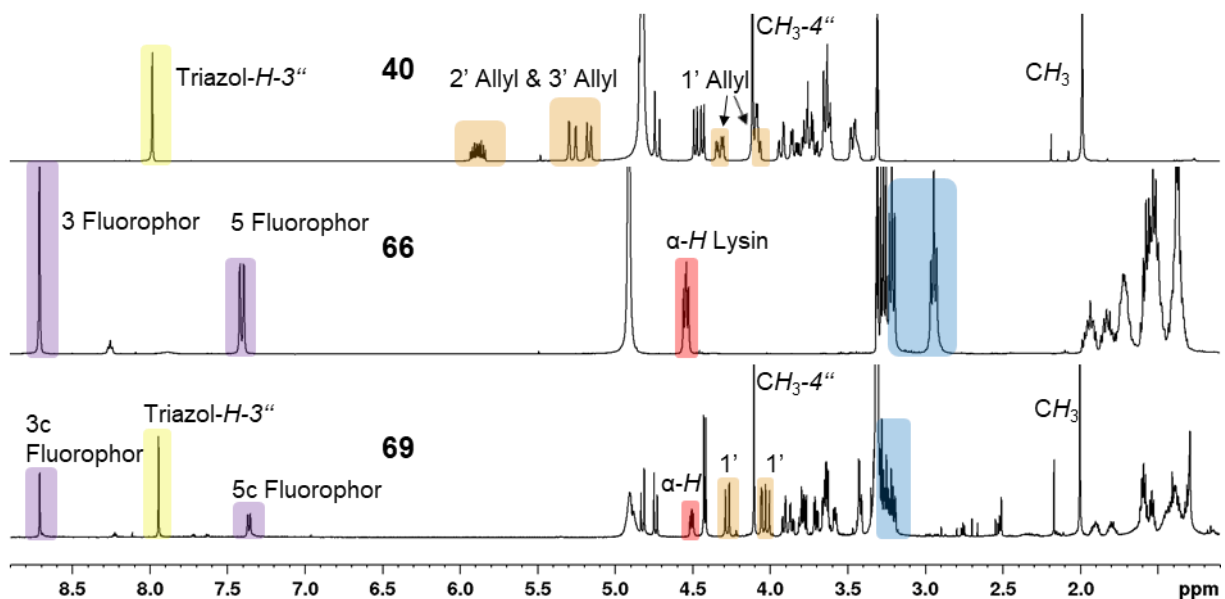


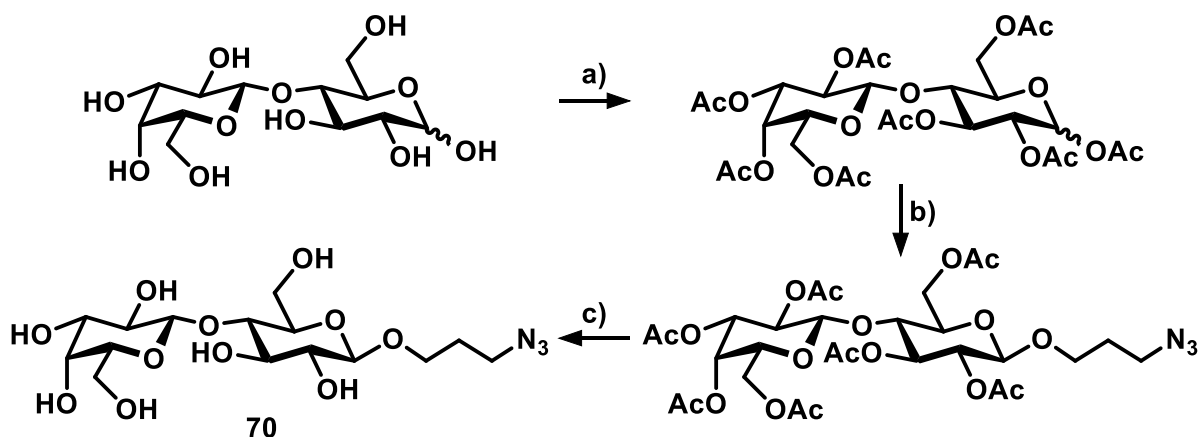
Abbildung 42: 1H -NMR-Spektren (400 MHz, MeOD) der Verbindungen **40**, **66** und **69**.

Verbindung **69** ist eine Kombination aus einem synthetischen Gal-1 Liganden, einer Azidogruppe und einem Fluorophor. Durch *metabolic glycoengineering* (Vergleich **Kapitel 4.1**) werden Alkylgruppen auf die Zelloberfläche gebracht. Diese können durch Click-Chemie mit der Azidogruppe von **69** zur Reaktion gebracht werden, womit der Ligand für Galectin-1 auf der Zelloberfläche angereichert wird. Die optische Nachverfolgung und Evaluation des Einbaus ist durch den Fluorophor gegeben. Zusätzlich kann somit auch die Dauer der unnatürlichen Modifikationen auf den Zellen nachvollzogen werden.

4.3 Oligosaccharide

Saccharide von Proteinen auf der Zelloberfläche mit terminalen Polysialinsäure-, Sia-LacNAc- oder *N*-Acetyllactosamin-Einheiten steuern viele biologische Prozesse (Vergleich **Kapitel 2.2.2**). Die Stoffklasse der Glycosphingolipide (GSL) enthalten andere Oligosaccharide, beispielweise Lactose als Basis. Auch hier entstehen komplexe Oligosaccharide durch Bindung weiterer Zuckereinheiten (*ganglio*-, *lacto*-, *neolacto*-, *globo*-, *isoglobo*-Glycolipide).^[51] Die Variationen der Glycosylierungsmotive erlauben eine Vielzahl spezifischer Interaktionen zwischen Proteinen und den Glycobindungspartnern, was sich wiederum auf das Zellverhalten auswirkt. Für die Konjugation an Zellen (Click-Reaktion nach *metabolic glycoengineering* der Zellen mit Alkinzuckern) müssen die Saccharide Azidogruppen enthalten. Ausgehend von Azido-Lactose sollen weitere Oligosaccharide inspiriert durch natürliche GSL synthetisiert werden.

Zur Einführung eines Azido-funktionalisierten Linkers ist die anomere Position von Sacchariden synthetisch aufgrund der erhöhten Reaktivität gut geeignet.^[264] So wurde Lactose zuerst mit Ac₂O und Pyridin verestert (**Schema 33a**), anschließend mit 3-Azidopropanol zur Reaktion gebracht (**b**) und die Acetylgruppen final mit NaOMe entfernt (**c**). Die Reaktion **b**) wurde in der Mikrowelle mit FeCl₃ als Lewis-Säure in Toluol durchgeführt. Die Mikrowellen erhitzen die FeCl₃-Partikel sehr stark, während Toluol einen geringen Effekt erfährt.^[265] Die anomere Acetylgruppe wird abgespalten und das entstehende Kation durch den Nachbargruppeneffekt stabilisiert. Der Angriff des nukleophilen 3-Azidopropanols führt selektiv zur Bildung des β-Anomers.^[266]

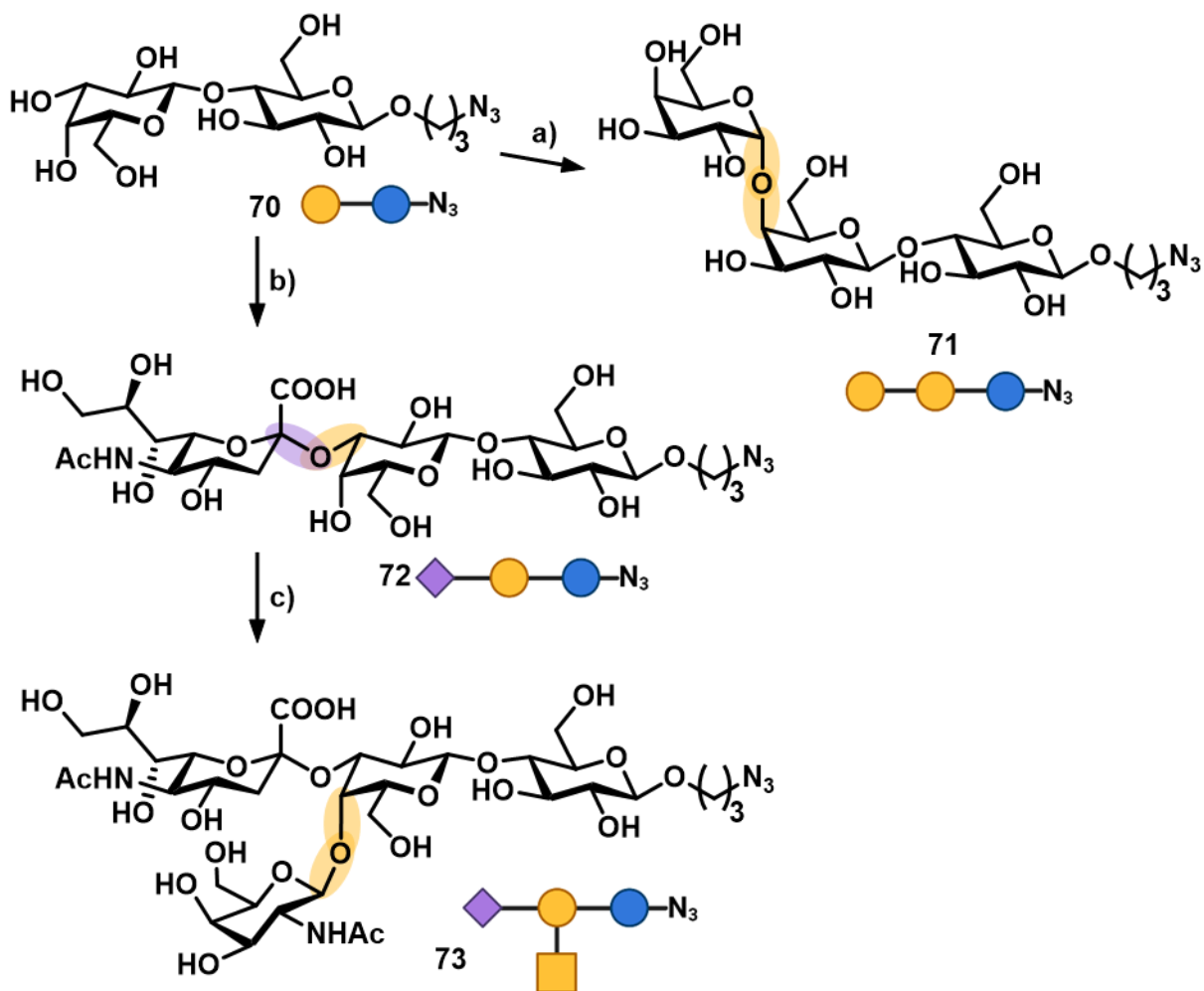


Schema 33: Synthese der Azido-funktionalisierten Lactose. **a)** Ac₂O, Py, RT, 18 h, quant; **b)** 3-Azidopropanol, FeCl₃, Toluol, MW, 95 °C, 15 min, 62 %; **c)** NaOMe, MeOH, RT, 15 min, quant.

Anschließend wurde die Azido-Lac **70** enzymatisch in Zusammenarbeit mit *Dr. Maria Ortiz-Soto* umgesetzt. Dabei übernahm die Biologin die Umsetzung der enzymatischen Reaktionen, während die Isolierung und Charakterisierung selbstständig durchgeführt wurden. Die dargestellten Saccharide leiten sich von Globotriaosylceramid (Gb) und

4. Ergebnisse und Diskussion

Monosialodihexosylgangliosid (GM) ab. **71** ist das Trisaccharid von Gb3, **72** das Trisaccharid von GM3 und **73** das Tetrasaccharid von GM2 (**Schema 34**).^[52] Ausgehend von Azido-Lac **70** wurde diese mit α -1,4-Galactosyltransferase LgtC-C246S und UDP-Galactose zu Verbindung „Gb3“ **71** umgesetzt (**a**). Zur Darstellung von „GM3“ **72** müssten die Sialyltransferasen ST3Gal IV–VI verwendet werden, um z.B. CMP-Sia auf die Galactose zu übertragen.^[267] Diese Enzyme standen jedoch nicht zur Verfügung. Trans-Sialidase TcTs (*Trypanosoma cruzi* exprimiert in *E. coli*) besitzt ebenfalls die Fähigkeit die 3-Position der Galactose zu sialylieren, wofür ein Donor-Substrat verwendet wird.^[268] Dafür wurde hier Fetuin verwendet, ein Glyoprotein das 8.7 % (Masse) gebundene Sialinsäure enthält.^[269] Nach 24 h konnte die Bildung von „GM3“ **72** beobachtet werden (**b**). Der Transfer war nicht quantitativ und eine Erhöhung der Reaktionszeit oder weitere Zugabe von Sia-Donor brachte keinen weiteren Umsatz. Die Reaktion wurde abgebrochen und **72** mit 15 % isoliert, jedoch konnte das Edukt **70** ebenfalls mit 68 % wiedergewonnen werden. Ein Teil des Produkts wurde weiterhin mit β -1,4-*N*-Acetylgalactosaminyltransferase CgtA und UDP-GalNAc umgesetzt und somit konnte „GM2“ **73** mit 70 % unter Rückgewinnung des Edukts **72** von 16 % isoliert werden (**c**).



Schema 34: Enzymatische Synthese von bioorthogonalen Oligosacchariden ausgehend von Azido-Lactose **70**. **a)** α -1,4-Galactosyltransferase LgtC-C246S, UDP-Gal, 48 h, 32 °C, 67 %; **b)** Trans-Sialidase TcTs, Fetuin, 24 h, 30 °C; 15 % **c)** β -1,4-*N*-Acetylgalactosaminyltransferase CgtA, UDP-GalNAc, 48 h, 35 °C, 70 %.

Die ^1H -NMR-Spektren der vier Saccharide sind zum Vergleich untereinander abgebildet (**Abbildung 43**). Die Signale der anomeren Protonen der Saccharide überlagern nicht mit den anderen Signalen und können eindeutig zugeordnet werden. Ebenso resoniert das Proton $H\text{-}2\text{a}$ der Glucose bei 2.34 ppm und das Quintett von $H\text{-}2'$ des Linkers bei 1.87 ppm. Gut erkennbar sind die Protonen $H\text{-}3\text{c}$ der Sialinsäure bei 2.79 bzw. 2.68 ppm. Die Methylprotonen der Acetylgruppen resonieren bei etwa 2.0 ppm.

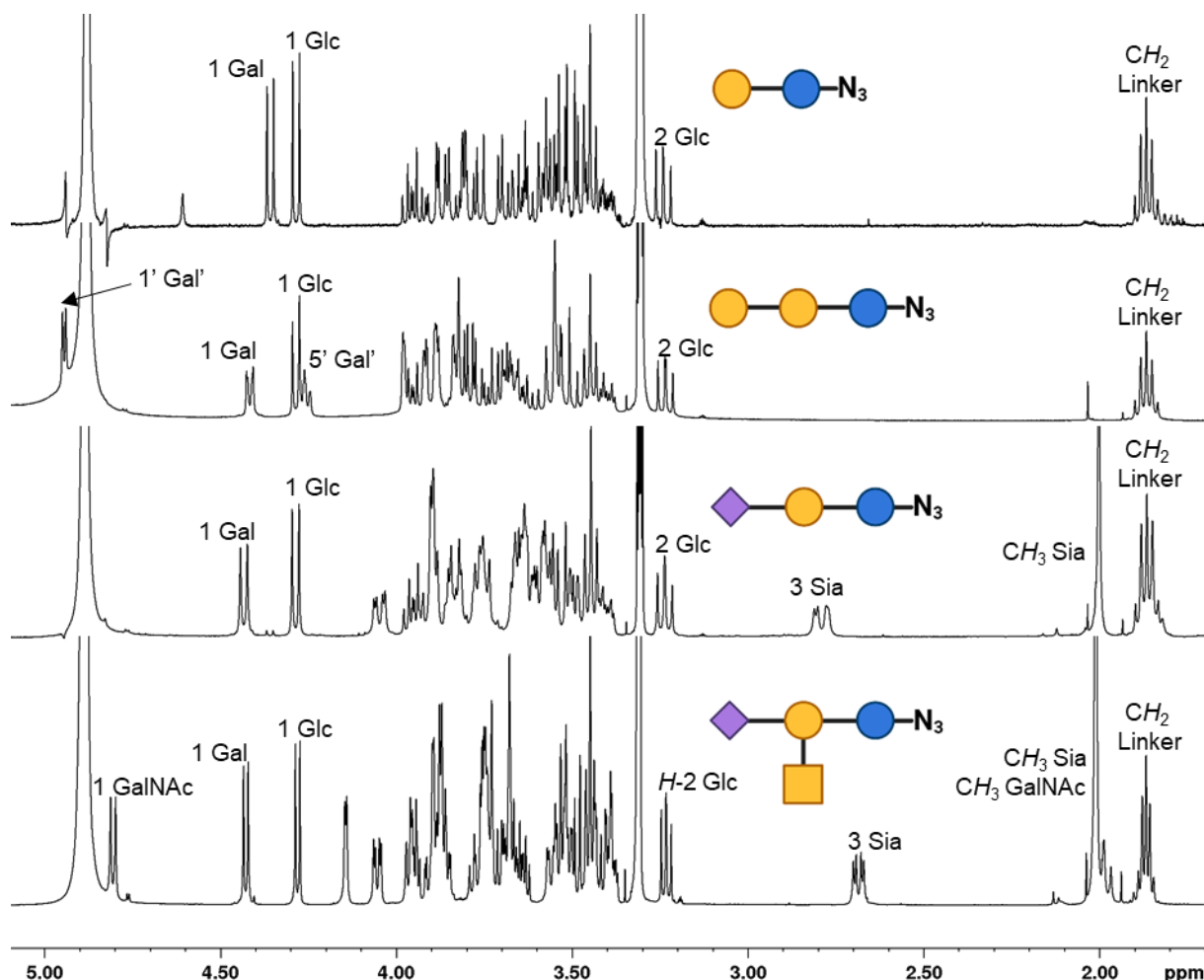


Abbildung 43: ^1H -NMR-Spektren (400 oder 600 MHz, MeOD) der Saccharide **70–73** im Vergleich.

Alle Signale der ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren konnten mithilfe von 2D-NMR zugeordnet werden. Das Tetrasaccharid **73** ist das größte Molekül in der Reihe und für dieses werden ausschließlich die Daten repräsentativ ausführlicher diskutiert. Die Atomzuordnungen der anderen Verbindungen können dem **Experimentalteil 6** entnommen werden.

Die anomeren Protonen $H\text{-}1$ der Hexosen können zu Beginn eindeutig zugeordnet werden und dienen als Startpunkt für weitere Korrelationen. Ebenso sind die $H\text{-}3\text{c}$ der Sialinsäure charakteristisch. Das $^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$ -TOCSY-Spektrum (*total correlated spectroscopy*) zeigt alle Kreuzsignale der Protonen eines Spinsystems,^[270] im vorliegenden Fall von jedem Monosaccharid (**Abbildung 44**). Die Protonen-Signale überlagern im Bereich von 4.0–

4. Ergebnisse und Diskussion

3.3 ppm, konnten jedoch mit dieser Messung und zusätzlich durch ^1H - ^1H -COSY-Spektrum (typischerweise die 3J -Korrelation)^[270] den Signalen der einzelnen Spinsysteme zugeordnet werden (**Abbildung 45**).

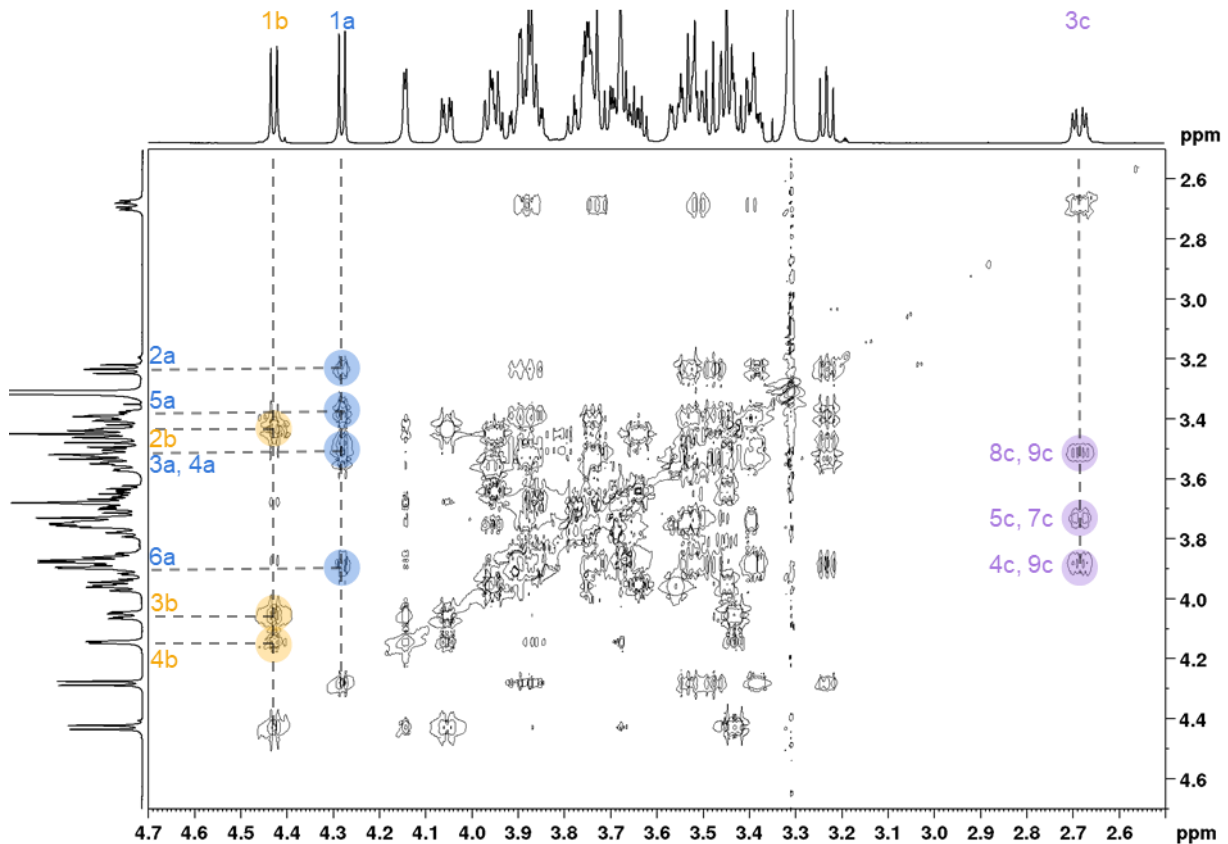


Abbildung 44: Ausschnitt aus dem ^1H - ^1H -TOCSY-Spektrum (600 MHz, CDCl_3) von „GM2“ **73** zur Veranschaulichung der Korrelationen der einzelnen Spinsysteme (Monosaccharide). Vergrößern des überlagerten Bereichs enthüllt weitere Korrelationen.

Die Zuckersignale im ^{13}C -Spektrum (**Abbildung 46**) resonieren teilweise bei sehr ähnlichen Verschiebungen (vor allem im Bereich von 82.1–69.3 ppm), sind jedoch trotzdem klar voneinander abgetrennt und im HSQC (direkte ^1H - ^{13}C -Korrelation)^[271] eindeutig einem Multiplett zuzuordnen. Das HMBC (^1H - ^{13}C -Korrelation über mehrere Bindungen)^[271] bestätigte weiterhin die zugeordneten Korrelationen der Protonen und konnte zusätzlich die postulierten glycosidischen Bindungen der Enzymreaktionen verifizieren. Durch die axiale Stellung von *OH*-4b der Galactose spaltet *H*-3b in ein Dublett von Dubletts mit der *trans*-Kopplung zu *H*-2b von 9.7 Hz und *cis*-Kopplung zu *H*-4b mit 3.2 Hz auf. Dieses Proton korreliert im HMBC mit dem quartären Kohlenstoff *C*-2c von Sia, das bei 102.6 ppm resoniert. *H*-4b erscheint als Multiplett (überlagertes Dublett von Dublett) aufgrund von zwei *cis*-Kopplungen zu den benachbarten Protonen und korreliert mit dem anomeren *C*-1d von GalNAc bei 104.2 ppm. Beide Protonen erfahren durch die Bindung eines weiteren Monosaccharids eine Tieffeldverschiebung.

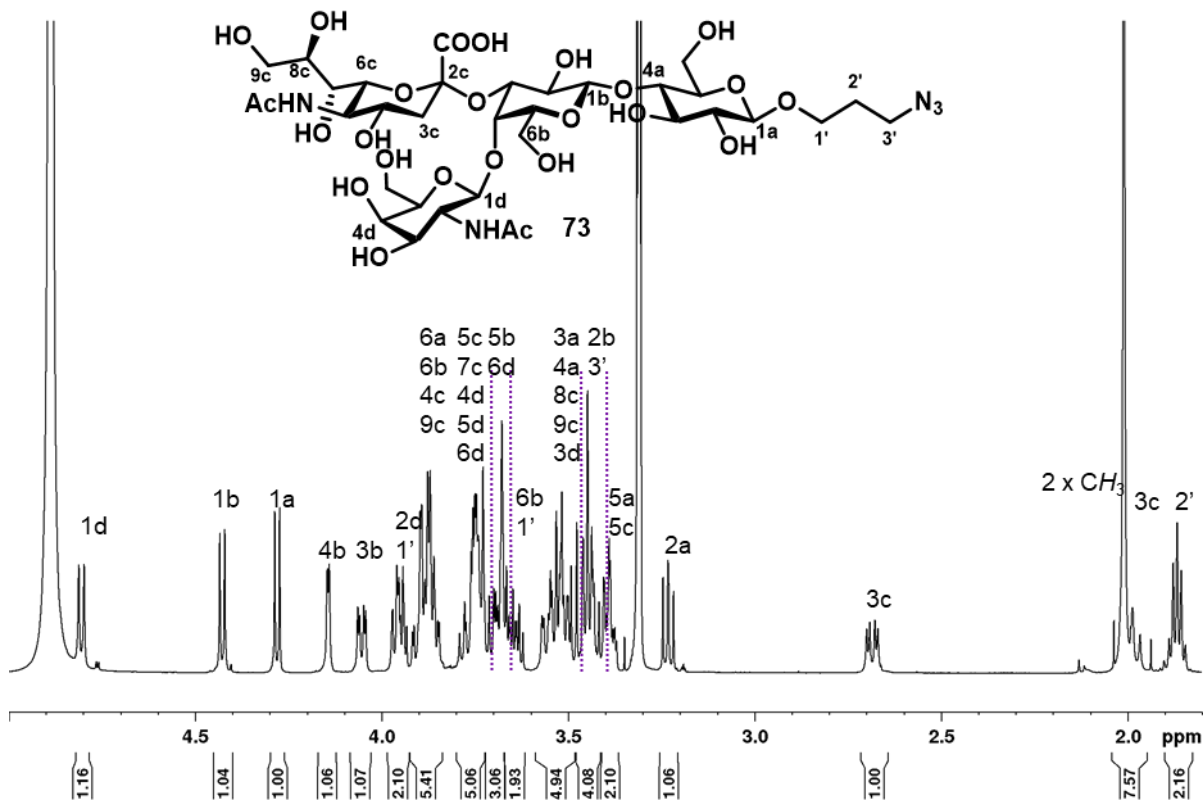


Abbildung 45: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (600 MHz, MeOD) der Verbindung „GM2“ 73.

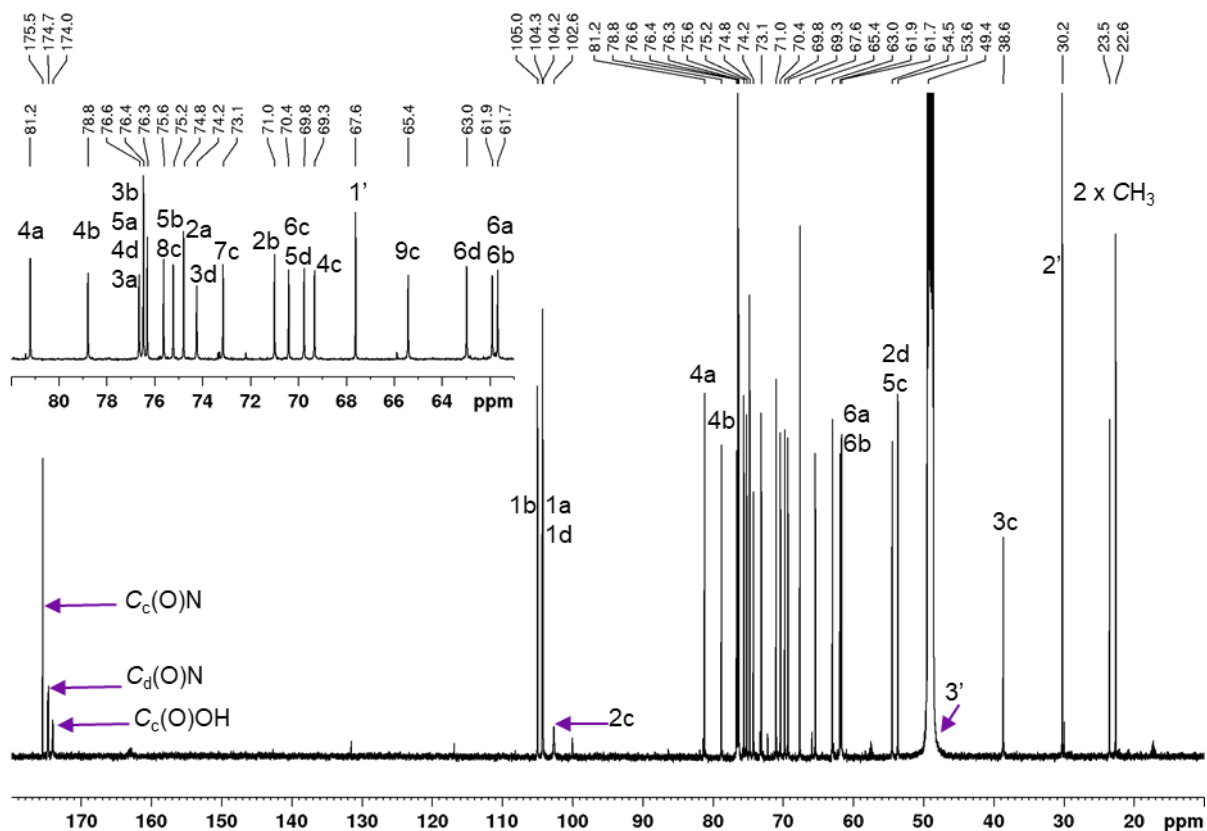


Abbildung 46: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (150 MHz, MeOD) der Verbindung „GM2“ 73.

4. Ergebnisse und Diskussion

Die Azido-Saccharide sind untypische Zuckerstrukturen auf Glycoproteinen. Durch *metabolic glycoengineering* mit SiaNAI (oder ManNAI) werden Alkylgruppen auf die Zelloberfläche eingeführt (Vergleich **Kapitel 4.1**), wodurch die Verbindungen auf die Zellen kovalent konjugiert werden. Die Anreicherung von unnatürlichen Glycosylierungen können die Interaktion mit Lectinen in der extrazellulären Matrix und somit auch das Zellverhalten beeinflussen. Diese Manipulationen können für die Zell-Matrix- oder für Zell-Biomaterial-Wechselwirkungen genutzt werden.

4.4 Messung der Steifigkeit von Zellen nach *metabolic glycoengineering*

Beim Biodruck können je nach Anwendungsmethode die verwendeten Zellen durch den auftretenden Scherstress beschädigt werden. Hohe Auflösungen konnten bereits durch eine schmalere Kapillare (bis zu 10 µm) erzeugt werden. Aufgrund des geringen Durchmessers wurden Zellschäden und eine niedrigere Zellviabilität festgestellt.^[12, 272]

Hier wird die Hypothese untersucht, dass *metabolic glycoengineering* einen Effekt auf die Zellsteifigkeit hat und die Zellen in zukünftigen Arbeiten vor mechanischem Stress schützt. Bisher konnte gezeigt werden, dass eine hohe Zellsteifigkeit die Zellen vor Scherstress und Deformation schützt.^[272] Zur Veränderung der Membran werden Zellen mit unnatürlichen Zuckern inkubiert (Vergleich **Kapitel 2.3** und **Kapitel 4.1**), woraufhin diese in den Metabolismus aufgenommen werden. Auf diese Weise werden Glycoproteine markiert und können anschließend durch Click Chemie (Vergleich **Kapitel 2.4**) in der extrazellulären Matrix mit diversen Verbindungen modifiziert werden. Die Veränderung der Glycocalyx durch enzymatische Degradation der Glycosaminoglycane (GAGs) zeigte eine erhöhte Steifigkeit.^[273] Eine Methode die Zellsteifigkeit sowie die Fluidität zu bestimmen, wird von *Prof. Dr. B. Fabry* zur Verfügung gestellt und im Folgenden erläutert.

Zur Messung der Zellsteifigkeit wurden die Deformationen der Zellen in einem mikrofluidischen Kanal (200 µL Durchmesser) unter verschiedenen Drücken (1–3 bar) mit einer Hochgeschwindigkeitskamera (500 Bilder pro Sekunde) aufgenommen (**Abbildung 47**). Dazu wurden die Zellen in einer hochviskosen Lösung aus Zellmedium mit 2 % (w/v) Alginate suspendiert.^[274] Im Vergleich zu Messmethoden wie *atomic force microscopy*,^[275] *micropipette aspiration*^[273] oder *magnetic tweezer microrheology*^[276] bei denen lediglich bis zu 100 Zellen pro Stunde analysiert werden, erlaubt dieser Aufbau mit bis zu 100 Zellen pro Sekunde einen Hochdurchsatz, wodurch statistische Daten erhoben werden können.^[274]

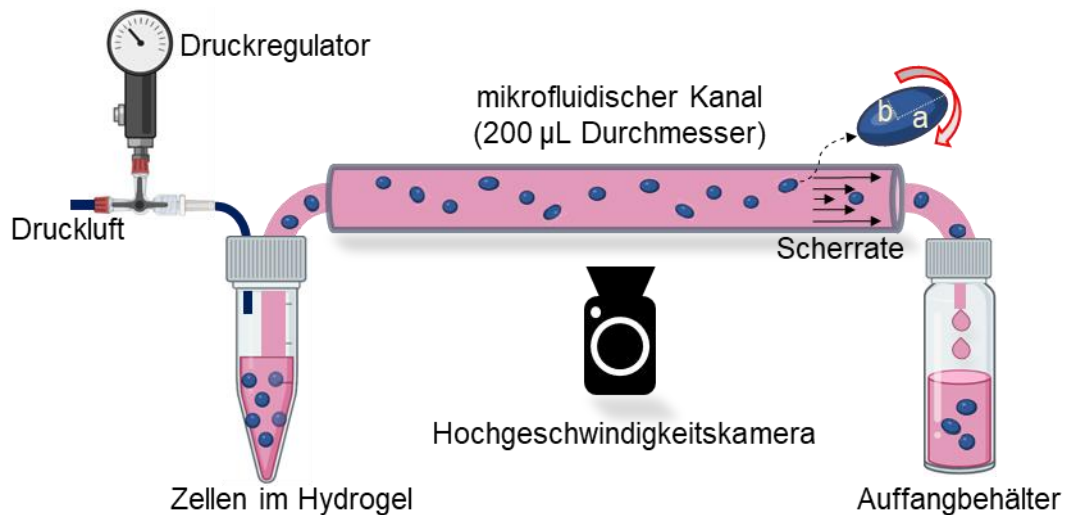


Abbildung 47: Aufbau der Messung zur Bestimmung der Zellsteifigkeit. In einem Hydrogel suspendierte Zellen werden durch einen mikrofluidischen Kanal gedrückt und mit einer Hochgeschwindigkeitskamera (500 Bilder pro Sekunde) die Zelldeformation aufgenommen.^[274] Erstellt mit BioRender.com

Im mikrofluidischen Kanal werden die Zellen entsprechend ihrer Lage unterschiedlichen deformiert. An den Kanalwänden wird starker Scherstress ausgeübt, während in der Flussmitte dieser nicht vorhanden ist, weswegen die Zellen an den Wänden elliptisch erscheinen und die zentrierten abgerundet vorliegen. Auf den Aufnahmen werden die Längen und Breiten der Ellipsen bestimmt (**Abbildung 47**), wodurch sich die Zellbelastung ϵ (*cell strain* ϵ) berechnen lässt. Beim Auftragen von ϵ gegen Scherstress der flüssigen Komponente σ (*fluid shear stress* σ) wird keine lineare, sondern eine abflachende Kurve erhalten, insbesondere bei hohen Scherraten. Dieses Phänomen ist auf die Rotation der Zellen zurückzuführen, wodurch Energie abgeleitet wird. Im weiteren Sinne ist dieses mit der Kettenbewegung eines Panzers vergleichbar (*tank-treading*). Das rotierende Verhalten wird durch die Reihe an Bildern detektiert und die Rotationsfrequenz f_{tt} (*tank-treading frequency* f_{tt}) jeder Zelle bestimmt. Die Geschwindigkeit der Rotation steigt vom Zentrum zur Kanalwand.^[274] Laut der Roscoe-Theorie lassen sich die viskoelastischen Eigenschaften der Zellen mit dem *Kelvin-Voigt body* beschreiben. Die Körper sind elastisch und lassen sich langsam verformen, zeigen jedoch zusätzlichen Widerstand bei schneller Verformung.^[277]

Eine Parallelschaltung zwischen einer Feder und einem Dämpfer (*spring and dash-pot*) beschreibt dieses Modell schematisch und liefert Informationen über das Speichermodul G' (*storage modulus* G') und das Verlustmodul G'' (*loss modulus* G''). Bei der Korrelation von G' und G'' gegen die Winkelfrequenz ω ($= 2 \cdot 2\pi \cdot f_{tt}$) werden letztlich die gewünschten Größen Zellsteifigkeit k (*cell stiffness* k) und Fluidität α (*fluidity* α) bestimmt. Ein Wert von $\alpha = 0$ beschreibt ein Hookesches elastisches Zellverhalten, bei der die Verformung linear zur

4. Ergebnisse und Diskussion

Belastung steht, während $\alpha = 1$ ein Newtonsches Fluid beschreibt, bei dem die Viskosität unabhängig von der Belastung ist.^[274]

$$\tilde{G} = k \cdot \left(i \frac{\omega}{\omega_0} \right)^\alpha \cdot \Gamma(1-\alpha)$$

mit $\tilde{G} = G' + iG''$ und Gammafunktion Γ

Die Messungen wurden von *Jennifer Elsterer* in der Forschungsgruppe von *Prof. Dr. B. Fabry* durchgeführt. Für dieses Experiment wurden hMSC-TERT von *Dr. Stephan Altmann* entsprechend der bereits etablierten Bedingungen (**Kapitel 4.1.1**) mit synthetischen Ac₄ManNAI **12a** behandelt. Durch Konjugation von Gal-1 Ligand **58** oder Fluoreszenzfarbstoff **61** wurden die Zelloberflächen jeweils modifiziert. Eine Steigerung der Steifigkeit durch den Fluorophor **61** (1.1–1.4-fach) und den Liganden **58** (1.4–1.8-fach) wurde in den ersten Messungen detektiert. Dies deutete auf einen vielversprechenden Ansatz hin, *metabolic glycoengineering* zu nutzen, um diese vor Scherstress im 3D-Druck zu schützen und somit eine bessere Auflösung des gedruckten Konstrukts durch kleine Kapillaren zu ermöglichen.

Das *metabolic glycoengineering* verändert die Glycosylierungen deutlich.^[144, 224] Aufgrund der Click-Reaktion mit dem Fluorophor **61** wird die Zellmembran mit unpolaren Aromaten angereichert, mit Auswirkung auf physikalischen Wechselwirkungen der Zellen. Der Ligand **58** hat zum Gal-1 eine ähnliche Affinität wie das natürliche Erkennungsmotiv LacNAc, dennoch werden auch hier die Bindestellen für Gal-1 angereichert. In hMSC zählt Gal-1 zu den am meisten exprimierten Proteinen,^[241] wodurch bei diesem Experiment eine gesteigerte Konzentration Protein-Ligand-Komplex auf der Zelloberfläche zu erwarten ist.

In weiteren Versuchsdurchläufen wurden jedoch große Schwankungen beobachtet, die teilweise auch eine Verringerung der Steifigkeit zeigten. Die Ergebnisse konnten nicht reproduziert werden und sollen daher hier nicht graphisch abgebildet werden.

Um den Fehler in der Zellkultur und der Wahl der Zelllinie auszuschließen wurde das Experiment anschließend mit AMO-1 (*human plasmacytoma cell line*)^[278] von *Konstantin Takors* ebenfalls aus der Forschungsgruppe *Prof. Dr. B. Fabry* wiederholt. Auf diese Weise wurde das Wachstum der Zellen, das *metabolic glycoengineering* und die Messung jeweils vor Ort von derselben Person durchgeführt. Abweichungen durch unterschiedliche Handhabung der Zellen und zusätzlicher Stress durch den Transport wurden somit minimiert. Die nötigen Substanzen für das *glycoengineering* und die anschließende Konjugation wurden ebenfalls zur Verfügung gestellt. Galectin-1 wird von Myelomzellen exprimiert, weswegen auch hier die

Anreicherung des Gal-1 Liganden **58** und eine erhöhte Bildung des Protein-Ligand-Komplexes eine Veränderung der Zelleigenschaften vermuten lässt.^[279]

Trotz der Minimierung der Fehlerquellen wurden auch bei dieser Zelllinie nach etlichen Durchläufen sehr unterschiedliche Ergebnisse gemessen. Für die Steifigkeiten k wurden Werte zwischen 100 – 220 Pa für die Kontrolle und Werte zwischen 110 – 230 Pa für Zellen mit konjugiertem Gal-1 Liganden ermittelt. Diese Experimente zeigten, dass bereits bei der Kontrolle große Schwankungen gemessen wurden.

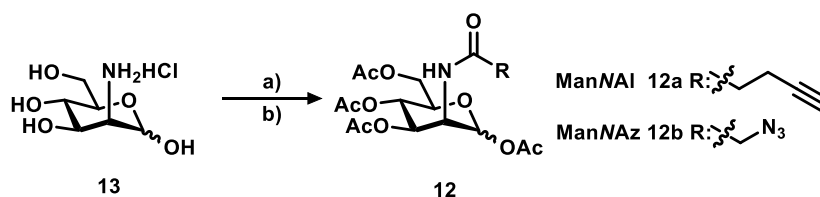
Eine Möglichkeit um reproduzierbare Daten zu generieren, ist eine längere Schonzeit der Zellen nach der Click-Reaktion. Diese wurden bereits nach 30 min durch den mikrofluidischen Kanal gedrückt, jedoch wirkt sich die akute Handhabung direkt auf die Zellerscheinung und – deformation aus. Wie schon bei *Altmann et al.* beschrieben, sind die eingeführten Modifikationen durch das *metabolic glycoengineering* auch bis zu 6 d nach der Inkubation mit den unnatürlichen Zuckern nachweisbar, da diese erst mit fortschreitender Zeit degradiert werden.^[100]

5 Zusammenfassung

Ein detailliertes Zellverständnis ist wichtig für die Herstellung von künstlichen Gewebe und zukünftig auch von funktionalen Organen. Innovationen bei der additiven Fertigung wie der 3D-Druck werden zur Erstellung von hierarchischen Strukturen und Modellen eingesetzt.^[11] Künstliche Modelle ersetzen nicht nur beschädigtes oder fehlendes Gewebe bei Patienten, sondern helfen zusätzlich auch bei der Erforschung von Medikamenteneinflüssen oder Krankheitsverläufen. Seitdem werden für den 3D-Druck speziell angefertigte Biotinten (besiedeltes Biomaterial mit Zellen) entwickelt.^[12] Wichtig dabei ist die Optimierung der Wechselwirkungen zwischen Zelle und Matrix bzw. Zelle und Biomaterial, wofür die Untersuchung der Zelloberfläche in Hinsicht ihres Aufbaus und ihrer Funktionen entscheidend ist.^[11, 280] In dieser Arbeit stand die Synthese von humanen Saccharid-Analoga zur Modifikation von Zelloberflächen im Vordergrund, um Erkenntnisse über die Zelloberflächen zu erhalten.

Durch Inkubation mit unnatürlichen Zuckern werden diese von Zellen aufgenommen und in den Zellmetabolismus eingeschleust. Diese Methode ist als *metabolic glycoengineering* bekannt. Speziell Sialinsäure-Analoga werden als *mucin-type O-* oder als *N-Glycane* auf Glycoproteine übertragen, die als Transmembranprotein außerhalb der Zelle oder in der extrazellulären Matrix biologische Prozesse wie Adhäsion oder Signaltransduktion vermitteln.^[79]

Als Saccharid-Analoga wurden bioorthogonale (Azid- oder Alkingruppe) peracetylierte Mannosamin-Derivate **12** über zwei Stufen synthetisiert (**Schema 35**). ManNAc ist der metabolische Vorläufer von Sia.

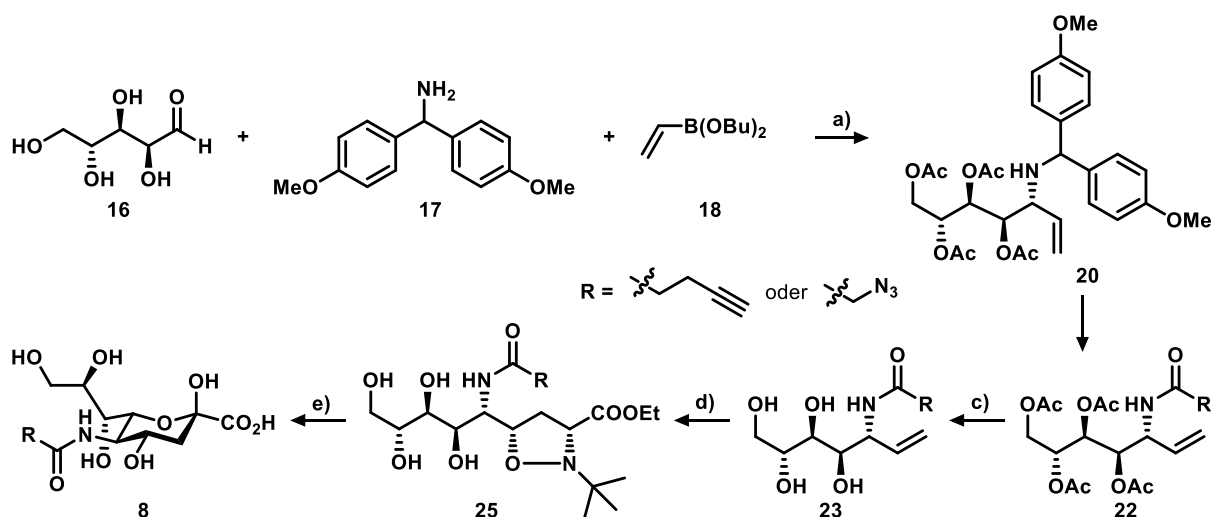


Schema 35: Synthese von bioorthogonalen Mannosamin-Derivaten. a) Pentinsäure-NHS-ester oder Azidoessigsäure-NHS-ester, Na₂CO₃, MeOH, RT, 16 h, 85 % für **12a** und 78 % für **12b**. b) Ac₂O, Py, RT, 16 h, quant.

Der Einbau der synthetisierten Monosaccharide wurden von *Dr. Stephan Altmann* aus der Forschungsgruppe von *Prof. Dr. R. Ebert* an humanen mesenchymalen Stromazellen (sowohl Primärzellen als auch eine Telomerase-immortalisierte Zelllinie) untersucht. Die Zellmembran wurde durch Click-Reaktionen mit den Fluoreszenzfarbstoffen (Cy5-Azid **14** oder

Cy3-Alkin **15**) visualisiert und zeigte für **12** stärkere Fluoreszenzsignale und somit auch einen erhöhten Einbau als die Monosaccharide Ac₄GalNAz **10** und Ac₄GlcNAz **11**.^[100]

Peracetylierte Monosaccharide haben den Nachteil, dass diese unspezifische Nebenreaktionen mit nukleophilen Aminosäuren (S-Glycosylierung) eingehen können und nicht metabolisch auf die Glycanketten der Proteine übertragen werden.^[118] Um die S-Glycosylierung zu umgehen wurden daher bioorthogonale Sialinsäuren synthetisiert, die keine Acetylgruppen tragen. Diese sind das metabolische Endprodukt von Mannosamin-Derivaten und haben den Vorteil, dass diese den Roseman-Warren-Biosyntheseweg (Biosynthese von Sialinsäure aus Mannosamin)^[79] umgehen und direkt im Zellkern aktiviert und durch Sialyltransferasen auf die Glycoproteine übertragen werden. Die bereits publizierte Synthesestrategien von Wong *et al.*^[223] und Homann *et al.*^[99] wurde hinsichtlich Aufreinigung und Reaktionszeit verbessert. Die Zielmoleküle und die Zwischenstufen wurden jeweils NMR-spektroskopisch und massenspektrometrisch analysiert (**Schema 36**).



Schema 36: Synthese der Sialinsäure-Derivate mit bioorthogonalen Gruppen in der Seitenkette von C-5. a) EtOH, H₂O, 1 d, 50 °C; dann Ac₂O, Py, RT, 20 h, 59 %; b) TFA, DCM, 10 min, RT, quant.; c) Azidoessigsäure oder Pentinsäure, HATU, DIPEA, DMF, RT, 15 h, 52–73 %; d) NaOMe, MeOH, RT, 30 min, quant. e) Nitron **24**, Dioxan, 30 °C, 2–4 Wochen, 54–69 %; f) NaOMe, 24 h, RT, dann H₂O, 24 h, RT, 77–82 %.

Der Einbau von SiaNAI **8a** oder SiaNAz **8b** in die Glycoproteine wurde wieder von *Dr. Stephan Altmann* untersucht und durch Click-Reaktionen mit Fluoreszenzfarbstoffen (Cy5-Azid **14** oder Cy3-Alkin **15**) evaluiert. Bei Konzentrationen zwischen 0.5–2.0 mM während der Inkubation wurde anschließend starkes Fluoreszenzsignal (3.0-faches Fluoreszenzsignal zur Kontrolle) bei den Alkin-Verbindungen detektiert, stattdessen konnte bei den Azid-Analoga erst bei einer 2.0 mM Zuckerkonzentration moderates Fluoreszenzsignal erhalten werden (1.5-faches Fluoreszenzsignal zur Kontrolle). Eine höhere Einbaueffizienz wurde bereits von *Bertozzi et al.* berichtet, indem der Einbau des Alkinzuckers in mehreren Zelltypen effizienter war als der Einbau des entsprechenden Azidzuckern.^[110] Die Zellviabilitäten der hMSC durch **8a** und **8b**

5. Zusammenfassung

war unter den getesteten Bedingungen hoch, lediglich hohe Konzentrationen (1.0 und 2.0 mM) bei den hMSC-TERT sowohl die Zellviabilität, aber auch die Apoptose gesenkt. Ansonsten wurde kein negativer Effekt auf die Zellen beobachtet. Ein verändertes oder gestörtes Differenzierungsverhalten konnte ebenfalls nicht festgestellt werden.

Zur Bestimmung der durch *metabolic glycoengineering* markierten Glycoproteine wurden die Zelllysate von gefütterten Zellen (SiaNAI **8a** und Ac₄ManNAI **12a**) gewonnen. Aufgrund des effizienteren Einbaus durch die Alkin-Saccharide wurden diese den Azid-Analoga vorgezogen. Auch hier wurden die Zellen von *Prof. Dr. R. Ebert* zur Verfügung gestellt. Durch Click-Reaktion mit einem Biotin-Azid und Isolierung der Glycopeptide mit einem Streptavidin-Agarose-Harz wurden diese schließlich von *Dr. Marc Drießen* massenspektrometrisch analysiert (LC-MS/MS). Die Messungen zeigten die Markierung von 55 Glycoproteinen durch Inkubation mit SiaNAI **8a** und 94 Glycoproteinen durch Inkubation mit Ac₄ManNAI **12a**, wobei 30 in den Lysaten von beiden Sacchariden nachgewiesen wurden (**Abbildung 48**). Diese wurden mit den Datenbanken von UniProt^[231] verglichen und deren molekularen Funktionen sowie die zellulären Komponenten quantifiziert. SiaNAI zeigte den Vorteil einer Selektivität in der Markierung von Proteinen, deren Funktion mit Signaltransduktion, Zelladhäsion und, im Fall von Stammzellen, mit Differenzierung korrelieren. Das Experiment lässt die Vermutung zu, dass vor allem durch den Einsatz von unnatürlichen Sialinsäure-Analoga diese Zelleigenschaften manipulierbar sind. Dieser Einfluss könnte im Rahmen der Biofabrikation und der künstlichen Gewebezüchtung nützliche Anwendungen finden, wie zum Beispiel bei der selektiven Adhärenz von Zellen auf einer Biotinte.

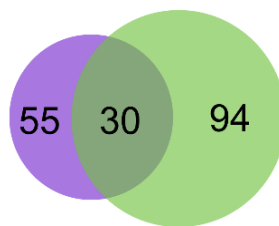
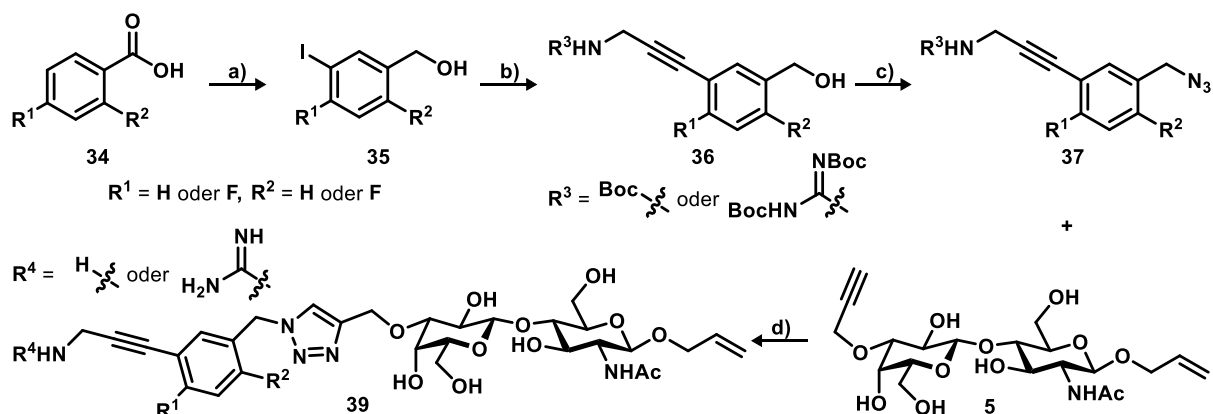


Abbildung 48: Mengendiagramm der identifizierten Glycoproteine durch Inkubation von hMSC-TERT mit SiaNAI **8a** (lila) oder Ac₄ManNAI **12a** (grün).

Ein weiteres interessantes Themengebiet war die Untersuchungen zum Galectin-1, eines der am meisten exprimierten Proteine in hMSC.^[241] Dieses Protein bindet terminale Galactose-Einheiten von Glycoproteinen auf der Zelloberfläche, denn neben Sia sind auch LacNAc (β 1,4Gal-GlcNAc) häufige Enden von Zuckerketten.^[192] Um das kleine Protein zu adressieren und das Zellverhalten zu manipulieren sollten spezifische Liganden synthetisiert werden. In Vorarbeiten wurden bereits Liganden hergestellt, die als Ausgangsbasis dienten.^[205] Letztendlich konnten über mehrere Stufen (13 Stufen für Disaccharid **5**, jeweils fünf Stufen für die fluorierten Aromaten **37** und zwei weitere Stufen zu den finalen Liganden **39**) sechs

Liganden dargestellt werden, die jeweils ein oder zwei Fluoratome im aromatischen Ring tragen (**Schema 37**).

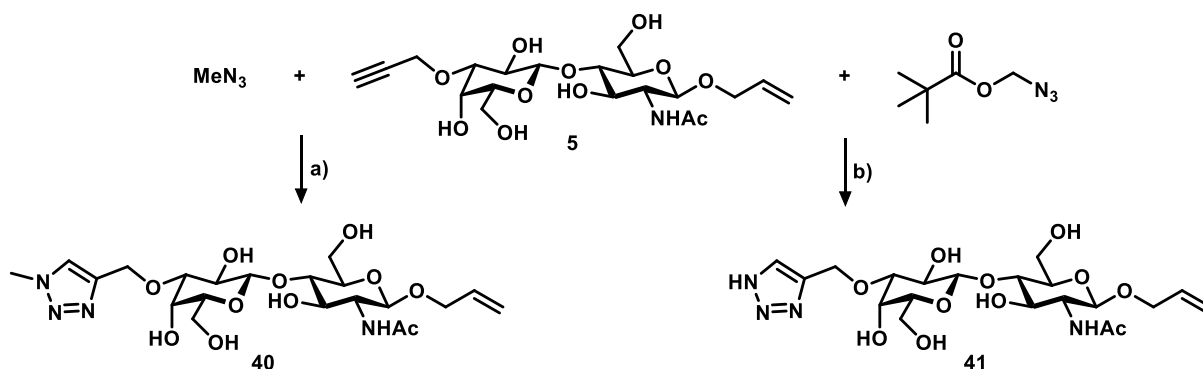


Schema 37: Synthese von Fluor-substituierten, aromatischen Gal-1 Liganden ausgehend von den drei Edukten 2,4-Difluorbenzoesäure **34a** ($R^1 = \text{F}, R^2 = \text{F}$); 2-Fluorbenzoesäure **34b** ($R^1 = \text{H}, R^2 = \text{F}$), 4-Fluorbenzoesäure **34c** ($R^1 = \text{F}, R^2 = \text{H}$). **a)** 1: NIS, H_2SO_4 , 2-4 h, 0°C , 61–91 %; 2: BH_3 in THF, 16 h, RT, 73-90 %; **b)** $\text{BocNH-CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ oder $\text{BocNHC(NBoc)NH-CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$, $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$, CuI, THF, NEt_3 , 16 h, RT, 33-67 %; **c)** CBr_4 , PPh_3 , DCM, 16 h, RT; dann NaN_3 , DMF, 2 h, 75°C , 33-71 % über zwei Stufen; **d)** 1: **5**, NaAsc, CuSO_4 , $t\text{-BuOH/H}_2\text{O}$, 2 h, RT, 52-82 %, 2: 30 % TFA/ H_2O , RT, 1-2 h, 88-99 %. Die Dissoziationskonstanten K_D liegen zwischen 151 und 238 μM , im Vergleich $K_D(\text{LacNAc}) = 91 \mu\text{M}$.

Die Zielmoleküle und Zwischenstufen wurden vollständig charakterisiert. Die Affinitäten zum Galectin-1 wurden durch isotherme Kalorimetrie bestimmt und die gemessenen Werte befinden sich in der Größenordnung des natürlichen Substrats LacNAc, da einerseits die Enthalpie ΔH durch die eingeführten Wechselwirkungen steigt, dafür aber Kristallwasser verdrängt wird, und durch den Entropieverlust ΔS kompensiert wird. Zusätzlich wurden in Zusammenarbeit mit *Dr. Clemens Grimm* Proteinkristalle gezüchtet und mit den synthetisierten Liganden versetzt. Die Messungen am Bessy II in Berlin ergaben keine vollständigen Elektronendichten für die gesamten Moleküle, sondern jeweils nur für das Disaccharid, aufgrund von destruktiven Wechselwirkungen zwischen den Fluoratomen und den Heteroatomen der Aminosäuren.

Diese Ergebnisse zeigen jedoch eine konservierte Bindung des Zuckers und des Triazols. Daher wurden Liganden ohne Linker synthetisiert, die lediglich eine Methylgruppe oder ein Wasserstoffatom am entstehenden Triazolring tragen (**Schema 38**).

5. Zusammenfassung



Schema 38: Synthese von Galectin-1 Liganden mit kurzem Rest (H oder Me) am Triazol. **a)** MeI, NaN₃, THF, H₂O, RT, 16 h; dann **5**, NaAsc, CuSO₄, RT, 1 h, 67 %; **b)** 1: **5**, Azidomethylpivalat, NaAsc, CuSO₄, *t*-BuOH/H₂O, 1 h, RT, 90 %; 2: NaOMe, MeOH, RT, 3 h, 66 %.

Durch erneut durchgeführte Röntgenkristalluntersuchungen mit *Dr. Clemens Grimm* am Elektronen-Synchrotron in Hamburg, konnten zwei vollständig aufgelöste Strukturen gemessen werden (**Abbildung 49**).

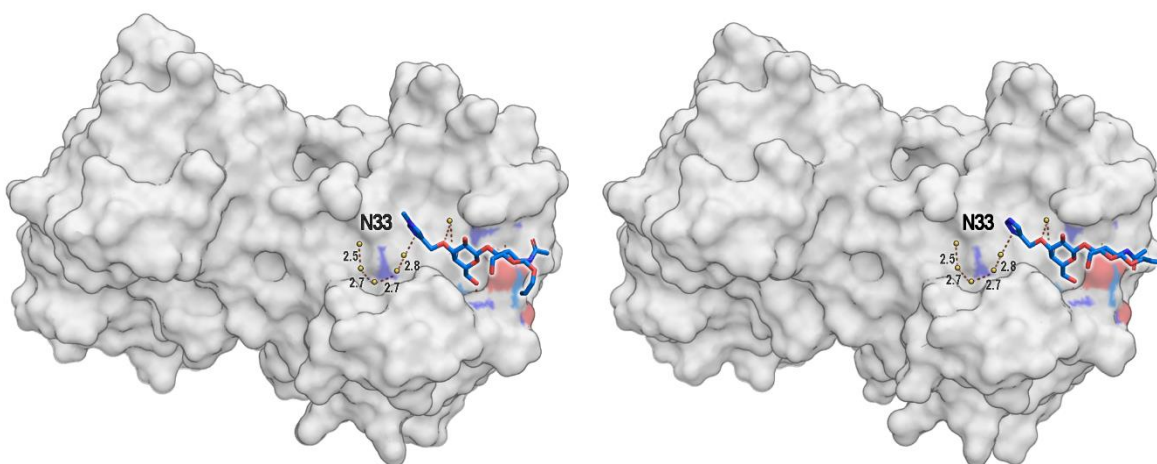
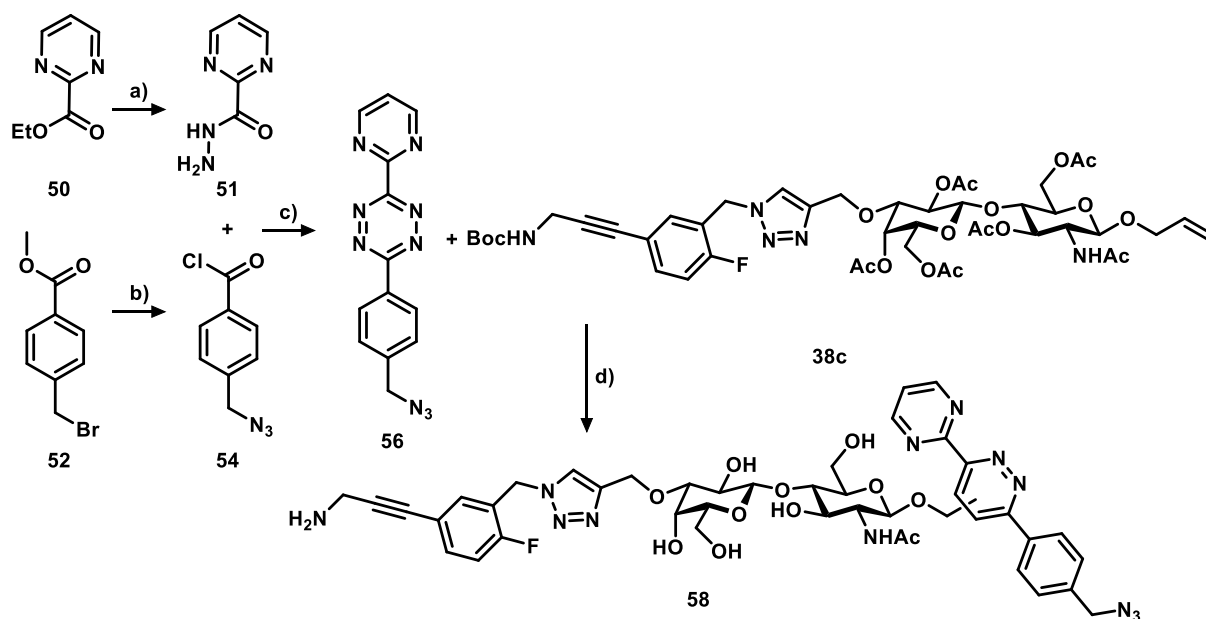


Abbildung 49: Vollständig aufgelöste Kristallstrukturen der beiden Gal-1 Liganden **40** (PDB ID: 8B0Z, Auflösung: 1.23 Å, $K_D = 128 \pm 9 \mu\text{M}$) und **41** (PDB ID: 8B0W, Auflösung: 1.53 Å, $K_D = 238 \pm 55 \mu\text{M}$).

Zur Konjugation des Gal-1 Liganden auf der Zelloberfläche von SiaNAI-gefütterten Zellen müssen diese eine Azidogruppe enthalten. Nach erfolgreicher Synthese eines Azido-funktionalisierten Tetrazins (fünf Stufen) konnte dieses mit der Allylgruppe von **38c** cyclisiert werden. **58** kann entsprechend der etablierten Protokolle eingesetzt werden (**Schema 39**).

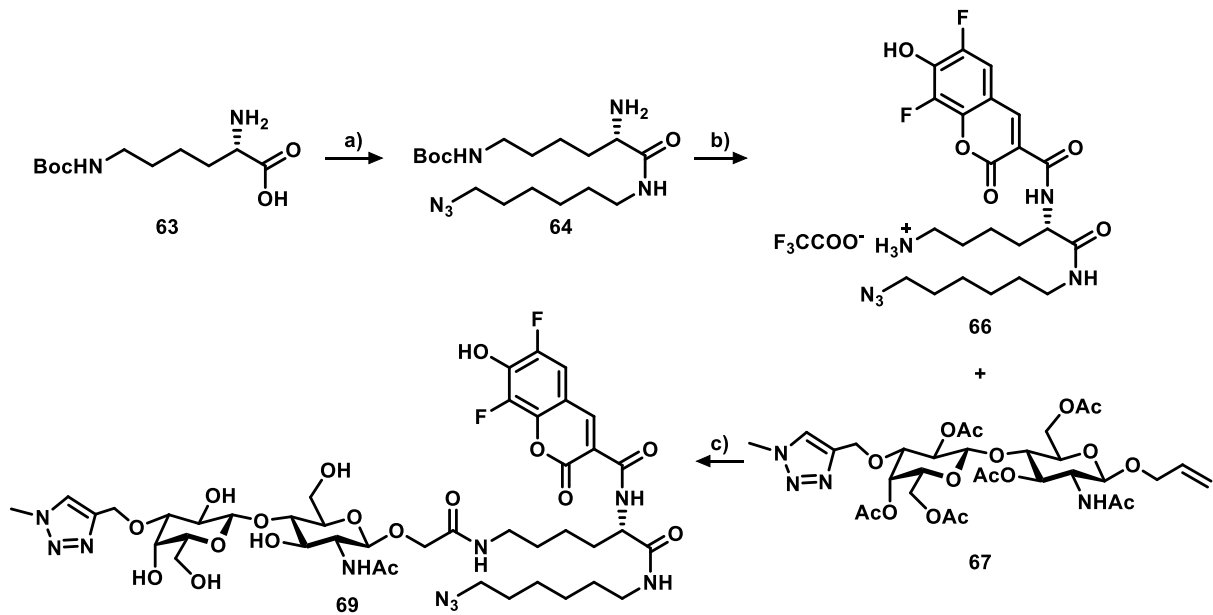


Schema 39: Synthese von Azido-Tetrazin **56** und Cycloaddition zum Liganden **58**. **a)** $\text{H}_2\text{NNH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, EtOH, MW, $95\text{ }^\circ\text{C}$, 30 min, 99 %; **b)** 1: NaN_3 , DMF, MW, $130\text{ }^\circ\text{C}$, 20 min, dann NaOH, RT, 16 h, 84 % (über zwei Stufen); 2: $(\text{COCl})_2$, DMF, DCM, $45\text{ }^\circ\text{C}$, 2 h direkte Verwendung; **c)** 1: **51** und **54**, NEt_3 , DCM, RT, 4 h, 41 %; 2: PCl_5 , Tol, $135\text{ }^\circ\text{C}$, 3 h, dann $\text{H}_2\text{NNH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, DCM, RT, 2 h, dann NaNO_2 , AcOH, H_2O , $0\text{ }^\circ\text{C}$, 30 min, 34 %; **d)** 1: **56** und **38c**, MeOH, DCM, $60\text{ }^\circ\text{C}$, 48 h, 58 %; 2: TFA, MeOH, RT, 16 h, 76 %.

Der Effekt dieser Verbindung auf die Steifigkeit von Zellen wurde in Kooperation mit *Jennifer Elsterer* und *Konstantin Takors* aus der Forschungsgruppe von *Prof. Dr. B. Fabry* ermittelt.^[274] Dazu wurden die Zellen (hMSC-TERT oder AMO-1) durch einen mikrofluidischen Kanal gedrückt in dem die Zelldeformation durch eine Hochgeschwindigkeitskamera aufgenommen wurden. Eine tendenzielle Erhöhung der Steifigkeit konnte beobachtet werden, da in den ersten Messversuchen eine Erhöhung der Zellsteifigkeit durch konjugiertes **58** (1.8-fache Erhöhung) erreicht wurde. Jedoch waren die Messergebnisse nicht reproduzierbar und die Daten bisher nicht signifikant genug, um eine eindeutige Aussage zu treffen.

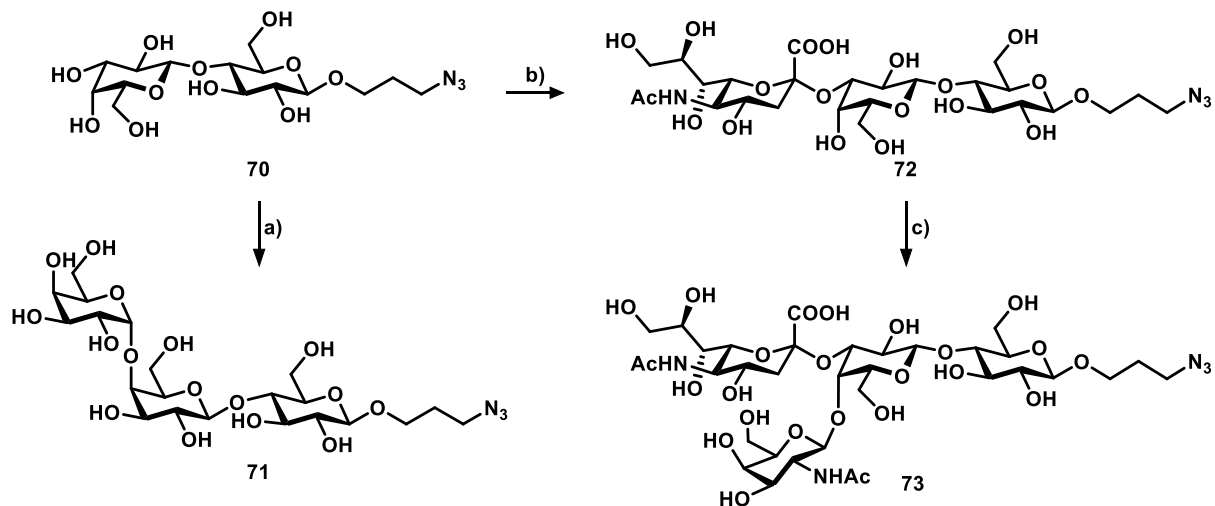
Verbindung **58** hat den Nachteil, dass diese aufgrund von fehlenden Fluoreszenzeigenschaften nicht visualisiert werden kann. Dazu wurde ein Molekül synthetisiert, welches einen Azido-funktionalisierten Gal-1 Liganden mit einem Fluorophor vereint. Dafür wurde „Pacific blue“ **60** gewählt, da dieses verhältnismäßig klein ist und die Ligand-Protein-Wechselwirkung nicht behindern soll (**Schema 40**).

5. Zusammenfassung



Schema 40: Synthese von einem fluoreszierenden Gal-1 Liganden (**41**) mit einer bioorthogonalen Gruppe **69**.
a) 1: 6-Azidohexylamin, HATU, DMF, DIPEA, RT, 2 h, 97 %; 2: Piperidin, DMF, RT, 3 h, 90 %; **b)** 1: HATU, DMF, DIPEA, RT, 2 h; 2: TFA, DCM, 1 h, 33 % (über zwei Stufen); **c)** 1: RuCl₃, NaIO₄, H₂O, MeCN, DCM, HCl, RT, 3 h; 2: **66**, HATU, DIPEA, DMF, 0 °C → RT, 16 h; 3: NaOMe, MeOH, RT, 30 min, 16 % (über drei Stufen).

Zuletzt sollten humane Saccharide dargestellt und mit einer Azidogruppe funktionalisiert werden. Auf Basis von Azidolactose **70** konnten in Zusammenarbeit mit *Dr. Maria Ortiz-Soto* die Oligosaccharide **71–73** enzymatisch synthetisiert werden (**Schema 41**). Die Verbindungen wurden jeweils vollständig charakterisiert.



Schema 41: Enzymatische Synthese von bioorthogonalen Oligosacchariden ausgehend von Azido-Lactose **70**.
a) α -1,4-Galactosyltransferase LgtC-C246S, UDP-Galactose, 48 h, 32 °C, 67 %; **b)** Trans-Sialidase TcTs, Fetuin, 24 h, 30 °C; 15 % **c)** β -1,4-N-Acetylgalactosaminyltransferase CgtA, UDP-GalNAc, 48 h, 35 °C, 70 %.

Diese Oligosaccharide sind die Zuckereinheiten der Glycosphingolipide Gb3, GM3 und GM2 und kein Bestandteil von Glycoproteinen. Statt der Lactose-Einheiten (β 1,4Gal-Glc) treten bei

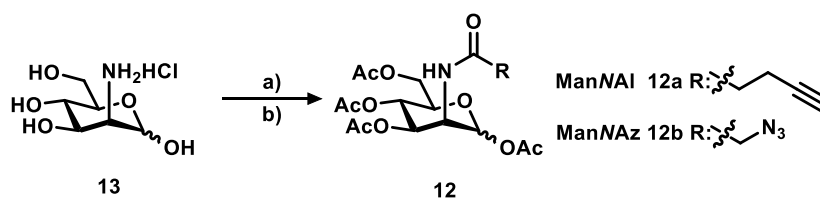
Glycoproteinen Lactosamin-Einheiten (β 1,4Gal-GlcNAc) auf. Durch *metabolic glycoengineering* können unnatürliche funktionelle Gruppen auf die Zelloberfläche eingeführt werden. Wie oben bereits erwähnt zeigte *SiaNAI 8a* effiziente Einbauten und wird entsprechend der natürlichen Sialinsäure als terminale Zuckereinheit von Glycanketten übertragen. Durch Click-Reaktionen können die Alkylgruppen zur Konjugation mit den Azido-Oligosacchariden **71-73** genutzt werden, wodurch untypische Glycosylierungen auf den Proteinen entstehen. Der Einfluss auf die Zellen durch diese Veränderung soll in Zukunft näher untersucht werden. Interessant ist vor allem die kontrollierte Differenzierung von Stammzellen, die für Gewebezüchtung und regenerativen Medizin bedeutend sind.

6 Summary

A more precise understanding of cells is necessary for the production of artificial biological tissues and, in the future, functional organs. Innovations in additive manufacturing, such as 3D printing, are used to produce hierarchical structures.^[11] Artificial models may replace damaged or missing tissue in patients and additionally support the research of drug effects or the course of diseases. Therefore, special bioinks (populated biomaterial with cells) are being developed for the 3D printing.^[12] In this context, it is important to optimise the interaction between cells and matrix or cells and biomaterial, for which the investigation of the cell surface in its structure and functions is crucial.^[11, 280] This work focuses on the synthesis of human saccharide analogues for the modification of cell surfaces to gain new insight on the cell membrane.

Unnatural sugars are introduced into the natural cell metabolism by incubation. This method is called metabolic glycoengineering. In particular, sialic acid analogues are transferred as mucin-type O- as well as N-glycans to glycoproteins, which mediate biological processes such as adhesion or signaling as transmembrane proteins outside the cell or in the extracellular matrix.^[79]

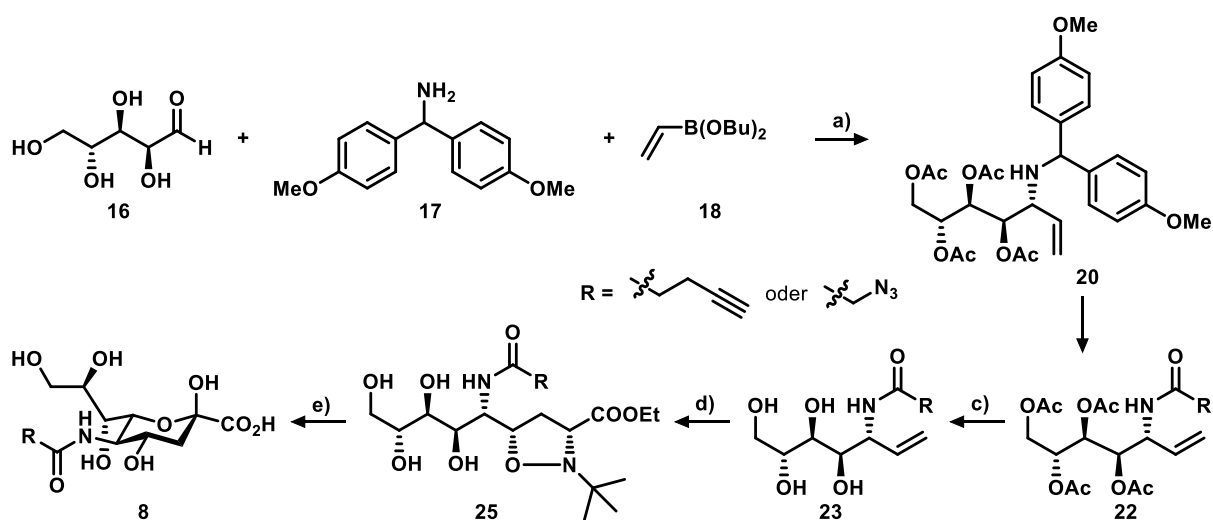
Mannosamine derivatives **12** were synthesised over two steps with bioorthogonal groups (azide or alkyne) in the side chain (**Scheme 1**). ManNAc is the metabolic precursor of Sia, unnatural ManNAI and ManNAz can therefore be transformed to the corresponding Sia analogues.



Scheme 1: Synthesis of bioorthogonal mannosamine derivatives. a) Pentynoic acid-NHS-ester or azido acetic acid-NHS-ester, Na₂CO₃, MeOH, RT, 16 h, 85 % for **12a** and 78 % for **12b**. b) Ac₂O, Py, RT, 16 h, quant.

The incorporation of the synthesised monosaccharides was investigated by *Dr. Stephan Altmann* from the research group of *Prof. Dr. R. Ebert* on mesenchymal stromal cells (primary cells and telomerase-immortalized cell line). The efficiency of the incorporation on the cell membrane was evaluated by click reactions with fluorescent dyes (Cy5-azide **14** or Cy3-alkyne **15**). Acetylated mannosamine-analogues **12** showed a stronger fluorescent signal and thus a higher labelling of glycoproteins than the monosaccharides Ac₄GalNAz **10** and Ac₄GlcNAz **11**, respectively.^[100]

Peracetylated monosaccharides entail the disadvantage of undergoing unspecific reactions with nucleophilic amino acids, mainly cysteine (S-glycosylation) and label glycoproteins unspecifically.^[118] Bioorthogonal sialic acids without acetyl groups were synthesised to prevent S-glycosylation. They are the metabolic product of mannosamine analogues with the advantage of avoiding the Rosemann-Warren biosynthetic pathway (biosynthesis of sialic acid from mannosamine). They are directly activated in the nucleus and transferred to glycoproteins by sialyltransferases.^[79] On the outer cell membrane, the unnatural functional groups are available for specific chemical reactions. The established strategies of *Wong et al.*^[223] and *Homann et al.*^[99] were improved regarding purification and reaction time (**Scheme 2**). The incorporation of the synthesised monosaccharides was again investigated by *Dr. Stephan Altmann*.



Scheme 2: Synthesis of sialic acid derivatives with bioorthogonal groups in the side chain of C-5. **a)** EtOH, H₂O, 1 d, 50 °C; then Ac₂O, Py, RT, 20 h, 59 %; **b)** TFA, DCM, 10 min, RT, quant.; **c)** azido acetic acid or pentynoic acid, HATU, DIPEA, DMF, RT, 15 h, 52–73 %; **d)** NaOMe, MeOH, RT, 30 min, quant. **e)** Nitrone **24**, dioxane, 30 °C, 2–4 weeks, 54–69 %; **f)** NaOMe, 24 h, RT, then H₂O, 24 h, RT, 77–82 %.

The incorporation on the cell membrane was evaluated by click reactions with fluorescent dyes (Cy5-azide **14** or Cy3-alkyne **15**). Concentrations between 0.5–2.0 mM during incubation displayed a strong fluorescence signal for the alkyne compound **8a**, while moderate fluorescence signal could only be obtained for the azide analogues **8b** at a 2.0 mM sugar concentration. Higher labelling of glycoproteins with the alkyne variant was also previously reported from *Bertozzi et al.* in different cell lines.^[110] Cell viability under the influences of **8** was high under the tested conditions and otherwise no negative effect on the cells was observed, except for the hMSC-TERT the viability and apoptosis was reduced by high concentrations (1.0 and 2.0 mM). Additionally, no altered or disturbed differentiation behaviour could be reported.

6. Summary

For the determination of glycoproteins labelled by metabolic glycoengineering, the cell lysates were obtained after incubating cells with SiaNAI **8a** and Ac₄ManNAI **12a**. Due to their more efficient incorporation the alkyne sugars were preferred over their azido analogues. The cells were also provided by *Prof. Dr. R. Ebert*. The samples were reacted with a biotin-azide using click chemistry and the glycopeptides isolated with a streptavidin agarose resin. Finally, the proteins were analysed by mass spectrometry (LC-MS/MS) by *Dr. Marc Drießen*. These experiments resulted in the labelling of 55 glycoproteins by incubation with SiaNAI **8a** and 94 glycoproteins with Ac₄ManNAI **12a**, whereby 30 were detected in the lysates of both saccharides (**Figure 1**). The glycoproteins were compared with databases from UniProt,^[231] their molecular functions and cellular components were quantified. Thus, SiaNAI showed a selectivity in labelling proteins correlating with signal transduction, cell adhesion and, in the case of stem cells, differentiation. These experiments lead to the assumption that cell properties may be manipulated, especially by employing unnatural sialic acid analogues in glycoengineering. This feature could be useful for applications in biofabrication and tissue engineering, for example in selective adherence of cells to a bioink.

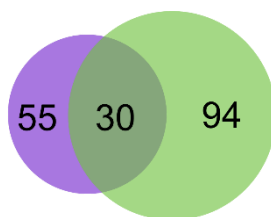
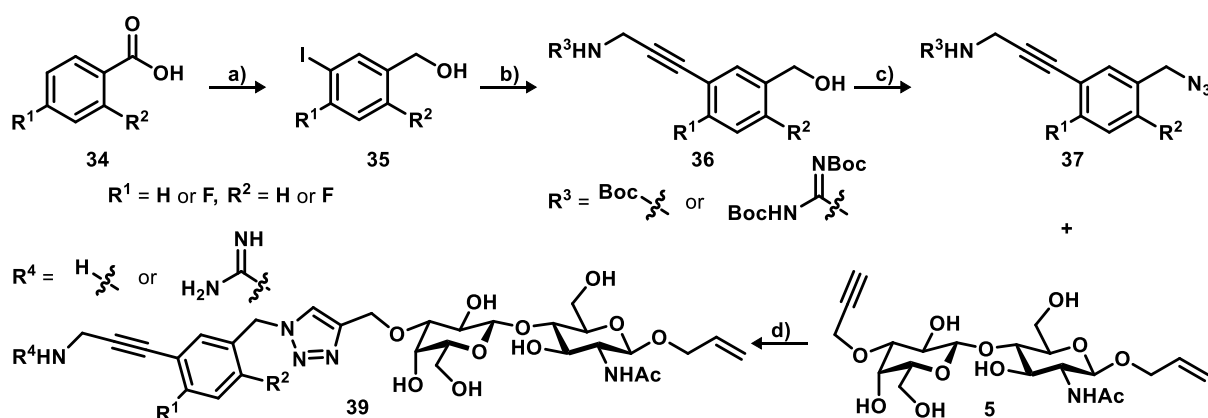


Figure 1: Venn-diagram of the identified glycoproteins by incubation of hMSC-TERT with SiaNAI **8a** (purple) or Ac₄ManNAI **12a** (green).

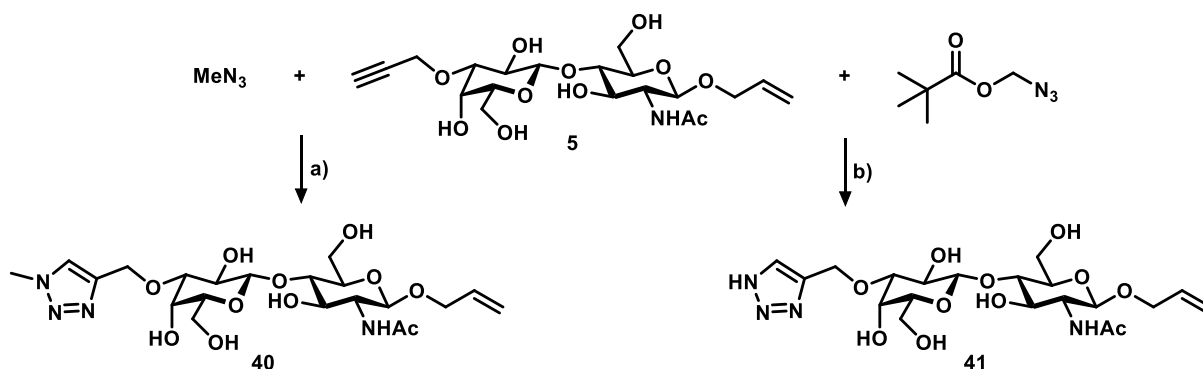
Another interesting topic was the investigation of galectin-1, which is highly expressed in hMSC.^[281] This protein binds terminal galactose or lactosamine (disaccharide of galactose and glucosamine) residues of glycoproteins on the cell surface.^[192] Specific ligands were designed in order to address the small lectin and possibly manipulate the cell behaviour. Finally, six ligands were synthesised over several steps (13 steps for the synthesis of **5**, five steps for the synthesis of fluorinated aryl-compounds **37** and the final synthesis of ligands **39** respectively), each carrying one or two fluorine atoms on the aromatic ring (**Scheme 3**). The target molecules and intermediates were fully characterised. Further, the affinities for galectin-1 were determined by isothermal calorimetry and the measured values were also in the μM range as the natural substrate LacNAc. Expanding the ligand and adding further interactions to the protein results in a higher enthalpy ΔH , on the other side water is removed from the crystal compensating the energy by a reduced entropy ΔS . Additionally, protein crystals were grown in collaboration with *Dr. Clemens Grimm* and soaked with the synthetic ligands. The measurements at Bessy II in Berlin did not show complete electron densities for the whole molecules, but only for the disaccharides, respectively. The fluorine atoms with a high electron density cause destructive interactions with the amide bonds of the protein.



Scheme 3: Synthesis of fluor-substituted, aromatic Gal-1 ligands starting from 2,4-difluoro benzoic acid **34a** ($R^1 = F$, $R^2 = F$); 2-fluoro benzoic acid **34b** ($R^1 = H$, $R^2 = F$), 4-fluoro benzoic acid **34c** ($R^1 = F$, $R^2 = H$). **a)** 1: NIS, H_2SO_4 , 2-4 h, 0°C , 61–91 %; 2: BH_3 in THF, 16 h, RT, 73-90 %; **b)** $\text{BocNH-CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ or $\text{BocNHC(NBoc)NH-CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$, $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$, CuI, THF, NEt_3 , 16 h, RT, 33-67 %; **c)** CBr_4 , PPh_3 , DCM, 16 h, RT; then NaN_3 , DMF, 2 h, 75°C , 33-71 % over two steps; **d)** 1: **5**, NaAsc, CuSO_4 , $t\text{-BuOH/H}_2\text{O}$, 2 h, RT, 52-82 %, 2: 30 % TFA/ H_2O , RT, 1-2 h, 88-99 %. Dissociation constant K_D for the ligands is between 151 und 238 μM , in comparison $K_D(\text{LacNAc}) = 91 \mu\text{M}$.

However, these results revealed a conserved binding of the sugar and the triazole, respectively. In a further approach, truncated ligands were synthesised with only a methyl group or hydrogen atom on the triazole (**Scheme 4**). The methyl group was introduced by forming MeN_3 *in situ* and the hydrogen atom by reacting **5** with azidomethyl pivalate followed by basic cleavage.

6. Summary



Scheme 4: Synthesis of Galectin-1 ligands with truncated residues (H oder Me) at the triazole. **a)** MeI, NaN₃, THF, H₂O, RT, 16 h; then **5**, NaAsc, CuSO₄, RT, 1 h, 67 %; **b)** 1: **5**, azidomethyl pivalate, NaAsc, CuSO₄, *t*-BuOH/H₂O, 1 h, RT, 90 %; 2: NaOMe, MeOH, RT, 3 h, 66 %.

After soaking the ligands with new grown Gal-1 crystals, two completely resolved structures were measured with *Dr. Clemens Grimm* at the electron synchrotron in Hamburg (**Figure 2**).

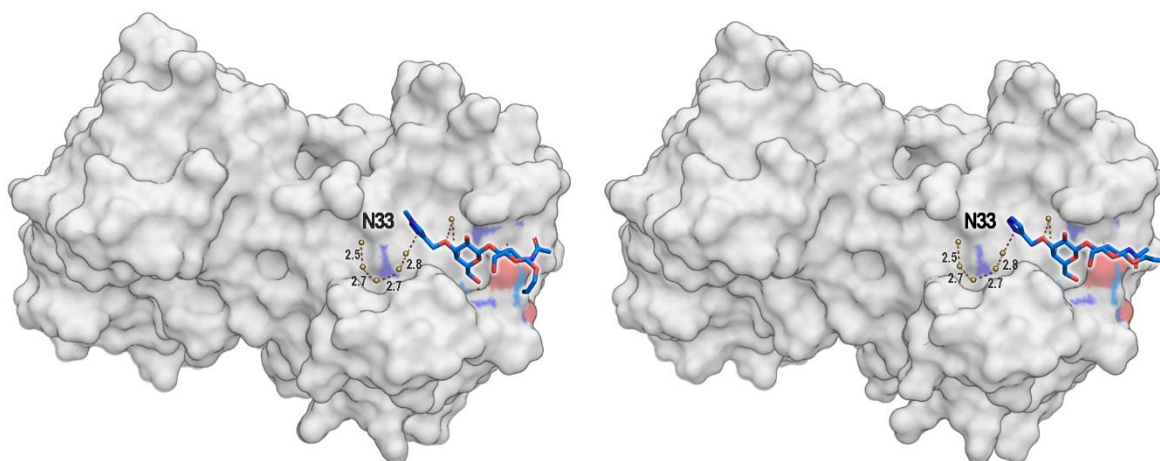
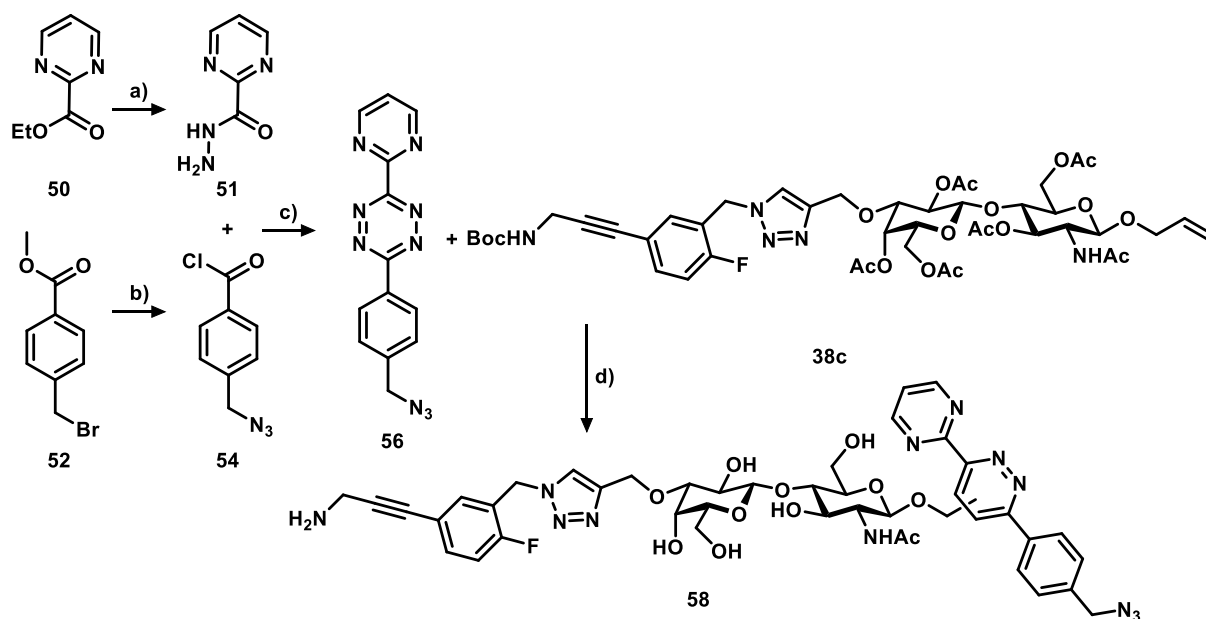


Figure 2: Resolved crystal structures of the Gal-1 ligands **40** (8B0Z, 1.23 Å, $K_D = 128 \pm 9 \mu\text{M}$) and **41** (8B0W, 1.53 Å, $K_D = 238 \pm 55 \mu\text{M}$).

To enable the coupling of the ligand on the cell surface of glycoengineered cells (incubated with SiaNAI), an azido group has to be introduced. After the successful synthesis of an azido functionalised tetrazine, the cyclisation with the allyl group at position 1 of compound **38c** was performed. Molecule **58** can be used in the future for CuAAC or SpAAC according to the established protocols (**Scheme 5**).



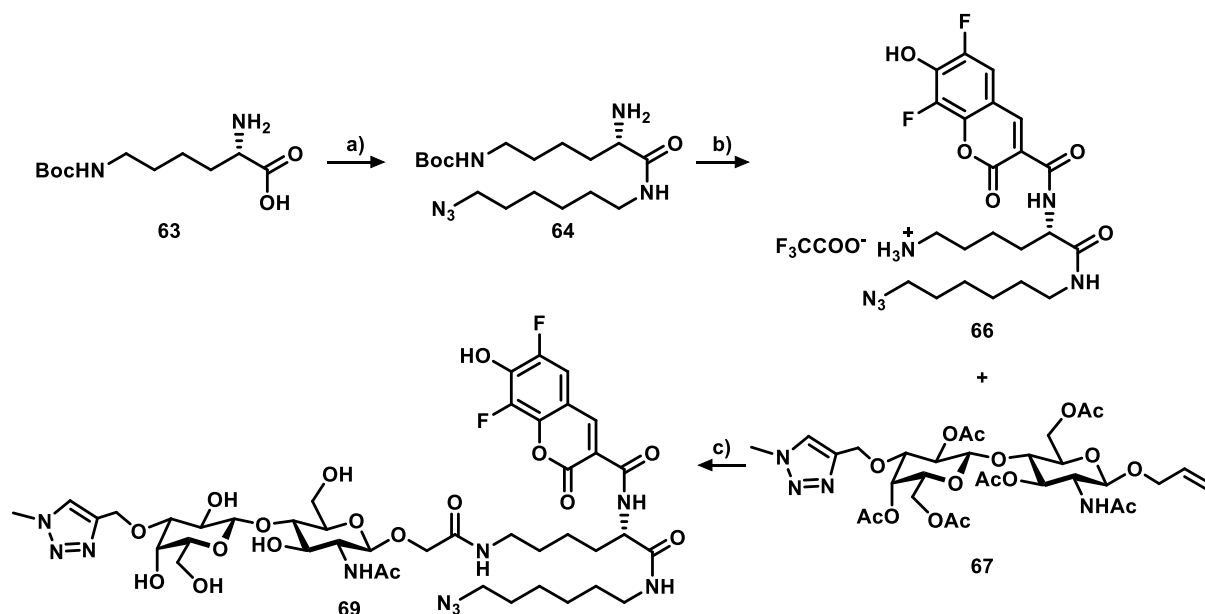
Scheme 5: Synthesis of azido tetrazine **56** and cycloaddition to form ligand **58**. **a)** $\text{H}_2\text{NNH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, EtOH, MW, 95 °C, 30 min, 99 %; **b)** 1: NaN_3 , DMF, MW, 130 °C, 20 min, then NaOH, RT, 16 h, 84 % (over two steps); 2: $(\text{COCl})_2$, DMF, DCM, 45 °C, 2 h used immediately; **c)** 1: **51** and **54**, NEt_3 , DCM, RT, 4 h, 41 %; 2: POCl_3 , Tol, 135 °C, 3 h, then $\text{H}_2\text{NNH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, DCM, RT, 2 h, then NaNO_2 , AcOH, H_2O , 0 °C, 30 min, 34 %; **d)** 1: **56** and **38c**, MeOH, DCM, 60 °C, 48 h, 58 %; 2: TFA, MeOH, RT, 16 h, 76 %.

In cooperation with *Jennifer Elsterer* and *Konstantin Takors* from the research group of *Prof. Dr. B. Fabry*, the stiffness of glycoengineered cells were measured by pushing the cells through a microfluidic channel.^[274]

There, the cells (hMSC-TERT or AMO-1) were monitored with a high-speed camera and the deformation provided information about the stiffness. In preliminary experiments, an increase in cell stiffness was achieved after click reaction with compound **58** (up to 1.8-fold). However, the results were not reproducible and the data so far not significant enough for a final statement. Future experiments are planned to increase the cell stiffness and thus protect the cells from shear stress during 3D printing processes.

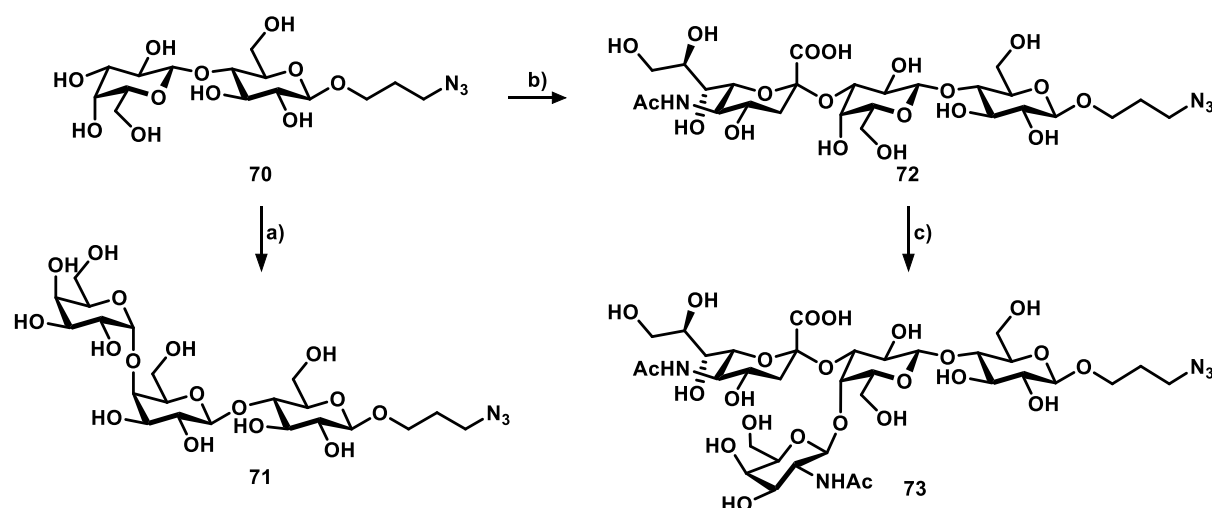
A further improvement of conjugate **58** is the coupling with a fluorescent dye. Therefore, a molecule was synthesised combining an azido-functionalised Gal-1 ligand with a fluorophore. “Pacific blue” **60** was chosen due its relatively small structure to minimize sterical effects and block the ligand-protein interaction (**Scheme 6**).

6. Summary



Scheme 6: Synthesis of a fluorescent Gal-1 ligand with a bioorthogonal group **69**. **a)** 1: 6-azido-hexylamine, HATU, DMF, DIPEA, RT, 2 h, 97 %; 2: Piperidin, DMF, RT, 3 h, 90 %; **b)** 1: HATU, DMF, DIPEA, RT, 2 h; 2: TFA, DCM, 1 h, 33 % (over two steps); **c)** 1: RuCl₃, NaIO₄, H₂O, MeCN, DCM, HCl, RT, 3 h; 2: **66**, HATU, DIPEA, DMF, 0 °C→RT, 16 h; 3: NaOMe, MeOH, RT, 30 min, 16 % (over three steps).

Creating different bioorthogonal compounds based on human saccharides expand the possibilities for glycoengineering. The chemical synthesised azido-lactose **70** was enzymatically applied in collaboration with *Dr. Maria Ortiz-Soto* to generate the oligosaccharides **71–73** (**Scheme 7**). All target molecules were fully characterised.



Scheme 7: Enzymatic synthesis of bioorthogonal oligosaccharides starting from azido-lactose **70**. **a)** α -1,4-galactosyltransferase LgtC-C246S, UDP-Gal, 48 h, 32 °C, 67 %; **b)** trans-sialidase TcTs, fetuin, 24 h, 30 °C, 15 %; **c)** β -1,4-*N*-acetylgalactosaminyltransferase CgtA, UDP-GalNAc, 48 h, 35 °C, 70 %.

These oligosaccharides are the glycan units of the glycosphingolipids Gb3, GM3 and GM2 and not a component of glycoproteins. In the future, the influence on cells by metabolic

glycoengineering with alkyne sugars (SiaNAI **8a**) and further conjugation of these azido-oligosaccharides **71–73** on the glycoproteins in the cell membrane shall be investigated. Of particular interest is the differentiation of stem cells, which is important for tissue engineering and regenerative medicine.

7 Experimententeil

7.1 Allgemeine Arbeitstechniken

7.1.1 Geräte

Kernresonanzspektroskopie

Im Institut für Organische Chemie standen für die Messung von NMR-Spektren folgende Geräte zur Verfügung:

Brucker Avance III HD 400 NMR-Spektrometer (^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz, ^{19}F : 377 MHz).

Brucker Avance III HD 600 NMR-Spektrometer (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz, ^{19}F : 565 MHz).

Aufgenommen wurden die Spektren bei 25 °C. Die Kalibrierung erfolgte auf das Signal der Restprotonen des jeweiligen deuterierten Lösungsmittels. Für ^1H -NMR-Spektren: $\delta(\text{CDCl}_3) = 7.26$ ppm; $\delta(\text{D}_2\text{O}) = 4.79$ ppm; $\delta(\text{MeOD-d}_4) = 3.31$ ppm; $\delta(\text{DMSO-d}_6) = 2.50$ ppm und für die ^{13}C -NMR-Spektren: $\delta(\text{CDCl}_3) = 77.16$ ppm; $\delta(\text{MeOD}) = 49.00$ ppm; $\delta(\text{DMSO-d}_6) = 39.52$ ppm

Die Zuordnung der Signale wurde mit Hilfe von DEPT135-, COSY-, HSQC-, HMBC- und TOCSY-NMR-Spektren durchgeführt. Die chemischen Verschiebungen sind in ppm und die Kopplungskonstanten in Hz angegeben. Für die Aufspaltungen wurden folgende Abkürzungen verwendet: s: Singulett; d: Dublett, t: Triplett, q: Quartett, quint: Quintett und m: Multiplett.

Massenspektrometrie

Bruker Daltonics MicroOTOF Focus für Elektronenspray-Ionisation (ESI)

Mikrowelle

Discover 2.0 von CEM; Mikrowellen können bis zu 300 W Leistung eingestrahlt werden

HPLC-Pumpe und Detektor

HPLC-Pumpe: BESTA, Type HD2-400

UV-Vis-Detektor: SYKAM S3345 PDA DETECTOR

Vakuumpumpen

VACUUBRAND verschiedene Membran- und Ölpumpen

Gerfietrocknungsanlage

Christ Alpha 2-4 Ldplus

Isotherme Kalorimetrie

MicroCal iTC200 von Malvern

7.1.2 Chemikalien

Reagenzien und Lösungsmittel

Die verwendeten Chemikalien wurden entsprechend der vom Hersteller angegebenen Reinheit eingesetzt. Diese wurden bei Sigma Aldrich, Alfa Aesar, TCI, abcr und Acros Organics erworben.

Alle technischen Lösungsmittel wurden vor dem Gebrauch destilliert (Wasser zwei Mal). Bei wasserfreien Lösungsmitteln wurden diese nach den gängigen Methoden getrocknet und unter Stickstoffatmosphäre gelagert. Gemische sind in Volumenanteilen (V:V) angegeben. Verwendete Lösungen sind, wenn nicht anderes deklariert, im wässrigen Milieu.

Dünnschichtchromatographie (DC)

Macherey-Nagel ALUGRAM® Xtra SIL G/UV₂₅₄

Merck TLC Silica gel 60 RP-18 F₂₅₄S

Färbereagenzien für DC

Die Flecken (*spots*) wurden entweder durch Fluoreszenzlöschung bei 254 nm visualisiert oder durch eine der folgenden Färbungen:

Nachweis von Zuckern:

N-(1-Naphthyl)-ethylendiamin (60 mg), H₂SO₄ konz (10 mL), MeOH (200 mL)

Nachweis von Aminen und Amiden:

Ninhydrin (0.60 g), n-Butanol (200 mL), Essig konz. (6.0 mL)

Nachweis von oxidierbaren Verbindungen:

KMnO₄ (1.50 g), K₂CO₃ (10.0 g), NaOH (1.2 mL, 10 %) H₂O (200 mL)

7. Experimententeil

Säulenchromatographie

Die Aufreinigungen wurden über Kieselgel 60 (0.04 –0.063 mm) der Fa. Macherey-Nagel mit Säulen verschiedener Maße durchgeführt.

Die Aufreinigung über RP-18-Kieselgel der Firma YMC (ODS-AQ-HG, AQG12S16, 12 nm, S-15 µm, C-18) wurde in wiederverwendbaren Glassäulen der Firma YMC (ECO Columns, ECO^{PLUS} Columns, 10-50 bar) durchgeführt.

7.2 Synthesen

7.2.1 Allgemeine Versuchsvorschriften

7.2.1.1 Allgemeine Versuchsvorschrift A) Reduktion von Säuren

Einer Lösung aus Benzoessäure-Derivat in THF (200 mM) wurden tropfenweise $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$ (1 M, 3.00 Äq.) bei 0 °C zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde die Reaktionslösung für 16 h bei RT gerührt. Anschließend wurde mit ges. NaHCO_3 -Lösung versetzt und die wässrige Phase drei Mal mit EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Kieselgel (Cy:EE = 3:1) gereinigt.

7.2.1.2 Allgemeine Versuchsvorschrift B) Sonogashira-Reaktion

Aryliodid (1.00 Äq.) und Alkin (1.00 Äq.) wurden in THF gelöst (100 mM). Anschließend wurden $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$ (0.05 Äq.), CuI (0.05 Äq.) und NEt_3 ($\text{THF}:\text{NEt}_3 = 5:1$) und das Reaktionsgemisch 16 h bei RT gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde diese mit DCM verdünnt und mit ges. NaHCO_3 -Lösung gewaschen und die wässrige Phase zwei Mal mit DCM extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Kieselgel (Cy:EE = 9:1→4:1) gereinigt.

7.2.1.3 Allgemeine Versuchsvorschrift C) Appel-Reaktion

Der Alkohol wurde in trockenem DCM gelöst (20 mM). Der Lösung wurden PPh_3 (1.50 Äq.) und CBr_4 (1.50 Äq.) zugegeben und das Reaktionsgemisch für 16 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in trockenem DMF (20 mM) aufgenommen und NaN_3 (2.50 Äq.) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 2 h auf 75 °C erhitzt. Nach beendeter Reaktion wurde das Gemisch zuerst mit Wasser und dann mit ges. NaCl -Lösung versetzt. Die wässrige Phase wurde drei Mal mit EE extrahiert und die vereinigten, organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch über Kieselgel (Cy:EE = 4:1) gereinigt.

7.2.1.4 Allgemeine Versuchsvorschrift D) CuAAC

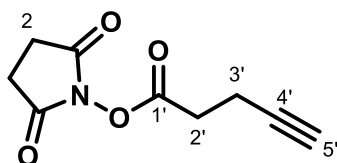
Alkin (1.00 Äq.) und das entsprechende Azid (1.00 Äq.) wurden in ^tBuOH/H₂O (2:1, 0.1 M) gelöst. Daraufhin wurde wässrige CuSO₄-Lösung (0.1 M, 0.10 Äq.) und wässrige Natriumascorbat-Lösung (1.0 M, 1.00 Äq.) zugegeben und die Reaktionslösung 1-2 h (DC-Kontrolle) bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch über Kieselgel (DCM:MeOH = 10:1 → 5:1) gereinigt.

7.2.1.5 Allgemeine Versuchsvorschrift E) Abspaltung Boc-Schutzgruppe

Eine 1.0 M Lösung des Boc-Amins wurde mit wässriger TFA (30 %vol) versetzt und bei RT gerührt bis kein Edukt detektiert wurde (1-2 h). Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch über RP18-Kieselgel (H₂O:MeCN:TFA = 2:1:0.01) gereinigt.

7.2.2 Synthese von Mannosamin-Derivaten

7.2.2.1 4-Pentinsäure-NHS-Ester 74a



4-Pentinsäure (3.2 g, 32.6 mmol, 1.00 Äq.) und *N*-Hydroxysuccinimid (4.50 g, 39.1 mmol, 1.20 Äq.) wurden in trockenem DCM (150 mL) suspendiert. Das Gemisch wurde auf 0 °C gekühlt und EDC (10.8 g, 56.1 mmol, 1.72 Äq.) portionsweise zugegeben. Anschließend wurde die Reaktionslösung 40 min bei 0 °C und dann 2.5 h bei RT gerührt. Die organische Phase wurde mit DCM verdünnt und mit 3 % NaHSO₄-Lösung (3x 100 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde als farbloses Öl erhalten, das während der Lagerung fest wurde.

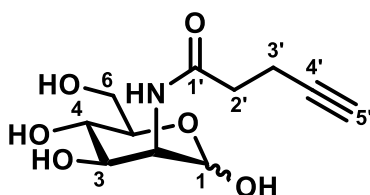
Ausbeute: 5.69 g (32.6 mmol, 89 %)

Summenformel: C₉H₉NO₄

Molare Masse: 195.17 g/mol

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): 2.87 (t, ³J = 7.4 Hz, 2H, *H*-2'), 2.83 (s_{br}, 4H, *H*-2), 2.60 (dt, ³J = 7.5 Hz, ⁴J = 2.6 Hz, 2H, *H*-3'), 2.04 (t appt, ⁴J = 2.7 Hz, 1H, *H*-5') ppm.

7.2.2.2 Synthese von ManNAI 75a



D-Mannosaminhydrochlorid **13** (238 mg, 1.10 mmol, 1.00 Äq.) wurde in trockenem Methanol (12 mL) gelöst. Na₂CO₃ (332 mg, 3.13 mmol, 2.84 Äq.) und 4-Pentinsäure-NHS-Ester **74a** (280 mg, 1.43 mmol, 1.30 Äq.) wurden hinzugegeben und das Reaktionsgemisch 16 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt über Kieselgel (DCM:MeOH = 9:1 → 8:2) gereinigt.

Ausbeute: 243 mg (937 µmol, 85 %) eines farblosen Feststoffs.

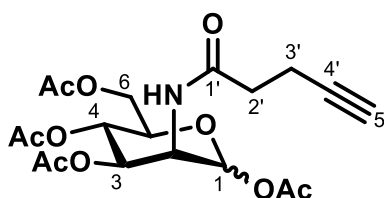
7. Experimentalteil

¹H-NMR des Hauptanomers: (400MHz, MeOD): 5.00 (d, ³J = 1.6 Hz, 1H, H-1), 4.30 (dd, ³J = 4.7 Hz, ³J = 1.6 Hz, 1H, H-2), 4.00 (dd, ³J = 9.7 Hz, ³J = 4.9 Hz, 1H, H-3), 3.87–3.75 (m, 3H, H-5, H-6), 3.58 (dd, ³J = 9.6 Hz, 1H, H-4), 2.49–2.46 (m, 3H, H-2', H-3'), 2.27–2.25 (m, 1H, H-5') ppm.

¹³C-NMR des Hauptanomers: (100MHz, MeOD): 174.71 (C-1'), 95.00 (C-1), 83.70 (C-4'), 73.44 (C-5), 70.62 (C-3), 70.24 (C-5'), 68.48 (C-4), 62.23 (C-6), 55.09 (C-2), 35.88 (C-2'), 15.63 (C-3') ppm.

MS (ESI m/z) berechnet für [M+Cl]⁻ 294.0750, gefunden 294.0758, ($|\Delta m/z| = 2.8$ ppm).

7.2.2.3 Synthese von Ac₄ManNAI 12a



ManNAI **75** (230 mg, 887 μ mol, 1.00 \ddot{A} q.) wurde in Pyridin (3.0 mL) suspendiert und auf 0 °C gekühlt. Essigsäureanhydrid (839 μ L, 8.87 mmol, 10.0 eq.) wurde dem Gemisch hinzugegeben und diese 18 h bei RT gerührt. Das Gemisch wurde mit DCM verdünnt (150 mL) und die organische Phase mit ges. NaHCO₃-Lösung (30 mL) und ges. NaCl (30 mL) gewaschen. Anschließend wurde diese über MgSO₄ getrocknet und das Rohprodukt über Kieselgel (Cy:EE = 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 330 mg (772 μ mol, 87 %) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: C₁₉H₂₅NO₁₀

Molare Masse: 427.41 g/mol

¹H-NMR des Hauptanomers (400MHz, CDCl₃): δ = 6.11 (d, ³J = 9.1 Hz, 1H, NH), 6.04 (d, ³J = 1.8 Hz, 1H, H-1), 5.32 (dd, ³J = 10.2 Hz, ³J = 4.4 Hz, 1H, H-3), 5.22 (dd, ³J = 10.0 Hz, 1H, H-4), 4.67 (ddd, ³J = 9.3 Hz, ³J = 4.4 Hz, ³J = 1.8 Hz, 1H, H-2), 4.29–4.24 (m, 1H, H-6), 4.11–4.01 (m, 2H, H-5, H-6), 2.56–2.45 (m, 2H, H-2', H-3'), 2.17, 2.09, 2.05, 2.00 (s, 12H, 4x CH₃) ppm.

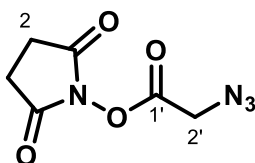
¹³C-NMR des Hauptanomers (100 MHz, CDCl₃): δ = 171.4 (C-1'), 170.7 (CH₃CO₂C-6), 170.2 (CH₃CO₂C-3), 169.8 (CH₃CO₂C-4), 168.3 (CH₃CO₂C-1), 91.8 (C-1), 82.7 (C-4'), 70.7 (C-5'), 70.3 (C-5), 69.0 (C-3), 65.6 (C-4), 62.1 (C-6), 49.4 (C-2), 35.5 (C-2'), 21.0, 20.9, 20.9, 20.8 (4x CH₃), 15.13 (C-3') ppm.

¹H-NMR des Nebenamers (400MHz, CDCl₃): δ = 6.07 (d, ³J = 9.1 Hz, 1H, NH), 5.86 (d, ³J = 1.8 Hz, 1H, H-1), 5.16 (dd, ³J = 9.8 Hz, 1H, H-4), 5.04 (dd, ³J = 10.0 Hz, ³J = 4.0 Hz, 1H, H-3), 4.80 (ddd, ³J = 9.2 Hz, ³J = 4.0 Hz, ³J = 1.7 Hz, 1H, H-2), 4.29–4.24 (m, 1H, H-6), 4.11–4.01 (m, 1H, H-6), 3.80 (ddd, ³J = 9.7 Hz, ³J = 5.1 Hz, ³J = 2.5 Hz, 1H, H-5), 2.56–2.45 (m, 2H, H-2', H-3'), 2.10, 2.10, 2.05, 2.00 (s, 12H, 4x CH₃) ppm.

¹³C-NMR des Nebenamers (100 MHz, CDCl₃): δ = 171.8 (C-1'), 170.7 (CH₃CO₂C-6), 170.3 (CH₃CO₂C-3), 169.8 (CH₃CO₂C-4), 168.5 (CH₃CO₂C-1), 90.7 (C-1), 82.7 (C-4'), 73.6 (C-5), 71.5 (C-3), 70.7 (C-5'), 65.4 (C-4), 62.0 (C-6), 49.6 (C-2), 35.6 (C-2'), 21.0, 20.9, 20.8, 20.8 (4x CH₃), 15.2 (C-3') ppm.

MS (ESI m/z) berechnet für [M+Na]⁺ 450.1371, gemessen 450.1365, (|Δm/z| = 3.9 ppm).

7.2.2.4 Azidoessigsäure-NHS-Ester 74b



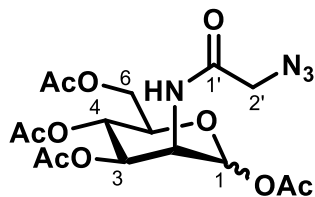
2-Azidoessigsäure (10.4 g, 103 mmol, 1.00 Äq.) und *N*-Hydroxysuccinimid (11.8 g, 102 mmol, 1.00 Äq.) wurden in trockenem THF (80 mL) suspendiert und auf 0 °C gekühlt. Dem Gemisch wurde eine Lösung DCC (21.2 g, 102 mmol, 1.00 Äq.) in trockenem THF (60 mL) zugetropft und die Reaktionslösung 2 h bei 0 °C gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert und mit THF nachgespült. Unter vermindertem Druck wurde die organische Phase auf etwa 200 mL eingeeengt und mit Et₂O (200 mL) versetzt. Die Lösung wurde für 24 h auf 4 °C gekühlt. Anschließend wurde der ausgefallene Feststoff abfiltriert.

Ausbeute: 5.69 g (32.6 mmol, 89 %) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: C₆H₆N₄O₄

Molare Masse: 198.14 g/mol

¹H-NMR (400MHz, DMSO-d₆): 4.71 (s, 2H, H-2'), 2.84 (s, 4H, H-2) ppm.

7.2.2.5 Ac₄ManNAz 12b

D-Mannosaminhydrochlorid **13** (357 mg, 1.66 mmol, 1.00 Äq.) wurde in trockenem Methanol (8.0 mL) gelöst. NaHCO₃ (422 mg, 4.97 mmol, 3.00 Äq.) und 4-Pentinsäure-NHS-Ester **74b** (820 mg, 4.14 mmol, 2.50 Äq.) wurden hinzugegeben und das Reaktionsgemisch 16 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch über Kieselgel (DCM:MeOH = 9:1 → 8:2) gereinigt.

Das noch verunreinigte Produkt wurde in Pyridin (4.00 mL, 49.7 mmol, 30.0 Äq.) und Ac₂O (1.10 mL, 11.6 mmol, 7.00 Äq.) gelöst und das Gemisch für 16 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit DCM (100 mL) verdünnt und mit ges. NH₄Cl-Lösung (25 mL), ges. NaHCO₃-Lösung (25 mL) und mit ges. NaCl-Lösung (25 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Kieselgel (Cy:EE = 2:1 → 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 264 mg (613 µmol, 37 %) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: C₁₆H₂₂N₄O₁₀

Molare Masse: 430.37 g/mol

¹H-NMR des Hauptanomers (400MHz, CDCl₃): δ = 6.64 (d, ³J = 9.0 Hz, 1H, NH), 5.88 (d, ³J = 1.7 Hz, 1H, H-1), 5.34 (dd, ³J = 10.2 Hz, ³J = 4.3 Hz, 1H, H-3), 5.22 (dd, ³J = 10.1 Hz, 1H, H-4), 4.61 (ddd, ³J = 9.3 Hz, ³J = 4.2 Hz, ³J = 2.0 Hz, 1H, H-2), 4.27–4.21 (m, 1H, H-6), 4.11–4.01 (m, 4H, H-5, H-6, H-2'), 2.18, 2.10, 2.05, 2.00 (s, 12H, 4x CH₃) ppm.

¹³C-NMR des Hauptanomers (100 MHz, CDCl₃): δ = 170.6 (CH₃CO₂C-6), 170.2 (CH₃CO₂C-3), 169.7 (CH₃CO₂C-4), 168.2 (CH₃CO₂C-1), 167.4 (C-1'), 91.4 (C-1), 70.4 (C-5), 69.0 (C-3), 65.2 (C-4), 61.9 (C-6), 52.7 (C-2'), 49.8 (C-2), 21.0, 20.9, 20.9, 20.8 (4x OCH₃) ppm.

¹H-NMR des Nebenanomers (400MHz, CDCl₃): δ = 6.57 (d, ³J = 9.3 Hz, 1H, NH), 6.04 (d, ³J = 1.9 Hz, 1H, H-1), 5.16 (dd, ³J = 9.8 Hz, 1H, H-4), 5.05 (dd, ³J = 9.9 Hz, ³J = 3.8 Hz, 1H, H-3), 4.72 (ddd, ³J = 9.0 Hz, ³J = 3.8 Hz, ³J = 1.6 Hz, 1H, H-2), 4.27–4.21 (m, 1H, H-6), 4.11–

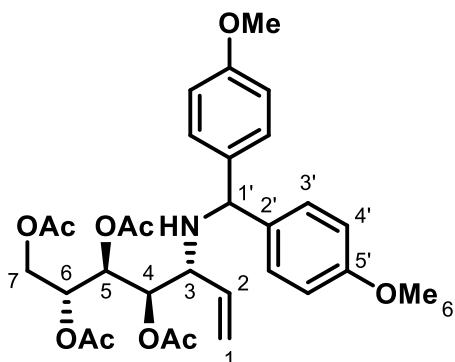
4.01 (m, 1H, *H*-6, *H*-2'), 3.82 (ddd, $^3J = 9.7$ Hz, $^3J = 4.6$ Hz, $^3J = 2.5$ Hz, 1H, *H*-5), 2.11, 2.10, 2.05, 2.00 (s, 12H, 4x *CH*₃) ppm.

¹³C-NMR des Nebenamomers (100 MHz, CDCl₃): δ = 170.6 (CH₃CO₂C-6), 170.3 (CH₃CO₂C-3), 169.7 (CH₃CO₂C-4), 168.5 (CH₃CO₂C-1), 166.8 (C-1'), 90.4 (C-1), 73.6 (C-5), 71.5 (C-3), 65.0 (C-4), 61.8 (C-6), 52.5 (C-2'), 49.4 (C-2), 21.0, 20.9, 20.8, 20.8 (4x OCH₃) ppm.

MS (ESI *m/z*) berechnet für [M+Na]⁺ 453.1234, gemessen 453.1238, (|Δ*m/z*| = 0.9 ppm).

7.2.3 Synthese von Sialinsäure-Derivaten

7.2.3.1 (2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-5-((Bis(4-methoxyphenyl)methyl)amino)hept-6-en-1,2,3,4-tetraacetat **20**



D-arabinose **16** (1.25 g, 8.33 mmol, 1.00 Äq.), 4,4'-Dimethoxybenzhydrolamin **17** (2.43 g, 5.73 mmol, 1.10 Äq.) und Vinylborsäuredibutylester **18** (3.49 mL, 20.0 mmol, 1.90 Äq.) wurden in wässrigen Ethanol (20 mL, EtOH:H₂O = 4:1) und 24 h auf 50 °C erhitzt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch über Kieselgel (DCM:MeOH = 20:1 → 7:1) gereinigt. Der erhaltene Feststoff (2.58 g, 6.39 mmol, 1.00 Äq.) wurde in trockenem Pyridin (12.9 mL, 160 mmol, 25.0 Äq.) und Ac₂O (12.1 mL, 128 mmol, 20.0 Äq.) gelöst und 16 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch über Kieselgel (Cy:EE = 2:1) aufgereinigt. Das Produkt wurde als farbloser, klebriger Feststoff isoliert.

Ausbeute: 2.83 g (4.95 mmol, 59 % über 2 Stufen).

Summenformel: C₃₀H₃₇NO₁₀

Molare Masse: 571.62 g/mol

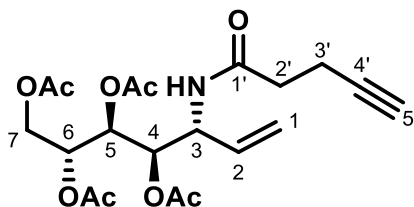
7. Experimentalteil

¹H-NMR (400 MHz, C₆D₆): δ = 7.32–7.38 (m, 4H, *H*-4'), 6.74–6.82 (m, 4 H, *H*-3'), 6.10 (dd, ³*J* = 8.1 Hz, ³*J* = 2.1 Hz, 1H, *H*-5), 5.54 (ddd, ³*J* = 8.1 Hz, ³*J* = 6.4 Hz, ³*J* = 2.9 Hz, 1H, *H*-6), 5.48 (ddd, ³*J*_{trans} = 17.0 Hz, ³*J*_{cis} = 10.1 Hz, ³*J* = 9.1 Hz, 1H, *H*-2), 5.37 (dd, ³*J* = 9.1 Hz, ³*J* = 2.1 Hz, 1H, *H*-4), 5.09 (dd, ³*J* = 10.1 Hz, ²*J* = 1.9 Hz, 1H, *H*-1a), 4.93 (dd, ³*J* = 17.0 Hz, ²*J* = 1.6 Hz, 1H, *H*-1b), 4.81 (s, 1H, *H*-1'), 4.51 (dd, ²*J* = 12.3 Hz, ³*J* = 2.9 Hz, 1H, *H*-7a), 4.20 (dd, ²*J* = 12.3 Hz, ³*J* = 6.4 Hz, 1H, *H*-7b), 3.29 (s, 3H, *H*-6'), 3.31 (s, 3H, *H*-6'), 3.27 (m, 1H, *H*-3), 1.87 (s, 3H, CH₃-6), 1.79 (s, 3H, CH₃-4), 1.73 (s, 3H, CH₃-7), 1.66 (s, 3H, CH₃-5), 1.31 (s, 1H, *NH*) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, C₆D₆): δ = 170.1 (CH₃CO₂C-5), 170.0 (CH₃CO₂C-7), 169.9 (CH₃CO₂C-4), 169.8 (CH₃CO₂C-6), 159.3 (*C*-5'), 137.6 (*C*-2), 137.4 (*C*-2'), 135.5 (*C*-2'), 129.5 (*C*-4'), 128.6 (*C*-4'), 119.3 (*C*-1), 114.3 (*C*-3'), 71.9 (*C*-4), 69.6 (*C*-6), 69.0 (*C*-5), 63.0 (*C*-1'), 62.9 (*C*-7), 59.3 (*C*-3), 54.8 (*C*-6'), 54.8 (*C*-6'), 20.8 (OCH₃-5), 20.8 (OCH₃-6), 20.7 (OCH₃-4), 20.4 (OCH₃-7) ppm.

MS (ESI *m/z*) berechnet für [M+Na]⁺ 594.2310, gefunden 594.2312, ($|\Delta m/z|$ = 0.3 ppm).

7.2.3.2 (2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-5-(Pent-4-inamido)hept-6-ene-1,2,3,4-tetraacetat **22a**



Amin **20** (705 mg, 1.23 mmol, 1.00 Äq.) wurde in einem Gemisch aus DCM/TFA (20 mL, 3:1) bei 0 °C gelöst. Es wurden H₂O (0.5 mL) zugegeben und die Reaktionslösung für 15 min bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und mindestens 1 h an der Hochvakuumpumpe (10⁻² mbar) getrocknet. Der violettfarbene, ölige Rückstand wurde in trockenem DMF (10.0 mL) gelöst und anschließend 4-Pentinsäure (254 mg, 2.59 mmol, 2.10 Äq.) und DIPEA (1.00 mL, 5.74 mmol, 4.65 Äq.) hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde auf 0 °C gekühlt und HATU (985 mg, 2.59 mmol, 2.10 Äq.) portionsweise hinzugegeben. Zuerst wurde die Reaktionslösung 1 h bei 0 °C und dann 2 h bei RT gerührt. Diese wurde mit EE (30 mL) verdünnt und die organische Phase mit ges. NH₄Cl-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit EE extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch über Kieselgel (Cy:EE = 2:1 → 1:1) gereinigt. Ausbeute: 272 mg (639 µmol, 52 %) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: C₂₀H₂₇NO₉

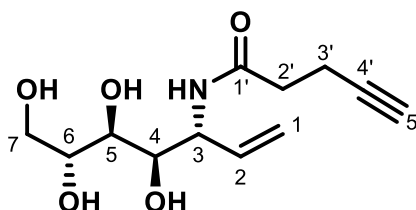
Molare Masse: 425.43 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 5.97 (d, ³J = 9.2 Hz, 1H, NH), 5.71 (ddd, ³J_{trans} = 17.1 Hz, ³J_{cis} = 10.3 Hz, ³J = 6.8 Hz, 1H, H-2), 5.42 (dd, ²J = 8.0 Hz, ³J = 3.2 Hz, 1H, H-5), 5.28 (ddd, ³J_{trans} = 17.1 Hz, ²J = 1.2 Hz, ⁴J = 1.2 Hz, 1H, H-1a), 5.19 (ddd, ³J_{cis} = 10.3 Hz, ²J = 1.1 Hz, ⁴J = 1.1 Hz, 1H, H-1b), 5.19 (dd, ³J = 7.3 Hz, ⁴J = 3.2 Hz, 1H, H-4), 5.10 (ddd, ³J = 8.0 Hz, ³J = 5.7 Hz, ⁴J = 2.9 Hz, 1H, H-6), 4.77–4.71 (m, 1H, H-3), 4.23 (dd, ³J = 12.5 Hz, ³J = 2.9 Hz, 1H, H-7a), 4.04 (dd, ³J = 12.5 Hz, ³J = 5.8 Hz, 1H, H-7b), 2.53–2.48 (m, 2H, H-2'), 2.40–2.36 (m, 2H, H-3'), 2.10, 2.05, 2.04, 2.04 (s, 12H, 4x·CH₃), 2.01 (d, ⁴J = 2.6 Hz, 1H, H-5') ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 170.7 (C-Ester), 170.5 (C-Ester), 170.5 (C-1'), 170.1 (C-Ester), 170.0 (C-Ester), 133.4 (C-2), 118.7 (C-1), 83.2 (C-4'), 71.4 (C-4), 69.7 (C-5'), 68.8 (C-6), 68.5 (C-5), 62.0 (C-7), 51.7 (C-3), 35.5 (C-2'), 21.0, 2x 20.9, 20.8 (4·CH₃), 14.8 (C-3') ppm.

MS (ESI m/z) berechnet für [M+Na]⁺ 448.1578, gefunden 448.1591, (|Δm/z| = 2.9 ppm).

7.2.3.3 N-((3R,4R,5S,6R)-4,5,6,7-Tetrahydroxyhept-1-en-3-yl)pent-4-inamid **23a**



Verbindung **22a** (242 mg, 569 μmol, 1.00 Äq.) wurde in trockenem MeOH (11 mL) gelöst, mit NaOMe-Lösung (1.14 mL, 0.5 m 1.00 Äq.) versetzt und anschließend für 15 min bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit saurem Ionentauscher (Dowex®) neutralisiert, vom Harz abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: 145 mg (564 μmol, quant.) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: C₁₂H₁₉NO₅

Molare Masse: 257.29 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 6.04 (ddd, ³J_{trans} = 17.3 Hz, ³J_{cis} = 10.5 Hz, ³J = 5.6 Hz, 1H, H-2), 5.28 (ddd, ³J_{trans} = 17.3 Hz, ²J = 1.6 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, 1H, H-1), 5.19 (ddd, ³J_{cis} = 10.5 Hz, ²J = 1.5 Hz, ⁴J = 1.5 Hz, 1H, H-1), 4.56–4.52 (m, 1H, H-3), 3.79 (dd, ²J = 11.1 Hz, ³J = 3.4 Hz,

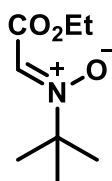
7. Experimentaltteil

^1H , $H-7$), 3.74-3.67 (m, 2H, $H-4$, $H-6$), 3.60 (dd, $^2J = 11.1$ Hz, $^3J = 5.8$ Hz, 1H, $H-7$), 3.56 (dd, $^3J = 8.4$ Hz, $^3J = 1.4$ Hz, 1H, $H-5$), 2.52-2.43 (m, 4H, $H-2'$, $H-3'$), 2.30-2.29 (m, 1H, $H-5'$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, MeOD): $\delta = 174.1$ (C-1'), 137.0 (C-2), 116.7 (C-1), 83.6 (C-4'), 72.5 (C-6), 72.3 (C-4), 71.5 (C-5), 71.5 (C-5'), 65.0 (C-7), 55.1 (C-3), 36.2 (C-2'), 15.7 (C-3') ppm.

MS (ESI m/z) berechnet für $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 280.1155, gefunden 280.1150, ($|\Delta m/z| = 2.0$ ppm).

7.2.3.4 Nitron 24



N-(*tert*-butyl)hydroxylamine Hydrochlorid (2.77 g, 22.1 mmol, 1.00 Äq.) wurden in Toluol (4.5 mL) suspendiert. Ethylglyoxalat (4.50 mL, 50 %ige Lösung in Toluol, 22.1 mmol, 1.00 Äq.) und NaHCO_3 (3.71 g, 44.1 mmol, 2.00 Äq.) wurden hinzugegeben und die Reaktionslösung für 20 h bei RT gerührt. Anschließend wurde der Feststoff von der Lösung abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das verbleibende Öl wurde ohne weitere Reinigung weiterverwendet.

Ausbeute: (3.82 g, 22.1 mmol, quant.) eines farblosen Öls.

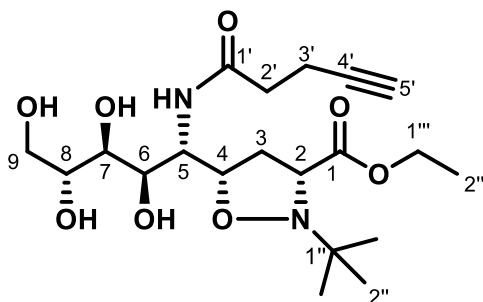
Summenformel: $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{NO}_3$

Molare Masse: 173.21 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.22$ (s, 1H, $\text{N}=\text{CH}$), 4.25 (q, $^3J = 7.1$ Hz, 2H, CH_2), 1.52 (s, 9H, *t*-butyl), 1.30 (t, $^3J = 7.1$ Hz, 3H, CH_3) ppm.

MS (ESI m/z) berechnet für $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 196.09441, gefunden 196.09468, ($|\Delta m/z| = 1.37$ ppm).

7.2.3.5 Ethyl-(3R,5S)-2-(tert-butyl)-5-((1S,2R,3S,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxy-1-(pent-4-inamido)pentyl)isoxazolidin-3-carboxylat **25a**



Olefin **23a** (134 mg, 520 μmol , 1.00 Äq.) und Nitron **24** (180 mg, 1.04 mmol, 2.00 Äq.) wurden in trockenem Dioxan (7.0 mL) gelöst und 2 Wochen bei 30 °C gerührt. Der Reaktionsumsatz wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (DCM:MeOH = 10:1). Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch über Kieselgel (DCM:MeOH = 15:1 \rightarrow 10:1) gereinigt.

Ausbeute: 121 mg (281 μmol , 54 %) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_8$

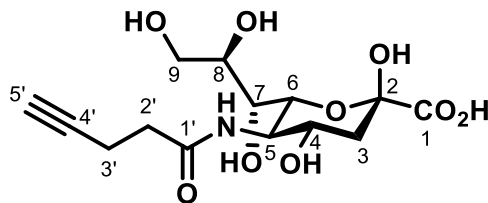
Molare Masse: 430.50 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOD): δ = 4.74 (ddd, $^3J = 8.5$ Hz, $^3J = 6.8$ Hz, $^3J = 1.6$ Hz, 1H, *H*-4), 4.16–4.24 (m, 2H, *H*-1'''), 4.00 (t, $^3J = 8.5$ Hz, 1H, *H*-2), 3.94 (dd, $^3J = 10.3$ Hz, $^3J = 1.6$ Hz, 1H, *H*-5), 3.87 (dd, $^3J = 10.4$ Hz, $^3J = 0.7$ Hz, 1H, *H*-6), 3.80 (dd, $^2J = 11.4$ Hz, $^3J = 3.3$ Hz, 1H, *H*-9), 3.72–3.66 (m, 1H, *H*-8), 3.58 (dd, $^2J = 11.3$ Hz, $^3J = 6.0$ Hz, *H*-9), 3.47 (dd, $^3J = 8.8$ Hz, $^3J = 0.8$ Hz, 1H, *H*-7), 2.69 (ddd, $^2J = 12.3$ Hz, $^3J = 8.3$ Hz, $^3J = 6.8$ Hz, 1H, *H*-3), 2.57–2.53 (m, 1H, *H*-2'), 2.52–2.49 (m, 1H, *H*-3'), 2.28 (t, $^4J = 2.5$ Hz, 1H, *H*-5'), 2.24 (ddd, $^2J = 12.3$ Hz, $^3J = 8.6$ Hz, $^3J = 8.6$ Hz, 1H, *H*-3b), 1.27 (t, $^3J = 7.1$ Hz, 3H, *H*-2'''), 1.14 (s, 9H, *H*-2'') ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, MeOD): δ = 175.7 (C-1'), 174.6 (C-1), 83.6 (C-5'), 77.4 (C-4), 72.2 (C-8), 71.4 (C-7), 70.7 (C-4'), 70.6 (C-6), 65.4 (C-9), 62.5 (C-1'''), 62.2 (C-2), 61.3 (C-1''), 53.8 (C-5), 38.9 (C-3), 36.2 (C-2'), 25.9 (C-2''), 15.7 (C-3'), 14.4 (C-2''') ppm.

MS (ESI *m/z*) berechnet für $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 453.2207, gefunden 453.2213, ($|\Delta m/z| = 1.3$ ppm).

7.2.3.6 SiaNAI 8a



25a (104 mg, 242 μmol , 1.00 Äq.) wurden in trockenem Methanol (5.0 mL) gelöst und mit NaOMe (530 μL , 0.5 M, 266 μmol , 1.10 Äq.) versetzt. Das Gemisch wurde 16 h bei RT gerührt. Anschließend wurden Wasser (10 mL) und wässrige NaOH (3.0 mL, 0.1 M) hinzugegeben und das Gemisch weitere 24 h bei RT gerührt. Die Lösung wurde mit saurem Ionentauscher (Dowex®) neutralisiert und die Lösung abfiltriert. Das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch über RP-18 (H_2O mit 0.1 % TFA) gereinigt.

Ausbeute: 69.1 mg (199 μmol , 82 %) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{NO}_9$

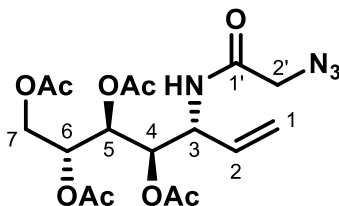
Molare Masse: 347.32 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOD): δ = 4.06–4.01 (m, 1H, *H*-4), 4.01–3.98 (m, 1H, *H*-6), 3.90 (t, 3J = 10.3 Hz, 3J = 10.3 Hz, 1H, *H*-5), 3.79 (dd, 2J = 11.2 Hz, 3J = 6.2 Hz, 1H, *H*-9a), 3.66 (m, 1H, *H*-8), 3.57 (dd, 2J = 11.2 Hz, 3J = 2.8 Hz, 1H, *H*-9b), 3.52 (d, 3J = 9.24 Hz, 1H, *H*-7), 2.51–2.44 (m, 4H, *H*-2', *H*-3'), 2.30 (m, 1H, *H*-5'), 2.11 (dd, 2J = 12.7 Hz, 3J = 4.8 Hz, 1H, *H*-3), 1.86 (t, 2J = 12.7 Hz, 1H, *H*-3) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, MeOD): δ = 177.4 (*C*-1), 175.2 (*C*-1'), 97.6 (*C*-2), 83.7 (*C*-4'), 72.1 (*C*-8), 71.9 (*C*-4), 70.6 (*C*-5'), 70.6 (*C*-7), 68.7 (*C*-6), 65.2 (*C*-9), 54.2 (*C*-5), 41.8 (*C*-3), 36.2 (*C*-2'), 15.7 (*C*-3') ppm.

MS (ESI *m/z*) berechnet für $[\text{M-H}]^-$ 346.1144, gefunden 346.1140, ($|\Delta m/z|$ = 1.1 ppm).

7.2.3.7 (2R,3S,4R,5R)-5-(2-Azidoacetamido)hept-6-ene-1,2,3,4-tetraacetate 22b



Amin **20** (368 mg, 644 μmol , 1.00 Äq.) wurde in einem Gemisch aus DCM/TFA (20 mL, 3:1) bei 0 °C gelöst. Anschließend wurde H₂O (0.5 mL) zugegeben und das Gemisch 15 min bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mindestens 1 h unter vermindertem Druck getrocknet. Das violettfarbene Öl wurde mit Azidoessigsäure (137 mg, 1.35 mmol, 2.10 Äq.) und DIPEA (505 μL , 2.90 mmol, 4.50 Äq.) in trockenem DMF (3 mL) versetzt. Anschließend wurde HATU (514 mg, 1.35 mmol, 2.10 Äq.) bei 0 °C zugegeben und das Reaktionsgemisch zuerst 1 h bei 0 °C und dann 2 h bei RT gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Gemisch mit EE (30 mL) verdünnt und mit ges. NH₄Cl-Lösung (20 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurde anschließend mit EE reextrahiert (2 x 30 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch über Kieselgel (Cy:EE = 2:1 → 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 201 mg (469 μmol , 73 %) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: C₁₇H₂₄N₄O₉

Molare Masse: 428.40 g/mol

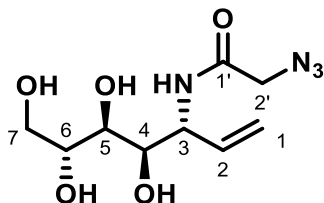
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 6.58 (d, ³J = 9.5 Hz, 1H, NH), 5.70 (ddd, ³J_{trans} = 17.1 Hz, ³J_{cis} = 10.2 Hz, ³J = 7.1 Hz, 1H, H-2), 5.42 (dd, ²J = 8.5 Hz, ³J = 2.9 Hz, 1H, H-5), 5.29–5.20 (m, 3H, H-1a, H-1b, H-4), 5.11 (ddd, ³J = 8.4 Hz, ³J = 5.4 Hz, ⁴J = 2.9 Hz, 1H, H-6), 4.75–4.69 (m, 1H, H-3), 4.22 (dd, ³J = 12.5 Hz, ³J = 2.8 Hz, 1H, H-7a), 4.04 (dd, ³J = 12.5 Hz, ³J = 5.4 Hz, 1H, H-7b), 3.98 (d, ²J = 16.6 Hz, 1H, H-2'a), 3.92 (d, ²J = 16.5 Hz, 1H, H-2'b), 2.11, 2.06, 2.05, 2.03 (s, 12H, 4x CH₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 170.8 (C-Ester), 170.5 (C-Ester), 170.0 (2-C-Ester), 166.3 (C-1'), 133.0 (C-2), 119.1 (C-1), 70.9 (C-4), 68.5 (C-6), 68.2 (C-5), 61.9 (C-7), 52.8 (C-2'), 51.6 (C-3), 21.0, 20.9, 20.9, 20.8 (4·CH₃) ppm.

MS (ESI m/z) berechnet für [M+Na]⁺ 451.1441, gefunden 451.1423, ($|\Delta m/z|$ = 1.7 ppm).

7. Experimentalteil

7.2.3.8 2-Azido-N-((3R,4R,5S,6R)-4,5,6,7-tetrahydroxyhept-1-en-3-yl)acetamid 23b



Verbindung **22b** (233 mg, 544 μmol , 1.00 Äq.) wurde in trockenem MeOH (11 mL) gelöst, mit NaOMe-Lösung (1.10 mL, 0.5 M 1.01 Äq.) versetzt und anschließend für 15 min bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit saurem Ionentauscher (Dowex®) neutralisiert, vom Harz abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: 141 mg (542 μmol , quant.) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_5$

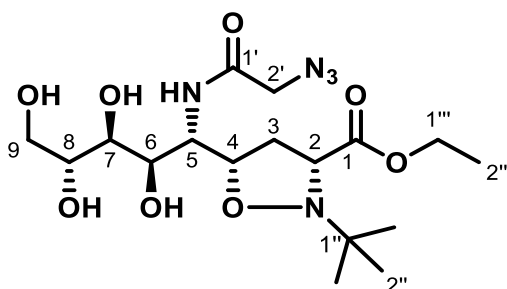
Molare Masse: 260.25 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOD): δ = 5.99 (ddd, $^3J_{\text{trans}} = 17.3$ Hz, $^3J_{\text{cis}} = 10.5$ Hz, $^3J = 5.6$ Hz, 1H, *H*-2), 5.26–5.19 (m, 2H, *H*-1), 4.61 (ddd, $^3J = 7.3$ Hz, $^3J = 5.6$ Hz, $^4J = 1.6$ Hz, 1H, *H*-3), 3.97 (s, 2H, *H*-2'), 3.84 (dd, $^3J = 7.3$ Hz, $^3J = 1.4$ Hz, 1H, *H*-4), 3.78 (dd, $^2J = 11.0$ Hz, $^3J = 3.4$ Hz, 1H, *H*-7a), 3.70 (ddd, $^3J = 8.4$ Hz, $^3J = 5.6$ Hz, $^3J = 3.35$ Hz, 1H, *H*-6), 3.62 (dd, $^2J = 11.0$ Hz, $^3J = 5.6$ Hz, 1H, *H*-7b), 3.57 (dd, $^3J = 8.3$ Hz, $^3J = 1.4$ Hz, 1H, *H*-5) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, MeOD): δ = 170.0 (C-1'), 136.5 (C-2), 116.7 (C-1), 72.6 (C-6), 71.7 (C-5), 71.5 (C-4), 64.9 (C-7), 56.0 (C-3), 53.1 (C-2') ppm.

MS (ESI m/z) berechnet für $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 283.1013, gefunden 283.1012, ($|\Delta m/z| = 2.8$ ppm).

7.2.3.9 Ethyl-(3R,5S)-5-((1S,2R,3S,4R)-1-(2-azidoacetamido)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)-2-(tert-butyl)isoxazolidine-3-carboxylat 25b



Olefin **23b** (141 mg, 542 μmol , 1.00 Äq.) und Nitron 24 (210 mg, 1.21 mmol, 2.2 Äq.) wurden in trockenem Dioxan (5 mL) gelöst und 4 Wochen bei 30 °C erhitzt. Der Reaktionsverlauf wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (DCM:MeOH = 10:1). Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (DCM:MeOH = 15:1 \rightarrow 10:1) gereingt.

Ausbeute: 161.3 mg (372 μmol , 69 %) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: $\text{C}_{17}\text{H}_{31}\text{N}_5\text{O}_8$

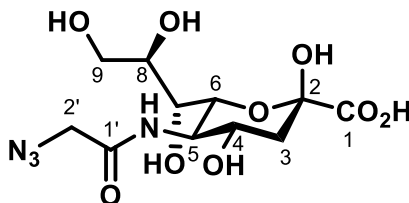
Molare Masse: 433.46 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOD): δ = 4.77–4.73 (m, 1H, $H-2$), 4.23–4.15 (m, 2H, $H-1'''$), 4.05 (s, 2H, $H-2'$), 4.00–3.89 (m, 3H, $H-4$, $H-5$, $H-6$), 3.81–3.77 (m, 1H, $H-9a$), 3.71–3.67 (m, 1H, $H-8$), 3.64–3.59 (m, 1H, $H-9b$), 3.41 (dd, $^3J = 8.7$ Hz, $^3J = 0.8$ Hz, 1H, $H-7$), 2.79–2.72 (m, 1H, $H-3a$), 2.24–2.17 (m, 1H, $H-3b$), 1.30 (s, 9H, $H-2''$), 1.26 (t, $^3J = 7.1$ Hz, 2H, $H-2'''$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, MeOD): δ = 174.3 ($C-1$), 171.8 ($C-1'$), 77.0 ($C-2$), 72.2 ($C-8$), 71.3 ($C-7$), 70.5 ($C-6$), 65.2 ($C-9$), 62.5 ($C-1'''$), 62.1 ($C-4$), 61.0 ($C-1''$), 54.7 ($C-5$), 53.1 ($C-2'$), 39.1 ($C-3$), 25.9 ($C-2''$), 14.4 ($C-2'''$) ppm.

MS (ESI m/z) berechnet für $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 456.2065, gefunden 456.2057, ($|\Delta m/z| = 2.8$ ppm).

7.2.3.10 SiaNAz 8b



25b (141 mg, 325 μmol , 1.00 Äq.) wurde in trockenem MeOH (2.8 mL) gelöst und mit NaOMe-Lösung (715 μL , 0.5 M, 358 μmol , 1.10 Äq.) versetzt. Das Gemisch wurde für 16 h bei RT gerührt und anschließend zuerst H_2O (3 mL) und dann wässriger NaOH (3 mL, 0.1 M) hinzugegeben und weitere 24 h bei RT gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde die Lösung mit saurem Ionentauscher (Dowex®) neutralisiert, vom Harz abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über RP18 (H_2O mit 0.1 % TFA) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 87.5 mg (250 μmol , 77 %)

Summenformel: $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_9$

Molare Masse: 350.28 g/mol

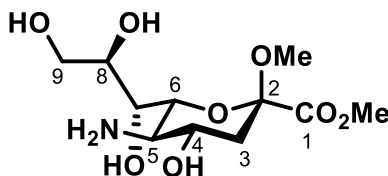
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOD): δ = 4.13–4.07 (m, 2H, *H*-4, *H*-6), 4.02–3.94 (m, 3H, *H*-5, *H*-2'), 3.83–3.79 (m, 1H, *H*-9a), 3.74–3.70 (m, 1H, *H*-7), 3.66–3.61 (m, 1H, *H*-9b), 3.54–3.52 (m, 1H, *H*-8), 2.25 (dd, 3J = 12.7 Hz, 3J = 4.7 Hz, 1H, *H*-3a), 1.84 (dd, 3J = 12.1 Hz, 1H, *H*-3b) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, MeOD): δ = 173.5 (*C*-1), 171.6 (*C*-1'), 96.6 (*C*-2), 71.9 (*C*-7), 71.8 (*C*-6), 70.1 (*C*-8), 67.8 (*C*-4), 64.8 (*C*-9), 54.2 (*C*-5), 52.9 (*C*-2'), 41.0 (*C*-3) ppm.

MS (ESI *m/z*) berechnet für $[\text{M-H}]^-$ 349.1001, gefunden 349.0988, ($|\Delta m/z|$ = 3.9 ppm).

7.2.4 Alternative durchgeführte Synthese von SiaNAz 8b

7.2.4.1 Methyl-(2S,4S,5R,6R)-5-amino-4-hydroxy-2-methoxy-6-((1R,2R)-1,2,3-trihydroxypropyl)tetrahydro-2H-pyran-2-carboxylate 76



Sialinsäure (1.00 g, 3.23 mmol, 1.00 Äq.) wurde mit HCl (25.0 mL, 3 M in MeOH, 23.2 Äq.) versetzt und 18 h auf 80 °C erhitzt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt (flüssigen Stickstoff und Kühlfalle verwenden!). Der schwarze Rückstand wurde säulenchromatographisch über Kieselgel (CHCl₃:MeOH:H₂O = 6:4:1) gereinigt und das Produkt als gelbfarbener, klebriger Feststoff erhalten.

Ausbeute: 878 mg (2.97 mmol, 92 %) eines klebrigen Feststoffs.

Summenformel: C₁₁H₂₁NO₈

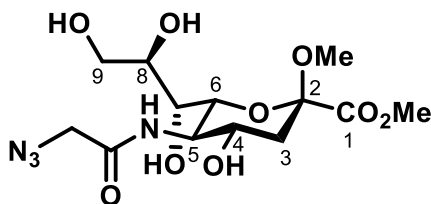
Molare Masse: 295.29 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 4.02 (dd, ³J = 10.4 Hz, ³J = 1.5 Hz, 1H, H-6), 3.98–3.94 (m, 1H, H-4), 3.86–3.80 (m, 5H, H-8, H-9, COOCH₃), 3.72 (dd, ³J = 12.1 Hz, ³J = 5.9 Hz, 1H, H-9), 3.67 (dd, ³J = 10.4 Hz, ³J = 1.5 Hz, 1H, H-7), 3.28 (s, 3H, COCH₃), 3.09 (dd, ³J = 10.2 Hz, 1H, H-5), 2.36 (dd, ³J = 12.9 Hz, ³J = 5.0 Hz, 1H, H-3), 1.64 (dd, ³J = 13.0 Hz, ³J = 11.2 Hz, 1H, H-3) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD): δ = 171.1 (C-1), 100.5 (C-2), 71.6 (C-7), 71.5 (C-9), 69.8 (C-8), 67.1 (C-5), 65.0 (C-10), 54.3 (C-6), 53.5 (C-3), 51.9 (C-1'), 41.5 (C-4) ppm.

MS (ESI m/z) berechnet für [M+Na]⁺ 318.1159, gefunden 318.1162, (|Δm/z| = 0.8 ppm).

7.2.4.2 Methyl-(2S,4S,5R,6R)-5-(2-azidoacetamido)-4-hydroxy-2-methoxy-6-((1R,2R)-1,2,3-trihydroxypropyl)tetrahydro-2H-pyran-2-carboxylat **77**



Amin **76** (471 mg, 1.42 mmol, 1.00 Äq.) wurden in trockenem MeOH (10 mL) vorgelegt und Azidoessigsäure-NHS-ester **74b** (717 mg, 3.62 mmol, 2.55 Äq.) und Na₂CO₃ (272 mg, 2.57 mmol, 1.81 Äq.) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 20 h auf 80 °C erhitzt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch über Kieselgel (DCM:MeOH = 10:1 → 5:1) gereinigt.

Ausbeute: 216 mg (571 µmol, 40 %) als gelbfarbener Feststoff.

Summenformel: C₁₃H₂₂N₄O₉

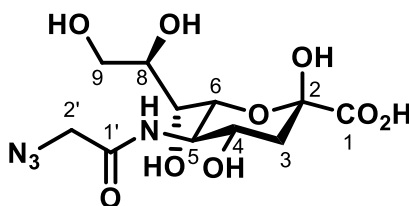
Molare Masse: 378.34 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 4.08–4.02 m, 1H, *H*-4), 3.97–3.88 (m, 4H, *H*-5, *H*-6, *H*-2'), 3.83–3.78 (m, 5H, *H*-8, *H*-9, COOCH₃), 3.68–3.63 (m, 1H, *H*-9), 3.51–3.48 (m, 1H, *H*-7), 3.27 (s, 3H, COCH₃), 2.35 (dd, ³*J* = 12.9 Hz, ³*J* = 5.0 Hz, 1H, *H*-3), 1.65 (dd, ³*J* = 12.9 Hz, ³*J* = 11.2 Hz, 1H, *H*-3) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD): δ = 171.4 (*C*-1''), 171.1 (*C*-2), 100.4 (*C*-3), 71.9 (*C*-7), 71.5 (*C*-9), 70.0 (*C*-8), 67.6 (*C*-5), 65.2 (*C*-10), 53.7 (*C*-6), 53.2 (*C*-1), 52.9 (*C*-2''), 51.6 (*C*-1'), 41.5 (*C*-4) ppm.

MS (ESI *m/z*) berechnet für [M+Na]⁺ 401.1279, gefunden 401.1265, (|Δ*m/z*| = 3.4 ppm).

7.2.4.3 SiaNAz 8b



77 (378 mg, 1.02 mmol, 1.00 Äq.) wurde in H₂O (10 mL) gelöst und HCl (1.0 mL, 0.5 M, 0.49 Äq.) zugegeben und die Reaktionslösung für 18 h auf 75 °C erhitzt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch über RP18 (H₂O mit 0.1 % TFA) gereinigt.

Ausbeute: 216 mg (617 µmol, 60 %)

Summenformel: C₁₁H₁₈N₄O₉

Molare Masse: 350.28 g/mol

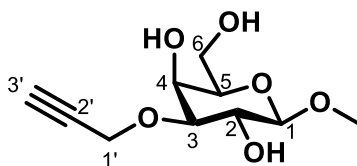
¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 4.13–4.07 (m, 2H, *H*-4, *H*-6), 4.02–3.94 (m, 3H, *H*-5, *H*-2'), 3.83–3.79 (m, 1H, *H*-9a), 3.74–3.70 (m, 1H, *H*-7), 3.66–3.61 (m, 1H, *H*-9b), 3.54–3.52 (m, 1H, *H*-8), 2.25 (dd, ³*J* = 12.7 Hz, ³*J* = 4.7 Hz, 1H, *H*-3a), 1.84 (dd, ³*J* = 12.1 Hz, 1H, *H*-3b) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD): δ = 173.5 (*C*-1), 171.6 (*C*-1'), 96.6 (*C*-2), 71.9 (*C*-7), 71.8 (*C*-6), 70.1 (*C*-8), 67.8 (*C*-4), 64.8 (*C*-9), 54.2 (*C*-5), 52.9 (*C*-2'), 41.0 (*C*-3) ppm.

MS (ESI *m/z*) berechnet für [M-H]⁻ 349.1001, gefunden 349.0988, (|Δ*m/z*| = 3.9 ppm).

7.2.5 Synthese des LacNAc-Derivats 5

7.2.5.1 1-O-Methyl-3-O-propargyl-β-D-galactopyranosid 27



1-O-Methyl-β-D-galactopyranosid **26** (5.64 g, 29.0 mmol, 1.00 Äq.) und Dibutylzinnoxid (9.40 g, 37.8 mmol, 1.30 Äq.) wurden in trockenem MeOH (60 mL) suspendiert und 4 h auf 85 °C erhitzt. Das Lösungsmittel der gelben, klaren Reaktionslösung wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand 30 min im Hochvakuum getrocknet. Anschließend wurde der getrocknete Feststoff in trockenem DMF (50 mL) suspendiert und Propargylbromid (6.47 mL, 80 %ige Lösung in Toluol, 58.1 mmol, 2.00 Äq.) zugegeben und das Reaktionsgemisch 3 d auf 42 °C erhitzt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch über Kieselgel (DCM:MeOH = 10:1) gereinigt.

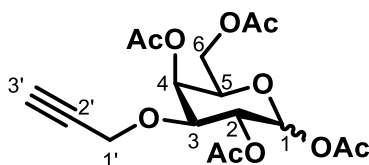
Ausbeute: 4.72 g (20.3 mmol, 70 %) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: C₁₀H₁₆O₆

Molare Masse: 232.23 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, Aceton-d₆): δ = 4.40 (dd, ²J = 15.8 Hz, ⁴J = 2.5 Hz, 1H, H-1'a), 4.35 (dd, ²J = 15.8 Hz, ⁴J = 2.5 Hz, 1H, H-1'b), 4.15 (d, ³J = 7.7 Hz, 1H, H-1), 4.11–4.07 (m, 2H, OH-2, OH-4), 3.80–3.72 (m, 3H, H-4, H-6a, H-6b), 3.65–3.59 (m, 2H, H-2, OH-6), 3.53–3.46 (m, 2H, H-3, H-5), 3.43 (s, 3H, OCH₃), 2.93 (t, ⁴J = 2.5 Hz, 1H, H-3').

7.2.5.2 1,2,4,6-Tetra-O-acetyl-3-O-propargyl-β-D-galactopyranosid 80



27 (4.72 g, 20.3 mmol, 1.00 Äq.) wurden in Essigsäureanhydrid (77.0 mL, 813 mmol, 40.0 Äq.) gelöst und H₂SO₄ (217 μL, 4.06 mmol, 0.20 Äq.) zugegeben und das Reaktionsgemisch 17 h bei RT gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde die Lösung unter vermindertem Druck eingengt und anschließend zuerst mit Wasser (40 mL) und dann mit ges. NaHCO₃-Lösung

(40 mL) versetzt. Die Lösung wurde mit DCM (100 mL) verdünnt und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde DCM extrahiert (2x 50 mL) und die vereinten, organischen Phasen mit 20 mL ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch über Kieselgel (DCM:MeOH = 10:1) gereinigt.

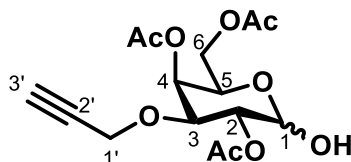
Ausbeute: 6.67 g (17.3 mmol, 85 %) eines farblosen Öls, als anomeres Gemisch $\alpha:\beta = 3.3:1$.

Summenformel: C₁₇H₂₂O₁₀

Molare Masse: 386.35 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 6.34$ (d, ³J = 3.7 Hz, 1H, H-1 α), 5.69 (d, ³J = 8.4 Hz, 1H, H-1 β), 5.51 (dd, ³J = 3.4 Hz, 1H, H-4 α), 5.42 (dd, ³J = 3.5 Hz, ³J = 1.1 Hz, 1H, H-4 β), 5.21 (dd, ³J = 10.4 Hz, ³J = 3.7 Hz, 1H, H-2 α), 5.19 (dd, ³J = 10.0 Hz, ³J = 8.4 Hz, 1H, H-2 β), 4.29–4.27 (m, 1H, H-5 α), 4.26–4.16 (m, 5H, H-1' α , H-1' β , H-6 β), 4.15–4.04 (m, 4H, H-6 α , H-3 α), 3.99–3.97 (m, 1H, H-5 β), 3.89 (dd, ³J = 10.0 Hz, ³J = 3.5 Hz, 1H, H-3 β), 2.47–2.44 (m, 2H, H-3' α , H-3' β), 2.16 (α), 2.15 (α,β), 2.12 (β), 2.08 (β), 2.06 (α,β), 2.05 (α) (s, 24H, 4x C(O)CH₃ α , 4x C(O)CH₃ β) ppm.

7.2.5.3 2,4,6-Tri-O-acetyl-3-O-propargyl-D-galactopyranosid 28



80 (6.67 g, 17.3 mmol, 1.00 Äq.) wurden in trockenem DCM (50 mL) gelöst, *N,N'*-Dimethyl-1,3-propandiamin (10.8 mL, 86.3 mmol, 4.99 Äq.) zugegeben und das Reaktionsgemisch für 1.5 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit DCM (100 mL) verdünnt und die organische Phase mit wässriger HCl (2x 30 mL, 1.0 M), mit ges. NaHCO₃-Lösung (30 mL) und schließlich mit ges. NaCl-Lösung (30 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: 3.10 g (9.00 mmol, 52 %) eines klebrigen Feststoffs, als anomeres Gemisch $\alpha:\beta = 2.4:1$.

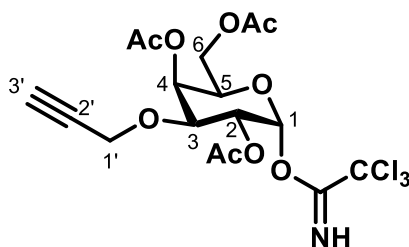
Summenformel: C₁₅H₂₀O₉

Molare Masse: 344.32 g/mol

7. Experimentalteil

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 5.52–5.45 (m, 2H, *H*-1 α , *H*-4 α), 5.41 (dd, ³*J* = 3.5 Hz, ³*J* = 1.0 Hz, 1H, *H*-4 β), 5.07 (dd, ³*J* = 10.4 Hz, ³*J* = 3.6 Hz, 1H, *H*-2 α), 4.92 (dd, ³*J* = 10.0 Hz, ³*J* = 8.1 Hz, 1H, *H*-2 β), 4.65 (d, ³*J* = 8.1 Hz, 1H, 1H, *H*-1 β), 4.42–4.39 (m, 1H, *H*-5 α), 4.32–4.20 (m, 4H, *H*-1' α , *H*-1' β), 4.18–4.09 (m, 4H, *H*-3 α , *H*-6 α , *H*-6 β , *H*-6 β), 4.08–4.04 (m, 1H, *H*-6 α), 3.90–3.88 (m, 1H, *H*-5 β), 3.85 (dd, ³*J* = 10.0 Hz, ³*J* = 3.5 Hz, 1H, *H*-3 β), 2.46–2.44 (m, 2H, *H*-3' α , β), 2.14 (β), 2.14 (β), 2.13 (α), 2.13 (α), 2.06 (α , β), (s, 18H, 3 x C(O)CH₃ α , 3 x C(O)CH₃ β) ppm.

7.2.5.4 2,4,6-Tri-*O*-acetyl-1-*O*-trichloracetimido-3-*O*-propargyl- α -D-galactopyranosid 29



28 (3.09 g, 8.97 mmol, 1.00 Äq.) wurde in trockenem DCM (60 mL) und Trichloracetonitril (18.0 mL, 179 mmol, 20.0 Äq.) gelöst. DBU (1.37 mL, 8.97 mmol, 1.00 Äq.) wurde der Lösung zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 2 h bei RT gerührt und anschließend das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Kieselgel (Cy:EE = 10:1 → 2:1) gereinigt.

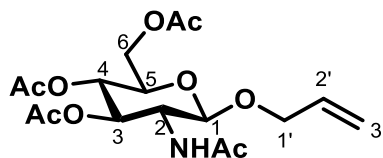
Ausbeute: 3.10 g (9.00 mmol, 52 %) eines gelb farbenen Öls.

Summenformel: C₁₇H₂₀Cl₃NO₉

Molare Masse: 488.70 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.64 (s, 1H, NH), 6.57 (d, ³*J* = 3.6 Hz, 1H, *H*-1), 5.56 (dd, ³*J* = 3.4 Hz, ³*J* = 1.4 Hz, 1H, *H*-4), 5.26 (dd, ³*J* = 10.4 Hz, ³*J* = 3.6 Hz, 1H, *H*-2), 4.40–4.37 (m, 1H, *H*-5), 4.28–4.24 (m, 3H, *H*-1', *H*-3), 4.20 (dd, ²*J* = 11.5 Hz, ³*J* = 6.2 Hz, 1H, *H*-6), 4.06 (dd, ²*J* = 11.5 Hz, ³*J* = 7.0 Hz, 1H, *H*-6), 2.44 (dd, ⁴*J* = 2.4 Hz, 1H, *H*-3'), 2.16, 2.05, 2.04 (s, 9H, 3x C(O)CH₃) ppm.

7.2.5.5 2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-1-O-allyl-2-deoxy-β-D-glucopyranosid 78



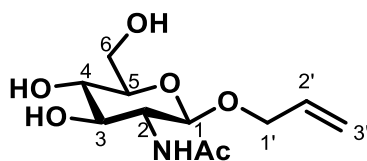
1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-β-D-N-acetylglucosamin **30** (10.0 g, 25.7 mmol, 1.00 Äq.) wurde in trockenem DCM (120 mL) gelöst und TMSOTf (6.0 mL, 33.2 mmol, 1.29 Äq.) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 3 d auf 45 °C erhitzt. Anschließend wurde Allylalkohol (5.21 mL, 77.1 mmol, 3.00 Äq.) zugegeben und das rotfarbene Gemisch weitere 4.5 h auf 45 °C erhitzt. Nach beendeter Reaktion wurde unter Kühlung NEt_3 (5.5 mL) zugegeben, anschließend das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch über Kieselgel (Cy:EE = 4:1 → 1:4) gereinigt.

Ausbeute: 4.93 g (12.7 mmol, 50 %) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{NO}_9$

Molare Masse: 387.39 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 5.91–5.81 (m, 1H, $H\text{-}2'$), 5.46 (d, $^3J = 8.8$ Hz, 1H, NH), 5.32–5.29 (m, 1H, $H\text{-}3$), 5.29–5.24 (m, 1H, $H\text{-}3'_{\text{trans}}$), 5.22–5.18 (m, 1H, $H\text{-}3'_{\text{cis}}$), 5.08 (dd, $^3J = 9.8$ Hz, $^3J = 9.2$ Hz, 1H, $H\text{-}4$), 4.71 (d, $^3J = 9.8$ Hz, 1H, $H\text{-}1$), 4.34 (ddd, $^2J = 12.8$ Hz, $^3J = 5.0$ Hz, $^4J = 1.3$ Hz, 1H, $H\text{-}1'$), 4.26 (dd, $^2J = 12.4$ Hz, $^3J = 4.8$ Hz, 1H, $H\text{-}6$), 4.14 (dd, $^2J = 12.4$ Hz, $^3J = 4.8$ Hz, 1H, $H\text{-}6$), 4.09 (dd, $^2J = 12.9$ Hz, $^3J = 5.0$ Hz, $^4J = 1.3$ Hz, 1H, $H\text{-}1'$), 3.90–3.83 (m, 1H, $H\text{-}2$), 3.72–3.66 (m, 1H, $H\text{-}5$), 2.08, 2.03, 2.02, 1.95 (s, 4x 3H, 4x OCH_3) ppm.

7.2.5.6 2-Acetamido-1-O-allyl-2-deoxy- β -D-glucopyranosid **31**

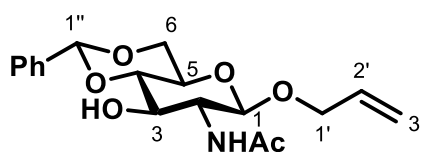
78 (4.93 g, 12.7 mmol, 1.00 Äq.) wurde in trockenem MeOH (30 mL) gelöst, mit NaOMe-Lösung (25.5 mL, 0.5 M, 12.7 mmol, 1.00 Äq.) versetzt und das Reaktionsgemisch 20 min bei RT gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Gemisch mit saurem Ionentauscher (Dowex®) neutralisiert und vom Harz abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: 3.33 g (12.7 mmol, quant.) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: $C_{11}H_{19}NO_6$

Molare Masse: 261.27 g/mol

1H -NMR (400 MHz, MeOD): δ = 5.94–5.84 (m, 1H, $H-2'$), 5.27 (ddd, $^2J = 1.8$ Hz, $^3J_{trans} = 17.1$ Hz, $^4J = 1.6$ Hz, 1H, $H-3'_{trans}$), 5.13 (ddd, $^2J = 1.8$ Hz, $^3J_{cis} = 10.5$ Hz, $^4J = 1.6$ Hz, 1H, $H-3'_{cis}$), 4.43 (d, $^3J = 8.4$ Hz, 1H, $H-1$), 4.34 (ddd, $^2J = 13.3$ Hz, $^3J = 4.9$ Hz, $^4J = 1.6$ Hz, 1H, $H-1'$), 4.07 (ddd, $^2J = 13.3$ Hz, $^3J = 5.8$ Hz, $^4J = 1.6$ Hz, 1H, $H-1'$), 3.88 (dd, $^2J = 12.0$ Hz, $^3J = 2.3$ Hz, 1H, $H-6$), 3.70–3.65 (m, 2H, $H-6$, $H-2$), 3.47–3.43 (m, 1H, $H-3$), 3.34–3.31 (m, 1H, $H-4$), 3.28–3.23 (m, 1H, $H-5$), 1.97 (s, 3H, $C(O)CH_3$) ppm.

7.2.5.7 2-Acetamido-1-O-allyl-4,6-benzyliden-2-deoxy- β -D-glucopyranosid **32**

31 (3.33 g, 12.8 mmol, 1.00 Äq.) wurde in trockenem MeCN (50 mL) suspendiert, Benzaldehyddimethylacetal (5.00 mL, 33.3 mmol, 2.60 Äq.) sowie Camphersulfonsäure (148 mg, 637 μ mol, 0.05 Äq.) zugegeben und das Reaktionsgemisch 3 d bei RT gerührt. Dem Gemisch wurden NEt_3 (3 mL) zugegeben und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Kieselgel (DCM:MeOH = 20:1) gereinigt.

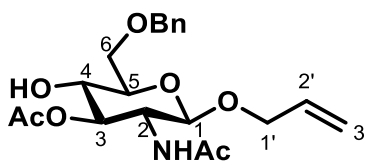
Ausbeute: 3.03 g (8.67 mmol, 68 %) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: $C_{18}H_{23}NO_6$

Molare Masse: 349.38 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 7.52–7.48 (m, 2H, H_{arom}), 7.36–7.31 (m, 3H, H_{arom}), 5.93–5.83 (m, 1H, $H-2'$), 5.60 (s, 1H, $H-1''$), 5.28 (ddd, $^2J = 1.8$ Hz, $^3J_{\text{trans}} = 17.4$ Hz, $^4J = 1.6$ Hz, 1H, $H-3'_{\text{trans}}$), 5.15 (ddd, $^2J = 1.8$ Hz, $^3J_{\text{cis}} = 10.5$ Hz, $^4J = 1.5$ Hz, 1H, $H-3'_{\text{cis}}$), 4.58–4.55 (m, 1H, $H-1$), 4.32–4.26 (m, 2H, $H-1'$, $H-6$), 4.07 (ddd, $^2J = 13.3$ Hz, $^3J = 5.7$ Hz, $^4J = 1.6$ Hz, 1H, $H-1'$), 3.84–3.73 (m, 3H, $H-2$, $H-4$, $H-6$), 3.56–3.51 (m, 1H, $H-3$), 3.46–3.40 (m, 1H, $H-5$), 1.98 (s, 3H, C(O)CH₃) ppm.

7.2.5.8 2-Acetamido-3-O-acetyl-1-O-allyl-6-O-benzyl-2-deoxy- β -D-glucopyranosid **33**



32 (2.93 g, 8.38 mmol, 1.00 Äq.) wurden mit Pyridin (35 mL) und Essigsäureanhydrid (8.20 mL, 8.65 mmol, 10.0 Äq.) für 2 d bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde mit Toluol koevaporiert und der farblose Rückstand in trockenem DCM gelöst (35 mL) und auf 0 °C gekühlt. Zuerst wurde TFAA (1.16 mL, 8.38 mmol, 1.00 Äq.) und anschließend Et₃SiH (8.03 mL, 50.3 mmol, 6.00 Äq.) zugegeben. Zuletzt wurde in einem Zeitraum von 10 min mit TFA (3.21 mL, 41.9 mmol, 5.00 Äq.) zugetropft und die Reaktionslösung zuerst 2 h bei 0 °C und dann 3 h bei RT gerührt. Nach beendeter Reaktion wurden NEt₃ (10 mL) zugegeben und mit DCM (150 mL) verdünnt. Die organische Phase wurde mit ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Kieselgel (DCM:MeOH = 30:1 → 20:1) gereinigt.

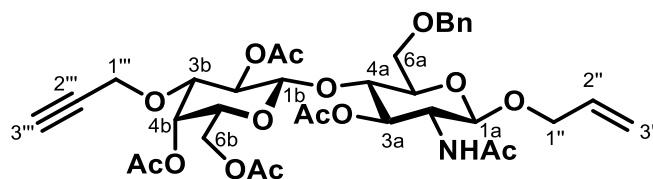
Ausbeute: 2.64 g (6.70 mmol, 80 %) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: C₂₀H₂₇NO₇

Molare Masse: 393.44 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.38–7.27 (m, 5H, H_{arom}), 5.90–5.80 (m, 1H, $H-2'$), 5.45 (d, $^3J = 9.1$ Hz, 1H, NH), 5.26 (ddd, $^3J_{\text{trans}} = 17.2$ Hz, $^2J = 1.5$ Hz, $^4J = 1.4$ Hz, 1H, $H-3'_{\text{trans}}$), 5.18 (ddd, $^3J_{\text{cis}} = 10.5$ Hz, $^4J = 1.6$ Hz, $^2J = 1.5$ Hz, 1H, $H-3'_{\text{cis}}$), 5.03 (dd, $^3J = 10.5$ Hz, $^3J = 9.1$ Hz, 1H, $H-3$), 4.62 (d, $^2J = 11.9$ Hz, 1H, -OCH₂Ph), 4.56 (d, $^2J = 11.9$ Hz, 1H, -OCH₂Ph), 4.51 (d, $^2J = 8.4$ Hz, 1H, $H-1$), 4.33 (ddd, $^2J = 13.2$ Hz, $^3J = 4.9$ Hz, $^4J = 1.6$ Hz, 1H, $H-1'$), 4.06 (ddd, $^2J = 13.2$ Hz, $^3J = 6.1$ Hz, $^4J = 1.6$ Hz, 1H, $H-1'b$), 4.00–3.92 (m, 1H, $H-2$), 3.82 (dd, $^2J = 10.1$ Hz, $^3J = 4.9$ Hz, 1H, $H-6$), 3.79–3.72 (m, 2H, $H-4$, $H-6$), 3.56–3.50 (m, 1H, $H-5$), 2.10, 1.95 (s, 2x 3H, 2x C(O)CH₃) ppm.

7.2.5.9 2,4,6-Tri-O-acetyl-3-O-propargyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-3-O-acetyl-1-O-allyl-6-O-benzyl-2-deoxy- β -D-glucopyranosid 81



33 (2.94 g, 6.02 mmol, 1.0 Äq.) und **7** (2.37 g, 6.02 mmol, 1.0 Äq.) in 50 mL trockenem DCM langsam zugegeben. Nach 5 min rühren bei RT wurde $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (762 μL , 6.02 mmol, 1.0 Äq.) zugetropft und weitere 2 h bei RT gerührt. Nach beendeter Reaktion wurden 2 mL NEt_3 zugegeben und das Gemisch mit 150 mL DCM verdünnt. Die organische Phase wurde mit ges. NaHCO_3 -Lösung gewaschen und die wässrige Phase nochmal mit 20 mL DCM reextrahiert. Die vereinten, organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt säulenchromatographisch über Kieselgel (DCM:MeOH = 70:1 \rightarrow 25:1) gereinigt.

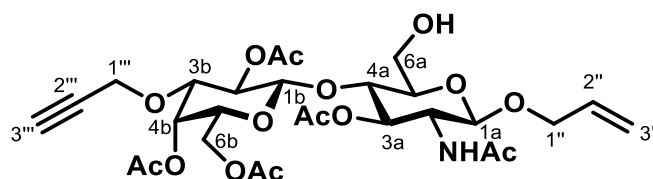
Ausbeute: 1.59 g (2.20 mmol, 37 %) eines farblosen Öls.

Summenformel: $\text{C}_{35}\text{H}_{45}\text{NO}_{15}$

Molare Masse: 719.74 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.42–7.29 (m, 5H, H_{arom}), 5.91–5.80 (m, 1H, $H-2''$), 5.59 (d, $^3J = 9.5$ Hz, 1H, NH), 5.31–5.30 (m, 1H, $H-4b$), 5.26 (ddd, $^3J_{\text{trans}} = 17.3$ Hz, $^4J = 1.7$ Hz, $^2J = 1.6$ Hz, 1H, $H-3''_{\text{trans}}$), 5.17 (ddd, $^3J_{\text{cis}} = 10.5$ Hz, $^4J = 1.7$ Hz, $^2J = 1.4$ Hz, 1H, $H-3''_{\text{cis}}$), 5.01 (dd, $^3J = 9.7$ Hz, $^3J = 8.2$ Hz, 1H, $H-3a$), 4.92 (dd, $^3J = 9.9$ Hz, $^3J = 8.1$ Hz, 1H, $H-2b$), 4.72 (d, $^2J = 12.0$ Hz, 1H, $\text{O}(\text{CH}_2)\text{Ph}$), 4.52 (d, $^2J = 12.0$ Hz, 1H, $\text{O}(\text{CH}_2)\text{Ph}$), 4.47 (d, $^3J = 8.1$ Hz, 1H, $H-1b$), 4.42 (d, $^3J = 7.5$ Hz, 1H, $H-1a$), 4.32 (ddd, $^2J = 13.2$ Hz, $^3J = 4.9$ Hz, $^4J = 1.7$ Hz, 1H, $H-1''$), 4.16–4.15 (m, 2H, $H-1'''$), 4.13–4.02 (m, 4H, $H-1''$, $H-2a$, $H-6b$), 3.96–3.92 (m, 1H, $H-4a$), 3.77–3.74 (m, 2H, $H-6a$), 3.67–3.63 (m, 2H, $H-3b$, $H-5b$), 3.53–3.49 (m, 1H, $H-5a$), 2.45 (dd, $^4J = 2.4$ Hz, 1H, $H-3'''$), 2.12, 2.08, 2.03, 2.02, 1.96 (s, 15H, 5x $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$) ppm.

7.2.5.10 2,4,6-Tri-O-acetyl-3-O-propargyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-3-O-acetyl-1-O-allyl-2-deoxy- β -D-glucopyranosid 82



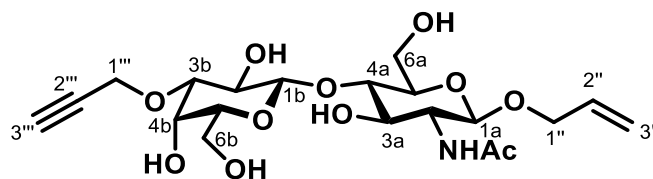
81 (1.59 g, 2.21 mmol, 1.00 Äq.) und DDQ (2.56 g, 11.3 mmol, 5.11 Äq.) wurden in trockenem DCM (100 mL) suspendiert und 2 d auf 45 °C erhitzt. Der Reaktionslösung wurde Wasser (40 mL) zugegeben und weitere 3 h bei RT gerührt. Das rotfarbene Gemisch wurde mit DCM (100 mL) verdünnt, die Phasen getrennt und die organische Phase mit ges. NaHCO₃-Lösung (100 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit DCM (50 mL) extrahiert und die vereinten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lösung (50 mL) und Wasser (3x 50 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das rotfarbene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Kieselgel (DCM:MeOH = 50:1 → 30:1) gereinigt. Ausbeute: 1.08 g (1.71 mmol, 77%) eines leicht rot farbenen Feststoffs.

Summenformel: C₂₈H₃₉NO₁₅

Molare Masse: 629.61 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 5.90–5.79 (m, 1H, *H*-2''), 5.51 (d, ³*J* = 9.5 Hz, 1H, *NH*), 5.36–5.34 (m, 1H, *H*-4b), 5.26 (ddd, ³*J*_{trans} = 17.3 Hz, ⁴*J* = 1.6 Hz, ²*J* = 1.6 Hz, 1H, *H*-3''_{trans}), 5.17 (ddd, ³*J*_{cis} = 10.5 Hz, ⁴*J* = 1.6 Hz, ²*J* = 1.6 Hz, 1H, *H*-3''_{cis}), 5.04 (dd, ³*J* = 10.5 Hz, ³*J* = 8.9 Hz, 1H, *H*-3a), 4.97 (dd, ³*J* = 10.0 Hz, ³*J* = 8.0 Hz, 1H, *H*-2b), 4.58 (d, ³*J* = 8.0 Hz, 1H, *H*-1b), 4.45 (d, ³*J* = 8.3 Hz, 1H, *H*-1a), 4.32 (ddd, ²*J* = 13.2 Hz, ³*J* = 4.9 Hz, ⁴*J* = 1.5 Hz, 1H, *H*-1''), 4.17–4.15 (m, 2H, *H*-1'''), 4.12–4.02 (m, 4H, *H*-1'', *H*-2a, *H*-6b), 3.95–3.85 (m, 2H, *H*-4a, *H*-6a), 3.85–3.81 (m, 1H, *H*-5b), 3.81–3.74 (m, 2H, *H*-3b, *H*-6a), 3.40–3.35 (m, 1H, *H*-5a), 2.44 (dd, ⁴*J* = 2.4 Hz, 1H, *H*-3'''), 2.13, 2.10, 2.08, 2.07, 1.96 (s, 15H, 5 x C(O)CH₃) ppm.

7.2.5.11 3-O-Propargyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-1-O-allyl-2-deoxy- β -D-glucopyranosid 5



82 (1.08 g, 1.72 mmol, 1.00 Äq.) wurden in trockenem MeOH (35 mL) gelöst und NaOMe-Lösung (318 μ L, 5.4 M, 1.72 mmol, 1.00 Äq.) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 2 h bei RT gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde die Lösung mit saurem Ionentauscher (Dowex®) neutralisiert, vom Harz abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: 746 mg (1.62 mmol, 94%) eines leicht rot farbenen Feststoffs.

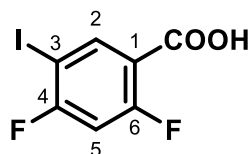
Summenformel: C₂₀H₃₁NO₁₁

Molare Masse: 461.46 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 5.94–5.84 (m, 1H, *H*-2'''), 5.27 (ddd, ³*J*_{trans} = 17.2 Hz, ⁴*J* = 1.6 Hz, ²*J* = 1.6 Hz, 1H, *H*-3''_{trans}), 5.13 (ddd, ³*J*_{cis} = 10.5 Hz, ⁴*J* = 1.6 Hz, ²*J* = 1.6 Hz, 1H, *H*-3''_{cis}), 4.45 (d, ³*J* = 8.4 Hz, 1H, *H*-1a), 4.42 (d, ³*J* = 7.8 Hz, 1H, *H*-1b), 4.39–4.37 (m, 1H, 1H, *H*-1'''), 4.37–4.35 (m, 1H, *H*-1'''), 4.34–4.30 (m, 1H, *H*-1''), 4.09–4.04 (m, 2H, *H*-1'', *H*-4b), 3.92 (dd, ²*J* = 12.1 Hz, ³*J* = 2.6 Hz, 1H, *H*-6a), 3.86 (dd, ²*J* = 12.1 Hz, ³*J* = 4.3 Hz, 1H, *H*-6a), 3.78–3.73 (m, 2H, *H*-2a, *H*-6b), 3.71–3.66 (m, 1H, *H*-6b), 3.66–3.61 (m, 3H, *H*-2b, *H*-3a, *H*-4a), 3.59–3.56 (m, 1H, *H*-5b), 3.52 (dd, ⁴*J* = 9.7 Hz, ⁴*J* = 3.2 Hz, 1H, *H*-3b), 3.41–3.36 (m, 1H, *H*-5a), 2.88 (dd, ⁴*J* = 2.4 Hz, 1H, *H*-3''') 1.97 (s, 3H, C(O)CH₃) ppm.

7.2.6 Synthese der Gal-1 Liganden

7.2.6.1 2,4-Difluor-5-iodbenzoesäure 34a



2,4-Difluorbenzoesäure (1.00 g, 6.32 mmol, 1.00 Äq.) wurde in H_2SO_4 (10 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Es wurden portionsweise *N*-Iodsuccinimid (1.35 g, 6.01 mmol, 0.95 Äq.) zugegeben und das Gemisch anschließend weitere 4 h bei 0 °C gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Reaktionsgemisch auf Eis (150 g) gegeben und mit Na_2SO_3 versetzt bis keine Gasentwicklung beobachtet wurde. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert, mit kaltem Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das Produkt wurde als gelb farbener Feststoff isoliert.

Ausbeute: 1.48 g (5.21 mmol, 82 %)

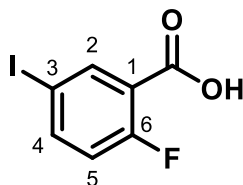
Summenformel: $\text{C}_7\text{H}_3\text{F}_2\text{IO}_2$

Molare Masse: 284.00 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 8.30\text{--}8.22$ (m, 1H, *H*-2), $7.52\text{--}7.44$ (m, 1H, *H*-5) ppm.

$^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (376 MHz, DMSO-d_6): $\delta = -88.7$ (d, $^4J = 8.6$ Hz), -112.9 (d, $^4J = 8.6$ Hz) ppm.

7.2.6.2 2-Fluor-5-iodbenzoesäure 34b



H_2SO_4 (100 mL) wurden auf 0 °C gekühlt und *N*-Iodsuccinimid (9.00 g, 40.0 mmol, 1.30 Äq.) wurden portionsweise zugegeben und 20 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde 2-Fluorbenzoesäure (4.36 g, 31.1 mmol, 1.0 Äq.) auf einmal zugegeben und das Reaktionsgemisch 2 h bei 0 °C gerührt. Diese wurde auf Eis (150 g) gegeben und solange mit gesättigter Na_2SO_3 -Lösung versetzt bis die Suspension farblos erschien. Das Rohprodukt wurde abfiltriert und mit wenig kaltem Aceton gewaschen.

Ausbeute: 7.54 g (28.4 mmol, 91 %) eines farblosen Feststoffs.

7. Experimententeil

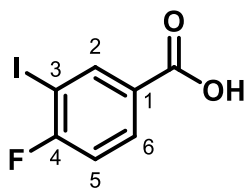
Summenformel: C₇H₄FIO₂

Molare Masse: 266.01 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.32 (dd, ⁴J_{F,6} = 6.7 Hz, ⁴J_{4,6} = 2.4 Hz, 1H, H-6), 7.86 (ddd, ³J_{3,4} = 8.7 Hz, ⁴J_{F,4} = 4.4 Hz, ⁴J_{4,6} = 2.4 Hz, 1H, H-4), 6.95 (dd, ³J_{F,3} = 10.4 Hz, ³J_{3,4} = 8.7 Hz, 1H, H-3) ppm.

¹⁹F{¹H}-NMR (376 MHz, CDCl₃): δ = -118.0 ppm.

7.2.6.3 4-Fluor-3-iodbenzoesäure 34c



H₂SO₄ (70 mL) wurde auf 0 °C gekühlt und *N*-Iodsuccinimid (3.85 g, 17.1 mmol, 1.20 Äq.) wurden portionsweise zugegeben und 30 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurden 4-Fluorbenzoesäure (2.00 g, 14.3 mmol, 1.00 Äq.) auf einmal zugegeben und das Reaktionsgemisch 2 h bei 0 °C gerührt. Diese wurde auf Eis (100 g) gegeben und solange mit Na₂SO₃ versetzt bis die Suspension farblos erschien. Das Rohprodukt wurde abfiltriert und aus Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute: 2.31 g (8.67 mmol, 61 %) eines farblosen Feststoffs.

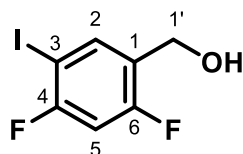
Summenformel: C₇H₄FIO₂

Molare Masse: 266.01 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.45 (dd, ⁴J_{F,2} = 6.0 Hz, ⁴J_{2,6} = 2.1 Hz, 1H, H-2), 8.01 (ddd, ³J_{5,6} = 8.6 Hz, ⁴J_{F,6} = 4.9 Hz, ⁴J_{2,6} = 2.1 Hz, 1H, H-6), 7.07 (dd, ³J_{5,6} = 8.6 Hz, ³J_{F,5} = 7.5 Hz, 1H, H-5) ppm.

¹⁹F{¹H}-NMR (376 MHz, CDCl₃): δ = -85.1 ppm.

7.2.6.4 2,4-Difluor-5-iodbenzylalkohol 35a



Allgemeine **Versuchsvorschrift a)**.

Ausbeute: 1.10 g (4.07 mmol, 87%) einer farblosen Flüssigkeit, die zu einem Feststoff erstarrt.

Summenformel: C₇H₅F₂IO

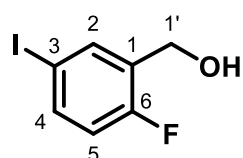
Molare Masse: 270.02 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.85-7.80 (m, 1H, *H*-2), 6.84 (dd, ³*J*_{F,5} = 9.8 Hz, ³*J*_{F,5} = 7.7 Hz, 1H, *H*-5), 4.70 (m, 2H, *H*-1'), 1.90 (s, 1H, *OH*) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 161.4 (dd, ¹*J* = 247.4 Hz, ³*J* = 12.1 Hz, *C*-4), 160.8 (dd, ¹*J* = 250.2 Hz, ³*J* = 10.8 Hz, *C*-6), 138.9 (dd, ³*J* = 5.6 Hz, ³*J* = 3.0 Hz, *C*-2), 126.1 (dd, ²*J* = 15.6 Hz, ⁴*J* = 3.9 Hz, *C*-1), 104.4 (dd, ²*J* = 27.4 Hz, ³*J* = 26.2 Hz, *C*-5), 74.8 (dd, ²*J* = 25.8 Hz, ⁴*J* = 4.2 Hz, *C*-3), 58.4 (d, ³*J* = 3.7 Hz, *C*-1') ppm.

¹⁹F{¹H}-NMR (376 MHz, CDCl₃): δ = -90.9 (d, ⁴*J* = 8.7 Hz), -115.5 (d, ⁴*J* = 8.7 Hz) ppm.

7.2.6.5 2-Fluor-5-iodbenzylalkohol 35b



Allgemeine **Versuchsvorschrift a)**.

Ausbeute: 6.41 g (25.4 mmol, 90 %) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: C₇H₆FIO

Molare Masse: 252.03 g/mol

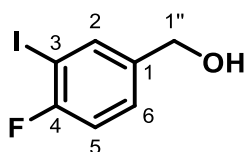
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.78-7.75 (m, 1H, *H*-2), 7.60-7.55 (m, 1H, *H*-4), 6.82 (dd, ³*J*_{F,3} = 9.7 Hz, ³*J*_{3,4} = 8.6 Hz, 1H, *H*-5), 4.72 (s, 2H, *H*-1'), 1.75 (s_{br}, 1H, *OH*) ppm.

7. Experimentalteil

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 160.5$ (d, $^1J = 247.4$ Hz, C-6), 138.2 (d, $^3J = 3.6$ Hz, C-4), 138.0 (d, $^3J = 1.7$ Hz, C-2), 130.8 (d, $^2J = 7.4$ Hz, C-1), 117.6 (d, $^2J = 22.4$ Hz, C-5), 87.4 (d, $^4J = 3.6$ Hz, C-3), 58.8 (d, $^4J = 4.3$ Hz, C-1') ppm.

$^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$ -NMR (376 MHz, CDCl_3): $\delta = -121.0$ ppm.

7.2.6.6 4-Fluor-3-iodbenzylalkohol 35c



Allgemeine **Versuchsvorschrift a)**.

Ausbeute: 1.55 g (6.15 mmol, 73 %) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: $\text{C}_7\text{H}_6\text{FIO}$

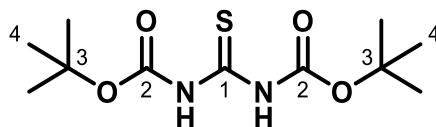
Molare Masse: 252.03 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.79$ – 7.75 (m, 1H, H-2), 7.32– 7.28 (m, 1H, H-6), 7.04 (dd, $^3J_{5,6} = 8.2$ Hz, $^3J_{\text{F},5} = 8.0$ Hz, 1H, H-5), 4.64 (s, 2H, H-1'), 1.74 (s_{br}, 1H, OH) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 161.3$ (d, $^1J = 245.2$ Hz, C-4), 138.7 (d, $^4J = 3.6$ Hz, C-1), 138.0 (d, $^3J = 1.8$ Hz, C-2), 128.8 (d, $^3J = 7.4$ Hz, C-6), 115.7 (d, $^2J = 24.1$ Hz, C-5), 87.4 (d, $^2J = 25.7$ Hz, C-3), 63.9 (C-1') ppm.

$^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$ -NMR (376 MHz, CDCl_3): $\delta = -95.8$ ppm.

7.2.6.7 *N,N'*-Dibocthioharnstoff 83



NaH (2.94 g, 60% in Paraffinöl, 73.5 mmol, 3.63 Äq.) wurde in THF (150 mL) suspendiert und bei 0 °C Thioharnstoff (1.54 g, 20.2 mmol, 1.00 Äq.) zugegeben und 15 min bei RT gerührt. Boc_2O (7.5 mL, 32.7 mmol, 1.90 Äq.) wurde bei 0 °C tropfenweise zugegeben und das Reaktionsgemisch zuerst 30 min bei 0 °C und anschließend 2 h bei RT gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde ges. NaHCO_3 -Lösung zugegeben, bis keine Gasentwicklung mehr

beobachtet wurde. Anschließend wurde ges. NaCl-Lösung (40 mL) zugegeben und die wässrige Phase mit EE (3x 50 mL) extrahiert. Die vereinten, organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Kieselgel (Cy:EE = 9:2 → 5:1) gereinigt.

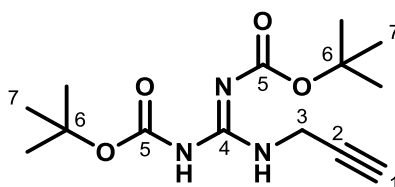
Ausbeute: 1.98 g (7.16 mmol, 55 %) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: C₁₁H₂₀N₂O₄S

Molare Masse: 276.35 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 1.53 (s, 18H, H-4) ppm.

7.2.6.8 1-Propargyl-2,3-di-(tert-butoxycarbonyl)guanidin 84



N,N-Dibocthioharnstoff **83** (1.98 g, 7.17 mmol, 1.00 Äq.) wurde in trockenem DMF (15 mL) gelöst und Propargylamin (4.69 mL, 73.2 mmol, 10.2 Äq.) sowie trockenes NEt₃ (3.0 mL) zugegeben. Unter Rühren wurde eine Suspension aus 2-Chlor-1-methylpyridiniumiodid (2.20 g, 8.61 mmol, 1.20 Äq.) in trockenem DMF (10 mL) zugetropft und weitere 2 h bei RT gerührt. Anschließend wurde ges. NaCl-Lösung (10 mL) zugegeben und die wässrige Phase mit DCM (5x 30 mL) extrahiert. Die vereinten, organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Kieselgel (Cy:EE = 4:1) gereinigt.

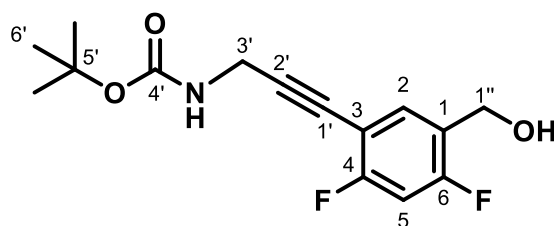
Ausbeute: 482 mg (1.62 mmol, 23 %) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: C₁₄H₂₃N₃O₄

Molare Masse: 297.36 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 11.44 (s_{br}, 1H, NH), 8.47 (s_{br}, 1H, NH), 4.24 (dd, ³J = 4.9 Hz, ⁴J = 2.6 Hz, 2H, H-3), 2.26 (t, ⁴J = 2.6 Hz, 1H, H-1), 1.50, 1.50 (s, 2 x 9H, H-7) ppm.

**7.2.6.9 *tert*-Butyl-(3-(3-(hydroxymethyl)-2,4-difluorophenyl)prop-2-yn-1-yl)carbamat
36a**



Allgemeine **Versuchsvorschrift b)** mit *N*-Boc-Propargylamin und **35a**.

Ausbeute: 270 mg (909 μ mol, 53 %) eines farblosen Öls.

Summenformel: C₁₅H₁₇F₂NO₃

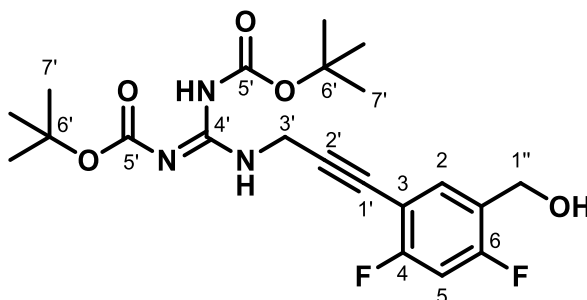
Molare Masse: 297.30 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.50 (dd, ⁴*J* = 8.0 Hz, ⁴*J* = 8.0 Hz, 1H, *H*-2), 6.81 (dd, ³*J* = 9.4 Hz, ³*J* = 9.4 Hz, 1H, *H*-5), 4.82 (s_{br}, 1H, NH), 4.68 (s, 2H, *H*-1''), 4.16 (d, ⁴*J* = 4.5 Hz, 2H, *H*-3'), 1.94 (s_{br}, 1H, OH), 1.46 (s, 3H, *H*-6') ppm. **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ = 162.6 (dd, ¹*J* = 254.1 Hz, ³*J* = 12.1 Hz, C-4), 160.2 (dd, ¹*J* = 252.6 Hz, ³*J* = 11.3 Hz C-6), 155.4 (C-4'), 133.9 (dd, ³*J* = 6.1 Hz, ³*J* = 2.3 Hz, C-2), 124.4 (dd, ³*J* = 15.7 Hz, ³*J* = 3.9 Hz, C-1), 107.7 (dd, ²*J* = 15.9 Hz, ⁴*J* = 4.1 Hz, C-3), 104.2 (dd, ²*J* = 25.6 Hz, ²*J* = 25.6 Hz, C-5), 90.6 (C-2'), 80.3 (C-5'), 75.6 (C-1'), 58.6 (d, ⁴*J* = 3.7 Hz, C-1''), 31.4 (C-3'), 28.5 (C-6') ppm.

¹⁹F{¹H}-NMR (376 MHz, CDCl₃): δ = -107.5 (d, ⁴*J* = 8.9 Hz), -113.0 (d, ⁴*J* = 8.9 Hz) ppm.

MS (ESI *m/z*) berechnet für [M+Na]⁺ 320.10687, gefunden 320.10605, ($|\Delta m/z|$ = 2.57 ppm).

7.2.6.10 *N,N'*-Di-(*tert*-butoxycarbonyl(guanidino)(3-(3-prop-2-in-1-yl)-2,4-difluorobenzyl)alkohol 36b



Allgemeine **Versuchsvorschrift b)** mit Alkin **84** und **35a**.

Ausbeute: 120 mg (273 μ mol, 40 %) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: C₂₁H₂₇F₂N₃O₅

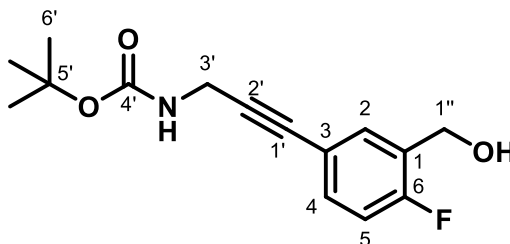
Molare Masse: 439.46 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 11.48 (s_{br}, 1H, NH), 8.54 (s_{br}, 1H, NH), 7.53 (dd, ⁴J_{F,2} = 8.0 Hz, ⁴J_{F,2} = 8.0 Hz, 1H, H-2), 7.08 (dd, ³J_{F,5} = 9.4 Hz, ³J_{F,5} = 9.4 Hz, 1H, H-5), 4.70 (s, 2H, H-1''), 4.49 (d, ⁴J = 5.0 Hz, 2H, H-3'), 1.87 (s_{br}, 1H, OH), 1.51, 1.50 (s, 2 x 9H, H-7') ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 163.4 (C-4'), 162.8 (dd, ¹J = 254.6 Hz, ³J = 12.2 Hz, C-4), 160.3 (dd, ¹J = 252.8 Hz, ³J = 11.3 Hz C-6), 155.8 (C-5'), 153.2 (C-5'), 134.1 (dd, ³J = 6.3 Hz, ³J = 2.7 Hz, C-2), 124.3 (dd, ²J = 15.7 Hz, ⁴J = 4.0 Hz, C-1), 107.6 (dd, ²J = 15.8 Hz, ⁴J = 4.1 Hz, C-3), 104.2 (dd, ²J = 25.8 Hz, ²J = 25.3 Hz, C-5), 89.4 (d, ⁴J = 3.3 Hz, C-2'), 83.6 (C-6'), 79.8 (C-6'), 58.6 (d, ⁴J = 3.6 Hz, C-1''), 31.6 (C-3'), 28.4 (C-7'), 28.2 (C-7') ppm.

¹⁹F{¹H}-NMR (376 MHz, CDCl₃): δ = -106.9 (d, ⁴J = 9.0 Hz), -112.7 (d, ⁴J = 9.0 Hz) ppm

MS (ESI m/z) berechnet für [M+Na]⁺ 462.1811, gefunden 462.1809, ($|\Delta m/z|$ = 0.4 ppm).

7.2.6.11 *tert*-Butyl-(3-(4-fluoro-3-(hydroxymethyl)phenyl)prop-2-yn-1-yl)carbamate **36c**

Allgemeine **Versuchsvorschrift b**) mit *N*-Boc-Propargylamin und **35b**.

Ausbeute: 746 mg (2.67 mol, 67 %) eines orange farbenen Öls.

Summenformel: C₁₅H₁₈FNO₃

Molare Masse: 279.31 g/mol

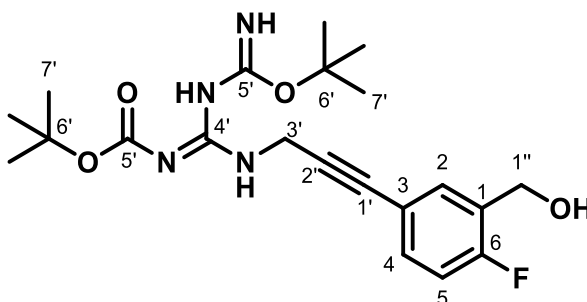
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.50 (dd, ⁴J_{F,2} = 7.0 Hz, ⁴J_{2,4} = 2.1 Hz, 1H, *H*-2), 7.35–7.29 (m, 1H, *H*-4), 6.98 (dd, ³J_{F,5} = 9.1 Hz, ³J_{4,5} = 9.1 Hz, 1H, *H*-5), 4.76 (s_{br}, 1H, *NH*), 4.73 (s, 2H, *H*-1''), 4.13 (d, 2H, ⁴J = 4.5 Hz, *H*-3'), 1.83 (s_{br}, 1H, *OH*), 1.47 (s, 9H, *H*-6') ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 160.4 (d, ¹J = 249.7 Hz, *C*-6), 155.4 (*C*-4'), 132.9 (d, ³J = 8.6 Hz, *C*-2), 132.8 (d, ³J = 5.0 Hz, *C*-4), 128.3 (d, ²J = 15.6 Hz, *C*-1), 119.1 (d, ⁴J = 3.8 Hz, *C*-3), 115.6 (d, ²J = 22.3 Hz, *C*-5), 85.3 (*C*-2'), 82.1 (*C*-1'), 80.2 (*C*-5'), 59.2 (d, ⁴J = 4.1 Hz, *C*-1''), 31.3 (*C*-3'), 28.5 (*C*-6') ppm.

¹⁹F{¹H}-NMR (376 MHz, CDCl₃): δ = -117.8 ppm.

MS (ESI *m/z*) berechnet für [M+Na]⁺ 302.1163, gefunden 302.1164, (|Δ*m/z*| = 0.5 ppm).

7.2.6.12 *N,N'*-Di-(*tert*-butoxycarbonyl(guanidino)(5-(3-prop-2-in-1-yl)-2-fluorobenzyl)alkohol 36d



Allgemeine **Versuchsvorschrift b)** mit Alkin **84** und **35b**.

Ausbeute: 551 mg (1.31 mmol, 33 %) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: C₂₁H₂₈FN₃O₅

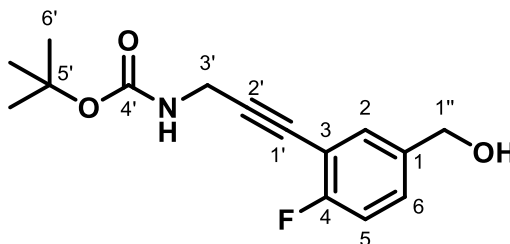
Molare Masse: 421.47 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 11.47 (s_{br}, 1H, NH), 8.51 (s_{br}, 1H, NH), 7.53 (dd, ⁴J_{F,2} = 7.0 Hz, ⁴J_{2,4} = 2.1 Hz, H-2), 7.33 (ddd, 1H, ³J_{4,5} = 8.5 Hz, ⁴J_{F,4} = 5.1 Hz, ⁴J_{2,4} = 2.2 Hz, H-4), 6.97 (dd, 1H, ³J_{F,5} = 9.7 Hz, ³J_{4,5} = 8.5 Hz, H-5), 4.72 (s, 2H, H-1''), 4.43 (d, 2H, ³J = 5.0 Hz, H-3'), 2.18 (s_{br}, 1H, OH), 1.50, 1.49 (s, 2x 9H, H-7')

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 163.4 (C-4'), 160.4 (d, ¹J = 249.8 Hz, C-6), 155.7 (C-5'), 153.2 (C-5'), 132.9 (d, ³J = 8.7 Hz, C-2), 133.8 (d, ³J = 5.2 Hz, C-4), 128.4 (d, ²J = 15.7 Hz, C-1), 118.9 (d, ⁴J = 3.9 Hz, C-3), 115.6 (d, ²J = 22.3 Hz, C-5), 84.0 (C-2'), 83.5 (C-6'), 82.9 (C-1'), 79.8 (C-6'), 59.0 (d, ⁴J = 4.2 Hz, C-1''), 31.6 (C-3'), 28.4 (C-7'), 28.2 (C-7') ppm.

¹⁹F{¹H}-NMR (376 MHz, CDCl₃): δ = -117.6 ppm.

MS (ESI m/z) berechnet für [M+Na]⁺ 444.1905, gefunden 444.1901, (|Δm/z| = 0.8 ppm).

7.2.6.13 *tert*-Butyl-(3-(2-fluoro-5-(hydroxymethyl)phenyl)prop-2-yn-1-yl)carbamate 36e

Allgemeine **Versuchsvorschrift b)** mit *N*-Boc-Propargylamin und **35c**.

Ausbeute: 96.2 mg (344 μ mol, 53 %) eines orange farbenen Öls.

Summenformel: C₁₅H₁₈FNO₃

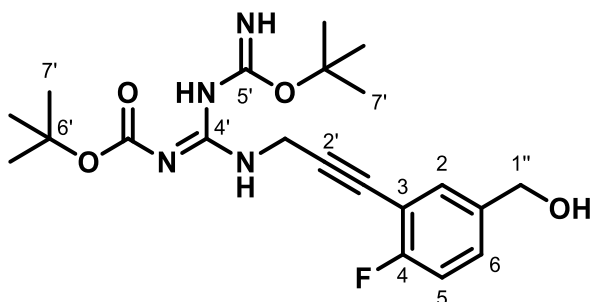
Molare Masse: 279.31 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.41 (dd, ⁴J_{F,2} = 6.7 Hz, ⁴J_{2,6} = 2.2 Hz, 1H, *H*-2), 7.32-7.27 (m, 1H, *H*-6), 7.04 (dd, ³J_{F,5} = 8.8 Hz, ³J_{5,6} = 8.8 Hz, 1H, *H*-5), 4.80 (s_{br}, 1H, *NH*), 4.63 (s, 2H, *H*-1''), 4.18 (d, ⁴J = 4.6 Hz, 2H, *H*-3'), 1.72 (s_{br}, 1H, *OH*), 1.47 (s, 9H, *H*-6') ppm. **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ = 162.4 (d, ¹J = 251.3 Hz, *C*-4), 155.4 (*C*-4'), 136.8 (d, ⁴J = 3.6 Hz, *C*-1), 132.3 (*C*-2), 128.8 (d, ³J = 8.1 Hz, *C*-6), 115.8 (d, ²J = 21.4 Hz, *C*-5), 111.3 (d, ²J = 16.1 Hz, *C*-3), 90.9 (*C*-2'), 80.2 (*C*-5'), 76.6 (*C*-1'), 64.3 (*C*-1''), 31.4 (*C*-3'), 28.5 (*C*-6') ppm.

¹⁹F{¹H}-NMR (376 MHz, CDCl₃): δ = -112.4 ppm.

MS (ESI *m/z*) berechnet für [M+Na]⁺ 302.11629, gefunden 302.11447, ($|\Delta m/z|$ = 6.02 ppm).

7.2.6.14 *N,N'*-Di-(*tert*-butoxycarbonyl(guanidino)(3-(3-prop-2-in-1-yl)-4-fluorobenzyl)alkohol 36f



Allgemeine **Versuchsvorschrift b)** mit Alkin **84** und **35c**.

Ausbeute: 55.5 mg (132 μ mol, 33 %) eines orange farbenen Öls.

Summenformel: C₂₁H₂₈FN₃O₅

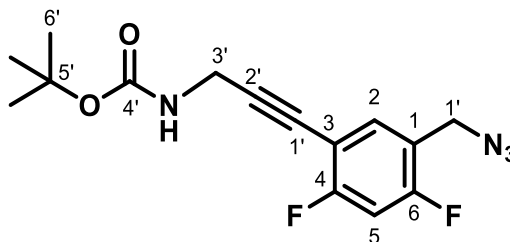
Molare Masse: 421.47 g/mol

H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 11.48 (s_{br}, 1H, NH), 8.56 (s_{br}, 1H, NH), 7.40 (dd, ⁴J_{F,2} = 6.5 Hz, ⁴J_{2,6} = 2.3 Hz, 1H, H-2), 7.33-7.28 (m, 1H, H-6), 7.08 (dd, ³J_{F,5} = 8.7 Hz, ³J_{5,6} = 8.7 Hz, 1H, H-5), 4.63 (s, 2H, H-1''), 4.52 (d, ⁴J = 5.0 Hz, 2H, H-3'), 1.51, 1.50 (s, 2 x 9H, H-7') ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 163.4 (C-4'), 162.8 (d, ¹J = 252.5 Hz, C-4), 155.7 (C-5'), 152.9 (C-5'), 133.7 (d, ³J = 1.8 Hz, C-2), 131.5 (d, ⁴J = 3.6 Hz, C-1), 130.1 (d, ³J = 8.5 Hz, C-6), 116.1 (d, ²J = 21.3 Hz, C-5), 111.6 (d, ²J = 15.9 Hz, C-3), 90.2 (d, ⁴J = 4.2 Hz, C-2'), 83.6 (C-6'), 81.6 (C-1'), 79.8 (C-6'), 64.5 (C-1''), 31.7 (C-3'), 28.3 (C-7'), 28.1 (C-7') ppm.

¹⁹F{¹H}-NMR (376 MHz, CDCl₃): δ = -111.9 ppm.

MS (ESI m/z) berechnet für [M+Na]⁺ 444.1905, gefunden 444.1915, ($|\Delta m/z|$ = 2.2 ppm).

7.2.6.15 *tert*-Butyl-(3-(3-(azidomethyl)-2,4-difluorophenyl)prop-2-yn-1-yl)carbammat 37a

Allgemeine **Versuchsvorschrift c)**.

Ausbeute: 184 mg (571 μmol , 71 %) eines farblosen Öls.

Summenformel: $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_2$

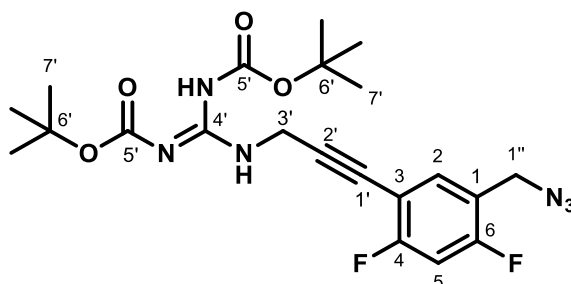
Molare Masse: 322.32 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.42$ (dd, $^4J = 7.9$ Hz, $^4J = 7.9$ Hz, 1H, *H*-2), 6.81 (dd, $^3J = 9.2$ Hz, $^3J = 9.2$ Hz, 1H, *H*-5), 4.82 (s_{br}, 1H, *NH*), 4.34 (s, 2H, *H*-1''), 4.18 (d, $^4J = 4.4$ Hz, 2H, *H*-3'), 1.47 (s, 3H, *H*-6') ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 163.1$ (dd, $^1J = 252.7$ Hz, $^3J = 11.8$ Hz, *C*-4), 160.6 (dd, $^1J = 253.9$ Hz, $^3J = 11.5$ Hz *C*-6), 155.5 (*C*-4'), 134.9 (dd, $^3J = 5.0$ Hz, $^3J = 3.1$ Hz, *C*-2), 119.3 (dd, $^2J = 16.2$ Hz, $^4J = 4.1$ Hz, *C*-1), 108.2 (dd, $^2J = 16.2$ Hz, $^4J = 4.2$ Hz, *C*-3), 104.6 (dd, $^2J = 25.6$ Hz, $^2J = 25.6$ Hz, *C*-5), 91.2 (*C*-2'), 80.3 (*C*-5'), 75.1 (*C*-1'), 47.8 (d, $^4J = 2.6$ Hz, *C*-1''), 31.3 (*C*-3'), 28.5 (*C*-6') ppm.

$^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$ -NMR (376 MHz, CDCl_3): $\delta = -105.9$ (d, $^4J = 9.4$ Hz), -111.8 (d, $^4J = 9.4$ Hz) ppm.

MS (ESI *m/z*) berechnet für $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 345.11335, gefunden 345.11295, ($|\Delta m/z| = 1.16$ ppm).

7.2.6.16 *N,N'*-Di-(*tert*-butoxycarbonyl(guanidino)(3-(3-prop-2-in-1-yl)-2,4-difluorobenzyl)azid 37b



Allgemeine **Versuchsvorschrift c)**.

Ausbeute: 16.6 mg (35.7 μmol , 33 %) eines farblosen Öls.

Summenformel: $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{F}_2\text{N}_6\text{O}_4$

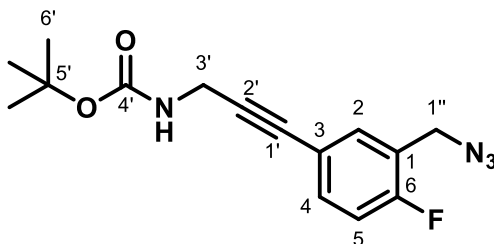
Molare Masse: 464.47 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 11.48$ (s_{br} , 1H, NH), 8.55 (s_{br} , 1H, NH), 7.44 (dd, $^4J_{\text{F},2} = 7.9$ Hz, $^4J_{\text{F},2} = 7.9$ Hz, 1H, H-2), 6.88 (dd, $^3J_{\text{F},5} = 9.2$ Hz, $^3J_{\text{F},5} = 9.2$ Hz, 1H, H-5), 4.50 (d, $^4J = 5.0$ Hz, 2H, H-3'), 4.35 (s, 2H, H-1''), 1.51, 1.50 (s, 2x 9H, H-7')

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 163.4$ (C-4'), 163.2 (dd, $^1J = 256.1$ Hz, $^3J = 12.2$ Hz, C-4), 160.7 (dd, $^1J = 254.1$ Hz, $^3J = 11.5$ Hz C-6), 155.8 (C-5'), 153.2 (C-5'), 135.1 (dd, $^3J = 5.5$ Hz, $^3J = 2.9$ Hz, C-2), 119.3 (dd, $^2J = 16.2$ Hz, $^4J = 4.0$ Hz, C-1), 108.1 (dd, $^2J = 14.0$ Hz, $^4J = 2.1$ Hz, C-3), 104.6 (dd, $^2J = 25.8$ Hz, $^2J = 25.4$ Hz, C-5), 90.0 (d, $^4J = 3.4$ Hz, C-2'), 83.6 (C-6'), 79.8 (C-6'), 76.0 (d, $^4J = 1.6$ Hz, C-1'), 47.9.6 (C-1''), 31.6 (C-3'), 28.4 (C-7'), 28.2 (C-7') ppm.

$^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$ -NMR (376 MHz, CDCl_3): $\delta = -105.0$ (d, $^4J = 9.6$ Hz), -110.8 (d, $^4J = 9.6$ Hz) ppm.

MS (ESI m/z) berechnet für $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 487.1876, gefunden 487.1884, ($|\Delta m/z| = 1.6$ ppm).

7.2.6.17 *tert*-Butyl-(3-(3-(azidomethyl)-4-fluorophenyl)prop-2-yn-1-yl)carbammat 37c

Allgemeine **Versuchsvorschrift c)**.

Ausbeute: 293 mg (982 μmol , 36 %) eines gelb farbenen Feststoffs.

Summenformel: $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{FN}_4\text{O}_2$

Molare Masse: 304.33 g/mol

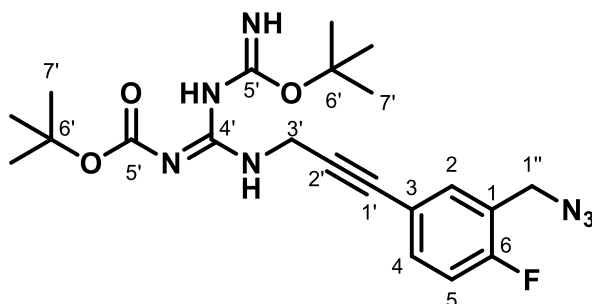
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.41$ (dd, $^4J_{\text{F},2} = 7.0$ Hz, $^4J_{2,4} = 2.0$ Hz, 1H, *H*-2), 7.35–7.29 (ddd, $^3J_{4,5} = 8.5$ Hz, $^4J_{\text{F},4} = 5.1$ Hz, $^4J_{2,4} = 2.2$ Hz, 1H, *H*-4), 7.03 (dd, $^3J_{\text{F},5} = 9.3$ Hz, $^3J_{4,5} = 8.6$ Hz, 1H, *H*-5), 4.81 (s_{br}, 1H, *NH*), 4.36 (s, 2H, *H*-1''), 4.13 (d, $^4J = 5.0$ Hz, 2H, *H*-3'), 1.46 (s, 9H, *H*-6') ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 160.4$ (d, $^1J = 249.7$ Hz, *C*-6), 155.4 (*C*-4'), 132.9 (d, $^3J = 4.4$ Hz, *C*-4), 132.8 (d, $^3J = 8.6$ Hz, *C*-2), 123.3 (d, $^2J = 16.2$ Hz, *C*-1), 119.1 (d, $^4J = 3.9$ Hz, *C*-3), 115.6 (d, $^2J = 22.3$ Hz, *C*-5), 85.9 (*C*-1'), 81.7 (*C*-2'), 80.2 (*C*-5'), 48.3 (d, $^4J = 3.1$ Hz, *C*-1''), 31.2 (*C*-3'), 28.5 (*C*-6') ppm.

$^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$ -NMR (376 MHz, CDCl_3): $\delta = -116.1$ ppm.

MS (ESI *m/z*) berechnet für $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 327.1228, gefunden 327.1230, ($|\Delta m/z| = 0.8$ ppm).

7.2.6.18 *N,N'*-Di-(*tert*-butoxycarbonyl(guanidino)(5-(3-prop-2-in-1-yl)-2-fluorobenzyl)azid 37d



Allgemeine **Versuchsvorschrift c)**.

Ausbeute: 91.1 mg (204 μ mol, 46%) eines farblosen Öls.

Summenformel: C₂₁H₂₇FN₆O₅

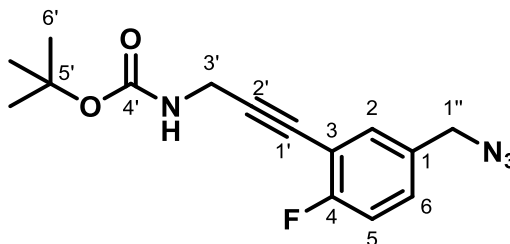
Molare Masse: 446.48 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 11.49 (s_{br}, 1H, NH), 8.53 (s_{br}, 1H, NH), 7.44 (dd, ⁴J_{F,2} = 7.0 Hz, ⁴J_{2,4} = 2.0 Hz, 1H, H-2), 7.40 (ddd, ³J_{4,5} = 8.1 Hz, ⁴J_{F,4} = 5.4 Hz, ⁴J_{2,4} = 2.5 Hz, 1H, H-4), 7.05 (dd, ³J_{F,5} = 9.3 Hz, ³J_{4,5} = 8.6 Hz, 1H, H-5), 4.46 (d, ³J = 5.0 Hz, 2H, H-3'), 4.38 (s, 2H, H-1''), 1.52, 1.51 (s, 2x 9H, H-7')

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 163.4 (C-4'), 160.7 (d, ¹J = 251.4 Hz, C-6), 155.8 (C-5'), 155.8 (C-5'), 134.0 (d, ³J = 4.2 Hz, C-4), 134.0 (d, ³J = 8.4 Hz, C-2), 123.3 (d, ²J = 16.2 Hz, C-1), 119.3 (d, ⁴J = 3.9 Hz, C-3), 116.0 (d, ²J = 22.3 Hz, C-5), 84.6 (C-2'), 83.6 (C-6'), 82.5 (C-1'), 79.8 (C-6'), 48.3 (d, ⁴J = 3.0 Hz, C-1''), 31.6 (C-3'), 28.4 (C-7'), 28.2 (C-7')

¹⁹F{¹H}-NMR (376 MHz, CDCl₃): δ = -115.8 ppm.

MS (ESI m/z) berechnet für [M+Na]⁺ 469.1970, gefunden 469.1973, ($|\Delta m/z|$ = 0.6 ppm).

7.2.6.19 *tert*-Butyl-(3-(5-(azidomethyl)-2-fluorophenyl)prop-2-yn-1-yl)carbamat 37e

Allgemeine **Versuchsvorschrift c)**.

Ausbeute: 30.3 mg (99.6 μmol , 35 %) eines farblosen Öls.

Summenformel: $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{FN}_4\text{O}_2$

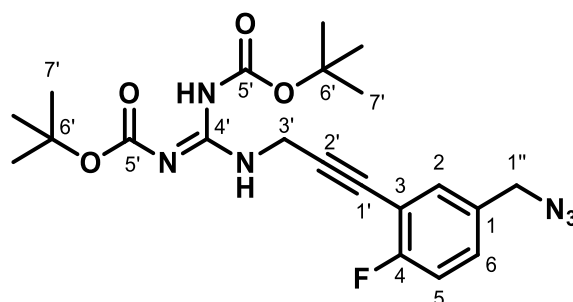
Molare Masse: 304.33 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.37$ (dd, $^4J_{\text{F},2} = 6.6$ Hz, $^4J_{2,6} = 2.3$ Hz, 1H, *H*-2), 7.27–7.22 (m, 1H, *H*-6), 7.07 (dd, $^3J_{\text{F},5} = 8.8$ Hz, $^3J_{5,6} = 8.8$ Hz, 1H, *H*-5), 4.80 (s_{br}, 1H, *NH*), 4.29 (s, 2H, *H*-1''), 4.19 (d, $^4J = 4.3$ Hz, 2H, *H*-3'), 1.47 (s, 9H, *H*-6') ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 162.7$ (d, $^1J = 252.8$ Hz, *C*-4), 155.4 (*C*-4'), 133.5 (*C*-2), 131.5 (d, $^4J = 3.8$ Hz, *C*-1), 130.0 (d, $^3J = 8.2$ Hz, *C*-6), 116.1 (d, $^2J = 21.6$ Hz, *C*-5), 111.9 (d, $^2J = 16.3$ Hz, *C*-3), 91.4 (*C*-2'), 80.3 (*C*-5'), 76.2 (*C*-1'), 53.8 (*C*-1''), 31.4 (*C*-3'), 28.5 (*C*-6') ppm.

$^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$ -NMR (376 MHz, CDCl_3): $\delta = -110.9$ ppm.

MS (ESI *m/z*) berechnet für $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 327.12277, gefunden 327.12278, ($|\Delta m/z| = 0.01$ ppm).

7.2.6.20 *N,N'*-Di-(*tert*-butoxycarbonyl(guanidino)(3-(3-prop-2-in-1-yl)-4-fluorobenzyl)azid 37f



Allgemeine **Versuchsvorschrift c)**.

Ausbeute: 29.4 mg (65.9 μ mol, 54 %) eines farblosen Öls.

Summenformel: C₂₁H₂₇FN₆O₄

Molare Masse: 446.48 g/mol

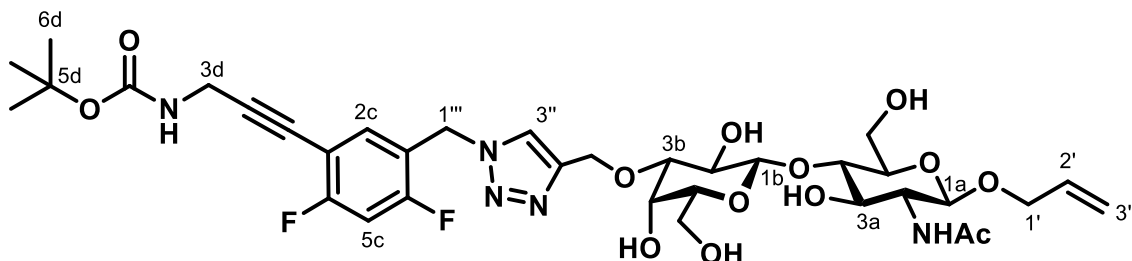
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 11.48 (s_{br}, 1H, NH), 8.56 (s_{br}, 1H, NH), 7.40 (dd, ⁴J_{F,2} = 6.5 Hz, ⁴J_{2,6} = 2.3 Hz, 1H, H-2), 7.28-7.23 (m, 1H, H-6), 7.08 (dd, ³J_{F,5} = 8.7 Hz, ³J_{5,6} = 8.7 Hz, 1H, H-5), 4.52 (d, ⁴J = 5.0 Hz, 2H, H-3'), 4.29 (s, 2H, H-1''), 1.52, 1.51 (s, 2x 9H, H-7') ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 163.4 (C-4'), 162.8 (d, ¹J = 253.2 Hz, C-4), 155.8 (C-5'), 153.2 (C-5'), 133.7 (d, ³J = 1.7 Hz, C-2), 131.5 (d, ⁴J = 3.8 Hz, C-1), 130.1 (d, ³J = 8.2 Hz, C-6), 116.1 (d, ²J = 21.5 Hz, C-5), 111.8 (d, ²J = 16.3 Hz, C-3), 90.2 (d, ⁴J = 3.8 Hz, C-2'), 83.6 (C-6'), 79.8 (C-6'), 77.0 (C-1'), 53.8 (C-1''), 31.7 (C-3'), 28.4 (C-7'), 28.2 (C-7') ppm.

¹⁹F{¹H}-NMR (376 MHz, CDCl₃): δ = -110.5 ppm.

MS (ESI m/z) berechnet für [2M+Na]⁺ 915.40478, gefunden 915.40755, ($|\Delta m/z|$ = 3.02 ppm).

7.2.6.21 3-O-[(1-(2-tert-Butyl(3-(3-ethyl-4,6-difluorophenyl)prop-2-in-yl)-1,2,3-triazol-4-yl)methyl-β-d-galactopyranosyl-(1→4)-2-acetamido-1-O-allyl-2-deoxy-β-d-glucopyranosid 38a



Allgemeine Versuchsvorschrift **d**).

Ausbeute: 159.7 mg (204 μmol, 64 %) eines farblosen Feststoffs.

Molare Masse: 783.78 g/mol

Summenformel: C₃₅H₄₇F₂N₅O₁₃

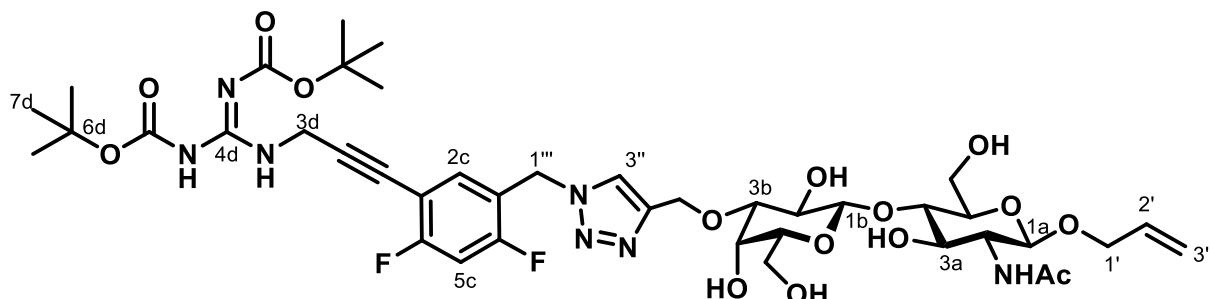
¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 8.03 (s, 1H, *H*-3''), 7.51 (t appt, ⁴*J*_{F,2} = 7.7 Hz, 1H, *H*-2c), 7.12 (t appt, ³*J*_{F,5} = 9.6 Hz, 1H, *H*-5c), 5.94–5.82 (m, 1H, *H*-2'), 5.65 (s, 2H, *H*-1'''), 5.27 (ddd, ³*J* = 17.3 Hz, ⁴*J* = 3.6 Hz, ²*J* = 1.7 Hz, 1H, *H*-3'_{trans}), 5.13 (ddd, ³*J* = 10.5 Hz, ⁴*J* = 3.3 Hz, ²*J* = 1.5 Hz, 1H, *H*-3'_{cis}), 4.85–4.70 (m, 2H, *H*-1''), 4.44 (d, ³*J* = 8.2 Hz, 1H, *H*-1a), 4.41 (d, ³*J* = 7.7 Hz, 1H, *H*-1b), 4.35–4.29 (m, 1H, *H*-1'), 4.09–3.98 (m, 4H, *H*-1', *H*-4b, *H*-3d), 3.92 (dd, ²*J* = 12.1 Hz, ³*J* = 2.5 Hz, 1H, *H*-6a), 3.84 (dd, ²*J* = 12.1 Hz, ³*J* = 4.3 Hz, 1H, *H*-6a), 3.80–3.74 (m, 2H, *H*-2a, *H*-6b), 3.71–3.66 (m, 1H, *H*-6b), 3.66–3.60 (m, 3H, *H*-2b, *H*-3a, *H*-4a), 3.59–3.55 (m, 1H, *H*-5b), 3.43–3.36 (m, 2H, *H*-3b, *H*-5a), 1.97 (s, 3H, C(O)CH₃), 1.46 (s, 9H, *H*-6d) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD): δ = 173.5 (C(O)OMe), 135.5 (C-2'), 125.2 (C-3''), 116.9 (C-3'), 104.9 (C-1b), 101.9 (C-1a), 82.8 (C-3b), 81.0 (C-2b), 76.9 (C-5a), 76.6 (C-5b), 74.2 (C-3), 71.7 (C-4a), 70.7 (C-1'), 66.9 (C-4b), 63.6 (C-1''), 62.5 (C-6b), 62.0 (C-6a), 56.6 (C-2a), 31.4 (C-3d), 28.7 (C-6d), 22.9 (OCH₃) ppm.

¹⁹F{¹H}-NMR (376 MHz, MeOD): δ = -107.0 (d, ⁴*J* = 10.4 Hz), -112.9 (d, ⁴*J* = 9.6 Hz) ppm.

MS (ESI *m/z*) berechnet für [M+Na]⁺ 806.3031, gefunden 806.3026, (|Δ*m/z*| = 0.6 ppm).

7.2.6.22 3-O-[N,N-Di-tert-butoxycarbonyl(guanidino))(3-(3-prop-2-in-1yl)-4,6-difluorbenzyl)-1,2,3-triazol-4-yl]methyl-β-d-galactopyranosyl-(1→4)-2-acetamido-1-O-allyl-2-deoxy-β-d-glucopyranosid 38b



Allgemeine Versuchsvorschrift **d**).

Ausbeute: 18.8 mg (20.3 μmol, 57 %) eines farblosen Feststoffs.

Molare Masse: 925.94 g/mol

Summenformel: C₄₁H₅₇F₂N₇O₁₅

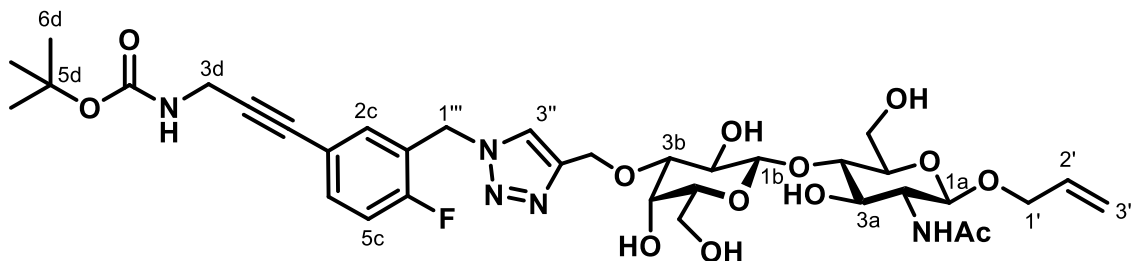
¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 8.03 (s, 1H, H-3''), 7.57 (t appt, ⁴J_{F,2} = 7.9 Hz, 1H, H-2c), 7.13 (t appt, ³J_{F,5} = 9.6 Hz, 1H, H-5c), 5.94–5.82 (m, 1H, H-2'), 5.65 (s, 2H, H-1'''), 5.27 (ddd, ³J = 17.3 Hz, ⁴J = 3.6 Hz, ²J = 1.8 Hz, 1H, H-3'_{trans}), 5.13 (ddd, ³J = 10.5 Hz, ⁴J = 3.3 Hz, ²J = 1.4 Hz, 1H, H-3'_{cis}), 4.85–4.70 (m, 2H, H-1''), 4.44 (d, ³J = 8.2 Hz, 1H, H-1a), 4.41 (d, ³J = 7.7 Hz, 1H, H-1b), 4.35–4.29 (m, 1H, H-1'), 4.09–3.98 (m, 4H, H-1', H-4b, H-3d), 3.92 (dd, ²J = 12.1 Hz, ³J = 2.5 Hz, 1H, H-6a), 3.84 (dd, ²J = 12.1 Hz, ³J = 4.3 Hz, 1H, H-6a), 3.80–3.74 (m, 2H, H-2a, H-6b), 3.71–3.66 (m, 1H, H-6b), 3.66–3.60 (m, 3H, H-2b, H-3a, H-4a), 3.59–3.55 (m, 1H, H-5b), 3.43–3.36 (m, 2H, H-3b, H-5a), 1.97 (s, 3H, C(O)CH₃), 1.54, 1.49 (s, 2x 9H, H-7d) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD): δ = 173.5 (C(O)OMe), 164.7 (dd, ¹J = 255.1 Hz, ³J = 12.3 Hz, C-4c), 164.3 (C-4d), 162.1 (d, ¹J = 253.5 Hz, ³J = 11.4 Hz, C-6c), 157.2 (C-5d), 153.9 (C-5d), 136.7 (m, C-2c), 135.5 (C-2''), 120.6 (dd, ²J = 15.9 Hz, ⁴J = 4.1 Hz, C-1c), 116.9 (C-3'), 109.5–109.2 (m, C-3c), 105.7 (dd, ²J = 26.0 Hz, ²J = 26.0 Hz, C-5c), 104.9 (C-1b), 101.9 (C-1a), 91.7 (C-2d), 84.7 (C-6d), 82.8 (C-3b), 81.0 (C-2b), 80.7 (C-6d), 76.9 (C-5a), 76.6 (C-5b), 74.2 (C-3a), 71.7 (C-4a), 70.7 (C-1'), 66.8 (C-4b), 63.6 (C-1''), 62.5 (C-6b), 62.0 (C-6a), 56.6 (C-2a), 31.8 (C-3d), 28.5, 28.2 (C-7d), 22.9 (OCH₃) ppm.

¹⁹F{¹H}-NMR (376 MHz, MeOD): δ = -106.6 (d, ⁴J = 9.8 Hz), -112.3 (d, ⁴J = 9.8 Hz) ppm.

MS (ESI m/z) berechnet für [M+Na]⁺ 948.3773, gefunden 948.3764, (|Δm/z| = 1.0 ppm).

7.2.6.23 3-O-[(1-(2-tert-Butyl(3-(3-ethyl-6-fluorophenyl)prop-2-yn-1-yl)-1,2,3-triazol-4-yl)methyl-β-d-galactopyranosyl-(1→4)-2-acetamido-1-O-allyl-2-deoxy-β-d-glucopyranosid 38c



Allgemeine Versuchsvorschrift **d**).

Ausbeute: 168 mg (220 μmol, 78 %) eines farblosen Feststoffs.

Molare Masse: 765.79 g/mol

Summenformel: C₃₅H₄₈FN₅O₁₃

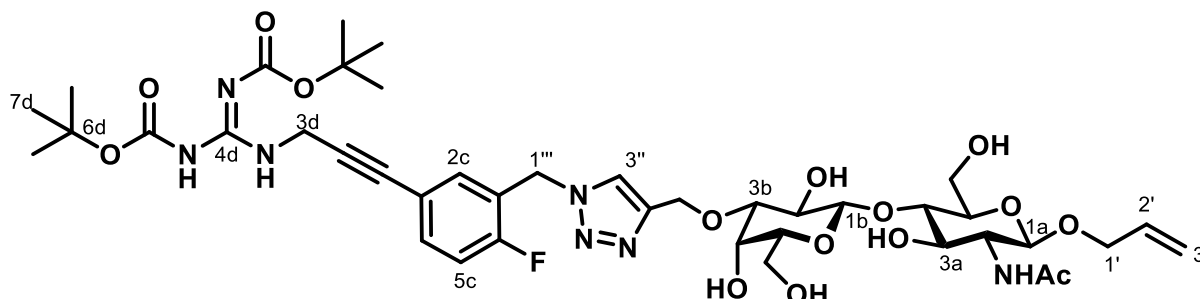
¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 8.06 (s, 1H, *H*-3''), 7.44 (ddd, ³*J*_{4,5} = 8.5 Hz, ⁴*J*_{F,4} = 5.0 Hz, ⁴*J*_{2,4} = 2.1 Hz, 1H, *H*-4c), 7.41–7.36 (m, 1H, *H*-2c), 7.15 (dd, ³*J*_{F,5} = 9.7 Hz, ³*J*_{4,5} = 8.7 Hz, 1H, *H*-5c), 5.94–5.82 (m, 1H, *H*-2'), 5.65 (s, 2H, *H*-1'''), 5.27 (ddd, ³*J* = 17.3 Hz, ⁴*J* = 3.6 Hz, ²*J* = 1.7 Hz, 1H, *H*-3'_{trans}), 5.13 (ddd, ³*J* = 10.5 Hz, ⁴*J* = 3.3 Hz, ²*J* = 1.5 Hz, 1H, *H*-3'_{cis}), 4.85–4.70 (m, 2H, *H*-1''), 4.44 (d, ³*J* = 8.2 Hz, 1H, *H*-1), 4.41 (d, ³*J* = 7.7 Hz, 1H, *H*-1b), 4.35–4.29 (m, 1H, *H*-1'), 4.09–3.98 (m, 4H, *H*-1', *H*-4b, *H*-3d), 3.92 (dd, ²*J* = 12.1 Hz, ³*J* = 2.5 Hz, 1H, *H*-6a), 3.84 (dd, ²*J* = 12.1 Hz, ³*J* = 4.3 Hz, 1H, *H*-6a), 3.80–3.74 (m, 2H, *H*-2a, *H*-6b), 3.71–3.66 (m, 1H, *H*-6b), 3.66–3.60 (m, 3H, *H*-2b, *H*-3a, *H*-4a), 3.59–3.55 (m, 1H, *H*-5b), 3.43–3.36 (m, 2H, *H*-3b, *H*-5a), 1.97 (s, 3H, C(O)CH₃), 1.46 (s, 9H, *H*-6d) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD): δ = 173.5 (C(O)OMe), 161.6 (d, ¹*J* = 250.4 Hz, C-6c), 158.0 (C-4d), 135.5 (C-2''), 135.3 (d, ³*J* = 9.0 Hz, C-2c), 135.0 (C-2'), 124.2 (d, ²*J* = 15.9 Hz, C-1c), 121.3 (d, ⁴*J* = 3.9 Hz, C-3c), 117.3 (d, ²*J* = 22.3 Hz, C-5c), 116.9 (C-3'), 105.0 (C-1b), 101.9 (C-1a), 87.7 (C-2d), 82.8 (C-3b), 81.3 (C-1d), 81.0 (C-2b), 80.7 (C-5d), 76.9 (C-5a), 76.6 (C-5b), 74.2 (C-3a), 71.7 (C-4a), 70.7 (C-1'), 66.9 (C-4b), 63.6 (C-1''), 62.5 (C-6b), 62.0 (C-6a), 56.6 (C-2a), 31.2 (C-3d), 28.7 (C-6d), 22.9 (OCH₃) ppm.

¹⁹F{¹H}-NMR (376 MHz, MeOD): δ = -118.2 ppm.

MS (ESI *m/z*) berechnet für [M+Na]⁺ 788.3125, gefunden 788.3119, (|Δ*m/z*| = 0.7 ppm).

7.2.6.24 3-O-[*N,N*-Di-*tert*-butoxycarbonyl(guanidino))(3-(3-prop-2-in-1yl)-6-fluorbenzyl)-1,2,3-triazol-4-yl]methyl- β -d-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-1-O-allyl-2-deoxy- β -d-glucopyranosid 38d



Allgemeine Versuchsvorschrift **d**).

Ausbeute: 94.0 mg (104 μ mol, 59 %) eines farblosen Feststoffs.

Molare Masse: 907.95 g/mol

Summenformel: C₄₁H₅₈FN₇O₁₅

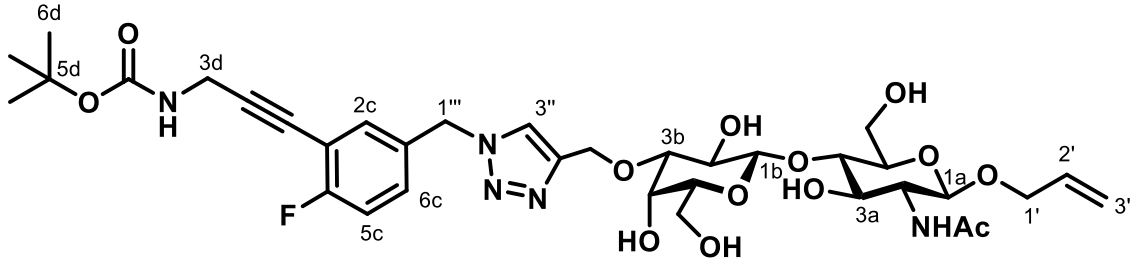
¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 8.03 (s, 1H, *H*-3''), 7.51–7.44 (m, 2H, *H*-2*, *H*-4c), 7.16 (dd, ³*J*_{F,5} = 9.7 Hz, ³*J*_{4,5} = 8.7 Hz, 1H, *H*-5c), 5.94–5.82 (m, 1H, *H*-2'), 5.65 (s, 2H, *H*-1'''), 5.27 (ddd, ³*J* = 17.3 Hz, ⁴*J* = 3.6 Hz, ²*J* = 1.7 Hz, 1H, *H*-3'_{trans}), 5.13 (ddd, ³*J* = 10.5 Hz, ⁴*J* = 3.3 Hz, ²*J* = 1.5 Hz, 1H, *H*-3'_{cis}), 4.81 (dd, ²*J* = 12.3 Hz, H, *H*-1''), 4.73 (dd, ²*J* = 12.2 Hz, H, *H*-1''), 4.44 (d, ³*J* = 8.2 Hz, 1H, *H*-1a), 4.41 (d, ³*J* = 7.7 Hz, 1H, *H*-1b), 4.35–4.29 (m, 1H, *H* 1'), 4.09–3.98 (m, 4H, *H*-1', *H*-4b, *H*-3d), 3.92 (dd, ²*J* = 12.1 Hz, ³*J* = 2.5 Hz, 1H, *H*-6a), 3.84 (dd, ²*J* = 12.1 Hz, ³*J* = 4.3 Hz, 1H, *H*-6a), 3.80–3.74 (m, 2H, *H*-2, *H*-6b), 3.71–3.66 (m, 1H, *H*-6b), 3.66–3.60 (m, 3H, *H*-2b, *H*-3a, *H*-4a), 3.59–3.55 (m, 1H, *H*-5b), 3.42–3.35 (m, 2H, *H*-3b, *H*-5a), 1.96 (s, 3H, C(O)CH₃), 1.53, 1.49 (s, 2x 9H, *H*-7d) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD): δ = 173.5 (C(O)OMe), 164.4 (C-5d), 161.9 (d, ¹*J* = 254.8 Hz, C-6c), 157.2 (C-4d), 154.0 (C-4d), 135.5 (C-2''), 135.5 (d, ³*J* = 8.8 Hz, C-2c), 135.2 (C-2'), 125.2 (C-3''), 124.3 (d, ²*J* = 15.9 Hz, C-1c), 121.3 (d, ⁴*J* = 3.8 Hz, C-3c), 117.2 (d, ²*J* = 22.3 Hz, C-5c), 116.9 (C-3'), 104.9 (C-1b), 101.9 (C-1a), 86.2 (C-2d), 84.7 (C-6d) 82.7 (C-3b), 82.3 (C-1d), 81.0 (C-2b), 80.7 (C-6d), 76.9 (C-5a), 76.6 (C-5b), 74.2 (C-3a), 71.7 (C-4a), 70.7 (C-1'), 66.9 (C-4b), 63.6 (C-1''), 62.6 (C-6b), 62.0 (C-6a), 56.6 (C-2a), 31.7 (C-3d), 28.5, 28.2 (C-7d), 22.5 (OCH₃) ppm.

¹⁹F{¹H}-NMR (376 MHz, MeOD): δ = –112.6 ppm.

MS (ESI *m/z*) berechnet für [M+Na]⁺ 930.3867, gefunden 930.3866, ($|\Delta m/z|$ = 0.1 ppm).

7.2.6.25 3-O-[(1-(2-tert-Butyl(3-(3-ethyl-4-fluorophenyl)prop-2-yn-1-yl)-1,2,3-triazol-4-yl)methyl-β-d-galactopyranosyl-(1→4)-2-acetamido-1-O-allyl-2-deoxy-β-d-glucopyranosid 38e



Allgemeine Versuchsvorschrift **d**).

Ausbeute: 39.7 mg (51.8 μmol, 73 %) eines farblosen Feststoffs.

Molare Masse: 765.79 g/mol

Summenformel: C₃₅H₄₈FN₅O₁₃

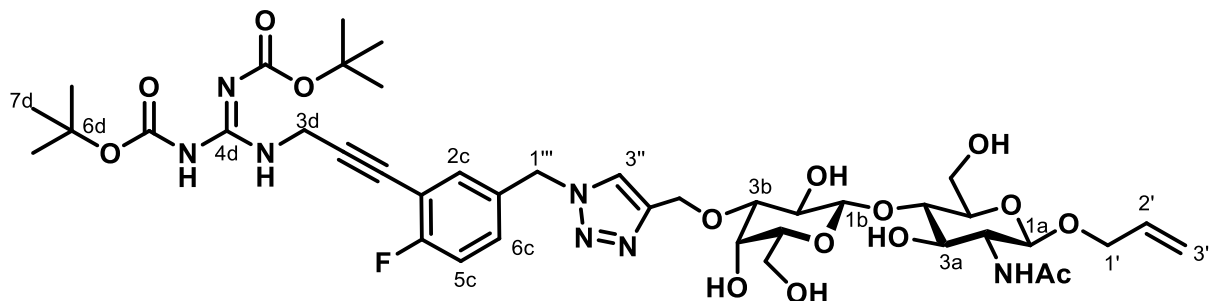
¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 8.06 (s, 1H, *H*-3''), 7.46–7.42 (m, 1H, *H*-2c), 7.41–7.36 (ddd, ³*J*_{5,6} = 8.3 Hz, ⁴*J*_{F,4} = 5.0 Hz, ⁴*J*_{2,6} = 2.6 Hz 1H, *H*-6c), 7.15 (dd, ³*J*_{F,5} = 8.9 Hz, ³*J*_{4,5} = 8.9 Hz, 1H, *H*-5c), 5.94–5.82 (m, 1H, *H*-2'), 5.65 (s, 2H, *H*-1'''), 5.27 (ddd, ³*J* = 17.3 Hz, ⁴*J* = 3.6 Hz, ²*J* = 1.7 Hz, 1H, *H*-3'_{trans}), 5.13 (ddd, ³*J* = 10.5 Hz, ⁴*J* = 3.3 Hz, ²*J* = 1.5 Hz, 1H, *H*-3'_{cis}), 4.85–4.70 (m, 2H, *H*-1''), 4.44 (d, ³*J* = 8.2 Hz, 1H, *H*-1a), 4.41 (d, ³*J* = 7.7 Hz, 1H, *H*-1b), 4.35–4.29 (m, 1H, *H*-1'), 4.09–3.98 (m, 4H, *H*-1', *H*-4b, *H*-3d), 3.92 (dd, ²*J* = 12.1 Hz, ³*J* = 2.5 Hz, 1H, *H*-6a), 3.84 (dd, ²*J* = 12.1 Hz, ³*J* = 4.3 Hz, 1H, *H*-6a), 3.80–3.74 (m, 2H, *H*-2a, *H*-6b), 3.71–3.66 (m, 1H, *H*-6b), 3.66–3.60 (m, 3H, *H*-2b, *H*-3a, *H*-4a), 3.59–3.55 (m, 1H, *H*-5b), 3.43–3.36 (m, 2H, *H*-3b, *H*-5a), 1.97 (s, 3H, C(O)CH₃), 1.46 (s, 9H, *H*-6d) ppm.

³C-NMR (100 MHz, MeOD): δ = 173.5 (C(O)OMe), 135.5 (C-2''), 131.2 (d, ³*J* = 8.4 Hz, C-6c), 125.0 (C-3''), 117.1 (d, ²*J* = 21.9 Hz, C-5d), 116.9 (C-3'), 104.9 (C-1b), 101.9 (C-1a), 82.8 (C-3b), 81.0 (C-5d), 76.9 (C-5a), 76.6 (C-5b), 74.2 (C-3a), 71.7 (C-4a), 70.7 (C-1'), 66.8 (C-4b), 63.6 (C-1''), 62.5 (C-6b), 62.0 (C-6a), 56.6 (C-2a), 53.7 (C-1'''), 31.4 (C-3d), 28.7 (C-6d), 22.9 (OCH₃) ppm.

¹⁹F{¹H}-NMR (376 MHz, MeOD): δ = -112.9 ppm.

MS (ESI *m/z*) berechnet für [M+Na]⁺ 788.3115, gefunden 788.3119, (|Δ*m/z*| = 1.2 ppm).

7.2.6.26 3-O-[*N,N*-Di-*tert*-butoxycarbonyl(guanidino)](3-(3-prop-2-in-1yl)-4-fluorbenzyl)-1,2,3-triazol-4-yl]methyl- β -d-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-1-O-allyl-2-deoxy- β -d-glucopyranosid **38f**



Allgemeine Versuchsvorschrift **d**).

Ausbeute: 48.8 mg (53.7 μ mol, 82 %) eines farblosen Feststoffs.

Molare Masse: 907.95 g/mol

Summenformel: C₄₁H₅₈FN₇O₁₅

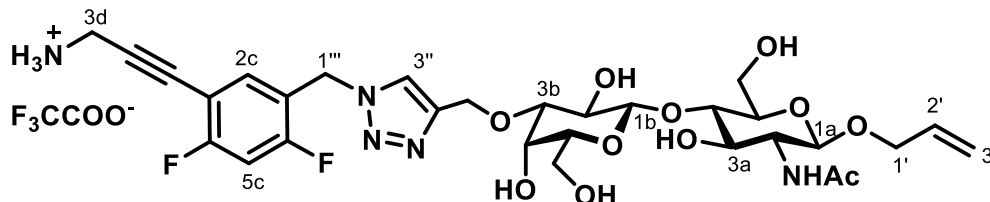
¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 8.01 (s, 1H, *H*-3''), 7.49 (dd, ⁴*J*_{F,2} = 6.6 Hz, ⁴*J*_{2,6} = 2.3 Hz, *H*-2c), 7.35 (ddd, ³*J*_{5,6} = 8.5 Hz, ⁴*J*_{F,6} = 4.9 Hz, ⁴*J*_{2,6} = 2.4 Hz, *H*-6c), 7.16 (dd, ³*J*_{F,5} = 8.9 Hz, ³*J*_{5,6} = 8.9 Hz, 1H, *H*-5c), 5.94–5.82 (m, 1H, *H*-2'), 5.65 (s, 2H, *H*-1'''), 5.27 (ddd, ³*J* = 17.3 Hz, ⁴*J* = 3.6 Hz, ²*J* = 1.7 Hz, 1H, *H*-3'_{trans}), 5.13 (ddd, ³*J* = 10.5 Hz, ⁴*J* = 3.3 Hz, ²*J* = 1.5 Hz, 1H, *H*-3'_{cis}), 4.81 (dd, ²*J* = 12.2 Hz, H, *H*-1''), 4.73 (dd, ²*J* = 12.2 Hz, H, *H*-1'), 4.44 (d, ³*J* = 8.2 Hz, 1H, *H*-1a), 4.41 (d, ³*J* = 7.7 Hz, 1H, *H*-1b), 4.35–4.29 (m, 1H, *H*-1'), 4.09–3.98 (m, 4H, *H*-1', *H*-4b, *H*-3d), 3.92 (dd, ²*J* = 12.1 Hz, ³*J* = 2.5 Hz, 1H, *H*-6a), 3.84 (dd, ²*J* = 12.1 Hz, ³*J* = 4.3 Hz, 1H, *H*-6a), 3.80–3.74 (m, 2H, *H*-2a, *H*-6b), 3.71–3.66 (m, 1H, *H*-6b), 3.66–3.60 (m, 3H, *H*-2b, *H*-3a, *H*-4a), 3.59–3.55 (m, 1H, *H*-5b), 3.42–3.35 (m, 2H, *H*-3b, *H*-5a), 1.96 (s, 3H, C(O)CH₃), 1.53, 1.49 (s, 2 x 9H, *H*-7d) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD): δ = 173.5 (C(O)OMe), 164.4 (C-4d), 164.0 (d, ¹*J* = 252.1 Hz, C-4c), 157.2 (C-5d), 153.9 (C-5d), 135.5 (C-2''), 134.7 (C-2c), 133.1 (d, ⁴*J* = 3.8 Hz, C-1c), 131.6 (d, ³*J* = 8.3 Hz, C-6c), 125.0 (C-3''), 117.1 (d, ²*J* = 21.8 Hz, C-5c), 116.9 (C-3'), 112.9 (d, ²*J* = 16.4 Hz, C-3c), 104.9 (C-1b), 101.9 (C-1a), 84.7 (C-6d) 82.9 (C-3b), 81.0 (C-2b), 80.7 (C-6d), 76.9 (C-5a), 76.6 (C-5b), 74.2 (C-3a), 71.7 (C-4a), 70.7 (C-1'), 66.8 (C-4b), 63.6 (C-1''), 62.6 (C-6b), 62.0 (C-6a), 56.6 (C-2a), 53.7-(1'''), 31.8 (C-3d), 28.5, 28.2 (C-7d), 22.9 (OCH₃) ppm.

¹⁹F{¹H}-NMR (376 MHz, MeOD): δ = -112.6 ppm.

MS (ESI *m/z*) berechnet für [M+Na]⁺ 930.3867, gefunden 930.3886, ($|\Delta m/z|$ = 2.0 ppm).

7.2.6.27 3-O-[(1-(3-(3-aminoprop-1-yn-1-yl)-4,6-difluorbenzyl)-1,2,3-triazol-4-yl)methyl- β -d-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-1-O-allyl-2-deoxy- β -d-glucopyranosid 39a



Allgemeine Versuchsvorschrift e).

Ausbeute: 137 mg (172 μ mol, 97 %) eines farblosen Feststoffs.

Molare Masse: 797.68 g/mol als TFA-Salz

Summenformel: C₃₂H₄₀F₅N₅O₁₃

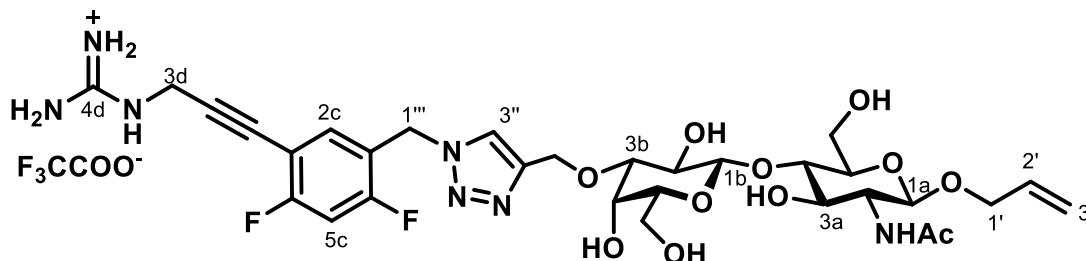
¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 8.07 (s, 1H, *H*-3''), 7.50 (t appt, ⁴*J*_{F,2} = 7.9 Hz, 1H, *H*-2c), 7.21 (dd, ³*J*_{F,5} = 9.6 Hz, 1H, *H*-5c), 5.93–5.84 (m, 1H, *H*-2'), 5.66 (s, 2H, *H*-1'''), 5.27 (ddd, ³*J* = 17.3 Hz, ⁴*J* = 3.6 Hz, ²*J* = 1.8 Hz, 1H, *H*-3'_{trans}), 5.14 (ddd, ³*J* = 10.5 Hz, ⁴*J* = 3.3 Hz, ²*J* = 1.4 Hz, 1H, *H*-3'_{cis}), 4.83 (d, ²*J* = 12.4 Hz, 1H, *H*-1''), 4.75 (d, ²*J* = 12.4 Hz, 1H, *H*-1''), 4.44 (d, ³*J* = 8.4 Hz, 1H, *H*-1a), 4.40 (d, ³*J* = 7.8 Hz, 1H, *H*-1b), 4.35–4.30 (m, 1H, *H*-1'), 4.09–4.00 (m, 4H, *H*-1', *H*-4b, *H*-3d), 3.91 (dd, ²*J* = 12.2 Hz, ³*J* = 2.5 Hz, 1H, *H*-6a), 3.84 (dd, ²*J* = 12.1 Hz, ³*J* = 4.3 Hz, 1H, *H*-6a), 3.80–3.73 (m, 2H, *H*-2, *H*-6b), 3.70–3.66 (m, 1H, *H*-6b), 3.66–3.60 (m, 3H, *H*-2b, *H*-3a, *H*-4a), 3.57–3.54 (m, 1H, *H*-5b), 3.41–3.38 (m, 2H, *H*-3b, *H*-5a), 1.97 (s, 3H, C(O)CH₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD): δ = 173.6 (C(O)OMe), 164.8 (dd, ¹*J* = 255.7 Hz, ³*J* = 12.6 Hz, C-6c), 162.5 (dd, ¹*J* = 255.0 Hz, ³*J* = 11.7 Hz, C-4c), 146.7 (C-2''), 136.4 (dd, ³*J* = 5.2 Hz, ³*J* = 2.5 Hz, C-2c), 135.5 (C-2'), 125.5 (C-3''), 121.2 (dd, ²*J* = 16.0 Hz, ⁴*J* = 4.0 Hz, C-1c), 117.0 (C-3'), 108.2 (dd, ²*J* = 16.3 Hz, ⁴*J* = 4.2 Hz, C-3c), 121.2 (t appt, ²*J* = 26.1 Hz, C-5c), 105.0 (C-1b), 101.9 (C-1a), 87.3 (C-1d), 82.6 (C-3b), 81.0 (C-2b), 79.6 (C-2d), 77.0 (C-5a), 76.5 (C-5b), 74.2 (C-3a), 71.7 (C-4a), 70.8 (C-1'), 66.9 (C-4b), 63.5 (C-1''), 62.5 (C-6b), 62.0 (C-6a), 56.6 (C-2a), 47.7 (C-1'''), 30.6 (C-3d), 22.9 (OCH₃) ppm.

¹⁹F{¹H}-NMR (376 MHz, MeOD): δ = -77.1 (F₃COO⁻), -106.5 (d, ⁴*J* = 10.3 Hz), -110.8 (d, ⁴*J* = 10.3 Hz) ppm.

MS (ESI *m/z*) berechnet für [M+Na]⁺ 706.2506, gefunden 706.2518, (| $\Delta m/z$ | = 1.6 ppm).

7.2.6.28 3-O-[(1-(3-(3-guanidinoprop1-in-yl)-4,6-difluorbenzyl)-1,2,3-triazol-4-yl)methyl- β -d-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-1-O-allyl-2-deoxy- β -d-glucopyranosid 39b



Allgemeine Versuchsvorschrift **e**).

Ausbeute: 16.2 mg (19.2 μ mol, 95 %) eines farblosen Feststoffs.

Molare Masse: 839.73 g/mol als TFA-Salz

Summenformel: C₃₃H₄₂F₅N₇O₁₃

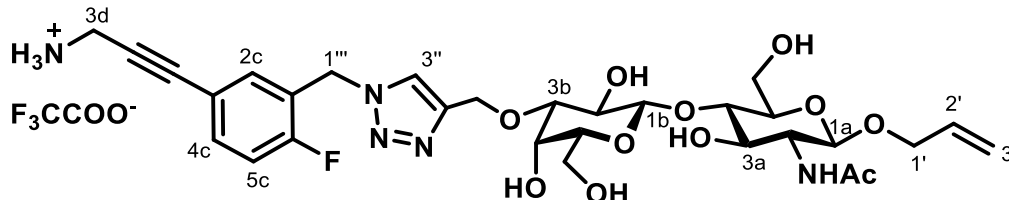
¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 8.01 (s, 1H, *H*-3''), 7.57 (dd, ⁴*J*_{F,2} = 7.9 Hz, 1H, *H*-2c), 7.13 (dd, ³*J*_{F,5} = 9.6 Hz, 1H, *H*-5c), 5.94–5.82 (m, 1H, *H*-2'), 6.65 (s, 2H, *H*-1'''), 5.27 (ddd, ³*J* = 17.3 Hz, ⁴*J* = 3.6 Hz, ²*J* = 1.8 Hz, 1H, *H*-3'_{trans}), 5.13 (ddd, ³*J* = 10.5 Hz, ⁴*J* = 3.3 Hz, ²*J* = 1.4 Hz, 1H, *H*-3'_{cis}), 4.85–4.70 (m, 2H, *H*-1''), 4.44 (d, ³*J* = 8.2 Hz, 1H, *H*-1a), 4.41 (d, ³*J* = 7.7 Hz, 1H, *H*-1b), 4.35–4.29 (m, 1H, *H*-1'), 4.09–3.98 (m, 4H, *H*-1', *H*-4b, *H*-3d), 3.92 (dd, ²*J* = 12.1 Hz, ³*J* = 2.5 Hz, 1H, *H*-6a), 3.84 (dd, ²*J* = 12.1 Hz, ³*J* = 4.3 Hz, 1H, *H*-6b), 3.80–3.74 (m, 2H, *H*-2a, *H*-6b), 3.71–3.66 (m, 1H, *H*-6b), 3.66–3.60 (m, 3H, *H*-2b, *H*-3a, *H*-4a), 3.59–3.55 (m, 1H, *H*-5b), 3.43–3.36 (m, 2H, *H*-3b, *H*-5a), 1.97 (s, 3H, C(O)CH₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD): δ = 173.6 (C(O)OMe), 164.7 (dd, ¹*J* = 254.7 Hz, ³*J* = 12.2 Hz, C-4c), 162.1 (d, ¹*J* = 253.8 Hz, ³*J* = 11.9 Hz, C-6c), 158.7 (C-4d), 136.3 (m, C-2c), 135.5 (C-2''), 120.8 (dd, ²*J* = 15.8 Hz, ⁴*J* = 4.0 Hz, C-1c), 117.0 (C-3'), 109.0–108.8 (m, C-3c), 105.8 (dd, ²*J* = 26.0 Hz, ²*J* = 26.0 Hz, C-5c), 105.0 (C-1b), 101.9 (C-1a), 90.0 (C-2d), 82.6 (C-3b), 81.0 (C-2b), 77.0 (C-5a), 76.5 (C-5b), 74.2 (C-3a), 71.7 (C-4a), 70.8 (C-1'), 66.9 (C-4b), 63.6 (C-1''), 62.5 (C-6b), 62.0 (C-6a), 56.6 (C-2a), 32.4 (C-3d), 22.9 (OCH₃) ppm.

¹⁹F{¹H}-NMR (376 MHz, MeOD): δ = -76.8 (F₃COO⁻), -106.9 (d, ²*J* = 10.0 Hz), -111.8 (d, ²*J* = 9.9 Hz) ppm.

MS (ESI *m/z*) berechnet für [M+H]⁺726.2905, gefunden 726.2909, (| $\Delta m/z$ | = 0.6 ppm).

7.2.6.29 3-O-[(1-(3-(3-aminoprop-1-yn-1-yl)-6-fluorbenzyl)-1,2,3-triazol-4-yl)methyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-1-O-allyl-2-deoxy- β -D-glucopyranosid 39c



Allgemeine Versuchsvorschrift **e**).

Ausbeute: 93.2 mg (120 μ mol, 88 %) eines farblosen Feststoffs.

Molare Masse: 779.70 g/mol als TFA-Salz

Summenformel: C₃₂H₄₁F₄N₅O₁₃

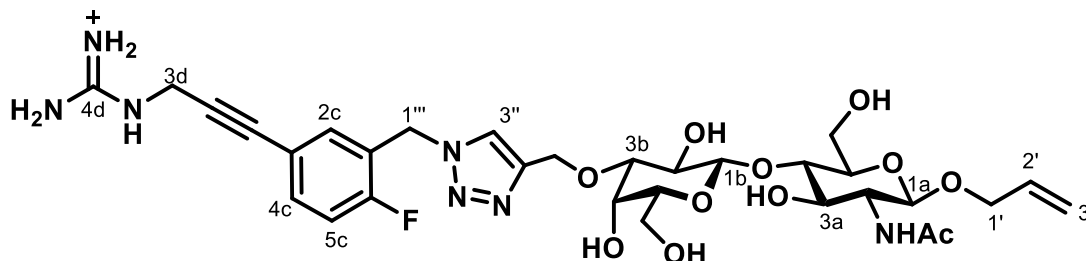
¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 8.07 (s, 1H, *H*-3'''), 7.53 (ddd, ³*J*_{4,5} = 8.6 Hz, ⁴*J*_{F,4} = 5.0 Hz, ⁴*J*_{2,4} = 2.2 Hz, 1H, *H*-4c), 7.38 (dd, ⁴*J*_{2,F} = 7.0 Hz, ⁴*J*_{2,4} = 2.1 Hz, 1H, *H*-2c), 7.23 (dd, ³*J*_{F,5} = 9.7 Hz, ³*J*_{4,5} = 8.6 Hz, 1H, *H*-5c), 5.93–5.83 (m, 1H, *H*-2'), 5.69 (s, 2H, *H*-1'''), 5.27 (ddd, ³*J* = 17.3 Hz, ⁴*J* = 3.6 Hz, ²*J* = 1.8 Hz, 1H, *H*-3'_{trans}), 5.14 (ddd, ³*J* = 10.5 Hz, ⁴*J* = 3.3 Hz, ²*J* = 1.4 Hz, 1H, *H*-3'_{cis}), 4.84 (d, ²*J* = 12.4 Hz, 1H, *H*-1''), 4.76 (d, ²*J* = 12.4 Hz, 1H, *H*-1'), 4.44 (d, ³*J* = 8.4 Hz, 1H, *H*-1a), 4.40 (d, ³*J* = 7.8 Hz, 1H, *H*-1b), 4.35–4.30 (m, 1H, *H*-1'), 4.09–4.04 (m, 1H, *H*-1'), 4.02–4.00 (m, 3H, *H*-4b, *H*-3d), 3.91 (dd, ²*J* = 12.2 Hz, ³*J* = 2.6 Hz, 1H, *H*-6a), 3.85 (dd, ²*J* = 12.2 Hz, ³*J* = 4.2 Hz, 1H, *H*-6a), 3.80–3.74 (m, 2H, *H*-2a, *H*-6b), 3.68 (dd, ²*J* = 11.5 Hz, ³*J* = 4.4 Hz, 1H, *H*-6b), 3.66–3.60 (m, 3H, *H*-2b, *H*-3a, *H*-4a), 3.58–3.54 (m, 1H, *H*-5b), 3.41–3.36 (m, 2H, *H*-3b, *H*-5a), 1.97 (s, 3H, C(O)CH₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD): δ = 173.6 (C(O)OMe), 162.1 (d, ¹*J* = 252.0 Hz, C-6c), 146.6 (C-2''), 135.6 (d, ³*J* = 8.2 Hz, C-4c), 135.5 (C-2'), 134.9 (d, ³*J* = 3.9 Hz, C-2c), 125.5 (C-3''), 124.9 (d, ²*J* = 15.9 Hz, C-1c), 119.7 (d, ⁴*J* = 3.9 Hz, C-3c), 117.5 (d, ²*J* = 22.6 Hz, C-5c), 117.0 (C-3'), 105.0 (C-1b), 101.9 (C-1a), 86.1 (C-1d), 82.6 (C-3b), 82.0 (C-2d), 81.0 (C-2b), 77.0 (C-5b), 76.5 (C-5a), 74.3 (C-3a), 71.7 (C-4a), 70.8 (C-1'), 66.9 (C-4b), 63.5 (C-1''), 62.5 (C-6b), 62.0 (C-6a), 56.6 (C-2a), 48.2 (C-1'''), 30.6 (C-3d), 22.9 (OCH₃) ppm.

¹⁹F{¹H}-NMR (376 MHz, MeOD): δ = -77.1 (F₃COO⁻), -116.4 ppm.

MS (ESI *m/z*) berechnet für [M+Na]⁺ 688.2601, gefunden 688.2616, ($|\Delta m/z|$ = 2.2 ppm).

7.2.6.30 3-O-[(1-(3-(3-guanidinoprop1-in-yl)-6-fluorbenzyl)-1,2,3-triazol-4-yl)methyl- β -d-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-1-O-allyl-2-deoxy- β -d-glucopyranosid 39d



Allgemeine Versuchsvorschrift **e**).

Ausbeute: 59.9 mg (72.9 μ mol, 89 %) eines farblosen Feststoffs.

Molare Masse: 821.74 g/mol als TFA-Salz

Summenformel: C₃₃H₄₃F₄N₇O₁₃

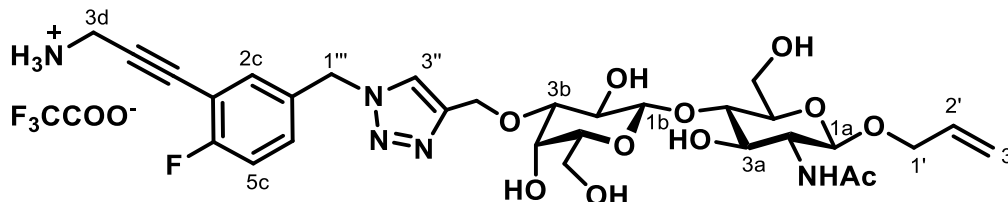
¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 8.06 (s, 1H, *H*-3''), 7.48 (ddd, ³*J*_{4,5} = 8.6 Hz, ⁴*J*_{F,4} = 5.0 Hz, ⁴*J*_{2,4} = 2.2 Hz, 1H, *H*-4c), 7.34 (dd, ⁴*J*_{2,F} = 7.0 Hz, ⁴*J*_{2,4} = 2.1 Hz, 1H, *H*-2c), 7.20 (dd, ³*J*_{F,5} = 9.7 Hz, ³*J*_{4,5} = 8.6 Hz, 1H, *H*-5c), 5.93–5.84 (m, 1H, *H*-2'), 5.67 (s, 2H, *H*-1'''), 5.27 (ddd, ³*J* = 17.3 Hz, ⁴*J* = 3.6 Hz, ²*J* = 1.8 Hz, 1H, *H*-3'_{trans}), 5.14 (ddd, ³*J* = 10.5 Hz, ⁴*J* = 3.3 Hz, ²*J* = 1.4 Hz, 1H, *H*-3'_{cis}), 4.84 (d, ²*J* = 12.5 Hz, 1H, *H*-1''), 4.76 (d, ²*J* = 12.4 Hz, 1H, *H*-1''), 4.44 (d, ³*J* = 8.4 Hz, 1H, *H*-1), 4.40 (d, ³*J* = 7.8 Hz, 1H, *H*-1b), 4.35–4.30 (m, 1H, *H*-1'), 4.25 (s, 2H, *H*-3d), 4.09–4.04 (m, 1H, *H*-1'), 4.01–4.00 (m, 1H, *H*-4b), 3.91 (dd, ²*J* = 12.2 Hz, ³*J* = 2.6 Hz, 1H, *H*-6a), 3.84 (dd, ²*J* = 12.2 Hz, ³*J* = 4.3 Hz, 1H, *H*-6a), 3.80–3.73 (m, 2H, *H*-2a, *H*-6b), 3.69–3.60 (m, 4H, *H*-2b, *H*-3a, *H*-4a, *H*-6b), 3.57–3.54 (m, 1H, *H*-5b), 3.40–3.37 (m, 2H, *H*-3b, *H*-5a), 1.97 (s, 3H, C(O)CH₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD): δ = 173.6 (C(O)OMe), 161.8 (d, ¹*J* = 251.3 Hz, C-6c), 158.6 (C-4d), 135.5 (C-2'), 135.4 (d, ³*J* = 8.7 Hz, C-4c), 134.8 (d, ³*J* = 3.7 Hz, C-2c), 125.5 (C-3''), 124.7 (d, ²*J* = 15.9 Hz, C-1c), 120.4 (d, ⁴*J* = 3.9 Hz, C-3c), 117.4 (d, ²*J* = 22.6 Hz, C-5c), 117.0 (C-3'), 105.0 (C-1b), 101.9 (C-1a), 84.5 (C-1d), 83.6 (C-2d), 82.5 (C-3b), 81.1 (C-2b), 77.0 (C-5b), 76.5 (C-5a), 74.3 (C-3a), 71.7 (C-4a), 70.8 (C-1'), 66.9 (C-4b), 63.5 (C-1''), 62.6 (C-6b), 62.0 (C-6a), 56.6 (C-2a), 48.2 (C-1'''), 32.4 (C-3d), 22.9 (OCH₃) ppm.

¹⁹F{¹H}-NMR (376 MHz, MeOD): δ = -77.0 (F₃COO⁻), -117.4 ppm.

MS (ESI *m/z*) berechnet für [M+Na]⁺ 730.2819, gefunden 730.2808, ($|\Delta m/z|$ = 1.4 ppm).

7.2.6.31 3-O-[(1-(3-(3-aminoprop-1-yn-1-yl)-4-fluorbenzyl)-1,2,3-triazol-4-yl)methyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-1-O-allyl-2-deoxy- β -D-glucopyranosid 39e



Allgemeine Versuchsvorschrift **e**).

Ausbeute: 37.2 mg (47.7 μ mol, 99 %) eines farblosen Feststoffs.

Molare Masse: 779.70 g/mol als TFA-Salz

Summenformel: C₃₂H₄₁F₄N₅O₁₃

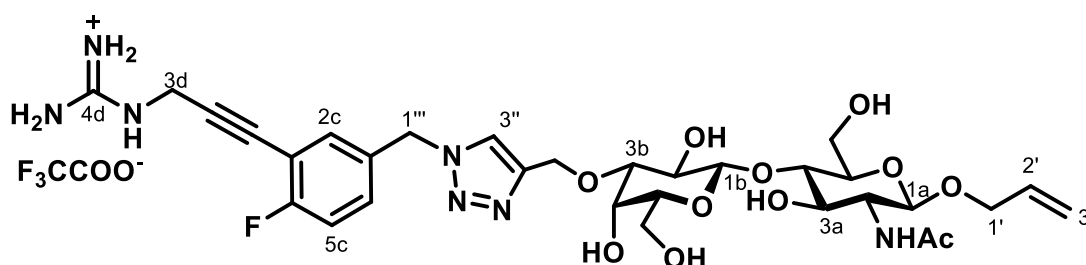
¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 8.04 (s, 1H, H-3''), 7.49–7.42 (m, 1H, H-2c), 7.22 (dd, ³J_{F,5} = 8.9 Hz, ³J_{4,5} = 8.9 Hz, 1H, H-5c), 5.94–5.82 (m, 1H, H-2'), 6.65 (s, 2H, H-1'''), 5.27 (ddd, ³J = 17.3 Hz, ⁴J = 3.6 Hz, ²J = 1.7 Hz, 1H, H-3'_{trans}), 5.13 (ddd, ³J = 10.5 Hz, ⁴J = 3.3 Hz, ²J = 1.5 Hz, 1H, H-3'_{cis}), 4.83 (d, ²J = 12.4 Hz, 1H, H-1''), 4.75 (d, ²J = 12.4 Hz, 1H, H-1''), 4.44 (d, ³J = 8.2 Hz, 1H, H-1a), 4.41 (d, ³J = 7.7 Hz, 1H, H-1b), 4.35–4.29 (m, 1H, H-1'), 4.09–3.98 (m, 4H, H-1', H-4b, H-3d), 3.92 (dd, ²J = 12.1 Hz, ³J = 2.5 Hz, 1H, H-6a), 3.84 (dd, ²J = 12.1 Hz, ³J = 4.3 Hz, 1H, H-6a), 3.80–3.74 (m, 2H, H-2a, H-6b), 3.71–3.66 (m, 1H, H-6b), 3.66–3.60 (m, 3H, H-2b, H-3a, H-4a), 3.59–3.55 (m, 1H, H-5b), 3.43–3.36 (m, 2H, H-3b, H-5a), 1.97 (s, 3H, C(O)CH₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD): δ = 173.6 (C(O)OMe), 164.1 (d, ¹J = 252.8 Hz, C-4c), 146.7 (C-2'), 135.5 (C-3''), 134.4 (C-2c), 132.5 (d, ³J = 8.6 Hz, C-6c), 125.5 (C-3''), 117.3 (d, ²J = 21.6 Hz, C-5c), 116.9 (C-3'), 111.7 (d, ²J = 16.8 Hz, C-3c), 104.9 (C-1b), 101.9 (C-1a), 82.8 (C-3b), 81.0 (C-5d), 76.9 (C-5a), 76.6 (C-5b), 74.2 (C-3a), 71.7 (C-4a), 70.7 (C-1'), 66.8 (C-4b), 63.6 (C-1''), 62.5 (C-6b), 62.0 (C-6a), 56.6 (C-2a), 53.7 (C-1'''), 31.4 (C-3d), 22.9 (OCH₃) ppm.

¹⁹F{¹H}-NMR (376 MHz, MeOD): δ = -77.2 (F₃COO⁻), -112.4 ppm.

MS (ESI m/z) berechnet für [M+Na]⁺ 666.27811, gefunden 666.27866, ($|\Delta m/z|$ = 0.82 ppm).

7.2.6.32 3-O-[(1-(3-(3-guanidinoprop1-in-yl)-4-fluorbenzyl)-1,2,3-triazol-4-yl)methyl- β -d-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-1-O-allyl-2-deoxy- β -d-glucopyranosid 39f



Allgemeine Versuchsvorschrift **e**).

Ausbeute: 13.7 mg (16.6 μ mol, 94 %) eines farblosen Feststoffs.

Molare Masse: 821.74 g/mol als TFA-Salz

Summenformel: C₃₃H₄₃F₄N₇O₁₃

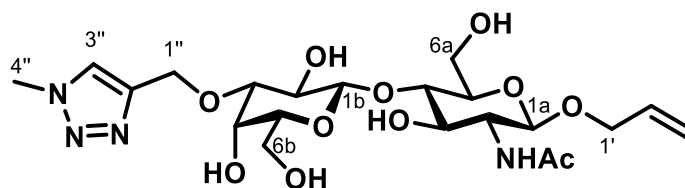
¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 8.01 (s, 1H, H-3''), 7.44–7.39 (m, 2H, H-2*, H-6c), 7.16 (dd, ³J_{F,5} = 8.9 Hz, ³J_{5,6} = 8.9 Hz, 1H, H-5c), 5.94–5.82 (m, 1H, H-2'), 6.65 (s, 2H, H-1''), 5.27 (ddd, ³J = 17.3 Hz, ⁴J = 3.6 Hz, ²J = 1.7 Hz, 1H, H-3'_{trans}), 5.13 (ddd, ³J = 10.5 Hz, ⁴J = 3.3 Hz, ²J = 1.5 Hz, 1H, H-3'_{cis}), 4.81 (dd, ²J = 12.2 Hz, H, H-1''), 4.73 (dd, ²J = 12.2 Hz, H, H-1''), 4.44 (d, ³J = 8.2 Hz, 1H, H-1a), 4.41 (d, ³J = 7.7 Hz, 1H, H-1b), 4.35–4.29 (m, 1H, H 1'), 4.09–3.98 (m, 4H, H-1', H-4b, H-3d), 3.92 (dd, ²J = 12.1 Hz, ³J = 2.5 Hz, 1H, H-6a), 3.84 (dd, ²J = 12.1 Hz, ³J = 4.3 Hz, 1H, H-6a), 3.80–3.74 (m, 2H, H-2a, H-6b), 3.71–3.66 (m, 1H, H-6b), 3.66–3.60 (m, 3H, H-2b, H-3a, H-4a), 3.59–3.55 (m, 1H, H-5b), 3.42–3.35 (m, 2H, H-3b, H-5a), 1.96 (s, 3H, C(O)CH₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD): δ = 173.6 (C(O)OMe), 16, 164.0 (d, ¹J = 252.2 Hz, C-4c), 158.6 (C-4d), 135.5 (C-2''), 134.4 (C-2c), 133.4 (d, ⁴J = 3.8 Hz, C-1c), 131.9 (d, ³J = 8.3 Hz, C-6c), 125.0 (C-3''), 117.1 (d, ²J = 21.8 Hz, C-5c), 116.9 (C-3'), 112.9 (d, ²J = 16.4 Hz, C-3c), 104.9 (C-1b), 101.9 (C-1a), 84.7 (C-6d) 82.9 (C-3b), 81.0 (C-2b), 80.7 (C-6d), 76.9 (C-5), 76.6 (C-5b), 74.2 (C-3a), 71.7 (C-4a), 70.7 (C-1'), 66.8 (C-4b), 63.6 (C-1''), 62.6 (C-6b), 62.0 (C-6a), 56.6 (C-2a), 53.7-(1''), 31.8 (C-3d), 22.9 (OCH₃) ppm.

¹⁹F{¹H}-NMR (376 MHz, MeOD): δ = -76.9 (F₃COO⁻), -112.7 ppm.

MS (ESI m/z) berechnet für [M+Na]⁺ 730.2819, gefunden 730.2831, ($|\Delta m/z|$ = 1.7 ppm).

7.2.6.33 3-O-(Methyl-1,2,3-triazol-4-yl)methyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-1-O-allyl-2-deoxy- β -D-glucopyranosid 40



MeI (135 μ L, 218 mmol, 10.0 $\ddot{\text{A}}\text{q}$) wurden in THF (1.0 mL) verdünnt und NaN_3 (184 mg, 2.83 mmol, 13.0 $\ddot{\text{A}}\text{q}$) in H_2O (1.0 mL) zugegeben und das Gemisch für 18 h bei RT gerührt. Anschließend wurden **5** (100 mg, 218 μ mol, 1.00 $\ddot{\text{A}}\text{q}$), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ -Lösung (109 μ L, 0.2 M, 21.8 μ mol, 0.10 $\ddot{\text{A}}\text{q}$), zuletzt Natriumascorbat-Lösung (239 μ L, 1.0 M, 239 μ mol, 1.10 $\ddot{\text{A}}\text{q}$) und das Reaktionsgemisch für 2 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch über Kieselgel (DCM:MeOH = 10:1 \rightarrow 5:1) gereinigt.

Ausbeute: 76.1 mg (147 μ mol, 67 %) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_{11}$.

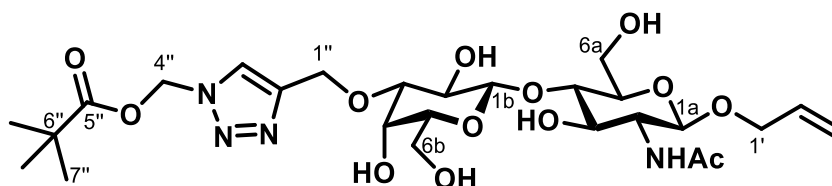
Molare Masse: 518.52 g/mol.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOD): δ = 7.98 (s, 1H, $H\text{-}3''$), 5.93–5.83 (m, 1H, $H\text{-}2'$), 5.27 (ddd, 3J = 17.3 Hz, 4J = 3.3 Hz, 2J = 1.6 Hz, 1H, $H\text{-}3'_{\text{trans}}$), 5.17 (ddd, 3J = 10.5 Hz, 4J = 2.4 Hz, 2J = 1.6 Hz, 1H, $H\text{-}3'_{\text{cis}}$), 4.87–4.82 (m, 1H, $H\text{-}1''$), 4.80 (d, 2J = 12.2 Hz, 1H, $H\text{-}1''$), 4.48 (d, 3J = 8.4 Hz, 1H, $H\text{-}1\text{a}$), 4.44 (d, 3J = 7.8 Hz, 1H, $H\text{-}1\text{b}$), 4.35–4.30 (m, 1H, $H\text{-}1'$), 4.11 (s, 3H, $H\text{-}4''$), 4.09–4.04 (m, 2H, $H\text{-}4\text{b}$, $H\text{-}1'$), 3.93 (dd, 2J = 12.1 Hz, 3J = 2.1 Hz, 1H, $H\text{-}6\text{a}$), 3.85 (dd, 2J = 12.2 Hz, 3J = 4.3 Hz, 1H, $H\text{-}6\text{a}$), 3.81–3.75 (m, 2H, $H\text{-}2\text{a}$, $H\text{-}6\text{b}$), 3.73–3.69 (m, 1H, $H\text{-}6\text{b}$), 3.66–3.61 (m, 4H, $H\text{-}2\text{b}$, $H\text{-}3\text{a}$, $H\text{-}4\text{a}$, $H\text{-}5\text{b}$), 3.48–3.42 (m, 2H, $H\text{-}3\text{b}$, $H\text{-}5\text{a}$), 1.99 (s, 3H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, MeOD): δ = 174.1 ($\text{C}(\text{O})\text{OMe}$), 145.9 ($\text{C}\text{-}2'$), 135.1 ($\text{C}\text{-}2'$), 126.4 ($\text{C}\text{-}3''$), 117.6 ($\text{C}\text{-}3'$), 104.6 ($\text{C}\text{-}1\text{b}$), 101.7 ($\text{C}\text{-}1\text{a}$), 82.2 ($\text{C}\text{-}3\text{b}$), 80.5 ($\text{C}\text{-}2\text{b}$), 76.7 ($\text{C}\text{-}5\text{b}$), 76.3 ($\text{C}\text{-}5\text{a}$), 74.0 ($\text{C}\text{-}3\text{a}$), 71.5 ($\text{C}\text{-}4\text{a}$), 71.0 ($\text{C}\text{-}1'$), 66.5 ($\text{C}\text{-}4\text{b}$), 63.1 ($\text{C}\text{-}1''$), 62.4 ($\text{C}\text{-}6\text{b}$), 61.6 ($\text{C}\text{-}6\text{a}$), 56.4 ($\text{C}\text{-}2\text{a}$), 37.2 ($\text{C}\text{-}4''$) 23.0 (OCH_3) ppm.

MS (ESI m/z) berechnet für $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 541.2116, gefunden 541.2111, ($|\Delta m/z|$ = 1.0 ppm).

7.2.6.34 3-O-(Pivalat-1,2,3-triazol-4-yl)methyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-1-O-allyl-2-deoxy- β -D-glucopyranosid 85



Allgemeine Versuchsvorschrift **d**), jedoch mit 3.00 Äquivalenten Azidomethylpivalat.

Ausbeute: 51.0 mg (82.4 μ mol, 90 %) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: C₂₆H₄₂N₄O₁₃

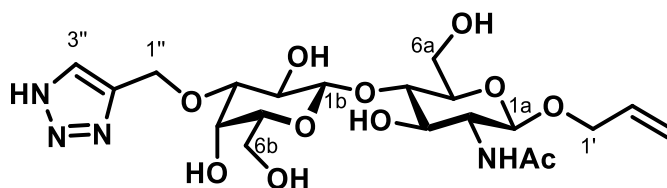
Molare Masse: 618.64 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 8.18 (s, 1H, *H*-3''), 6.32 (s, 2H, *H*-4''), 5.93–5.84 (m, 1H, *H*-2'), 5.27 (ddd, ³*J* = 17.2 Hz, ⁴*J* = 3.6 Hz, ²*J* = 1.8 Hz, 1H, *H*-3'_{trans}), 5.13 (ddd, ³*J* = 10.5 Hz, ⁴*J* = 3.3 Hz, ²*J* = 1.4 Hz, 1H, *H*-3'_{cis}), 4.87–4.84 (m, 1H, *H*-1''), 4.76 (d, ²*J* = 12.4 Hz, 1H, *H*-1''), 4.45 (d, ³*J* = 8.4 Hz, 1H, *H*-1), 4.42 (d, ³*J* = 7.8 Hz, 1H, *H*-1b), 4.35–4.30 (m, 1H, *H*-1'), 4.09–4.04 (m, 2H, *H*-4b, *H*-1'), 3.92 (dd, ²*J* = 12.2 Hz, ³*J* = 2.5 Hz, 1H, *H*-6a), 3.86 (dd, ²*J* = 12.1 Hz, ³*J* = 4.3 Hz, 1H, *H*-6a), 3.81–3.75 (m, 2H, *H*-2a, *H*-6b), 3.72–3.68 (m, 1H, *H*-6b), 3.67–3.57 (m, 4H, *H*-2b, *H*-3a, *H*-4a, *H*-5b), 3.46–3.39 (m, 2H, *H*-3b, *H*-5a), 1.97 (s, 3H, C(O)CH₃), 1.18 (s, 9H, C(CH₃)₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD): δ = 178.5 (C-5''), 173.5 (C(O)OMe), 146.6 (C-2'), 135.5 (C-2'), 126.2 (C-3''), 117.0 (C-3'), 104.9 (C-1b), 101.9 (C-1a), 82.5 (C-3b), 81.0 (C-2b), 76.9 (C-5b), 76.5 (C-5a), 74.2 (C-3a), 71.7 (C-4a), 71.2 (C-4''), 70.8 (C-1'), 66.9 (C-4b), 63.4 (C-1''), 62.5 (C-6b), 62.0 (C-6a), 56.5 (C-2a), 39.7 (C-6''), 27.2 (C-7''), 22.9 (OCH₃) ppm.

MS (ESI *m/z*) berechnet für [M+Na]⁺ 641.2641, gefunden 641.2635, ($|\Delta m/z|$ = 0.8 ppm).

7.2.6.35 3-O-(H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-1-O-allyl-2-deoxy- β -D-glucopyranosid 41



85 (56.5 mg, 91.3 μ mol, 1.00 \AA q.) wurden in trockenem MeOH (1.0 mL) gelöst und mit NaOMe-Lösung (5.4 m, 42.3 μ L, 228 μ mol, 2.50 \AA q.) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend für 3 h bei RT gerührt, anschließend mit H₂O (5 mL) verdünnt und mit saurem Ionentauscher neutralisiert. Die Lösung wurde vom Ionentauscher abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch über Kieselgel (DCM:MeOH = 10:1 \rightarrow 5:1) gereinigt.

Ausbeute: 30.5 mg (60.5 μ mol, 66 %) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: C₂₀H₃₂N₄O₁₁

Molare Masse: 504.49 g/mol

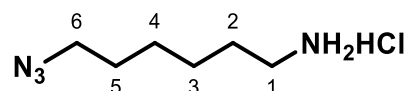
¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 7.87 (s, 1H, H-3''), 5.93–5.84 (m, 1H, H-2'), 5.27 (ddd, ³J = 17.3 Hz, ⁴J = 3.5 Hz, ²J = 1.7 Hz, 1H, H-3'_{trans}), 5.13 (ddd, ³J = 10.5 Hz, ⁴J = 3.1 Hz, ²J = 1.4 Hz, 1H, H-3'_{cis}), 4.87–4.84 (m, 1H, H-1''), 4.80 (d, ²J = 12.4 Hz, 1H, H-1''), 4.45 (d, ³J = 8.4 Hz, 1H, H-1), 4.42 (d, ³J = 7.9 Hz, 1H, H-1b), 4.35–4.30 (m, 1H, H-1'), 4.09–4.04 (m, 2H, H-4b, H-1'), 3.92 (dd, ²J = 12.1 Hz, ³J = 2.5 Hz, 1H, H-6a), 3.87 (dd, ²J = 12.1 Hz, ³J = 4.1 Hz, 1H, H-6a), 3.81–3.75 (m, 2H, H-2a, H-6b), 3.72–3.68 (m, 1H, H-6b), 3.67–3.57 (m, 4H, H-2b, H-3a, H-4a, H-5b), 3.45–3.39 (m, 2H, H-3b, H-5a), 1.97 (s, 3H, C(O)CH₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD): δ = 173.6 (C(O)OMe), 135.5 (C-2'), 117.0 (C-3'), 104.9 (C-1b), 101.9 (C-1a), 82.6 (C-3b), 80.9 (C-2b), 76.9 (C-5b), 76.5 (C-5a), 74.3 (C-3a), 71.7 (C-4a), 70.8 (C-1'), 66.9 (C-4b), 63.4 (C-1''), 62.5 (C-6b), 61.8 (C-6a), 56.5 (C-2a), 22.9 (OCH₃) ppm.

MS (ESI m/z) berechnet für [M+Na]⁺ 527.1960, gefunden 527.1941, ($|\Delta m/z|$ = 3.6 ppm).

7.2.7 Synthese von Azido-funktionalisierten Gal-1 Liganden

7.2.7.1 6-Azidohexan-1-amin 86



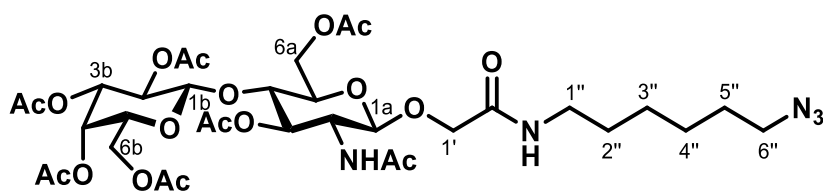
2-(6-Azidohexyl)isoindoline-1,3-dion (17.2 g, 63.3 mmol, 1.00 Äq.) wurde in EtOH (300 mL) und Hydrazinhydrat (10.2 mL, 211 mmol, 3.33 Äq.) gelöst und 3 h auf 90 °C erhitzt. Die Reaktionslösung wurde abgekühlt und der ausgefallene Feststoff abfiltriert. Die organische Phase wurde eingengt und mit wässriger HCl (0.2 M, 200 mL) neutralisiert. Die wässrige Phase wurde mit DCM extrahiert (5x 100 mL). Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet. Um das Amin als HCl-Salz zu erhalten wurde HCl-Lösung (1.25 M, 55.7 mL, 69.6 mmol, 1.10 Äq.) zugegeben und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: 10.0 mg (56.2 mmol, 89 %) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: C₆H₁₅N₄Cl

Molare Masse: 178.66 g/mol als HCl-Salz

¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 3.31 (t, ³J = 6.8 Hz, 2H, H-6), 2.93 (t, ³J = 7.7 Hz, 2H, H-1), 1.72–1.59 (m, 4H, H-2, H-5), 1.48–1.41 (m, 4H, H-3, H-4) ppm.

7.2.7.2 (6-Azidoheptylamido)-methyl-heptaacetylactosamin **42**

1-Allylheptaacetylactosamin **42** (hergestellt von *Dr. Nadja Bertleff-Zieschang* im Rahmen ihrer Promotion, 27.0 mg, 40.0 μmol , 1.00 $\text{\AA}q.$) wurden in DCM (1.0 mL), MeCN (1.0 mL), H_2O (0.5 mL) und AcOH (0.5 mL) gelöst, $\text{RuCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1.80 mg, 7.99 μmol , 0.20 $\text{\AA}q.$) und NaIO_4 (128 mg, 600 μmol , 15.0 $\text{\AA}q.$) zugegeben und das Reaktionsgemisch 3 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit DCM (20 mL) und ges. NH_4Cl -Lösung (20 mL) verdünnt und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit DCM (2x 20 mL) extrahiert, die vereinten, organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde 2 h an der Hochvakuumpumpe getrocknet. Anschließend wurde dieser in trockenem DMF (1.0 mL) gelöst und **86** (30.0 mg, 42.3 μmol , 4.00 $\text{\AA}q.$), DIPEA (60.0 μL , 346 μmol , 8.00 $\text{\AA}q.$) und HATU (32.1 mg, 84.3 μmol , 1.95 $\text{\AA}q.$) bei 0 °C zugegeben und das Reaktionsgemisch 16 h bei RT gerührt. Das Gemisch wurde mit ges. NH_4Cl -Lösung (20 mL) verdünnt und die wässrige Phase mit DCM (3x 20 mL) extrahiert. Die vereinten, organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Kieselgel (DCM:MeOH = 100:1 \rightarrow 50:1 \rightarrow 10:1 \rightarrow 5:1) gereinigt.

Ausbeute: 13.2 mg (16.1 μmol , 40 %) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: $\text{C}_{34}\text{H}_{51}\text{N}_5\text{O}_{18}$

Molare Masse: 817.80 g/mol

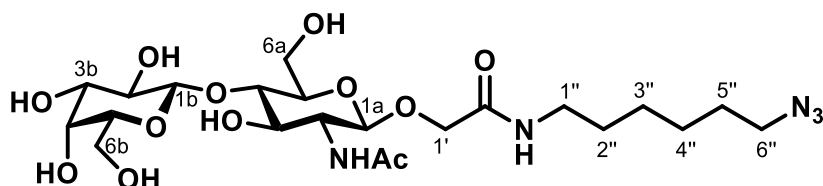
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 6.90–6.87 (m, 1H, C-1''NH), 5.98 (d, 3J = 8.6 Hz, 1H, C(O)NH), 5.36 (dd, 3J = 3.4 Hz, 3J = 1.0 Hz, 1H, H-4b), 5.10 (dd, 3J = 10.5 Hz, 3J = 7.8 Hz, 1H, H-2b), 5.01 (dd, 3J = 10.3 Hz, 3J = 8.9 Hz, 1H, H-3a), 4.96 (dd, 3J = 10.5 Hz, 3J = 3.4 Hz, 1H, H-3b), 4.49 (d, 3J = 7.8 Hz, 1H, H-1b), 4.45 (dd, 2J = 11.9 Hz, 3J = 2.2 Hz, 1H, H-6a), 4.34–4.30 (m, 2H, H-1a, H-1'), 4.15–4.05 (m, 4H, H-2a, H-6a, H-6b), 3.94 (d, 2J = 14.8 Hz, 1H, H-1'), 3.90–3.87 (m, 1H, H-5b), 3.77 (dd, 3J = 8.7 Hz, 1H, H-4a), 3.64–3.59 (m, 1H, H-5a), 3.27–3.22 (m, 4H, H-1'', H-6''), 2.14, 2.11, 2.10, 2.06, 2.05, 1.97, 1.97 (s, 7x 3H, 7x CH_3), 1.63–1.56 (m, 2H, H-2''), 1.55–1.49 (m, 2H, H-5''), 1.41–1.32 (m, 4H, H-3'', H-4'') ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ = 171.4 (Ester), 171.0 (NC(O)), 170.5 (Ester), 170.4 (Ester), 170.2 (Ester), 170.1 (Ester), 169.4 (Ester), 168.7 (C-2), 101.9 (C-1a), 101.2 (C-1b), 75.6 (C-4a), 73.0 (C-5a), 72.3 (C-3a), 70.9 (C-3b), 70.9 (C-5b), 69.1 (C-2b), 68.9 (C-1''), 66.7

(C-4b), 62.1 (C-6a), 60.9 (C-6b), 54.1 (C-2a), 51.5 (C-6''), 39.0 (C-1''), 29.4 (C-2''), 28.8 (C-5''), 26.5 (C-3''), 26.5 (C-4''), 23.6, 21.0, 20.9, 20.8, 20.8, 20.7, 20.6 (s, 7x OCH₃) ppm.

MS (ESI m/z) berechnet für [M+Na]⁺ 840.3121, gefunden 840.3137, ($|\Delta m/z| = 2.7$ ppm).

7.2.7.3 (6-Azidohexylamido)-methyl-lactosamin 87



42 (13.2 mg, 16.1 mmol, 1.00 Äq.) wurden in trockenem MeOH (5.0 mL) gelöst und NaOMe-Lösung (1.00 mL, 0.5 m, 500 µmol, 31.1 Äq.) gegeben und 30 min bei RT zur Reaktion gebracht. Die Lösung wurde mit saurem Ionentauscher (Dowex ®) neutralisiert, vom Harz abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: 9.10 mg (16.1 mmol, quant) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: C₂₂H₃₉N₅O₁₂

Molare Masse: 565.58 g/mol

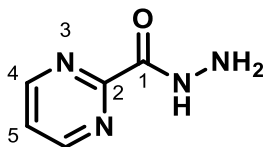
¹H-NMR (400 MHz, MeOD): $\delta = 4.41$ (d, ³J = 8.4 Hz, 1H, H-1a), 4.39 (d, ³J = 7.4 Hz, 1H, H-1b), 4.30 (d, ²J = 15.0 Hz, 1H, H-1'), 4.01 (d, ²J = 15.0 Hz, 1H, H-1'), 3.92 (dd, ²J = 12.2 Hz, ³J = 2.6 Hz, 1H, H-6a), 3.86 (dd, ²J = 12.2 Hz, ³J = 4.1 Hz, 1H, H-6a), 3.82–3.80 (m, 2H, H-2a, H-4b), 3.77 (dd, ²J = 11.6 Hz, ³J = 7.7 Hz, 1H, H-6b), 3.69 (dd, ²J = 11.4 Hz, ³J = 4.5 Hz, 1H, H-6b), 3.65–3.62 (m, 2H, H-3a, H-4a), 3.60–3.56 (m, 1H, H-5b), 3.54 (dd, ³J = 9.7 Hz, ³J = 7.4 Hz, 1H, H-2b), 3.48 (dd, ³J = 9.7 Hz, ³J = 3.2 Hz, 1H, H-3b), 3.45–3.42 (m, 1H, H-5a), 3.30–3.22 (m, 4H, H-1'', H-6''), 2.00 (s, 3H, CH₃), 1.64–1.57 (m, 2H, H-5''), 1.56–1.51 (m, 2H, H-2''), 1.46–1.30 (m, 4H, H-3'', H-4'') ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD): $\delta = 174.2$ (C(O)OMe), 171.8 (C-2'), 105.1 (C-1b), 102.9 (C-1a), 80.5 (C-4a), 77.2 (C-5b), 76.7 (C-5a), 74.8 (C-3b), 73.7 (C-3a), 72.6 (C-2b), 70.3 (C-4b), 69.2 (C-1'), 62.5 (C-6b), 61.7 (C-6a), 56.5 (C-2a), 52.4 (C-6''), 39.9 (C-1''), 30.3 (C-2''), 52.4 (C-5''), 27.5, 27.5 (2C, C-3'', C-4''), 23.1 (OCH₃) ppm.

MS (ESI m/z) berechnet für [M+Na]⁺ 588.2487, gefunden 588.2489, ($|\Delta m/z| = 0.2$ ppm).

7. Experimentalteil

7.2.7.4 Pyrimidine-2-carbohydrazid 51



2-Carboxylethylesterpyrimidin **50** (867 mg, 6.28 mmol, 1.00 Äq.) wurde in Ethanol (5 mL) gelöst und Hydrazinhydrat (1.00 mL, 20.2 mmol, 3.20 Äq.) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend in der Mikrowelle für 30 min bei 95 °C erhitzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: 860 mg (6.23 mmol, 99 %) eines farblosen Öls.

Summenformel: C₅H₆N₄O

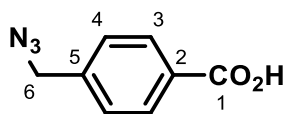
Molare Masse: 138.13 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 10.05 (s, 1H, NH), 8.92 (d, 2H, ³J = 7.9 Hz, H-4), 7.64 (t appt, 1H, ³J = 4.9 Hz, H-5), 4.63 (s, 2H, NH₂) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ = 161.6 (C-1), 158.2 (C-2), 157.7 (C-4), 122.8 (C-5) ppm.

MS (ESI m/z) berechnet für [2M+Na]⁺ 299.09754, gefunden 299.09934, (Δm/z) = 6.00 ppm).

7.2.7.5 4-(Azidomethyl)benzoesäure 53



Brombenzylbenzoesäuremethylester **52** (2.75 g, 12.0 mmol, 1.00 Äq.) wurde mit NaN₃ (1.95 g, 30.0 mmol, 2.50 Äq.) in DMF (15 mL) gelöst und in der Mikrowelle für 20 min bei 130 °C erhitzt. Nach beendeter Reaktion wurde die Lösung mit H₂O (30 mL) verdünnt und die wässrige Phase mit DCM (3x 30 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und anschließend das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der ölige Rückstand wurde mit NaOH (30 mL, 1.0 M, 30 mmol, 2.50 Äq.) verdünnt und über Nacht bei RT gerührt. Anschließend wurde mit HCl (halbkonzentriert) die Lösung auf pH 1 angesäuert und die wässrige Phase mit drei Mal mit Et₂O (30 mL) extrahiert. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde das Produkt ohne weitere Aufreinigung als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1.79 g (10.1 mmol, 84 %) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: C₈H₇N₃O₂

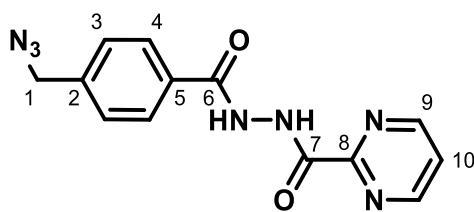
Molare Masse: 177.16 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 7.98–7.95 (m, 2H, H-3), 7.49–7.47 (m, 2H, H-4), 4.56 (s, 2H, H-6) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ = 167.1 (C-1), 140.7 (C-2), 130.5 (C-5), 129.8 (C-3), 128.4 (C-4), 53.1 (C-6) ppm.

MS (ESI m/z) berechnet für [M-H]⁻ 176.04655, gefunden 176.04686, (|Δm/z| = 1.78 ppm).

7.2.7.6 N'-(4-(azidomethyl)benzoyl)pyrimidine-2-carbohydrazid **55**



Carbonsäure **53** (922 mg, 5.20 mmol, 1.06 Äq.) wurden in trockenem DCM (10 mL) gelöst, Oxalylchlorid (740 µL, 8.63 mmol, 1.75 Äq.) und DMF (100 µL) zugegeben und das Reaktionsgemisch für 2 h unter Rückfluss (45 °C) erhitzt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in trockenem DCM (10 mL) aufgenommen und einer Lösung aus Hydrazid **51** (680 mg, 4.92 mmol, 1.00 Äq.) in DCM (5 mL) und NEt₃ (1.09 mL, 7.82 mmol, 1.59 Äq.) zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde das Reaktionsgemisch für 4 h bei RT gerührt und anschließend das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Kieselgel (DCM 100 %, dann stufenweise Zugabe von MeOH bis zu 10 %) gereinigt.

Ausbeute: 606 mg (2.04 mmol, 41 %) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: C₁₃H₁₁N₇O₂

Molare Masse: 297.28 g/mol

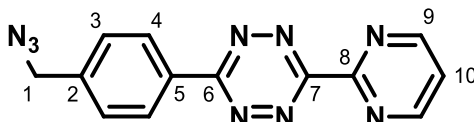
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 10.81 (s_{br}, 1H, NH), 10.67 (s_{br}, 1H, NH), 9.02 (d, ³J = 4.9 Hz, 1H, H-9), 7.97–7.94 (m, 2H, H-4), 7.76–7.73 (t_{appt}, 1H, H-10), 7.53–7.51 (m, 2H, H-3), 4.57 (s, 2H, H-1) ppm.

7. Experimentalteil

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ = 165.1 (C-6), 161.9 (C-7), 157.9 (C-9), 157.5 (C-8), 139.6 (C-2), 132.2 (C-5), 128.4 (C-3), 128.0 (C-4), 123.5 (C-10), 53.1 (C-1) ppm.

MS (ESI m/z) berechnet für [M+Na]⁺ 320.08664, gefunden 320.08526, ($|\Delta m/z|$ = 3.2 ppm).

7.2.7.7 3-(4-(Azidomethyl)phenyl)-6-(pyrimidin-2-yl)-1,2,4,5-tetrazin 56



55 (99.0 mg, 333 μ mol, 1.00 Äq.) und PCl_5 (520 mg, 2.50 mmol, 7.50 Äq.) wurden in trockenem Toluol (6 mL) suspendiert und 3 h auf 135 °C erhitzt. Anschließend wurde das Gemisch für 16 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde über Kieselgel filtriert (25 g Kieselgel eluiert mit DCM) und dann zuerst mit DCM (300 mL), danach mit Hydrazinhydrat-Lösung (4.0 mL Hydrazinhydrat in 200 mL DCM, entspricht 240 Äq. Hydrazin) gewaschen, sodass der Filterkuchen nicht trockenläuft. Dieser wurde 2 h bei RT stehen gelassen und anschließend so lange mit DCM/MeOH (9:1) gewaschen bis braun-violettfarbene Lösung aufgefangen wurde. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in AcOH (3 mL) aufgenommen und bei 0 °C mit NaNO_2 (115 mg, 1.67 mmol, 5.00 Äq.) in H_2O (1.67 mL) zugetropft. Anschließend wurde die Reaktion für 30 min bei RT gerührt und die violettfarbene Phase mit H_2O verdünnt und mit DCM (3x 20 mL) extrahiert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der violettfarbene Rückstand umkristallisiert (Cy:EE = 1:1).

Ausbeute: 32.5 mg (112 μ mol, 34 %) eines violettfarbenen Feststoffs.

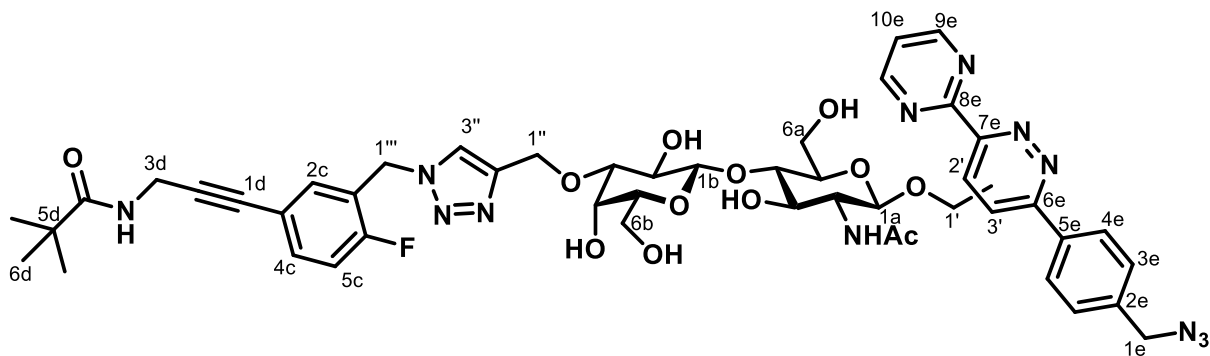
Summenformel: $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{N}_9$

Molare Masse: 291.28 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 9.13 (d, 3J = 4.9 Hz, 1H, H-9), 8.77–7.74 (m, 2H, H-4), 7.60–7.57 (m, 3H, H-10, H-3), 4.50 (s, 2H, H-1) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 164.3 (C-6), 163.3 (C-7), 159.6 (C-8), 158.6 (C-9), 141.1 (C-2), 131.3 (C-5), 129.4 (C-4), 129.0 (C-3), 122.7 (C-10), 54.4 (C-1) ppm.

7.2.7.8 Cyclisierter Gal-1 Ligand mit Boc-Gruppe mit Azido-Tetrazin 57



Alken **38c** (44.6 mg, 58.2 μmol , 1.50 Äq.) und Tetrazin **56** (11.3 mg, 38.8 μmol , 1.00 Äq.) wurden in MeOH/DCM (5:1, 800 μL) und die Reaktionslösung für 48 h auf 60 °C erhitzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck, wurde das Reaktionsgemisch zuerst säulenchromatographisch über Kieselgel (DCM:MeOH = 10:1 \rightarrow 5:1) und anschließend mittels präparativer Dünnschicht-chromatographie (DCM:MeOH = 5:1) gereinigt. Das Produkt enthielt noch leichte Verunreinigungen, die nach der Entfernung der Boc-Schutzgruppe final entfernt konnten.

Ausbeute: 22.9 mg (22.3 μmol , 58 %) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: $\text{C}_{48}\text{H}_{55}\text{FN}_{12}\text{O}_{13}$

Molare Masse: 1027.04 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOD): δ = 9.06–9.05 (m, 2H, *H*-9e), 8.90 (s, 1H, *H*-2'/*H*-3'), 8.03 (s, 1H, *H*-1'''), 7.73-7.70 (m, 2H, *H*-4e), 7.65-7.63 (m, 1H, *H*-10e), 7.60-7.57 (m, 2H, *H*-3e), 7.47-7.42 (m, 1H, *H*-4c), 7.39-7.37 (m, 1H, *H*-2c), 7.14 (dd, $^3J_{\text{F},5} = 9.6$ Hz, $^3J_{4,5} = 8.7$ Hz, 1H, *H*-5c), 5.64 (s, 2H, *H*-1'''), 5.04 (d, $^2J = 14.7$ Hz, 1H, *H*-1'), 4.84-4.72 (m, 3H, *H*-1', *H*-1''), 4.58 (d, $^3J = 8.4$ Hz, 1H, *H*-1a), 4.53 (s, 2H, *H*-1e), 4.40 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 1H, *H*-1b), 4.03-4.00 (m, 3H, *H*-4b, *H*-3d), 3.93-3.85 (m, 3H, *H*-2a, *H*-6a), 3.80-3.75 (m, 1H, *H*-6b), 3.71-3.67 (m, 1H, *H*-6b), 3.66-3.61 (m, 3H, *H*-3a, *H*-4a, *H*-2b), 3.58-3.52 (m, 1H, *H*-5b), 3.43-3.39 (m, 2H, *H*-5a, *H*-3b), 2.03 (s, 3H, C(O)CH₃), 1.45 (s, 9H, C(CH₃)₃) ppm.

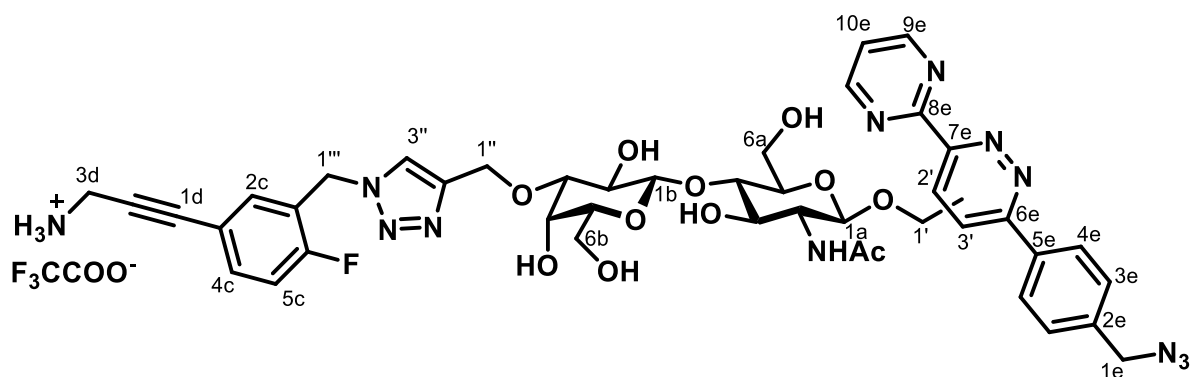
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, MeOD): δ = 173.8 (C(O)OMe), 161.6 (d, $^1J = 250.7$ Hz, C-6c), 159.4 (C-9e), 158.1 (C-4d), 146.6 (C-2''), 139.2 (C-2e), 136.7 (C-5e), 135.3 (C-4c), 135.0 (C-2c), 130.8 (C-4e), 129.7 (C-3e), 125.3 (C-3''), 124.2 (d, $^2J = 16.3$ Hz, C-1c), 121.3 (2c, C-3c, C-10e), 117.2 (d, $^2J = 15.9$ Hz, C-5c), 104.9 (C-1b), 102.5 (C-1a), 87.6 (C-2d), 82.8 (C-3b), 81.3 (C-1d), 80.8 (C-2b), 80.6 (C-5d) 76.9 (C-5b), 76.7 (C-5a), 74.0 (C-3a), 71.7 (C-4a), 67.2 (C-1'), 66.8 (C-4b), 63.6 (C-1''), 62.6 (C-6b), 61.8 (C-6a), 56.4 (C-2a), 55.1 (C-1e), 48.4 (C-1'''), 31.3 (C-3d), 28.7 (C-6d), 23.1 (C(O)CH₃) ppm.

7. Experimentalteil

$^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$ -NMR (376 MHz, MeOD): $\delta = -118.3$ ppm.

MS (ESI m/z) berechnet für $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1049.38878, gefunden 1049.38490, ($|\Delta m/z| = 3.7$ ppm)

7.2.7.9 Cyclisierter Gal-1 Ligand ohne Boc-Gruppe mit Azido-Tetrazin 58



57 (11.6 mg, 11.3 μmol , 1.00 $\text{\AA}q.$) wurden in MeOH (500 μL) gelöst und mit TFA (500 μL) versetzt und die Lösung für 16 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Produkt säulenchromatographisch über RP-18 ($\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN} = 7:3$) gereinigt.

Ausbeute: 7.91 mg (8.53 μmol , 76 %) eines rotfarbenen Feststoffs.

Summenformel: $\text{C}_{43}\text{H}_{47}\text{FN}_{12}\text{O}_{11}$

Molare Masse: 1040.94 g/mol als TFA-Salz

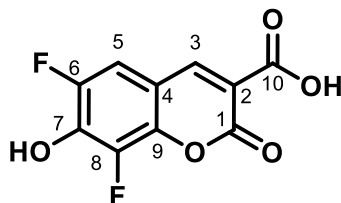
^1H -NMR (400 MHz, MeOD): $\delta = 9.27$ – 8.86 (m, 2H, H -9e), 8.06 (s, 1H, H -1''), 7.74–7.70 (m, 2H, H -4e), 7.58–7.56 (m, 2H, H -3e), 7.53–7.50 (m, 1H, H -4c), 7.40–7.37 (m, 1H, H -2c), 7.21 (m, 1H, H -5c), 5.64 (s, 2H, H -1'''), 4.84–4.73 (m, 2H, H -1''), 4.58 (d, $^3J = 8.6$ Hz, 1H, H -1a), 4.52 (s, 2H, H -1e), 4.40 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 1H, H -1b), 4.02–4.00 (m, 3H, H -4b, H -3d), 3.92–3.81 (m, 3H, H -2a, H -6a), 3.80–3.75 (dd, $^2J = 11.5$ Hz, $^3J = 7.6$ Hz, 1H, H -6b), 3.70–3.60 (m, 4H, H -3a, H -4a, H -2b, H -6b), 3.57–3.54 (m, 1H, H -5b), 3.42–3.38 (m, 2H, H -5a, H -3b), 2.03 (s, 3H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$) ppm.

^{13}C -NMR (100 MHz, MeOD): $\delta = 173.8$ ($\text{C}(\text{O})\text{OMe}$), 146.6 (C -2''), 139.3 (C -2e), 135.5 (d, $^3J = 8.8$ Hz, C -4c), 135.0 (d, $^3J = 4.0$ Hz, C -2c), 130.9 (C -4e), 129.6 (C -3e), 125.5 (C -3''), 117.5 (d, $^2J = 22.7$ Hz, C -5c), 105.0 (C -1b), 102.5 (C -1a), 86.0 (C -2d), 82.6 (C -3b), 82.0 (C -1d), 80.8 (C -2b), 77.0 (C -5b), 76.7 (C -5a), 74.0 (C -3a), 71.7 (C -4a), 66.9 (C -4b), 63.5 (C -1''), 62.6 (C -6b), 61.8 (C -6a), 56.4 (C -2a), 55.1 (C -1e), 47.9 (C -1'''), 30.6 (C -3d), 23.1 ($\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$) ppm.

$^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$ -NMR (376 MHz, MeOD): $\delta = -76.9$ (F_3COO^-), -116.4 ppm.

MS (ESI m/z) berechnet für $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 949.33625, gefunden 949.33427, ($|\Delta m/z| = 2.19$ ppm).

7.2.7.10 6,8-Difluoro-7-hydroxy-2-oxo-chromene-3-carbonsäure "Pacific Blue" 60



Diese Synthese wurde von *Adrian Graef* in der Bachelorarbeit unter der Betreuung von *Jürgen Mut* durchgeführt.

3,5-Difluoro-2,4-dihydroxybenzaldehyd (4.83 g, 27.7 mmol, 1.00 Äq.) wurden in H₂O (120 mL) gelöst und mit Meldrumsäure (4.42 g, 30.7 mmol, 1.10 Äq.) sowie NH₄Ac (1.12 g, 14.5 mmol, 0.50 Äq.) für 17 h bei RT zur Reaktion gebracht. Danach wurde wässrige HCl (37 %, 14.4 mL) bei 0 °C zugegeben und für 1 h gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert, mit Wasser (100 mL) gewaschen und schließlich an der Hochvakuumpumpe getrocknet.

Ausbeute: 4.27 g (17.6 mmol, 64 %) eines gelbfarbenen Feststoffs.

Summenformel: C₁₀H₄F₂O₅

Molare Masse: 242.13 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 8.76 (s, 1H, H-3), 7.63–7.60 (m, 1H, H-5) ppm.

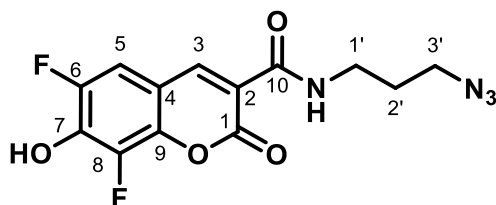
¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ = 163.8 (C-10), 155.6 (C-1), 148.6 (dd, ¹J = 240.5, ³J = 4.8, C-6), 148.6 (C-3), 141.3 (d, ³J = 8.9, C-4), 148.6 (²J = 18.2, ²J = 12.7, C-7), 138.7 (¹J = 244.8, ³J = 6.5, C-8), 115.3 (C-2), 110.6 (²J = 21.0, ⁴J = 2.6, C-5), 109.0 (²J = 10.2, C-9) ppm.

¹⁹F-NMR (376 MHz, MeOD): δ = -135.7 (t appt, ³J = 9.9), -154.0 (d, ³J = 9.4) ppm.

MS (ESI m/z) berechnet für [M-H]⁻ 240.99540, gefunden 240.99885, (|Δm/z| = 1.43 ppm).

7. Experimentalteil

7.2.7.11 *N*-(3-azidopropyl)-6,8-difluoro-7-hydroxy-2-oxo-chromene-3-carboxylamid 61



Diese Synthese wurde von *Adrian Graef* in der Bachelorarbeit unter der Betreuung von *Jürgen Mut* durchgeführt.

60 (1.22 g, 5.04 mmol, 1.00 Äq.) und 3-Azidopropylaminhydrochlorid (1.38 g, 10.1 mmol, 2.00 Äq.) wurden in DMF (33.0 mL) und DIPEA (3.00 mL, 17.6 mmol, 3.50 Äq.) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Dem Reaktionsgemisch wurde HATU (3.83 g, 10.1 mmol, 2.00 Äq.) zugegeben und das Reaktionsgemisch 18 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch über Kieselgel (Cy:EE = 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 948 mg (2.92 mmol, 58 %) eines gelbfarbenen Feststoffs.

Summenformel: C₁₃H₁₀F₂N₄O₄

Molare Masse: 324.24 g/mol

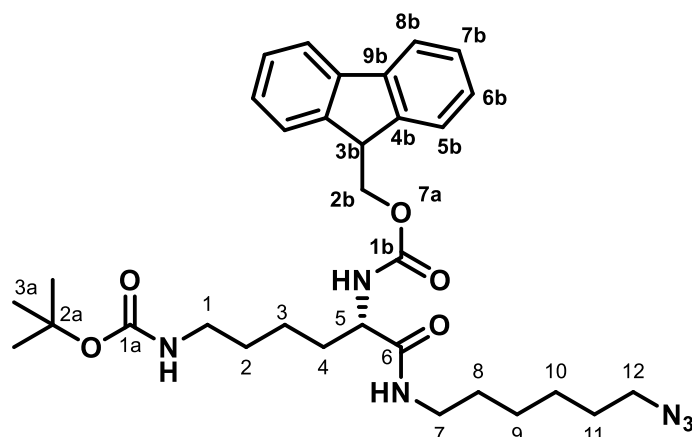
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): 8.76 (d, ⁴J = 1.4 Hz, 1H, *H*-3), 8.66 (t appt, ³J = 5.9 Hz, 1H, *NH*), 7.73 (dd, ²J = 10.5 Hz, ⁵J = 2.0 Hz, 1H, *H*-3), 3.41–3.36 (m, 4H, *H*-1', *H*-3') 1.78 (quin, ³J = 6.8 Hz) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ = 161.2 (*C*-10), 159.5 (*C*-1), 148.9 (dd, ¹J = 240.9, ³J = 4.9, *C*-6), 147.1 (*C*-3), 140.5 (d, ³J = 9.0, *C*-4), 140.1 (²J = 18.3, ²J = 12.6, *C*-7), 138.8 (¹J = 245.0, ³J = 6.6, *C*-8), 116.4 (*C*-2), 110.6 (²J = 21.1, ⁴J = 2.9, *C*-5), 109.5 (²J = 9.9, *C*-9), 48.6 (*C*-3'), 36.8 (*C*-1'), 28.4 (*C*-2') ppm.

¹⁹F-NMR (376 MHz, MeOD): δ = -135.1 (t appt, ³J = 10.2), -154.0 (d, ³J = 9.8) ppm.

MS (ESI *m/z*) berechnet für [M] 324.06756, gefunden 324.06834, (|Δ*m/z*| = 2.40 ppm).

7.2.7.12 (9H-Fluoren-9-yl)methyl-*tert*-butyl-6-(((6-azidohexyl)amino)-6-oxohexane-1,5-diyl)-(S)-dicarbamat 88



Fmoc-Boc-Lysine (1.29 g, 2.75 mmol, 1.00 Äq.), 6-Azidohexylamin-Hydrochlorid (738 mg, 4.13 mmol, 1.50 Äq.) und DIPEA (1.68 mL, 9.64 mmol, 3.50 Äq.) wurden in DMF (13.8 mL) versetzt und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde HATU (2.10 g, 5.51 mmol, 2.00 Äq.) portionsweise zugegeben und nach 1 h bei 0 °C anschließend 2 h bei RT gerührt. Das Gemisch wurde mit DCM verdünnt und die organische Phase mit ges. NH₄Cl-Lösung gewaschen. Das Lösungsmittel wurde über MgSO₄ getrocknet, unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch über Kieselgel (Cy:EE = 1.5:1 → 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 1.58 mg (2.67 µmol, 97 %) eines farblosen Öls. In den NMR-Spektren wurden noch Reste von DMF detektiert und auf weitere Aufreinigung verzichtet.

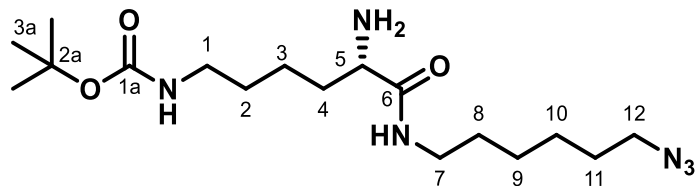
Summenformel: C₃₂H₄₄N₆O₅.

Molare Masse: 592.74 g/mol.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.74–7.72 (m, 2H, *H*-8b), 7.57–7.55 (m, 2H, *H*-5b), 7.39–7.35 (m, 2H, *H*-6b), 7.30–7.26 (m, 2H, *H*-7b), 4.35–4.33 (m, 2H, *H*-2b), 4.19–4.11 (m, 2H, *H*-3b, *H*-5), 3.21–3.17 (m, 4H, *H*-7, *H*-12), 3.09–3.03 (m, 2H, *H*-1), 1.86–1.79 (m, 1H, *H*-4), 1.71–1.60 (m, 1H, *H*-4), 1.57–1.44 (m, 6H, *H*-2, *H*-8, *H*-11), 1.41 (s, 3H, *H*-3a), 1.36–1.25 (m, 4H, *H*-9, *H*-10) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 171.8 (C-6), 156.3 (2C, C-1a, C-1b), 143.8 (C-9b), 141.3 (C-4b), 127.8 (C-6b), 127.1 (C-7b), 125.1 (C-5b), 120.0 (C-8b), 79.3 (C-2a), 67.1 (C-2b), 54.9 (C-5), 51.3 (C-12), 47.1 (C-3b), 40.0 (C-1), 39.4 (C-7), 32.2 (C-4), 29.6 (C-2), 29.4 (C-8), 28.7 (C-11), 28.5 (C-3a), 26.4 (2C, C-9, C-10), 22.6 (C-3) ppm.

MS (ESI *m/z*) berechnet für [M+Na]⁺ 615.3265, gefunden 615.3257, (|Δ*m/z*| = 1.4 ppm).

7.2.7.13 *tert*-Butyl-(*S*)-(5-amino-6-((6-azidohexyl)amino)-6-oxohexyl)carbamate **64**

87 (950 mg, 1.60 mmol, 1.00 Äq.) wurde in DMF (5 mL) und Piperidin (5.0 mL, 50.6 mmol, 31.6 Äq.) gelöst und die Lösung 3 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch über Kieselgeld (DCM:MeOH = 20:1 → 5:1) gereinigt.

Ausbeute: 541 mg (1.46 μ mol, 91 %) eines farblosen Öls.

Summenformel: C₁₇H₃₄N₆O₃.

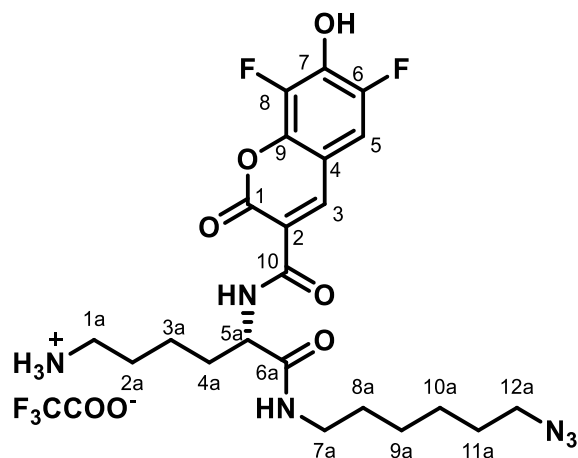
Molare Masse: 370.50 g/mol.

¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 3.35–3.32 (m, 1H, *H*-5), 3.30–3.27 (m, 2H, *H*-12), 3.25–3.16 (m, 1H, *H*-7), 3.03 (t, ³*J* = 6.9 Hz, 2H, *H*-1), 1.74–1.66 (m, 1H, *H*-4), 1.66–1.57 (m, 3H, *H*-4, *H*-11), 1.56–1.50 (m, 2H, *H*-8), 1.50–1.45 (m, 2H, *H*-2), 1.43 (s, 3H, *H*-3a) 1.41–1.32 (m, 4H, *H*-9, *H*-10) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD): δ = 176.1 (C-6), 158.6 (C-1a), 79.9 (C-2a), 55.8 (C-5), 52.4 (C-12), 41.1 (C-1), 40.2 (C-7), 35.5 (C-4), 30.7 (C-2), 30.7 (C-8), 29.8 (C-11), 28.8 (C-3a), 27.4 (2C, C-9, C-10), 23.8 (C-3) ppm.

MS (ESI *m/z*) berechnet für [M+Na]⁺ 393.2590, gefunden 393.2588, ($|\Delta m/z|$ = 0.5 ppm).

7.2.7.14 (S)-N-(6-amino-1-((6-azidohexyl)amino)-1-oxohexan-2-yl)-6,8-difluoro-7-hydroxy-2-oxo-chromene-3-carboxamide 66



64 (500 mg, 1.35 mmol, 1.00 Äq.) wurden in DMF (7.0 mL) gelöst und mit Fluorophor **60** (490 mg, 2.02 mmol, 1.50 Äq.) und DIPEA (705 µL, 4.05 mmol, 3.00 Äq.) versetzt. Das Gemisch wurde auf 0 °C gekühlt und mit HATU (720 mg, 1.89 mmol, 1.40 Äq.) zur Reaktion gebracht. Nach 1 h bei 0 °C wurde die Reaktionslösung 16 h bei RT gerührt. Die Lösung wurde mit DCM verdünnt und die organische Phase drei Mal mit ges. NH₄Cl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Kieselgel (EE → EE:MeOH = 4:1) gereinigt und alle Fraktionen mit Produkt vereint.

Das noch verunreinigte Produkt wurde in DCM (5.0 mL) gelöst, mit TFA (5.0 mL, 65.3 mmol, 50.1 Äq.) versetzt und 2 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde anschließend unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch über RP-18 (H₂O:MeCN = 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 235 mg (386 µmol, 29 % über 2 Stufen) eines gelbfarbenen, blau-fluoreszierenden Feststoffs.

Summenformel: C₂₄H₂₉F₅N₆O₇ als TFA-Salz.

Molare Masse: 608.52 g/mol als TFA-Salz.

¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 8.71 (s_{br}, 1H, H-3), 7.40 (dd, ³J_{H-F} = 10.1 Hz, ⁵J_{H-F} = 1.7 Hz, 1H, H-5), 4.54 (dd, ³J = 7.8 Hz, ³J = 5.5 Hz, 1H, H-5a), 3.27 (t, ³J = 6.8 Hz, 2H, H-12a), 3.22 (t, ³J = 7.0 Hz, 2H, H-7a), 2.95 (t, ³J = 7.6 Hz, 2H, H-1a), 1.99–1.90 (m, 1H, H-4a), 1.87–1.78 (m, 1H, H-4a), 1.77–1.66 (m, 2H, H-2a), 1.61–1.46 (m, 6H, H-3a, H-8a, H-11a), 1.43–1.32 (m, 4H, H-9a, H-10a) ppm.

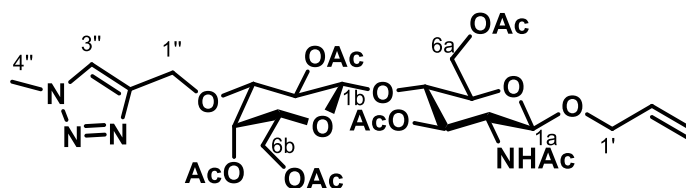
7. Experimentalteil

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD): δ = 173.4 (C-6a), 163.6 (C-10), 161.8 (C-1), 151.3 (dd, ¹J = 242.6 Hz, ³J = 4.9 Hz, C-6), 149.2 (C-3), 144.0 (dd, ²J = 18.2 Hz, ²J = 12.6 Hz, C-7), 142.5 (dd, ²J = 9.2 Hz, ⁴J = 1.4 Hz, C-9), 140.7 (dd, ¹J = 246.0 Hz, ³J = 6.6 Hz, C-8), 115.9 (C-2), 111.2 (dd, ²J = 21.2 Hz, ⁴J = 12.6 Hz, C-5), 110.2 (dd, ³J = 10.0 Hz, C-4), 54.9 (C-5a), 52.3 (C-12a), 40.5 (C-1a), 40.4 (C-7a), 33.4 (C-4a), 30.2 (C-8a), 29.8 (C-11a), 28.2 (C-2a), 27.4 (2C, C-9a, C-10a), 23.6 (C-3a) ppm.

¹⁹F{¹H}-NMR (376 MHz, CDCl₃): δ = -76.9, -137.2, -154.4 ppm.

MS (ESI m/z) berechnet für [M+Na]⁺ 517.1981, gefunden 517.1990, ($|\Delta m/z|$ = 1.7 ppm).

7.2.7.15 2,4,6-Tri-O-acetyl-O-(methyl-1,2,3-triazol-4-yl)methyl- β -d-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-1-O-allyl-3,6-O-diacetyl-2-deoxy- β -d-glucopyranosid 67



40 (76.0 mg, 147 μ mol, 1.00 Äq.) wurde in Pyridin (1.50 mL, 18.6 mmol, 127 Äq.) gelöst und Ac₂O (750 μ L, 7.93 mmol, 54.1 Äq.) zugegeben und die Lösung 16 h bei RT gerührt. Die Lösung wurde mit EE verdünnt und die organische Phase mit Wasser und ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet, abfiltriert und unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: 102 mg (140 μ mol, 96 %) eines farblosen Öls.

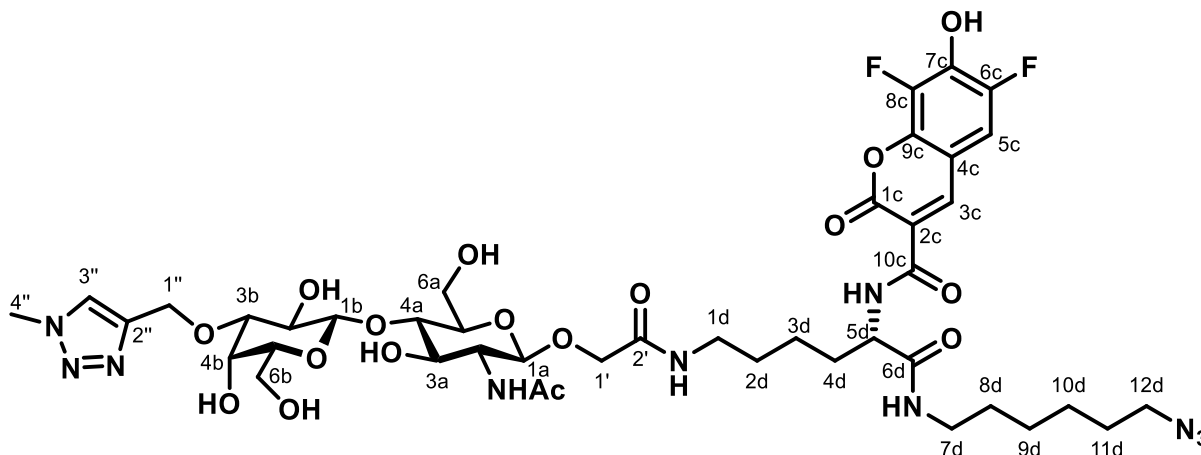
Summenformel: C₃₁H₄₄N₄O₁₆

Molare Masse: 728.71 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.46 (s, 1H, H-3''), 6.10 (d, ³J = 9.4 Hz, 1H, NH), 5.84–5.75 (m, 1H, H-2'), 5.36 (d appt, ³J = 2.9 Hz, 1H, H-4b), 5.21 (ddd, ³J = 17.2 Hz, ⁴J = 3.1 Hz, ²J = 1.5 Hz, 1H, H-3'_{trans}), 5.12 (ddd, ³J = 10.4 Hz, ⁴J = 3.1 Hz, ²J = 1.4 Hz, 1H, H-3'_{cis}), 5.02 (dd, ³J = 9.4 Hz, ³J = 8.2 Hz, 1H, H-3a), 4.91 (dd, ³J = 10.0 Hz, ³J = 8.0 Hz, 1H, H-2b), 4.66 (d, ²J = 12.5 Hz, 1H, H-1''), 4.57 (d, ²J = 12.6 Hz, 1H, H-1''), 4.46 (d, ³J = 7.4 Hz, 1H, H-1a), 4.43–4.37 (m, 2H, H-1b, H-6a), 4.27–4.23 (m, 1H, H-1'), 4.06–3.97 (m, 8H, H-2a, H-6a, H-6b, H-1', H-4''), 3.78 (t appt, ³J = 6.0 Hz, 1H, H-5b), 3.71 (t appt, ³J = 8.3 Hz, 1H, H-4a), 3.65 (dd, ³J = 9.5 Hz, ³J = 1.8 Hz, 1H, H-3b), 3.56 (m, 1H, H-5a), 2.09, 2.07, 2.04, 2.02, 1.94, 1.92 (6s, 18H, 6CH₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 170.7 (CH₃CO₂C-3a), 170.6 (CH₃CO₂C-6a), 170.5 (CH₃CO₂C-6b), 170.4 (CH₃C(O)N), 170.3 (CH₃CO₂C-4b), 169.6 (CH₃CO₂C-2b), 144.6 (C-1''), 133.6 (C-2'), 124.0 (C-3''), 117.5 (C-3'), 101.1 (C-1b), 99.8 (C-1a), 76.8 (C-3b), 75.8 (C-4a), 72.6 (2C, C-3a, C-5a), 70.9 (C-5b), 70.7 (C-2b), 69.7 (C-1'), 65.9 (C-4b), 63.1 (C-1''), 62.5 (C-6a), 61.3 (C-6b), 53.0 (C-2a), 36.8 (C-4''), 23.2, 20.9, 20.9, 20.8, 20.7, 20.7 (6C, OCH₃) ppm.

MS (ESI): berechnet für [M+Na⁺] 751.26445, gemessen 751.26525, ($|\Delta m/z|$ = 1.06 ppm).

7.2.7.16 Gal-1 Ligand **40** erweitert mit Fluorophor und Azid **69**

Disaccharid **67** (80.0 mg, 110 μmol , 1.47 Äq.) wurde in einem Gemisch aus DCM (1.0 mL), MeCN (0.5 mL) und wässriger HCl (1.0 mL, 1.0 M) gelöst und $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (4.95 mg, 22.0 μmol , 0.29 Äq.) und NaIO_4 (352 mg, 1.65 mmol, 22.0 Äq.) hinzugegeben. Das Gemisch wurde 3 h bei RT gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde die Lösung mit DCM verdünnt und die organische Phase mit ges. NH_4Cl -Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mit **66** (45.5 mg, 74.8 μmol , 1.00 Äq., ist die limitierte Komponente und bestimmt die Ausbeute) in trockenem DMF (1.0 mL) und DIPEA (57.3 μL , 329 μmol , 4.40 Äq.) gelöst. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt und HATU (62.6 mg, 165 μmol , 2.20 Äq.) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde zuerst 2 h bei 0 °C und anschließend 16 h bei RT gerührt. Diese wurde nach beendeter Reaktion mit DCM verdünnt und mit ges. NH_4Cl -Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit DCM reextrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch über Kieselgel (DCM:MeOH = 10:1 \rightarrow 5:1) gereinigt und alle Fraktion mit Produkt vereint.

Zur besseren Aufreinigung mit der HPLC über RP-18 muss die Substanz wasserlöslich sein und die Acetylgruppen vorher entfernt werden. Dazu wurde das Rohprodukt in trockenem MeOH (1.0 mL) gelöst und NaOMe (1.0 mL, 0.5 M, 500 μmol , 6.69 Äq.) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch 30 min bei RT gerührt. Diese wurde mit saurem Ionentauscher (Dowex®) neutralisiert, abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch über RP-18 (H_2O :MeCN = 4:1 \rightarrow 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 11.8 mg (11.7 μmol , 16 %) eines gelbfarbenen, blau-fluoreszierenden Feststoffs.

Summenformel: $\text{C}_{42}\text{H}_{58}\text{F}_2\text{N}_{10}\text{O}_{17}$

Molare Masse: 1012.98 g/mol

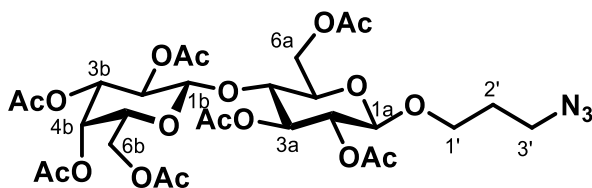
¹H-NMR (600 MHz, MeOD): δ = 8.71 (s, 1H, *H*-3c), 7.94 (s, 1H, *H*-3''), 7.37–7.35 (m, 1H, *H*-5c), 4.82 (d, ²*J* = 12.3 Hz, 1H, *H*-1''), 4.74 (d, ²*J* = 12.3 Hz, 1H, *H*-1''), 4.50 (dd, ³*J* = 8.0 Hz, ³*J* = 5.6 Hz, 1H, *H*-5d), 4.42 (d, ³*J* = 8.1 Hz, 2H, *H*-1a, *H*-1b), 4.28 (d, ²*J* = 15.1 Hz, 1H, *H*-1'), 4.10 (s, 3H, *H*-4''), 4.06–4.05 (m, 1H, *H*-4b), 4.01 (d, ²*J* = 15.1 Hz, 1H, *H*-1'), 3.91 (dd, ²*J* = 12.2 Hz, ³*J* = 2.4 Hz, 1H, *H*-6a), 3.86 (dd, ²*J* = 12.2 Hz, ³*J* = 4.2 Hz, 1H, *H*-6a), 3.81–3.76 (m, 2H, *H*-2a, *H*-6b), 3.70 (dd, ²*J* = 11.5 Hz, ³*J* = 4.5 Hz, 1H, *H*-6b), 3.69–3.62 (m, 3H, *H*-2b, *H*-3a, *H*-4a), 3.59–3.57 (m, 1H, *H*-5b), 3.44–3.41 (m, 2H, *H*-3b, *H*-5a), 3.30–3.19 (m, 6H, *H*-1d, *H*-7d, *H*-12d), 2.00 (s, 3H, C(O)CH₃), 1.94–1.88 (m, 1H, *H*-4d), 1.82–1.76 (m, 1H, *H*-4d), 1.61–1.52 (m, 6H, *H*-2d, *H*-8d, *H*-11d), 1.46–1.35 (m, 6H, *H*-3d, *H*-9d, *H*-10d) ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, MeOD): δ = 174.2 (C(O)OMe), 173.8 (C-6d), 171.9 (C-2'), 164.1 (C-10c), 162.4 (C-1c), 149.3 (C-3c), 146.3 (C-2'), 143.1 (m, C-7), 142.9 (dd, ²*J* = 9.2 Hz, C-9), 125.9 (C-3''), 110.6 (m, C-5c), 105.0 (C-1b), 103.1 (C-1a), 82.6 (C-3b), 80.7 (C-2b), 76.9 (C-5b), 76.7 (C-5a), 73.7 (C-3a), 71.7 (C-4a), 69.3 (C-1'), 66.8 (C-4b), 63.4 (C-1''), 62.5 (C-6b), 61.8 (C-6a), 56.5 (C-2a), 55.1 (C-5d), 52.3 (C-12d), 40.3 (C-7d), 39.6 (C-1d), 37.0 (C-4''), 33.5 (C-4d), 30.2 (C-2d), 30.0 (C-8d), 29.8 (C-11d), 27.4 (2C, C-9d, C-10d), 24.0 (C-3d), 23.1 (OCH₃) ppm.

MS (ESI *m/z*) berechnet für [M–H][–] 1011.38767, gefunden 1011.38950, ($|\Delta m/z|$ = 1.81 ppm).

7.2.8 Synthese von Azido-funktionalisierten Oligosacchariden

7.2.8.1 Hepta-O-acetyl(3-Azidopropyl)lactose 88



Octaacetyllactose (264 mg, 389 μmol , 1.00 Äq.) wurden mit Azidopropanol (197 mg, 1.95 mmol, 5.00 Äq.) und FeCl_3 (189 mg, 1.17 mmol, 3.00 Äq.) in trockenem Toluol (10 mL) gelöst und in der Mikrowelle für 15 min bei 100 °C zur Reaktion gebracht. Die dunkle Reaktionslösung wurde mit abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Kieselgel (Cy:EE = 2:1 \rightarrow 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 172 mg (239 μmol , 62 %) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: $\text{C}_{29}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_{18}$

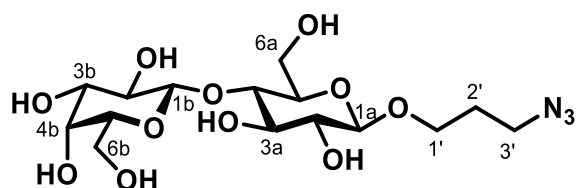
Molare Masse: 719.65 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 5.33 (dd, 3J = 3.4 Hz, 3J = 1.0 Hz, 1H, *H*-4b), 5.18 (t appt, 3J = 9.3 Hz, 1H, *H*-3a), 5.09 (dd, 3J = 10.5 Hz, 3J = 7.9 Hz, 1H, *H*-2b), 4.94 (dd, 3J = 10.4 Hz, 3J = 3.4 Hz, 1H, *H*-3b), 4.88 (dd, 3J = 9.6 Hz, 3J = 7.9 Hz, 1H, *H*-2a), 4.48 (dd, 2J = 12.2 Hz, 3J = 2.4 Hz, 1H, *H*-6a), 4.47 (d, 3J = 6.3 Hz, 1H, *H*-1b), 4.45 (d, 3J = 6.4 Hz, 1H, *H*-1a), 4.14–4.04 (m, 3H, *H*-6a, *H*-6b), 3.92–3.84 (m, 2H, *H*-5b, *H*-1'), 3.80–3.74 (m, 1H, *H*-4a), 3.62–3.53 (m, 2H, *H*-5a, *H*-1'), 3.39–3.32 (m, 2H, *H*-3'), 2.14, 2.11, 2.04, 3x 2.03, 1.95 (s, 7x 3H, 7x CH_3), 1.86–1.77 (m, 2H, *H*-2') ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ = 170.5, 170.4, 170.3, 170.2, 169.9, 169.7, 169.2 (7x Ester), 101.2 (*C*-1b), 100.6 (*C*-1a), 76.3 (*C*-4a), 72.9 (*C*-5a), 72.8 (*C*-3a), 71.7 (*C*-2a), 71.1 (*C*-3b), 70.8 (*C*-5b), 69.2 (*C*-2b), 66.7 (*C*-4b), 66.6(*C*-1'), 62.0 (*C*-6a), 60.9 (*C*-6b), 48.0 (*C*-3'), 29.1 (*C*-2'), 21.0, 20.9, 20.8, 20.8, 20.7, 20.7, 20.6 (7x OCH_3) ppm.

MS (ESI *m/z*) berechnet für $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 742.2277, gefunden 742.2275, ($|\Delta m/z|$ = 0.3 ppm).

7.2.8.2 (3-Azidopropyl)lactose 70



88 (119 mg, 166 μmol , 1.00 $\text{\AA}q.$) wurden in trockenem Methanol (5.0 mL) gelöst und mit NaOMe-Lösung (501 μL , 0.5 M, 250 μmol , 1.51 $\text{\AA}q.$) für 2 h bei RT zur Reaktion gebracht. Die Lösung wurde mit saurem Ionentauscher (Dowex®) neutralisiert, vom Harz abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: 69.8 mg (164 μmol , quant.) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: $\text{C}_{15}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_{11}$

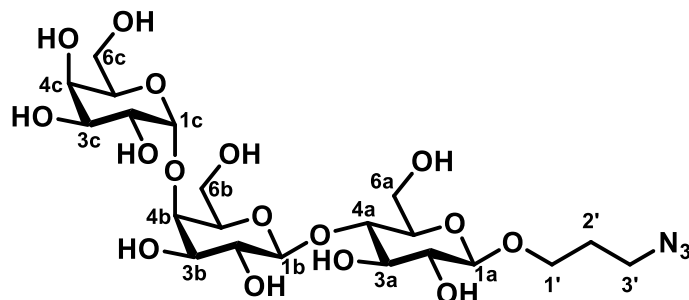
Molare Masse: 425.39 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOD): $\delta = 4.36$ (d, $^3J = 7.5$ Hz, 1H, $H-1b$), 4.29 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 1H, $H-1a$), 3.99–3.91 (m, 1H, $H-1'$), 3.90 (dd, $^2J = 12.1$ Hz, $^3J = 2.6$ Hz, 1H, $H-6a$), 3.84 (dd, $^2J = 12.1$ Hz, $^3J = 4.1$ Hz, 1H, $H-6a$), 3.83–3.80 (m, 1H, $H-4b$), 3.78 (dd, $^2J = 11.4$ Hz, $^3J = 7.5$ Hz, 1H, $H-6b$), 3.69 (dd, $^2J = 11.4$ Hz, $^3J = 4.7$ Hz, 1H, $H-6b$), 3.67–3.63 (m, 1H, $H-1'$), 3.60–3.56 (m, 2H, $H-5b$, $H-4a$), 3.55–3.49 (m, 3H, $H-2b$, $H-3b$, $H-3a$), 3.45 (t, $^3J = 6.9$ Hz, 1H, $H-3'$), 3.41 (ddd, $^3J = 9.4$ Hz, $^3J = 4.1$ Hz, $^3J = 2.7$ Hz, 1H, $H-5a$), 3.24 (dd, $^3J = 8.9$ Hz, $^3J = 7.9$ Hz, 1H, $H-2a$), 1.86 (quin, $^3J = 6.5$ Hz, 1H, $H-2'$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, MeOD): $\delta = 105.1$ (C-1'), 104.3 (C-1), 80.5 (C-4), 77.1 (C-5'), 76.4 (C-5), 76.4 (C-3), 74.8 (C-2'), 74.7 (C-2), 72.6 (C-3'), 70.3 (C-4'), 67.6 (C-1''), 62.5 (C-6'), 61.9 (C-6), 49.4 (C-3''), 30.2 (C-2'') ppm.

MS (ESI m/z) berechnet für $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 448.15378, gefunden 448.15236, ($|\Delta m/z| = 3.2$ ppm).

7.2.8.3 (3-Azidopropyl)-Gb3-Saccharid 71



Die Enzymreaktion wurde zusammen mit Dr. Maria Ortiz-Soto durchgeführt.

70 (8.99 mg, 21.1 μmol , 1.00 Äq.), UDP-Gal·2Na (12.9 mg, 21.1 μmol , 1.00 Äq.), α -1,4-Galactosyltransferase LgtC-C246S (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, aus *Neisseria meningitidis* exprimiert in *E. coli*) und MnCl_2 (5 mM) wurden in Tris-HCl Puffer (50 mM, pH = 7.5, 2.0 mL) gegeben und 48 h bei 32 °C inkubiert. Nach beendeter Reaktion wurde die Lösung für 5 min bei 95 °C erhitzt und das ausgefallene Enzym zentrifugiert. Der Überstand wurde gefriergetrocknet und das Rohprodukt wurde zuerst säulenchromatographisch über Kieselgel ($\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O} = 6:4:1$) und anschließend über RP18 ($\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN} = 100:0 \rightarrow 70:30$) gereinigt.

Ausbeute: 8.36 mg (14.2 μmol , 67 %) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: $\text{C}_{21}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_{16}$

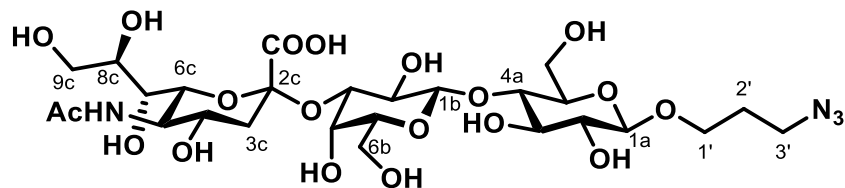
Molare Masse: 587.53 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOD): $\delta = 4.95$ (d, $^3J = 3.6$ Hz, 1H, *H*-1c), 4.43–4.41 (m, 1H, *H*-1b), 4.29 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 1H, *H*-1a), 4.27–4.25 (m, 1H, *H*-5c), 3.98–3.94 (m, 2H, *H*-4b, 1x*H*-1'), 3.93–3.91 (m, 1H, *H*-4c), 3.89–3.87 (m, 2H, *H*-6a), 3.84–3.82 (m, 2H, *H*-6b), 3.81–3.80 (m, 2H, *H*-2c, *H*-3c), 3.76–3.68 (m, 2H, *H*-6c), 3.68–3.63 (m, 2H, *H*-5b, 1x*H*-1'), 3.61–3.53 (m, 2H, *H*-4a, *H*-2b, *H*-3b), 3.51 (dd, $^3J = 8.9$ Hz, $^3J = 8.9$ Hz, 1H, *H*-3a), 3.45 (t, $^3J = 6.8$ Hz, 1H, *H*-3a), 3.42–3.38 (m, 1H, *H*-5a), 3.24 (dd, $^3J = 9.0$ Hz, $^3J = 7.9$ Hz, 1H, *H*-2a), 1.87 (quin, $^3J = 6.5$ Hz, 2H, *H*-2') ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, MeOD): $\delta = 105.3$ (C-1b), 104.3 (C-1a), 102.6 (C-1c), 80.9 (C-4a), 79.7 (C-4b), 76.5 (C-5b), 76.4 (C-5a), 76.4 (C-3a), 74.8 (C-2a), 74.6 (C-3b), 72.8 (C-5c), 72.6 (C-2b), 71.3 (C-2c), 71.0 (C-4c), 70.5 (C-3c), 67.6 (C-1'), 62.6 (C-6c), 61.8 (C-6a), 61.4 (C-6b), 49.4 (C-3'), 30.2 (C-2') ppm.

MS (ESI *m/z*) berechnet für $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 610.2066, gefunden 610.2049, ($|\Delta m/z| = 2.9$ ppm).

7.2.8.4 3-Azidopropyl)-GM3-Saccharid 72



Die Enzymreaktion wurde zusammen mit Dr. Maria Ortiz-Soto durchgeführt.

70 (50.0 mg, 118 μ mol, 1.00 Äq.), Trans-Sialidase TcTs (20 μ L semi-gereinigte Phase, aus *Trypanosoma cruzi* exprimiert in *E. coli*) und Fetuin (Sialinsäuredonor, 250 mg) wurden in Tris-HCl Puffer (100 mM, pH = 7.0, 5.0 mL) gegeben und 24 h bei 30 °C inkubiert. Die Umsetzung war nicht quantitativ, jedoch wurde auch bei längeren Reaktionszeiten keine weitere Umsetzung beobachtet. Das Enzym und Fetuin wurden durch Ultrafiltration unter Verwendung einer Membran (Trenngrenze von 10 kDA) entfernt. Die verbleibende wässrige Lösung wurde gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wurde zuerst säulenchromatographisch über Kieselgel (CHCl_3 :MeOH:H₂O = 6:4:1) und anschließend über RP-18 (H₂O:MeCN = 100:0 \rightarrow 70:30) gereinigt.

Ausbeute: 12.9 mg (18.0 μ mol, 15 %) eines farblosen Feststoffs, Wiedergewinnung von **70** (33.8 mg, 68 %).

Summenformel: C₂₆H₄₄N₄O₁₉

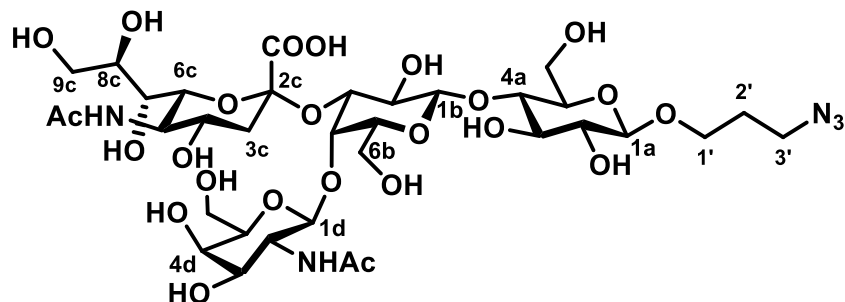
Molare Masse: 716.65 g/mol

¹H-NMR (600 MHz, MeOD): δ = 4.43 (d, 3J = 7.8 Hz, 1H, H-1b), 4.29 (d, 3J = 7.8 Hz, 1H, H-1a), 4.02 (dd, 3J = 9.7 Hz, 3J = 2.9 Hz, 1H, H-3b), 3.98–3.92 (m, 1H, H-1'), 3.91–3.89 (m, 3H, H-6a, H-4b), 3.86–3.82 (m, 2H, H-7c, H-9c), 3.78–3.74 (m, 3H, H-5c, H-6b), 3.67–3.60 (m, 4H, H-1', H-4c, H-5b, H-9c), 3.59–3.54 (m, 3H, H-2b, H-4a, H-6c), 3.52–3.49 (m, 2H, H-3a, H-8c), 3.45 (t, 3J = 6.8 Hz, 1H, H-3'), 3.43–3.39 (m, 1H, H-5a), 3.24 (dd, 3J = 8.7 Hz, 3J = 8.1 Hz, 1H, H-2a), 2.79 (dd, 2J = 12.8 Hz, 3J = 3.3 Hz, 1H, H-3c), 2.00 (s, 3H, C(O)NHCH₃), 1.90–1.82 (m, 3H, H-2', H-3c) ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, MeOD): δ = 175.3 (C(O)N), 173.0 (C(O)OH), 105.1 (C-1b), 104.3 (C-1a), 100.3 (C-2c), 80.8 (C-4a), 77.8 (C-3b), 76.9 (C-6c), 76.4 (C-5a), 76.4 (C-3a), 75.2 (C-5b), 74.7 (C-2a), 72.7 (C-7c), 70.8 (C-2b), 70.0 (C-8c), 69.4 (C-4b), 68.9 (C-4c), 67.6 (C-1'), 64.7 (C-9c), 62.5 (C-6b), 61.9 (C-6a), 53.8 (C-5c), 49.3 (C-3'), 41.4 (C-3c), 30.2 (C-2'), 22.6 (NHCH₃) ppm.

MS (ESI m/z) berechnet für [M-H]⁻ 715.2527, gefunden 715.2533, ($|\Delta m/z|$ = 0.8 ppm).

7.2.8.5 3-Azidopropyl)-GM2-Saccharid 73



Die Enzymreaktion wurde zusammen mit Dr. Maria Ortiz-Soto durchgeführt.

72 (7.71 mg, 10.8 μmol , 1.00 Äq.), UDP-GalNAc \cdot 2Na (10.0 mg, 15.3 μmol , 1.42 Äq.), β -1,4-*N*-Acetylgalactosaminyltransferase CgtA (50 μL *clear-extract*, aus *Campylobacter jejuni* exprimiert in *E. coli*) und MgCl_2 (5 mM) wurden in Tris-HCl Puffer (40 mM, pH = 7.5, 1.0 mL) gegeben und 48 h bei 35 °C inkubiert. Das Enzym wurden durch Ultrafiltration unter Verwendung einer Membran (Trenngrenze von 10 kDA) entfernt. Die verbleibende wässrige Lösung wurde gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wurde zuerst säulenchromatographisch über Kieselgel ($\text{CHCl}_3\text{:MeOH:H}_2\text{O} = 6\text{:}4\text{:}1$) und anschließend über RP-18 ($\text{H}_2\text{O:MeCN} = 100\text{:}0 \rightarrow 70\text{:}30$) gereinigt.

Ausbeute: 6.92 mg (7.52 μmol , 70 %) eines farblosen Feststoffs, Wiedergewinnung von **72** (1.22 mg, 16 %).

Summenformel: $\text{C}_{34}\text{H}_{57}\text{N}_5\text{O}_{24}$

Molare Masse: 919.84 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOD): $\delta = 4.81$ (d, $^3J = 8.5$ Hz, 1H, *H*-1d), 4.43 (d, $^3J = 7.9$ Hz, 1H, *H*-1b), 4.28 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 1H, *H*-1a), 4.15–4.14 (m, 1H, *H*-4b), 4.05 (dd, $^3J = 9.7$ Hz, $^3J = 3.2$ Hz, 1H, *H*-3b), 3.97–3.93 (m, 2H, *H*-2d, *H*-1'), 3.91–3.84 (m, 5H, *H*-6a, 1x*H*-6b, *H*-4c, *H*-9c), 3.79–3.73 (m, 5H, *H*-5c, *H*-7c, *H*-4d, *H*-5d, *H*-6d), 3.71–3.68 (m, 2H, *H*-5b, *H*-6d), 3.67–3.62 (m, 2H, *H*-6b, *H*-1'), 3.57–3.49 (m, 5H, *H*-3a, *H*-4a, *H*-8c, *H*-9c, *H*-3d), 3.46–3.42 (m, 3H, *H*-2b, *H*-3') 3.41–3.37 (m, 2H, *H*-5a, *H*-5c), 3.23 (dd, $^3J = 9.0$ Hz, $^3J = 8.0$ Hz, 1H, *H*-2a), 2.68 (dd, $^2J = 12.8$ Hz, $^3J = 4.8$ Hz, 1H, *H*-3c), 2.04–1.99 (m, 7H, *H*-3c, 2x C(O)NHCH₃), 1.87 (quin, $^3J = 6.6$ Hz, 2H, *H*-2') ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, MeOD): $\delta = 175.5$ (C_c(O)N), 174.7 (C_d(O)N), 174.0 (C_c(O)OH), 105.0 (C-1b), 104.3 (C-1a), 104.2 (C-1d), 102.6 (C-2c), 81.2 (C-4a), 78.8 (C-4b), 76.6 (C-3b), 76.4 (2C, C-5a, C-4d), 76.3 (C-3a), 75.6 (C-5b), 75.2 (C-8c), 74.8 (C-2a), 74.2 (C-3d), 73.1 (C-7c), 71.0 (C-2b), 70.4 (C-6c), 69.8 (C-5d), 69.3 (C-4c), 67.6 (C-1'), 65.4 (C-9c), 63.0 (C-6d), 61.9

(C-6a), 61.7 (C-6b), 54.5 (C-2d), 53.6 (C-5c), 49.4 (C-3'), 38.6 (C-3c), 30.2 (C-2'), 23.5, 22.6 (2x OCH₃) ppm.

MS (ESI m/z) berechnet für [M-H]⁻ 918.3321, gefunden 918.3375, ($|\Delta m/z| = 4.8$ ppm).

7.3 Biochemische Arbeiten

7.3.1 Züchtung der Galectin-1 Kristalle

Kristallisation

Eine Galectin-1 Lösung mit einer Konzentration von etwa 40 mg/mL wurde von *Julian Bechold* zur Verfügung gestellt. (Zusammensetzung des Lagerungs-Puffers: HEPES (20 mM, pH = 7.5), NaCl (120 mM), β -Mercaptoethanol (2.0 mM)). Die Kristallisation und die Analyse der gemessenen Röntgenstrukturen wurde in Zusammenarbeit mit *Dr. Clemens Grimm* durchgeführt.

Für die Kristallisation von Gal-1 wurde die Methode „Dampfdiffusion am hängender Tropfen“ (*hanging-drop vapor-diffusion method*) verwendet. Dazu wurde auf die Kristallisationsscheibe Gal-1-Lösung (2.0 μ L) zusammen Kristallisationspuffer (2.0 μ L, gleicher Volumenanteil) gegeben und die Kammer mit 100 μ L Kristallisationspuffer befüllt. Die Kammer wurde mit der Scheibe verschlossen, sodass der Tropfen nach unten hängt. (Zusammensetzung des Kristallisationspuffers: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2.2 M), BisTris (100 μ M, pH = 5.0), β -Mercaptoethanol (1.0 %)). Nach 2-4 Wochen bei 16 °C wurden die Gal-1 Kristalle mit Größen von mehreren 100 μ m gebildet.

Soaking

Für die anschließende Zugabe der Liganden **39a-f**, **40** oder **41** wurde diese jeweils im Cryo-Puffer gelöst. Dieser hat nahezu die gleiche Zusammensetzung wie der Kristallisationspuffer, mit der Ausnahme, dass 25 % Wasser durch Glycerin ausgetauscht sind. Die Scheiben wurden aus Kristallisationskammer vorsichtig herausgenommen und dem Tropfen (2.0 μ L) des jeweiligen Liganden im Cryo-Puffer zugegeben. Nach 5 min wurden der 2.0 μ L der Lösung entnommen, ohne dabei die Gal-1 Kristalle zu beschädigen. Schrittweise wurde durch Zugabe von Cryo-Puffer und Entnahme der Lösung dieser ausgetauscht. Die Kristalle wurden aus der Lösung entnommen (*loop*) und direkt in flüssigem Stickstoff (-196 °C) eingefroren. Diese wurden anschließend einem „Aluminium-Revolver“ gelagert, der für die Automation am jeweiligen Synchrotron geeignet waren.

Datenerhebung, Strukturauflösung und Verfeinerung

Die aufgelösten Strukturen von **40** und **41** im Gal-1 wurde am Synchrotron in Hamburg gemessen. Die Beugungsquelle (PETRA III, EMBL c/o DES) lieferte eine Wellenlänge (0.92626 Å). Die bereits publizierte Struktur 5MWX^[205] wurde als Basis genutzt und die neuen Liganden im Modus *molecular replacement* und anschließend *refinement* (Verfeinerung) mit PHENIX^[282] durchgeführt. Die Liganden wurden in die gemessene Elektronendichte gesetzt. Für die richtige Datei (*restraint*) wurden Koordinaten der Liganden im PRODRG Server^[283] genutzt.

7.3.2 ITC-Messungen

Die Messung der Dissoziationskonstanten der Liganden zum Galectin-1 wurden mit einem MircoCalITC200 durchgeführt. Dieses wurde von *Prof. Dr. Lorenz Meinel* zur Verfügung gestellt. Der schematische Aufbau des Geräts ist unter **Kapitel 4.2.3** beschrieben. Die Gal-1 Lösung wurde gegen entgasten ITC-Puffer bestehend aus Na-phosphat (5.0 mM, pH = 7.2), NaCl (200 mM) und β -Mercaptoethnaol (4.0 mM) dialysiert. Die Liganden **39a-f**, **40** und **41** wurden im selben Puffer gelöst (Überstand beim letzten Zyklus der Dialyse). Die Kammer wurde Gal-1 Lösung befüllt (1.0 mM, 300 μ L) und über die Kanüle der Ligand hinzutitriert (20.0 mM, 20x 2.0 μ L). Für die erste Injektion wurden 0.4 μ L verwendet. Die Wärmekorrektur wurde aufgenommen und auf das Stoffmengenverhältnis des Liganden bzw. Proteins gerechnet. Das gegebene Programm wurde für die Auswertung verwendet. Dazu wurde *one set of sites* eine nichtlineare Kurve angepasst.

7.3.3 Isolierung der Glycopeptide für die LC-MS/MS

Zellkultur

Die Zelllysate aus drei Zellkulturen (Inkubation für 3 d von DMSO als Kontrolle, von 1.0 mM SiaNAI **8a** (1.0 mM in H₂O) und von Ac₄ManNAI **12a** (20 µM in DMSO) wurden von *Prof. Dr. R. Ebert* zur Verfügung gestellt.

Für die **Isolierung und weiteren Verarbeitung** wurde in Eigenarbeit das Protokoll von *Woo et al.* durchgeführt.^[226]

Jedes Zelllysate wurde auf eine Konzentration von 300 µg pro 50 µL verdünnt. Es wurden SDS-Puffer (50 µL, 10 %) zugegeben und die Proben für 10 min auf 90 °C erhitzt. Die Proben wurden mit H₃PO₄ (10 µL, 12 %) versetzt und *S-Trap*-Bindungspuffer (700 µL, 90% MeOH, 50mM TEAB). Die Lösungen wurden auf kleine Filter (*spin columns*) überführt und die Lösung mit einer Tischzentrifuge abfiltriert. Die Proteine wurden noch mit *S-Trap*-Bindungspuffer (3x 400 µL) gewaschen. Anschließend wurden die Proben mit Trypsin in TEAB (10 µg Trypsin pro Probe, 125 µL, 50 mM TEAB) über Nacht inkubiert. Die Lösungen wurden zentrifugiert, der Überstand entfernt und der Rückstand in TEAB (160 µL, 50 mM) und mit wässriger MeCN-Lösung (160 µL, 50 % mit 0.2 % Ameisensäure) gelöst. Die Peptide wurden gefriergetrocknet.

Die Peptid-Proben wurden in PBS-Lösung (200 µL) und einer Lösung aus Biotin-Azid von CCT (17.0 µL, 10 mM), CuSO₄ (4.0 µL, 50 mM), THPTA (16.0 µL, 30 mM) und NaAsc (80.0 µL, 100 mM) wurden hinzugegeben und das Reaktionsgemisch unter leichtem Rotieren für 3.5 h bei 25 °C inkubiert. Zur Komplexierung der Kupferionen wurden EDTA-Lösung (5 µL, 40 mM) zugegeben und das Gemisch weitere 5 min inkubiert. Anschließend wurde Biotin-Agarose-Harz (1000 µL) zugegeben und weitere 14 h bei 25 °C unter leichtem Rotieren inkubiert. Das Harz wurde mit wässriger Harnstoff-Lösung (2x 1000 µL, 6.0 M) und mit PBS-Lösung (3x 1000 µL) gewaschen. Die Lösungen wurden jeweils zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Harz wurde erneut in PBS (500 µL) suspendiert und zuerst für 1 h mit DTT (10.0 µL, 5.0 mM), dann 1 h mit Iodacetamid (4.0 µL, 10 mM) versetzt. Das Harz wurde noch mit PBS (2x 1000 µL) und H₂O (3x 1000 µL) gewaschen. Zur Abspaltung der Glycopeptide vom Harz wurde dieses mit wässriger Ameisensäure (400 µL, 2.0 %) für 30 min versetzt. Dieser Schritt wurde noch zwei Mal wiederholt und das Harz mit wässriger MeCN-Lösung (2x 400 µL, mit 1.0 % Ameisensäure) gewaschen. Die vereinten sauren Phasen wurden vereint und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck (*speed vac*) entfernt.

LC-MS/MS wurde von *Dr. Marc Drießen* durchgeführt.

NanoLC-MS/MS Analysen wurden an einem Orbitrap Fusion Lumos (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Germany), das mit einer PicoView Ion Source (New Objective, Littleton, USA)

ausgerüstet ist und mit einer EASY-nLC 1000 (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Germany) verbunden ist.

Peptide wurden auf eine Vorsäule gegeben (trap column, 2 cm × 150 µM ID, befüllt mit 3 µm C18 ReproSil) und dann auf Kapillarsäulen eluiert (30 cm × 150 µm ID, befüllt mit ReproSil-Pur 120 C18-AQ, 1.9 µm) und über einen Zeitraum von 90 min mit einem Gradienten von 3% zu 44% MeCN (75 min), gefolgt von 44% zu 81% MeCN (90min) getrennt. Anschließend wurden diese mit 98% MeCN gewaschen. Alle Puffer enthalten 0.1% Ameisensäure. Eine Fließrate von 500 nL/min wurde benutzt. Suchparameter für die MS 1 waren: Auflösung: 120k, Bereich: 300-2000 m/z, max. Inj. Zeit: 50ms, AGC: 4 x 10e6 (100%). Die DDA-basierte MS2 basierte auf einer dynamischen Ausschlussliste, (N=1, 10s), Ladungszustandsfilter (einschließlich z=2-6), einer Mindestintensität von 25 x10e3, in einer Zykluszeit von 3 s.

MS-MS Einstellungen: stHCD (12,30,48), Auflösung 30k, max. Inj. Zeit von 54ms, AGC target 5x10e5 und 2 Microscans.

Datenanalyse wurde mit Byonic (Protein Metrics) durchgeführt, unter Gebrauch des humanen Proteoms als Refrenz (uniprot) und erlaubte, variable Modifikationen wie Deaminierung (Q,N), Oxidation (M), Gln->pyro-Glu (Q) und Carbamidomethyl (C).

8 Literaturverzeichnis

- [1] Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung, *Wissen, Einstellung und Verhalten zur Organ- und Gewebespende*, <https://www.organspende-info.de/zahlen-und-fakten/einstellungen-und-wissen/>, 17.11.2022
- [2] Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung, *Der unumkehrbare Ausfall der gesamten Hirnfunktionen (Hirntod) ist Voraussetzung zur Organspende*, <https://www.organspende-info.de/organspende/hirntod/>, 17.11.2022
- [3] Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung, *Definition und Ursachen des unumkehrbaren Ausfalls der gesamten Hirnfunktionen (Hirntod)*, <https://www.organspende-info.de/organspende/hirntod/definition-und-ursachen/>, 17.11.2022
- [4] Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung, *Wichtige Voraussetzungen für eine Organspende sind Zustimmung zur Spende und Todesfeststellung*, <https://www.organspende-info.de/organspende/voraussetzungen/>, 27.11.2022
- [5] Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung, *Die Nierentransplantation*, <https://www.organspende-info.de/organspende/transplantierbare-organe/nierentransplantation/>, 17.11.2022
- [6] Y. Cao, J. P. Vacanti, K. T. Paige, J. Upton, C. A. Vacanti, *Plastic and Reconstructive Surgery* **1997**, 100, 297-302.
- [7] J. C. Perron, A. A. Rodrigues, N. Surubholta, J. Dodd, *Biology Open* **2019**, 8.
- [8] P. H. Warnke, I. N. G. Springer, J. Wiltfang, Y. Acil, H. Eufinger, M. Wehmöller, P. A. J. Russo, H. Bolte, E. Sherry, E. Behrens, H. Terheyden, *The Lancet* **2004**, 364, 766-770.
- [9] *Tissue Engineering Part C: Methods* **2020**, 26, 91-106.
- [10] S. Soker, M. Machado, A. Atala, *World Journal of Urology* **2000**, 18, 10-18.
- [11] R. Levato, T. Jungst, R. G. Scheuring, T. Blunk, J. Groll, J. Malda, *Adv. Mater.* **2020**, 32, 1906423.
- [12] J. Zhang, E. Wehrle, M. Rubert, R. Müller, *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, 22, 3971.
- [13] P. S. Gungor-Ozkerim, I. Inci, Y. S. Zhang, A. Khademhosseini, M. R. Dokmeci, *Biomaterials Science* **2018**, 6, 915-946.
- [14] C. Mandrycky, Z. Wang, K. Kim, D.-H. Kim, *Biotechnol. Adv.* **2016**, 34, 422-434.
- [15] F. Pati, J. Gantelius, H. A. Svahn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 4650-4665.
- [16] S. N. Bhatia, D. E. Ingber, *Nat. Biotechnol.* **2014**, 32, 760-772.
- [17] R. Schmid, S. K. Schmidt, R. Detsch, H. Horder, T. Blunk, S. Schrüfer, D. W. Schubert, L. Fischer, I. Thievensen, S. Heltmann-Meyer, D. Steiner, D. Schneidereit, O. Friedrich, A. Grüneboom, H. Amouei, H. Wajant, R. E. Horch, A. K. Bosserhoff, A. Arkudas, A. Kengelbach-Weigand, *Adv. Funct. Mater.* **2022**, 32, 2107993.
- [18] F. Hajjali, S. Tajbakhsh, A. Shojaei, *Polymer Reviews* **2018**, 58, 164-207.
- [19] J. Schöneberg, F. De Lorenzi, B. Theek, A. Blaeser, D. Rommel, A. J. C. Kuehne, F. Kießling, H. Fischer, *Scientific Reports* **2018**, 8, 10430.
- [20] L. Ning, H. Sun, T. Lelong, R. Guilloteau, N. Zhu, D. J. Schreyer, X. Chen, *Biofabrication* **2018**, 10, 035014.
- [21] *Tissue Engineering Part C: Methods* **2019**, 25, 334-343.
- [22] L. Cheng, B. Yao, T. Hu, X. Cui, X. Shu, S. Tang, R. Wang, Y. Wang, Y. Liu, W. Song, X. Fu, H. Li, S. Huang, *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, 135, 1107-1113.
- [23] P. Liu, H. Shen, Y. Zhi, J. Si, J. Shi, L. Guo, S. G. Shen, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2019**, 181, 1026-1034.
- [24] S. P. Miguel, C. S. D. Cabral, A. F. Moreira, I. J. Correia, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2019**, 181, 994-1003.
- [25] Y.-J. Seol, H. Lee, J. S. Copus, H.-W. Kang, D.-W. Cho, A. Atala, S. J. Lee, J. J. Yoo, *Bioprinting* **2018**, 10, e00028.

- [26] M. Albanna, K. W. Binder, S. V. Murphy, J. Kim, S. A. Qasem, W. Zhao, J. Tan, I. B. El-Amin, D. D. Dice, J. Marco, J. Green, T. Xu, A. Skardal, J. H. Holmes, J. D. Jackson, A. Atala, J. J. Yoo, *Scientific Reports* **2019**, *9*, 1856.
- [27] A. Mazzocchi, M. Devarasetty, R. Huntwork, S. Soker, A. Skardal, *Biofabrication* **2018**, *11*, 015003.
- [28] C. Pitsalidis, M. P. Ferro, D. Iandolo, L. Tzounis, S. Inal, R. M. Owens, *Science Advances* **2018**, *4*, eaat4253.
- [29] W. Kim, M. Kim, G. H. Kim, *Adv. Funct. Mater.* **2018**, *28*, 1800405.
- [30] W. Kim, H. Lee, J. Lee, A. Atala, J. J. Yoo, S. J. Lee, G. H. Kim, *Biomaterials* **2020**, *230*, 119632.
- [31] H. Lee, W. Kim, J. Lee, J. J. Yoo, G. H. Kim, S. J. Lee, *ACS Applied Materials & Interfaces* **2019**, *11*, 39449-39458.
- [32] J. H. Kim, Y.-J. Seol, I. K. Ko, H.-W. Kang, Y. K. Lee, J. J. Yoo, A. Atala, S. J. Lee, *Scientific Reports* **2018**, *8*, 12307.
- [33] L. Li, J. Li, J. Guo, H. Zhang, X. Zhang, C. Yin, L. Wang, Y. Zhu, Q. Yao, *Adv. Funct. Mater.* **2019**, *29*, 1807356.
- [34] D. Taniguchi, K. Matsumoto, T. Tsuchiya, R. Machino, Y. Takeoka, A. Elgalad, K. Gunge, K. Takagi, Y. Taura, G. Hatachi, N. Matsuo, N. Yamasaki, K. Nakayama, T. Nagayasu, *Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery* **2018**, *26*, 745-752.
- [35] Y. Lai, Y. Li, H. Cao, J. Long, X. Wang, L. Li, C. Li, Q. Jia, B. Teng, T. Tang, J. Peng, D. Eglin, M. Alini, D. W. Grijpma, G. Richards, L. Qin, *Biomaterials* **2019**, *197*, 207-219.
- [36] Z. Wang, S. J. Lee, H.-J. Cheng, J. J. Yoo, A. Atala, *Acta Biomaterialia* **2018**, *70*, 48-56.
- [37] V. Mironov, T. Trusk, V. Kasyanov, S. Little, R. Swaja, R. Markwald, *Biofabrication* **2009**, *1*, 022001.
- [38] N. K. Karamanos, A. D. Theocharis, Z. Piperigkou, D. Manou, A. Passi, S. S. Skandalis, D. H. Vynios, V. Orian-Rousseau, S. Ricard-Blum, C. E. H. Schmelzer, L. Duca, M. Durbeej, N. A. Afratis, L. Troeberg, M. Franchi, V. Masola, M. Onisto, *The FEBS Journal* **2021**, *288*, 6850-6912.
- [39] A. Sorushanova, L. M. Delgado, Z. Wu, N. Shologu, A. Kshirsagar, R. Raghunath, A. M. Mullen, Y. Bayon, A. Pandit, M. Raghunath, D. I. Zeugolis, *Adv. Mater.* **2019**, *31*, 1801651.
- [40] R. O. Hynes, *Cell* **1992**, *69*, 11-25.
- [41] S. C. Mueller, G. Ghersi, S. K. Akiyama, Q.-X. A. Sang, L. Howard, M. Pineiro-Sanchez, H. Nakahara, Y. Yeh, W.-T. Chen, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 24947-24952.
- [42] N. K. Karamanos, Z. Piperigkou, A. D. Theocharis, H. Watanabe, M. Franchi, S. Baud, S. Brézillon, M. Götte, A. Passi, D. Vigetti, S. Ricard-Blum, R. D. Sanderson, T. Neill, R. V. Iozzo, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 9152-9232.
- [43] I. C. Harding, R. Mitra, S. A. Mensah, A. Nersesyan, N. N. Bal, E. E. Ebong, *Biorheology* **2019**, *56*, 131-149.
- [44] F. W. Lichtenthaler, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, *2002*, 4095-4122.
- [45] B. Kalra, S. Kalra, *Journal of Medical Nutrition and Nutraceuticals* **2013**, *2*, 110.
- [46] A. D. McNaught, *Carbohydr. Res.* **1997**, *297*, 1-92.
- [47] Y. Kanie, O. Kanie, *Biochemical Compounds* **2017**, *5*, 3.
- [48] B. Ma, X. Guan, Y. Li, S. Shang, J. Li, Z. Tan, *Frontiers in Chemistry* **2020**, *8*.
- [49] L. Tappy, *Clinical Nutrition* **2021**, *40*, 1691-1698.
- [50] H. H. Wandall, M. A. I. Nielsen, S. King-Smith, N. de Haan, I. Bagdonaite, *The FEBS Journal* **2021**, *288*, 7183-7212.
- [51] C. D. Hunter, T. Guo, G. Daskhan, M. R. Richards, C. W. Cairo, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 8188-8241.
- [52] J. M. F. G. Aerts, M. Artola, M. van Eijk, M. J. Ferraz, R. G. Boot, *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **2019**, *7*.
- [53] J. Fink, J. Seibel, *Biol. Chem.* **2018**, *399*, 1157-1168.
- [54] J. Zhang, P. Kowal, J. Fang, P. Andreana, P. G. Wang, *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 969-976.

8. Literaturverzeichnis

- [55] A. B. Celi, J. Goldstein, M. V. Rosato-Siri, A. Pinto, *Frontiers in Molecular Biosciences* **2022**, 9.
- [56] J. Gu, T. Isaji, Y. Sato, Y. Kariya, T. Fukuda, *Biol. Pharm. Bull.* **2009**, 32, 780-785.
- [57] M. Kundu, B. Mahata, A. Banerjee, S. Chakraborty, S. Debnath, S. S. Ray, Z. Ghosh, K. Biswas, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **2016**, 1863, 1472-1489.
- [58] Y.-C. Wang, S. E. Peterson, J. F. Loring, *Cell Research* **2014**, 24, 143-160.
- [59] G. A. Khoury, R. C. Baliban, C. A. Floudas, *Scientific Reports* **2011**, 1, 90.
- [60] S. Shrimal, N. A. Cherepanova, R. Gilmore, *Seminars in Cell & Developmental Biology* **2015**, 41, 71-78.
- [61] P. H. Jensen, D. Kolarich, N. H. Packer, *The FEBS Journal* **2010**, 277, 81-94.
- [62] K. K. Palaniappan, C. R. Bertozzi, *Chem. Rev.* **2016**, 116, 14277-14306.
- [63] Z. Yuan, R. D. Teasdale, *Bioinformatics* **2002**, 18, 1109-1115.
- [64] E. Kim, H. Koo, *Chemical Science* **2019**, 10, 7835-7851.
- [65] M. Aebi, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **2013**, 1833, 2430-2437.
- [66] F. Schwarz, M. Aebi, *Current Opinion in Structural Biology* **2011**, 21, 576-582.
- [67] P. Fisher, D. Ungar, *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **2016**, 4.
- [68] P. Hossler, B. C. Mulukutla, W.-S. Hu, *PLOS ONE* **2007**, 2, e713.
- [69] P. Fisher, J. Thomas-Oates, A. J. Wood, D. Ungar, *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **2019**, 7.
- [70] D. Skropeta, *Biorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 2645-2653.
- [71] J. Gu, N. Taniguchi, *Glycoconjugate J.* **2004**, 21, 9-15.
- [72] Y.-Y. Zhao, M. Takahashi, J.-G. Gu, E. Miyoshi, A. Matsumoto, S. Kitazume, N. Taniguchi, *Cancer Science* **2008**, 99, 1304-1310.
- [73] G. P. Bhide, K. J. Colley, *Histochemistry and Cell Biology* **2017**, 147, 149-174.
- [74] A. Varki, *Glycobiology* **1992**, 2, 25-40.
- [75] S. R. K. JP, *New Compr. Biochem.* **1997**, 29, 243-402.
- [76] M. Bardor, D. H. Nguyen, S. Diaz, A. Varki, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 4228-4237.
- [77] S. Roseman, G. W. Jourdian, D. Watson, R. Rood, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1961**, 47, 958-961.
- [78] L. Warren, H. Felsenfeld, *J. Biol. Chem.* **1962**, 237, 1421-1431.
- [79] P. R. Wratil, R. Horstkorte, W. Reutter, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 9482-9512.
- [80] J. Du, M. A. Meledeo, Z. Wang, H. S. Khanna, V. D. P. Paruchuri, K. J. Yarema, *Glycobiology* **2009**, 19, 1382-1401.
- [81] M. S. Macauley, P. R. Crocker, J. C. Paulson, *Nature Reviews Immunology* **2014**, 14, 653-666.
- [82] A. Varki, *Trends in Molecular Medicine* **2008**, 14, 351-360.
- [83] J. B. Lowe, *Current Opinion in Cell Biology* **2003**, 15, 531-538.
- [84] F. Li, J. Ding, *Protein & Cell* **2019**, 10, 550-565.
- [85] H. C. Hang, C. Yu, D. L. Kato, C. R. Bertozzi, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003**, 100, 14846-14851.
- [86] B. W. Zaro, Y. Y. Yang, H. C. Hang, M. R. Pratt, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2011**, 108, 8146-8151.
- [87] J. M. Smeeckens, W. Chen, R. Wu, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **2015**, 26, 604-614.
- [88] C. Gurcel, A.-S. Vercoutter-Edouart, C. Fonbonne, M. Mortuaire, A. Salvador, J.-C. Michalski, J. Lemoine, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2008**, 390, 2089-2097.
- [89] H. Hahne, N. Sobotzki, T. Nyberg, D. Helm, V. S. Borodkin, D. M. F. van Aalten, B. Agnew, B. Kuster, *Journal of Proteome Research* **2013**, 12, 927-936.
- [90] M. Gutmann, E. Memmel, A. C. Braun, J. Seibel, L. Meinel, T. Lühmann, *ChemBioChem* **2016**, 17, 866-875.
- [91] D. Rabuka, S. C. Hubbard, S. T. Laughlin, S. P. Argade, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 12078-12079.
- [92] M. Sawa, T.-L. Hsu, T. Itoh, M. Sugiyama, S. R. Hanson, P. K. Vogt, C.-H. Wong, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, 103, 12371-12376.

- [93] T.-L. Hsu, S. R. Hanson, K. Kishikawa, S.-K. Wang, M. Sawa, C.-H. Wong, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007**, *104*, 2614-2619.
- [94] S. R. Hanson, T.-L. Hsu, E. Weerapana, K. Kishikawa, G. M. Simon, B. F. Cravatt, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7266-7267.
- [95] P.-H. Kuhn, K. Koroniak, S. Hognl, A. Colombo, U. Zeitschel, M. Willem, C. Volbracht, U. Schepers, A. Imhof, A. Hoffmeister, C. Haass, S. Roßner, S. Bräse, S. F. Lichtenthaler, *The EMBO Journal* **2012**, *31*, 3157-3168.
- [96] P.-w. Pan, Q. Zhang, J. Hou, Z. Liu, F. Bai, M.-r. Cao, T. Sun, G. Bai, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2012**, *403*, 1661-1670.
- [97] R. Xie, S. Hong, L. Feng, J. Rong, X. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 9914-9917.
- [98] R. Xie, L. Dong, R. Huang, S. Hong, R. Lei, X. Chen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 14082-14086.
- [99] A. Homann, R.-u. Qamar, S. Serim, P. Dersch, J. Seibel, *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **2010**, *6*, 24.
- [100] S. Altmann, J. Mut, N. Wolf, J. Meißner-Weigl, M. Rudert, F. Jakob, M. Gutmann, T. Lühmann, J. Seibel, R. Ebert, *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, *22*, 2820.
- [101] S. J. Luchansky, S. Goon, C. R. Bertozzi, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 371-374.
- [102] A. K. Sarkar, T. A. Fritz, W. H. Taylor, J. D. Esko, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1995**, *92*, 3323-3327.
- [103] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.
- [104] C. D. Hein, X.-M. Liu, D. Wang, *Pharm. Res.* **2008**, *25*, 2216-2230.
- [105] E. Saxon, R. Bertozzi Carolyn, *Science* **2000**, *287*, 2007-2010.
- [106] S. J. Luchansky, S. Argade, B. K. Hayes, C. R. Bertozzi, *Biochemistry* **2004**, *43*, 12358-12366.
- [107] Q.-R. Bai, L. Dong, Y. Hao, X. Chen, Q. Shen, *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 5486-5489.
- [108] Y. Hao, X. Fan, Y. Shi, C. Zhang, D.-e. Sun, K. Qin, W. Qin, W. Zhou, X. Chen, *Nature Communications* **2019**, *10*, 4065.
- [109] Y. Chu, Y. H. Oum, I. S. Carrico, *Virology* **2016**, *487*, 95-103.
- [110] P. V. Chang, X. Chen, C. Smyrniotis, A. Xenakis, T. Hu, C. R. Bertozzi, P. Wu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4030-4033.
- [111] J. Vanbeselaere, D. Vicogne, G. Matthijs, C. Biot, F. Foulquier, Y. Guerardel, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 11293-11295.
- [112] P. A. Gilormini, C. Lion, D. Vicogne, T. Levade, S. Potelle, C. Mariller, Y. Guérardel, C. Biot, F. Foulquier, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 2318-2321.
- [113] P. V. Chang, D. H. Dube, E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9516-9518.
- [114] 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.
- [115] N. M. Riley, C. R. Bertozzi, S. J. Pitteri, *Molecular & Cellular Proteomics* **2021**, *20*, 100029.
- [116] N. M. Riley, S. A. Malaker, M. D. Driessen, C. R. Bertozzi, *Journal of Proteome Research* **2020**, *19*, 3286-3301.
- [117] S. Li, H. Zhu, J. Wang, X. Wang, X. Li, C. Ma, L. Wen, B. Yu, Y. Wang, J. Li, P. G. Wang, *ELECTROPHORESIS* **2016**, *37*, 1431-1436.
- [118] W. Qin, K. Qin, X. Fan, L. Peng, W. Hong, Y. Zhu, P. Lv, Y. Du, R. Huang, M. Han, B. Cheng, Y. Liu, W. Zhou, C. Wang, X. Chen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 1817-1820.
- [119] L. R. Ruhaak, G. Xu, Q. Li, E. Goonatilleke, C. B. Lebrilla, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 7886-7930.
- [120] W.-C. Lee, K. H. Lee, *Anal. Biochem.* **2004**, *324*, 1-10.
- [121] L. Yang, S. Wu, J. C. Cooper, M. K. Paul, A. L. Cummings, Z. M. Eletr, S. L. Ben-Arye, V. Padler-Karavani, K. N. Samli, R. J. Woods, *The FASEB Journal* **2018**, *32*, 544.516-544.516.

8. Literaturverzeichnis

- [122] N. Selvan, R. Williamson, D. Mariappa, D. G. Campbell, R. Gourlay, A. T. Ferenbach, T. Aristotelous, I. Hopkins-Navratilova, M. Trost, D. M. F. van Aalten, *Nature chemical biology* **2017**, *13*, 882-887.
- [123] E. Sterner, N. Flanagan, J. C. Gildersleeve, *ACS Chemical Biology* **2016**, *11*, 1773-1783.
- [124] C. F. Teo, S. Ingale, M. A. Wolfert, G. A. Elsayed, L. G. Nöt, J. C. Chatham, L. Wells, G.-J. Boons, *Nature chemical biology* **2010**, *6*, 338-343.
- [125] E. Klement, T. Raffai, K. F. Medzihradzsky, *PROTEOMICS* **2016**, *16*, 1858-1862.
- [126] M. R. Larsen, S. S. Jensen, L. A. Jakobsen, N. H. H. Heegaard, *Molecular & Cellular Proteomics* **2007**, *6*, 1778-1787.
- [127] P. Hägglund, J. Bunkenborg, F. Elortza, O. N. Jensen, P. Roepstorff, *Journal of Proteome Research* **2004**, *3*, 556-566.
- [128] L. Cao, L. Yu, Z. Guo, X. Li, X. Xue, X. Liang, *J. Chromatogr. A* **2013**, *1299*, 18-24.
- [129] J. Wei, Y. Tang, Y. Bai, J. Zaia, C. E. Costello, P. Hong, C. Lin, *Anal. Chem.* **2020**, *92*, 782-791.
- [130] C. Ashwood, B. Pratt, B. X. MacLean, R. L. Gundry, N. H. Packer, *Analyst* **2019**, *144*, 3601-3612.
- [131] J. Chen, P. Shah, H. Zhang, *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 10670-10674.
- [132] T.-L. Tremblay, J. J. Hill, *Scientific Reports* **2017**, *7*, 46574.
- [133] K. Sparbier, S. Koch, I. Kessler, T. Wenzel, M. Kostrzewa, *Journal of biomolecular techniques : JBT* **2005**, *16*, 407-413.
- [134] Y. Xu, Z. Wu, L. Zhang, H. Lu, P. Yang, P. A. Webley, D. Zhao, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 503-508.
- [135] C. M. Woo, A. T. Iavarone, D. R. Spiciarich, K. K. Palaniappan, C. R. Bertozzi, *Nature Methods* **2015**, *12*, 561-567.
- [136] L. Wen, D. Liu, Y. Zheng, K. Huang, X. Cao, J. Song, P. G. Wang, *ACS Central Science* **2018**, *4*, 451-457.
- [137] A. Lopez Aguilar, J. G. Briard, L. Yang, B. Ovrzyn, M. S. Macauley, P. Wu, *ACS Chemical Biology* **2017**, *12*, 611-621.
- [138] C. Büll, T. Heise, N. van Hilten, J. F. A. Pijnenborg, V. R. L. J. Bloemendal, L. Gerrits, E. D. Kers-Rebel, T. Ritschel, M. H. den Brok, G. J. Adema, T. J. Boltje, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 3309-3313.
- [139] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 666-676.
- [140] Prize announcement, NobelPrize.org, Nobel Prize Outreach AB 2022, *The Nobel Prize in Chemistry 2022*, <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2022/summary/>, 10.11.2022
- [141] C. E. Hoyle, C. N. Bowman, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1540-1573.
- [142] A. H. Gergely B. Scerép, Péter Kele, *Methods Appl. Fluoresc* **2015**, *3*, 042001.
- [143] H. Staudinger, J. Meyer, *Helv. Chim. Acta* **1919**, *2*, 635-646.
- [144] E. Saxon, S. J. Luchansky, H. C. Hang, C. Yu, S. C. Lee, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14893-14902.
- [145] *Proceedings of the Chemical Society* **1961**, 357-396.
- [146] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.
- [147] B. T. Worrell, J. A. Malik, V. V. Fokin, *Science* **2013**, *340*, 457-460.
- [148] F. Martins, M. F. Duarte, M. T. Fernandez, G. J. Langley, P. Rodrigues, M. T. Barros, M. L. Costa, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18*, 363-366.
- [149] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *The Journal of Organic Chemistry* **2002**, *67*, 3057-3064.
- [150] N. P. Grimster, B. Stump, J. R. Fotsing, T. Weide, T. T. Talley, J. G. Yamauchi, Á. Nemezc, C. Kim, K.-Y. Ho, K. B. Sharpless, P. Taylor, V. V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 6732-6740.
- [151] C. M. Woo, A. Felix, L. Zhang, J. E. Elias, C. R. Bertozzi, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2017**, *409*, 579-588.

- [152] M. A. Nessen, G. Kramer, J. Back, J. M. Baskin, L. E. Smeenk, L. J. de Koning, J. H. van Maarseveen, L. de Jong, C. R. Bertozzi, H. Hiemstra, C. G. de Koster, *J Proteome Res* **2009**, *8*, 3702-3711.
- [153] A. Krebs, J. Wilke, in *Wittig Chemistry*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **1983**, pp. 189-233.
- [154] J. Dommerholt, F. P. J. T. Rutjes, F. L. van Delft, *Top. Curr. Chem.* **2016**, *374*, 16.
- [155] J. C. Jewett, E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3688-3690.
- [156] J. B. Warner, A. K. Muthusamy, E. J. Petersson, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 2508-2514.
- [157] I. Nikić-Spiegel, in *Noncanonical Amino Acids: Methods and Protocols* (Ed.: E. A. Lemke), Springer New York, New York, NY, **2018**, pp. 279-295.
- [158] B. L. Oliveira, Z. Guo, G. J. L. Bernardes, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 4895-4950.
- [159] B. Briou, B. Améduri, B. Boutevin, *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50*, 11055-11097.
- [160] W. Chen, D. Wang, C. Dai, D. Hamelberg, B. Wang, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 1736-1738.
- [161] J. Schoch, M. Staudt, A. Samanta, M. Wiessler, A. Jäschke, *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 1382-1386.
- [162] M. Wiessler, W. Waldeck, C. Kliem, R. Pipkorn, K. Braun, *International Journal of Medical Sciences* **2010**, *7*, 19-28.
- [163] R. Selvaraj, J. M. Fox, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 753-760.
- [164] M. L. Blackman, M. Royzen, J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13518-13519.
- [165] M. Baumdick, Y. Brüggemann, M. Schmick, G. Xouri, O. Sabet, L. Davis, J. W. Chin, P. I. H. Bastiaens, *eLife* **2015**, *4*, e12223.
- [166] T. Plass, S. Milles, C. Koehler, J. Szymański, R. Mueller, M. Wießler, C. Schultz, E. A. Lemke, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4166-4170.
- [167] E. Kozma, I. Nikić, B. R. Varga, I. V. Aramburu, J. H. Kang, O. T. Fackler, E. A. Lemke, P. Kele, *ChemBioChem* **2016**, *17*, 1518-1524.
- [168] D. Shi, A. Sheng, L. Chi, *Frontiers in Molecular Biosciences* **2021**, *8*.
- [169] R. Mody, S. H. a. Joshi, W. Chaney, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **1995**, *33*, 1-10.
- [170] Y. Huang, C. Yang, X.-f. Xu, W. Xu, S.-w. Liu, *Acta Pharmacologica Sinica* **2020**, *41*, 1141-1149.
- [171] B. E. Thacker, D. Xu, R. Lawrence, J. D. Esko, *Matrix Biol.* **2014**, *35*, 60-72.
- [172] A. Gómez Toledo, J. T. Sorrentino, D. R. Sandoval, J. Malmström, N. E. Lewis, J. D. Esko, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **2021**, *69*, 105-119.
- [173] H. Barth, C. Schäfer, M. I. Adah, F. Zhang, R. J. Linhardt, H. Toyoda, A. Kinoshita-Toyoda, T. Toida, T. H. van Kuppevelt, E. Depla, F. von Weizsäcker, H. E. Blum, T. F. Baumert, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 41003-41012.
- [174] R. C. Kines, C. D. Thompson, D. R. Lowy, J. T. Schiller, P. M. Day, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2009**, *106*, 20458-20463.
- [175] M. Banerjee, J. Copp, D. Vuga, M. Marino, T. Chapman, P. Van Der Geer, P. Ghosh, *Mol. Microbiol.* **2004**, *52*, 257-271.
- [176] T. Minko, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2004**, *56*, 491-509.
- [177] C. Galustian, R. A. Childs, M. Stoll, H. Ishida, M. Kiso, T. Feizi, *Immunology* **2002**, *105*, 350-359.
- [178] L. Li, Q. Ding, J. Zhou, Y. Wu, M. Zhang, X. Guo, M. Long, S. Lü, *The FEBS Journal* **2022**, *289*, 2877-2894.
- [179] S. Sun, Y. Hu, L. Jia, S. T. Eshghi, Y. Liu, P. Shah, H. Zhang, *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 6292-6299.
- [180] F.-C. Chou, S.-J. Shieh, H.-K. Sytwu, *European Journal of Immunology* **2009**, *39*, 2403-2411.
- [181] M. D'Addio, J. Frey, V. I. Otto, *Glycobiology* **2020**, *30*, 490-499.
- [182] A. M. Kerrigan, G. D. Brown, *Immunobiology* **2009**, *214*, 562-575.
- [183] C. Saravanan, Z. Cao, S. R. Head, N. Panjwani, *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **2009**, *50*, 5690-5696.
- [184] R. K. J. Malik, R. R. Ghurye, D. J. Lawrence-Watt, H. J. S. Stewart, *Glycobiology* **2009**, *19*, 1402-1407.

8. Literaturverzeichnis

- [185] M. Ruseva, M. Kolev, F. Dagnaes-Hansen, S. B. Hansen, K. Takahashi, A. Ezekowitz, S. Thiel, J. C. Jensenius, M. Gadjeva, *Immunology* **2009**, *127*, 279-288.
- [186] S. H. Barondes, V. Castronovo, D. N. W. Cooper, R. D. Cummings, K. Drickamer, T. Felzi, M. A. Gitt, J. Hirabayashi, C. Hughes, K.-i. Kasai, H. Leffler, F.-T. Liu, R. Lotan, A. M. Mercurio, M. Monsigny, S. Pillai, F. Poirer, A. Raz, P. W. J. Rigby, J. M. Rini, J. L. Wang, *Cell* **1994**, *76*, 597-598.
- [187] J. Hirabayashi, K. I. Kasai, *The family of metazoan metal-independent β -galactoside-binding lectins: Structure, function and molecular evolution*, Vol. 3, **1993**.
- [188] H. Leffler, S. Carlsson, M. Hedlund, Y. Qian, F. Poirier, *Glycoconjugate J.* **2002**, *19*, 433-440.
- [189] C.-L. Mortales, S.-U. Lee, M. Demetriou, *The Journal of Immunology* **2020**, *205*, 630-636.
- [190] G. A. Rabinovich, N. Rubinstein, L. Fainboim, *Journal of Leukocyte Biology* **2002**, *71*, 741-752.
- [191] L. Johannes, C. Wunder, M. Shafaq-Zadah, *J. Mol. Biol.* **2016**, *428*, 4792-4818.
- [192] L. Johannes, R. Jacob, H. Leffler, *J. Cell Sci.* **2018**, *131*.
- [193] S. Rorive, N. Belot, C. Decaestecker, F. Lefranc, L. Gordower, S. Micik, C.-A. Maurage, H. Kaltner, M.-M. Ruchoux, A. Danguy, H.-J. Gabius, I. Salmon, R. Kiss, I. Camby, *Glia* **2001**, *33*, 241-255.
- [194] N. D'Haene, C. Maris, F. Sandras, M. F. Dehou, M. Remmelink, C. Decaestecker, I. Salmon, *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* **2005**, *18*, 431-443.
- [195] T. Szöke, K. Kayser, J. D. Baumhäkel, I. Trojan, J. Furak, L. Tizslavicz, A. Horvath, K. Szluha, H. J. Gabius, S. Andre, *Oncology* **2005**, *69*, 167-174.
- [196] S. Saussez, I. Camby, G. Toubeau, R. Kiss, *Head & Neck* **2007**, *29*, 874-884.
- [197] S. N. Chow, R. J. Chen, C. H. Chen, T. C. Chang, L. C. Chen, W. J. Lee, J. Shen, L. P. Chow, *European journal of gynaecological oncology* **2010**, *31*, 55-62.
- [198] 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. Albin, G. A. Rabinovich, *Journal of Experimental Medicine* **2012**, *209*, 1985-2000.
- [199] T. Dalotto-Moreno, D. O. Croci, J. P. Cerliani, V. C. Martinez-Allo, S. Dergan-Dylon, S. P. Méndez-Huergo, J. C. Stupirski, D. Mazal, E. Osinaga, M. A. Toscano, V. Sundblad, G. A. Rabinovich, M. Salatino, *Cancer Research* **2013**, *73*, 1107-1117.
- [200] D. J. Laderach, L. D. Gentilini, L. Giribaldi, V. C. Delgado, L. Nugnes, D. O. Croci, N. Al Nakouzi, P. Sacca, G. Casas, O. Mazza, M. A. Shipp, E. Vazquez, A. Chauchereau, J. L. Kutok, S. J. Rodig, M. T. Elola, D. Compagno, G. A. Rabinovich, *Cancer Research* **2013**, *73*, 86-96.
- [201] L. Astorgues-Xerri, M. E. Riveiro, A. Tijeras-Raballand, M. Serova, G. A. Rabinovich, I. Bieche, M. Vidaud, A. de Gramont, M. Martinet, E. Cvitkovic, S. Faivre, E. Raymond, *European Journal of Cancer* **2014**, *50*, 2463-2477.
- [202] D. O. Croci, J. P. Cerliani, N. A. Pinto, L. G. Morosi, G. A. Rabinovich, *Glycobiology* **2014**, *24*, 1283-1290.
- [203] N. Rubinstein, M. Alvarez, N. W. Zwirner, M. A. Toscano, J. M. Ilarregui, A. Bravo, J. Mordoh, L. Fainboim, O. L. Podhajcer, G. A. Rabinovich, *Cancer Cell* **2004**, *5*, 241-251.
- [204] L. Astorgues-Xerri, M. E. Riveiro, A. Tijeras-Raballand, M. Serova, C. Neuzillet, S. Albert, E. Raymond, S. Faivre, *Cancer Treatment Reviews* **2014**, *40*, 307-319.
- [205] N. ACH - Models in Chemistry Bertleff-Zieschang, J. Bechold, C. Grimm, M. Reutlinger, P. Schneider, G. Schneider, J. Seibel, *ChemBioChem* **2017**, *18*, 1477-1481.
- [206] M. W. Freyer, E. A. Lewis, in *Methods in Cell Biology*, Vol. 84, Academic Press, **2008**, pp. 79-113.
- [207] S. N. Goud, L. P. S. Soukya, M. Ghouse, D. Komal, R. Alvala, M. Alvala, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **2019**, *19*, 1369-1378.
- [208] S. André, D. Giguère, T. K. Dam, F. Brewer, H.-J. Gabius, R. Roy, *New J. Chem.* **2010**, *34*, 2229-2240.

- [209] D. Giguère, R. Patnam, M.-A. Bellefleur, C. St-Pierre, S. Sato, R. Roy, *Chem. Commun.* **2006**, 2379-2381.
- [210] H. van Hattum, H. M. Branderhorst, E. E. Moret, U. J. Nilsson, H. Leffler, R. J. Pieters, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 1350-1354.
- [211] I. Cumpstey, E. Salomonsson, A. Sundin, H. Leffler, U. J. Nilsson, *Chemistry – A European Journal* **2008**, *14*, 4233-4245.
- [212] R. H. Grubbs, S. Chang, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 4413-4450.
- [213] S. C. Schürer, S. Gessler, N. Buschmann, S. Blechert, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 4062-4065.
- [214] A. K. Sinha, D. Equbal, *Asian Journal of Organic Chemistry* **2019**, *8*, 32-47.
- [215] J. Mut, Master thesis, Julius-Maximilians-Universität **2018**.
- [216] N. Wolf, L. Kersting, C. Herok, C. Mihm, J. Seibel, *The Journal of Organic Chemistry* **2020**, *85*, 9751-9760.
- [217] K. Baghaei, S. M. Hashemi, S. Tokhanbigli, A. Asadi Rad, H. Assadzadeh-Aghdaei, A. Sharifian, M. R. Zali, *Gastroenterology and hepatology from bed to bench* **2017**, *10*, 208-213.
- [218] J. L. Ramírez-Zacarías, F. Castro-Muñozledo, W. Kuri-Harcuch, *Histochemistry* **1992**, *97*, 493-497.
- [219] S. S. Han, H. E. Shim, S. J. Park, B. C. Kim, D. E. Lee, H. M. Chung, S. H. Moon, S. W. Kang, *Sci Rep* **2018**, *8*, 13212.
- [220] S. J. Luchansky, K. J. Yarema, S. Takahashi, C. R. Bertozzi, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 8035-8042.
- [221] J. M. I. Daenzer, R. D. Sanders, D. Hang, J. L. Fridovich-Keil, *PLOS Genetics* **2012**, *8*, e1002721.
- [222] P. Stallforth, S. Matthies, A. Adibekian, D. G. Gillingham, D. Hilvert, P. H. Seeberger, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 11987-11989.
- [223] Z. Hong, L. Liu, C.-C. Hsu, C.-H. Wong, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7417-7421.
- [224] K. Bork, W. Reutter, R. Gerardy-Schahn, R. Horstkorte, *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 5079-5083.
- [225] J. Kaur, P. K. Singh, *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2022**, *52*, 949-967.
- [226] C. M. Woo, C. R. Bertozzi, *Current Protocols in Chemical Biology* **2016**, *8*, 59-82.
- [227] C. M. Woo, A. Felix, W. E. Byrd, D. K. Zuegel, M. Ishihara, P. Azadi, A. T. Iavarone, S. J. Pitteri, C. R. Bertozzi, *Journal of Proteome Research* **2017**, *16*, 1706-1718.
- [228] C. M. Woo, P. J. Lund, A. C. Huang, M. M. Davis, C. R. Bertozzi, S. J. Pitteri, *Molecular & Cellular Proteomics* **2018**, *17*, 764.
- [229] R. P. Haugland, W. W. You, in *Avidin-Biotin Interactions: Methods and Applications* (Ed.: R. J. McMahon), Humana Press, Totowa, NJ, **2008**, pp. 13-23.
- [230] S. O. Reinke, G. Lehmer, S. Hinderlich, W. Reutter, **2009**, *390*, 591-599.
- [231] T. U. Consortium, *Nucleic Acids Res.* **2020**, *49*, D480-D489.
- [232] N. Fülöp, R. B. Marchase, J. C. Chatham, *Cardiovascular Research* **2007**, *73*, 288-297.
- [233] Y.-C. Wang, J. W. Stein, C. L. Lynch, H. T. Tran, C.-Y. Lee, R. Coleman, A. Hatch, V. G. Antontsev, H. S. Chy, C. M. O'Brien, S. K. Murthy, A. L. Laslett, S. E. Peterson, J. F. Loring, *Scientific Reports* **2015**, *5*, 13317.
- [234] H. W. Park, J.-S. Shin, C.-W. Kim, *PROTEOMICS* **2007**, *7*, 2881-2894.
- [235] M. A. Garcia, W. J. Nelson, N. Chavez, *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2018**, *10*.
- [236] K. A. Knudsen, M. J. Wheelock, *J. Cell Biol.* **1992**, *118*, 671-679.
- [237] L. W. Jaques, E. B. Brown, J. M. Barrett, W. Brey Ws Jr Weltner, *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 4533-4538.
- [238] I. Kouvonen, R. Gräsbeck, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1984**, *797*, 163-170.
- [239] M. Prakriya, *The Journal of Physiology* **2020**, *598*, 1647-1648.
- [240] I. Camby, M. Le Mercier, F. Lefranc, R. Kiss, *Glycobiology* **2006**, *16*, 137R-157R.
- [241] *Stem Cells and Development* **2005**, *14*, 204-212.
- [242] G. A. Rabinovich, *British Journal of Cancer* **2005**, *92*, 1188-1192.

8. Literaturverzeichnis

- [243] F. R. Zetterberg, K. Peterson, R. E. Johnsson, T. Brimert, M. Håkansson, D. T. Logan, H. Leffler, U. J. Nilsson, *ChemMedChem* **2018**, *13*, 133-137.
- [244] G. Cavallo, P. Metrangolo, R. Milani, T. Pilati, A. Priimagi, G. Resnati, G. Terraneo, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 2478-2601.
- [245] V. K. Chaikovskii, V. D. Filimonov, V. I. Skorokhodov, V. D. Ogorodnikov, *Russ. J. Org. Chem.* **2007**, *43*, 1278-1281.
- [246] L. Wang, O. Jacobson, D. Avdic, B. H. Rotstein, I. D. Weiss, L. Collier, X. Chen, N. Vasdev, S. H. Liang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 12777-12781.
- [247] R. Chinchilla, C. Nájera, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 874-922.
- [248] K. Sonogashira, Y. Tohda, N. Hagihara, *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 4467-4470.
- [249] M. M. Meloni, P. D. White, D. Armour, R. C. D. Brown, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 299-311.
- [250] R. Appel, *Angewandte Chemie International Edition in English* **1975**, *14*, 801-811.
- [251] G. V. Sagar Reddy, G. V. Rao, R. V. K. Subramanyam, D. S. Iyengar, *Synth. Commun.* **2000**, *30*, 2233-2237.
- [252] B. Wiene-Schmidt, M. Oebbeke, K. Ngo, A. Heine, G. Klebe, *ChemMedChem* **2021**, *16*, 292-300.
- [253] M. M. Matin, P. Matin, M. R. Rahman, T. Ben Hadda, F. A. Almalki, S. Mahmud, M. M. Ghoneim, M. Alruwaily, S. Alshehri, *Frontiers in molecular biosciences* **2022**, *9*, 864286-864286.
- [254] D. V. Filippov, H. van den Elst, C. M. Tromp, G. A. van der Marel, C. A. A. van Boeckel, H. S. Overkleeft, J. H. van Boom, *Synlett* **2004**, *2004*, 0773-0778.
- [255] R. H. Grubbs, T. M. Trnka, in *Ruthenium in Organic Synthesis*, **2004**, pp. 153-177.
- [256] U. H. F. Bunz, D. Mäker, M. Porz, *Macromol. Rapid Commun.* **2012**, *33*, 886-910.
- [257] A. Fürstner, P. W. Davies, *Chem. Commun.* **2005**, 2307-2320.
- [258] B. R. Galan, A. J. Giessert, J. B. Keister, S. T. Diver, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5762-5763.
- [259] E. Kozma, O. Demeter, P. Kele, *ChemBioChem* **2017**, *18*, 486-501.
- [260] A. J. C. Sarris, T. Hansen, M. A. R. de Geus, E. Maurits, W. Doelman, H. S. Overkleeft, J. D. C. Codée, D. V. Filippov, S. I. van Kasteren, *Chemistry – A European Journal* **2018**, *24*, 18075-18081.
- [261] L. I. Willems, N. Li, B. I. Florea, M. Ruben, G. A. van der Marel, H. S. Overkleeft, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4431-4434.
- [262] A. Graef, Bachelor thesis, Julius-Maximilians-Universität **2021**.
- [263] M. M. Lee, B. R. Peterson, *ACS Omega* **2016**, *1*, 1266-1276.
- [264] M. A. Gonzalez, J. L. Jimenez Requejo, J. C. Palacios Albarran, J. A. Gabis Perez, *Carbohydr. Res.* **1986**, *158*, 53-66.
- [265] M. B. Gawande, S. N. Shelke, R. Zboril, R. S. Varma, *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 1338-1348.
- [266] J. Seibel, L. Hillringhaus, R. Moraru, *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 507-511.
- [267] A. K. Datta, *Current Drug Targets* **2009**, *10*, 483-498.
- [268] I. Damager, S. Buchini, M. F. Amaya, A. Buschiazzi, P. Alzari, A. C. Frasch, A. Watts, S. G. Withers, *Biochemistry* **2008**, *47*, 3507-3512.
- [269] R. G. Spiro, *J. Biol. Chem.* **1960**, *235*, 2860-2869.
- [270] L. Braunschweiler, R. R. Ernst, *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **1983**, *53*, 521-528.
- [271] E. A. Capanema, M. Y. Balakshin, C.-L. Chen, J. S. Gratzl, H. Gracz, **2001**, *55*, 302-308.
- [272] L. Fischer, M. Nosratlo, K. Hast, E. Karakaya, N. Ströhlein, T. U. Esser, R. Gerum, S. Richter, F. Engel, R. Detsch, B. Fabry, I. Thievessen, *Biofabrication* **2022**, *14*, 045005.
- [273] D. V. Zhelev, D. Needham, R. M. Hochmuth, *Biophys. J.* **1994**, *67*, 696-705.
- [274] R. Gerum, E. Mirzahosseini, M. Eroles, J. Elsterer, A. Mainka, A. Bauer, S. Sonntag, A. Winterl, J. Bartl, L. Fischer, S. Abuhattum, R. Goswami, S. Girardo, J. Guck, S. Schrüfer, N. Ströhlein, M. Nosratlo, H. Herrmann, D. Schultheis, F. Rico, S. J. Müller, S. Gekle, B. Fabry, *eLife* **2022**, *11*, e78823.

- [275] A. Cordes, H. Witt, A. Gallemí-Pérez, B. Brückner, F. Grimm, M. Vache, T. Oswald, J. Bodenschatz, D. Flormann, F. Lautenschläger, M. Tarantola, A. Janshoff, *Phys. Rev. Lett.* **2020**, *125*, 068101.
- [276] N. Bonakdar, R. Gerum, M. Kuhn, M. Spörrer, A. Lippert, W. Schneider, K. E. Aifantis, B. Fabry, *Nature Materials* **2016**, *15*, 1090-1094.
- [277] B. Fregin, F. Czerwinski, D. Biedenweg, S. Girardo, S. Gross, K. Aurich, O. Otto, *Nature Communications* **2019**, *10*, 415.
- [278] S. Shimizu, T. Takiguchi, M. Fukutoku, R. Yoshioka, Y. Hirose, S. Fukuhara, H. Ohno, Y. Isobe, S. Konda, *Leukemia* **1993**, *7*, 274-280.
- [279] P. Storti, G. Donofrio, V. Marchica, D. Guasco, K. Todoerti, I. Airoidi, J. Anderson, M. Bolzoni, V. Ferri, E. Martella, C. Mancini, N. Campanini, A. Neri, G. D. Roodman, F. Aversa, N. Giuliani, *Blood* **2014**, *124*, 3373-3373.
- [280] B. Yi, Q. Xu, W. Liu, *Bioactive Materials* **2022**, *15*, 82-102.
- [281] T. Kadri, D. Lutomski, *Stem Cells and Development* **2005**, *14*, 204-212.
- [282] P. D. Adams, P. V. Afonine, G. Bunkoczi, V. B. Chen, I. W. Davis, N. Echols, J. J. Headd, L.-W. Hung, G. J. Kapral, R. W. Grosse-Kunstleve, A. J. McCoy, N. W. Moriarty, R. Oeffner, R. J. Read, D. C. Richardson, J. S. Richardson, T. C. Terwilliger, P. H. Zwart, *Acta Crystallographica Section D* **2010**, *66*, 213-221.
- [283] A. W. Schüttelkopf, D. M. van Aalten, *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **2004**, *60*, 1355-1363.

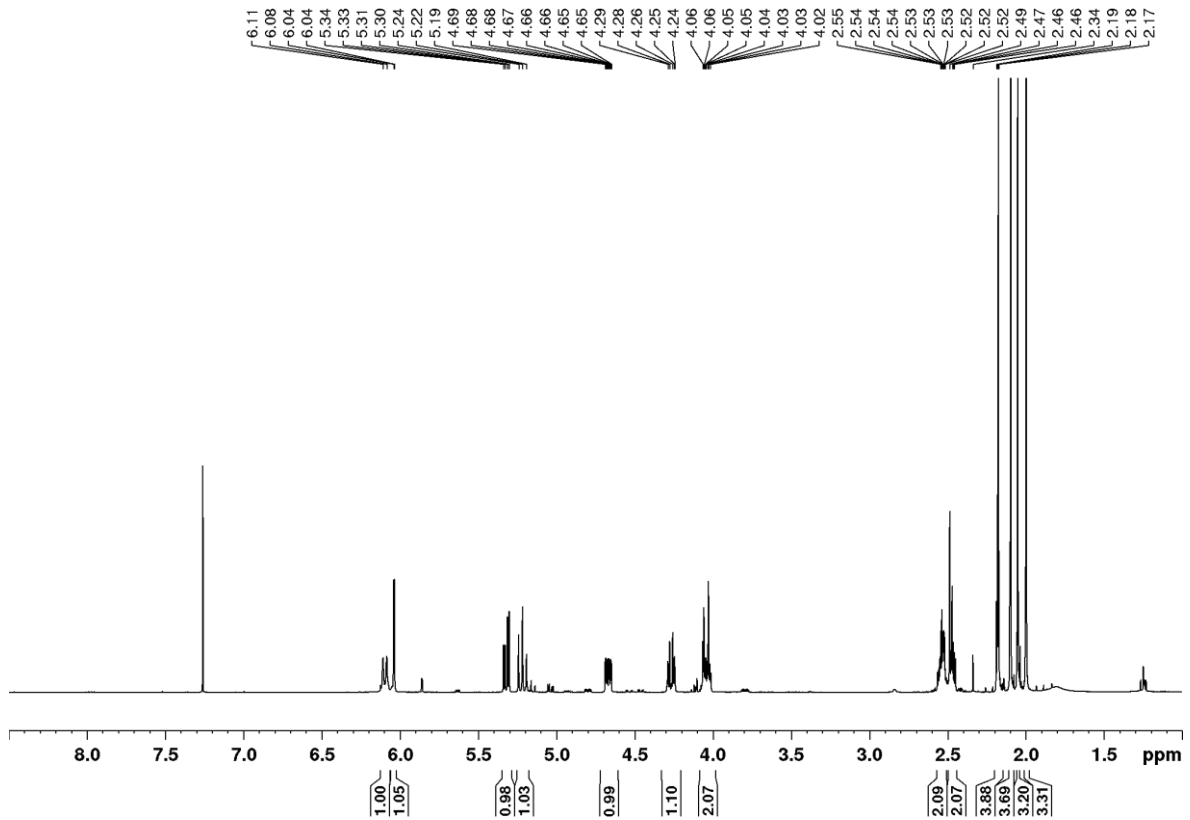
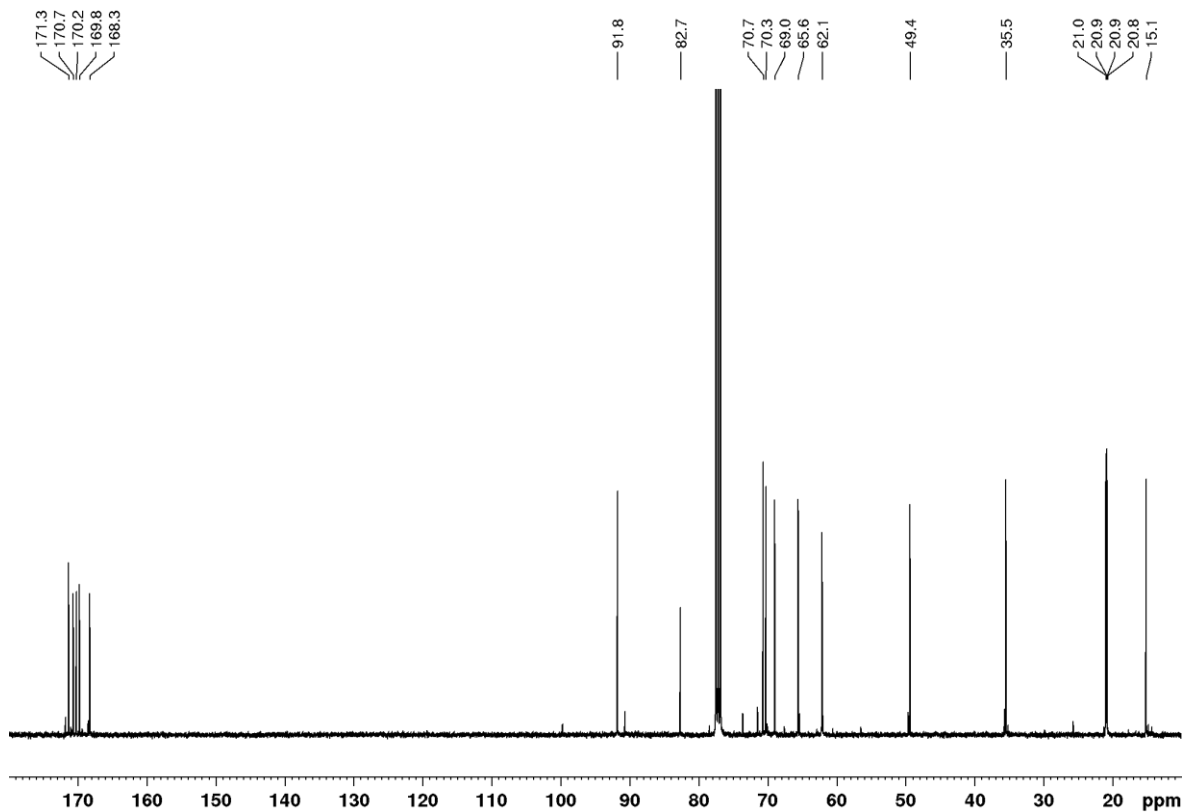
9 Anhang

Abkürzungsverzeichnis

Ac	Acetyl	ges.	gesättigt
Äq.	Äquivalent	Glc	Glucose
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl	GlcNAc	Glucosamin
Bu	Butyl	h	Stunde
bzw.	beziehungsweise	HATU	[O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)- N,N,N',N'-tetramethyluronium- hexafluorphosphat
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>	HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
CuAAC	Cu(I)-katalysierte Azid-Alkin- Cycloaddition	hMSC	humane mesenchymale Stammzellen
Cy	Cyclohexan	hMSC-TERT	Telomerase-immortalisierten humane mesenchymale Stammzellen
d	Tag	HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
d	Dublett	Hz	Hertz
DBU	Diazabicycloundecen	iEDDA	<i>inverse electron demand Diels-Alder reaction</i>
DC	Dünnschichtchromatographie	LC	Flüssigchromatographie
DCM	Dichlormethan	m	Multipllett
DIPEA	Diisopropylethylamin	M	mol/L
DMF	Dimethylformamid	Man	Mannose
DMSO	Dimethylsulfoxid	ManNAc	Mannosamin
EE	Essigsäureethylester	Me	Methyl
ER	endoplasmatisches Retikulum	MeCN	Acetonitril
ESI	Elektronenspray-Ionisation	MeOD	Methanol-d ₄
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und weitere)		
Et	Ethyl		
GAG	Glycosaminoglycan		
Gal	Galactose		
GalNAc	Galactosamin		

min	Minute
mL	Milliliter
MS	Massenspektrometrie
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NIS	<i>N</i> -Iodsuccinimid
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Pufferlösung)
Ph	Phenyl
ppm	<i>parts per million</i>
quant.	quantitativ
quint	Quintett
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
Sia	Sialinsäure
SPAAC	<i>strain promoted alkyne-azide</i> <i>cycloaddition</i>
t	Triplett
Tf	Trifluormethansulfonyl
TFA	Trifluoressigsäure
TFAA	Trifluoressigsäureanhydrid
THF	Tetrahydrofuran
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>
z.B.	zum Beispiel

Spektren

Abbildung 50: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl_3) von Verbindung **12a**.Abbildung 51: ^{13}C -NMR-Spektrum (100 MHz, CDCl_3) von Verbindung **12a**

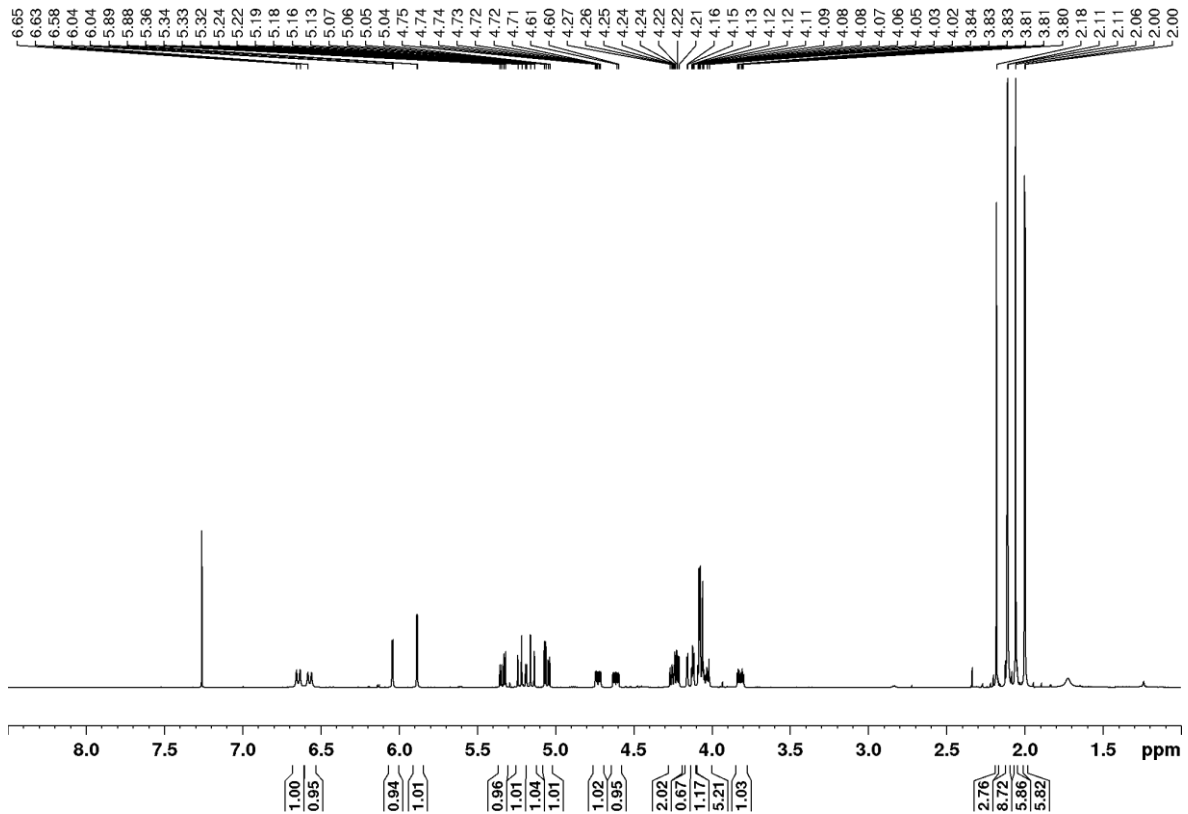


Abbildung 52: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl_3) von Verbindung **12b**.

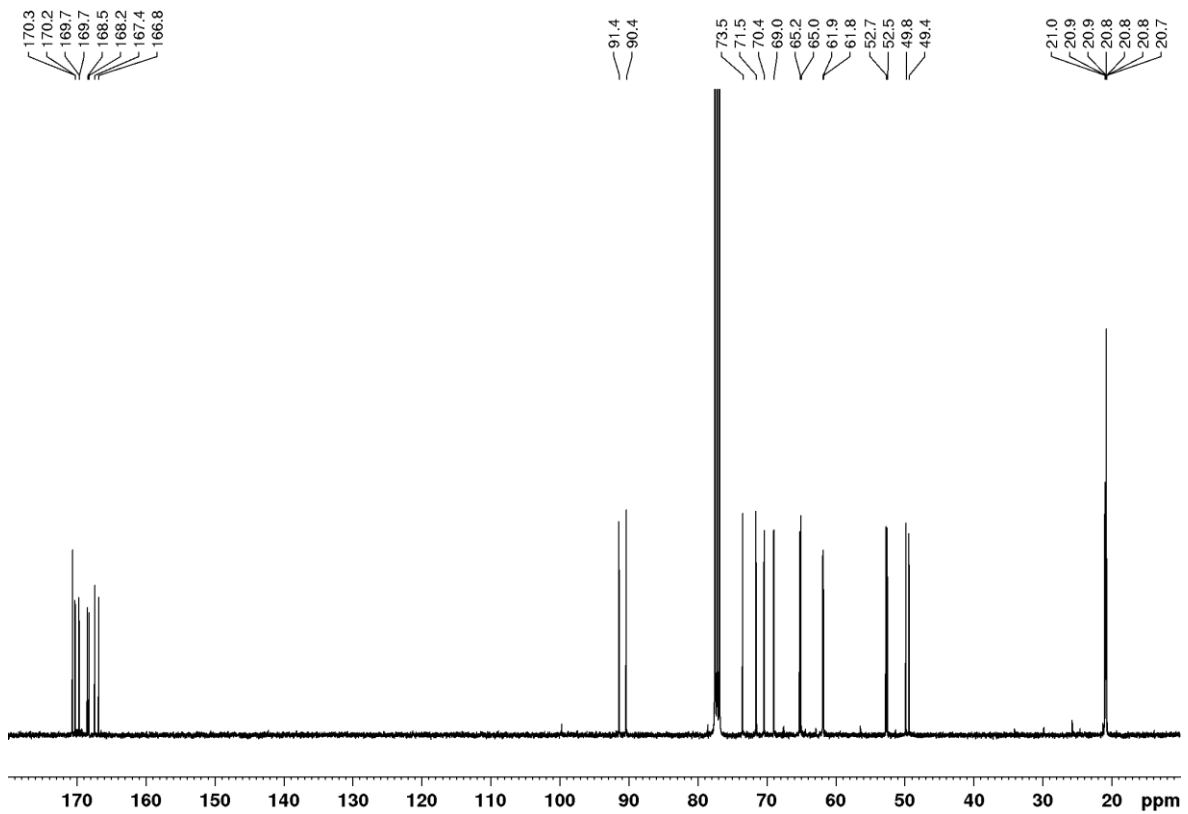


Abbildung 53: ^{13}C -NMR-Spektrum (100 MHz, CDCl_3) von Verbindung **12b**.

9. Anhang

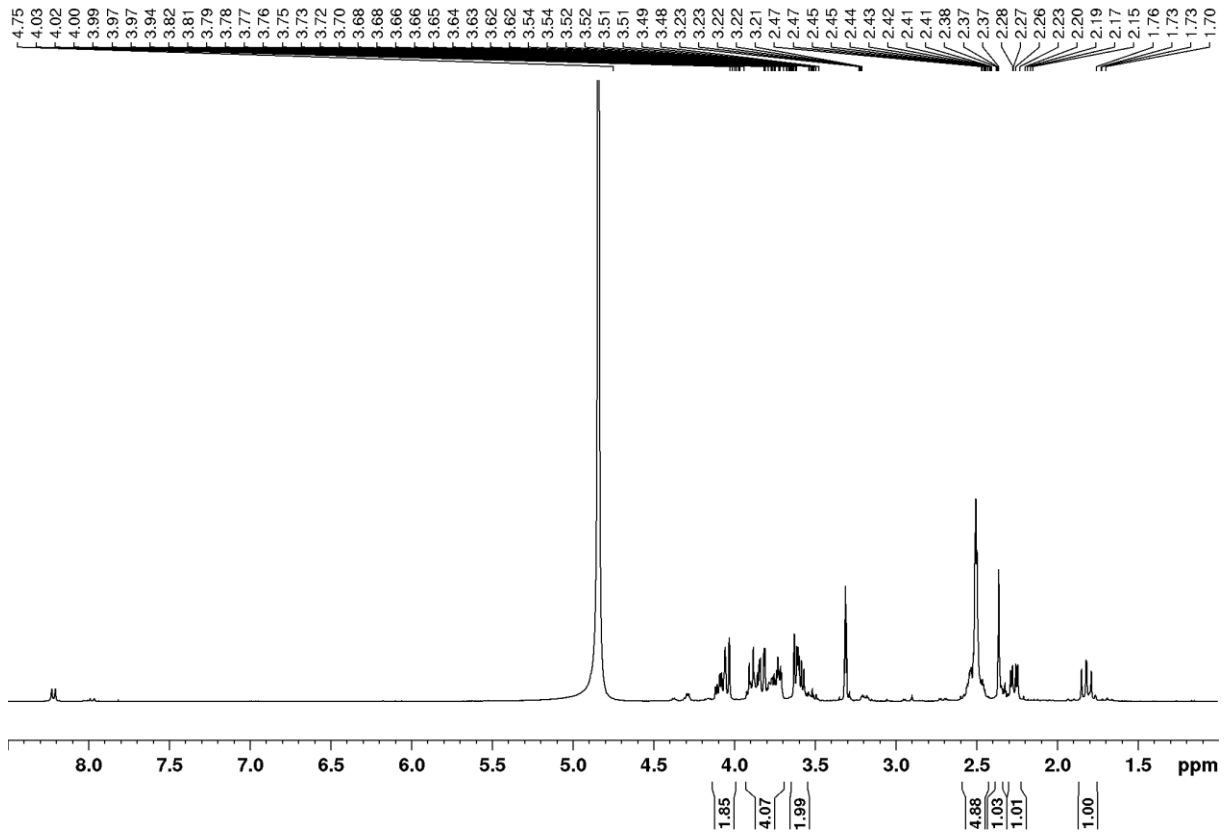


Abbildung 54: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, MeOD) von Verbindung **8a**.

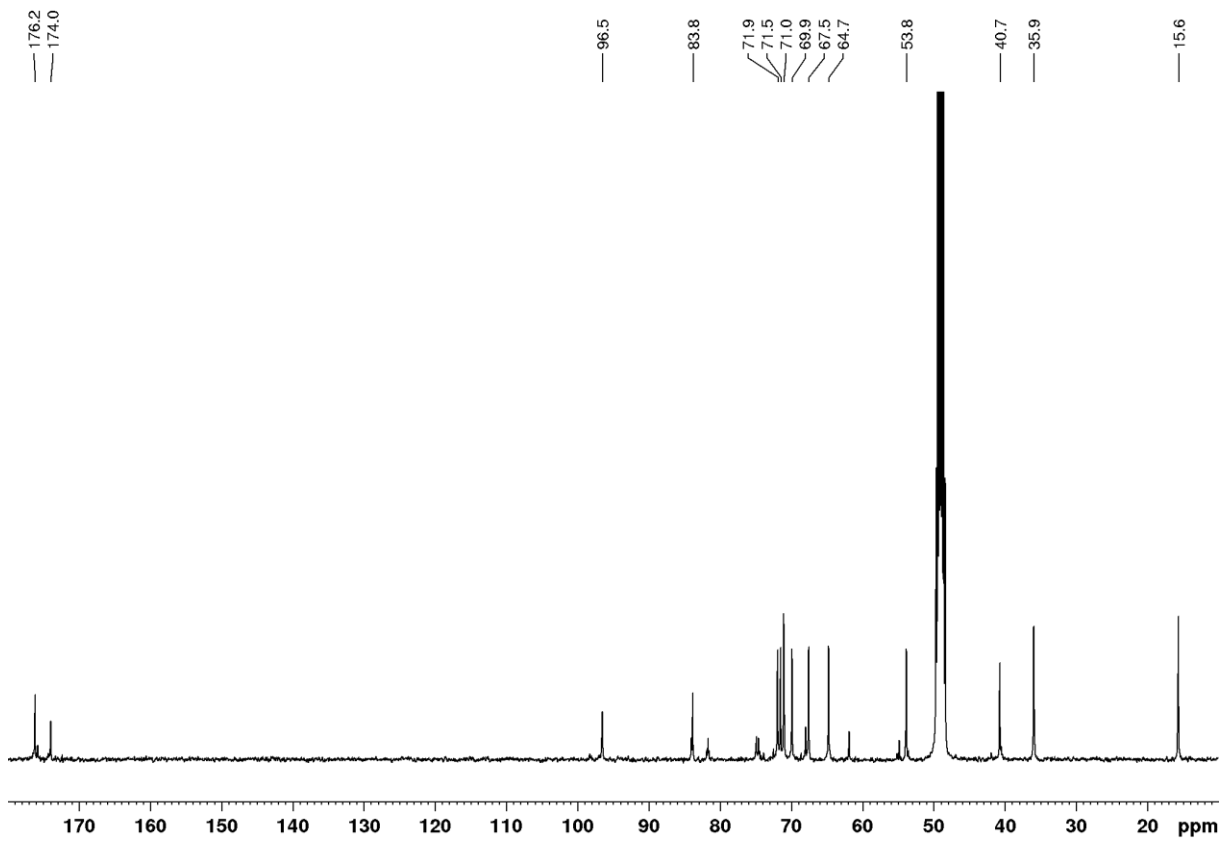


Abbildung 55: ^{13}C -NMR-Spektrum (100 MHz, MeOD) von Verbindung **8a**.

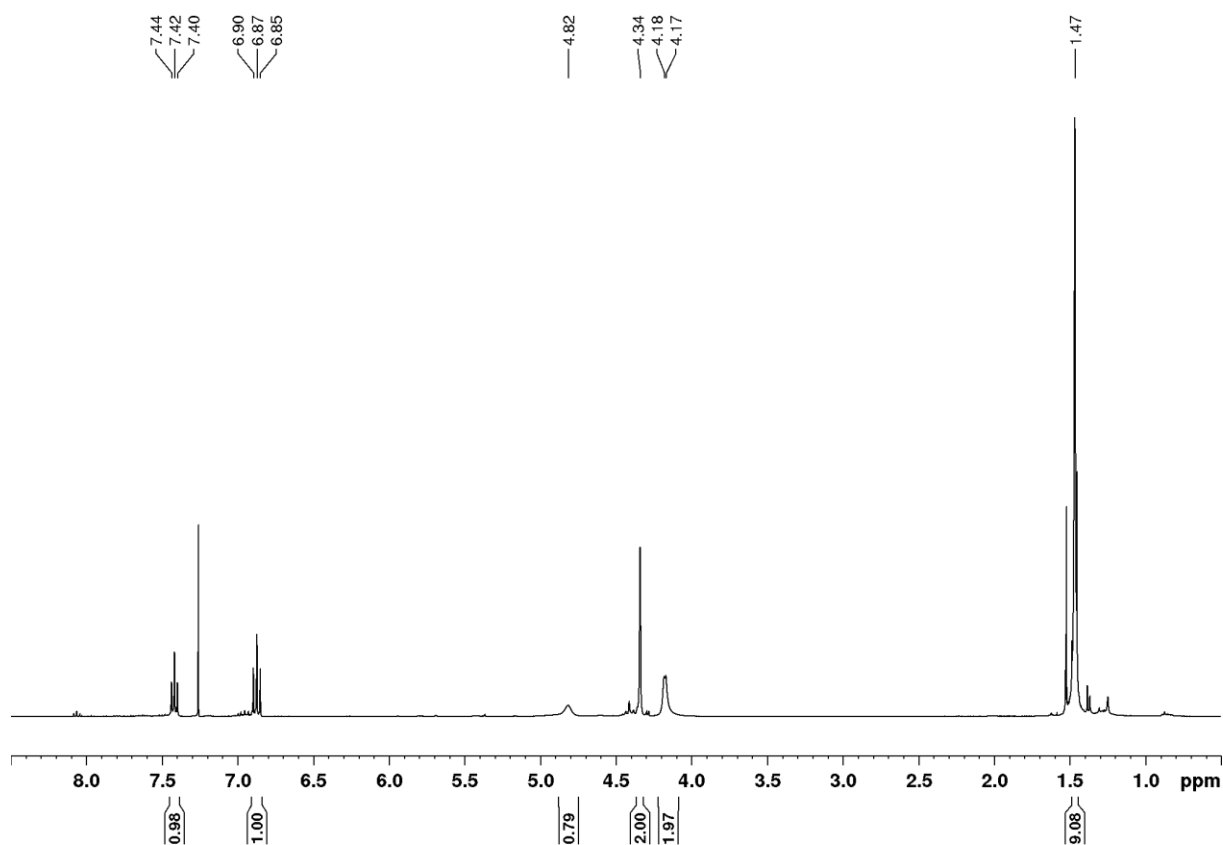


Abbildung 56: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl_3) von Verbindung **37a**.

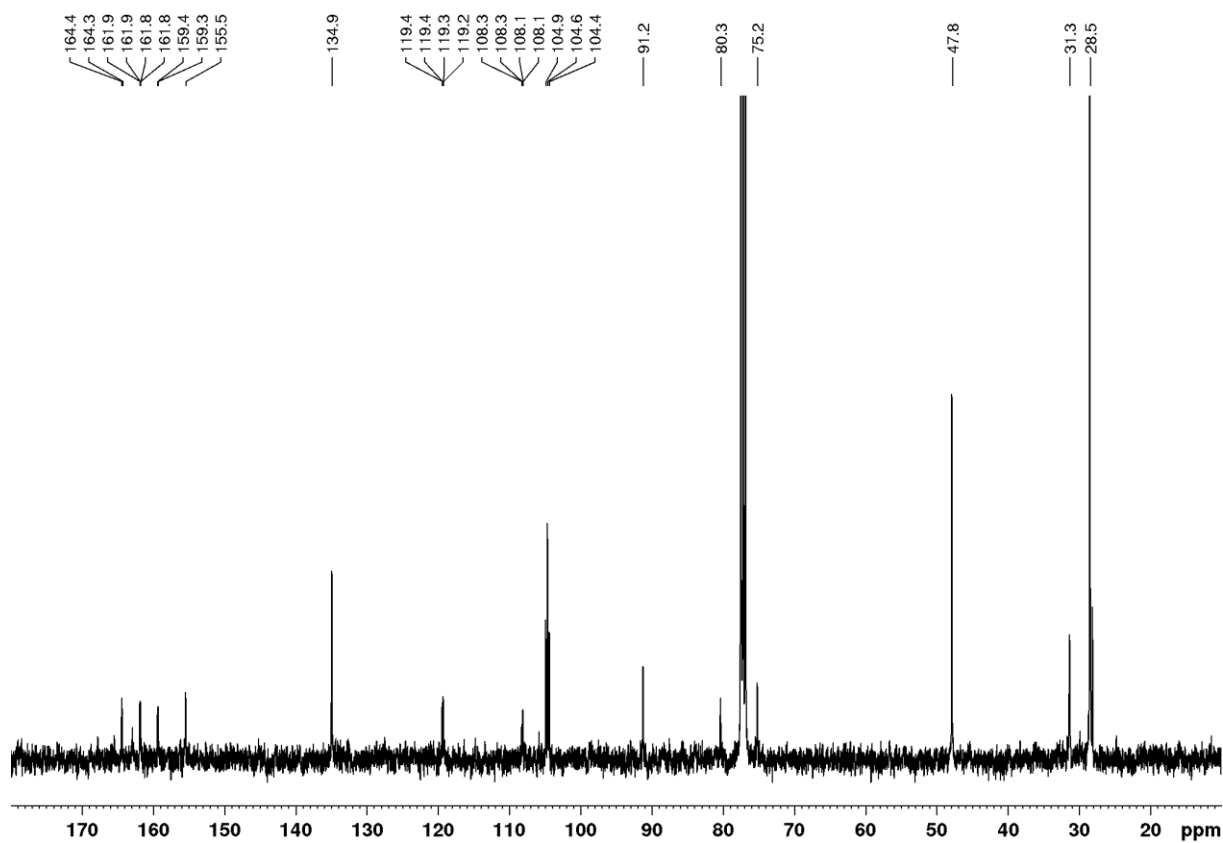


Abbildung 57: ^{13}C -NMR-Spektrum (100 MHz, CDCl_3) von Verbindung **37a**.

9. Anhang

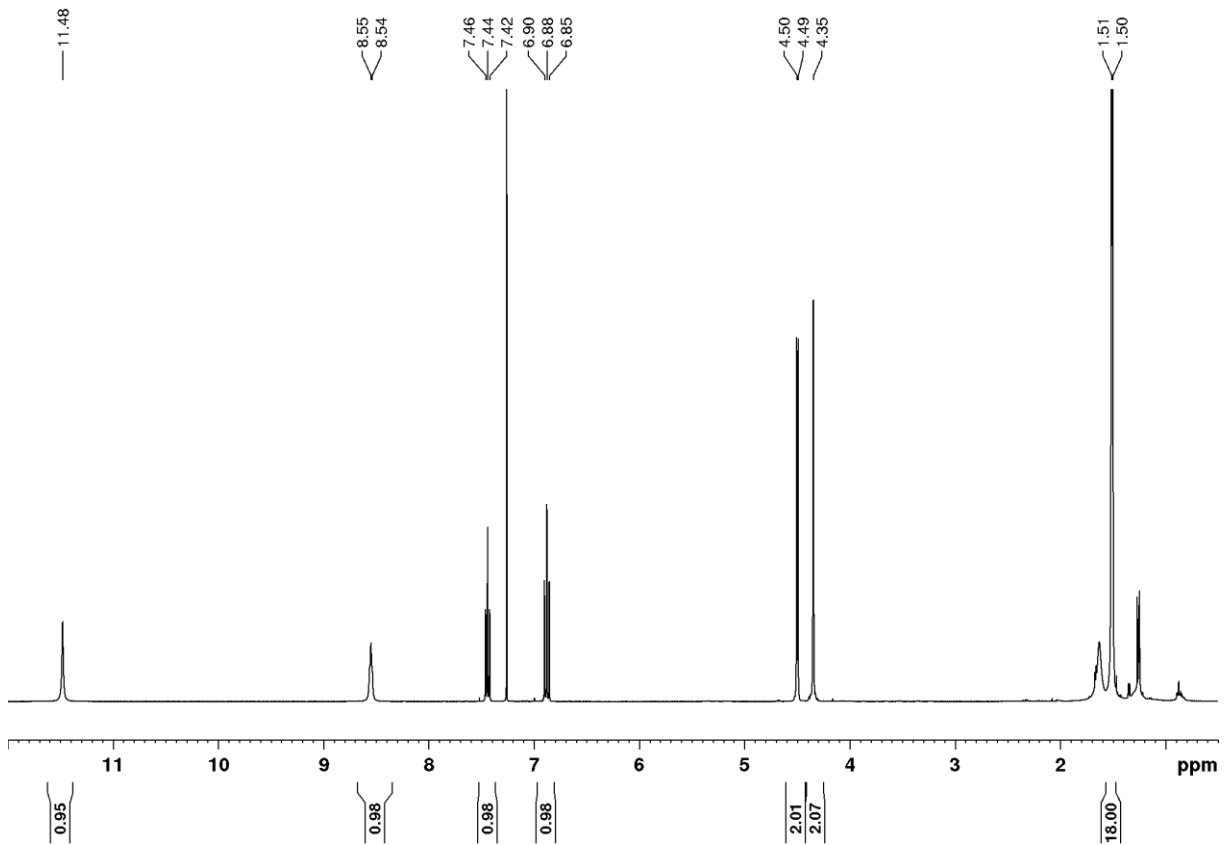


Abbildung 58: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl_3) von Verbindung **37b**.

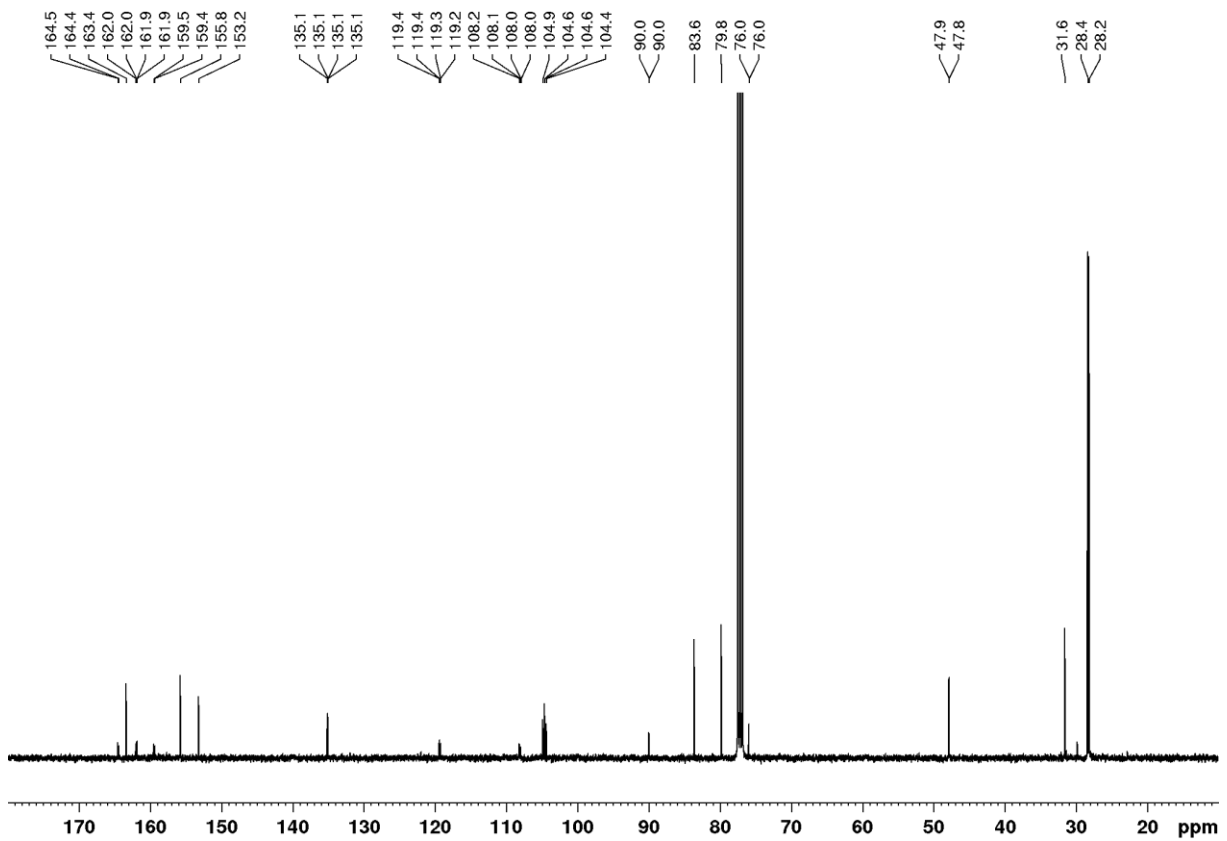


Abbildung 59: ^{13}C -NMR-Spektrum (100 MHz, CDCl_3) von Verbindung **37b**.

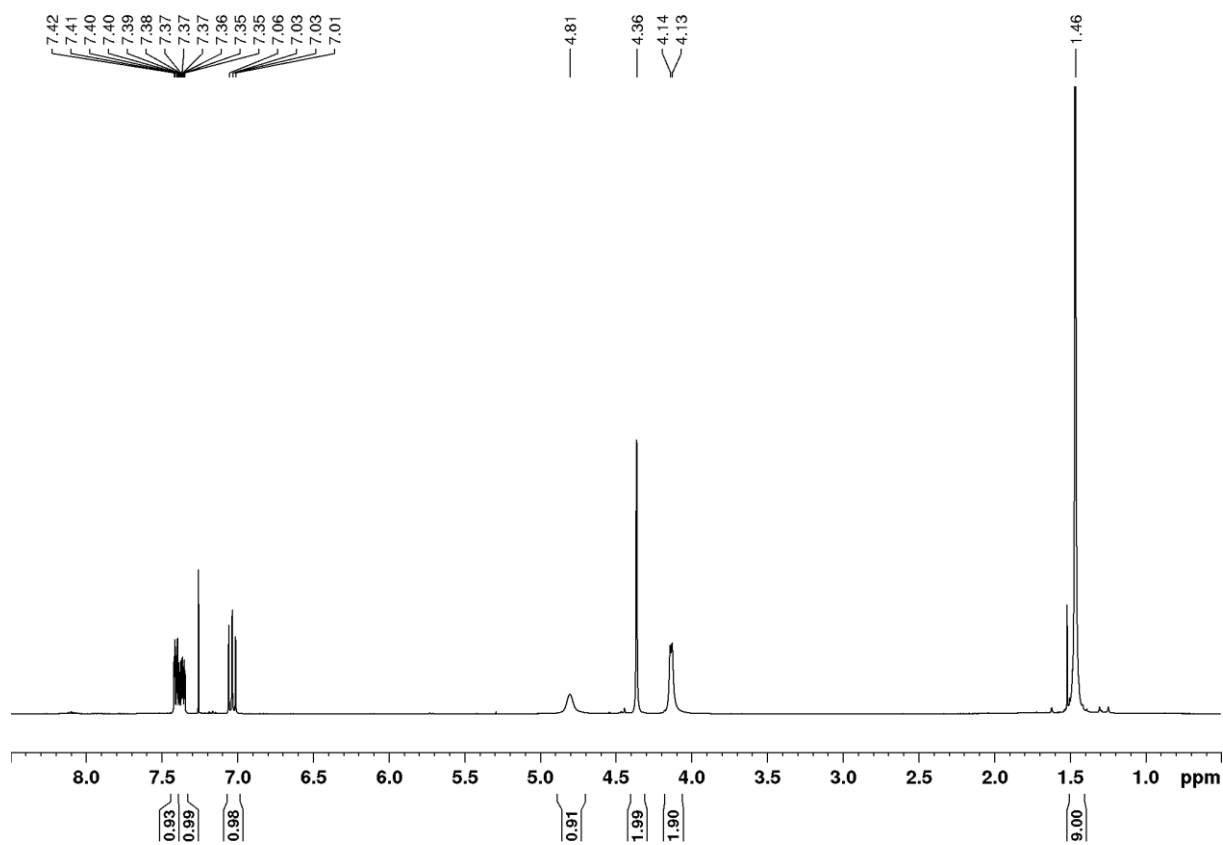


Abbildung 60: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl_3) von Verbindung **37c**.

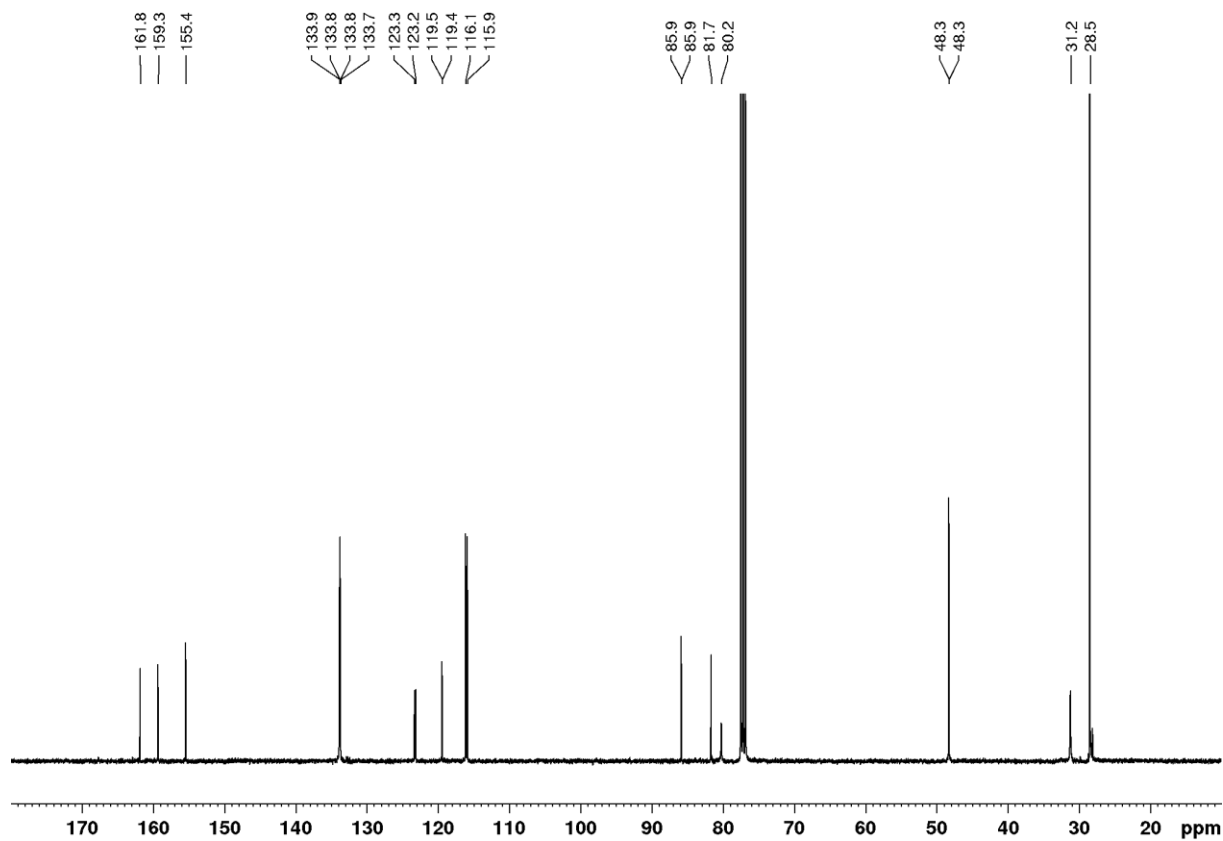


Abbildung 61: ^{13}C -NMR-Spektrum (100 MHz, CDCl_3) von Verbindung **37c**.

9. Anhang

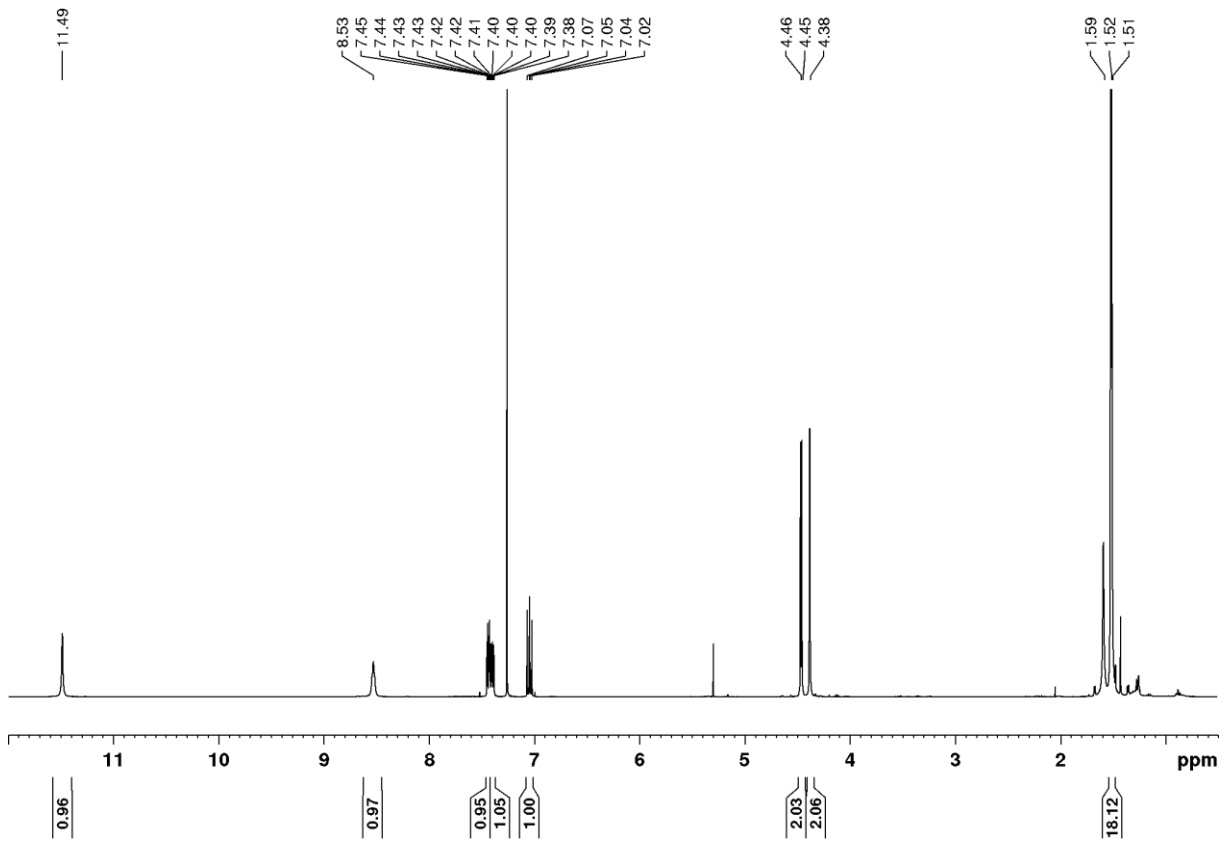


Abbildung 62: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl_3) von Verbindung 37d.

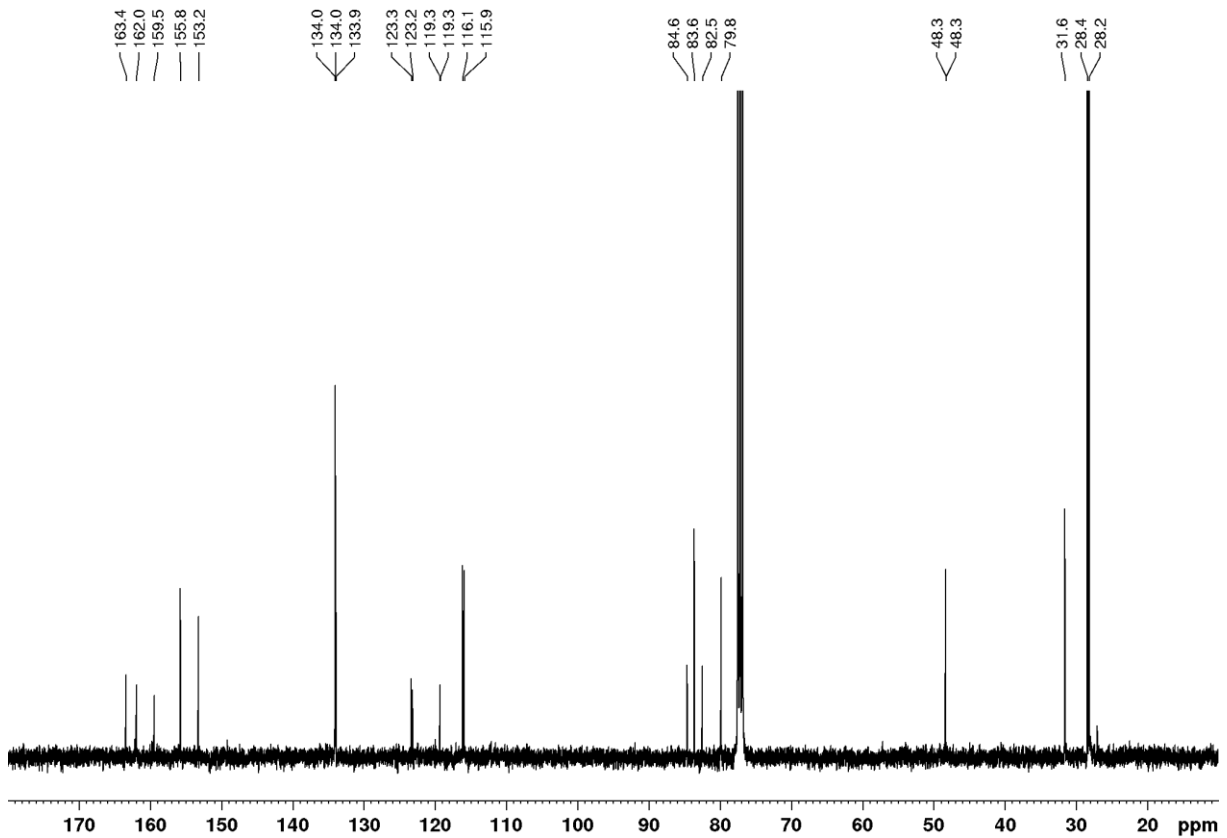


Abbildung 63: ^{13}C -NMR-Spektrum (100 MHz, CDCl_3) von Verbindung 37d.

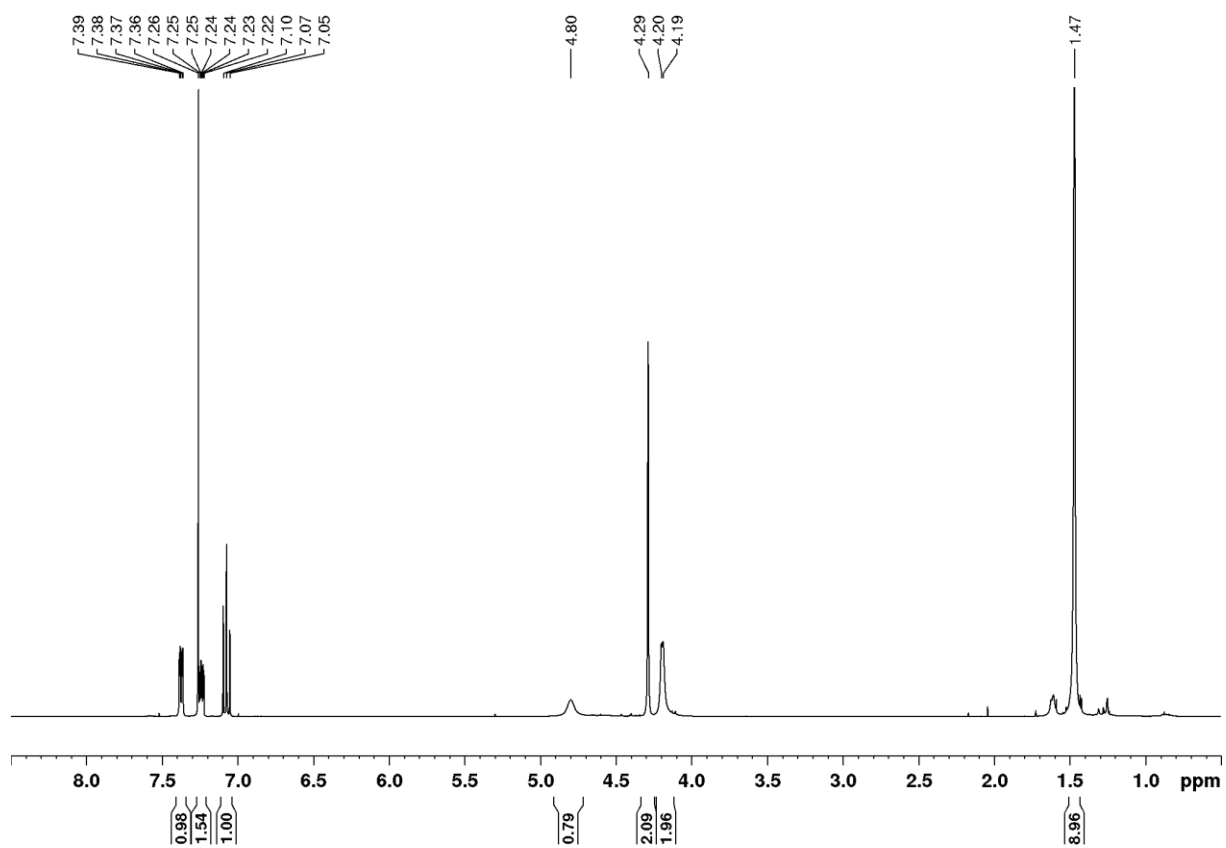


Abbildung 64: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl_3) von Verbindung **37e**.

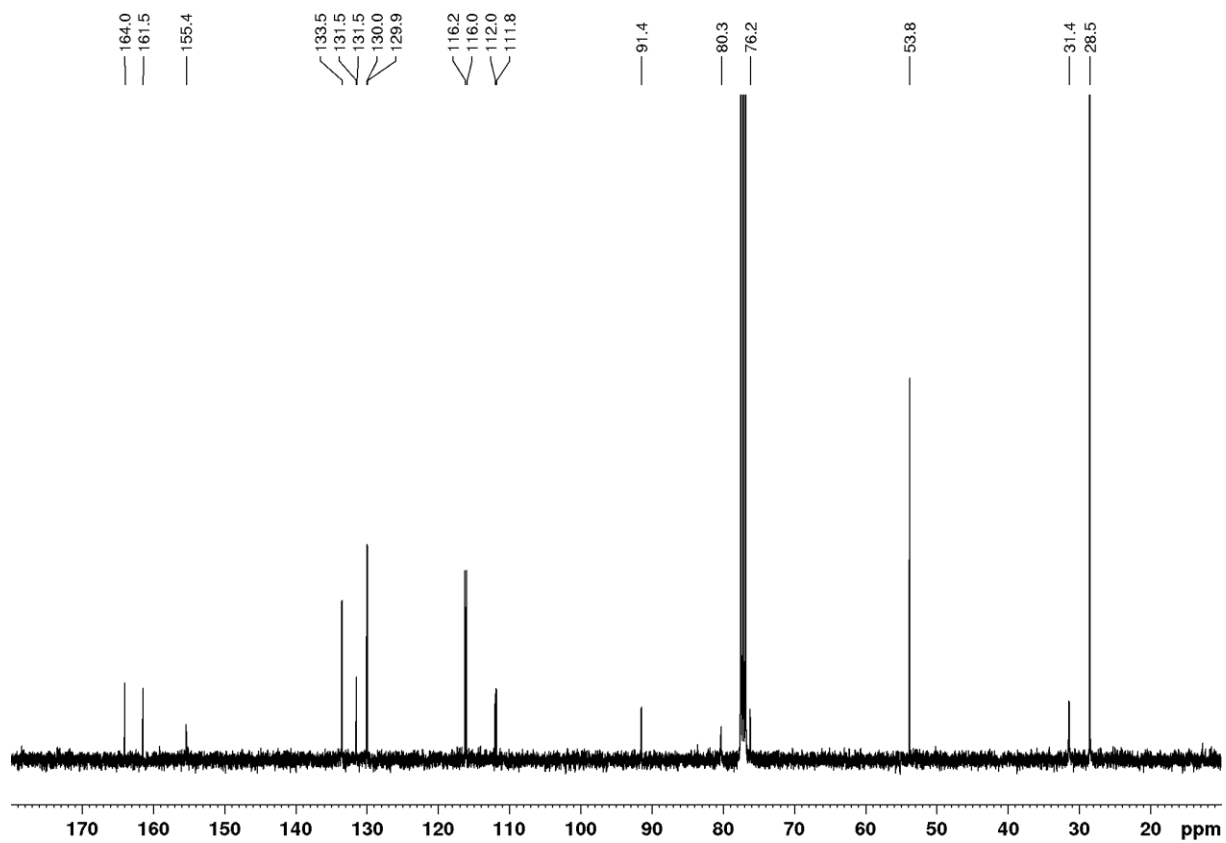


Abbildung 65: ^{13}C -NMR-Spektrum (100 MHz, CDCl_3) von Verbindung **37e**.

9. Anhang

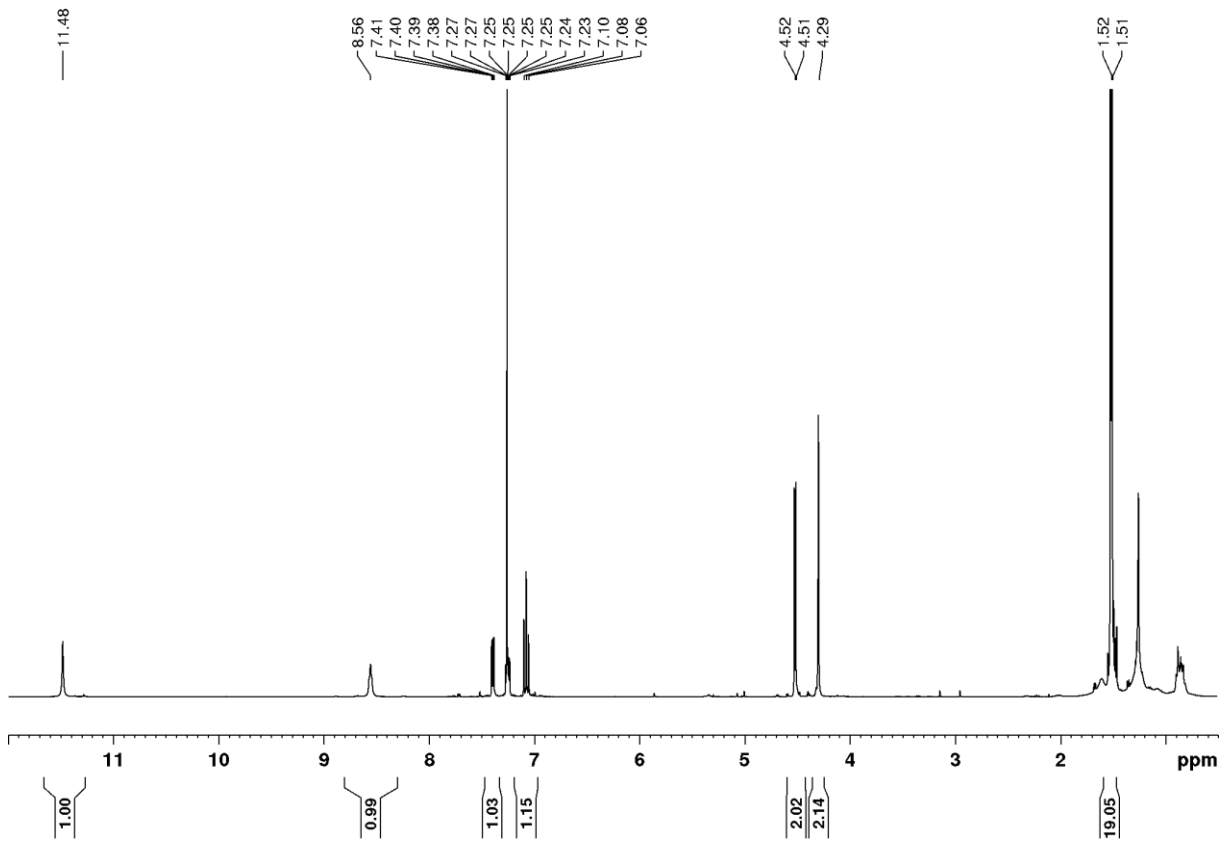


Abbildung 66: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl_3) von Verbindung 37f.

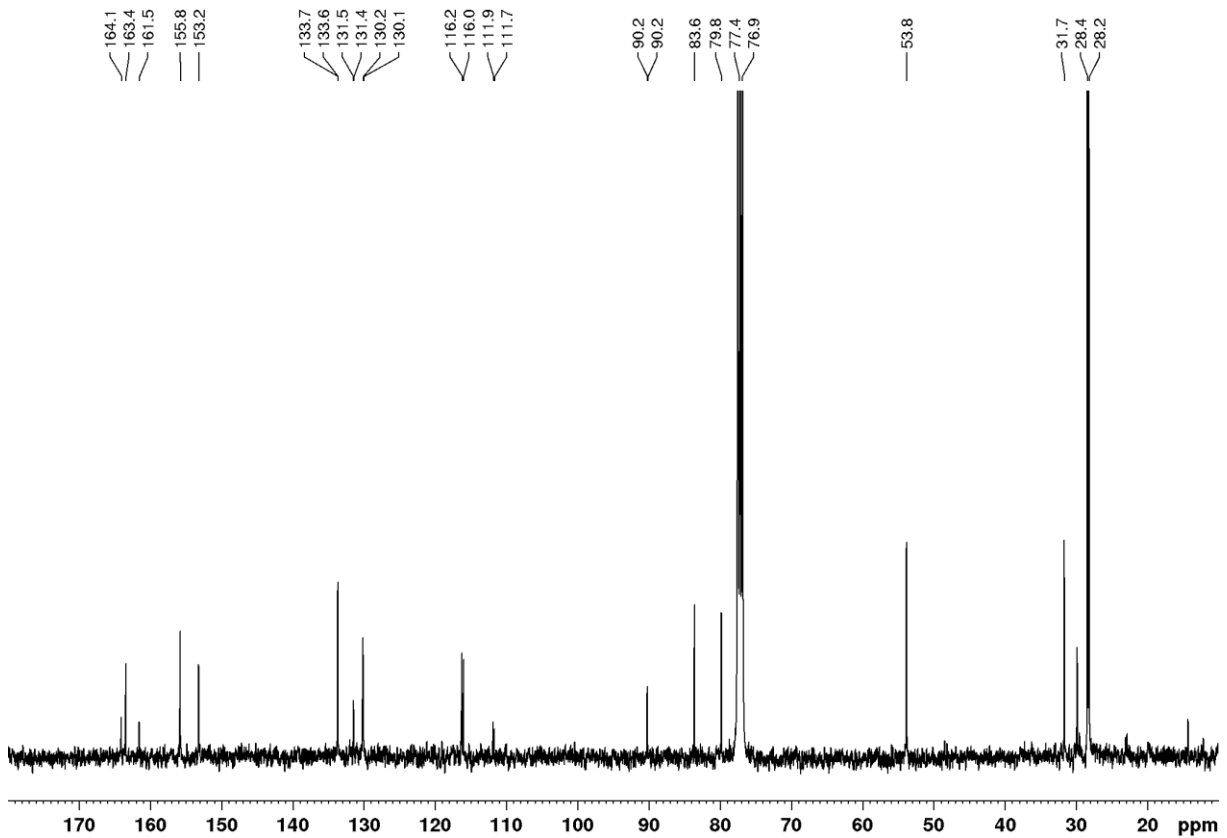


Abbildung 67: ^{13}C -NMR-Spektrum (100 MHz, CDCl_3) von Verbindung 37f.

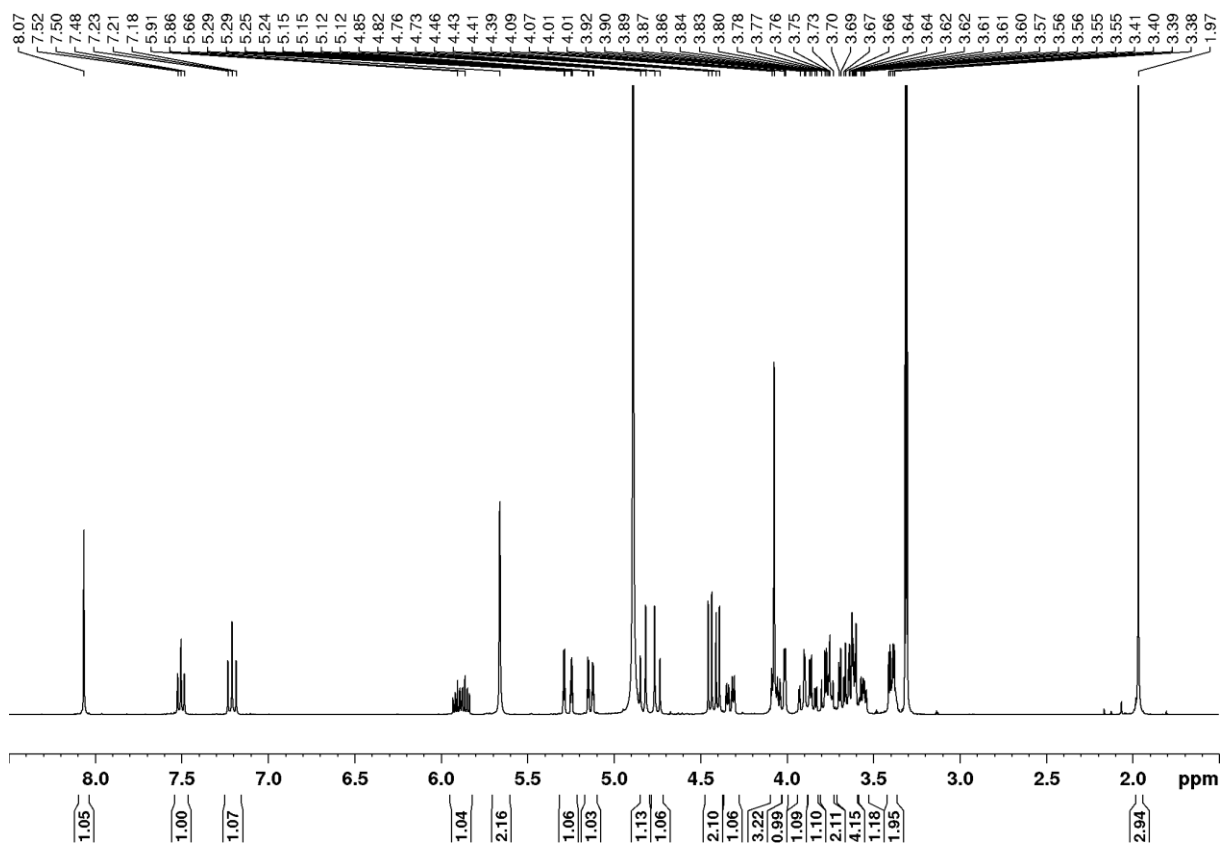


Abbildung 68: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, MeOD) von Verbindung 39a.

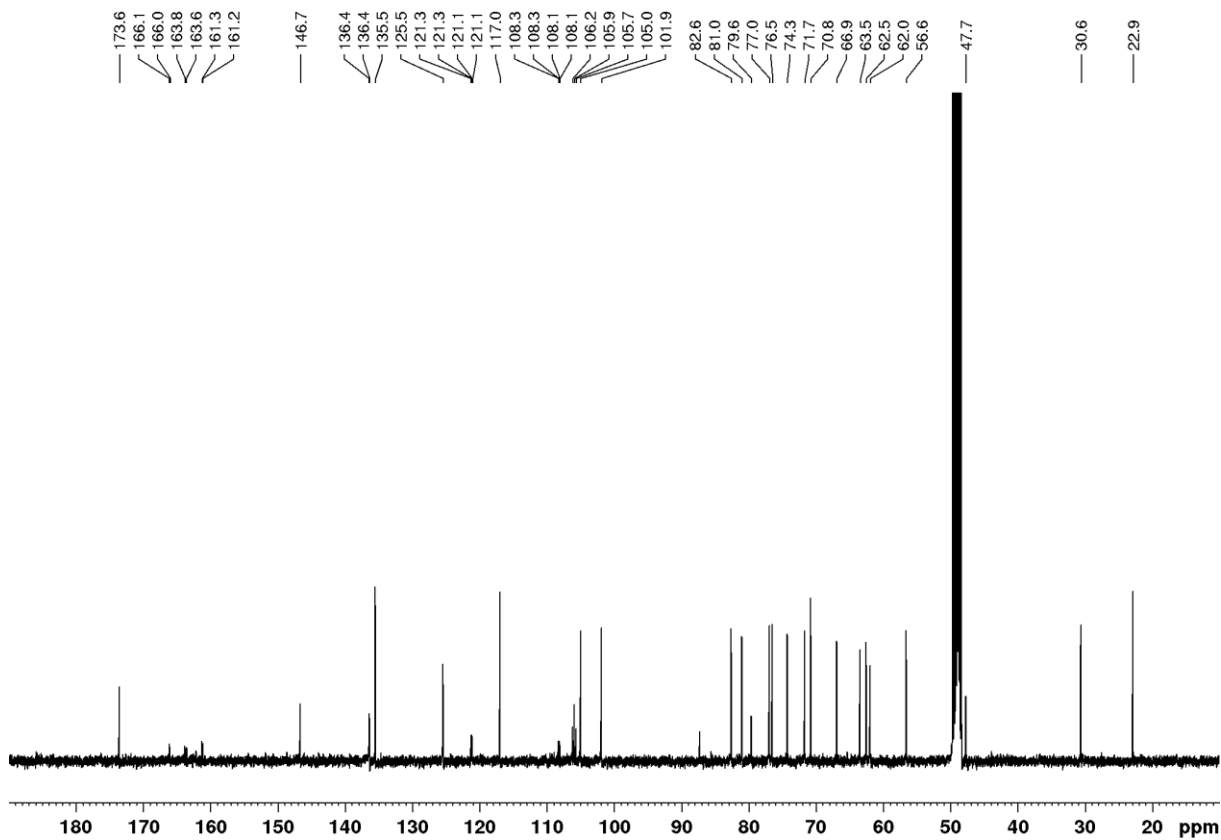


Abbildung 69: ^{13}C -NMR-Spektrum (100 MHz, MeOD) von Verbindung 39a.

9. Anhang

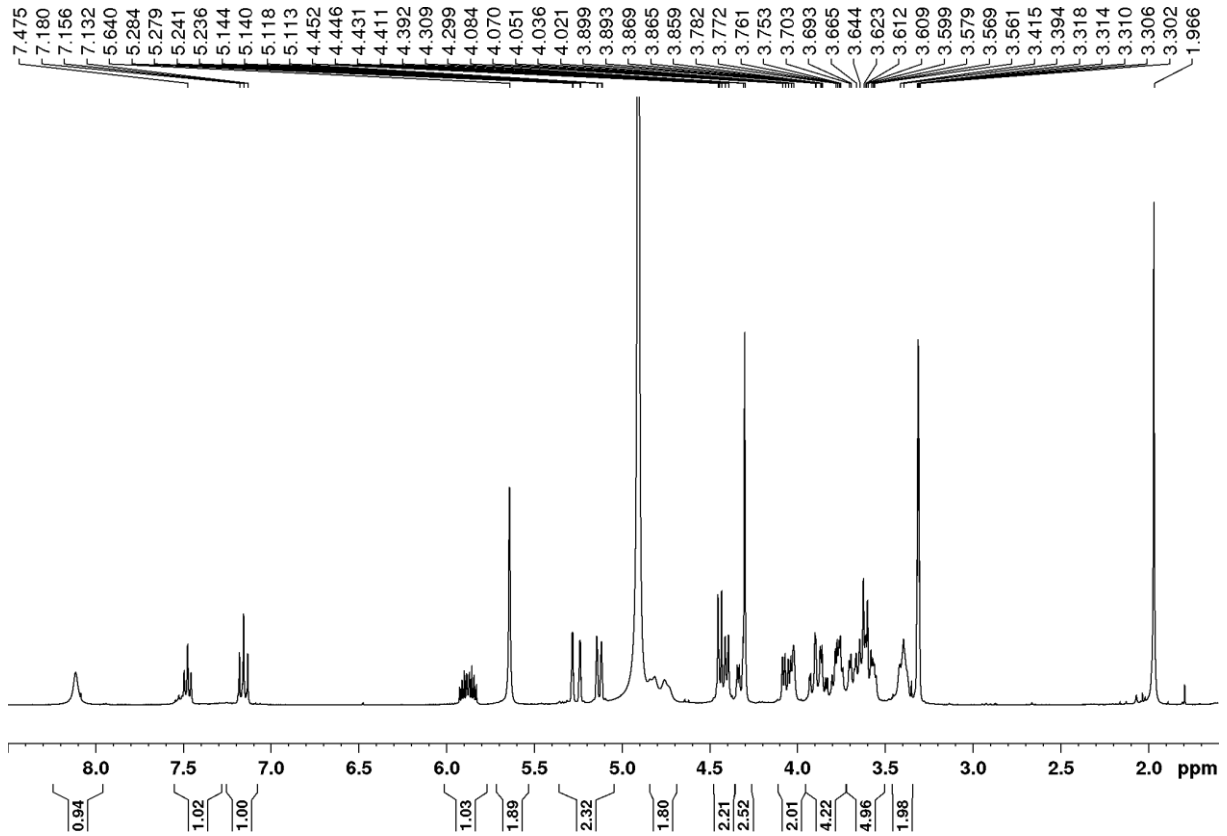


Abbildung 70: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, MeOD) von Verbindung **39b**.

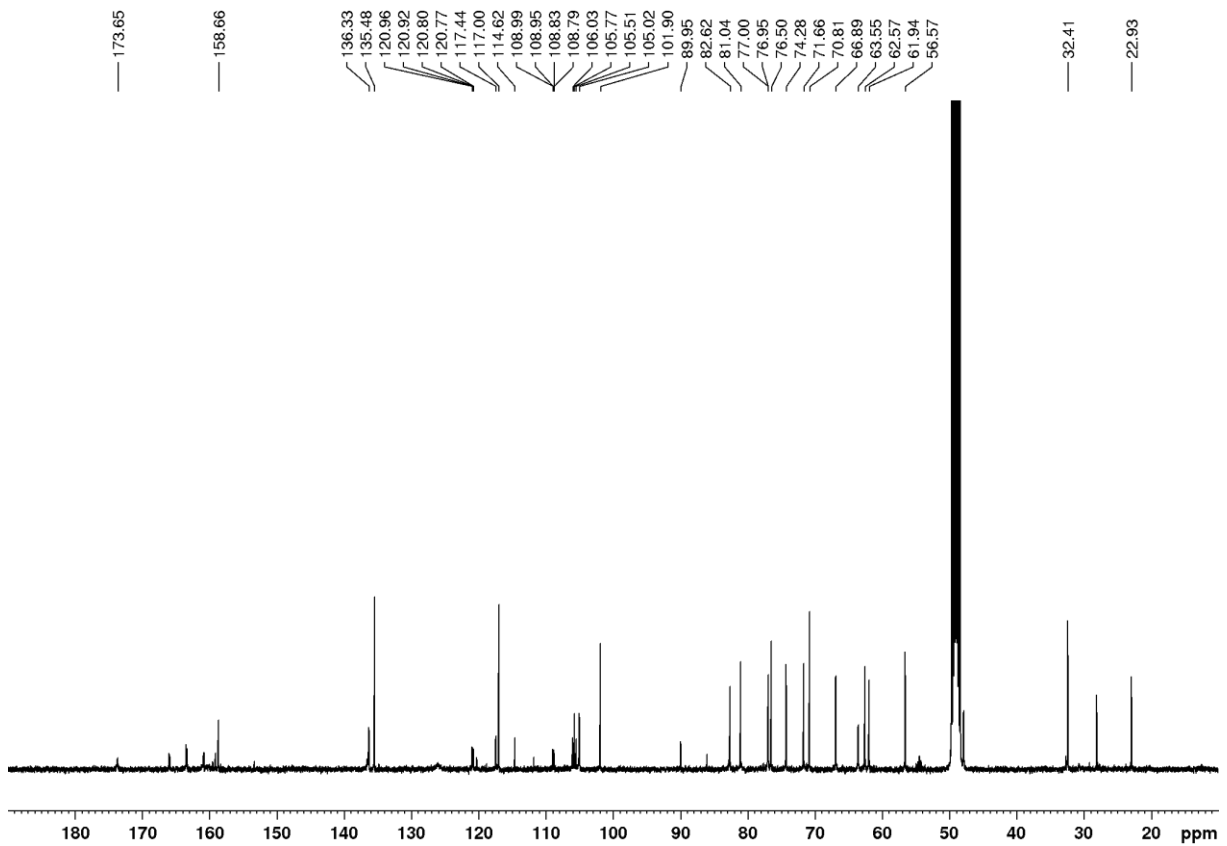


Abbildung 71: ^{13}C -NMR-Spektrum (100 MHz, MeOD) von Verbindung **39b**.

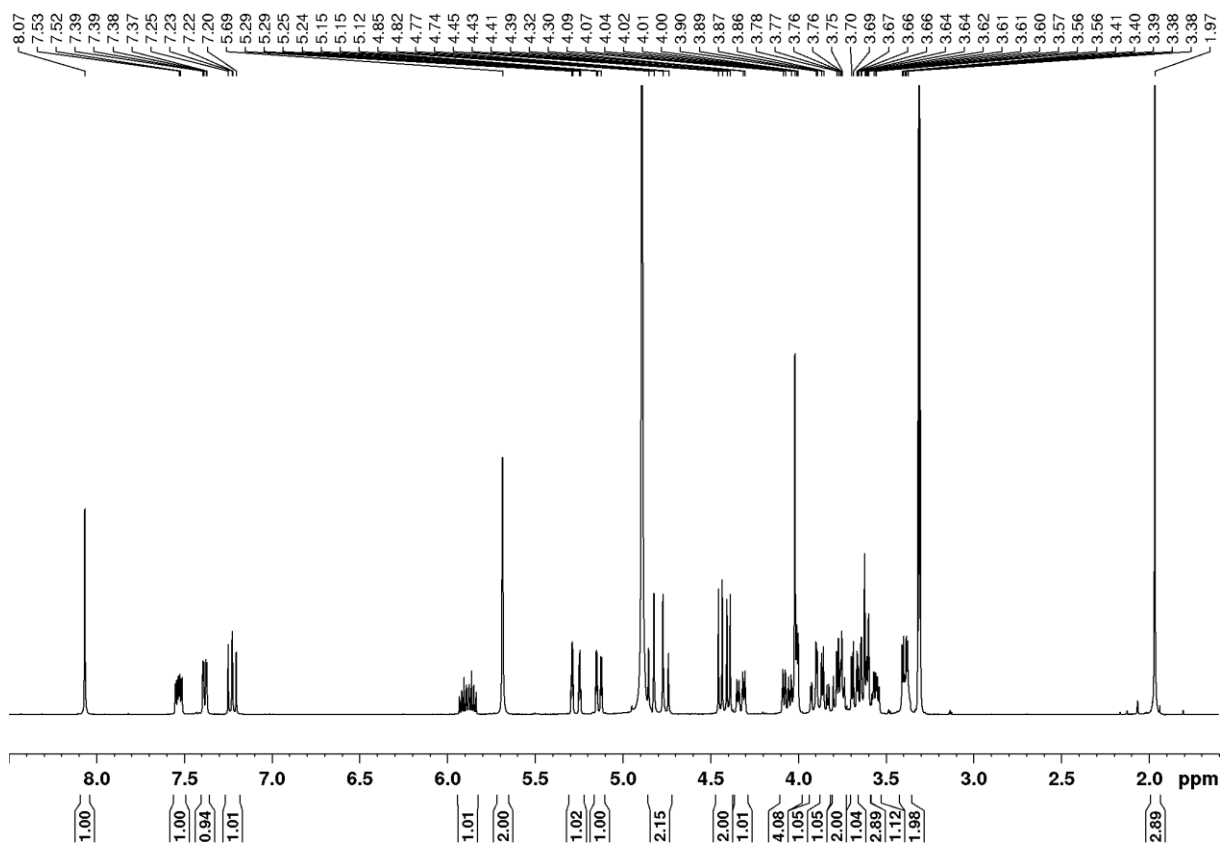


Abbildung 72: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, MeOD) von Verbindung **39c**.

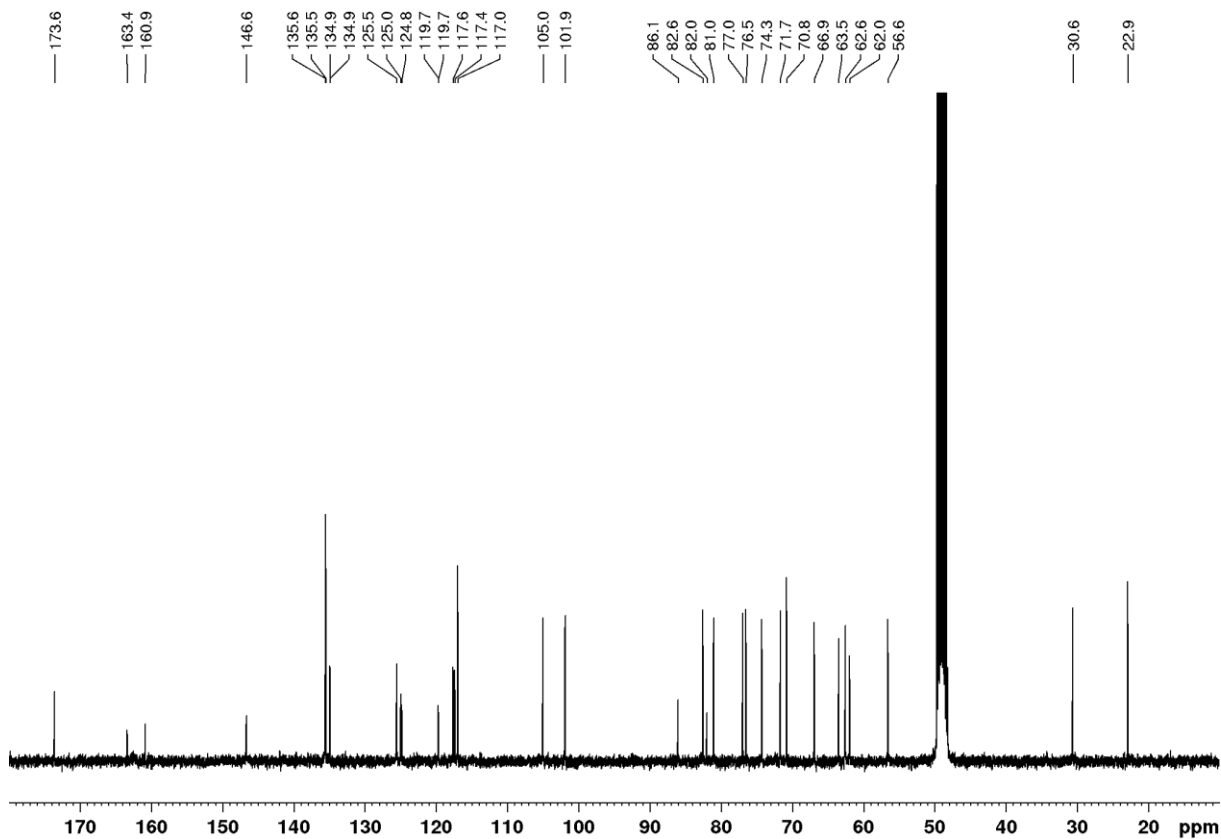


Abbildung 73: ^{13}C -NMR-Spektrum (100 MHz, MeOD) von Verbindung **39c**.

9. Anhang

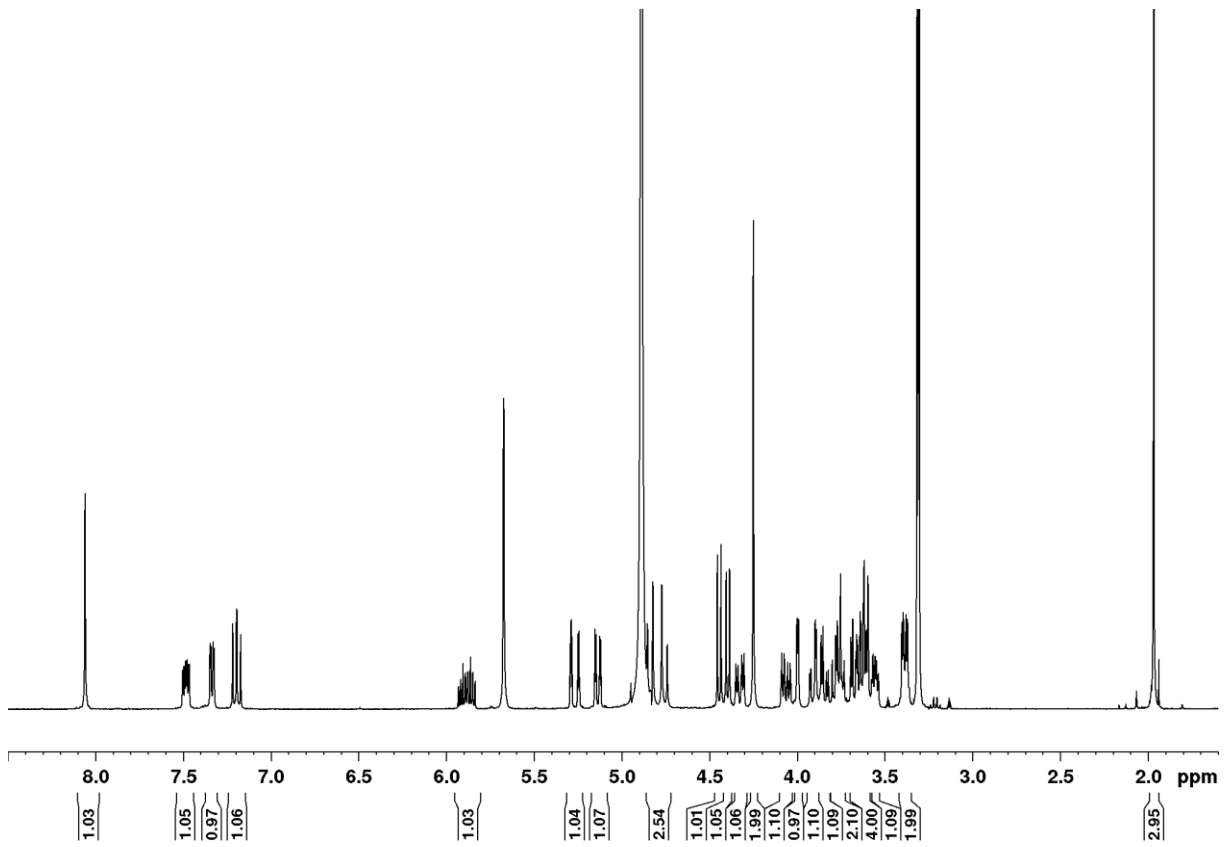


Abbildung 74: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, MeOD) von Verbindung 39d.

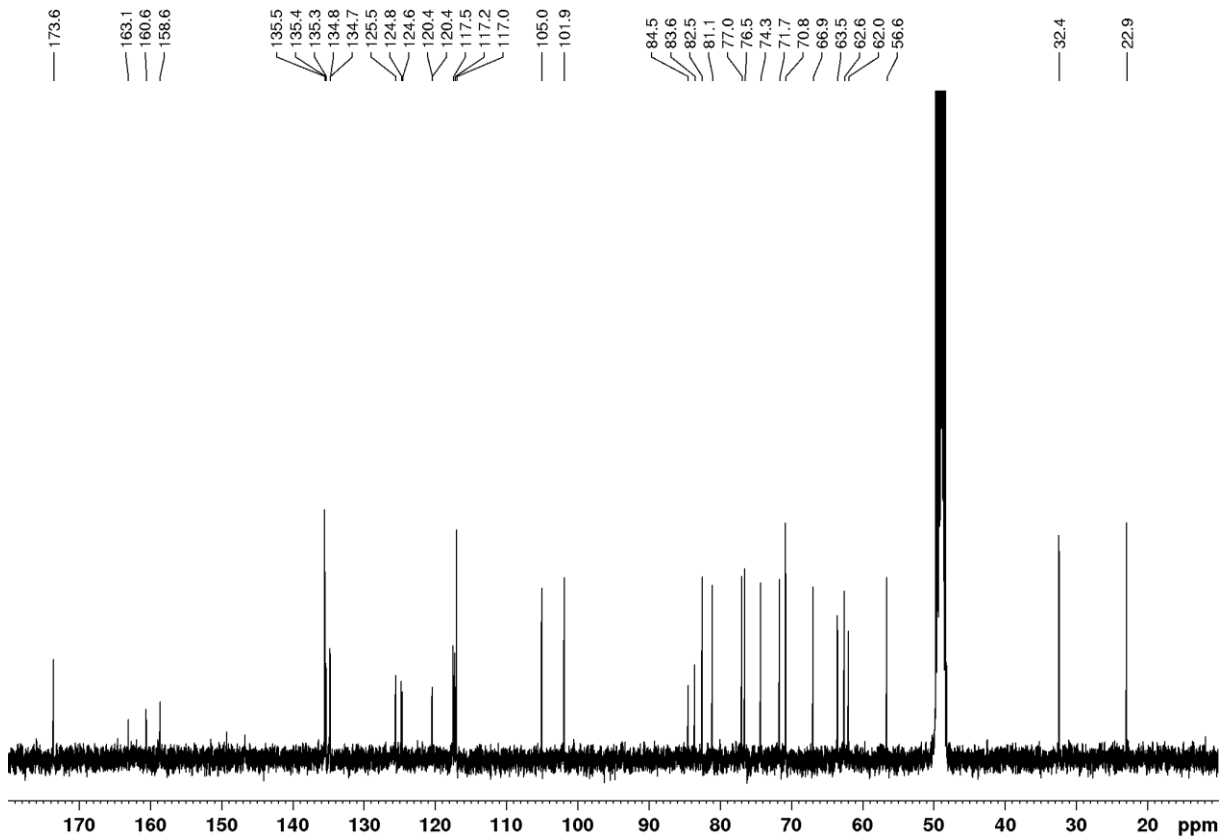


Abbildung 75: ^{13}C -NMR-Spektrum (100 MHz, MeOD) von Verbindung 39d.

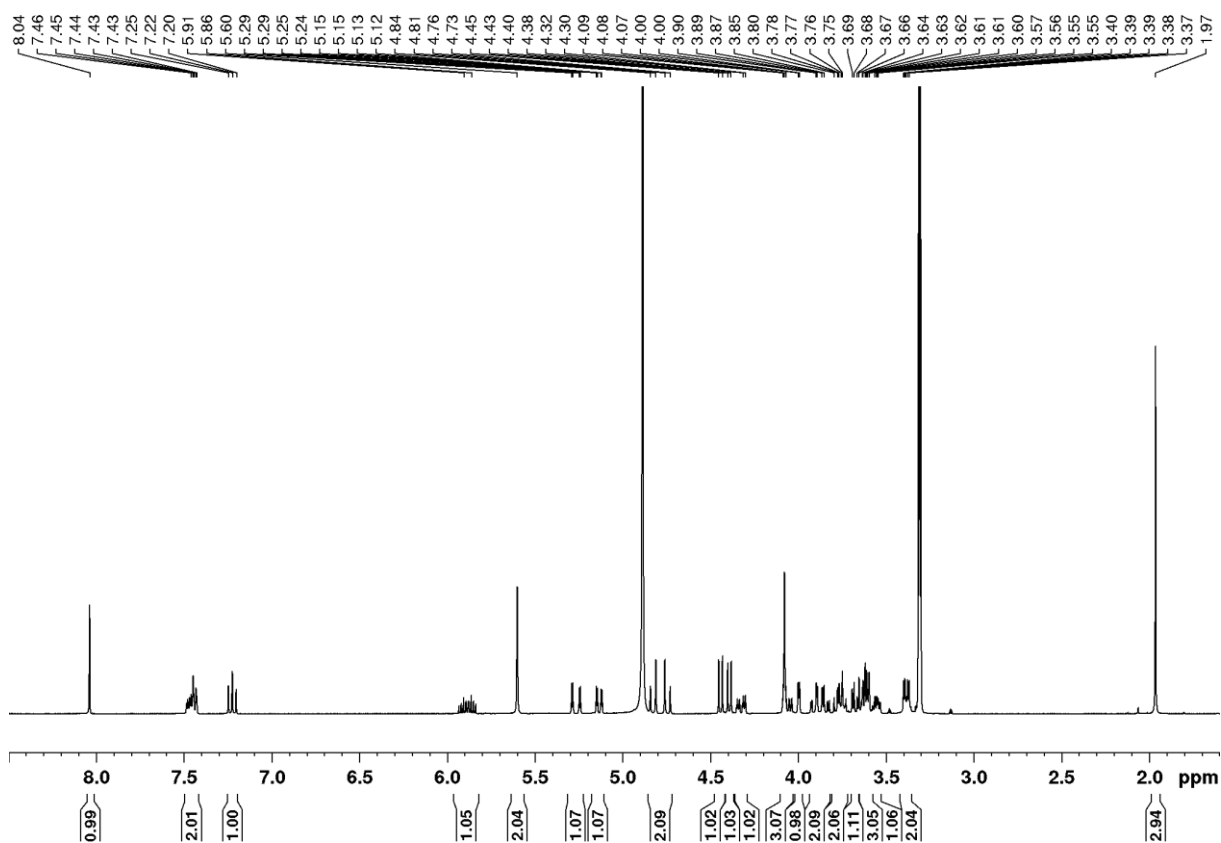


Abbildung 76: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, MeOD) von Verbindung **39e**.

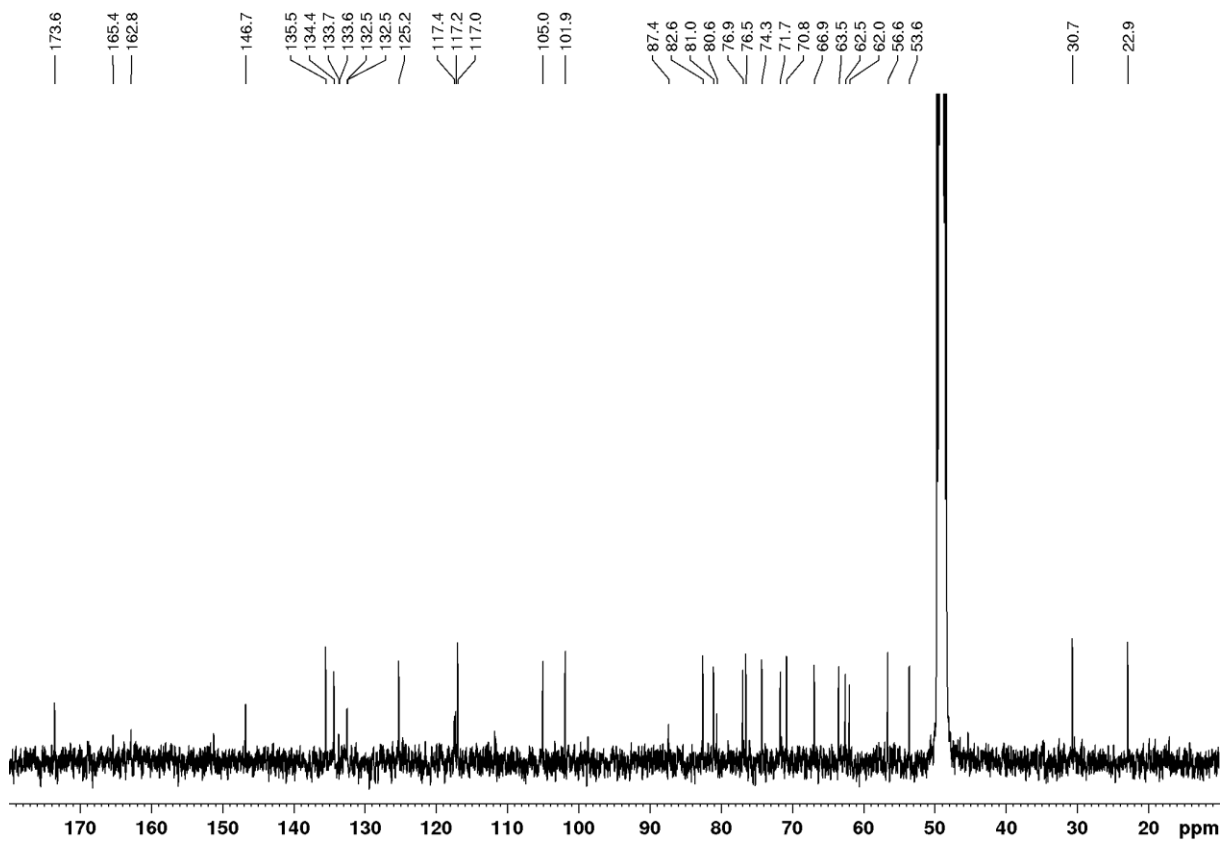


Abbildung 77: ^{13}C -NMR-Spektrum (100 MHz, MeOD) von Verbindung **39e**.

9. Anhang

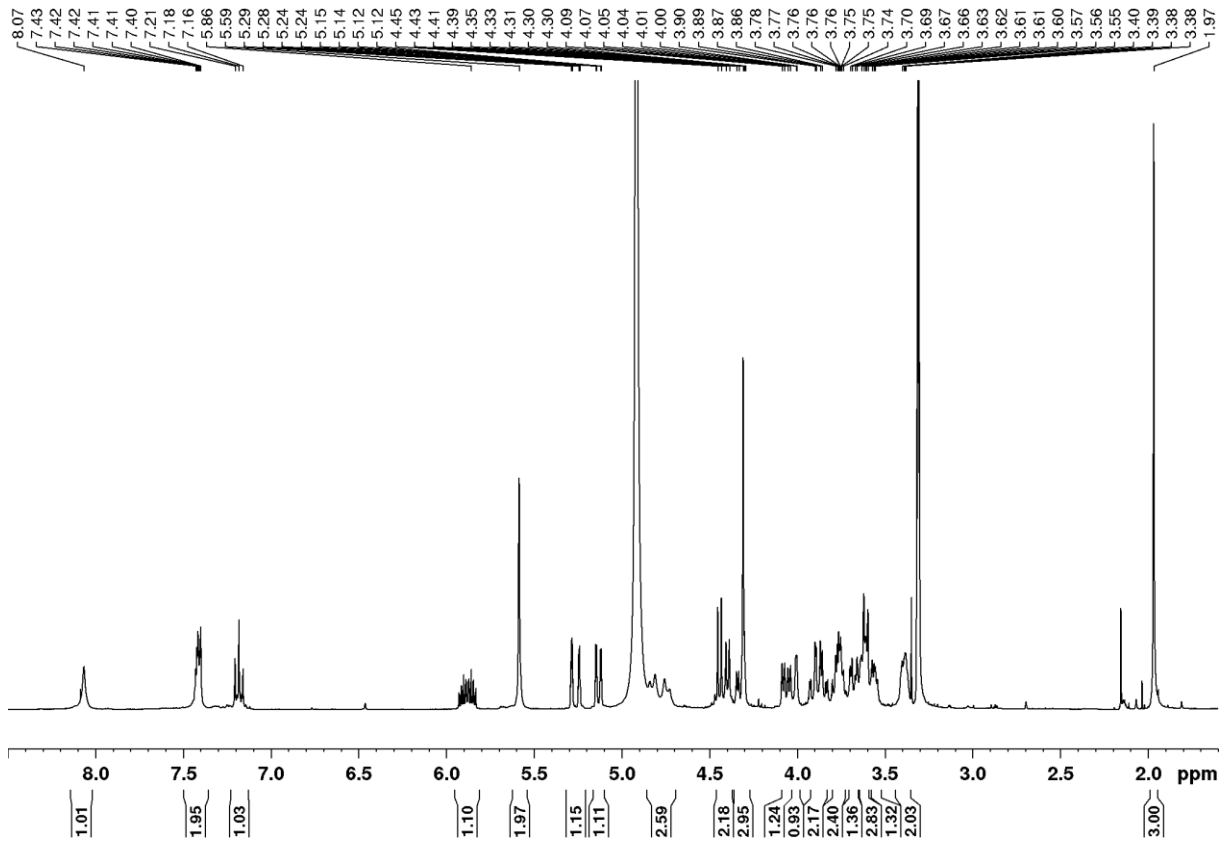


Abbildung 78: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, MeOD) von Verbindung **39f**.

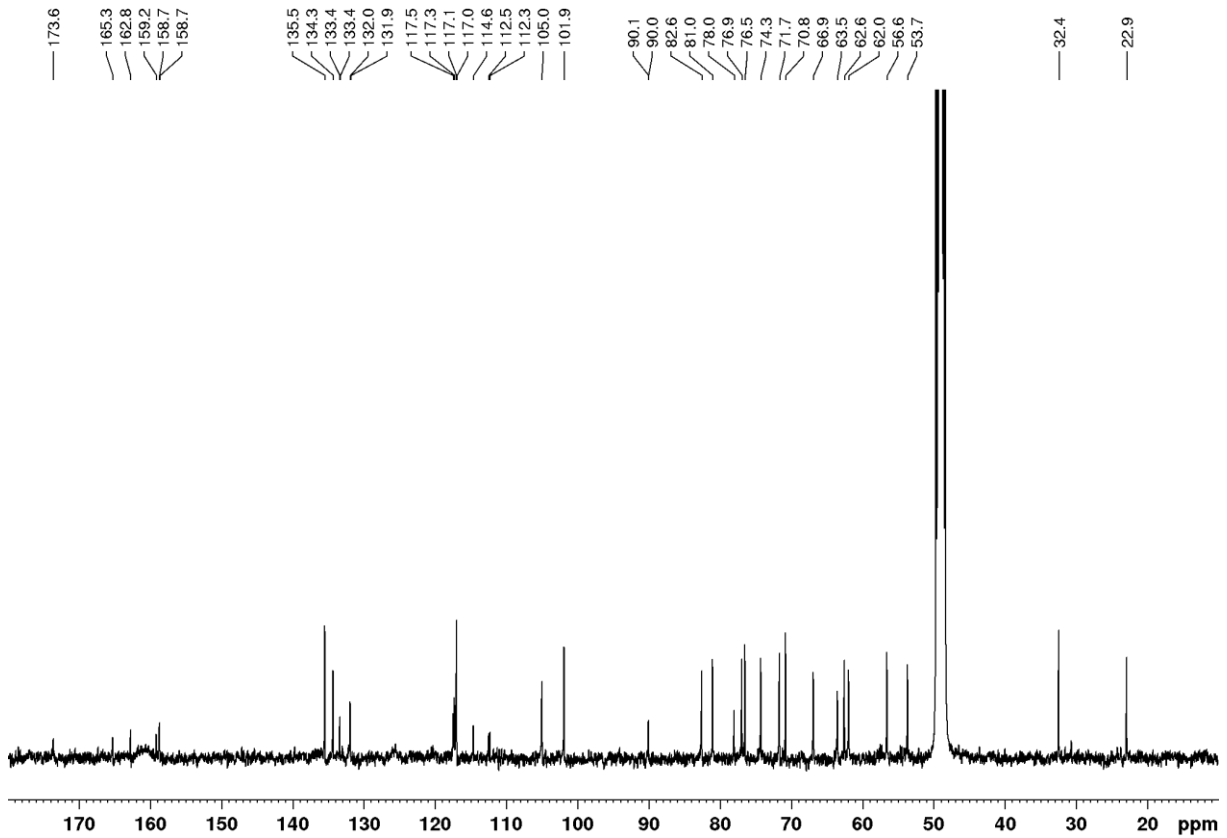


Abbildung 79: ^{13}C -NMR-Spektrum (100 MHz, MeOD) von Verbindung **39f**.

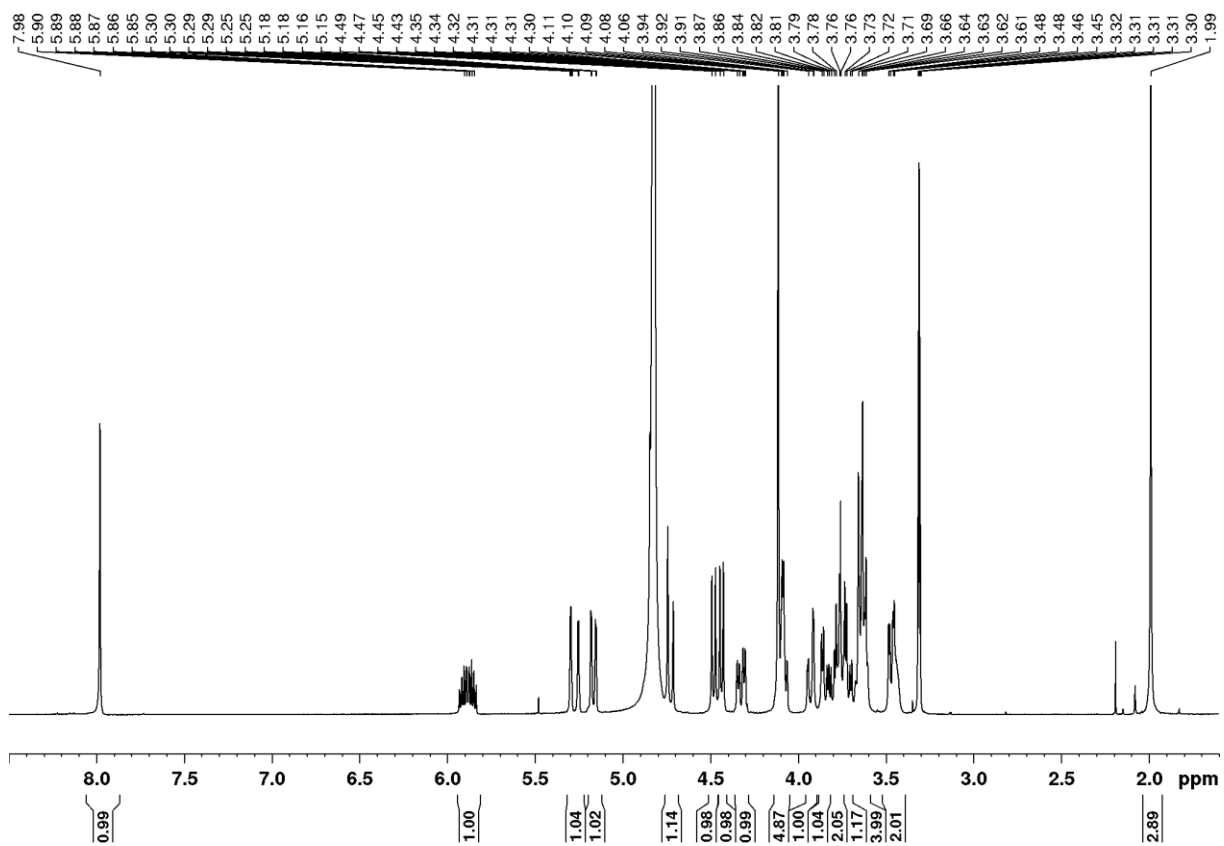


Abbildung 80: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, MeOD) von Verbindung 40.

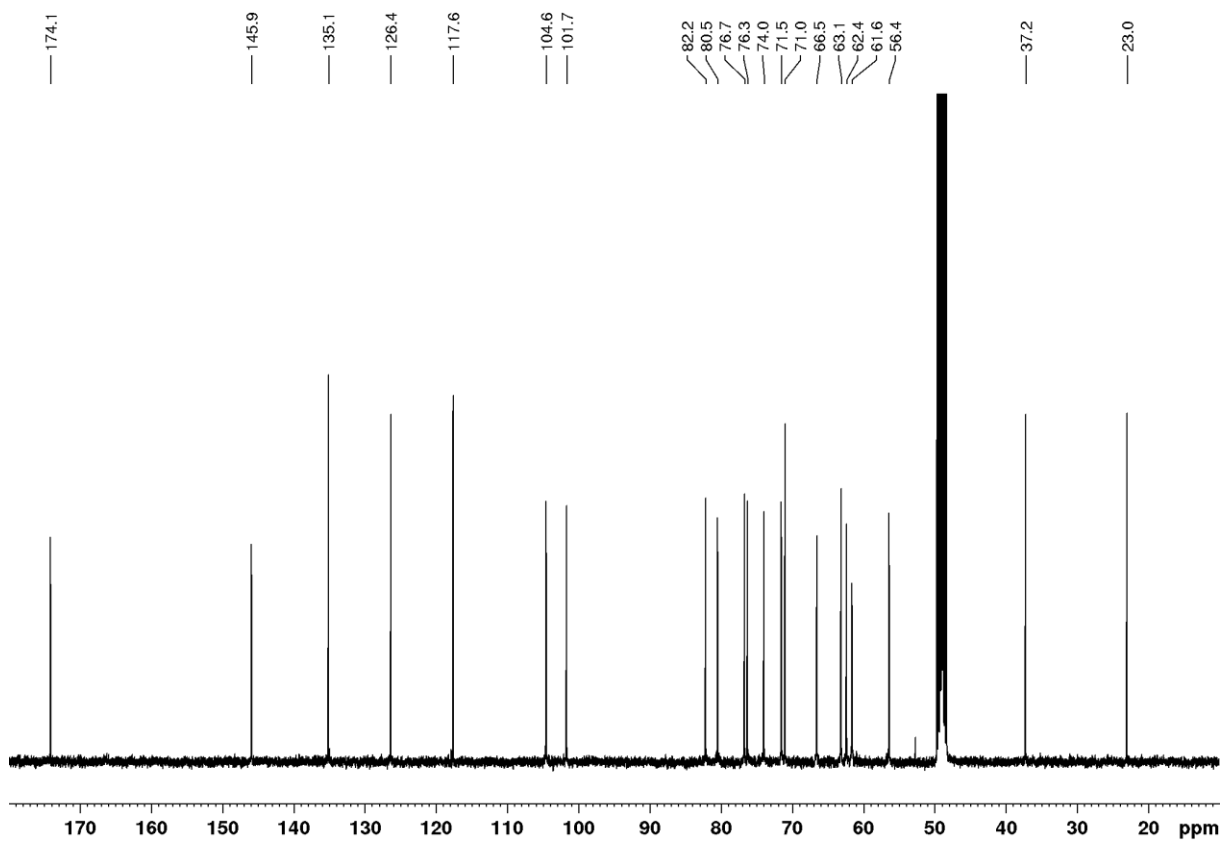


Abbildung 81: ^{13}C -NMR-Spektrum (100 MHz, MeOD) von Verbindung 40.

9. Anhang

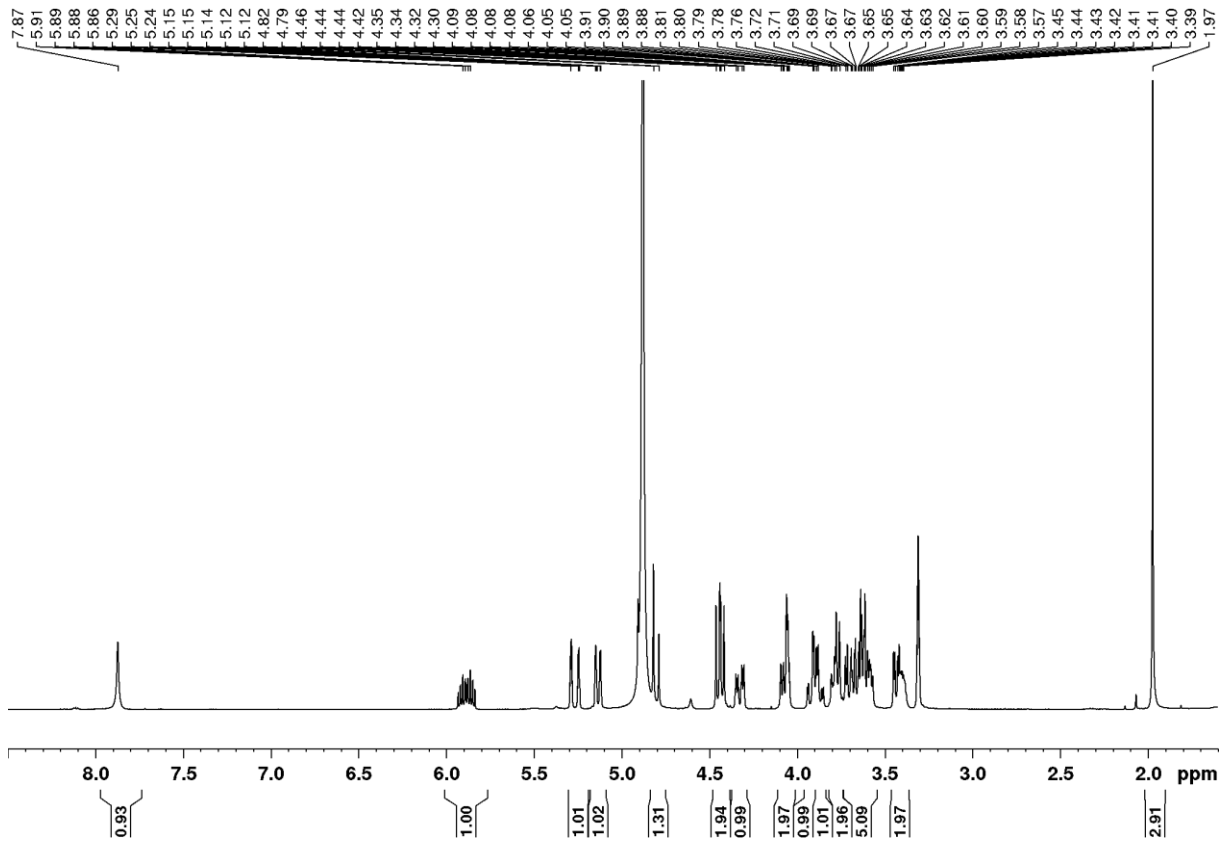


Abbildung 82: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, MeOD) von Verbindung 41.

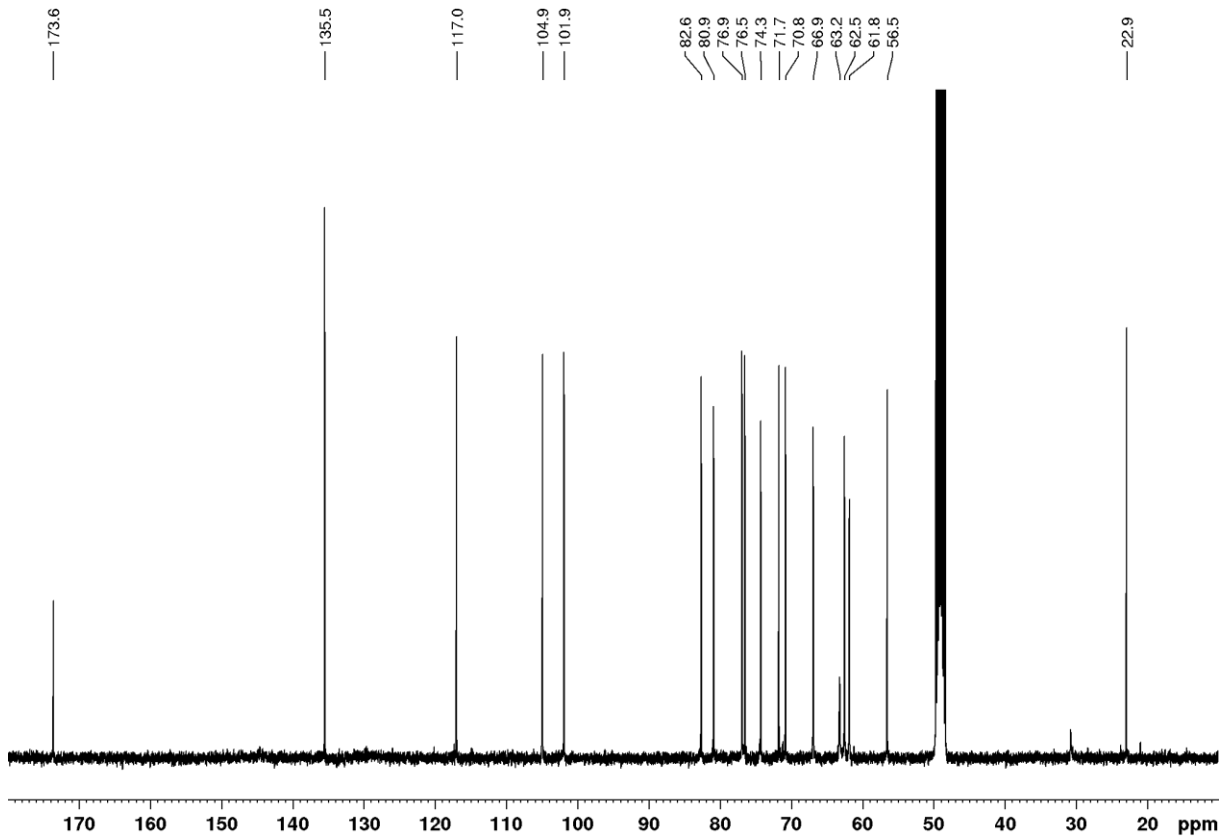


Abbildung 83: ^{13}C -NMR-Spektrum (100 MHz, MeOD) von Verbindung 41.

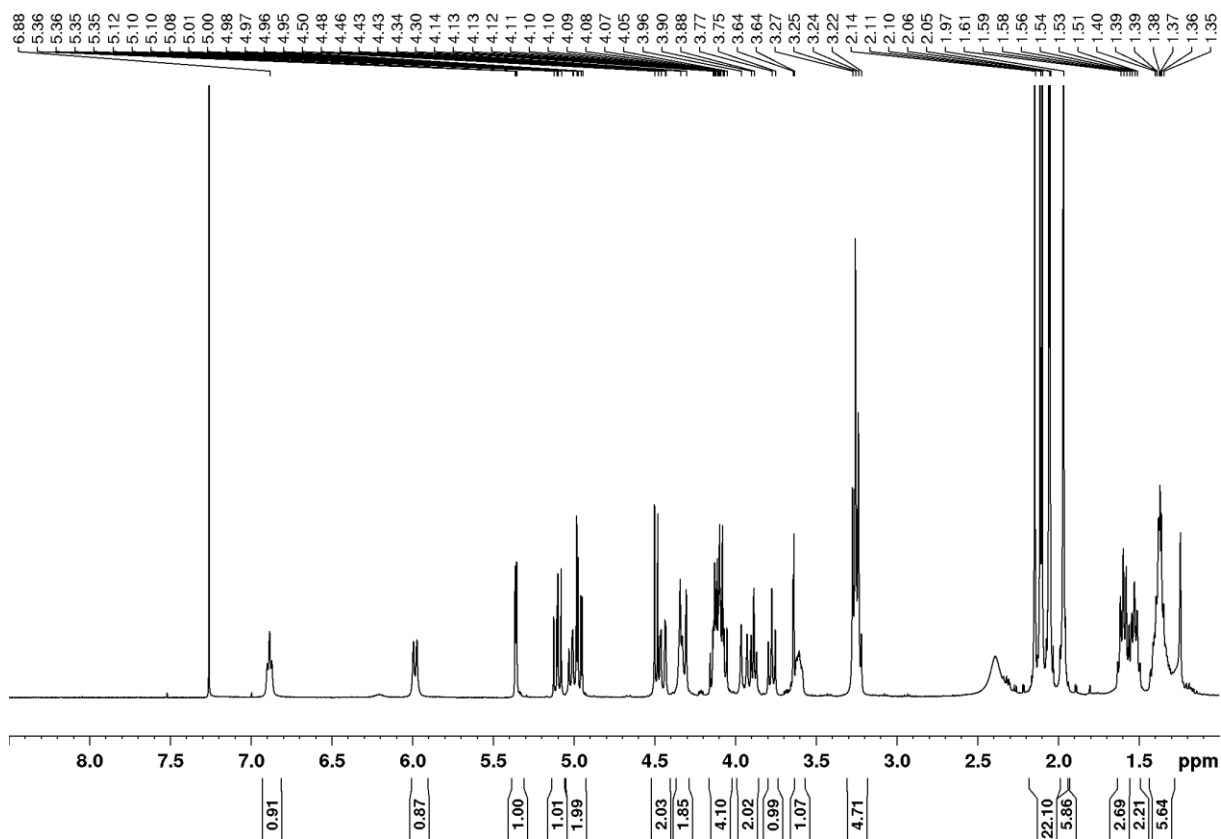


Abbildung 84: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl_3) von Verbindung 42.

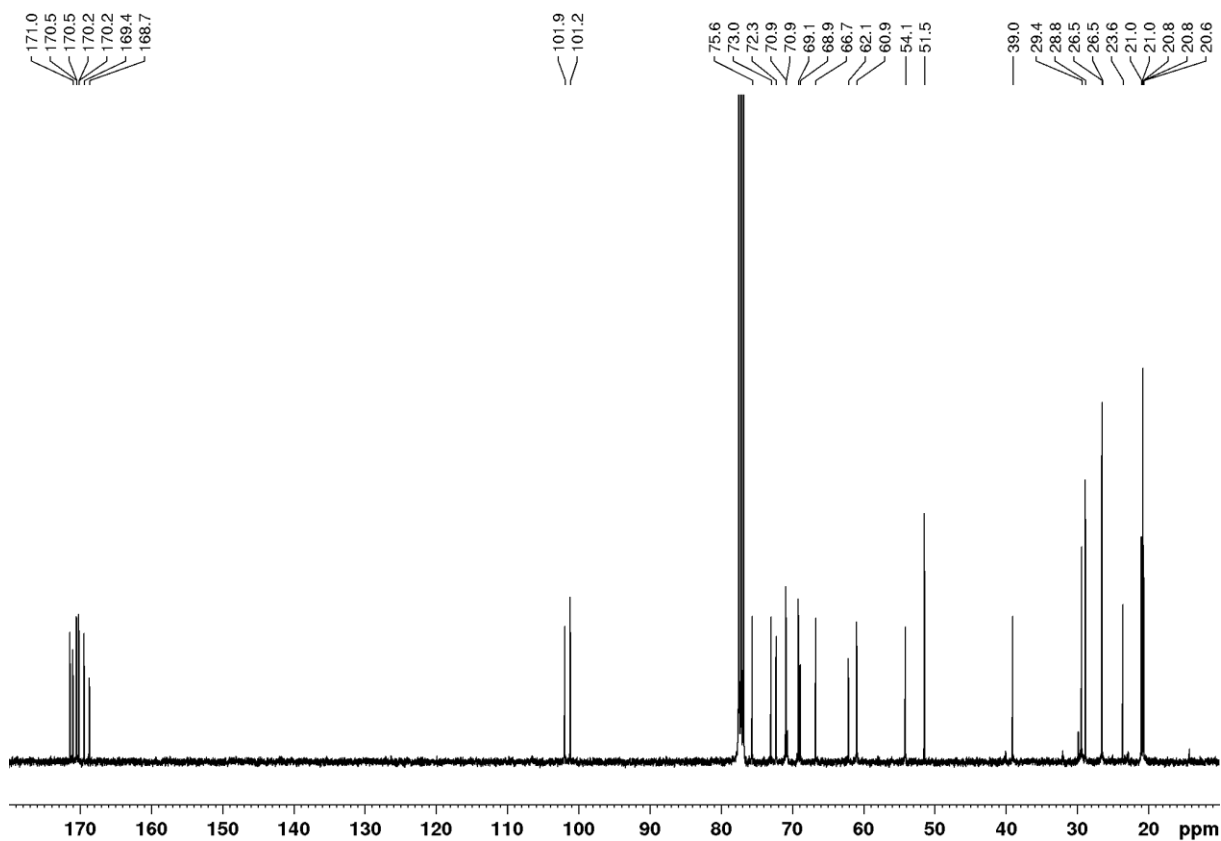


Abbildung 85: ^{13}C -NMR-Spektrum (100 MHz, CDCl_3) von Verbindung 42.

9. Anhang

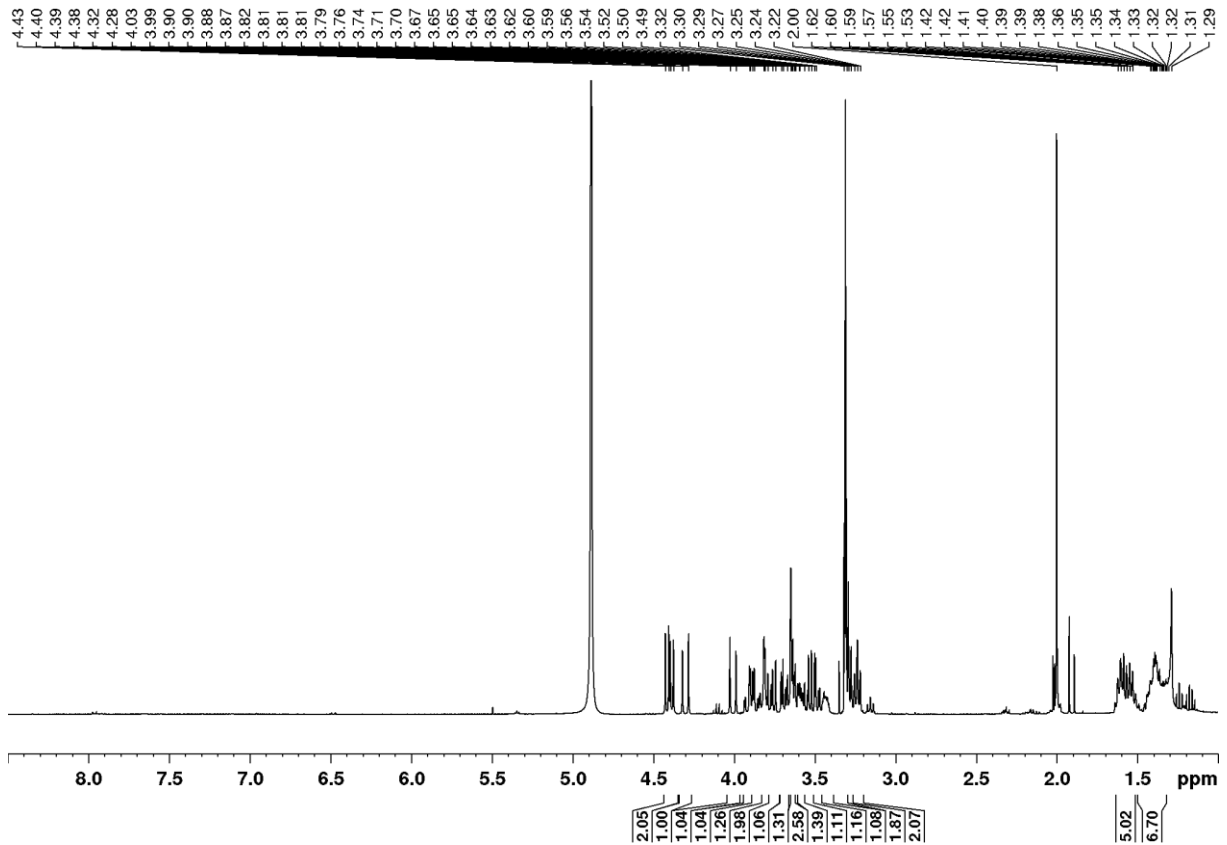


Abbildung 86: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, MeOD) von Verbindung **87**.

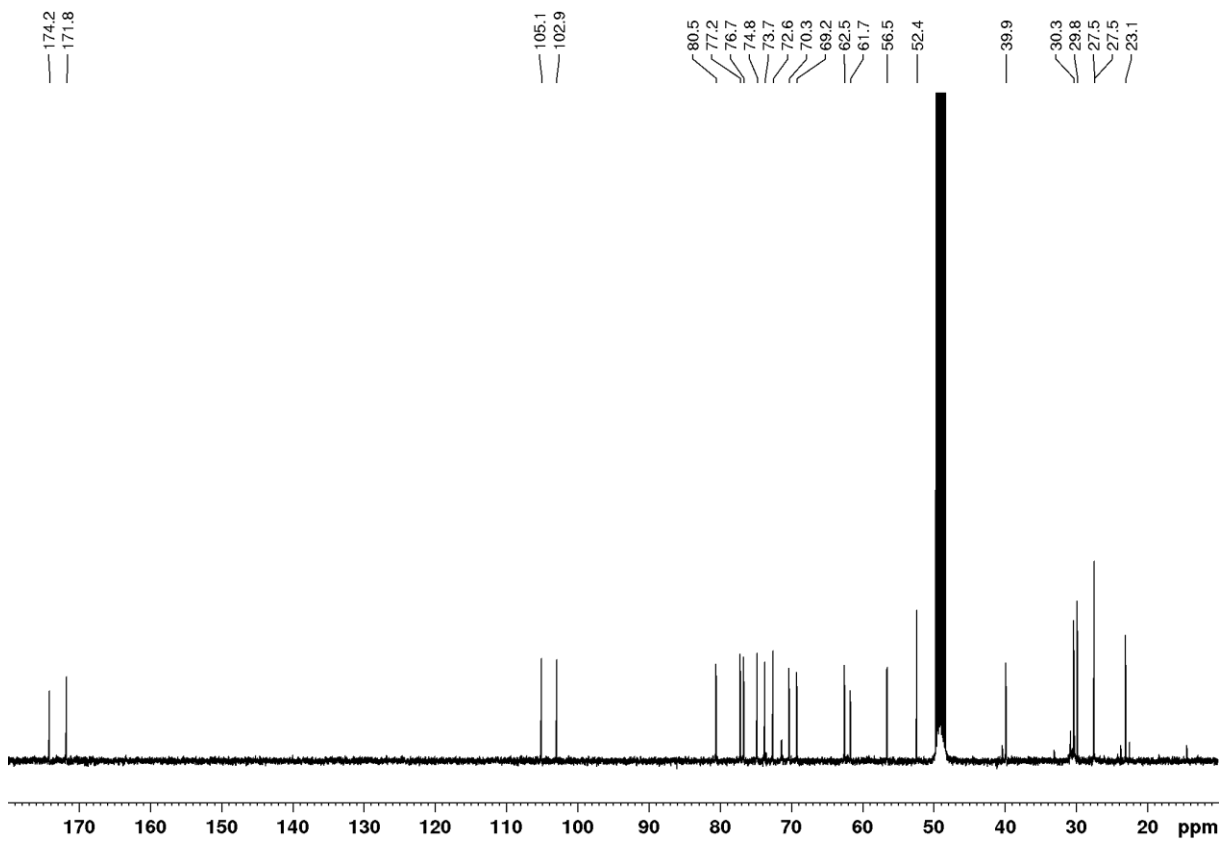


Abbildung 87: ^{13}C -NMR-Spektrum (100 MHz, MeOD) von Verbindung **87**.

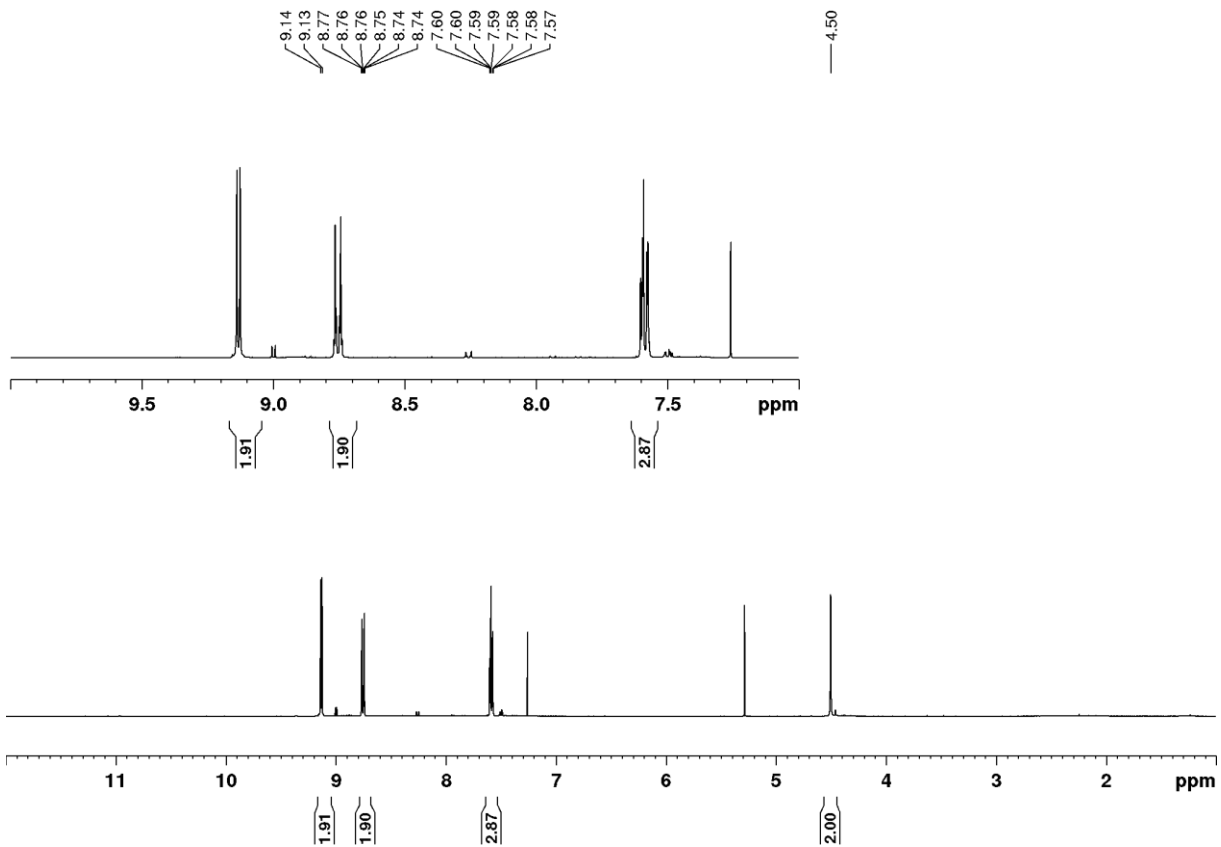


Abbildung 88: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl_3) von Verbindung 56.

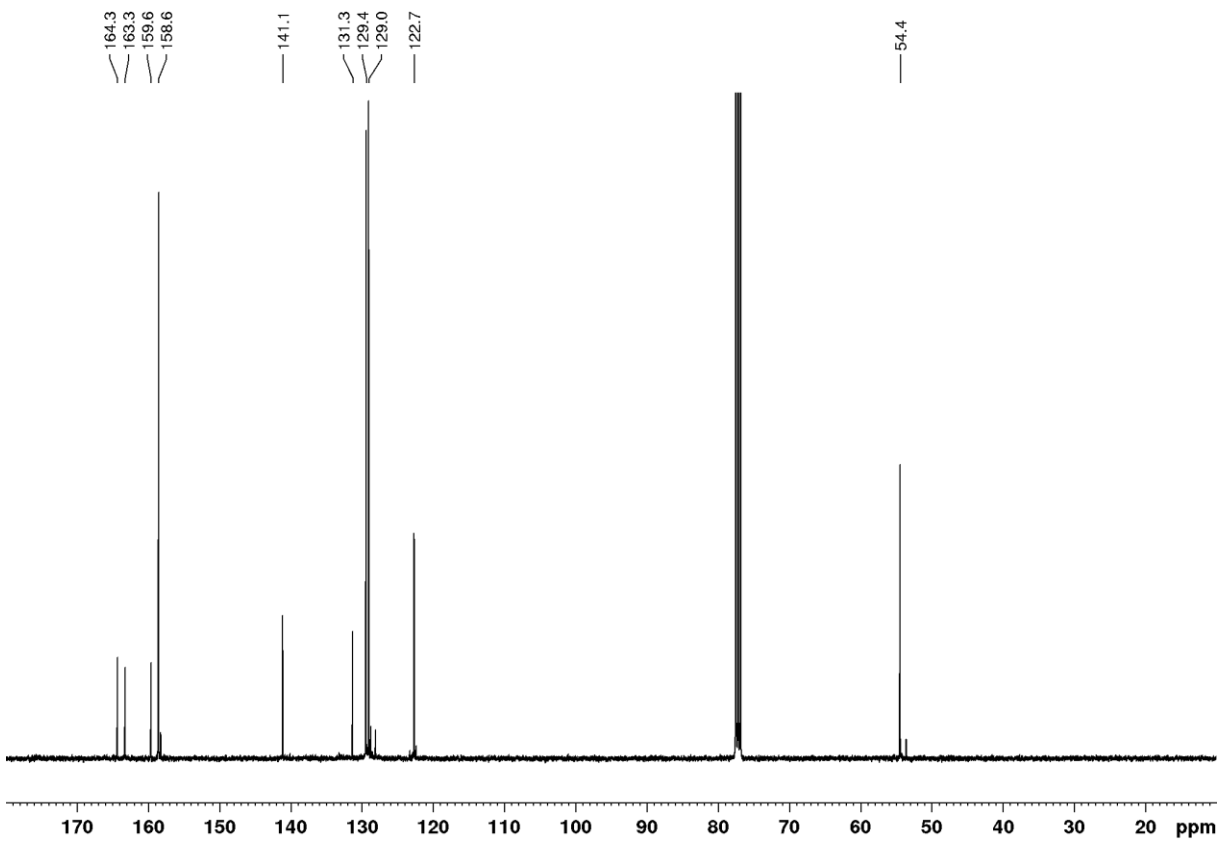


Abbildung 89: ^{13}C -NMR-Spektrum (100 MHz, CDCl_3) von Verbindung 56.

9. Anhang

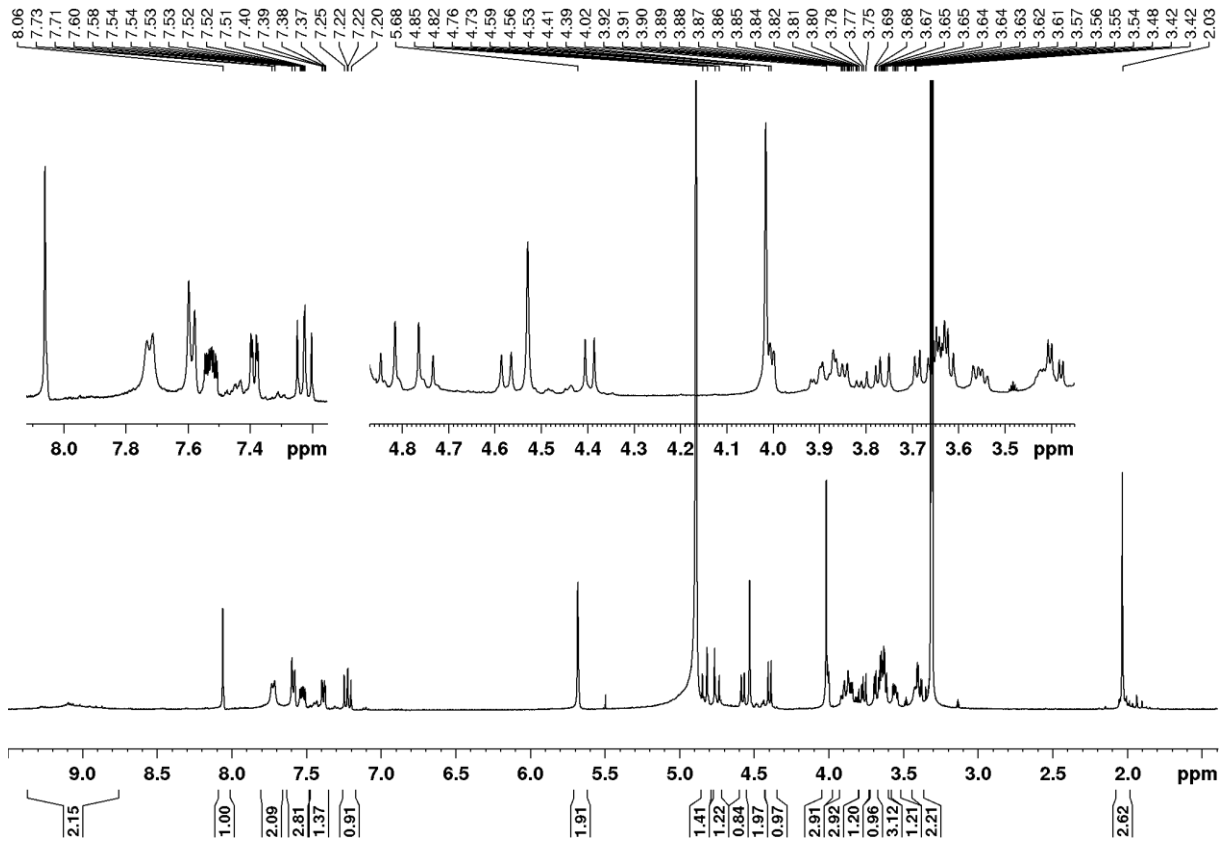


Abbildung 90: ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, MeOD) von Verbindung **58**.

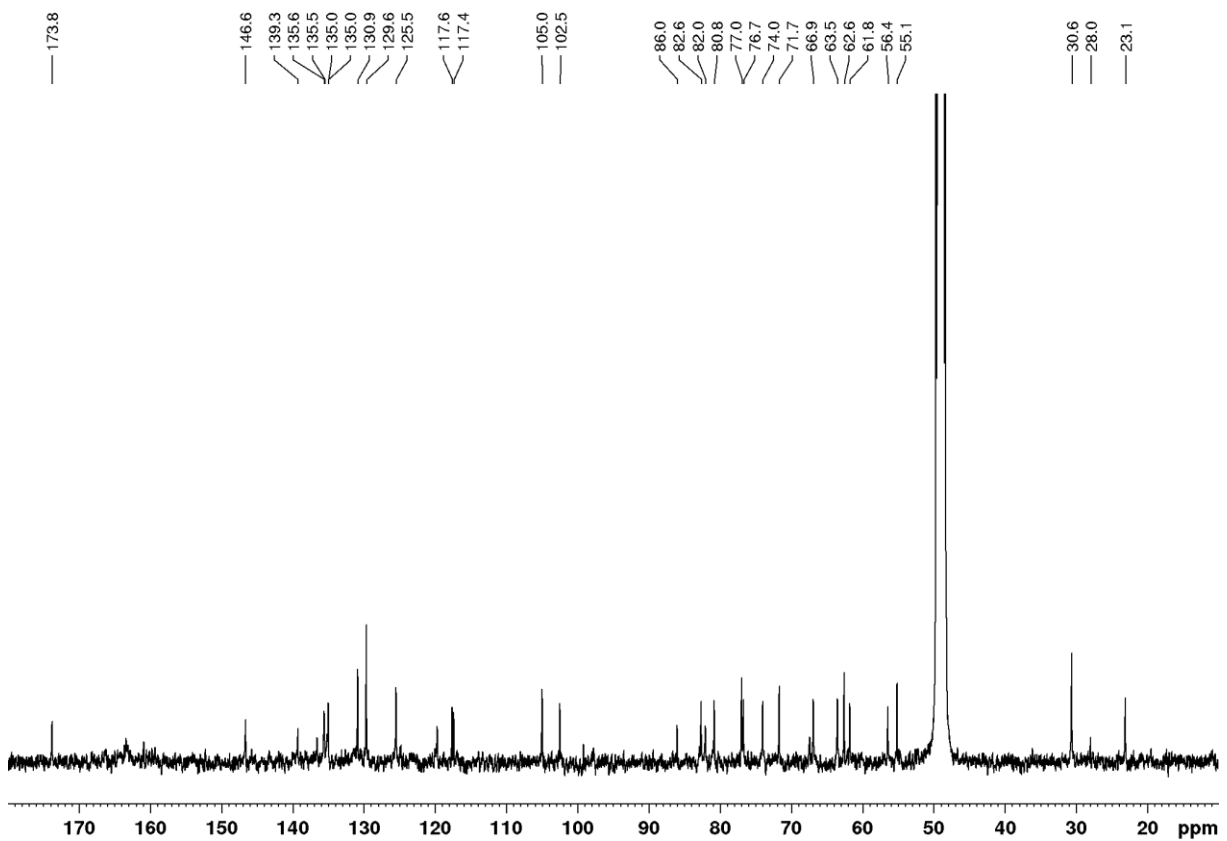


Abbildung 91: ^{13}C -NMR-Spektrum (150 MHz, MeOD) von Verbindung **58**.

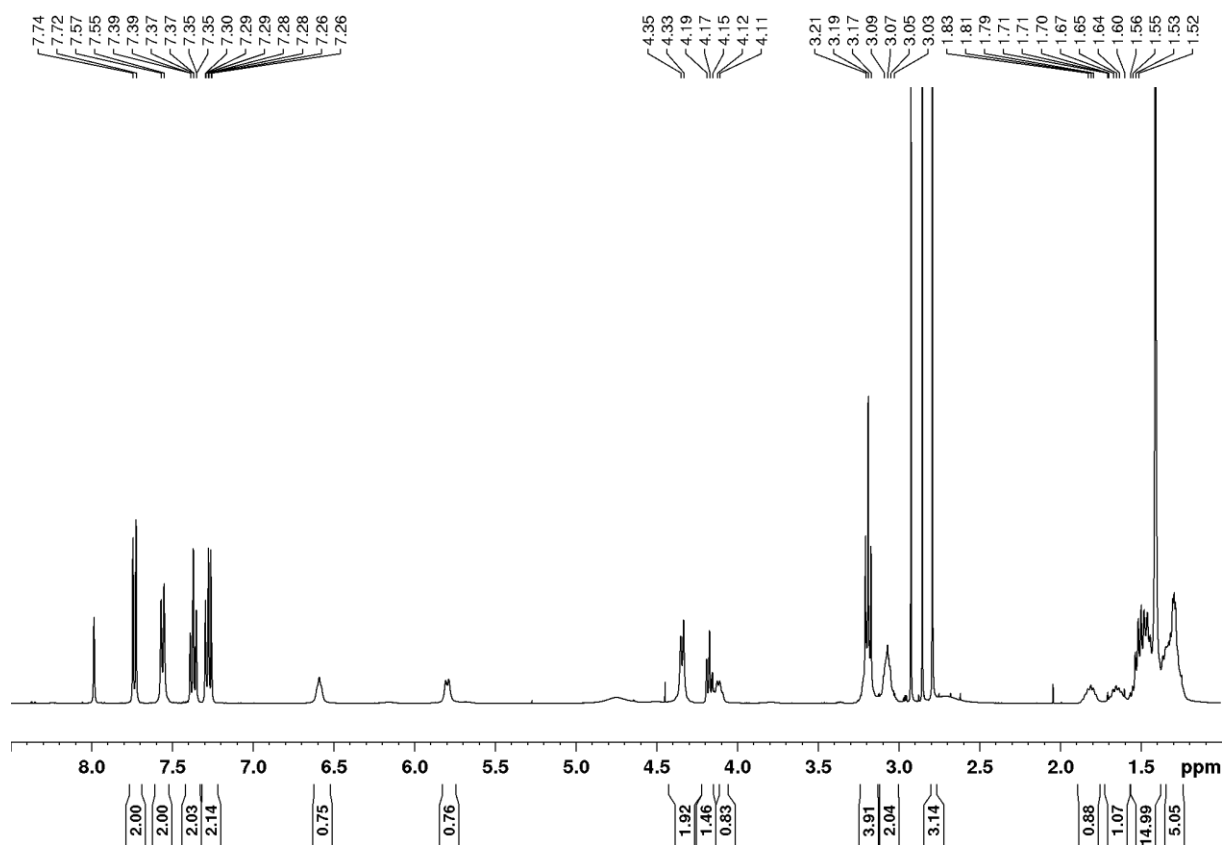


Abbildung 92: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl_3) von Verbindung **88**.

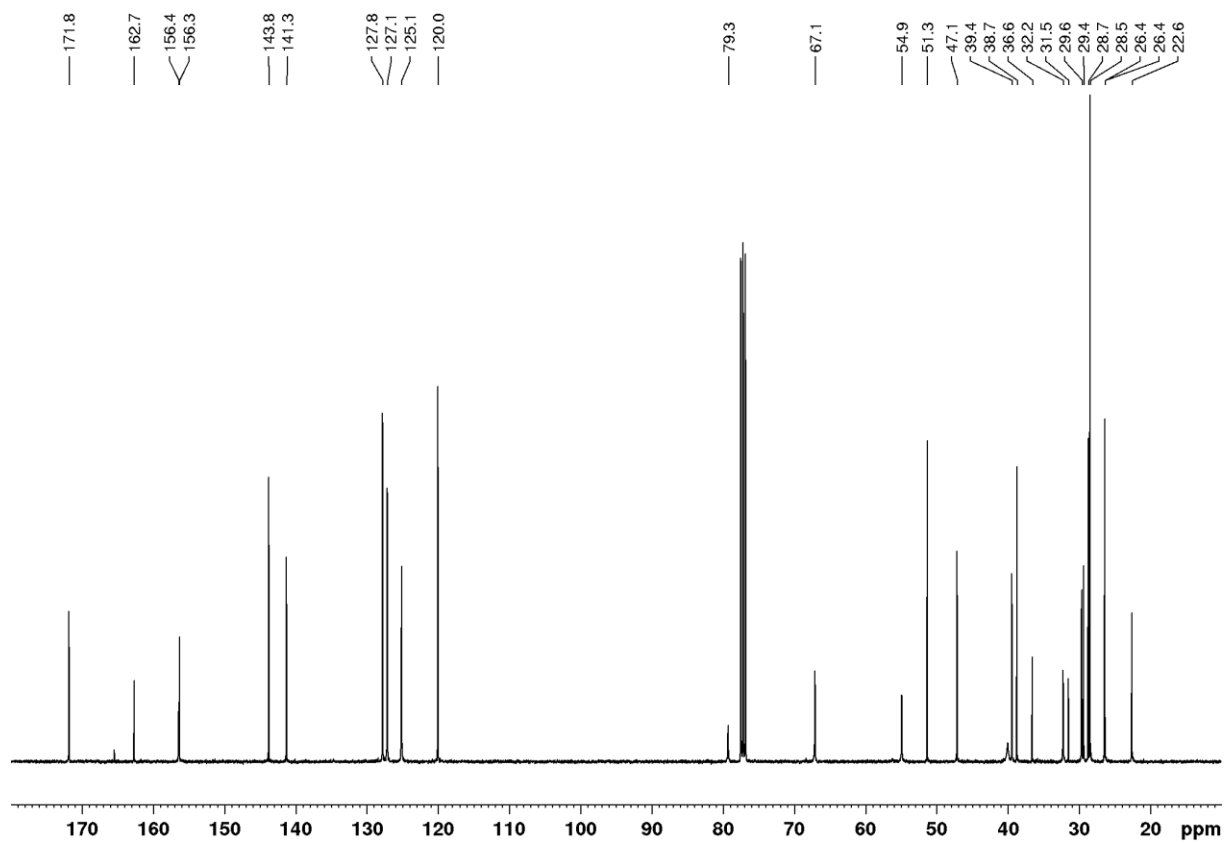


Abbildung 93: ^{13}C -NMR-Spektrum (100 MHz, CDCl_3) von Verbindung **88**.

9. Anhang

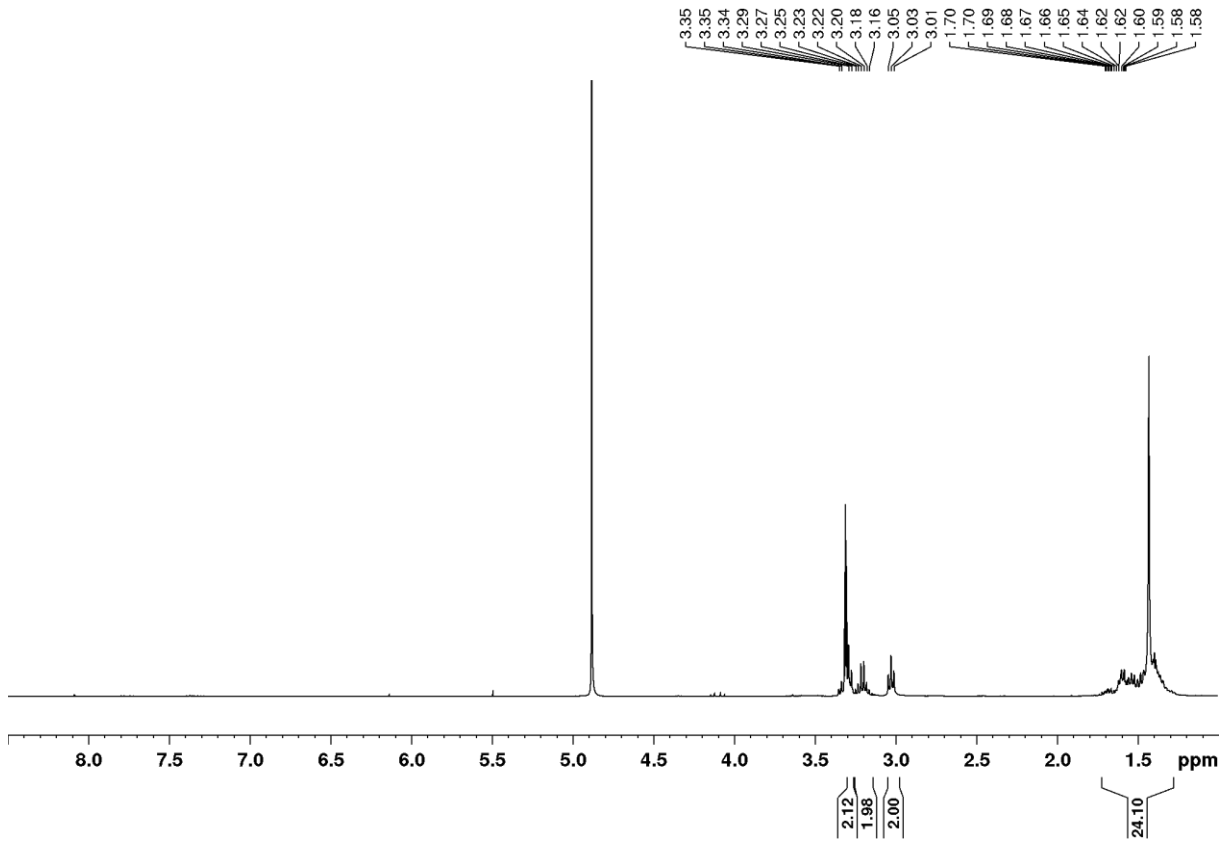


Abbildung 94: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, MeOD) von Verbindung 64.

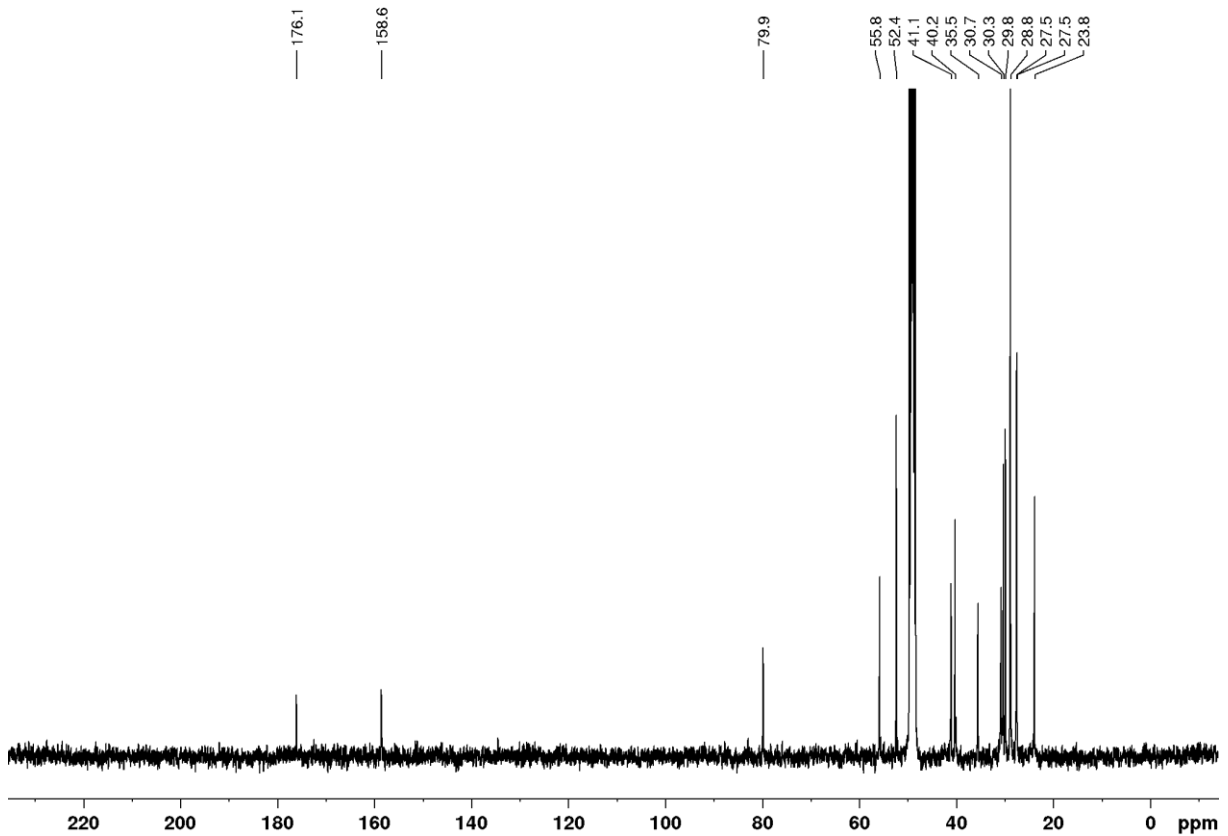


Abbildung 95: ^{13}C -NMR-Spektrum (100 MHz, MeOD) von Verbindung 64.

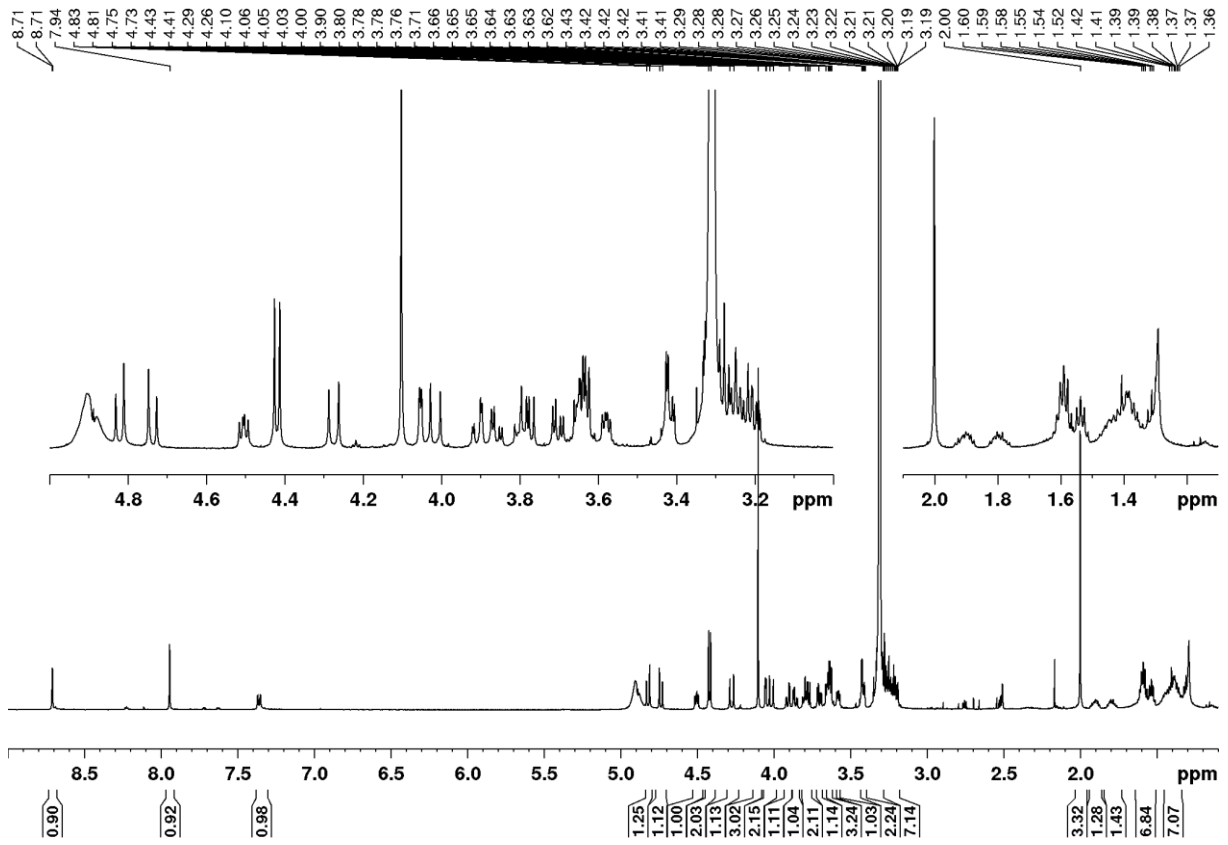


Abbildung 96: ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, MeOD) von Verbindung 69.

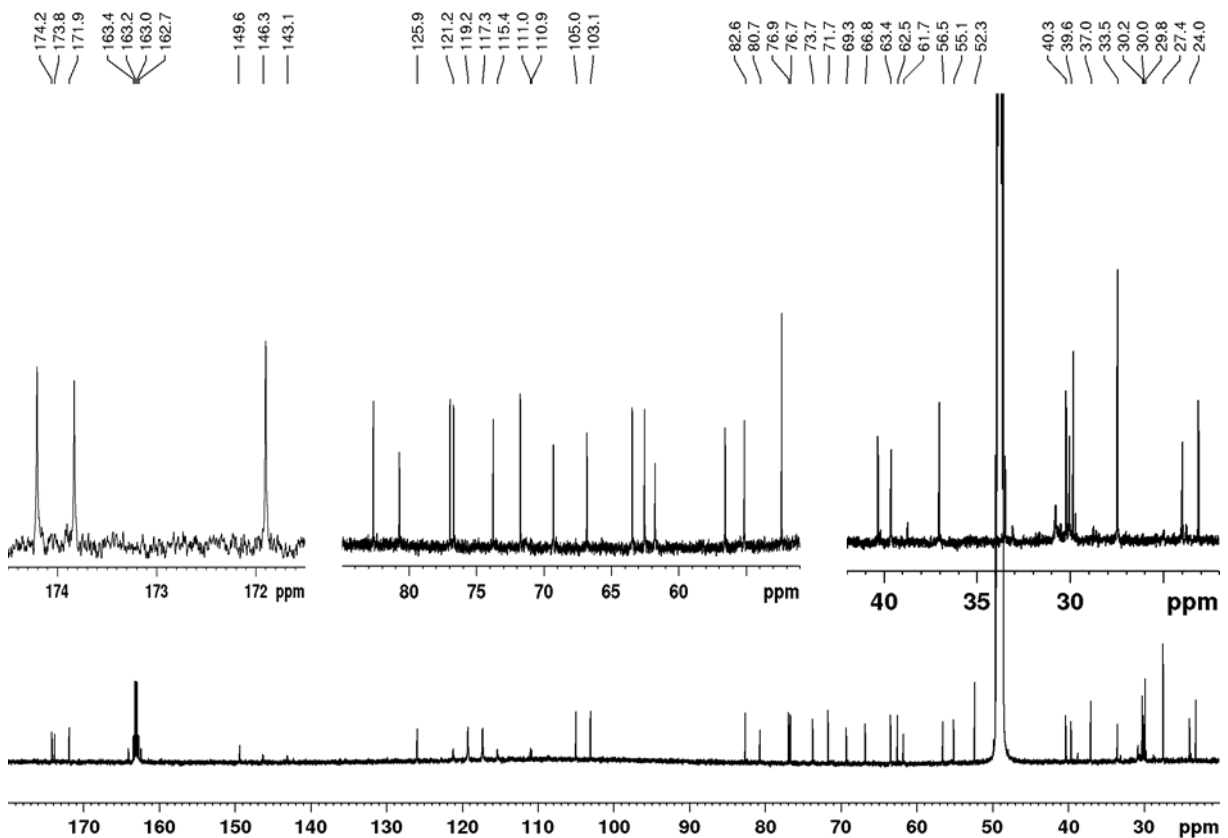


Abbildung 97: ^{13}C -NMR-Spektrum (150 MHz, MeOD) von Verbindung 69.

9. Anhang

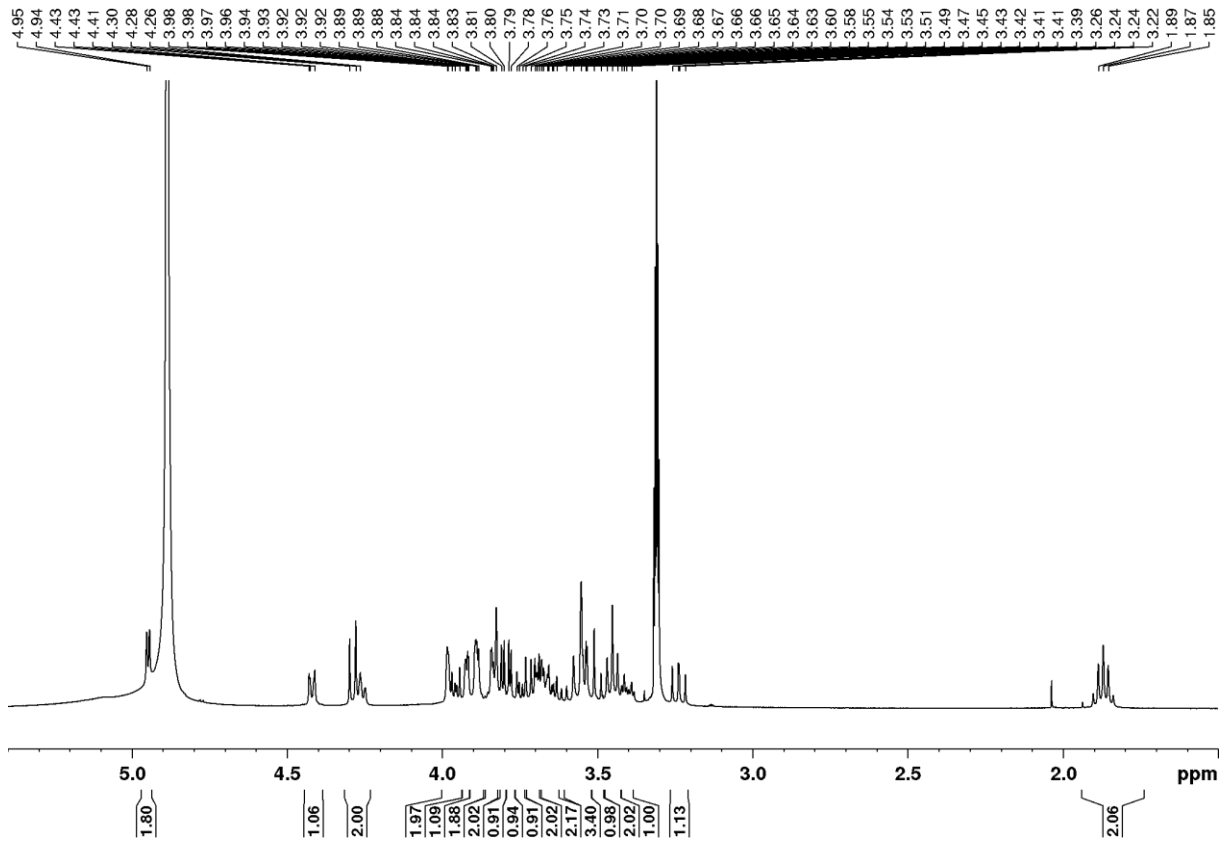


Abbildung 98: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, MeOD) von Verbindung 71.

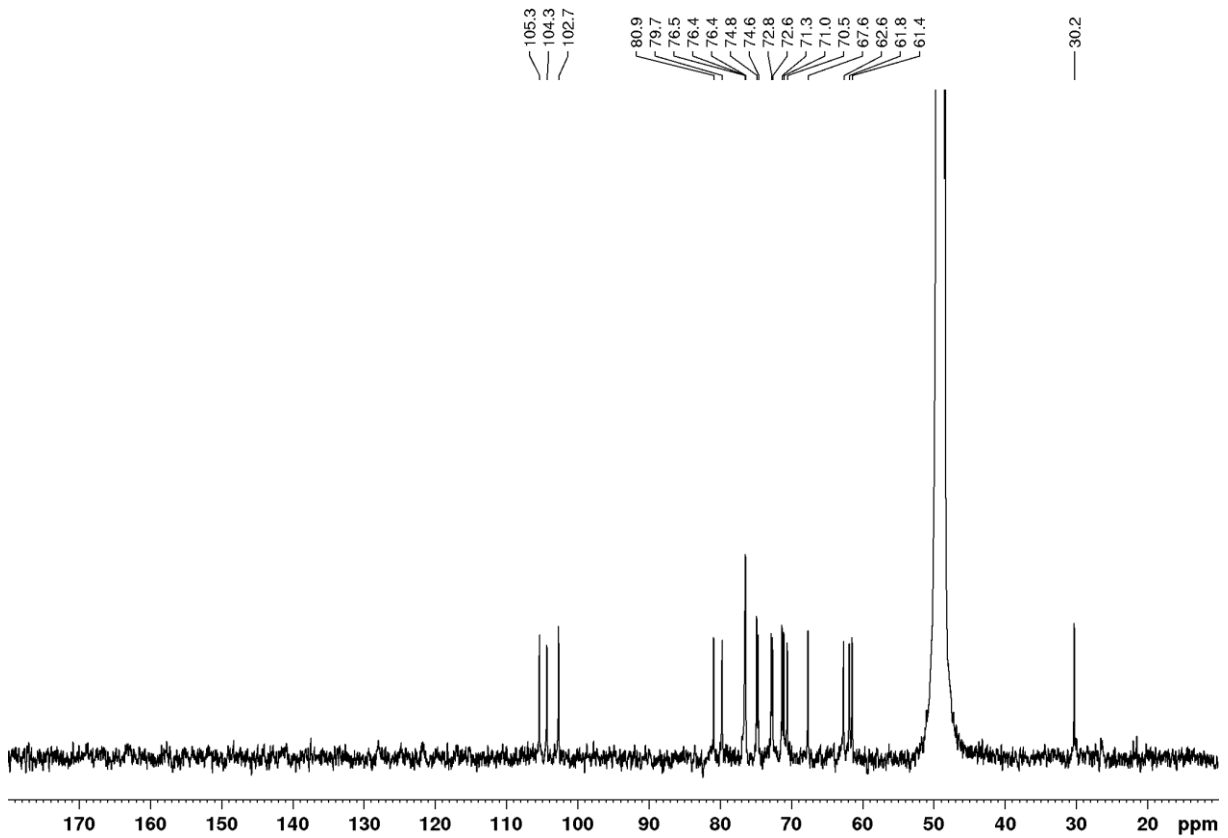


Abbildung 99: ^{13}C -NMR-Spektrum (100 MHz, MeOD) von Verbindung 71.

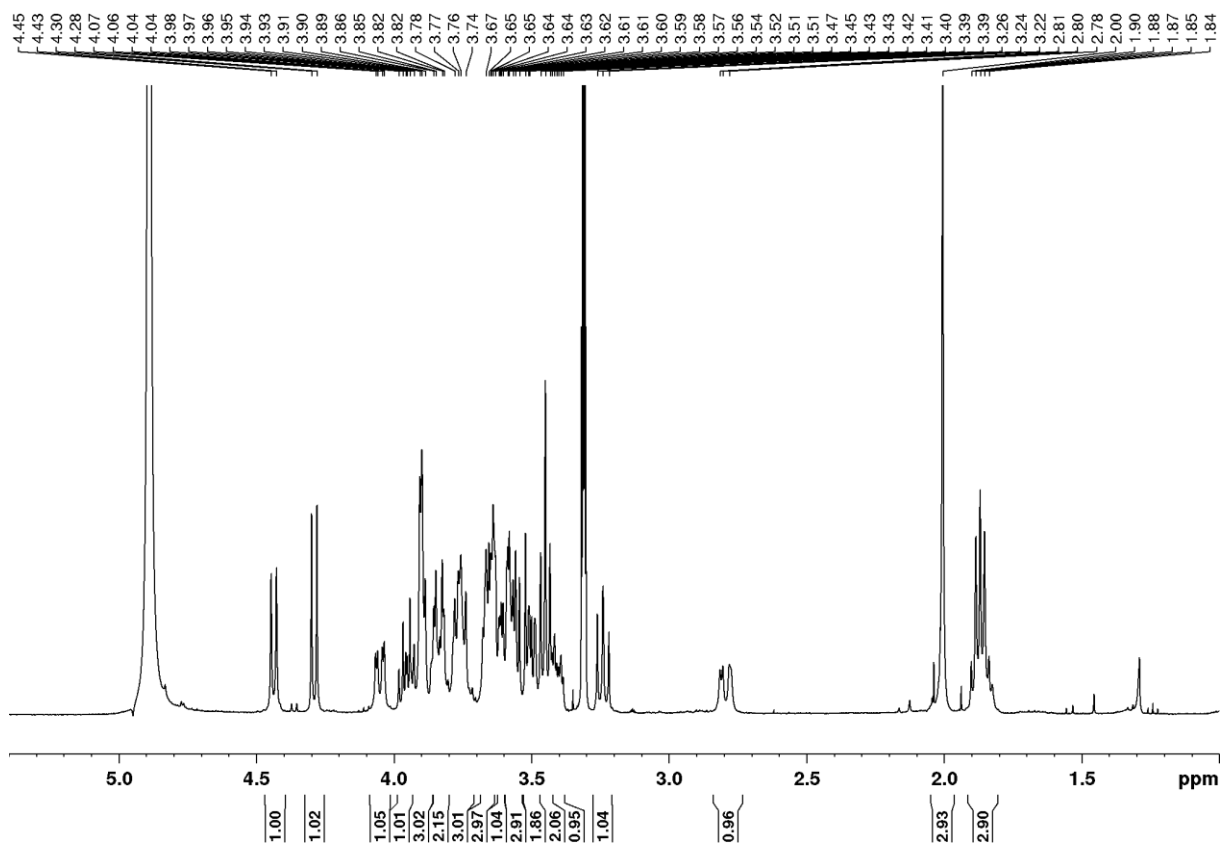


Abbildung 100: ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, MeOD) von Verbindung 72.

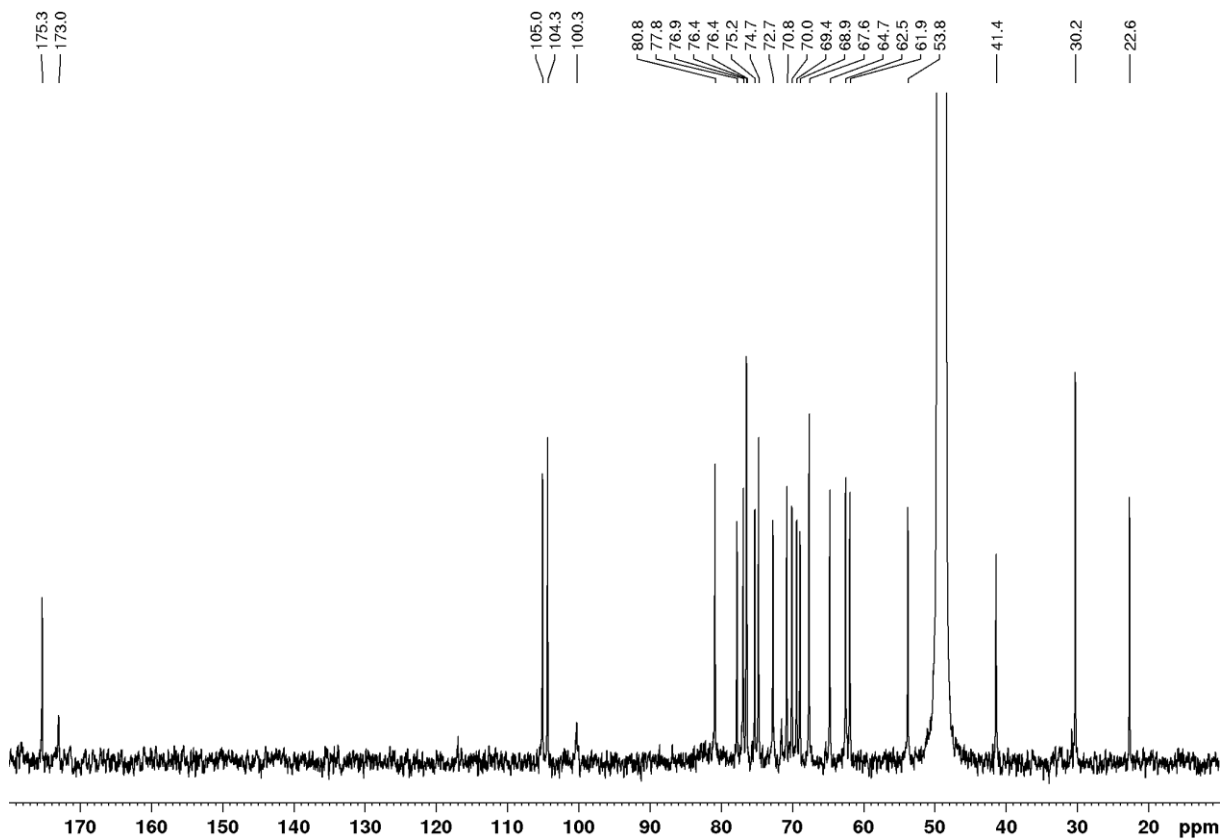


Abbildung 101: ^{13}C -NMR-Spektrum (150 MHz, MeOD) von Verbindung 72.

ITC-Messungen

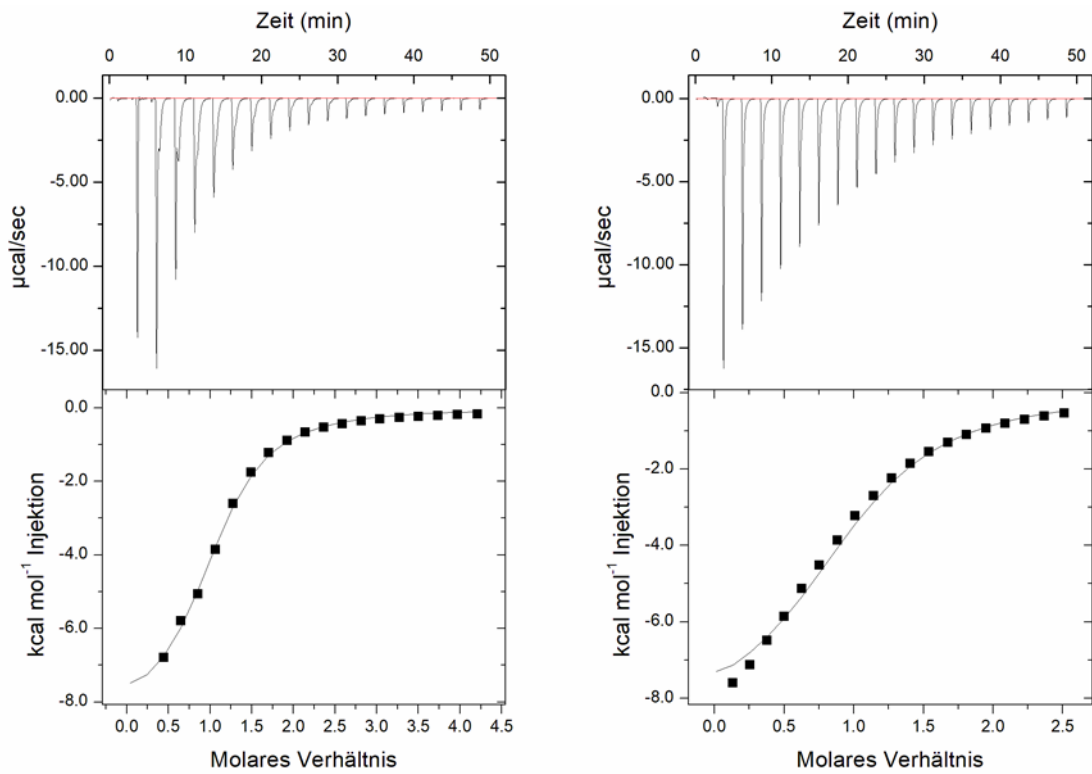


Abbildung 102: ITC-Diagramm von 40 (20.0 mM) und Gal-1 (1.0 mM) und integrierte Wärmeänderung pro Titration und der besten angepassten Kurve.

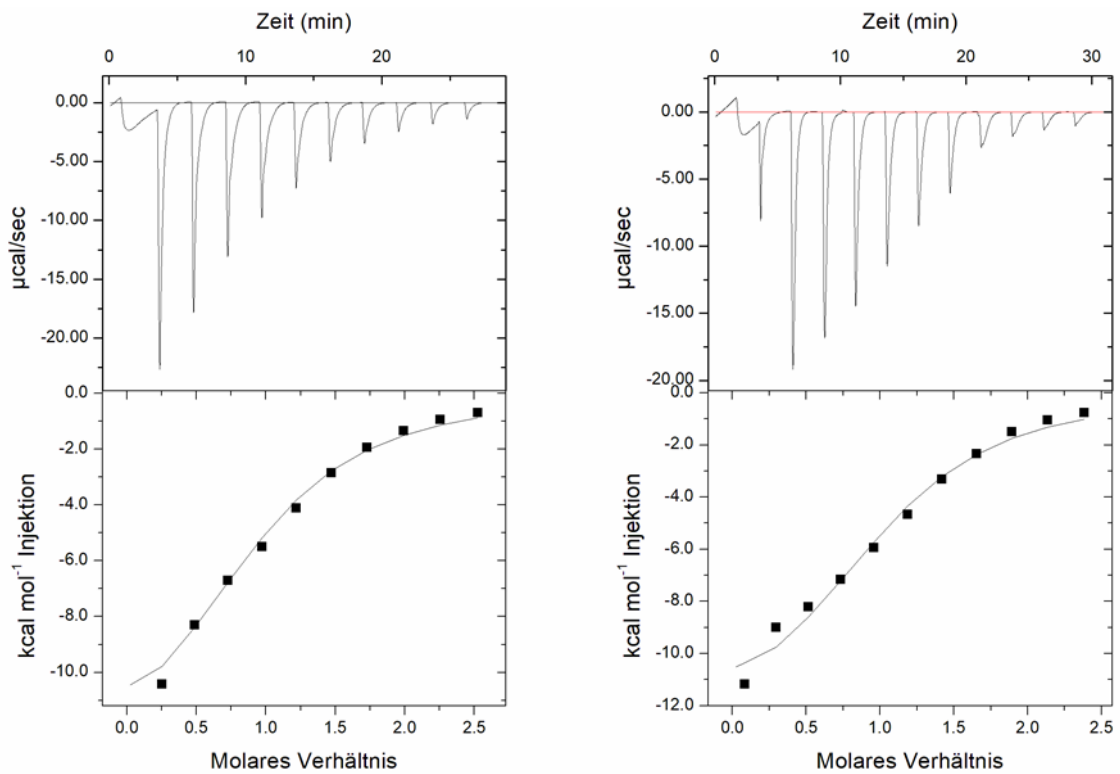


Abbildung 103: ITC-Diagramm von 41 (30.0 mM) und Gal-1 (1.0 mM) und integrierte Wärmeänderung pro Titration und der besten angepassten Kurve.

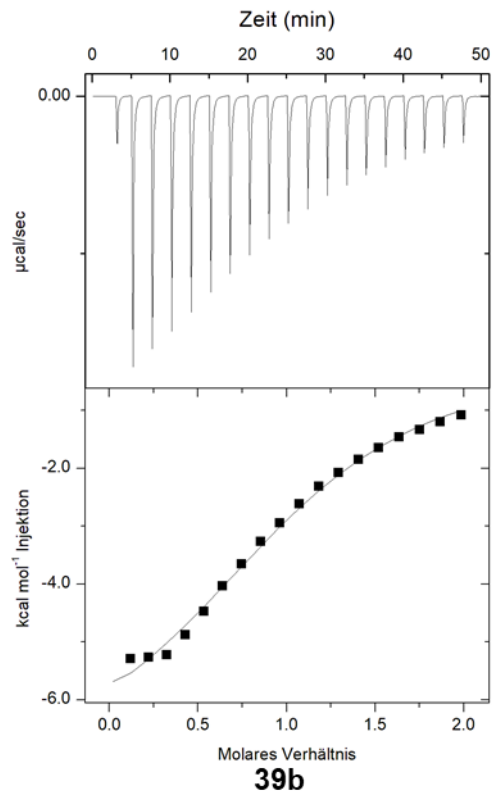
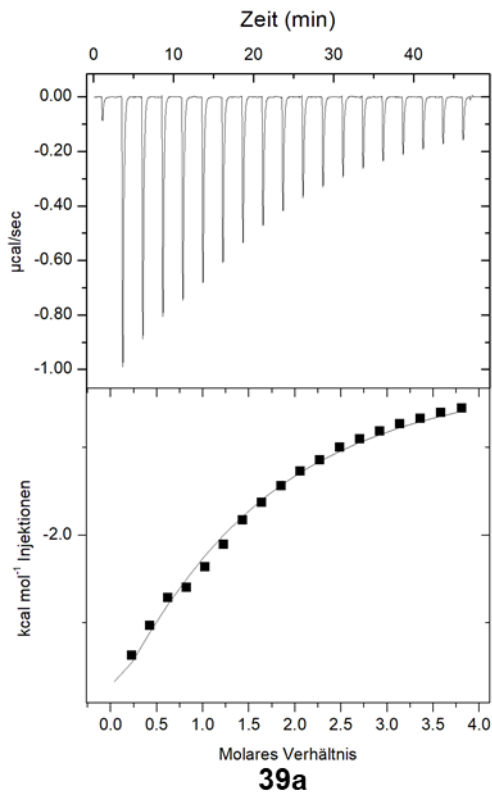


Abbildung 104: ITC-Diagramm von **39a** & **39b** (20.0 mM) und Gal-1 (1.0 mM) und integrierte Wärmeänderung pro Titration und der besten angepassten Kurve.

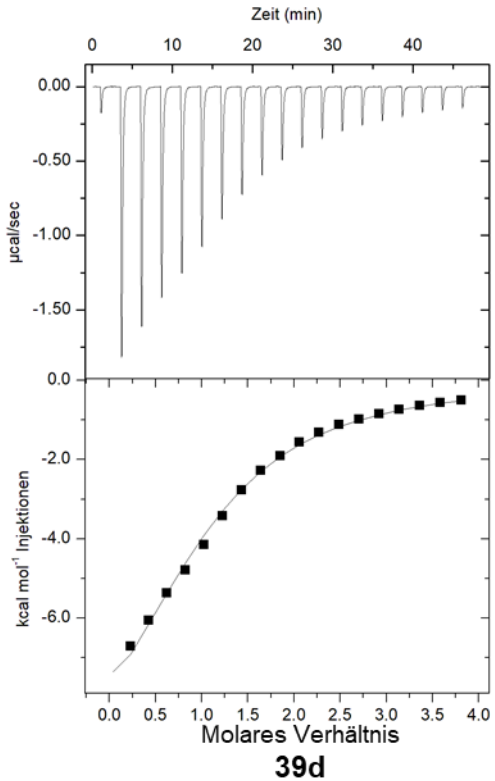
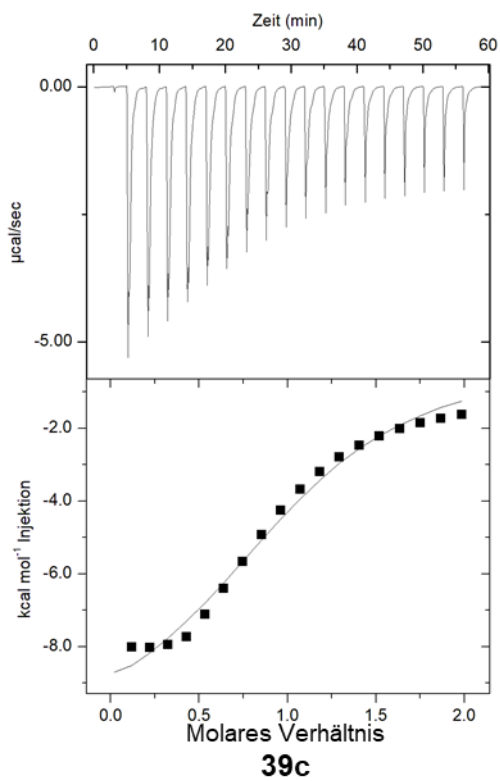


Abbildung 105: ITC-Diagramm von **39c** & **39d** (20.0 mM) und Gal-1 (1.0 mM) und integrierte Wärmeänderung pro Titration und der besten angepassten Kurve.

9. Anhang

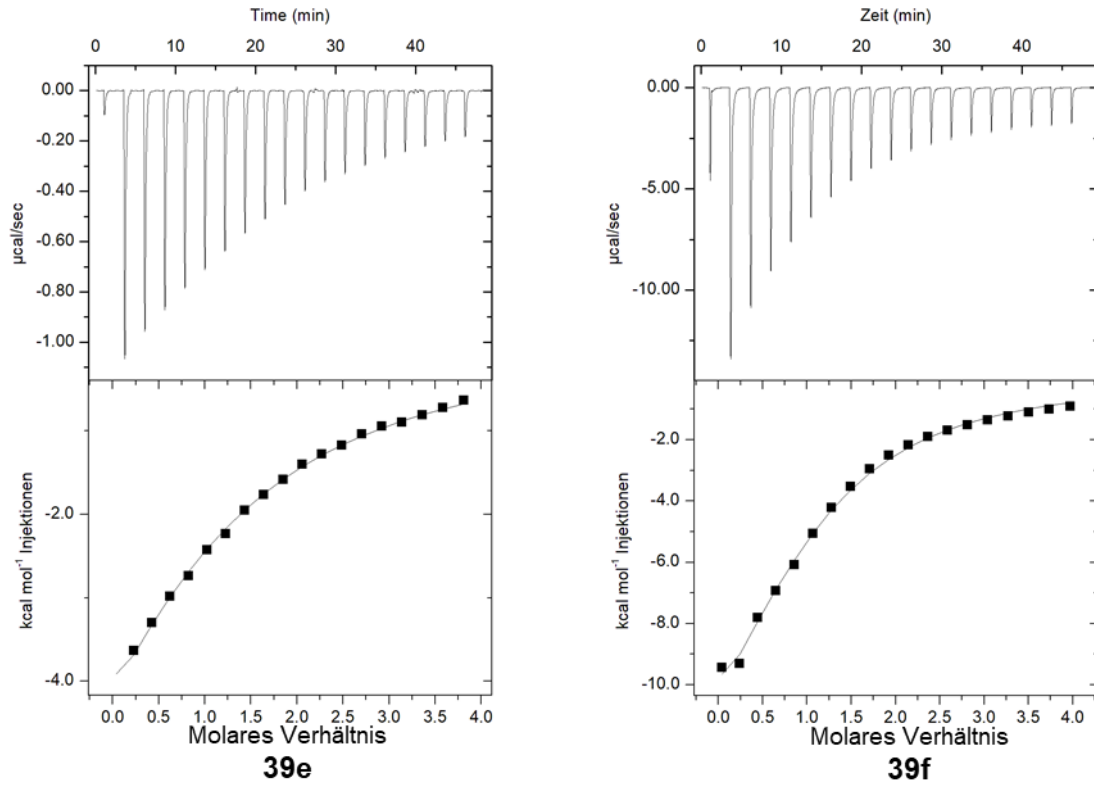


Abbildung 106: ITC-Diagramm von **39e** & **39f** (20.0 mM) und Gal-1 (1.0 mM) und integrierte Wärmeänderung pro Titration und der besten angepassten Kurve.

Kristalldaten

Tabelle 6: Kristalldaten und Verfeinerungsstatistik von Verbindung **41** in Gal-1.

Wavelength	0.97626 Å
Resolution range	40.41 - 1.53 (1.585 - 1.53)
Space group	P 21 21 21
Unit cell	43.388 58.153 110.901 90 90 90
Total reflections	554689 (56330)
Unique reflections	42854 (4193)
Multiplicity	12.9 (13.4)
Completeness (%)	99.15 (98.10)
Mean I/sigma(I)	14.63 (2.94)
Wilson B-factor	17.55
R-merge	0.1164 (1.786)
R-meas	0.1215 (1.857)
R-pim	0.03416 (0.5032)
CC1/2	0.998 (0.921)
CC*	0.999 (0.979)
Reflections used in refinement	42821 (4178)
Reflections used for R-free	2027 (212)
R-work	0.1809 (0.2548)
R-free	0.2073 (0.3063)
CC(work)	0.964 (0.929)
CC(free)	0.950 (0.854)
Number of non-hydrogen atoms	2440
macromolecules	2189
ligands	160
solvent	168

9. Anhang

Protein residues	266
RMS(bonds)	0.012
RMS(angles)	1.17
Ramachandran favored (%)	95.55
Ramachandran allowed (%)	4.45
Ramachandran outliers (%)	0.00
Rotamer outliers (%)	0.43
Clashscore	5.40
Average B-factor	34.86
macromolecules	33.45
ligands	52.59
solvent	44.44

Tabelle 7: Kristalldaten und Verfeinerungsstatistik von Verbindung **40** in Gal-1.

Wavelength	0.97626 Å
Resolution range	40.3 - 1.233 (1.277 - 1.233)
Space group	P 21 21 21
Unit cell	43.246 58.306 111.555 90 90 90
Total reflections	1012618 (46384)
Unique reflections	80915 (6953)
Multiplicity	12.5 (6.7)
Completeness (%)	98.57 (86.13)
Mean I/sigma(I)	22.55 (2.16)
Wilson B-factor	15.88
R-merge	0.0609 (0.7591)
R-meas	0.06353 (0.8247)
R-pim	0.01782 (0.305)

CC1/2	0.997 (0.83)
CC*	0.999 (0.952)
Reflections used in refinement	80863 (6949)
Reflections used for R-free	2000 (172)
R-work	0.2013 (0.3383)
R-free	0.2263 (0.3122)
CC(work)	0.968 (0.867)
CC(free)	0.949 (0.884)
Number of non-hydrogen atoms	2515
macromolecules	2192
ligands	165
solvent	238
Protein residues	266
RMS(bonds)	0.012
RMS(angles)	1.39
Ramachandran favored (%)	95.95
Ramachandran allowed (%)	3.64
Ramachandran outliers (%)	0.40
Rotamer outliers (%)	0.00
Clashscore	5.17
Average B-factor	25.48
macromolecules	23.49
ligands	48.96
solvent	35.45

9. Anhang

Liste der markierten Proteine durch die *glycoproteomics* (Kapitel 4.1.3)

Tabelle 8: Markierte Glycoproteine durch *metabolic glycoengineering* an hMSC-TERT mit SiaNAI **8a** und/oder durch Ac₄ManNAI **12a**. Yes = wurde in der jeweiligen Fraktion markiert; X = wurde in der jeweiligen Fraktion **nicht** markiert.

UniProt-ID	Proteinname	SiaNAI	ManNAI
O75369	FLNB_HUMAN Filamin-B	yes	X
Q9Y6N5	SQOR_HUMAN Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial	yes	X
P62249	RS16_HUMAN 40S ribosomal protein S16	yes	X
P49588	SYAC_HUMAN Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic	yes	X
P08754	GNAI3_HUMAN Guanine nucleotide-binding protein G(k) subunit alpha	yes	X
P61019	RAB2A_HUMAN Ras-related protein Rab-2A	yes	X
Q02413	DSG1_HUMAN Desmoglein-1	yes	X
Q96AG4	LRC59_HUMAN Leucine-rich repeat-containing protein 59	yes	X
P49411	EFTU_HUMAN Elongation factor Tu, mitochondrial	yes	X
P14923	PLAK_HUMAN Junction plakoglobin	yes	X
P48735	IDHP_HUMAN Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	yes	X
P33176	KINH_HUMAN Kinesin-1 heavy chain	yes	X
O15143	ARC1B_HUMAN Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B	yes	X
Q96CW1	AP2M1_HUMAN AP-2 complex subunit mu	yes	X
Q9NSD9	SYFB_HUMAN Phenylalanine--tRNA ligase beta subunit	yes	X
P48147	PPCE_HUMAN Prolyl endopeptidase	yes	X
P14868	SYDC_HUMAN Aspartate--tRNA ligase, cytoplasmic	yes	X
P48047	ATPO_HUMAN ATP synthase subunit O, mitochondrial	yes	X
P41250	GARS_HUMAN Glycine--tRNA ligase	yes	X
Q9UMS4	PRP19_HUMAN Pre-mRNA-processing factor 19	yes	X
P13797	PLST_HUMAN Plastin-3	yes	X
Q9Y4L1	HYOU1_HUMAN Hypoxia up-regulated protein 1	yes	X
Q9NZN3	EHD3_HUMAN EH domain-containing protein 3	yes	X
Q04695	K1C17_HUMAN Keratin, type I cytoskeletal 17	yes	X
P04259	K2C6B_HUMAN Keratin, type II cytoskeletal 6B	yes	X
P68363	TBA1B_HUMAN Tubulin alpha-1B chain	X	yes
Q9Y696	CLIC4_HUMAN Chloride intracellular channel protein 4	X	yes
P17096	HMGA1_HUMAN High mobility group protein HMG-I/HMG-Y	X	yes
P49327	FAS_HUMAN Fatty acid synthase	X	yes
P12110	CO6A2_HUMAN Collagen alpha-2(VI) chain	X	yes
P49773	HINT1_HUMAN Histidine triad nucleotide-binding protein 1	X	yes
O60506	HNRPQ_HUMAN Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	X	yes

Q00325	MPCP_HUMAN Phosphate carrier protein, mitochondrial	X	yes
P62820	RAB1A_HUMAN Ras-related protein Rab-1A	X	yes
P62491	RB11A_HUMAN Ras-related protein Rab-11A	X	yes
P15144	AMPN_HUMAN Aminopeptidase N	X	yes
P63010	AP2B1_HUMAN AP-2 complex subunit beta	X	yes
P04080	CYTB_HUMAN Cystatin-B	X	yes
P30085	KCY_HUMAN UMP-CMP kinase	X	yes
P11216	PYGB_HUMAN Glycogen phosphorylase, brain form	X	yes
P78371	TCPB_HUMAN T-complex protein 1 subunit beta	X	yes
P10599	THIO_HUMAN Thioredoxin	X	yes
P35237	SPB6_HUMAN Serpin B6	X	yes
Q16881	TRXR1_HUMAN Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic	X	yes
Q93008	USP9X_HUMAN Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase FAF-X	X	yes
Q14103	HNRPD_HUMAN Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	X	yes
Q8NBS9	TXND5_HUMAN Thioredoxin domain-containing protein 5	X	yes
Q13011	ECH1_HUMAN Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial	X	yes
P14866	HNRPL_HUMAN Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	X	yes
O15371	EIF3D_HUMAN Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D	X	yes
P62888	RL30_HUMAN 60S ribosomal protein L30	X	yes
Q9H223	EHD4_HUMAN EH domain-containing protein 4	X	yes
P62701	RS4X_HUMAN 40S ribosomal protein S4, X isoform	X	yes
P30043	BLVRB_HUMAN Flavin reductase (NADPH)	X	yes
Q7Z6Z7	HUWE1_HUMAN E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1	X	yes
P60900	PSA6_HUMAN Proteasome subunit alpha type-6	X	yes
P53680	AP2S1_HUMAN AP-2 complex subunit sigma	X	yes
Q15366	PCBP2_HUMAN Poly(rC)-binding protein 2	X	yes
P35637	FUS_HUMAN RNA-binding protein FUS	X	yes
Q99729	ROAA_HUMAN Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	X	yes
P62244	RS15A_HUMAN 40S ribosomal protein S15a	X	yes
P24752	THIL_HUMAN Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	X	yes
O75396	SC22B_HUMAN Vesicle-trafficking protein SEC22b	X	yes
Q96L21	RL10L_HUMAN 60S ribosomal protein L10-like	X	yes
O14980	XPO1_HUMAN Exportin-1	X	yes
P27348	1433T_HUMAN 14-3-3 protein theta	X	yes
P52565	GDIR1_HUMAN Rho GDP-dissociation inhibitor 1	X	yes
O95168	NDUB4_HUMAN NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 4	X	yes

9. Anhang

O00203	AP3B1_HUMAN AP-3 complex subunit beta-1	X	yes
P07858	CATB_HUMAN Cathepsin B	X	yes
P42166	LAP2A_HUMAN Lamina-associated polypeptide 2, isoform alpha	X	yes
P36871	PGM1_HUMAN Phosphoglucomutase-1	X	yes
P19367	HXK1_HUMAN Hexokinase-1	X	yes
Q04446	GLGB_HUMAN 1,4-alpha-glucan-branching enzyme	X	yes
P43243	MATR3_HUMAN Matrin-3	X	yes
Q9UL46	PSME2_HUMAN Proteasome activator complex subunit 2	X	yes
P30520	PURA2_HUMAN Adenylosuccinate synthetase isozyme 2	X	yes
P49207	RL34_HUMAN 60S ribosomal protein L34	X	yes
P10768	ESTD_HUMAN S-formylglutathione hydrolase	X	yes
O75643	U520_HUMAN U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase	X	yes
Q9BUT1	BDH2_HUMAN 3-hydroxybutyrate dehydrogenase type 2	X	yes
P55884	EIF3B_HUMAN Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B	X	yes
P55060	XPO2_HUMAN Exportin-2	X	yes
Q8TF72	SHRM3_HUMAN Protein Shroom3	X	yes
P62910	RL32_HUMAN 60S ribosomal protein L32	X	yes
P62753	RS6_HUMAN 40S ribosomal protein S6	X	yes
O43683	BUB1_HUMAN Mitotic checkpoint serine/threonine-protein kinase BUB1	X	yes
Q13630	FCL_HUMAN GDP-L-fucose synthase	X	yes
P62987	RL40_HUMAN Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	X	yes
P22392	NDKB_HUMAN Nucleoside diphosphate kinase B	yes	yes
Q9Y617	SERC_HUMAN Phosphoserine aminotransferase	yes	yes
P36578	RL4_HUMAN 60S ribosomal protein L4	yes	yes
Q9NQC3	RTN4_HUMAN Reticulon-4	yes	yes
P17987	TCPA_HUMAN T-complex protein 1 subunit alpha	yes	yes
P06744	G6PI_HUMAN Glucose-6-phosphate isomerase	yes	yes
P50395	GDIB_HUMAN Rab GDP dissociation inhibitor beta	yes	yes
P52209	6PGD_HUMAN 6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	yes	yes
P04844	RPN2_HUMAN Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2	yes	yes
Q16851	UGPA_HUMAN UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	yes	yes
Q16658	FSCN1_HUMAN Fascin	yes	yes
O15144	ARPC2_HUMAN Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	yes	yes
P46776	RL27A_HUMAN 60S ribosomal protein L27a	yes	yes

P05556	ITB1_HUMAN Integrin beta-1	yes	yes
P18085	ARF4_HUMAN ADP-ribosylation factor 4	yes	yes
P31153	METK2_HUMAN S-adenosylmethionine synthase isoform type-2	yes	yes
P78417	GSTO1_HUMAN Glutathione S-transferase omega-1	yes	yes
Q969H8	MYDGF_HUMAN Myeloid-derived growth factor	yes	yes
P61160	ARP2_HUMAN Actin-related protein 2	yes	yes
O00154	BACH_HUMAN Cytosolic acyl coenzyme A thioester hydrolase	yes	yes
P53621	COPA_HUMAN Coatomer subunit alpha	yes	yes
Q5SSJ5	HP1B3_HUMAN Heterochromatin protein 1-binding protein 3	yes	yes
P61247	RS3A_HUMAN 40S ribosomal protein S3a	yes	yes
P51659	DHB4_HUMAN Peroxisomal multifunctional enzyme type 2	yes	yes
P47756	CAPZB_HUMAN F-actin-capping protein subunit beta	yes	yes
P47755	CAZA2_HUMAN F-actin-capping protein subunit alpha-2	yes	yes
P62269	RS18_HUMAN 40S ribosomal protein S18	yes	yes
P46781	RS9_HUMAN 40S ribosomal protein S9	yes	yes
P15924	DESP_HUMAN Desmoplakin	yes	yes
P50991	TCPD_HUMAN T-complex protein 1 subunit delta	yes	yes

Publikationsliste

Jürgen Mut, Stephan Altmann, Sabine Reising, Jutta Meißner-Weigl, Marc D. Driessen, Regina Ebert, Jürgen Seibel, *Manuskript in Bearbeitung*

S. Altmann, J. Mut, N. Wolf, J. Meißner-Weigl, M. Rudert, F. Jakob, M. Gutmann, T. Lühmann, J. Seibel, R. Ebert, *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, 22, 2820.

F. Pinzner, T. Keller, J. Mut, J. Bechold, J. Seibel, J. Groll, *Sensors* **2021**, 21, 3153.

M. E. Ortiz-Soto, J. Ertl, J. Mut, J. Adelman, T. A. Le, J. Shan, J. Teßmar, A. Schlosser, B. Engels, J. Seibel, *Chemical Science* **2018**, 9, 5312.

Affidavit

I hereby confirm that my thesis –Synthesis of human saccharide analogues for the investigation and modification of membrane surfaces of human mesenchymal stem cells– is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and/or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Würzburg, 27.02.2023

Signature

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation –Synthese von humanen Saccharid-Analoga zur Untersuchung und Modifikation Membranoberflächen von humanen mesenchymalen Stammzellen– eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg, 27.02.2023

Unterschrift

