

Synthese und Anwendung von Kohlenhydrat-Fängerverbindungen zur selektiven Isolierung von Lektinen und Adhäsion von Zellen

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der RWTH
Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Master of Science
Sebastian Lowins

aus Viersen

Berichter: Universitätsprofessor Dr. Elmar Weinhold
Universitätsprofessor Dr. Markus Albrecht

Tag der mündlichen Prüfung: 13.10.2016

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Aktuelle Methoden der Proteomforschung	1
1.2. Trifunktionelle <i>Capture Compounds</i>	3
1.3. Aufbau einer <i>Capture Compound</i>	4
1.4. Methoden zum Einfangen von Proteinen mit <i>Capture Compounds</i>	5
1.4.1. <i>OnBead-Capture</i> -Experimente	5
1.4.2. <i>OffBead-Capture</i> -Experimente	6
1.4.3. Unspezifische <i>Capture</i> -Ausbeute (Beifang)	6
1.5. Photochemie der Arylazide	7
1.6. <i>Capture Compounds</i> als Bausteine für biologische Systeme	9
1.7. Galektine und ihre Funktion in der extrazellulären Matrix	11
1.8. NCO-sP(EO-stat-PO)-modifizierte Multititerplatten zur Untersuchung der Adhesion von Galektinen auf Oberflächen	13
1.9. Lektine	13
1.9.1. <i>Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia</i> Lektin-II	14
1.9.2. Weizenkeim-Agglutinin	14
2. Zielsetzung	17
3. Ergebnisse und Diskussion	19
3.1. Aufbau einer artifiziellen extrazellulären Matrix	19
3.1.1. Synthesen	19
3.1.1.1. Photoquervernetzer mit PEG-Linker	19

3.1.1.2.	Photoquervernetzer mit Ethylendiamin-Linker	24
3.1.1.3.	Referenz-Verbindung	26
3.1.2.	Biochemische Untersuchungen der Photoquervernetzer zur kovalenten Bindung von Galektin-3 an eine Oberfläche	30
3.1.2.1.	Untersuchung der synthetisierten Photoquervernetzer auf ihre Bindung an Galektin-3	30
3.1.2.2.	Optimierung der Modifikationskonzentration	32
3.1.2.3.	Optimierung der HSY-Gal3-Konzentration	34
3.1.2.4.	Testweiser Aufbau einer artifiziellen extrazellulären Matrix	35
3.1.2.5.	Entfernung von reversibel gebundenem Galektin-3	36
3.1.2.6.	Kovalente Bindung von Galektin-3	40
3.2.	Selektivitätssteigerung von <i>Capture Compounds</i>	43
3.2.1.	Synthesen	45
3.2.1.1.	Synthese von Referenz-Capture Compound 30	45
3.2.1.2.	Einführen des potentiellen Selbstquenchers	46
3.2.1.3.	Synthese einer bifunktionellen <i>Capture Compound</i>	49
3.2.1.4.	Bifunktionelle Fängerverbindung mit selbstquenchender Funktion	52
3.2.2.	Untersuchung des Beifanges mittels der zuvor dargestellten Fängerverbindungen	55
3.2.2.1.	<i>OffBead-Capture</i> -Experimente	55
3.2.2.2.	Untersuchung der bimolekularen Reaktion als Ursache für unspezifische Ausbeuten	58
3.2.2.3.	<i>OnBead-Capture</i> -Experimente	60
3.2.2.4.	Untersuchung der unvollständigen Verdrängung als Ursache für eine scheinbar unspezifische <i>Capture</i> -Ausbeute. . .	61
3.2.2.5.	Untersuchung einer reversiblen Vorbindung von Protein an die <i>Capture Compound</i>	62
3.2.2.6.	Betrachtung des eingeführten Lysin-Restes als potentieller Selbstquencher	64

4. Zusammenfassung	67
4.1. Aufbau einer artifiziellen extrazellulären Matrix mittels trifunktioneller Photoquervernetzer	67
4.2. Ursachen für unspezifische <i>Capture</i> -Ausbeuten im <i>OffBead</i> -Experiment . . .	68
5. Ausblick	71
5.1. Untersuchung der Effektivität von Photoquervernetzern auf Oberflächen .	71
5.2. Optimierung zukünftiger <i>Capture Compounds</i>	72
6. Experimenteller Teil	73
6.1. Präparative und analytische Methoden	73
6.1.1. Verwendete Lösungsmittel	73
6.1.2. Chemikalien	73
6.1.3. Geräte	76
6.1.3.1. HPLC	76
6.1.4. Reaktionskontrolle	79
6.1.5. Verwendete Puffer	80
6.1.6. NuPage-Zusammensetzung	80
6.1.7. Produktreinigung	81
6.1.7.1. Säulenchromatographie	81
6.1.7.2. Waters SAP-Pack Light C18 Spritzenfilter	81
6.1.8. Angabe von analytischen Daten	82
6.2. Allgemeine Arbeitsanweisungen zu Bindungsstudien mit Galektin-3	82
6.2.1. Modifizierung von Mikrotiterplatten mit NCO-sP(EO- <i>stat</i> -PO) . . .	82
6.2.2. Kovalente Modifizierung von NCO-sP(EO- <i>stat</i> -PO)-beschichteten Mikrotiterplatten mit Fängerverbindungen	83
6.2.3. Immobilisierung von Galektin-3 auf mit Fängerverbindung modifizierten Oberflächen	83
6.2.4. Kovalente Bindung von Galektin-3 an NCO-sP(EO- <i>stat</i> -PO)-modifizierte Mikrotiterplatten	83
6.2.5. Inhibition der Bindung von Galektin-3	83

6.2.6.	Detektion von Galektin-3 auf Oberflächen	84
6.2.6.1.	Detektion mittels Fluoreszenz	84
6.2.6.2.	Detektion mittels ELISA	84
6.3.	Allgemeine Arbeitsanweisungen zu <i>Capture</i> -Experimenten	85
6.3.1.	<i>OffBead-Capture</i> -Experimente	85
6.3.2.	<i>OnBead-Capture</i> -Experimente	86
6.3.3.	Bestimmen der <i>Capture</i> -Ausbeute	86
6.4.	Synthesen	87
6.4.1.	<i>N</i> -Boc-Diaminoethan (24)	87
6.4.2.	<i>N</i> -Boc-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan (4)	88
6.4.3.	<i>p</i> -Azidobenzoesäure (47)	89
6.4.4.	<i>p</i> -Azidobenzoesäure-NHS-ester (3)	90
6.4.5.	Biotin-NHS-Ester (35)	91
6.4.6.	<i>N</i> -Biotin-Lys- <i>N'</i> -Boc-OH (37)	93
6.4.7.	<i>N</i> -Biotin-Lys- <i>N'</i> -Boc-OSu (45)	95
6.4.8.	α -Chlor- <i>N</i> -acetyl-3,4,6-tri- <i>O</i> -acetylglucosamin (22)	96
6.4.9.	<i>N</i> -Acetyl-3,4,6-tri- <i>O</i> -acetylglucosamino- β -isothiocyanat (23)	97
6.4.10.	β - <i>N</i> -Boc-Diaminoethylsulfocarbamido- <i>N</i> -acetyl-3,4,6-tri- <i>O</i> -acetylglucosamin (25)	98
6.4.11.	β - <i>N</i> -Boc-Diaminoethylsulfocarbamido- <i>N</i> -acetylglucosamin (27)	100
6.4.12.	β -Diaminoethylsulfocarbamido- <i>N</i> -acetylglucosamin (13)	101
6.4.13.	β - <i>N</i> -Boc-Diaminoethylsulfocarbamido- <i>N</i> -acetyllactosamin (28)	103
6.4.14.	β -Diaminoethylsulfocarbamido- <i>N</i> -acetyllactosamin (29)	104
6.4.15.	<i>N</i> -(<i>Z</i>)-(<i>S</i>)-Glu(<i>Ot</i> Bu)- <i>N'</i> -(Boc-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan) (7)	105
6.4.16.	H-(<i>S</i>)-Glu(<i>Ot</i> Bu)- <i>N</i> -(Boc-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan) (8)	107
6.4.17.	<i>N</i> -(4-azidobenzamido)-(<i>S</i>)-Glu(<i>Ot</i> Bu)- <i>N'</i> -(Boc-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan) (10)	109
6.4.18.	<i>N</i> -(4-Azidobenzamido)-(<i>S</i>)-Glu- <i>N'</i> -(1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan) (11)	111
6.4.19.	<i>N</i> -(4-Azidobenzamido)-(<i>S</i>)-Glu- <i>N'</i> -Boc-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan (12)	113

6.4.20.	<i>N</i> -(4-Azidobenzamido)-(S)-Glu- (β -diaminoethylsulfocarbamido- <i>N</i> -acetylglucosamino)- <i>N'</i> -Boc-1,13- diamino-4,7,10-trioxatridecan (14)	115
6.4.21.	<i>N</i> -(4-Azidobenzamido)-(S)-Glu- (β -diaminoethylsulfocarbamido- <i>N</i> -acetylglucosamino)- <i>N'</i> -Boc-1,13- diamino-4,7,10-trioxatridecan (15)	117
6.4.22.	<i>N</i> -(4-Azidobenzamido)-(S)-Glu- (β -diaminoethylsulfocarbamido- <i>N</i> -acetylglucosamino)-1,13-diamino- 4,7,10-trioxatridecan (6)	119
6.4.23.	<i>N</i> -(4-Azidobenzamido)-(S)-Glu- (β -diaminoethylsulfocarbamido- <i>N</i> -acetylglucosamino)- <i>N'</i> -1,13- diamino-4,7,10-trioxatridecan (34)	121
6.4.24.	<i>N</i> -(4-Azidobenzamido)-(S)-Glu-(β -diaminoethylsulfocarbamido- <i>N</i> - acetylglucosamino)- <i>N'</i> -biotinyl-1,13-diamino-4,7,10- trioxatridecan (30)	123
6.4.25.	<i>N</i> -Z-(S)-Glu(<i>OT</i> Bu)- <i>N'</i> -Boc-diaminoethan (17)	125
6.4.26.	H-(S)-Glu(<i>OT</i> Bu)- <i>N'</i> -Boc-diaminoethan (50)	126
6.4.27.	<i>N</i> -(4-Azidobenzamido)-(S)-Glu(<i>OT</i> Bu)- <i>N'</i> -Boc-diaminoethan (51)	128
6.4.28.	<i>N</i> -(4-Azidobenzamido)-(S)-Glu(OH)-diaminoethan (19)	130
6.4.29.	<i>N</i> -(4-Azidobenzamido)-(S)-Glu(OH)- <i>N'</i> -Boc-diaminoethan (18)	132
6.4.30.	<i>N</i> -(4-Azidobenzamido)-(S)-Glu-O(β -diaminoethyl-sulfocarbamido- <i>N</i> -acetylglucosamino)- <i>N'</i> -Boc-diaminoethan (52)	134
6.4.31.	<i>N</i> -(4-Azidobenzamido)-(S)-Glu-O(β -diaminoethylsulfocarbamido- <i>N</i> - acetylglucosamino)- <i>N'</i> -Boc-diaminoethan (20)	136
6.4.32.	<i>N</i> -(4-Azidobenzamido)-(S)-Glu-O(β -diaminoethylsulfocarbamido- <i>N</i> - Acetylglucosamino)-diaminoethan (21)	138
6.4.33.	<i>N</i> -(4-Azidobenzamido)-(S)-Glu-O(β -diaminoethylsulfocarbamido- <i>N</i> - acetylglucosamino)- <i>N'</i> - α -biotinyl- <i>N''</i> -Boc-Lysin-1,13-diamino-4,7,10- trioxatridecan (38)	140
6.4.34.	<i>N</i> -(4-Azidobenzamido)-(S)-Glu-O(β -diaminoethylsulfocarbamido- <i>N</i> - acetylglucosamino)- <i>N'</i> - α -biotinyl-H-Lysin-1,13- diamino-4,7,10-trioxatridecan (31)	142

6.4.35. <i>N</i> -Z-Gly- <i>N'</i> -Boc-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan (40)	144
6.4.36. H-Gly- <i>N'</i> -Boc-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan (41)	145
6.4.37. <i>N</i> -(4-Azidobenzamido)-Gly- <i>N'</i> -Boc-1,13-diamino- 4,7,10-trioxatridecan (42)	147
6.4.38. <i>N</i> -(4-Azidobenzamido)-Gly- <i>N'</i> -1,13-diamino- 4,7,10-trioxatridecan (43)	148
6.4.39. <i>N</i> -(4-Azidobenzamido)-Gly- <i>N'</i> -biotinyl-1,13-diamino- 4,7,10-trioxatridecan (43)	150
6.4.40. <i>N</i> -(4-Azidobenzamido)-Gly- <i>N'</i> - α -biotinyl- <i>N''</i> -Boc-Lysin-1,13-diamino- 4,7,10-trioxatridecan (44)	152
6.4.41. <i>N</i> -(4-Azidobenzamido)-Gly- <i>N'</i> - α -biotinyl-H-Lysin-1,13-diamino-4,7,10- trioxatridecan (33)	154
Abkürzungsverzeichnis	157
Literaturverzeichnis	159
Anhang	167
A. Danksagung	169
B. Spektren	173
Lebenslauf	253

1. Einleitung

Entsprechend des Genoms, welches die Gesamtheit aller Gene in einem Organismus beschreibt, bezeichnet das Proteom die Gesamtheit aller Proteine innerhalb eines Organismus. Hierbei existiert für jeden Organismus nur ein Genom, das Proteom kann sich jedoch abhängig von äußerlichen Einflüssen und unterschiedlichen Zell- und Gewebetypen innerhalb des betrachteten Organismus unterscheiden.^[1] Während die Genomanalyse mit der vollständigen Entschlüsselung des menschlichen Genoms im Jahre 2001 durch die Firma Celera Genomics zeitgleich mit dem Human Genom Projekt einen Höhepunkt hatte, steht die vollständige Erforschung des Proteoms noch am Anfang.^[2,3] Im Gegensatz zu den ca. 25.000 Genen des Genoms sind für das Proteom ca. 100.000 Proteine in rund 200 verschiedenen Zell- und Gewebetypen zu isolieren und zu untersuchen, wobei erschwerend hinzu kommt, dass die Expression der Proteine oft von äußeren Faktoren abhängt.^[4]

1.1. Aktuelle Methoden der Proteomforschung

Das Ziel der Proteomforschung ist das Vorhandensein von bekannten und unbekannten Proteinen, deren Konzentration und Wechselwirkung miteinander und mit anderen Zellen oder Organismen zu untersuchen. Hierzu haben sich in den letzten Jahren verschiedene Methoden und Verfahren etabliert, welche mit fortschreitender Entwicklung einen zunehmend spezifischeren Nachweis von Proteinen in unbekannten Proteinlösungen bei gleichzeitig stetig sinkender Nachweisgrenze ermöglichen. So wurde bereits in den Jahren 1968 - 1969 unabhängig voneinander von *Margolis* und *Kenrick*, *Dale* und *Latner* sowie *Macko* und *Stegemann* das Protein-Mapping entwickelt.^[5-8] Hierbei werden Proteine zunächst nach ihrer Ladung und anschließend nach ihrem Molekulargewicht getrennt.^[5]

Probleme hierbei sind jedoch unter anderem die Löslichkeit vieler Proteine, sodass diese teilweise ausfallen und der Analyse nicht mehr zur Verfügung stehen. Weiterhin wird für die Gelelektrophorese und das anschließende Färben des Geles verhältnismäßig viel Substanz benötigt, sodass gering konzentrierte Proteine nicht erkannt werden. Darüber hinaus verhalten sich Proteine mit ähnlicher Größe und vergleichbaren Eigenschaften während der Gelelektrophorese sehr ähnlich, sodass ihre Trennung und damit Einzelanalyse sehr schwierig wird. Das Protein-Mapping erlaubt somit eine Reduktion der Komplexität von Proteinlösungen anhand Größe und elektrischer Eigenschaften, nicht jedoch ihre vollständige Analyse.^[5] Weitere Analysemethoden für Proteine stellen die Affinitätschromatographie und Microarrays zur Verfügung. Hierzu werden Selektivitätsfunktionen, wie z.B. Substrate oder Liganden auf Festphasen immobilisiert, mit der Proteinlösung überspült und so die Proteine nach ihrer Funktion aufgetrennt. Die Proteine binden spezifisch an die Festphase und stehen für weitere Untersuchungen zur Verfügung. Da die Eigenschaften der Proteine im Vorfeld jedoch nicht bekannt sind, bleiben aufgrund unzureichender Löslichkeit und unbekannter Spezifität oder unzureichender Bindungsstärke zwischen Protein und Selektivitätsfunktion viele Proteine unentdeckt. Gleichzeitig kann es durch unspezifische Wechselwirkungen mit der Oberfläche zu falsch-positiven Signalen kommen, sodass das Ergebnis verfälscht wird.^[4] Mit der Entwicklung der MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation*)^[9] und ESI (Elektrospray-Ionisation)-Massenspektrometrie^[10] Ende der 1980er Jahre wurden Proteine erstmals für die instrumentelle Analytik zugänglich. Während die Analyse von Proteinen hierbei zunächst auf reine Massendetektion beschränkt war, wurden bis heute zahlreiche Verfahren entwickelt um Proteine durch verschiedene Techniken immer besser nachweisen zu können. Hierzu gehören unter anderem die HPLC-MS, wobei der eigentlichen massenspektrometrischen Analyse eine HPLC (*High Performance Liquid Chromatographie*) zur Auftrennung der Proteinprobe vorgeschaltet wird, ICAT-MS (*isotope-coded affinity tag*)^[11] und iTRAQ (*isobaric tags for relative and absolute quantitation*)-MS^[12] bei welchen die Proteine auf enzymatischem Weg fragmentiert und anschließend chemisch markiert werden um so eine noch höhere Aussagekraft über die analysierten Strukturen zu erhalten. Um die Probleme der vorgestellten Methoden zur Erforschung des Proteoms zu umgehen, wurde unter anderem von Cravatt *et al.* die sogenannte aktivitätsbasierte Protein-Profilierung (activity-based protein profiling, ABPP) entwickelt.^[13,14] Hierbei werden kleine synthetische Moleküle dargestellt,

welche in Lösung an das Zielprotein binden und über eine im Molekül vorhandene Reportergruppe (Sortierfunktion, i.d.R. Biotin oder ein Fluorophor) detektiert werden können. So nutzten *Cravatt et al.* an Biotin bzw. Fluorescein gekoppelte Fluorophosphonate um Serinhydrolasen in unbehandeltem Zellextrakt nachzuweisen.^[13] Wichtig ist hierbei, dass die sogenannte Selektivitätsfunktion, welche an das aktive Zentrum des Proteins bindet, so modifiziert ist, dass sie eine kovalente, irreversible Bindung an das Protein erlaubt (Reaktivitätsfunktion). Obwohl durch diese Form der Analyse viele Proteine hoch selektiv zu untersuchen sind, hat diese Methode den Nachteil, dass durch die Zusammenlegung von Selektivitäts- und Reaktivitätsfunktion, welche ein Analogon für das natürliche Substrat des untersuchten Proteins darstellt, diese Moleküle für jedes zu untersuchende Protein bzw. zu untersuchende Proteinklasse komplett neu entworfen und synthetisiert werden mussten.^[4] Einen anderen Weg mit dem selben Ziel der Erforschung des Proteoms verfolgten *Hatanaka et al.* in den 90er Jahren mit der Entwicklung der affinitätsbasierten Protein-Profilierung (affinity-based protein profiling, AfBPP) unter Verwendung von trifunktionellen *Capture Compounds*.^[15] Hierbei sind Selektivitäts- und Reaktivitätsfunktion räumlich voneinander getrennt, sodass sie sich einzeln auf das jeweilige Problem optimieren lassen.

1.2. Trifunktionelle *Capture Compounds*

1995 veröffentlichten *Hatanaka et al.* die Synthese eines trifunktionellen Moleküls zur Untersuchung der Glykosyltransferase GM3-Synthetase. Diese erste trifunktionelle *Capture Compound* bestand aus einem Laktose-Derivat, Biotin und einem Phenyl diazirin als photoaktivierbarem Quervernetzer.^[15] Seit dieser Entwicklung wurde mit trifunktionellen *Capture Compounds* eine Vielzahl von Proteinen untersucht und entdeckt. Hierzu zählen unter anderem die Isolierung von Glykosyltransferasen mittels *N*-Acetyllactosaminen durch *Hatanaka et al.*^{[16][17][18]}, die Isolierung von Lektinen durch *Pieters et al.*,^[19–21] sowie viele weitere Beispiele.^[22,23]

1.3. Aufbau einer *Capture Compound*

Capture Compounds sind meist kleine synthetische Moleküle, welche aus drei verschiedenen Reaktivitätsgruppen bestehen. Die Selektivitätsfunktion bindet nicht-kovalent, reversibel und spezifisch an das Zielprotein. Die Reaktivitätsfunktion führt durch Aktivierung mit UV-Licht zu einer kovalenten, irreversiblen Bindung an das Zielprotein, während die Sortierfunktion die Isolierung des *Capture Compound*-Protein-Konjugats ermöglicht. Die drei Funktionen sind mit oft hydrophilen Linkern verbunden, die in der Regel für eine bessere Löslichkeit im wässrigen Zielmedium sorgen.^[4] Abbildung 1 zeigt eine im Arbeitskreis Weinhold bereits erfolgreich verwendete *Capture Compound* zur selektiven Isolierung von Lektinen.^[4] Die Verbindung trägt als Selektivitätsfunktion (blau) einen GlcNAc-Rest zur selektiven, reversiblen Bindung an Lektine. Die Reaktivitätsfunktion (rot) besteht aus einem aromatischen Azid, welches durch UV-Licht angeregt wird und eine kovalente Bindung zum gebundenen Protein eingeht. Die Isolierung des *Capture Compound*-Protein-Konjugats erfolgt anschließend mit Hilfe der Sortierfunktion (grün), welche hier durch Biotin repräsentiert wird. Letzteres bindet an mit Streptavidin beschichtete, magnetische Partikel, was ein einfaches Isolieren aus dem Reaktionsmedium erlaubt.

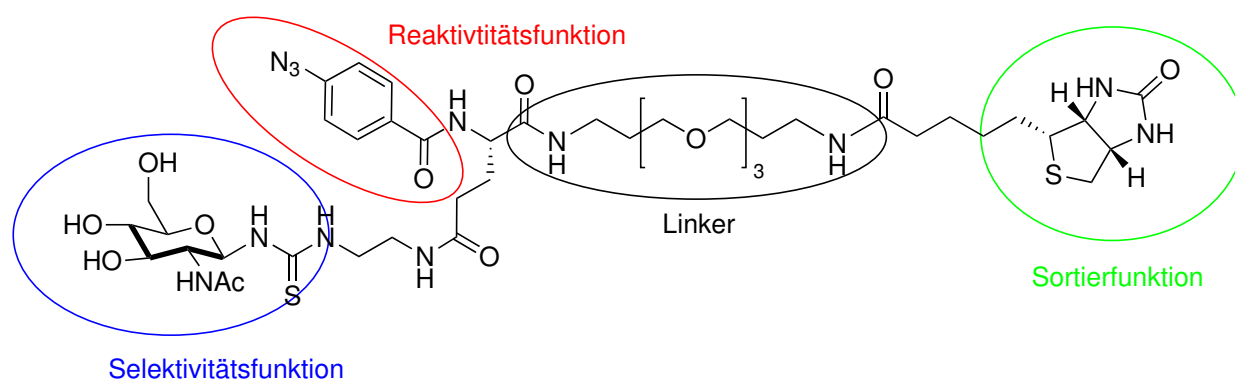


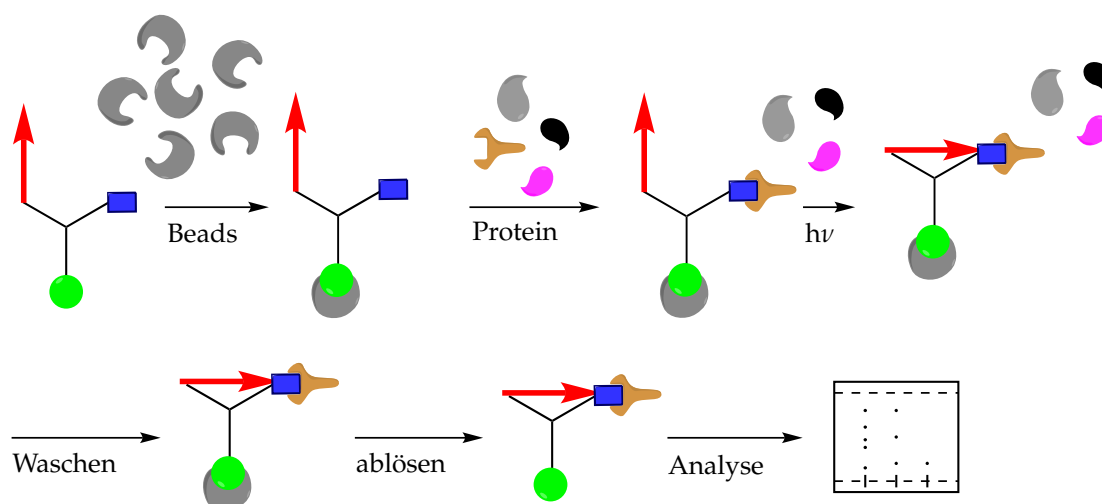
ABBILDUNG 1. In dieser Arbeit verwendete *Capture Compound*.

1.4. Methoden zum Einfangen von Proteinen mit *Capture Compounds*

Für das Einfangen von Proteinen mittels trifunktionellen *Capture Compounds* stehen zwei verschiedene Methoden zur Verfügung, welche im Folgenden kurz erklärt werden.

1.4.1. *OnBead-Capture-Experimente*

Bei der *OnBead*-Methode wird die *Capture Compound* zunächst auf die magnetischen Partikel aufgebracht und die *Capture Beads* anschließend der Proteinlösung zugesetzt und inkubiert. Hierbei geht die Selektivitätsfunktion zunächst eine reversible Vorbindung zum Zielprotein ein, welche im Anschluss durch Bestrahlen mit UV-Licht und der daraus resultierenden Aktivierung des photochemischen Quervernetzlers kovalent fixiert wird. Die Isolierung gefangener Proteine erfolgt durch Separieren der magnetischen Partikel, waschen mit verschiedenen Pufferlösungen, ablösen der Proteine von den Partikeln und anschließende Analyse mittels SDS-PAGE oder Massenspektrometrie.^[24]

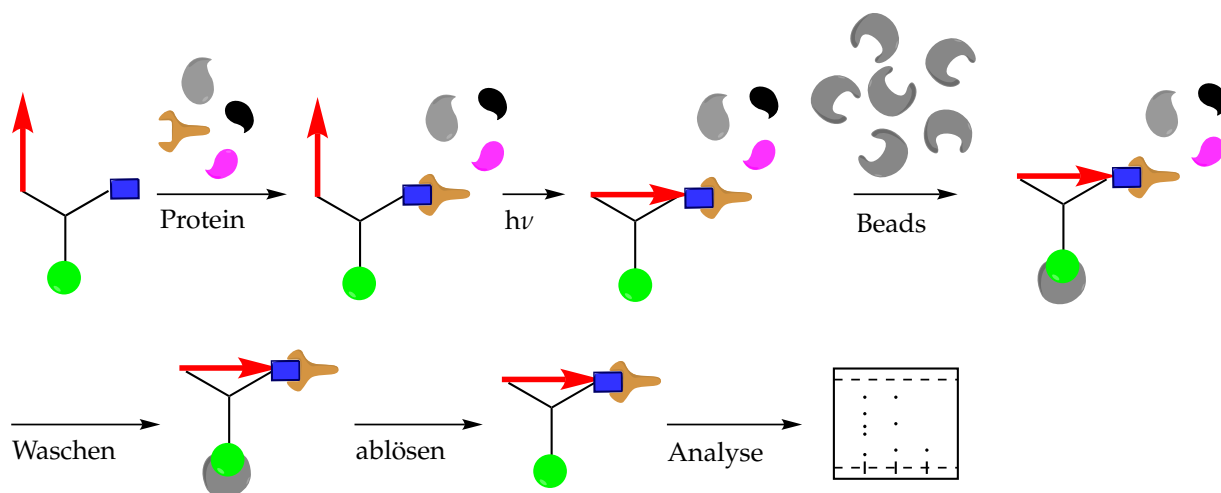


SCHEMA 1. Schematische Darstellung der *OnBead*-Methode.^[4]

Die Selektivitätsfunktion ist in blau, die Sortierfunktion in grün, die Reaktivitätsfunktion als roter Pfeil und die magnetischen Partikel (*Beads*) in grau dargestellt.

1.4.2. *OffBead-Capture*-Experimente

Bei der *OffBead*-Methode wird die *Capture Compound* zunächst mit der zu untersuchenden Proteinelösung inkubiert, bestrahlt und anschließend mit magnetischen *Beads* versetzt. Die Reinigung und Analyse erfolgt analog zur *OnBead*-Methode.^[24]



SCHEMA 2. Schematische Darstellung der *OffBead*-Methode.^[4]

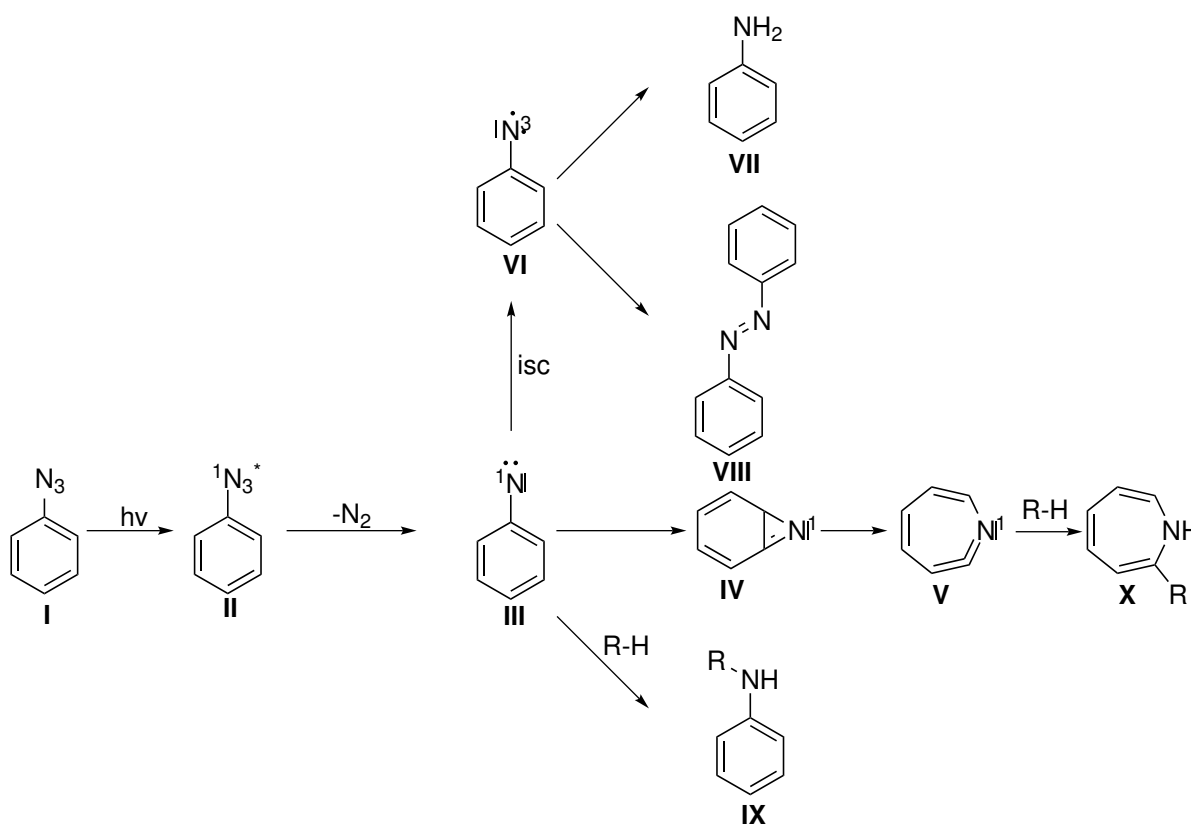
Die Selektivitätsfunktion ist in blau, die Sortierfunktion in grün, die Reaktivitätsfunktion als roter Pfeil und die magnetischen Partikel (*Beads*) in grau dargestellt.

1.4.3. Unspezifische *Capture*-Ausbeute (Beifang)

Als unspezifische *Capture*-Ausbeute, im Folgenden „Beifang“ genannt, wird die Ausbeute bezeichnet, welche im *Capture*-Experiment trotz einer aktiven Unterdrückung der reversiblen Verbindung an ein Zielprotein erreicht wird. In der Regel wird bei einem vollständigen *Capture*-Experiment eine Negativkontrolle durchgeführt, bei welcher dem *Capture*-Ansatz ein Inhibitor (i.d.R. eine freie Selektivitätsfunktion) zugesetzt wird. Hierdurch wird die reversible Verbindung zwischen der Selektivitätsfunktion der *Capture Compound* und dem Zielprotein unterdrückt. Eine Aktivierung der Reaktivitätsfunktion sollte dann nicht zu einer kovalenten Bindung zum Zielprotein führen. Während die Inhibition bei *OnBead-Capture*-Experimenten wie erwartet beobachtet wird, ist dies bei *OffBead*-Experimenten nicht der Fall.^[4]

1.5. Photochemie der Arylazide

Obwohl die Entwicklung der Photoaffinitätsmarkierung durch *Westheimer et al.* schon mehr als 50 Jahre zurückliegt und auch Arylazide kurz danach Einzug in die Chemie der Photoquervernetzer hielten, ist der Reaktionsmechanismus selbiger bis heute nicht klar verstanden.^[25,26] Zahlreiche Untersuchungen und Veröffentlichungen widmen sich dem Thema und ebenso viele Hypothesen hierzu sind bekannt. Sicher ist, dass Arylazide beim Bestrahlen mit UV-Licht abhängig von der Chemie des Arylazids und den umgebenden Faktoren (pH-Wert, Lösungsmittel, Temperatur, etc.) eine Vielzahl von Reaktionsprodukten bilden.^[27–34] Einen Überblick über mögliche Produkte der Reaktion eines angeregten Arylazids mit einem Zielmolekül zeigt Schema 3.



SCHEMA 3. Mögliche Produkte der Reaktion zwischen einem Zielmolekül und einem Arylazid nach UV-Anregung.^[32,34]

Das ursprüngliche Arylazid **I** geht zunächst durch Einstrahlen von Licht der für das Azid spezifischen Wellenlänge in den angeregten Singulett-Zustand **II** über.^[34] Durch spontane Freisetzung von Stickstoff wird die eigentlich reaktive Spezies **III** gebildet. Diese Verbindung kann nun auf drei verschiedenen Reaktionswegen abreagieren:

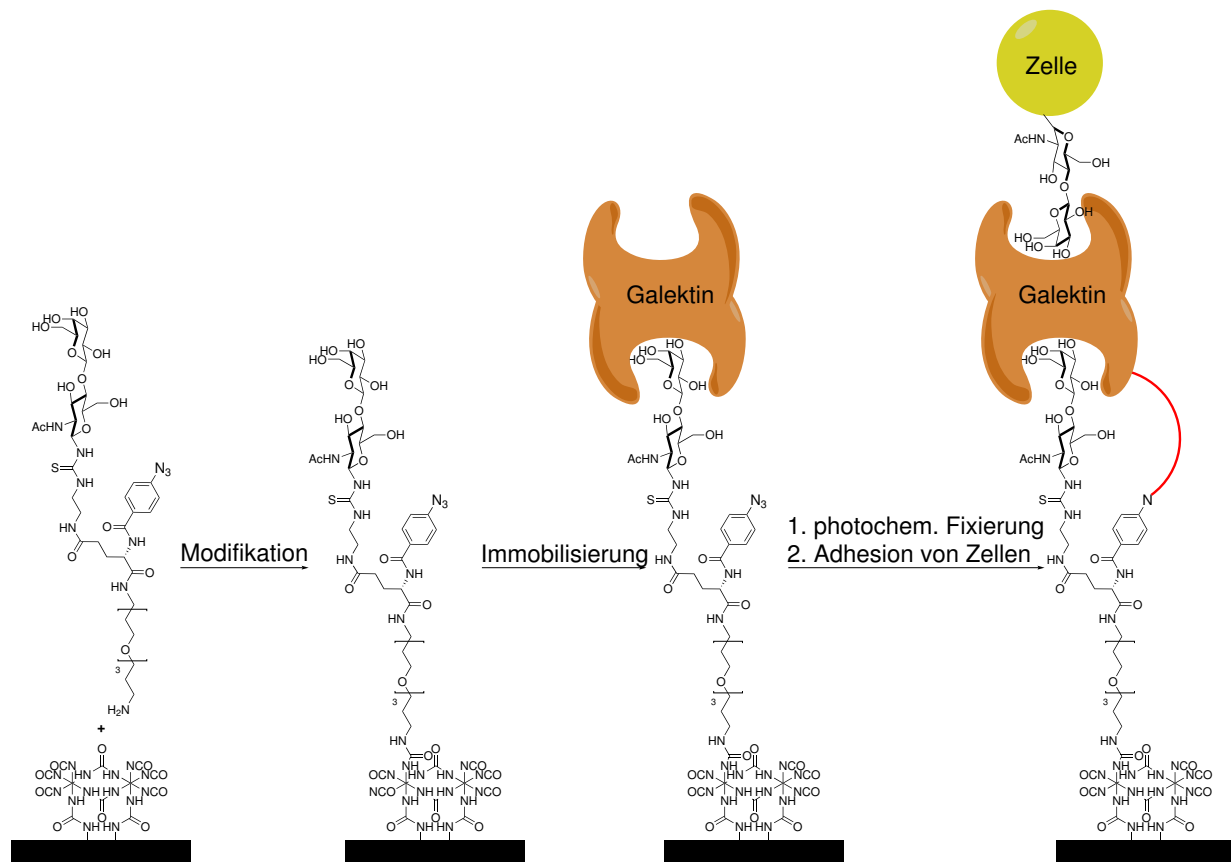
- Unterlaufen eines Intersystem-Crossing (ISC) zum Tripplett-Nitren und Folgereaktion zu Anilin (**VII**) oder Rekombination zum Azobenzol (**VIII**),
- Umlagerung über die Intermediate **IV** und **V**^[32] und Weiterreaktion mit einem Nucleophil zu **X** oder
- Einfache Reaktion mit einer beliebigen wasserstoffhaltigen Verbindung zum Endprodukt **IX**

Neben der Fähigkeit von Arylaziden zur photochemischen Quervernetzung müssen sie, um als Reaktivitätsfunktion in *Capture*-Experimenten in Frage zu kommen, verschiedene weitere Anforderungen erfüllen. So muss die Anregungswellenlänge groß genug (>250 nm) sein, um Zielproteine nicht durch UV-Licht zu schädigen. Außerdem muss die mittlere Lebensdauer der aktivierten Spezies einerseits so groß sein, dass sie mit dem Reaktionspartner in unmittelbarer Nähe reagieren kann und andererseits klein genug sein, um mögliche Nebenreaktionen mit freien Reaktionspartnern zu unterbinden. Auch wenn das Netzwerk an möglichen Reaktionen sehr groß erscheint, haben sich in den letzten Jahren allgemeingültige Aussagen etabliert an Hand derer sich die Reaktion von Arylaziden abschätzen lassen. So führt die Einführung von Fluorsubstituenten im Vergleich zum unsubstituierten Phenylazid zu einer erhöhten Lebensdauer des Arylnitrens und somit zu einer langsameren Ringexpansion zu Dehydroazepinen.^[34–38] Dieser Vorteil begünstigt die Verwendung von tetrafluorsubstituierten Arylaziden in der AfBPP, hat jedoch gleichzeitig den Nachteil, dass die Fluorsubstituenten die Anregungswellenlänge in einen für das Protein ungünstigen Bereich senken. Einen gegenteiligen Effekt haben elektronenziehende Substituenten, wie z.B. Nitro-Gruppen. Zwar wird die Anregungswellenlänge in einen deutlich längerwelligen Bereich verschoben, jedoch steigt die Reaktionsfreudigkeit des Arylnitrens so stark, dass Nebenreaktionen vermehrt beobachtet werden können.^[26,27] Bei der Reaktion von aktivierten Arylaziden in *Capture Compounds* wird davon ausgegangen, dass die Reaktion entweder über die Direktinsertion des Singulett-Nitrens in eine

C-H oder N-H-Bindung des Proteins oder durch Angriff eines Nucleophils an das Intermediat **V** verläuft.^[4]

1.6. *Capture Compounds* als Bausteine für biologische Systeme

Obwohl die Verwendung von *Capture Compounds* zur Erforschung des Proteoms heute eine etablierte und kommerziell eingesetzte Methode darstellt, lassen sich *Capture Compounds* nicht nur als Fängerverbindungen einsetzen. Wird die Sortierfunktion durch eine, zur Reaktivitätsfunktion orthogonale, zweite Reaktivitätsfunktion ersetzt, lassen sich *Capture Compounds* auf anderen Oberflächen immobilisieren. Hier stehen verschiedene Möglichkeiten sowohl für die zweite Reaktivitätsfunktion als auch für die Oberfläche zur Verfügung. Beispiele hierfür sind die Umsetzung von Aminen mit Epoxiden, NHS-Estern, Isocyanaten oder Alkoholen mit NHS-Estern. Auf diese Weise modifizierte Oberflächen können zur hoch selektiven, reversiblen Vorbindung von Proteinen und anschließend, durch Aktivierung der ursprünglichen Reaktivitätsfunktion, zur kovalenten Fixierung der Proteine eingesetzt werden. Versuche hierzu wurden unter anderem im Arbeitskreis Weinhold der RWTH Aachen University von Robin Bofinger im Zuge einer Diplomarbeit durchgeführt.^[39] Es konnte gezeigt werden, dass sich *Capture Compounds* erfolgreich auf Oberflächen aufbringen lassen und so Galektin-2 als Zielprotein gebunden werden kann.^[39] Galektin-2 dient als Adaptermolekül für poly-Saccharide^[39] und hat die Fähigkeit spezifisch weitere Proteine zu binden. In selbiger Diplomarbeit wurden daher Versuche zur Galektin-2 Immobilisierung auf Oberflächen mit anschließender Fibronectinanbindung durchgeführt. Es zeigte sich, dass mit Galektin-2-modifizierte Oberflächen in der Lage sind Fibronectin zu binden und so eine artifizielle extrazelluläre Matrix aufzubauen.^[39]



SCHEMA 4. Möglicher Aufbau einer artifiziellen extrazellulären Matrix. Im ersten Schritt wird die synthetisierte *Capture Compound* auf die mit Isocyanat modifizierten Oberflächen aufgebracht. Durch Ausbildung von Harnstoffmotiven wird die *Capture Compound* kovalent an die Oberfläche gebunden. Im Folgeschritt wird die behandelte Oberfläche mit Galektin inkubiert wobei die Selektivitätsfunktion der *Capture Compound* nicht-kovalent an das Protein bindet. Durch anschließende photochemische Aktivierung des aromatischen Azids der chemischen Komponente wird eine kovalente Bindung zwischen Protein und *Capture Compound* geschaffen und so eine Struktur erhalten, die eine nachfolgende spezifische Anbindung von weiteren Zellen ermöglicht.

1.7. Galektine und ihre Funktion in der extrazellulären Matrix

Die extrazelluläre Matrix (*extra cellular matrix*, ECM) bildet das Grundgerüst und die Grundlage für das Wachstum von Zellen sowie die Zell-Zell-Kommunikation für Gewebe und Organe in jedem Organismus.^[40] Die Entwicklung der ECM geht einher mit dem ersten Auftreten von multizellularen Organismen und besteht hauptsächlich aus drei Gruppen von Molekülen: Unlösliche Makromoleküle, lösliche Makromoleküle (Wachstumsfaktoren, Chemokine und Cytokine) und Proteine auf der Oberfläche von Nachbarzellen.^[41] Die unlöslichen ECM-Proteine bestehen hauptsächlich aus vier Makromolekülen: Kollagen, Proteoglykan, Laminin und Fibronectin. Jedes dieser Makromoleküle ist für eine spezifische Aufgabe zuständig.^[40] Kollagen gehört zu den unlöslichen Makromolekülen der ECM und bildet weite Netzwerke, welche durch kovalente Bindungen verbunden sind und so für die mechanische Stabilität von Gewebe und Organen sorgen.^[42] Proteoglykane sind vielfältige Makromoleküle und für die Elastizität von Gewebe zuständig. Darüber hinaus dienen sie als Speicherort für Wachstumsfaktoren und spielen bei Entwicklungsprozessen eine maßgebliche Rolle.^[43] Laminin ist das am häufigsten vorkommende Makromolekül der ECM und hat sowohl strukturgebende als auch zellinforma-tionsrelevante Funktionen. Fibronectine schließlich sind multifunktionale Glykoproteine welche eine zentrale Rolle in der Zelladhesion spielen.^[40] Daher wurden Fibronectine in den letzten Jahren eingehend untersucht und die Anbindung von Fibronectin an Oberflächen war Ziel intensiver Forschung. Es zeigte sich jedoch, dass die Anbindung von Zellen an fibronectinmodifizierten Oberflächen nicht immer spezifisch ist und oft verschiedene Zelltypen angebunden wurden, sodass intensiv nach weiteren Zell-Matrix unterstützenden Proteinen gesucht wurde.^[44] So konnte eine weitere Gruppe von Proteinen, die Galektine, zur Vermittlung der Zelladhesion gefunden werden. Galektine sind vielfältig vorkommende β -Galaktosid-bindende Proteine, welche eine gemeinsame Aminosäuresequenz, die sogenannte Kohlehydraterkennungsdomäne (carbohydrate recognition domain, CRD) besitzen.^[45] Inzwischen sind Galektine für ihre außerordentlich vielfältigen Funktionen innerhalb der Zelle und im extrazellulären Raum bekannt. Zu diesen Funktionen gehört neben der Regulierung von Zellzyklen, Hilfe bei der Wundheilung^[46] und

vielen weiteren Vorgängen im Organismus auch die vermittelnde Rolle zur Zelladhäsion und zu Zellsignal-Prozessen.^[45] Letztere Eigenschaft macht sie besonders interessant für Biomaterialforschung und -anwendung.^[45] Galektine lassen sich in drei Hauptfamilien einteilen. Die Prototyp-Klasse, welche eine CRD besitzt und durch die Galektine 1,2,5,7,10,11,13,14 und 15 vertreten wird. Die Chimera-Klasse mit einer CRD und einer nicht-Lektin Domäne deren einziger Vertreter das Galektin-3 ist und die Tandem-Repeat-Klasse mit zwei verschiedenen CR-Domänen, welche durch einen kurzen Linker verbunden sind. Zu dieser Klasse gehören die Galektine 4,6,8,9 und 12.^[45] Jede dieser Klassen ist in der Lage Di- bis Oligomere zu bilden wobei nur Galektin-3 eine Vorbindung an Liganden benötigt um Oligomere ausbilden zu können. Auch wenn jedes der Galektine eine mehr oder weniger eigene Rolle im Organismus spielt, binden doch alle an β -Lactosamin und können nur schwer einer spezifischen Aufgabe zugeordnet werden.^[47] Sicher ist, dass alle Galektin-Klassen an der Zelladhäsion und Zell-Zell-Wechselwirkung beteiligt sind.^[48] 2002 konnten *Panjwani et al.* zeigen, dass Galektin-3 und Galektin-7 essentiell für die Reepithalisierung von Wunden sind.^[46] Dies spielt insofern eine wichtige Rolle, als das so gezeigt werden konnte, dass Galektin-3 und Galektin-7 als einzige Vertreter der Galektinfamilien spezifisch gegenüber Epithelzellen sind.^[46] Dies macht sie zu vielversprechenden Kandidaten für Beschichtungen von Implantaten oder künstlichem Gewebe, um eine Abwehrreaktion des Körpers zu unterbinden und die Wiederherstellung von ersetzten Gewebe oder Organen zu beschleunigen. Zur Charakterisierung von Galektin-3 wurden in den letzten Jahren verschiedenste Detektionsmethoden entwickelt.^[49] Hierzu wurden meist Reaktionen von Reagenzien mit Aminogruppen des Proteins verwendet, sodass ein Effekt auf die Funktion von Galektin-3 durch chemische Modifizierung nicht ausgeschlossen werden konnte.^[49] 2013 berichteten *Elling et al.* über ein neues Galektin-3- bzw. Galektin-1-Fusionsprotein welche einen SNAP-Tag und ein *yellow fluorescent protein* (YFP) bzw. ein *Ds-red fluorescent protein* beinhaltet und gleichzeitig keine Veränderungen der biochemischen Aktivität gegenüber den unmodifizierten Proteinen zeigten.^[49] Hierdurch war es zum ersten Mal möglich Galektin-3 und Galektin-1 ohne chemische Modifizierung nebeneinander zu detektieren.^[49]

1.8. NCO-sP(EO-*stat*-PO)-modifizierte Multititerplatten zur Untersuchung der Adhesion von Galektinen auf Oberflächen

Oberflächen, welche als Sensoren oder für biomolekulare Wechselwirkungsstudien verwendet werden, müssen eine hohe Spezifität der immobilisierten Liganden für das zu untersuchende Protein bei gleichzeitiger vollständiger Unterdrückung unspezifischer Nebenreaktionen besitzen.^[50] Um diese Anforderungen zu erfüllen wurde 2012 von *Groll et al.* eine Methode etabliert, welche sich in einfachen Schritten in standardisierten 96er Mikrotiterplatten verwenden lässt.^[50] Dieses System beruht auf der Verwendung von sechs-armigen, sternförmig angeordneten Molekülen dessen Grundstruktur aus copolymerisiertem Ethylenoxid und Propylenoxid im Verhältnis 4:1 besteht und deren Armen mit Isocyanatgruppen modifiziert sind. Dieses NCO-sP(EO-*stat*-PO) zeigte hervorragende antiadhesive Eigenschaften bei gleichzeitiger einfacher chemischer Modifizierbarkeit.^[51–53] Es konnte gezeigt werden, dass sich verschiedene aminofunktionalisierte Biomoleküle, wie Fibronectin und Biotin, aber auch chemische Moleküle wie *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) und *N*-Acetyllactosamin (LacNAc) kovalent auf die Oberfläche aufbringen lassen und als spezifische Liganden für entsprechende Proteine dienen können.^[50] Vor allem Letzteres ist von herausragender Bedeutung, da LacNAc als Ligand für Galektine dient und so die Untersuchung selbiger auf Oberflächen stark vereinfacht wird.

1.9. Lektine

Lektine sind kohlenhydratbindende Proteine und bilden eine Proteinuntergruppe innerhalb des Proteoms.^[54] Ihre Funktion ist vielfältig und umfasst unter anderem die Zell-Zell-Erkennung^[55], die Vermittlung der Symbiose zwischen stickstofffixierenden Mikroorganismen und Hülsenfrüchten^[56] und auch die Abwehrreaktion von Pflanzen gegen Pilze und Insekten.^{[57][58]} Die Bindung zwischen Lektin und Kohlenhydrat basiert auf direkten oder wasservermittelten Wasserstoffbrückenbindungen und van der Waals Kräften.^[59] Durch ihre mindestens bivalente, in der Regel jedoch polyvalente Struktur ermöglichen Kohlenhydrate die nicht-kovalente Verknüpfung von verschiedenen Zielproteinen.^[60] Auf-

grund ihres häufigen Vorkommens und ihrer wichtigen Rolle bei der kohlenhydratvermittelten Erkennung können Lektine direkt als therapeutisch wirksame Zielmoleküle oder indirekt als Transporter für Wirkstoffe verwendet werden.^[61]

1.9.1. *Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia* Lektin-II

Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia Lektin-II (GSL-II) ist einer der bekanntesten Vertreter der Lektine und bindet im Gegensatz zu anderen Lektinen, wie Weizenkeim-Agglutinin (*Wheat Germ Agglutinin* (WGA)) und *Potato Lectine* (STL), welche an interne und terminale N-Acetylglucosamineinheiten (GlcNAC) binden, nur an terminale, nichtreduzierende GlcNAC-Einheiten.^{[62][63]} Aufgrund dessen wurde GSL-II bereits intensiv zur Erkennung und Detektion von nichtreduzierenden GlcNAC-Einheiten verwendet.^[62] GSL-II besteht aus vier Untereinheiten von je ca. 32500 kDa^[63] wobei jeweils zwei der Untereinheiten zu einem GlcNAC-bindenden Dimer zusammengefasst sind.^{[59][64]} Abhängig vom Vorkommen des Proteins im Organismus muss zwischen zwei Varianten unterschieden werden. Während aus den Blättern isoliertes GSL-II (lGSL-II) eine Untereinheit für die Erkennung von GlcNAC-Resten und eine Untereinheit mit Klasse III Chitinaseaktivität aufweist, handelt es sich bei dem aus dem Samen isolierten GSL-II (sGSL-II) um ein Homotetramer, welches zwei identische Untereinheiten für die Erkennung von GlcNAC-Resten besitzt.^[59] Beide Varianten sind innerhalb der Pflanze an der Abwehr von Fremdorganismen wie Pilzen und Insekten beteiligt. Die abwehrende Wirkung beruht hierbei auf der Bindung von GSL-II an die GlcNAC-haltige Darmwand (von Insekten bzw. Membran von Pilze und Bakterien) und der damit einhergehenden Markierung für das pflanzeigene Immunsystem.^[59]

1.9.2. Weizenkeim-Agglutinin

Weizenkeim-Agglutinin ist ein weiterer Vertreter der Lektine und ebenfalls an der Abwehr von Pflanzenschädlingen beteiligt. Es besteht aus drei Isolektinen, welche sich leicht in ihrer Aminosäuresequenz unterscheiden.^[60] Die Isolektine bestehen aus einem Dimer von ca. 34.000 kDa, welches aus zwei identischen Untereinheiten von je ca. 17.000 kDa gebildet wird, und können bis zu vier interne und terminale GlcNAC-Reste binden.^[4,60,65]

Obwohl Kristallstrukturanalysen zeigten, dass alle vier Bindungsstellen GlcNAc-Reste binden können, zeigt sich in Lösung, dass zwei der Bindungsstellen zu schwach sind, um eine effektive Bindung zu GlcNAc-Resten einzugehen.^[60] Bedingt durch die Fähigkeit interne GlcNAc-Reste binden zu können, führt eine Verlängerung der GlcNAc-Kette zu einer Erhöhung der Bindungsaffinität von WGA.^[60]

2. Zielsetzung

Aufbauend auf den Ergebnissen von Weinhold *et al.*^[39] und unter Zuhilfenahme des von Groll *et al.*^[50] entwickelten Systems zur Untersuchung von Proteinen auf NCO-sP(EO-stat-PO)-modifizierten Oberflächen und dem von Elling *et al.*^[49] entwickelten Galektin-3-Fusionsprotein soll im ersten Teil dieser Arbeit eine *Capture Compound* synthetisiert werden, welche zwei orthogonale Reaktivitätsfunktionen enthält. Bei der Synthese der *Capture Compound* durch Weinhold *et al.*^[39] zeigte sich, dass es während der Kupplung der freien Carbonsäure des verwendeten Asparaginsäurederivates mit dem aminomodifizierten GlcNAc-Derivat zu Nebenreaktionen kommt, welche die Ausbeute dieser Reaktion stark vermindern. Erste Untersuchungen durch vorangegangene Arbeiten^[44] zeigten, dass es sich hierbei unter anderem um ein Zyklisierungsprodukt handelt. Diese Zyklisierung soll durch Ersetzen der Asparaginsäure durch Glutaminsäure im Grundgerüst unterdrückt werden. Die so modifizierte *Capture Compound* soll im Anschluss an die erfolgreiche Synthese auf NCO-sP(EO-stat-PO)-modifizierten 96er Mikrotiterplatten immobilisiert und ihre Fähigkeit Galektin-3 zu binden untersucht werden. Hierbei soll besonders der Effekt des Photoquervernetzers berücksichtigt werden und eine Aussage über den Unterschied der Oberflächenmodifikation durch Galektin-3 bei aktiviertem und nicht aktiviertem Photoquervernetzer untersucht werden. Schlussendlich soll der Aufbau einer artifiziellen extrazellulären Matrix untersucht werden, indem eine mit *Capture Compound* und Galektin-3 modifizierte 96er Mikrotiterplatte mit Asialofetuin (ASF) inkubiert wird. Die so präparierte Oberfläche soll hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur selektiven Bindung von Proteinen der ECM untersucht werden. Im zweiten Teil dieser Arbeit soll der von Charrack *et al.*^[4] beobachtete Beifang in *OffBead-Capture*-Experimenten und dessen Ursache untersucht werden. Es zeigte sich, dass bei *OffBead-Capture*-Experimenten auch

Capture-Ausbeuten erzielt wurden, wenn ein Kompetitor zugegeben wurde. Bei *OnBead-Capture*-Experimenten wurde dies bei identischer Vorgehensweise jedoch nicht beobachtet. Als mögliche Ursache für diesen Beifang lassen sich vier verschiedene Hypothesen aufstellen: Die unvollständige Verdrängung des Proteins durch den Kompetitor, was in der Folge zu einer Bande auf dem SDS-Gel führt und eine scheinbar unspezifische *Capture*-Ausbeute impliziert, eine unspezifische, bimolekulare Reaktion des aktivierten Azids mit einem zufällig in der Nähe befindlichen Protein, die unspezifische reversible Bindung von Protein an die Reaktivitätsfunktion mit anschließender kovalenter Fixierung sowie die unspezifische reversible Bindung von Protein an die Sortierfunktion mit anschließender kovalenter Fixierung. Um die Ursache für die unspezifischen Reaktionen zu untersuchen, sollen vier *Capture Compounds* synthetisiert und diese sowohl in *OnBead*- als auch *Offbead-Capture*-Experimenten untersucht werden. Neben einer unmodifizierten *Capture Compound* als Positivkontrolle soll eine zweite *Capture Compound* hergestellt werden, welche zusätzlich zu den drei Funktionen einen Lysinrest trägt. Dieser soll als potentieller Selbstquencher dienen und eine bimolekulare Reaktion des aktivierten Azids mit in der Nähe befindlichen, nicht vorgebundenen Proteinen durch intramolekulare Reaktion unterbinden. Außerdem soll eine dritte *Capture Compound* synthetisiert werden, welche keine Selektivitätsfunktion trägt. Hierdurch kann die Höhe der unspezifischen Ausbeute direkt bestimmt werden, da die spezifische Ausbeute per Definition bei Null liegen muss. Um die Experimente vergleichbar zu halten, wird diese letztgenannte *Capture Compound* zusätzlich mit einem Lysinrest synthetisiert. Mit den dargestellten *Capture Compounds* sollen die Ursache für den Beifang untersucht und mögliche Lösungswege zur Vermeidung des Beifangs in *Capture*-Experimenten erarbeitet werden.

3. Ergebnisse und Diskussion

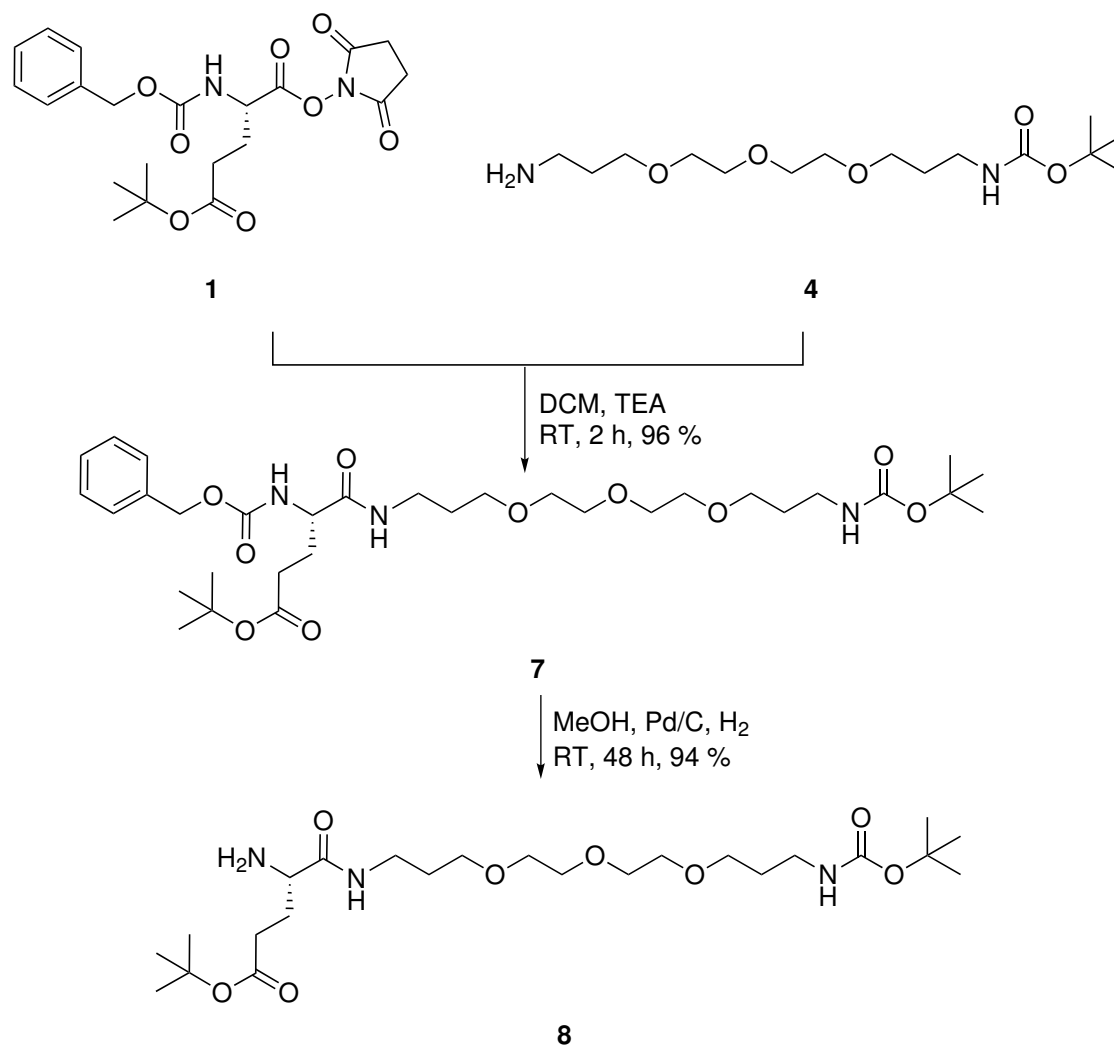
3.1. Aufbau einer artifiziellen extrazellulären Matrix

3.1.1. Synthesen

3.1.1.1. Photoquervernetzer mit PEG-Linker

Ausgehend von Glutaminsäurederivat **1** wurde eine erste Verbindung unter Verwendung von Diamino-Polyethylenglykol **2** zur Untersuchung des Aufbaus einer artifiziellen extrazellulären Matrix über 8 Stufen dargestellt (Schemata **5** - **7**). Zur Einführung der photoaktiven Reaktivitätsfunktion wurde hierbei auf das im Arbeitskreis bekannte aromatische Azid **3** zurückgegriffen und als Selektivitätsfunktion LacNAc gewählt, da es für die Bindung von Galektin-3 eingesetzt werden soll. Die zweite Sortierfunktion in Form eines Amins wurde nicht explizit eingeführt, sondern durch einfaches Entschützen des zuvor eingeführten PEG-Linkers erhalten. Letzterer dient zur besseren Löslichkeit der Zielverbindung in wässrigen Medien und lässt darüber hinaus, über seine Kettenlänge, eine Steuerung des Abstandes zwischen Selektivitätsfunktion und Oberfläche zu. Während Glutaminsäurederivat **1** kommerziell erhältlich ist, wurde das einfach-Boc-geschützte Diamin **4** ausgehend von 1,13-Diamino-4,7,10-trioxa-tridecan (**2**) durch Zutropfen von Di-*tert*-butyldicarbonat (**5**) in Dichlormethan und anschließender säulenchromatografischer Reinigung dargestellt. Im ersten Aufbauschritt des Photoquervernetzers **6** wurde das so erhaltene mono-Boc-geschützte Diamin **4** im leichten Überschuss in Dichlormethan mit dem Glutaminsäurederivat **1** umgesetzt und das PEG-modifizierte Grundgerüst **7** mit einer Ausbeute von 96 % erhalten. Anschließend wurde die Cbz-Schutzgruppe unter reduktiven Bedingungen in Methanol und Wasserstoffatmosphäre unter Einwirkung von

Pd/C abgespalten um das Amin **8** für den Folgeschritt zugänglich zu machen.



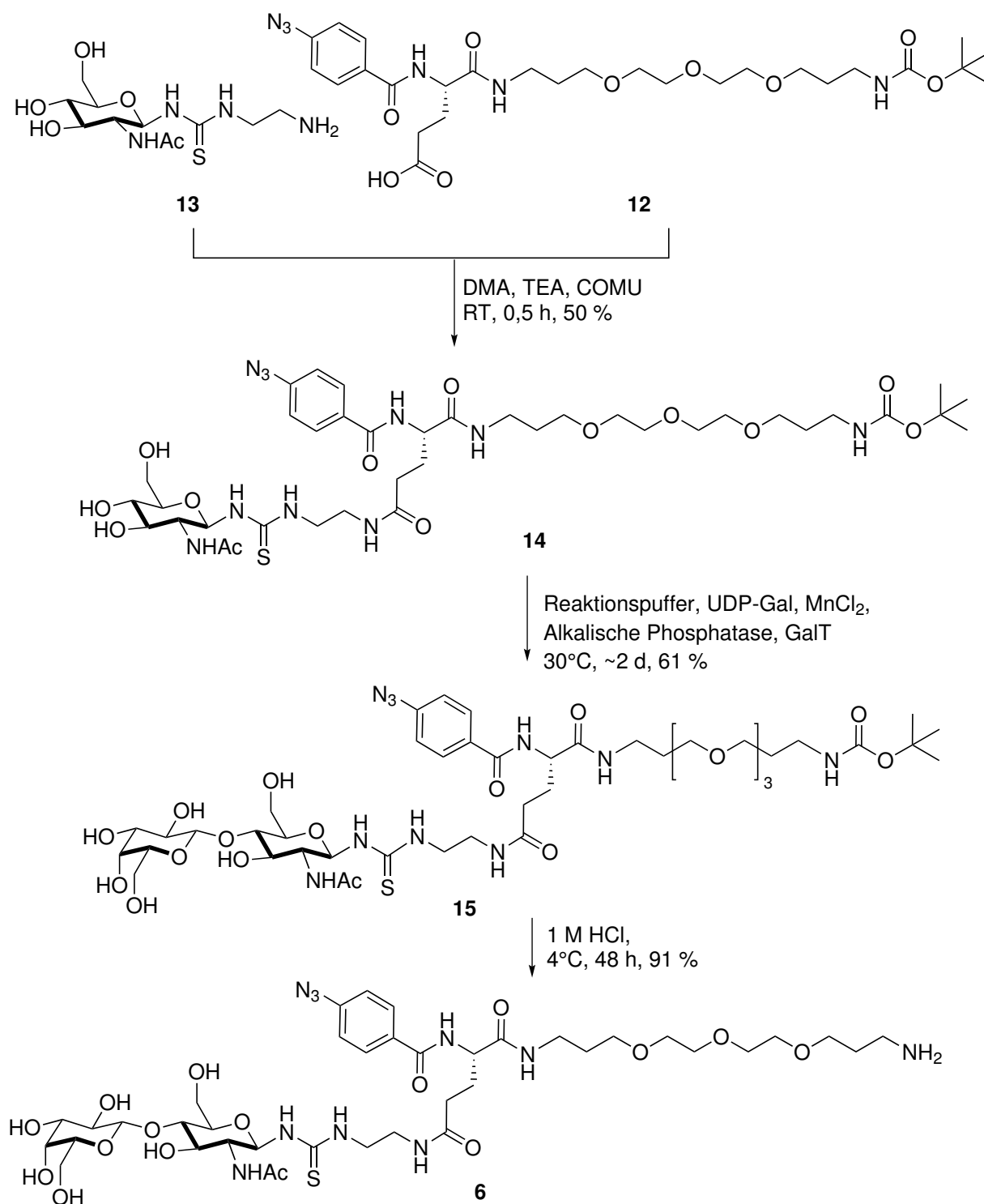
SCHEMA 5. Synthese des PEG-modifizierten Glutaminsäurederivates **8**.

Zur Einführung der Reaktivitätsfunktion wurde *p*-Azidobenzoesäure-NHS-Ester (**3**) nach der Methode von *Suwal et al.* [66] und *Bofinger*[39] in einer dreistufigen Synthese durch eine sandmeierähnliche Reaktion und nachfolgender Aktivierung der Carbonsäure mittels Diisopropylcarbodiimid und *N*-Hydroxysuccinimid (**9**) hergestellt. Anschließend wurde *p*-Azidobenzoesäure-NHS-Ester (**3**) in Dichlormethan im leichtem Überschuss mit dem zuvor synthetisierten Amin **8** umgesetzt. Nach erfolgreicher nukleophiler Substitution wurde die Verbindung säulenchromatographisch gereinigt und konnte mit einer

Ausbeute von 82 % isoliert werden. Da die Selektivitätsfunktion in Form eines Amins eingeführt werden sollte, musste zunächst die *tert*-Butylschutzgruppe der Carbonsäure **10** entfernt werden. Da keine selektive Entschützung einer *tert*-Butylschutzgruppe in Gegenwart einer Boc-Schutzgruppe möglich war, wurden beide Schutzgruppen über 48 h in Ameisensäure entfernt und das erhaltene Amin **11** anschließend mit einem Überschuss an Di-*tert*-butyldicarbonat (**5**) in Dichlormethan erneut geschützt. Hierbei konnte das Amin **11** quantitativ und die freie Säure **12** mit einer Ausbeute von 96 % isoliert werden. Um die Selektivitätsfunktion in Form des benötigten *N*-Acetylglucosamins einführen zu können, wurde zunächst *N*-Acetylglucosamin in einer mehrstufigen Reaktion^[67,68] in das GlcNAc-Derivat **13** überführt und mit Hilfe von COMU in Triethylamin-basischem Dimethylacetamid direkt in einer nukleophilen Substitution mit der zuvor entschützten Carbonsäure **12** gekuppelt. Die Reinigung wurde hierbei mittels Kieselgelsäule durchgeführt, wobei ein sehr polares Elutionsmittel von 15 % Methanol in Dichlormethan mit Zusatz von 1 % Essigsäure gewählt wurde. Diese hohe Polarität ist nötig um den sehr polaren Zuckerteil der dargestellten Verbindung von der Säule zu eluieren. Die gewollte Selektivitätsfunktion LacNAc wurde ausgehend von dem GlcNAc-modifizierten Gerüst **14** in einer enzymatischen Reaktion mit Hilfe des Enzyms β -1,4-Galactosyltransferase 1 (GalT) und dem Substrat UDP-Galaktose in wässrigem Puffer nach 2 d erhalten. Hierbei wurde der Vorschrift von Charrack *et al.*, wie sie im Arbeitskreis etabliert ist, gefolgt.^[4] Die Reinigung der erhaltenen Verbindung erfolgte abweichend mittels Waters SepPAK-Light Spritzenkartuschen. Diese bestehen aus einem unpolaren Kieselgel und halten so weniger polare Verbindungen zurück, während hoch polare Verbindungen vorab eluiert werden können. So wurde eine Ausbeute von 61 % im Vergleich zu 53 %^[4] erreicht. Neben der Ausbeutenerhöhung von ca. 13 % liegt der große Vorteil dieses Reinigungsschrittes im deutlich kürzeren Zeitaufwand, welcher für die Reinigung des LacNAc-Gerüsts **15** aufgebracht werden muss.



SCHEMA 6. Einführen der Reaktivitätsfunktion und Synthese der Carbonsäure **12**.

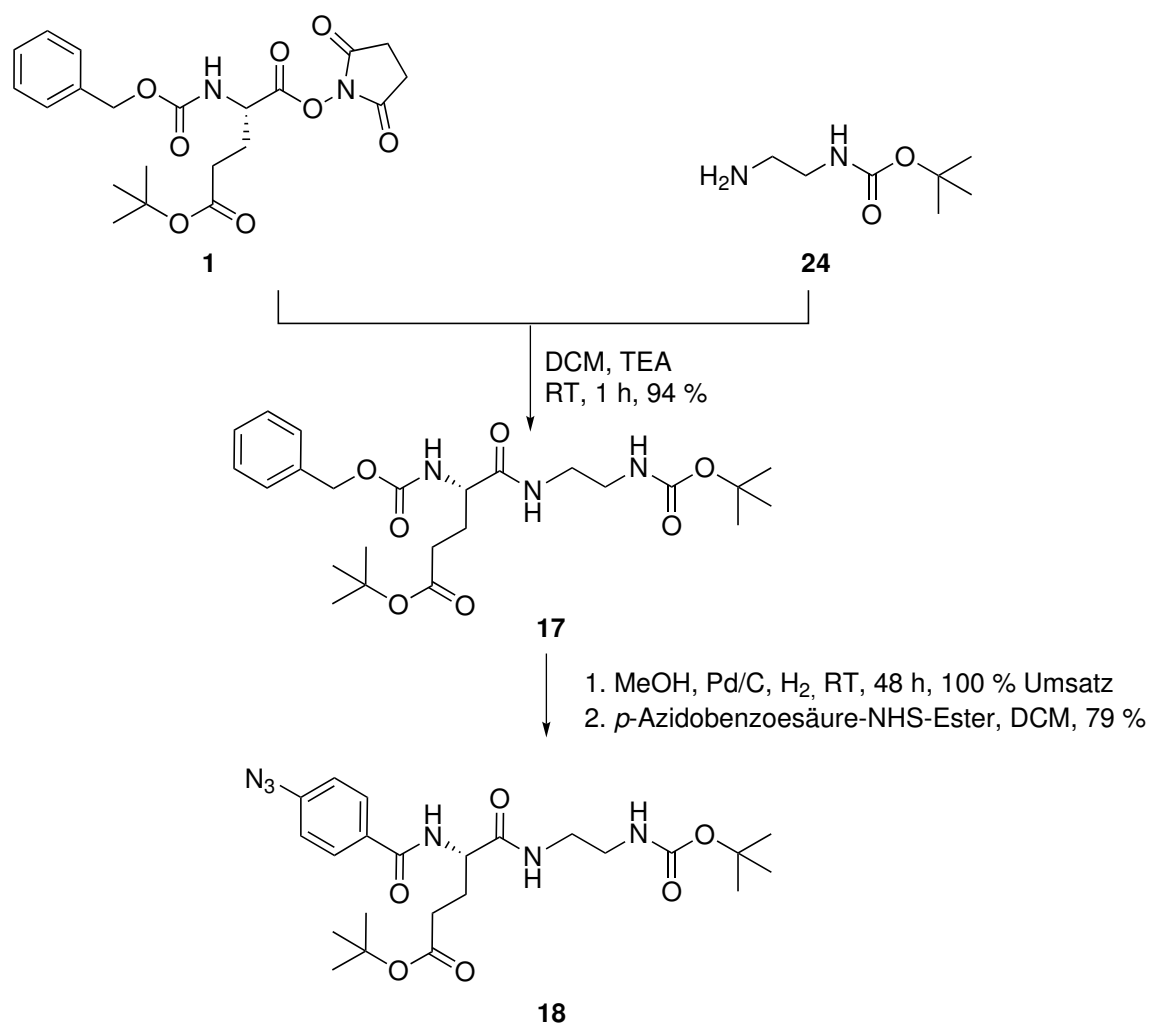


SCHEMA 7. Kupplungsreaktion zwischen Carbonsäurederivat **12** und GlcNAc-Gerüst **13** mit anschließendem Aufbau zum LacNAc-Derivat **15** und abschließender Entschützung.

Der letzte Syntheseschritt bestand in der Entschützung des Amins **15** um die Verbindung an die Oberfläche kuppeln zu können. Die glykosidischen Bindungen sind recht säurelabil, so dass das LacNAc-modifizierte Grundgerüst **15** in Salzsäure (1 M) für 48 h bei 4 °C entschützt werden konnte. Diese Methode hat den Vorteil, dass die Boc-Schutzgruppe vollständig entfernt und die glykosidischen Bindungen auch über einen längeren Zeitraum hinweg nicht angegriffen werden. Nach Aufarbeitung mittels Ionentauscher (Dowex 66) wurde die Zielverbindung **6** mit einer Ausbeute von 91 % und einer Gesamtausbeute von 19.7 % über 8 Stufen erhalten.

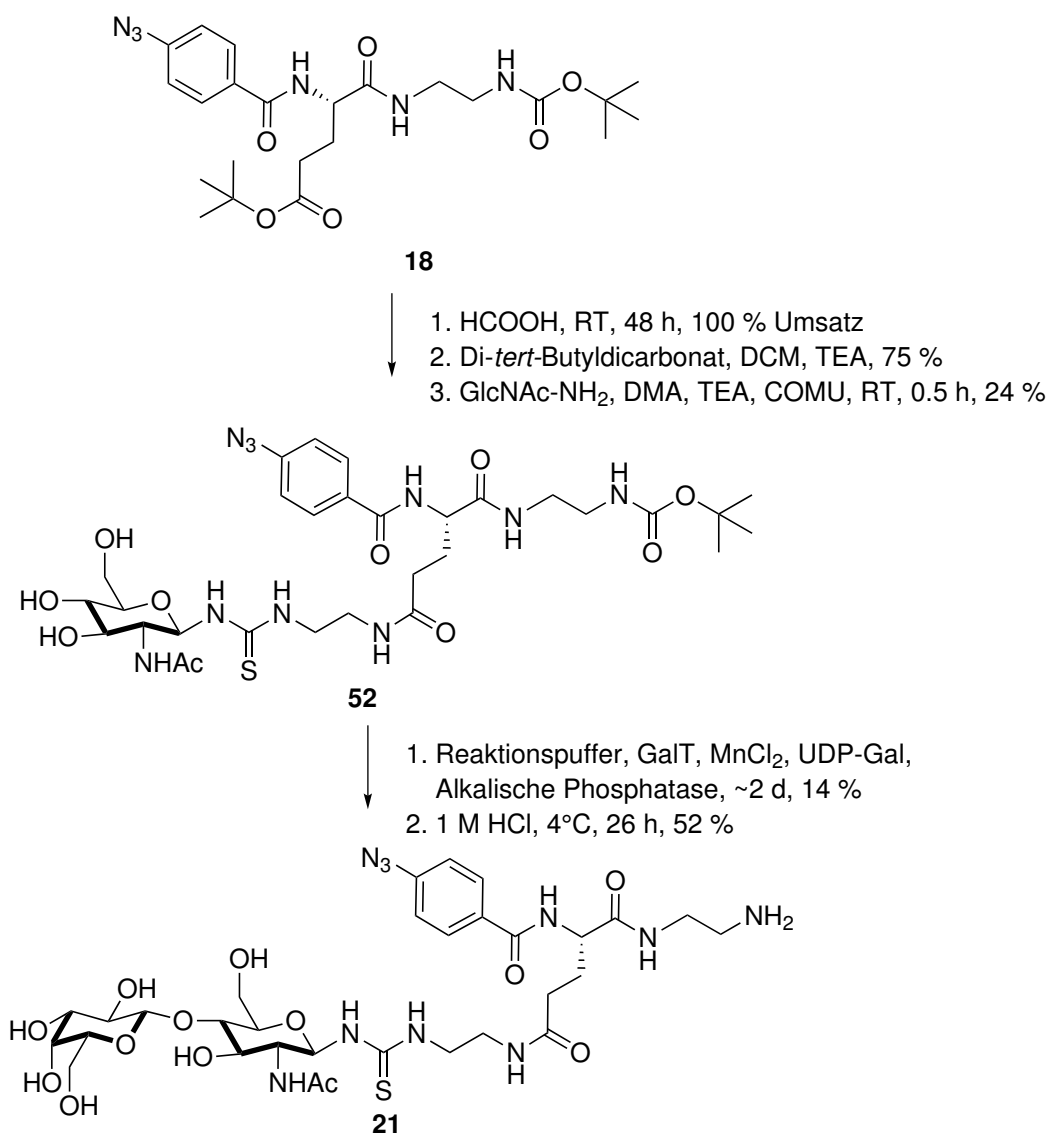
3.1.1.2. Photoquervernetzer mit Ethylendiamin-Linker

Um den Einfluss der Linkerlänge auf die Anbindung von Galektin-3 an die Oberfläche zu untersuchen, wurde neben der in Kapitel 3.1.1.1 beschriebenen Synthese unter Einsatz eines Diamino-PEG-Linkers die analoge Synthese unter Einsatz eines Diaminoethan-Linkers durchgeführt (Schemata **8 - 9**). Durch den deutlich geringeren Abstand der Selektivitätsfunktion von der Oberfläche könnte die Anbindung von Galektin-3 an die Oberfläche beeinflusst werden. Analog zu der Synthese mit Diamino-PEG geht auch die Synthese mit Diaminoethan vom Glutaminsäurederivat **1** aus. Diaminoethan **16** wurde zunächst in Methanol durch Zutropfen einer Di-*tert*-butyldicarbonat-Lösung einfach geschützt und anschließend im leichtem Überschuss in Dichlormethan mit dem Glutaminsäurederivat **1** gekuppelt. Die so erhaltene Verbindung **17** konnte säulenchromatographisch gereinigt und mit einer Ausbeute von 94 % erhalten werden. Anschließende reduktive Entschützung des linkermodifizierten Grundgerüsts **17** mit Wasserstoff in Methanol in Anwesenheit von Pd/C und nachfolgende Kupplung mit *p*-Azidobenzoesäure-NHS-Ester (**3**) ergaben die Zwischenstufe **18** mit einer Ausbeute von 79 %.



SCHEMA 8. Synthese des kürzeren Photoquervernetzers zur Untersuchung des Einflusses der Linkerlänge auf die Galektin-3-Anbindung. Einführen von Ethylendiamin und Reaktivitätsfunktion.

Analog zur Synthese aus Kapitel 3.1.1.1 wurde eine vollständige Entschützung der Zwischenstufe **18** in Ameisensäure durchgeführt und das freie Amin **19** anschließend erneut Boc-geschützt. Nachfolgend wurde das zuvor erwähnte linkermodifizierte GlcNAc-Gerüst **13** mittels Direktkupplung unter Zuhilfenahme von COMU in triethylaminbasischem Dimethylacetamid eingeführt und enzymatisch zur LacNAc-Verbindung **20** aufgebaut. Abschließende Entschützung in Salzsäure (1 M) bei 4 °C lieferte die Endverbindung **21** mit einer Ausbeute von 52 % und einer Gesamtausbeute von 1 % über 8 Stufen.

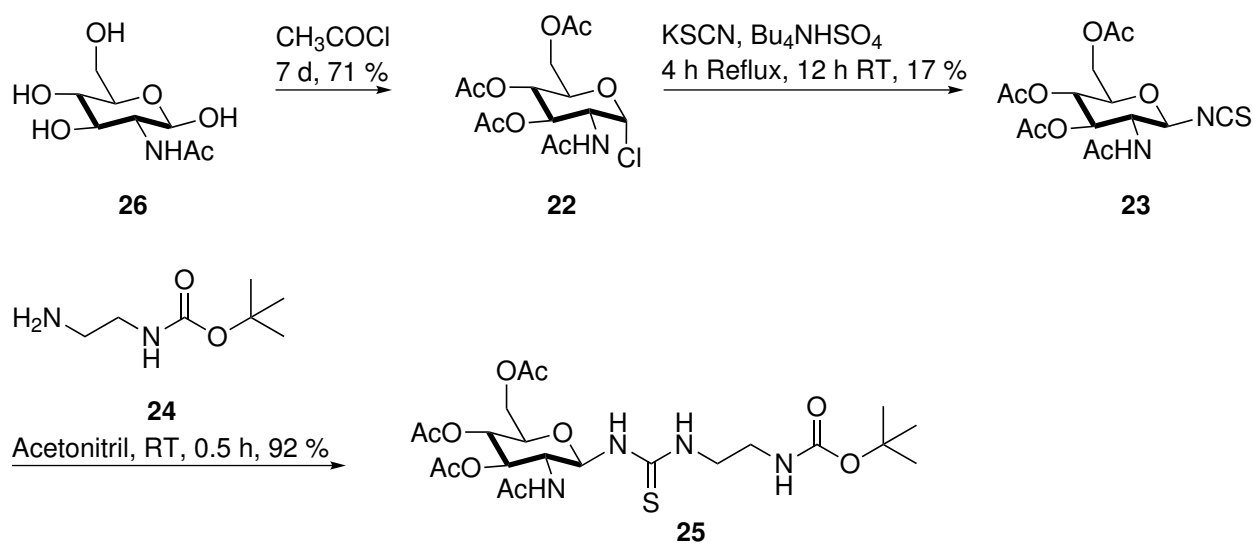


SCHEMA 9. Einführen des GlcNAc-Bausteins **13** mit enzymatischem Aufbau und abschließender Entschützung.

3.1.1.3. Referenz-Verbindung

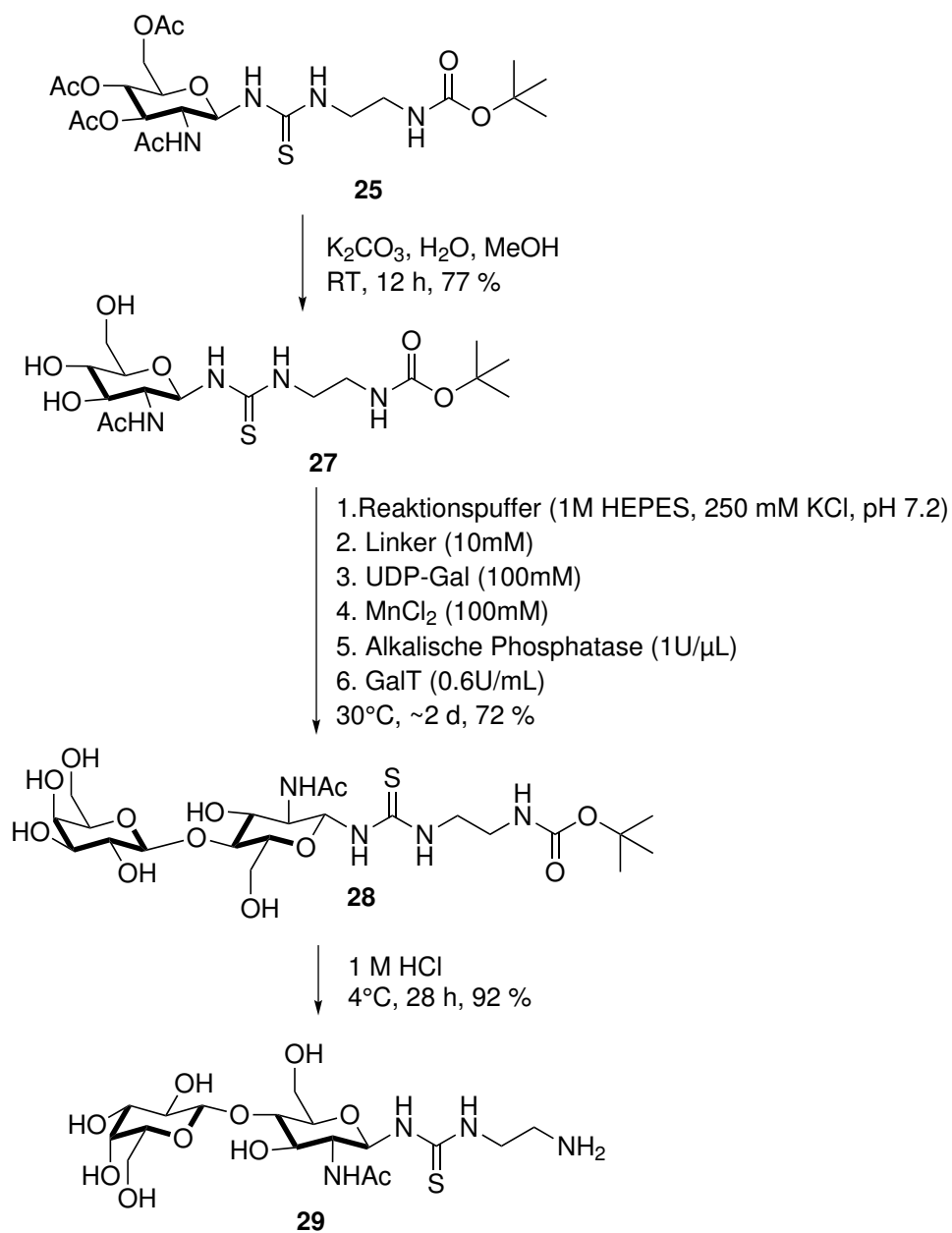
Zur Untersuchung des Effektes der photoaktiven Reaktivitätsfunktion auf die Bindungsstabilität zwischen Oberfläche und Galektin-3 der beiden zuvor dargestellten Verbindungen **6** und **21** wurde eine Referenzverbindung entworfen, welche lediglich aus einer Selektivitätsfunktion zur reversiblen Bindung von Galektin-3 und einem Amin zur Anbin-

dung auf der Oberfläche besteht (Schemata 10 - 11). So kann die Referenz mit den beiden azidhaltigen Verbindungen verglichen und eine Aussage über die Effektivität der Photoquervernetzung getroffen werden. Um eine Modifikation des *N*-Acetylglucosamins zu ermöglichen wurde dieses zunächst 7 d in Acetylchlorid gerührt.^[67] Hierbei wird, neben der Acetylierung der Hydroxygruppen, die 1'-Hydroxygruppe durch ein Chlorid substituiert. Einengen des Acetylchlorids und Auskristallisieren mit Diethylether aus Chloroform ergab die chlorierte Zwischenverbindung **22** mit einer Ausbeute von 71 %. Durch die erhöhte Elektrophilie am 1'-Kohlenstoff wird die anschließende Reaktion zum Isothiocyanat vereinfacht. Hierzu wurde Chlorid **22** in Acetonitril gelöst und mit Kaliumthiocyanat und Tetrabutylammoniumhydrogensulfat versetzt. Der Reaktionsansatz wurde 4 h refluxiert und anschließend weitere 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Aufgrund der zahlreichen Nebenprodukte bei dieser Reaktion ist die Ausbeute in der Regel gering. Nach säulenchromatographischer Reinigung wurde die Zielverbindung **23** mit einer Ausbeute von 17 % erhalten.^[68] Das so dargestellte Isothiocyanat **23** kann nun sehr leicht durch beliebige Nukleophile modifiziert werden. Durch einfache Reaktion zwischen Isothiocyanat **23** und mono-Boc-geschütztem Diaminoethan **24** in Acetonitril konnte innerhalb von 0.5 h ein quantitativer Umsatz zum Zielprodukt **25** beobachtet und selbiges mit einer Ausbeute von 92 % isoliert werden.^[68]



SCHEMA 10. Linkermodifizierung von *N*-Acetylglucosamin (**26**).

Mittels einer starken Base lassen sich die Hydroxygruppen durch Abspalten der Acetylgruppen wieder erhalten. Hierzu wurde die acetylgeschützte Verbindung **25** in K_2CO_3 -haltigem Methanol und 5 eq. Wasser gelöst und für 12 h gerührt. Durch anschließende Zugabe von stark saurem Ionentauscher (H^+ Form) wurde die Base neutralisiert und die Zielverbindung **27** mit 77 % Ausbeute erhalten. Da für die Galektin-3-Anbindung eine LacNAc-Funktion im Referenzmolekül zur Verfügung stehen muss, wurde die modifizierte GlcNAc-Verbindung **27** enzymatisch verlängert. Hierzu wird GlcNAc-Verbindung **27** in wässrigem Puffer mit GalT und UDP-Galaktose versetzt und für 2 d bei 30 °C inkubiert. Die Reinigung der Zielverbindung erfolgte über Waters SepPAK-Light Spritzenaufsätze auf denen die polaren Bestandteile, wie Proteine und UDP-Galaktose, von der weniger polaren Zielverbindung getrennt werden können. So wurde die Zielverbindung **28** mit einer Ausbeute von 72 % erhalten. Um die Referenzverbindung auf der Oberfläche immobilisieren zu können, wurde im letzten Schritt die Boc-Schutzgruppe des Amins mittels Reaktion bei 4 °C in Salzsäure (1 M) und anschließender Neutralisation mit Ionentauscher (Dowex 66) entfernt. Hierdurch konnte eine Ausbeute für Referenzverbindung **29** von 92 % und eine Gesamtausbeute von 5 % über 6 Schritte erzielt werden.



SCHEMA 11. Enzymatischer Aufbau und abschließende Entschützung der Referenzverbindung **29**.

3.1.2. Biochemische Untersuchungen der Photoquervernetzer zur kovalenten Bindung von Galektin-3 an eine Oberfläche

Die biochemischen Untersuchungen wurden in einer engen Kooperation mit Sophia Böcker vom Helmholtz Institut an der RWTH Aachen und Nadine Jansen vom DWI an der RWTH Aachen, durchgeführt. Dabei wurde die Beschichtung und Modifikation der Oberflächen mit den Photoquervernetzern von Nadine Jansen, und die Fluoreszenz- bzw. ELISA-Messungen von Sophia Böcker übernommen.

3.1.2.1. Untersuchung der synthetisierten Photoquervernetzer auf ihre Bindung an Galektin-3

Zur Untersuchung der dargestellten Verbindungen **29**, **6** und **21** auf ihre Funktion hinsichtlich der Bindung von Galektin-3 wurde in einem ersten Experiment die Inhibition der Bindung an eine mit Asialofetuin (ASF) beschichtete Oberfläche untersucht. Hierzu wurde eine Mikrotiterplatte mit ASF beschichtet und anschließend mit Rinderserumalbumin (BSA) vorbehandelt. Bei Asialofetuin handelt es sich um ein Glykoprotein, welches drei asparagingebundene, dreiarmlige Kohlenhydratketten mit LacNAc-Enden beinhaltet und so insgesamt neun LacNAc-Reste zur Verfügung stellen kann.^[69] Wird ASF auf eine Oberfläche aufgebracht, so ist es in der Lage Galektin-3 zu binden und auf der Oberfläche zu immobilisieren. Da eine mit ASF beschichtete Oberfläche nicht vollständig mit Protein bedeckt ist, kann es zwischem Galektin-3 und der Oberfläche zu einer unspezifischen Wechselwirkung kommen, in dessen Folge Galektin-3 auch auf der Oberfläche bindet, obwohl gar kein ASF vorhanden ist. Um diese „Leerstellen“ zu besetzen, wurde die Mikrotiterplatte nach der Beschichtung mit ASF zusätzlich mit BSA behandelt, welches sich auf eben diese Leerstellen setzt, aber nicht an ASF bindet. Da BSA wiederum keine Möglichkeit hat Galektin-3 zu binden, eignet es sich hervorragend für diesen Schritt, sodass ein positiver Galektin-3-Nachweis tatsächlich auf das Vorhandensein von ASF zurückzuführen ist. Bei dem hier eingesetzten Galektin-3 handelt es sich um ein Fusionsprotein, welches sowohl einen His₆- als auch einen SNAP-Tag und darüber hinaus ein *Yellow fluorescent protein* (YFP) besitzt. Dieses sogenannte HSY-Gal3 (His₆-, SNAP-, YFP-Gal3) wurde bei allen in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten eingesetzt. Die Bezeichnung Galektin-3 und Gal3 wird Äquivalent verwendet.

Wird auf eine wie oben beschrieben präparierte Oberfläche eine Lösung aus HSY-Gal3 und der zu untersuchenden Verbindung gegeben, so kann Galektin-3 sowohl an die Oberfläche als auch an die in Lösung befindlichen Moleküle binden. Bei konstanter Galektin-3-Konzentration, ASF-Immobilisierung und ansteigender Konzentration an Testverbindung wird der Anteil an auf ASF immobilisiertem Galektin-3 zunehmend geringer. Das nicht an die Oberfläche gebundene Galektin-3 wird anschließend durch Waschen entfernt. Um die Menge an immobilisiertem Galektin-3 zu bestimmen, wurde die Mikrotiterplatte nach dem Waschen mit Anti-His₆-Antikörper (POD gekuppelt) inkubiert. Dieser bindet an den His₆-Tag des Galektins und kann im Folgeschritt hinzugegebenes ODP-Substrat zu UV-aktivem Farbstoff oxidieren, welcher dann mittels UV-Spektroskopie quantifiziert werden kann. Je geringer die UV-Absorption, desto weniger Galektin-3 ist auf der Oberfläche immobilisiert und umso mehr Galektin-3 wurde an die Testverbindung gebunden und beim Waschschrift entfernt. Abbildung 2 zeigt das Ergebnis für diesen Versuch mit dem PEG-Photoquervernetzer 6 und dem Referenzmolekül 29.

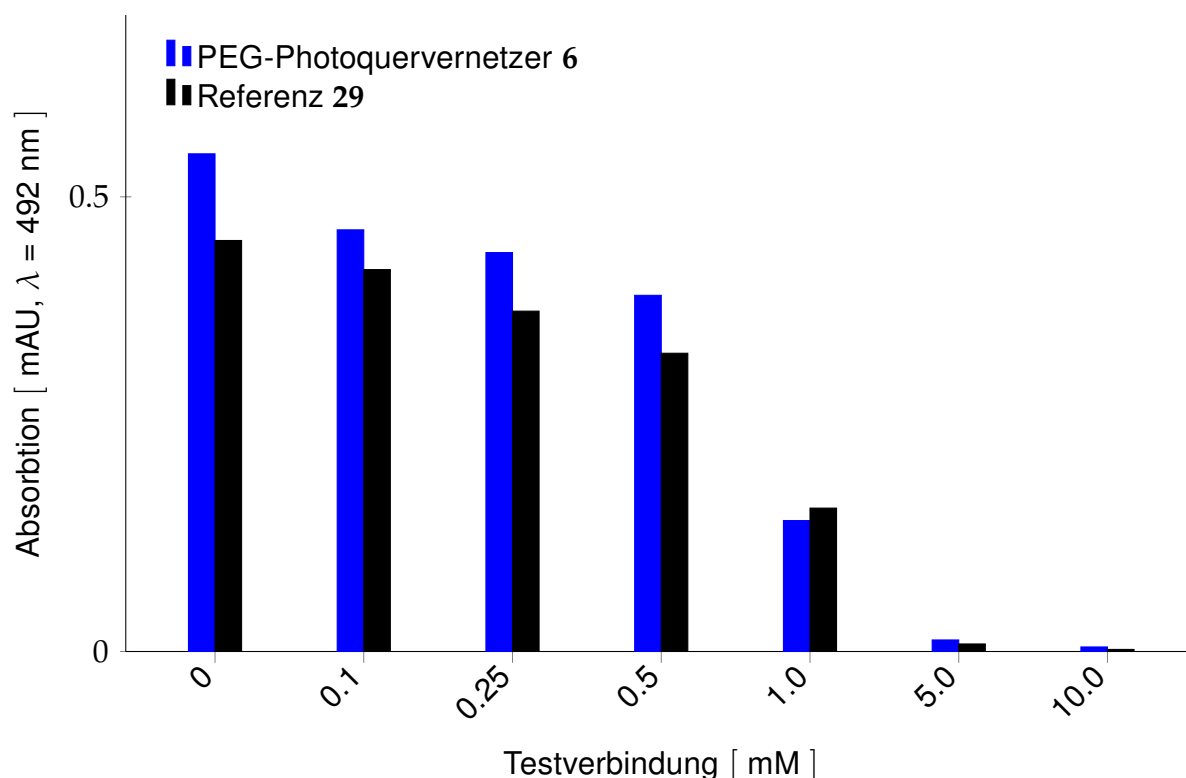


ABBILDUNG 2. Inhibition der Bindung von Galektin-3 auf ASF-modifizierter Oberfläche.

Wie in Abbildung 2 zu sehen ist, konnte Galektin-3 durch ansteigende Konzentrationen an LacNAc-haltigen Verbindungen (**29** und **6**) erfolgreich verdrängt und die Bindung von Galektin-3 an die Oberfläche unterbunden werden. Beide Verbindungen binden etwa gleich gut an Galektin-3. Dies zeigt, dass der PEG-Photoquervernetzer **6** in der Lage ist, Galektin-3 zu binden und somit für die eigentlichen Experimente, die kovalente Immobilisierung von Galektin-3 auf der Oberfläche zur Verfügung steht.

3.1.2.2. Optimierung der Modifikationskonzentration

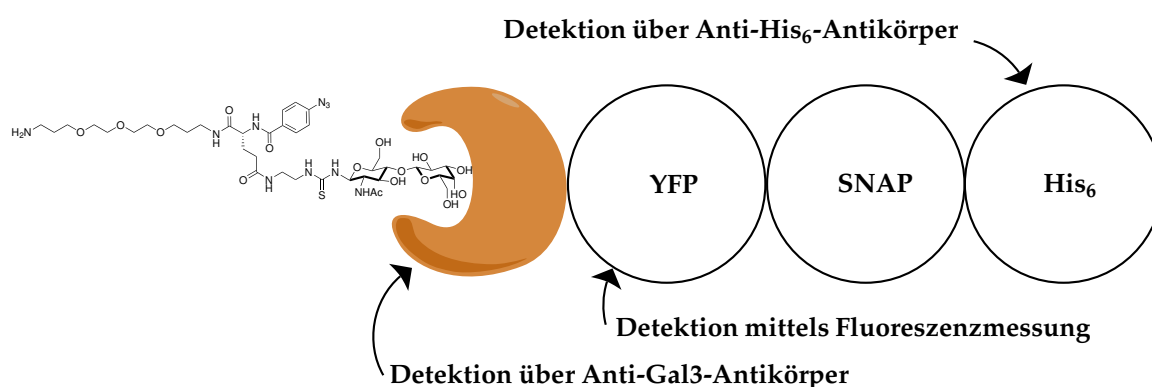


ABBILDUNG 3. Mögliche Detektionsmethoden zum Nachweis von Galektin-3 auf Oberflächen.

In den folgenden Experimenten soll die Anbindung der Photoquervernetzer **6** und **21** im Vergleich zur Referenz **29** an NCO-sP(EO-*stat*-PO)-modifizierten Mikrotiterplatten untersucht werden. Außerdem soll der Frage nachgegangen werden, welche Linkerlänge zur Bindung von Galektin-3 benötigt wird. Um nicht zu viel Substanz zu verbrauchen, gleichzeitig aber ein gut messbares, reproduzierbares Galektin-3-Signal zu erhalten, wurde eine Konzentrationsreihe durchgeführt. Hierzu wurden Mikrotiterplatten zunächst nach der Methode von *Beer et al.*^[50] mit NCO-sP(EO-*stat*-PO) beschichtet und anschließend mit verschiedenen konzentrierten Lösungen an Testsubstanz inkubiert. Die drei Substanzen **29**, **6** und **21** wurden hierbei jeweils in den Konzentrationen 0.1 mM, 0.25 mM, 0.5 mM, 1 mM, 2.5 mM und 5 mM eingesetzt und anschließend mit HSY-Gal-3 (5 μ M) inkubiert. Abbildung 4 zeigt den Fluoreszenzverlauf des gebundenen Galektin-3 in Abhängigkeit von der eingesetzten Linkerkonzentration.

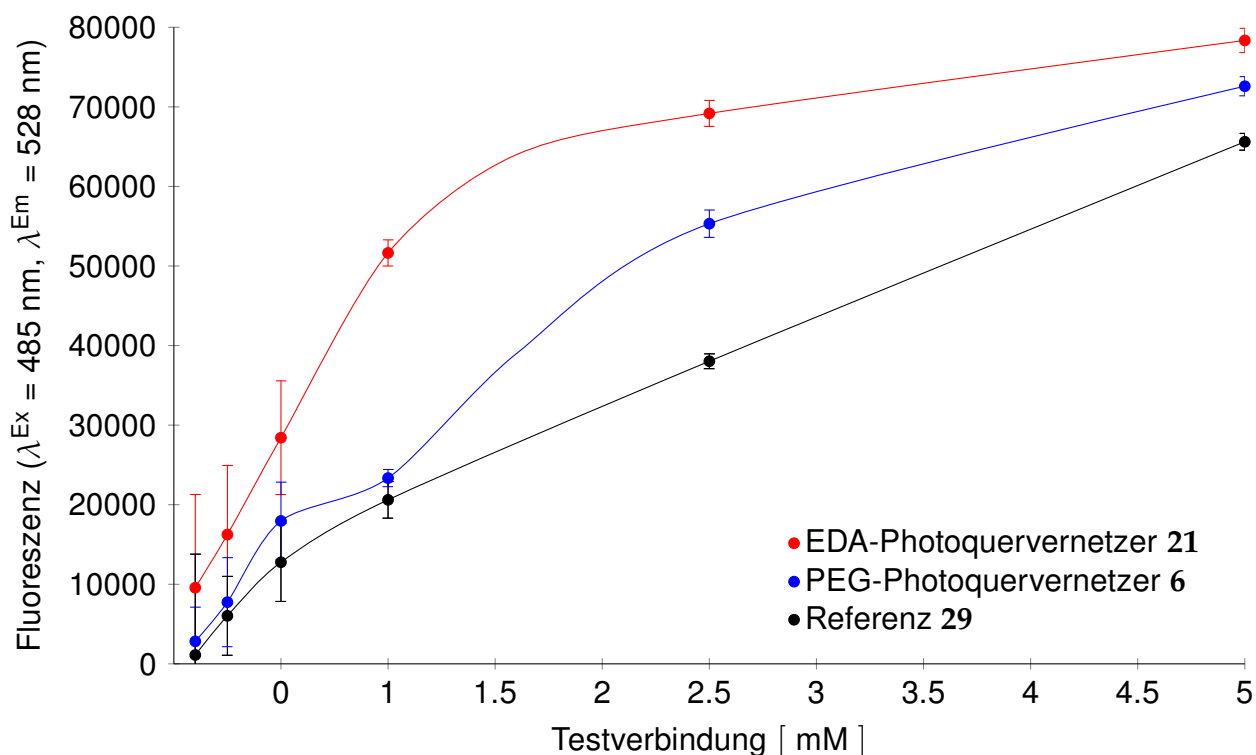


ABBILDUNG 4. Fluoreszenz des gebundenen HSY-Gal3 in Abhängigkeit von der Linkerkonzentration.

Wie aus Abbildung 4 hervorgeht, wurde Galektin-3 durch jeden der verwendeten Linker erfolgreich an die Oberfläche gebunden. Interessant ist hierbei, dass Referenzverbindung **29** das geringste Fluoreszenzsignal liefert, während der EDA-Photoquervernetzer **21** das höchste Fluoreszenzsignal gibt. Da geeignete Analysemethoden fehlen, kann nicht geklärt werden, ob diese Bindungsverhältnisse aufgrund von unterschiedlich starker Immobilisierung von Substanzen auf der Oberfläche oder durch unterschiedlich starke Bindung von Galektin-3 an die immobilisierten Zucker entstehen. Denkbar ist, dass sich die LacNAc-Reste in der Referenzverbindung **29** durch den sehr kurzen Linker nur knapp über der Oberfläche befinden und daher schlecht von Galektin-3 erkannt und gebunden werden können, während die Photoquervernetzer **6** und **21** einen ausreichenden Abstand von der Oberfläche liefern. Als beste Verbindung hat sich Substanz **21** gezeigt, da sie eine effektive Modifikation der Oberfläche ermöglicht und eine ausreichende Linkerlänge besitzt. Als Arbeitskonzentration für folgende Experimente wurde 5 mM gewählt.

3.1.2.3. Optimierung der HSY-Gal3-Konzentration

Nachdem für die Verbindungen eine optimale Modifizierungskonzentration von 5 mM gefunden werden konnte, wurde anschließend die Arbeitskonzentration von HSY-Gal3 bestimmt. Hierzu wurde eine Mikrotiterplatte mit der Referenzverbindung **29** beschichtet und anschließend mit verschiedenen Konzentrationen an Galektin-3 inkubiert. In Kapitel 3.1.2.2 hatte sich die Referenzverbindung **29** als Verbindung mit dem geringsten Fluoreszenzsignal gezeigt, sodass die Optimierung der Gal3-Konzentration mit dieser Verbindung durchgeführt wurde. Für die beiden Photoquervernetzer **6** und **21** sollte dadurch ein weitaus höheres Signal resultieren.

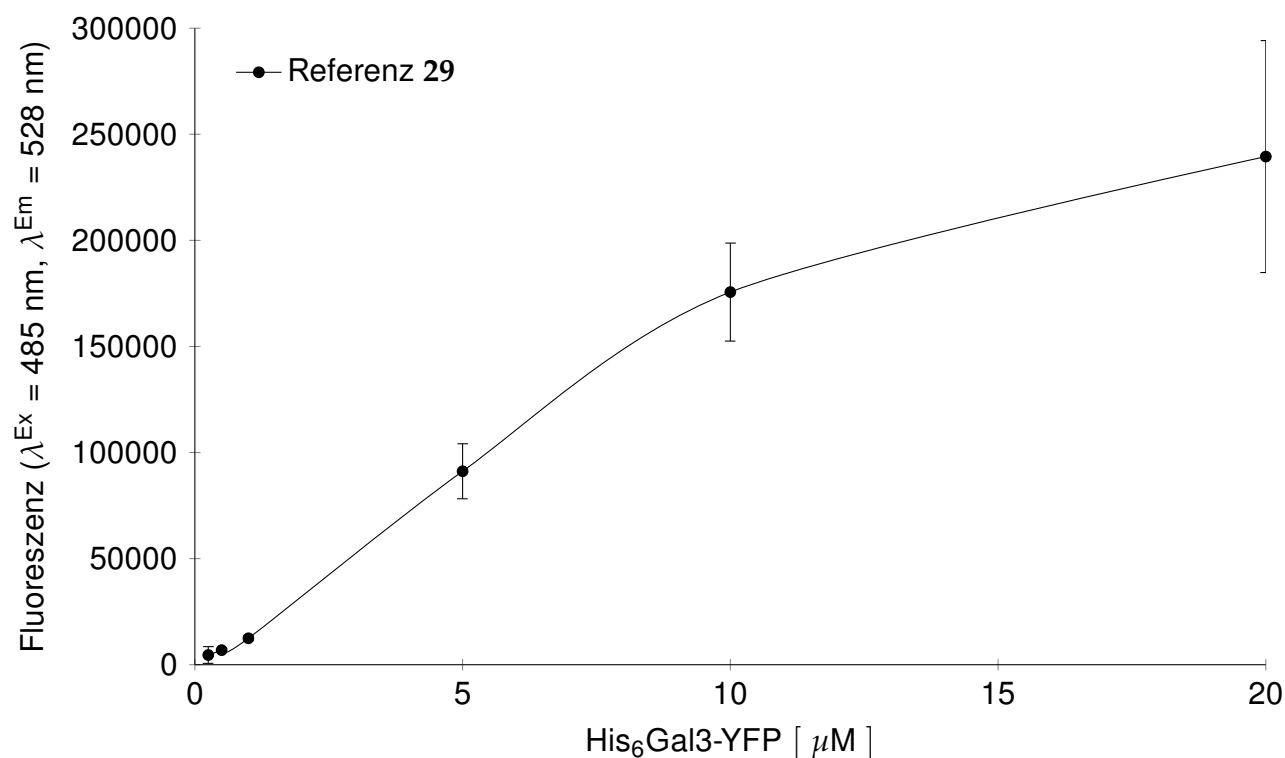


ABBILDUNG 5. Optimierung der Arbeitskonzentration von HSY-Gal3.

Abbildung 5 zeigt den Konzentrationsverlauf von HSY-Gal3 bei einer Modifikation der Oberfläche mit einer konstanten Konzentration von 5 mM der Referenzverbindung **29**. Eine Sättigung der Bindung von Galektin-3 an die Referenzsubstanz konnte nicht erreicht werden. Da sich aber ein signifikantes Fluoreszenzsignal ergibt, ohne übermäßig

viel Galektin-3 einzusetzen, wurde 5 μ M Galektin-3 als zukünftige Arbeitskonzentration festgelegt.

3.1.2.4. Testweiser Aufbau einer artifiziellen extrazellulären Matrix

Um die generelle Fähigkeit des hier entwickelten Systems zum Aufbau einer artifiziellen extrazellulären Matrix zu überprüfen, wurde eine Mikrotiterplatte mit Photoquervernetzer **21** und Galektin-3 modifiziert und anschließend mit ASF inkubiert. Hierbei sollte ASF an das auf der Oberfläche immobilisierte Galektin-3 binden und so die Fähigkeit von Galektin-3 weitere Glykoproteine zu binden bestätigen. Das eingesetzte ASF ist biotinyliert, sodass ein Nachweis mittels POD-gekoppeltem Streptavidin und anschließender Peroxidasereaktion möglich ist. Die in Abbildung 6 dargestellten Daten zeigen, dass eine mit LacNAc-haltiger Verbindung **21** und **29** modifizierte Mikrotiterplatte in der Lage ist selektiv Galektin-3 zu binden, welches anschließend erneut Glykoproteine wie ASF binden kann. Die Behandlung von NCO-sP(EO-*stat*-PO)-modifizierten Oberflächen ohne Verwendung von LacNAc-haltigen Strukturen mit Galektin-3, biotinyliertem ASF und anschließender Inkubation mit POD-gekoppeltem Streptavidin und nachfolgender Peroxidasereaktion zeigt dagegen ein deutlich geringeres Signal. Da aus vorherigen Versuchen bekannt ist, dass eine mit NCO-sP(EO-*stat*-PO)-modifizierte Oberfläche die Anbindung von Galektin-3 wirksam unterbindet, ist anzunehmen, dass das UV-Signal des Blanks von einer unspezifischen Bindung des biotinylierten ASFs oder des Streptavidin-Konjugates hervorgerufen wird. Dies zeigt, dass das zuvor beschriebene System prinzipiell zum Aufbau einer artifiziellen extrazellulären Matrix geeignet ist und die dargestellten Photoquervernetzer in der Lage sind, Galektin-3 auf Oberflächen zu immobilisieren, welches anschließend weitere für Galektin-3 spezifische Glykoproteine binden kann.

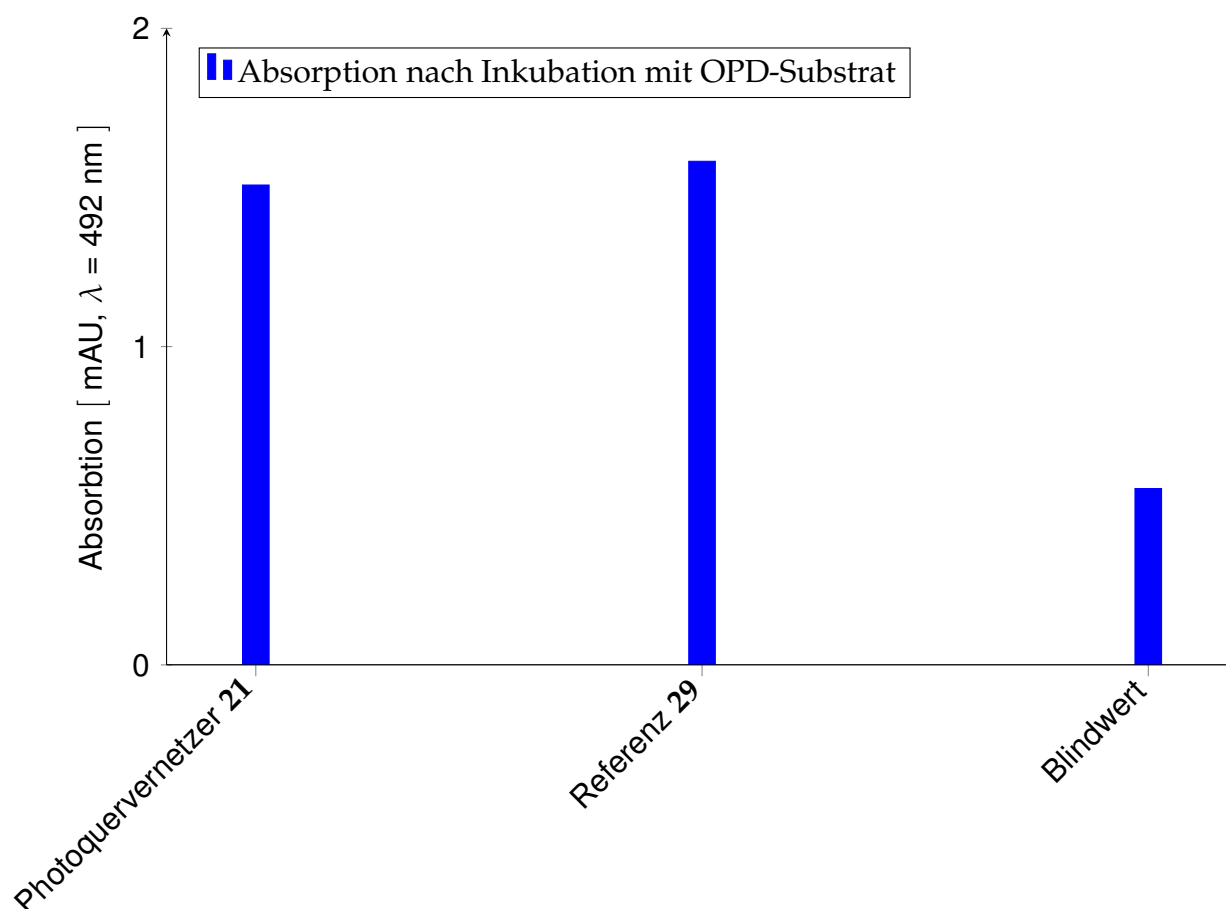


ABBILDUNG 6. Testweiser Aufbau einer artifiziellen extrazellulären Matrix. Der Blindwert wurde vor der Inkubation mit biotinyliertem ASF nicht mit LacNAc-haltiger Verbindung modifiziert.

3.1.2.5. Entfernung von reversibel gebundenem Galektin-3

Nachdem Galektin-3 erfolgreich auf der Oberfläche immobilisiert wurde, konnte im Nachfolgenden eine Methode zur Entfernung des nicht-kovalent gebundenen Galektin-3 entwickelt werden. Dies ist nötig um die Funktion des aromatischen Azids zur kovalenten Modifikation zu überprüfen. In der Theorie wird dies durch die Aktivierung des aromatischen Azids erreicht, welches bei Einstrahlen von UV-Licht zuvor reversibel gebundenes Protein kovalent bindet und so eine kovalente Fixierung des Proteins gewährleistet. Im Zuge von *Capture*-Experimenten, wie sie im Arbeitskreis *Weinhold* bereits durchgeführt wurden, konnte zuvor diese Fähigkeit des aromatischen Azids gezeigt werden.^[4] Um

diese Funktion nun auch auf Oberflächen nachweisen zu können, musste eine Methode entwickelt werden, bei welcher reversibel gebundenes Galektin-3 von der Oberfläche entfernt werden kann, um einen Unterschied in der Proteinmenge zwischen kovalent und reversibel gebundenem Protein nachzuweisen. Hierfür wurde eine Mikrotiterplatte wie zuvor mit NCO-sP(EO-*stat*-PO) und anschließend mit Testsubstanz beschichtet, mit HSY-Gal3 inkubiert und mit verschiedenen Waschlösungen behandelt. Das Ziel war die möglichst vollständige Entfernung von nicht-kovalent gebundenem Galektin-3. Da sich der EDA-Photoquervernetzer **21** bei der zuvor durchgeführten Konzentrationsreihe als der effektivere Linker herausgestellt hatte (Kapitel 3.1.2.2), wurde nur noch dieser neben der Referenz **29** verwendet.

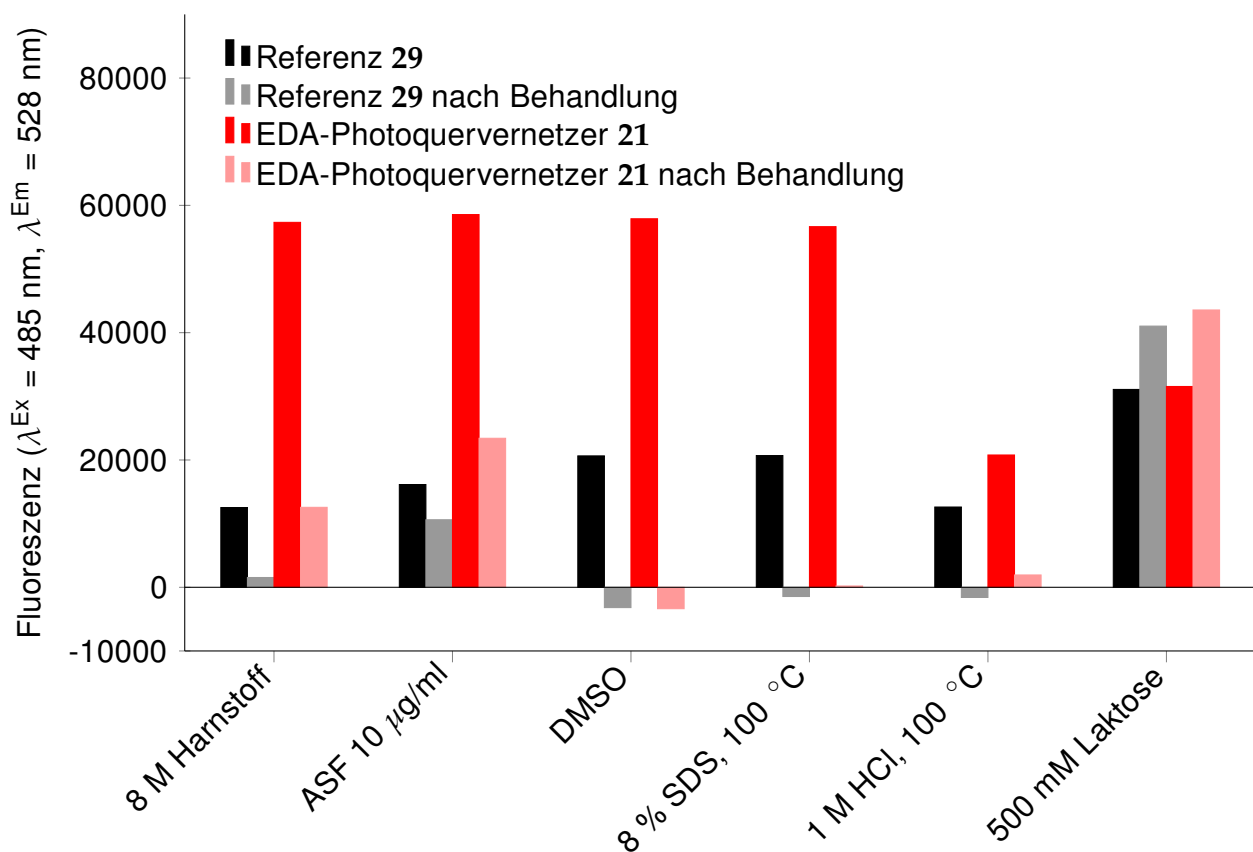


ABBILDUNG 7. Fluoreszenz vor und nach der versuchten Entfernung von HSY-Galektin-3. Negative Fluoreszenzwerte kommen durch die Subtraktion des Blindwertes zustande.

Wie aus Abbildung 7 zu erkennen ist, lässt sich HSY-Gal3 von der zuvor beschriebenen Oberfläche mit verschiedenen Methoden scheinbar unterschiedlich gut entfernen. Hierbei ist anzumerken, dass es sich nur bei der Verwendung von ASF und Laktose um eine Verdrängung handelt. Harnstoff, DMSO und SDS führen zur Denaturierung des Proteins während HCl (1 M) bei 100 °C zur Spaltung der glykosidischen Bindung des LacNAc-Zuckers führt. Auch wenn Abbildung 7 den Anschein erweckt, dass DMSO, SDS und 1 M HCl eine sehr gute Entfernung des Galektins von der Oberfläche ermöglichen, konnte in einem Folgeexperiment beobachtet werden, dass YFP unter den hier beschriebenen Bedingungen ebenfalls denaturiert was zu einem negativen Galektin-3-Nachweis führt, auch wenn sich Galektin-3 noch auf der Oberfläche befindet. Um die tatsächlich vorhandene Restmenge an Galektin-3 nach den beschriebenen denaturierenden Schritten zu bestimmen, wurde in einem nächsten Experiment die Menge an Galektin-3 zusätzlich mittels ELISA über Anti-His₆-Antikörper bestimmt. Aufgrund der bereits durch Fluoreszenzmessung nachgewiesenen, nur minimalen Verdrängung durch Laktose wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt. Da sich die Detektion mittels Antikörper experimentell bedingt nicht mehrfach pro Vertiefung durchführen lässt, sind in Abbildung 8 nur die Werte nach Behandlung dargestellt, welche im Verhältnis zueinander betrachtet werden.

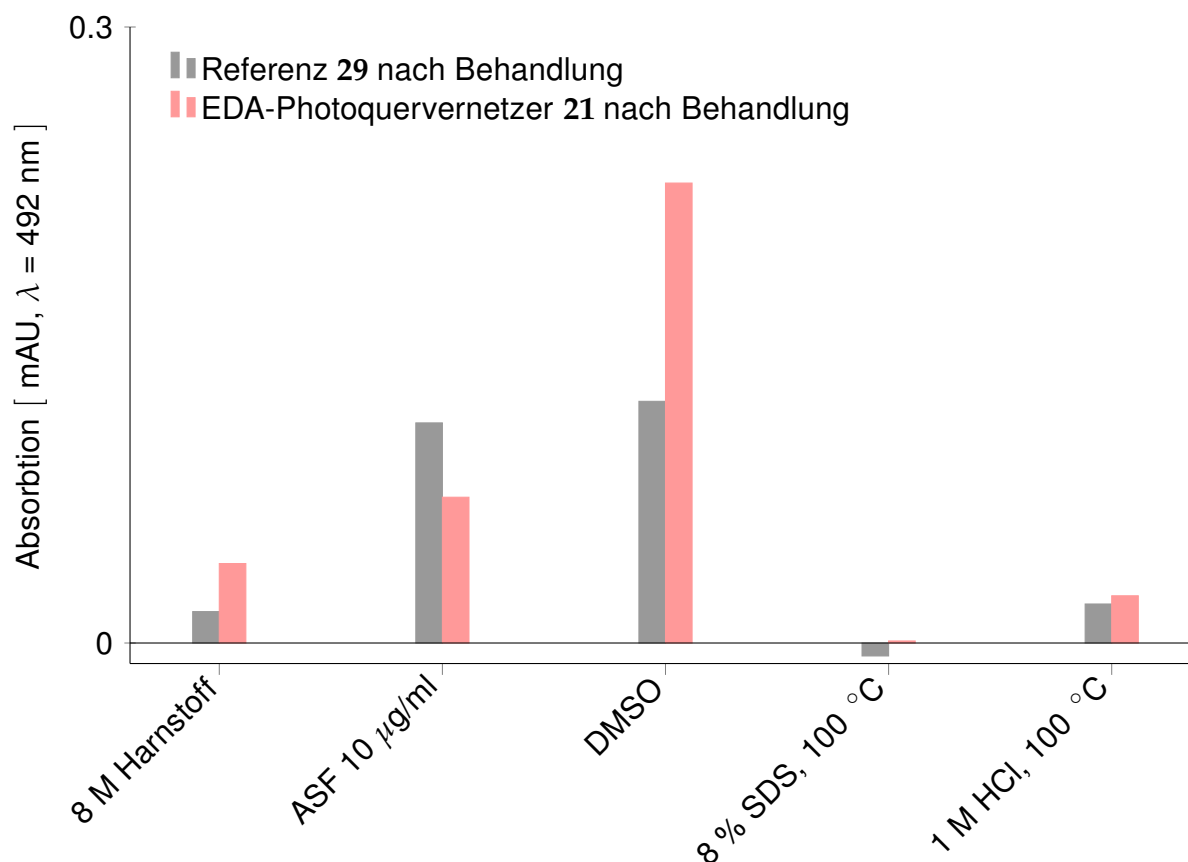


ABBILDUNG 8. ELISA nach der versuchter Entfernung von HSY-Gal3 mittels verschiedener Reagenzien.

Wie aus Abbildung 8 ersichtlich ist, ist die Messung der Fluoreszenz für die Bestimmung der Verdrängung nicht ausreichend. Im Gegensatz zur Fluoreszenzmessung konnte mittels ELISA gezeigt werden, dass die Denaturierung mit DMSO nicht ausreicht, um Gal3 von der Oberfläche zu entfernen. Die beste Entfernung des Galektins von der Oberfläche konnte mit 8 % SDS bei 100 °C erreicht werden, während 1 M HCl bei 100 °C und 8 M Harnstoff eine signifikante aber unvollständige Entfernung des Galektins ermöglichen. Da die Methoden mit SDS und HCl unter sehr harschen Bedingungen durchgeführt wird und eine Beschädigung der Oberfläche nicht ausgeschlossen werden kann, sollte im Folgenden mit 8 M Harnstoff gearbeitet werden.

3.1.2.6. Kovalente Bindung von Galektin-3

Nachdem gezeigt werden konnte, welche Konzentrationen an Photoquervernetzer (**6** und **21**) und Galektin-3 zu verwenden sind um ein möglichst hohes Signal bei gleichzeitig geringem Einsatz von Materialien zu gewährleisten und darüber hinaus eine Möglichkeit gefunden werden konnte um Galektin-3 zuverlässig von der Oberfläche zu entfernen, sollte im nächsten Schritt der Effekt der Photoquervernetzer auf die Anbindung von Galektin-3 an die Oberfläche untersucht werden. Bei vorangegangenen Photoquervernetzungs-Experimenten wurde ein Einfluss der Bestrahlung auf die Funktion des His₆-Tags des Galektins beobachtet. Dieser Einfluss zeigte sich in einer Modifikation des His₆-Tags, welche eine Erkennung durch den Anti-His₆-Antikörper und damit eine Detektion von Galektin-3 verhinderte. Da die Bestrahlung weiterhin einen Einfluss auf die Fluoreszenzintensität des gekoppelten YFP hat und es hierbei zu *Bleaching*-Effekten kommt, wurden für die folgenden Experimente Galektin-3 Antikörper verwendet, welche Galektin-3 direkt anhand der Aminosäuresequenz erkennen. Um den Effekt der Photoquervernetzung zu untersuchen, wurde die Mikrotiterplatte wie zuvor beschrieben zunächst mit NCO-sP(EO-stat-PO) beschichtet, mit EDA-Photoquervernetzer **21** modifiziert und anschließend mit Galektin-3 versetzt. Nachfolgend wurde ein Teil der Platte für 30 min im Kühlraum bei 4 °C mit einer UV-Lampe (Caprobox, 270 nm - 310 nm) bestrahlt, während die andere Hälfte der Platte bei 4 °C gelagert wurde. Anschließend wurde für jede Vertiefung zunächst die Fluoreszenz bestimmt, jede Vertiefung für 1 h mit Harnstoff (8 M) behandelt und nach dem Waschen mit PBS-Puffer für 30 min mit Galektin-3 Antikörper inkubiert. Aufgrund der fehlenden direkten Nachweismöglichkeit der Galektin-3-Antikörper, wurden diese mit Anti-Maus-Antikörpern behandelt, welche eine Peroxidase tragen und geeignete Substrate in Farbstoff umwandeln kann, welcher mittels UV-Absorption detektiert werden kann.

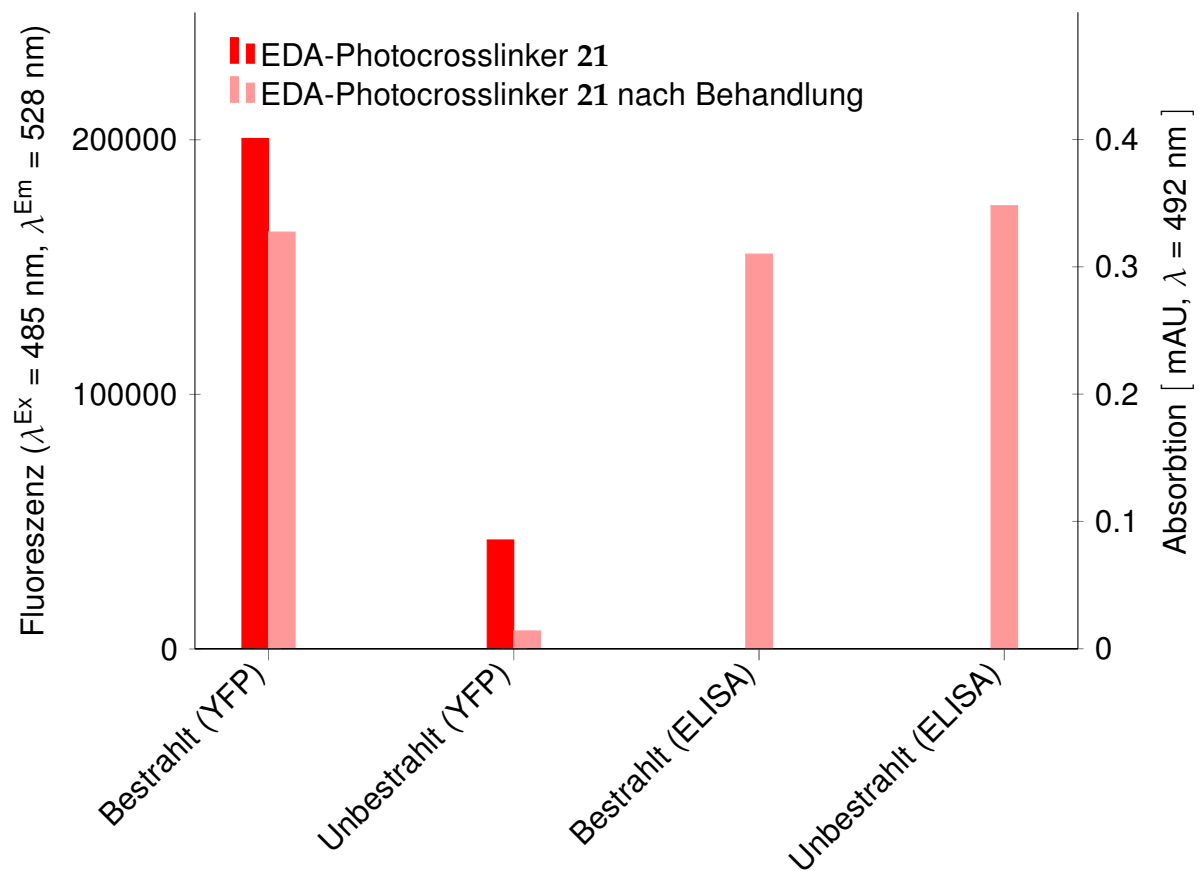


ABBILDUNG 9. Fluoreszenz und ELISA nach Entfernung von nicht-kovalent gebundenem HSY-Gal3.

Wie in Abbildung 9 zu sehen ist, konnte wie erwartet keine vollständige Entfernung des Galektins erreicht werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Beobachtungen aus Kapitel 3.1.2.5 wo bereits gezeigt wurde, dass nach Behandlung der Oberfläche mit Harnstoff ein positiver ELISA erhalten wurde. Ein interessanter Aspekt ist die unterschiedliche Fluoreszenzintensität bei diesem Experiment. Das Signal für die Vertiefungen mit „bestrahltem“ Galektin-3 direkt nach der Inkubation und die Vertiefungen mit „unbestrahltem“ Galektin-3 direkt nach der Inkubation zeigen extrem unterschiedliche Fluoreszenzwerte. Zunächst ist anzumerken, dass die Begriffe „bestrahlt“ und „unbestrahlt“ bei der Fluoreszenzmessung nur zur Unterscheidung der Vertiefungen dienen und zu diesem Zeitpunkt noch nicht bestrahlt wurden. Es handelt sich hierbei um jeweils 3 Vertiefungen, welche auf die gleiche Art und Weise behandelt und lediglich mit Galektin-3 inkubiert wurden. Bei genauerer Betrachtung dieses Phänomens zeigte sich, dass die Fluoreszenzintensität einer

unbehandelten Mikrotiterplatte enormen Schwankungen unterliegt und so das Ergebnis der Fluoreszenzmessung für Galektin-3 beeinträchtigen kann. Aus den Fluoreszenzwerten für die Entfernung von Galektin lässt sich dies erkennen. Zwar ist die Fluoreszenz nach der erfolgten Bestrahlung und anschließender Behandlung mit Harnstoff sowohl für die bestrahlten als auch für die unbestrahlten Vertiefungen kleiner geworden, die Differenz zwischen Fluoreszenz vor und nach der Entfernung von Galektin ist jedoch absolut gesehen gleich. Da ein Verdrängen von Proteinen in der Regel prozentual zur Menge an Protein beobachtet wird, kann davon ausgegangen werden, dass die enorm hohe Fluoreszenz der bestrahlten Vertiefungen mit einem sehr hohen Hintergrundsignal der Platte einhergeht. Der Nachweis von Galektin mittels Antikörper zeigt darüber hinaus keinen messbaren Unterschied zwischen den bestrahlten und den unbestrahlten Vertiefungen. Dies unterstützt die Annahme des hohen Hintergrundsignals der verwendeten Platte, da die Fluoreszenz bereits eine absolut gesehen gleiche Verdrängung von Protein zeigte, was darauf schließen lässt, dass in allen betrachteten Vertiefungen die gleiche Menge Protein vorhanden ist. Dass sich zwischen den bestrahlten und den unbestrahlten Vertiefungen nach der versuchten Entfernung von Galektin-3 kein Unterschied zeigt, lässt sich durch eine sehr niedrige Photoquervernetzungsausbeute bei der Photoreaktion zwischen dem aromatischen Azid und dem Protein erklären. Diese liegt im niedrigen, einstelligen Prozentbereich. Durch die unvollständige Entfernung von Galektin-3 ist die Restmenge an reversibel gebundenem Protein so hoch, dass sich durch die Bestrahlung kein messbarer Unterschied (Differenzmessung) ergibt. Dies zeigt, dass eine nahezu vollständige Entfernung von Protein von der Oberfläche notwendig ist, um einen kleinen Effekt der Photoquervernetzung zuverlässig anzuzeigen. Weitere Experimente müssen sich jetzt mit der Verwendung harscherer Bedingungen wie HCl bei 100 °C oder SDS bei 100 °C beschäftigen und überprüfen, ob die Oberfläche diese Bedingungen unbeschadet übersteht und dadurch ein messbarer Unterschied zwischen bestrahlten und unbestrahlten Proben sichtbar wird.

3.2. Selektivitätssteigerung von *Capture Compounds*

Um die Höhe des unspezifischen Beifangs bei *Capture*-Experimenten mit den im Arbeitskreis *Weinhold* etablierten trifunktionalen Fängerverbindungen bestimmen zu können, wurden vier neue Fängerverbindungen synthetisiert. Zunächst wurde eine Referenzverbindung dargestellt, die der von *Samir Charrack* entwickelten Fängerverbindung sehr ähnlich ist. Diese neue Verbindung **30** unterscheidet sich lediglich in der Verwendung von Glutaminsäure statt Asparaginsäure als zentralem Baustein und sollte die Synthese erleichtern. Um eine mögliche zufällige, bimolekulare Reaktion zwischen photoaktiviertem Azid und Protein zu unterbinden, wurde in der Fängerverbindung **31** zusätzlich eine potentiell selbstquenchende Funktion in Form eines Lysin-Restes eingeführt. Dieser soll bei nicht reversibel gebundenem Protein mit dem aktivierten Azid intramolekular reagieren und so eine bimolekulare Reaktion verhindern. Da auch eine weitere Wechselwirkung zwischen der *Capture Compound* und dem Protein als Ursache für den beobachteten Beifang nicht ausgeschlossen werden kann, wurde zusätzlich eine Fängerverbindung ohne Selektivitätsfunktion hergestellt. Diese Verbindung **32** besteht nur aus aromatischem Azid, Linker und Sortierfunktion und sollte so den maximal möglichen Beifang zeigen. Um einen möglicherweise negativen Einfluss der selbstquenchenden Funktion in *Capture Compound* **31** zu untersuchen, wurde als vierte Verbindung die *Capture Compound* ohne Sortierfunktion **32** um einen Lysin-Rest erweitert. So steht Verbindung **33** zur Verfügung, welche eine gleichzeitige Untersuchung des maximal möglichen Beifangs und der möglichen Auswirkungen einer selbstquenchenden Funktion ermöglicht. Abbildung 10 zeigt die vier vorgestellten Verbindungen.

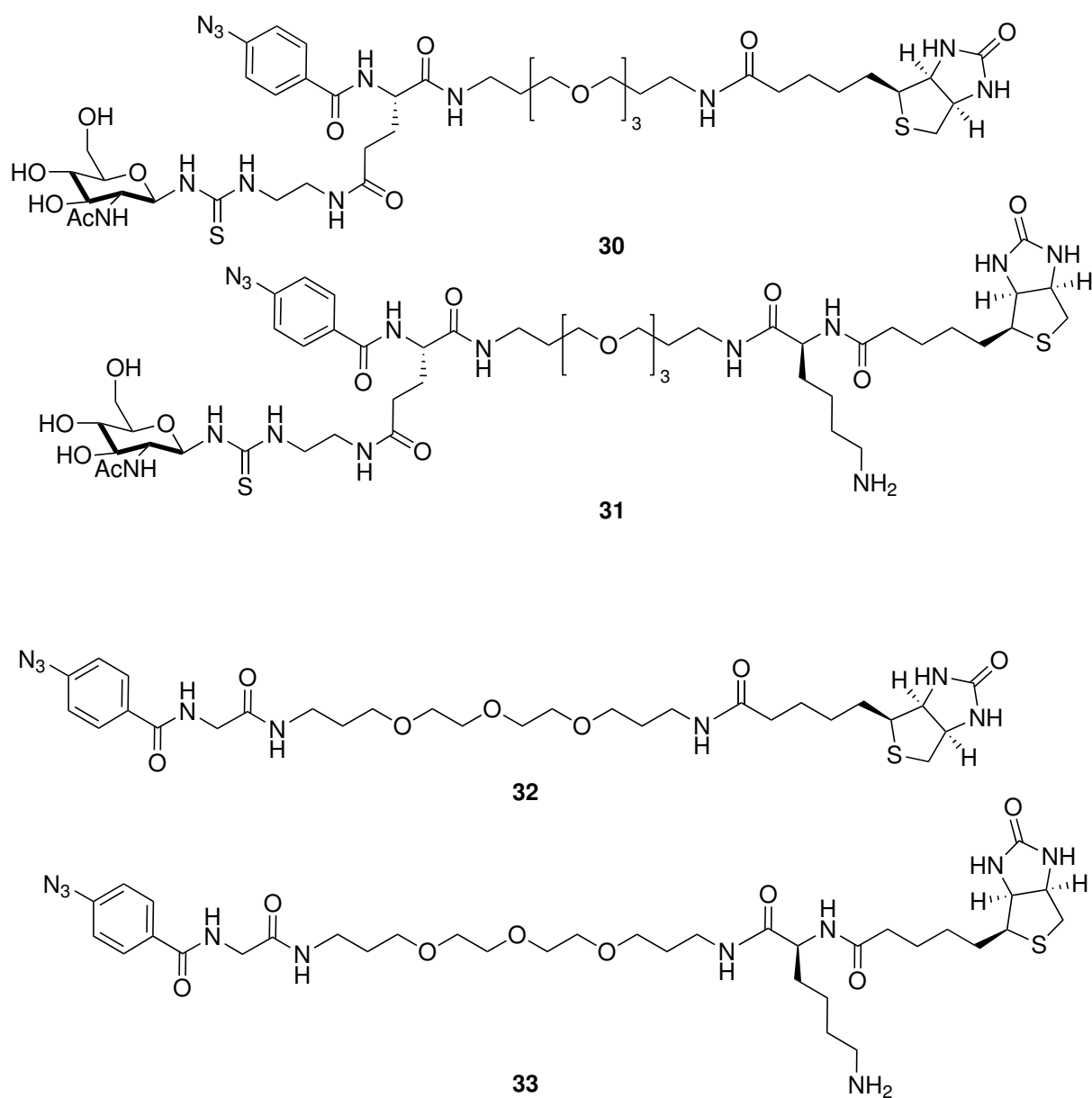
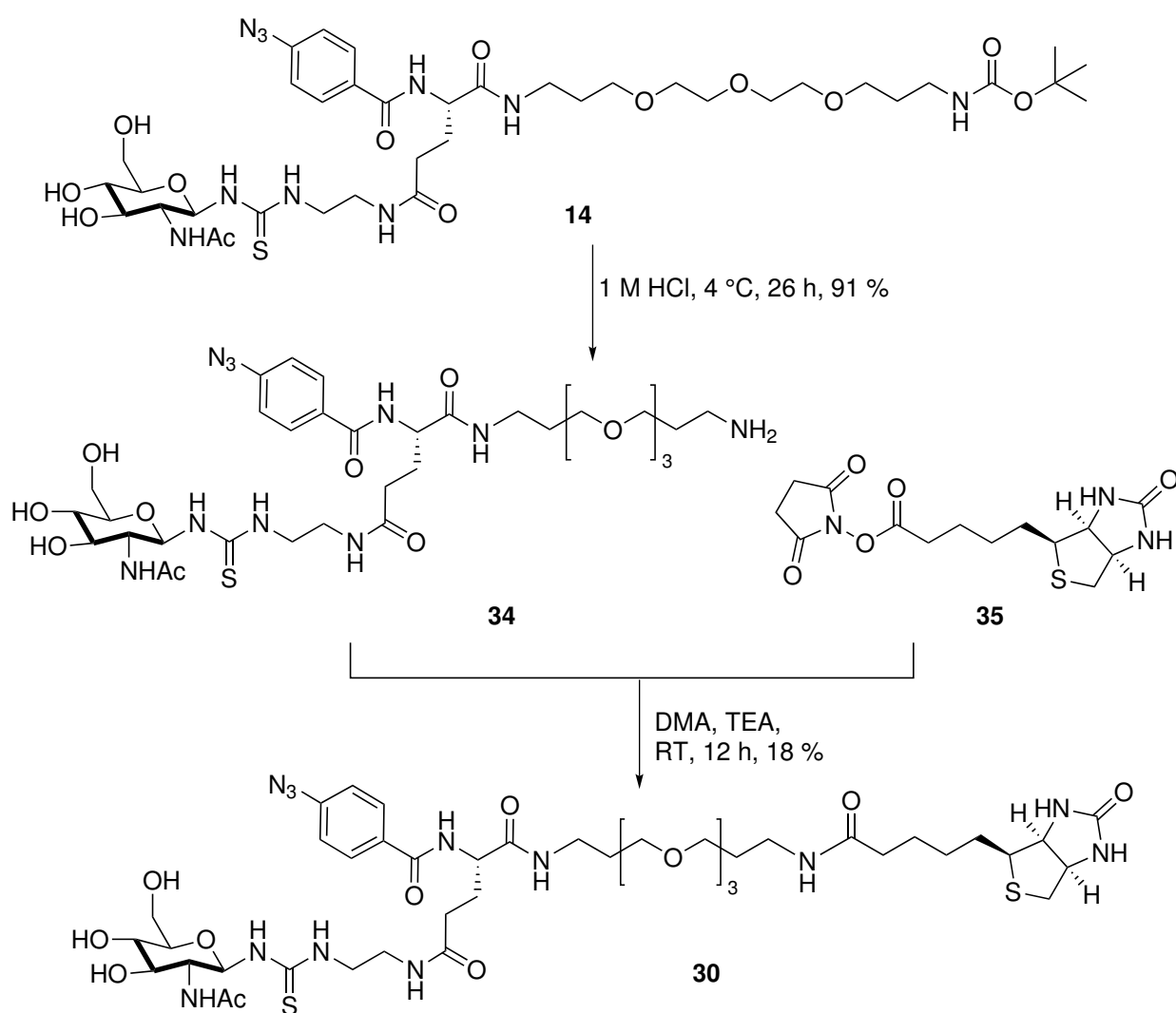


ABBILDUNG 10. Fängerverbindungen zur Untersuchung des unspezifischen Beifangs in *Cap*-*ture*-Experimenten.

3.2.1. Synthesen

3.2.1.1. Synthese von Referenz-Capture Compound 30

Da für die Fängerverbindungen **30** und **31** das gleiche Grundgerüst benötigt wurde wie für die in Kapitel 3.1 beschriebene Verbindung **6**, konnte bei der Synthese auf die Erfahrung und die bereits synthetisierten Zwischenstufen zurückgegriffen werden. So beschreibt dieses Kapitel die Synthese der Verbindungen **30** und **31** ausgehend von der in Schema 7 synthetisierten Verbindung **14**.



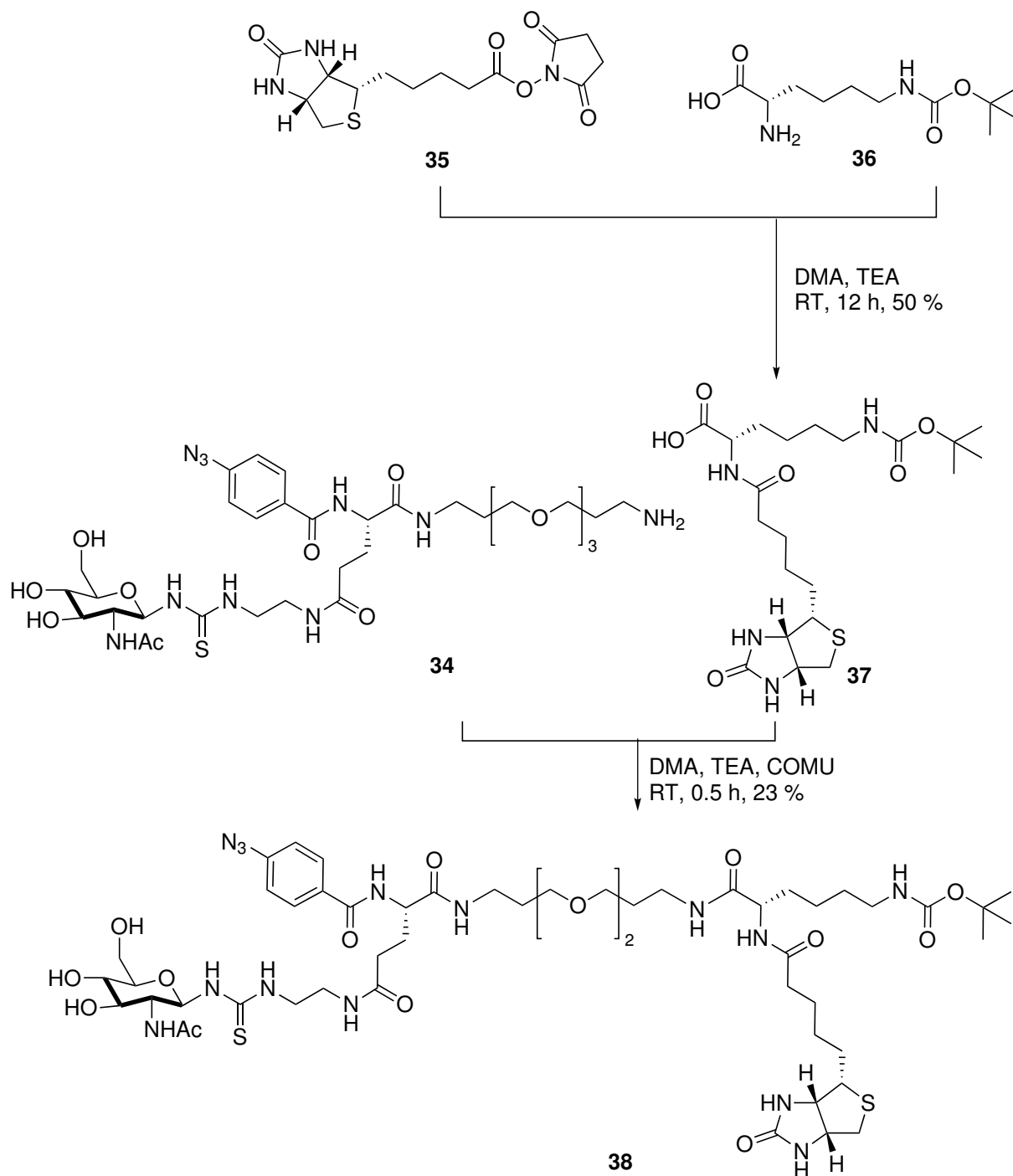
SCHEMA 12. Synthese der *Capture Compound* **30** ausgehend von geschützter Zwischenstufe **14**.

Wie in Schema 12 dargestellt, wurde zunächst die Entschützung der Aminogruppe durchgeführt. Hierzu wurde Boc-geschütztes Amin **14** in HCl (1 M) gelöst und 26 h bei 4 °C gerührt. Auf diese Weise wird eine vollständige Entschützung des Amins **14** bei gleichzeitigem Erhalt der glykosidischen Bindung gewährleistet. Das Produkt **34** konnte mit einer Ausbeute von 91 % isoliert werden. Um die Sortierfunktion einzuführen, welche später die Isolierung des *Capture Compound*-Protein-Konjugates ermöglicht, wurde zuvor NHS-aktiviertes Biotin (**35**) in einer nucleophilen Substitutionsreaktion eingeführt. Da sich die Reinigung des Endproduktes **30** aufgrund der hohen Polarität der Verbindung und dem dadurch sehr polaren Elutenten bei der Säulenchromatographie als sehr schwierig darstellte, wurde Biotin-NHS (**35**) bei dieser Reaktion im Unterschuss eingesetzt. Ein großes Problem bei der Synthese von biotinhaltigen Verbindungen ist die nicht quantitative Abtrennung von Biotin-Verbindungen aus dem Endprodukt. Freies Biotin kann im eigentlichen *Capture*-Experiment freie Bindungsstellen der streptavidinbeschichteten Beads besetzen und so die Ausbeute an gefangenem Protein herabsetzen. Durch die Verwendung von Biotin-NHS (**35**) im Unterschuss wird dieses Problem umgangen, da bei einer quantitativen Reaktion, wie sie hier zu beobachten ist, der gesamte Biotin-Rest in der Zielverbindung eingebaut wird. Überschüssige Zwischenstufe **34** und *N*-Hydroxysuccinimid, welche nicht umgesetzt wird bzw. bei der Reaktion entsteht, lassen sich einfach abtrennen und stören darüber hinaus die weiteren Experimente nicht. So konnte Zielverbindung **30** mit einer Ausbeute von 18 % und einer Gesamtausbeute von 6 % über 8 Schritte synthetisiert werden.

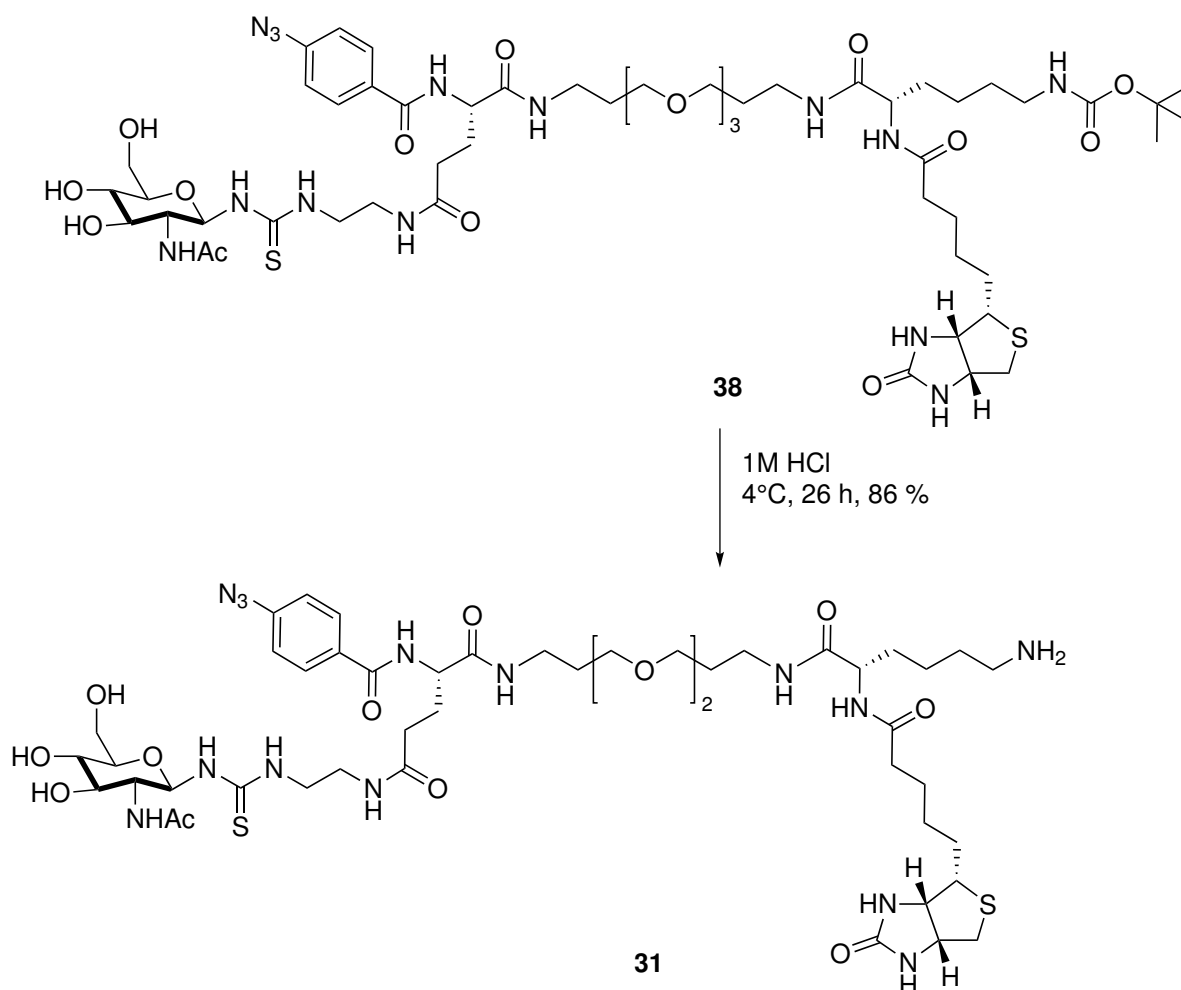
3.2.1.2. Einführen des potentiellen Selbstquenchers

Aufgrund des analogen Aufbaus konnte zur Synthese der potentiell selbstquenchenden Verbindung **31** die durch Entschützung mit HCl (1 M) bei 4 °C dargestellte Zwischenstufe **34** verwendet werden. Die Entschützung mittels Salzsäure hat für diese Reaktion neben der Erhaltung der glykosidischen Bindung des GlcNAc-Gerüsts einen weiteren positiven Effekt, welcher die folgende Synthese stark vereinfacht. Grundsätzlich lässt sich die Boc-Schutzgruppe mit verschiedensten, starken sowohl organischen als auch anorganischen Säuren abspalten. Da anorganische Säuren in der Regel extrem starke Säuren sind und häufig oxidierend wirken, wird in der organischen Chemie meist mit Amei-

sensäure oder Trifluoressigsäure gearbeitet. Bei beiden Säuren handelt es sich jedoch um Carbonsäuren, welche bei unzureichender Entfernung beim Einsatz von COMU in der Folgereaktion mit dem entschützten Produkt **34** reagieren können. Dies würde zu Nebenprodukten führen, welche keine quenchende- und keine Sortierfunktion beinhalten und aufgrund der Stabilität der geknüpften Bindung keine weitere Modifikation zuließen. Die Verwendung von 1 M HCl mit anschließender Neutralisation der Säure mittels Ionentauscher umgeht dieses Problem durch den Einsatz einer nicht elektrophilen Säure, welche nicht durch COMU aktiviert werden kann. Da neben dem Lysin-Rest auch Biotin als Sortierfunktion eingeführt werden musste, konnte weiterhin zwischen einer linearen oder konvergenten Synthesestrategie gewählt werden (Schema 13). Da die konvergente Synthese im Allgemeinen zu besseren Ausbeuten führt, wurde zunächst Biotin-NHS (**35**) mit H-Lys(Boc)-OH (**36**) in Triethylaminbasischem *N,N*-Dimethylacetamid im Verhältnis 1:1.5 gemischt und 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Durch säulenchromatographische Reinigung konnte die Zielverbindung **37** mit einer Ausbeute von 50 % erhalten werden. Um das so präparierte Biotin-Lysin-Addukt **37** mit dem entschützten Amin **34** zu koppeln, wurde auf Aktivierung der Carbonsäure mittels COMU zurückgegriffen. Im Gegensatz zur klassischen Aktivierung der Carbonsäurefunktion mit gängigen Reagenzien wie Diisopropylcarbodiimid oder Dicyclohexylcarbodiimid und *N*-Hydroxysuccinimid, welche die Synthese eines aktivierten Esters, dessen Reinigung und anschließende Weiterreaktion mit dem gewünschten Amin verfolgt, kann eine Carbonsäure mittels COMU direkt mit dem gewünschten Amin gekuppelt werden. Im Gegensatz zur klassischen Carbonsäureaktivierung, welche bei neutralen bis leicht sauren pH-Werten durchgeführt wird und somit eine Direktkupplung mit Aminen verhindert, da diese protoniert vorliegen würden, wird die Kupplung mittels COMU unter leicht bis stark basischen Bedingungen durchgeführt. Unter diesen Bedingungen sind die eingesetzten Amine deprotoniert und können direkt mit der aktivierten Carbonsäure reagieren. Die Anwendung dieser Methode auf die Kupplung zwischen dem entschützten Amin **34** und dem eingangs dargestellten Biotin-Lysin-Addukt **37** in triethylaminbasischem DMA mit anschließender Entschützung in Salzsäure (1 M) und Reinigung mittels *reversed-phase*-HPLC ergab die Zielverbindung **31** mit einer Ausbeute von 86 % und einer Gesamtausbeute von 6 % über 9 Schritte (Schema 14).



SCHEMA 13. Syntheschema zur konvergenten Synthese der Zwischenverbindung 38.

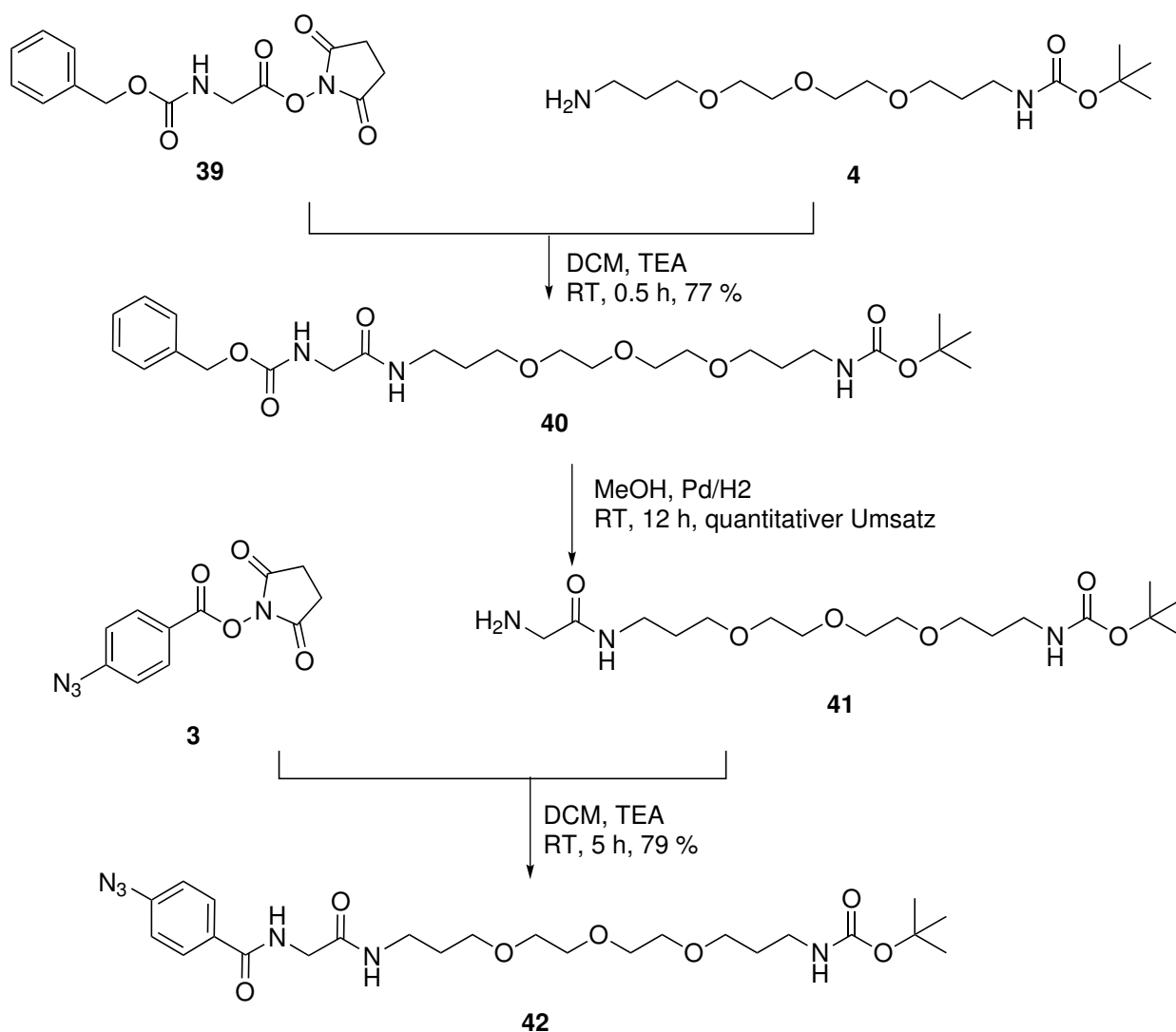


SCHEMA 14. Abschließende Entschützung zur potentiell selbstquenchenden Verbindung **31**.

3.2.1.3. Synthese einer bifunktionellen *Capture Compound*

Um eine unvollständige Verdrängung des Proteins bei *Capture*-Kontroll-Experimenten ausschließen zu können, wurde eine neue, bifunktionelle Fängerverbindung entwickelt, die keine Selektivitätsfunktion trägt. Durch das Fehlen der GlcNAc-Einheit, welche in den beiden trifunktionellen *Capture Compounds* **30** und **31** essentiell ist, entsteht eine bifunktionelle Verbindung, welche in späteren Kontroll-Experimenten eingesetzt werden kann. Kommt es bei der Verwendung einer bifunktionellen *Capture Compound* zum Einfangen eines Proteins, so kann eine unvollständige Verdrängung des Zielproteins als Ursache für den scheinbaren Beifang ausgeschlossen werden. Anders als die beiden trifunktionel-

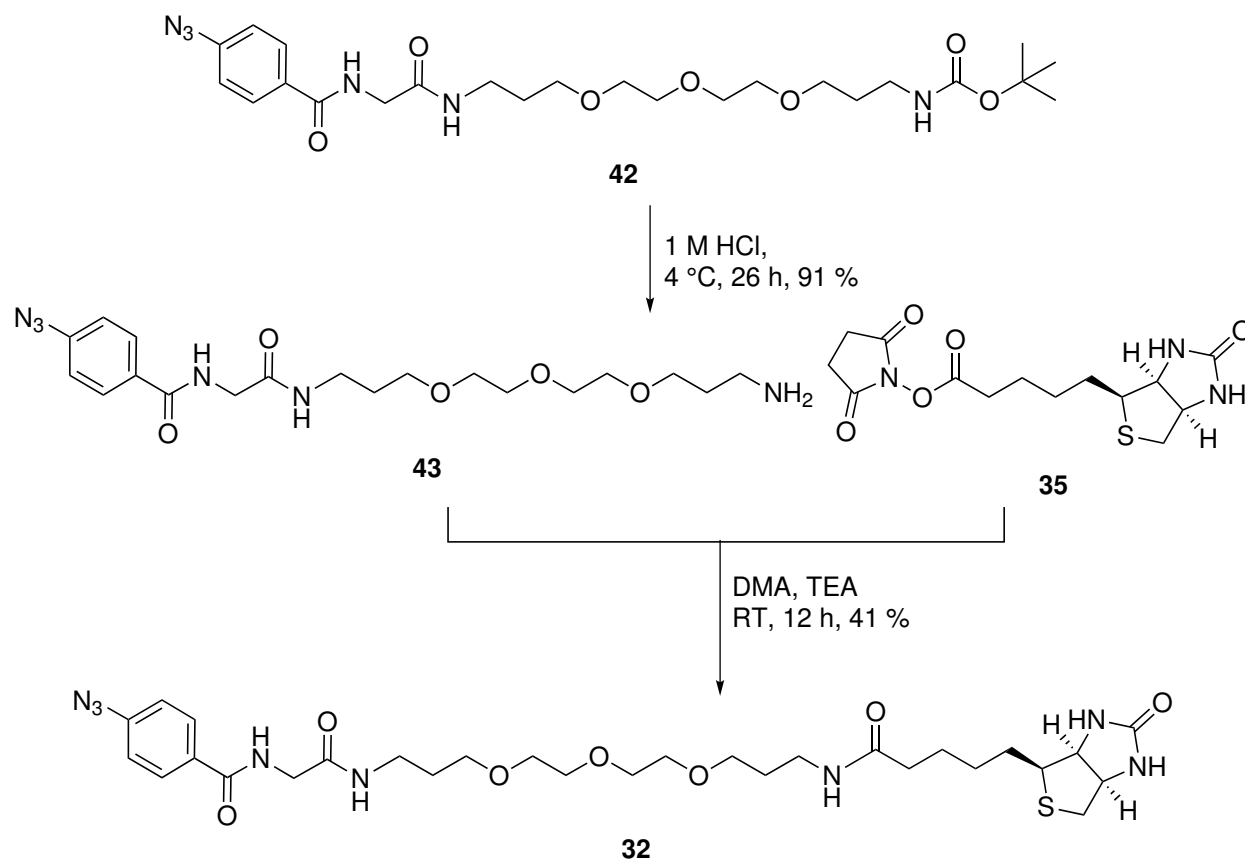
len Moleküle **30** und **31** wurde die bifunktionelle Verbindung **32** mit Glycin als zentralem Baustein aufgebaut. Dies hatte zur Folge, dass die gesamte Synthese der Zielverbindung durchlaufen werden musste und keine Zwischenstufen aus vorherigen Synthesen Verwendung fanden. Ausgehend von dem aktivierten Glycinderivat **39** wurde in einem ersten Schritt die geschützte Aminofunktion in Form eines wasserlöslichen Linkers eingeführt (Schema 15). Hierzu wurde Mono-Boc-geschütztes Amin **4** im Überschuss in Dichlormethan unter basischen Bedingungen in einer nucleophilen Substitution mit dem Glycinderivat **39** umgesetzt und nach vollständiger Reaktion mit Hilfe der Säulenchromatographie gereinigt. So konnte für die Zwischenstufe **40** eine Ausbeute von 77 % erzielt werden. Um die Reaktivitätsfunktion einzuführen, wurde die Cbz-Schutzgruppe der Zwischenstufe **40** zunächst unter reduktiven Bedingungen abgespalten und anschließend das Amin **41** in basischem Dichlormethan mit *p*-Azidobenzoessäure-NHS-Ester (**3**) umgesetzt. Durch säulenchromatographische Reinigung konnte für die Verbindung **42** eine Ausbeute von 79 % erzielt werden.



SCHEMA 15. Synthese einer bifunktionellen *Capture Compound* ausgehend von Glycinderivat 39.

Um die Sortierfunktion einführen zu können, wurde zunächst die Boc-Schutzgruppe in HCl (1 M) bei 4 °C abgespalten (Schema 16). Durch die Neutralisation mittels Ionentauscher konnte hier eine nahezu verlustfreie Aufarbeitungsmethode gewählt werden, welche die Zielverbindung 43 mit einer Ausbeute von 91 % ergab. Die abschließende Einführung der Sortierfunktion in Form von Biotin wurde durch klassische NHS-Ester-Chemie verwirklicht. Hierzu wurde entschütztes Amin 43 im Unterschuss mit Biotin-NHS-Ester (35) unter basischen Bedingungen umgesetzt und die Zielverbindung 32 säulenchroma-

tographisch gereinigt. Die bifunktionelle *Capture Compound* **32** konnte mit 41 % Ausbeute und einer Gesamtausbeute von 23 % über 5 Stufen dargestellt werden.

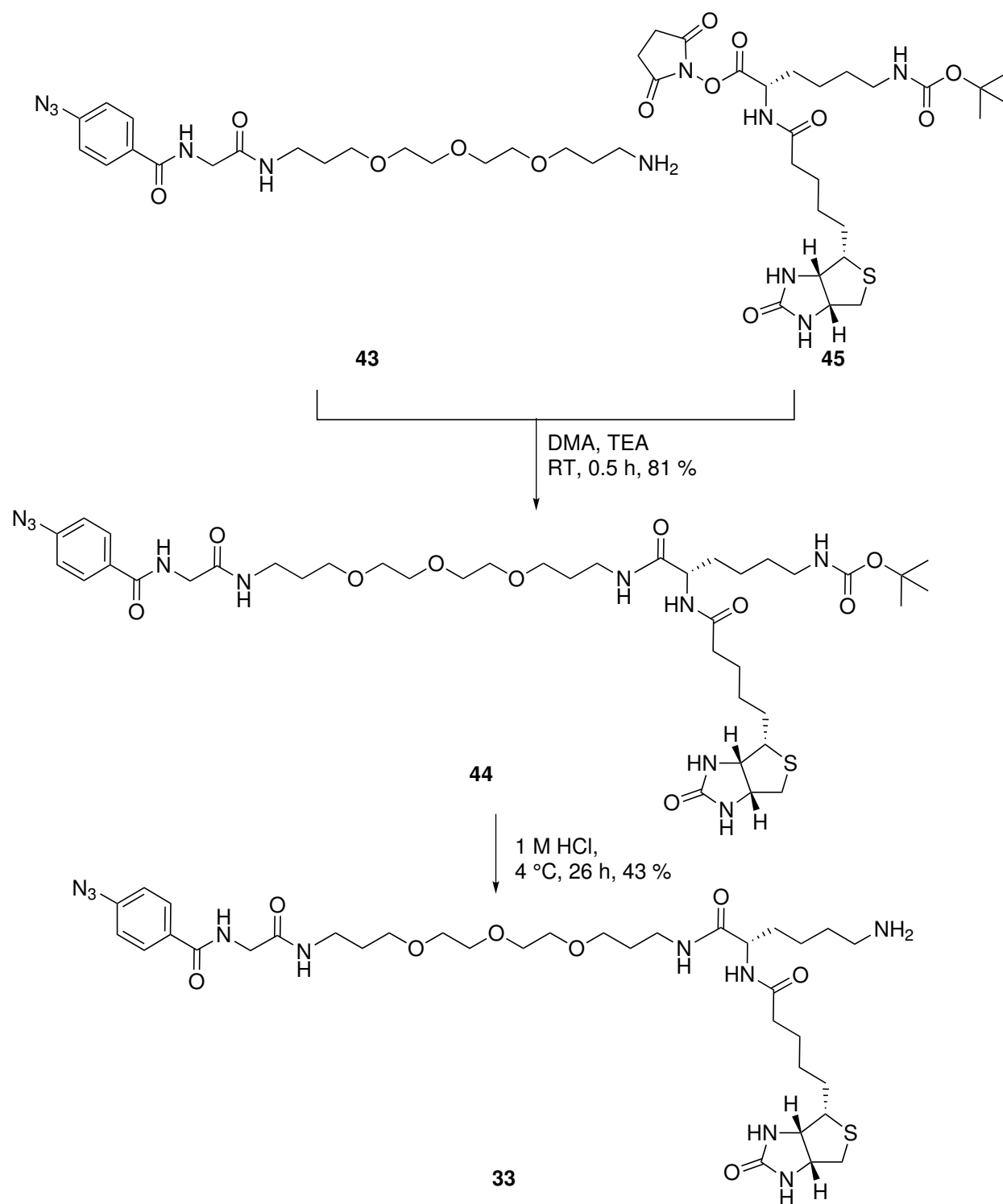


SCHEMA 16. Abschließende Einführung der Sortierfunktion zur Herstellung der bifunktionellen *Capture Compound* **32**.

3.2.1.4. Bifunktionelle Fängerverbindung mit selbstquenchernder Funktion

Mit der Synthese einer potentiell selbstquenchernden Komponente wie in Kapitel 3.2.1.2 beschrieben, wurde eine zusätzliche Funktion in die *Capture Compound* eingeführt, dessen Auswirkung noch nicht untersucht wurde. Aus diesem Grund sollte eine Kontrollverbindung synthetisiert werden, welche zwar eine Quencherfunktion, nicht jedoch eine Selektivitätsfunktion beinhaltet. So kann durch geeignete Experimente eine mögliche negative Auswirkung der quenchernden Funktion auf die *Capture*-Ausbeute untersucht werden. Denkbar ist hierbei eine ionische Wechselwirkung mit dem Zielprotein aufgrund

von zusätzlichen Ladungen, welche durch die zusätzliche freie Aminogruppe induziert wird. Durch Vergleich der beiden lysinhaltigen Verbindungen kann aufgrund der Selektivitätsfunktion eine Aussage über die Ursache des möglicherweise beobachteten Effekts gemacht werden. Aufgrund des analogen Aufbaus konnte zur Synthese dieser Kontrollverbindung die durch Entschützung mit HCl (1 M) bei 4 °C dargestellte Zwischenstufe **43** verwendet werden (Schema 17). Um die Kupplung zwischen Amin **43** und Biotin-Lysin-Addukt **37** zu vereinfachen, wurde die Kupplung über den NHS-Ester des Biotin-Lysin-Adduktes **37** durchgeführt. Die vorgeschobene, gezielte Aktivierung der Carbonsäure als *N*-Hydroxysuccinimidester unter klassischen Bedingungen mit EDC in DMA ermöglicht in einer darauffolgenden *in-situ*-Reaktion mit dem Amin **43** eine saubere Reaktion zur Zwischenstufe **44**. Für die *in-situ*-Umsetzung wurde Biotin-Lysin-NHS-Ester **45** zunächst wie zuvor dargestellt und die Reaktionslösung anschließend mit Amin **43** und Triethylamin versetzt. Durch säulenchromatographische Reinigung konnte die Zwischenstufe **44** mit einer Ausbeute von 81 % erhalten werden. Im letzten Schritt wurde mit der favorisierten Methode zur Entschützung von Boc-geschützten Aminen mittels HCl (1 M) bei 4 °C die Kontrollverbindung **33** mit einer Ausbeute von 81 % und einer Gesamtausbeute von 19 % über 6 Stufen erhalten.



SCHEMA 17. Synthese der bifunktionellen *Capture Compound* **33** mit potentiell selbstquenchem Lysin-Rest.

3.2.2. Untersuchung des Beifanges mittels der zuvor dargestellten Fängerverbindungen

Zur Untersuchung der unspezifischen Ausbeute („Beifang“) in *OffBead-Capture*-Experimenten wurden die vier in Kapitel 3.2 beschriebenen *Capture*-Verbindungen dargestellt. Wie bereits in Kapitel 2 beschrieben, kann ein unspezifisches Einfangen von Proteinen mit *Capture Compounds* drei Ursachen haben:

- Zufällige, unspezifische Reaktion des aktivierten Azids mit einem zufällig in der Nähe befindlichen Protein
- unspezifische reversible Verbindung von Protein an die Reaktivitätsfunktion
- unspezifische reversible Verbindung von Protein an die Sortierfunktion

Darüber hinaus kann eine unvollständige Verdrängung in dem Kontrollexperiment eine positive Bande für das zu fangende Protein ergeben und so eine scheinbar unspezifische Ausbeute anzeigen. Anhand der dargestellten *Capture*-Verbindungen und der damit durchgeführten *Capture*-Experimente sollte im Folgenden ermittelt werden, ob und mit welchem Ausmaß bzw. mit welcher Auswirkung auf die Ausbeute einer oder mehrere der oben genannten Effekte auftritt. Hierzu wurden alle Verbindungen mit zwei Lektinen sowohl in *OffBead*- als auch in *OnBead-Capture*-Experimenten, sowie mit und ohne Einsatz von Kompetitor getestet und die erhaltenen Ergebnisse zur Beantwortung der eingangs gestellten Aufgabenstellung herangezogen.

3.2.2.1. *OffBead-Capture*-Experimente

Zur Untersuchung einer zufälligen bimolekularen Reaktion zwischen aktiviertem Azid und Protein als Ursache für die scheinbar unspezifische Ausbeute bei *Capture*-Experimenten wurden zunächst die *OffBead*-Experimente durchgeführt. Fängerverbindungen **30**, **31**, **32** und **33** (Abbildung 10) wurden sowohl mit als auch ohne Kompetitor in *Capture*-Experimenten eingesetzt und die erhaltenen *Capture*-Ausbeuten bestimmt. Handelt es sich bei der Ursache für die scheinbare Unspezifität der Fängerverbindungen um eine unvollständige Verdrängung des jeweiligen Proteins, so sollten die bifunktionellen *Capture Compounds* **32** und **33** keine Ausbeute aufweisen, da sie keine Selektivitätsfunktion

beinhalten. Bei einer zufällig stattfindenden bimolekularen Reaktion zwischen aktiviertem Azid und Protein sollte die Ausbeute für die beiden bifunktionellen Verbindungen **32** und **33** identisch sein. Bei den trifunktionellen Verbindungen **30** und **31** wird in diesem Fall eine im Vergleich höhere Ausbeute erwartet, da hier die reversible Vorbindung der Selektivitätsfunktion mit Quervernetzung zusätzlich zur zufälligen bimolekularen Reaktion mit dem Protein hinzukommt. Abschließend kann bei diesen Experimenten der Einfluss der potentiell selbstquenchenden Verbindung untersucht und ggfs. eine Aussage über deren Effektivität getroffen werden.

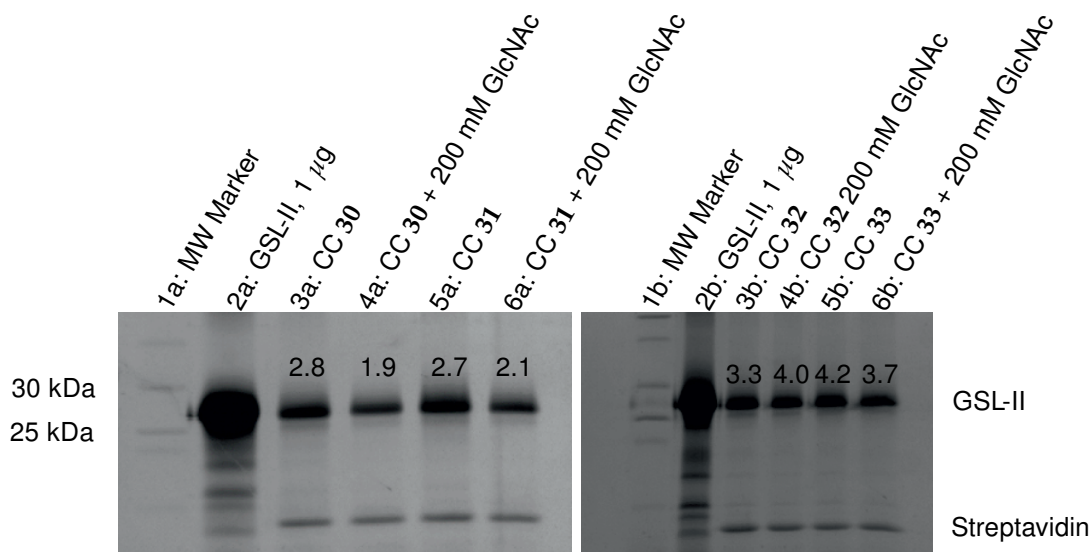


ABBILDUNG 11. *OffBeadCapture*-Experimente zum Einfangen von GSL-II (7 µM Bindungsstellen) mit den trifunktionellen *Capture Compounds* 30 und 31 sowie den bifunktionellen *Capture Compounds* 32 und 33 (jeweils 2 µM) in *Capture*-Puffer nach 30 min bestrahlen und GlcNAc-Verdrängungskontrollen. Die *Capture*-Ausbeuten, bezogen auf den gesamten Ansatz, wurden mittels ImageJ (V.1.48) durch Integration der Proteinbanden ermittelt und sind als Zahlenwert in % über der jeweiligen Bande dargestellt. Spur 1a: MW-Marker. Spur 2a: GSL-II-Standard (1 µg). Spur 3a: *Capture*-Experiment mit Verbindung 30. Spur 4a: *Capture*-Experiment mit Verbindung 30 und 200 mM GlcNAc als Kompetitor. Spur 5a: *Capture*-Experiment mit Verbindung 31. Spur 6a: *Capture*-Experiment mit Verbindung 31 und 200 mM GlcNAc als Kompetitor. Spur 1b: MW-Marker. Spur 2b: GSL-II-Standard (1 µg). Spur 3b: *Capture*-Experiment mit Verbindung 32. Spur 4b: *Capture*-Experiment mit Verbindung 32 und 200 mM GlcNAc als Kompetitor. Spur 5b: *Capture*-Experiment mit Verbindung 33. Spur 6b: *Capture*-Experiment mit Verbindung 33 und 200 mM GlcNAc als Kompetitor.

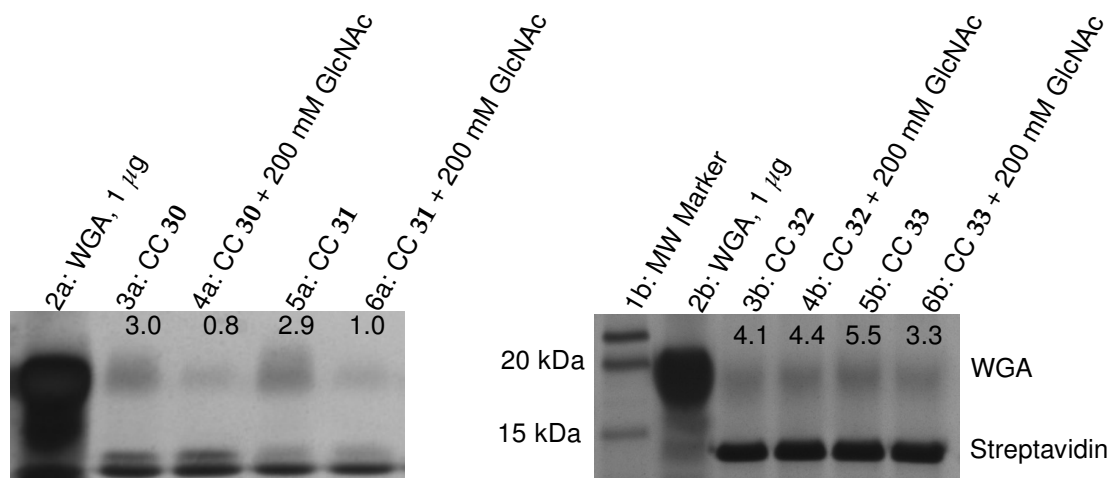


ABBILDUNG 12. *OffBead-Capture*-Experimente zum Einfangen von WGA (7 μ M Bindungsstellen) mit den trifunktionellen *Capture Compounds* 30 und 31 sowie den bifunktionellen *Capture Compounds* 32 und 33 (jeweils 2 μ M) in *Capture*-Puffer nach 30 min bestrahlen und GlcNAc-Verdrängungskontrollen. Die *Capture*-Ausbeuten, bezogen auf den gesamten Ansatz, wurden mittels ImageJ (V.1.48) durch Integration der Proteinbanden ermittelt und sind als Zahlenwert in % über der jeweiligen Bande dargestellt. Spur 1a: Leer, nicht dargestellt. Spur 2a: WGA-Standard (1 μ g). Spur 3a: *Capture*-Experiment mit Verbindung 30. Spur 4a: *Capture*-Experiment mit Verbindung 30 und 200 mM GlcNAc als Kompetitor. Spur 5a: *Capture*-Experiment mit Verbindung 31. Spur 6a: *Capture*-Experiment mit Verbindung 31 und 200 mM GlcNAc als Kompetitor. Spur 1b: MW-Marker. Spur 2b: WGA-Standard (1 μ g). Spur 3b: *Capture*-Experiment mit Verbindung 32. Spur 4b: *Capture*-Experiment mit Verbindung 32 und 200 mM GlcNAc als Kompetitor. Spur 5b: *Capture*-Experiment mit Verbindung 33. Spur 6b: *Capture*-Experiment mit Verbindung 33 und 200 mM GlcNAc als Kompetitor.

3.2.2.2. Untersuchung der bimolekularen Reaktion als Ursache für unspezifische Ausbeuten

Abbildungen 11 und 12 zeigen die Ergebnisse für die *OffBead-Capture*-Experimente mit GSL-II und WGA. Deutlich ist zu sehen, dass sich GSL-II nicht durch den Zusatz von GlcNAc verdrängen lässt (Abbildung 11, Spuren 4a, 6a, 4b, 6b), während dies für WGA im Falle der trifunktionellen Verbindungen 30 und 31 der Fall ist (Abbildung 12, Spuren 4a,

6a). Interessant ist hierbei, dass die beiden Verdrängungskontrollen für WGA beim Einsatz der bifunktionellen *Capture*-Verbindungen **32** und **33** negativ sind, d.h. keine Verdrängung aufweisen (Abbildung 12, Spuren 4b, 6b). Zunächst lässt sich, unter der Annahme, dass die Stoßwahrscheinlichkeit für die Reaktion zwischen *Capture Compound* und Protein trotz der unterschiedlichen Größe von WGA und GSL-II ähnlich sein sollte, aus dem Vergleich zwischen *OffBead*-Experiment mit GSL-II und *OffBead*-Experiment mit WGA beim Einsatz der beiden trifunktionellen Verbindungen **30** und **31** schließen, dass der unspezifische Beifang nicht auf einer bimolekularen, zufälligen Reaktion zwischen aktivierten Azid und Protein basiert, da sich WGA durch den Einsatz von GlcNAc weitestgehend verdrängen lässt. Die *OffBead*-Experimente mit WGA und den vier Verbindungen **30**, **31**, **32** und **33** (Abbildung 12) wurden alle mit identischen Konzentrationen durchgeführt. Bei einer bimolekularen Reaktion zwischen aktivierter *Capture*-Spezies und dem WGA sollte die *Capture*-Ausbeute für alle Verbindungen identisch sein, wobei sie für die beiden trifunktionellen Verbindungen ohne Einsatz von GlcNAc als Kompetitor durch die zusätzliche, reversible Vorbindung des Proteins höher sein sollte. Da WGA sich jedoch durch den Einsatz von GlcNAc signifikant verdrängen lässt und die in den Kontrollen für die Verbindungen **30** und **31** erreichte Ausbeute deutlich unter der Ausbeute für die beiden Kontrollverbindungen **32** und **33** liegt (Abbildung 12, Spur 4a, 6a, 4b, 6b) kann eine bimolekulare Reaktion als mögliche Ursache für die unspezifische Ausbeute bei *OffBead*-Experimenten nahezu ausgeschlossen werden. Die negative Verdrängungskontrolle für WGA beim Einsatz der beiden bifunktionellen Verbindungen **32** und **33** kann durch die im Vergleich zu den trifunktionellen Verbindungen stark erhöhte Hydrophobizität erklärt werden. Die beiden trifunktionellen Verbindungen **30** und **31** sind deutlich polarer, sodass die Bindung an das Protein daher selektiver erfolgen kann. Durch die stärker hydrophoben Eigenschaften der bifunktionellen Verbindungen **32** und **33** kann WGA jedoch unspezifisch mit seinerseits hydrophoben Aminosäureseitenketten an die *Capture Compound* binden, sodass in der Folge eine spezifische Verdrängung durch den Zusatz von GlcNAc nicht erfolgen kann (Abbildung 12, Spur 4b, 6b).

3.2.2.3. OnBead-Capture-Experimente

Nachdem im vorangegangenen Kapitel nicht alle möglichen Ursachen für unspezifische Ausbeuten bei *Capture*-Experimenten ausgeschlossen werden konnten, wurden zur weiteren Klärung *OnBead-Capture*-Experimente durchgeführt. Hierbei wurde nach dem von Samir Charrack im Arbeitskreis Weinhold etablierten Verfahren^[4] vorgegangen und die vier dargestellten Verbindungen **30**, **31**, **32** und **33** in *OffBead-Capture*-Experimenten sowohl mit GSL-II als auch mit WGA untersucht (Abbildungen **13** und **14**). Hierbei stand vor allem die mögliche unspezifische, reversible Vorbindung der eingesetzten Proteine an die *Capture Compound* im Vordergrund.

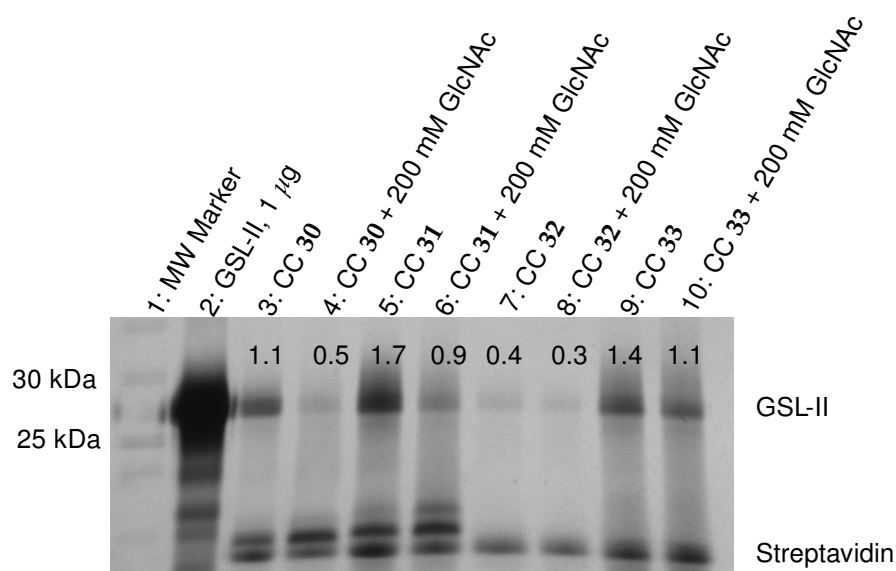


ABBILDUNG 13. *OnBead-Capture*-Experimente zum Einfangen von GSL-II (14 µM Bindungsstellen) mit den trifunktionellen *Capture Compounds* **30** und **31** sowie den bifunktionellen *Capture Compounds* **32** und **33** (jeweils 7 µM) in *Capture*-Puffer nach 30 min bestrahlen und GlcNAc-Verdrängungskontrollen. Die *Capture*-Ausbeuten, bezogen auf den gesamten Ansatz, wurden mittels ImageJ (V.1.48) durch Integration der Proteinbanden ermittelt und sind als Zahlenwert in % über der jeweiligen Bande dargestellt. Spur 1: MW-Marker. Spur 2: GSL-II-Standard (1 µg). Spur 3: *Capture*-Experiment mit Verbindung **30**. Spur 4: *Capture*-Experiment mit Verbindung **30** und 200 mM GlcNAc als Kompetitor. Spur 5: *Capture*-Experiment mit Verbindung **31**. Spur 6: *Capture*-Experiment mit Verbindung **31** und 200 mM GlcNAc als Kompetitor. Spur 7: *Capture*-Experiment mit Verbindung **32**. Spur 8: *Capture*-Experiment mit Verbindung **32** und 200 mM GlcNAc als Kompe-

titor. Spur 9: *Capture*-Experiment mit Verbindung 33. Spur 10: *Capture*-Experiment mit Verbindung 33 und 200 mM GlcNAc als Kompetitor.

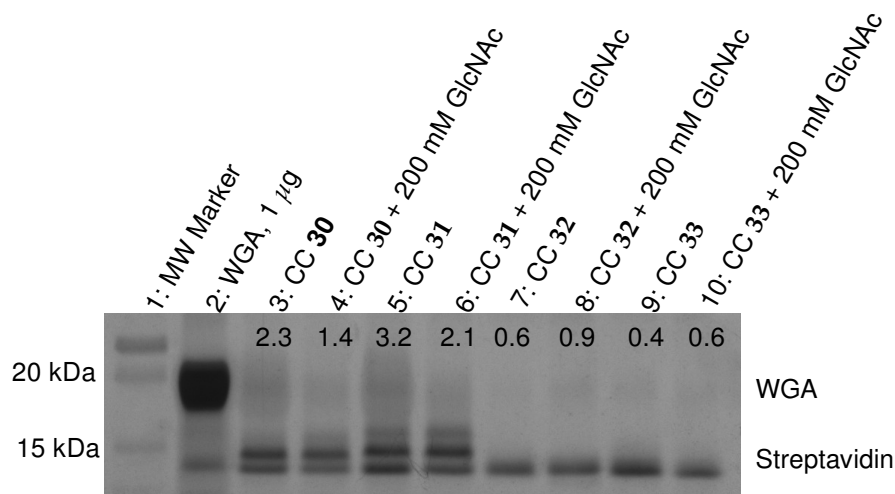


ABBILDUNG 14. *OnBead-Capture*-Experimente zum Einfangen von WGA (14 µM Bindungsstellen) mit den trifunktionellen *Capture Compounds* 30 und 31 sowie den bifunktionellen *Capture Compounds* 32 und 33 (jeweils 7 µM) in *Capture*-Puffer nach 30 min bestrahlen und GlcNAc-Verdrängungskontrollen. Die *Capture*-Ausbeuten, bezogen auf den gesamten Ansatz, wurden mittels ImageJ (V.1.48) durch Integration der Proteinbanden ermittelt und sind als Zahlenwert in % über der jeweiligen Bande dargestellt. Spur 1: MW-Marker. Spur 2: WGA-Standard (1 µg). Spur 3: *Capture*-Experiment mit Verbindung 30. Spur 4: *Capture*-Experiment mit Verbindung 30 und 200 mM GlcNAc als Kompetitor. Spur 5: *Capture*-Experiment mit Verbindung 31. Spur 6: *Capture*-Experiment mit Verbindung 31 und 200 mM GlcNAc als Kompetitor. Spur 7: *Capture*-Experiment mit Verbindung 32. Spur 8: *Capture*-Experiment mit Verbindung 32 und 200 mM GlcNAc als Kompetitor. Spur 9: *Capture*-Experiment mit Verbindung 33. Spur 10: *Capture*-Experiment mit Verbindung 33 und 200 mM GlcNAc als Kompetitor.

3.2.2.4. Untersuchung der unvollständigen Verdrängung als Ursache für eine scheinbar unspezifische *Capture*-Ausbeute.

Ist die Verdrängung bei Kontroll-*Capture*-Experimenten unvollständig, so kommt es in der Folge zu einer Bande auf dem SDS-Gel, was eine scheinbar unspezifische *Capture*-

Ausbeute vortäuscht. Um Proteinbanden auf dem erhaltenen SDS-Gel eines durchgeführten Kontrollexperimentes sicher bewerten zu können, sollte im Folgenden die Frage nach einer unvollständigen Verdrängung in Kontroll-*Capture*-Experimenten geklärt werden. Hierzu werden sowohl die durchgeführten *OffBead*-Experimente aus Kapitel 3.2.2.1 als auch die *OnBead*-Experimente aus Kapitel 3.2.2.3 betrachtet. Die durchgeführten *OffBead-Capture*-Experimente mit WGA zeigen zunächst, dass die Verdrängungskontrollen beim Einsatz der trifunktionellen Verbindungen **30** und **31** funktionieren und sich WGA verdrängen lässt (Abbildung **12**, Spur 4a, 6a). Beim Einfangen von GSL-II ist dies jedoch nicht der Fall (Abbildung **11**, Spur 4a, 6a). Dagegen lassen sich sowohl WGA als auch GSL-II in *OnBead-Capture*-Experimenten mit den beiden trifunktionellen *Capture Compounds* **30** und **31** signifikant verdrängen (Abbildungen **13** und **14**, jeweils Spuren 4 und 6). Bei einer unvollständigen Verdrängung in Kontroll-*Capture*-Experimenten mit trifunktionellen *Capture Compounds* sollten alle durchgeführten Kontrollexperimente eine prominente Proteinbande für WGA und GSL-II liefern. Da die Kontrollexperimente mit den trifunktionellen *Capture Compounds* jedoch im Falle der *OnBead-Capture*-Experimente für GSL-II eine stark reduzierte Bande zeigen, lassen sich die trifunktionellen *Capture Compounds* **30** und **31** auch bei GSL-II verdrängen. Somit können Proteinbanden in Kontroll-*Capture*-Experimenten als „Beifang“ bewertet werden.

3.2.2.5. Untersuchung einer reversiblen Vorbindung von Protein an die *Capture Compound*

Nachdem eine bimolekulare Reaktion zwischen Protein und aktiviertem Azid und eine unvollständige Verdrängung als Ursache für eine unspezifische bzw. scheinbar unspezifische *Capture*-Ausbeute unwahrscheinlich erscheint, sollte die Ursache in einer reversiblen, unspezifischen Vorbindung der *Capture Compounds* an die Proteine liegen. Aufgrund des Aufbaus der *Capture Compounds* gibt es hierzu zwei Möglichkeiten. Zum einen die Bindung an die Reaktivitätsfunktion und zum anderen die Bindung an die Sortierfunktion. Die Frage, welche der beiden Funktionen die Problematische ist, soll im Folgenden anhand der *OnBead-Capture*-Experimente mit GSL-II und WGA beim Einsatz aller dargestellten *Capture Compounds* geklärt werden. Um die Herangehensweise zu verstehen, muss zunächst geklärt werden, wie die beiden genannten Funktionen ihre Aufgabe

während des *OffBead*- und während des *OnBead*-Experimentes erfüllen. Während die Reaktivitätsfunktion bei beiden Durchführungsverfahren zur Verfügung steht, ist dies für die Sortierfunktion nicht der Fall. Durch die Vorinkubation der *Capture Compound* mit den *Beads* beim *OnBead*-Experiment bindet die *Capture Compound* mit der Sortierfunktion an die streptavidinbeschichteten *Beads*, was zu einem „Verstecken“ der Sortierfunktion führt, so dass diese der Ansatzlösung und den darin enthaltenen Verbindungen und Proteinen nicht mehr zugänglich ist. Bei Betrachtung der Abbildungen 13 und 14 zeigt sich, dass sowohl die Verdrängung von GSL-II als auch die für WGA beim Einsatz der trifunktionellen Verbindungen 30 und 31 positiv verlaufen sind und das jeweilige Protein verdrängt werden konnte (jeweils Spuren 4, 6). Während dieses Ergebnis für WGA aus dem *OffBead*-Experiment bekannt war, zeigt das Ergebnis für GSL-II, dass die Ursache für eine unspezifische *Capture*-Ausbeute in einer reversiblen, unspezifischen Vorbindung von GSL-II an die *Capture Compound* liegen muss. Da die *Capture*-Ausbeuten sowohl für GSL-II als auch für WGA beim Einsatz der bifunktionellen *Capture Compound* 32 im *OnBead*-Verfahren sowohl im eigentlichen Ansatz als auch bei der Verdrängung praktisch null sind, kann die Reaktivitätsfunktion als unspezifische „Selektivitätsfunktion“ ausgeschlossen werden (Abbildungen 13 und 14, Spuren 7 und 8). Bei einer unspezifischen reversiblen Vorbindung von Protein an das aromatische Azid, sollte eine Vorbindung der *Capture Compound* an die magnetischen *Beads* keine Ausbeutenverluste zur Folge haben, da das Azid weiterhin zugänglich sein sollte. Einzig eine unspezifische Vorbindung von Protein an die Sortierfunktion in Form des Biotins erklärt diese Beobachtungen vollständig. Werden die vier dargestellten *Capture Compounds* im *OffBead*-Experiment eingesetzt, so können die untersuchten Proteine sowohl an die Selektivitäts- als auch an die Sortierfunktion binden. Die unspezifische Vorbindung an die Sortierfunktion erfolgt abhängig vom untersuchten Protein zu hohen (GSL-II) oder zu niedrigen (WGA) Anteilen, was sich bei GSL-II in einer negativen Verdrängungskontrolle und einer hohen unspezifischen *Capture*-Ausbeute widerspiegelt. Beim *OnBead*-Experiment ist die Sortierfunktion bereits durch das auf den magnetischen *Beads* aufgebrachte Streptavidin gebunden und kann von anderen Proteinen nicht mehr erkannt werden. Das Protein kann so nur noch an die für diesen Zweck eingeführte Selektivitätsfunktion binden, von der sie sich durch Zugabe von Kompetitor wieder verdrängen lässt. Zur Verifizierung dieser Ergebnisse müsste nun Biotin 46 in hohen Konzentrationen als Kompetitor zum Ansatz hinzugegeben werden.

Da Biotin selber, wie auch das an die *Capture Compounds* gebundene Biotin in der Lage ist an die streptavidinbeschichteten *Beads* zu binden, müssten bei einer so hohen Biotinkonzentration wie sie zur Verdrängung von unspezifisch gebundenem Protein nötig ist, magnetische Partikel im Wert von mehreren Tausend Euro eingesetzt werden. Da dieses Experiment nicht wirtschaftlich ist und alle hier aufgeführten Indizien auf Biotin als Ursache hindeuten, wurde dieser letzte Beweis nicht erbracht. Künftige Arbeiten können sich jedoch mit einer möglichen Abtrennung von Biotin aus dem Ansatz nach der Bestrahlung mit UV-Licht beschäftigen, um so die in dieser Dissertation eingesetzten Mengen an *Beads* weiterverwenden zu können. Das zuvor beschriebene Verhalten der Proteine zu biotinhaltigen *Capture Compounds* findet sich in den *OnBead*-Experimenten für GSL-II und WGA beim Einsatz aller vier Verbindungen wieder, mit Ausnahme der bifunktionellen *Capture Compound 33* bei der Untersuchung von GSL-II. Wie in Abbildung 13 (Spuren 9 und 10) ersichtlich, ist die bifunktionelle *Capture Compound 33* in der Lage, GSL-II kovalent zu binden, sodass das Protein isoliert werden kann. Dieses Verhalten lässt sich mit der eingebrachten, potentiell selbstquechenden Aminofunktion und den isoelektrischen Punkten der beiden Proteine erklären. Unter den *Capture*-Bedingungen (pH = 7.5) liegt die Aminofunktion des Lysins protoniert vor und führt so zu einer positiven Ladung auf den *Capture-Beads*. Die isoelektronischen Punkte für GSL-II und WGA liegen bei 5 - 6 bzw. >9. Unter den vorherrschenden Bedingungen liegt GSL-II demnach leicht negativ geladen vor, während WGA deutlich positiv geladen ist. So herrscht zwischen *Capture Compound 33* und GSL-II eine elektrostatische Anziehung, welche zu einer reversiblen Vorbindung mit anschließender Photofixierung führen kann.

3.2.2.6. Betrachtung des eingeführten Lysin-Restes als potentieller Selbstquencher

Die Verbindungen 31 und 33 wurden ursprünglich entworfen und synthetisiert um eine mögliche Selbstquenchung durch intramolekulare Reaktion zwischen dem Lysin-Rest und der Reaktivitätsfunktion bei nicht erfolgter Vorbindung an ein Zielprotein zu ermöglichen. Während der Arbeit zeigte sich jedoch, dass es sich bei der beobachteten unspezifischen *Capture*-Ausbeute anscheinend um eine reversible Vorbindung zwischen Protein und Sortierfunktion der *Capture Compound* handelt. Die Funktion eines intramolekularen Selbstquenchens konnte daher nicht beobachtet werden. Im Fall von GSL-II zeigte sich

sogar ein negativer Effekt des eingebrachten Lysins aufgrund der damit einhergehenden positiven Ladung unter den während der *Capture*-Experimente herrschenden Bedingungen.

4. Zusammenfassung

4.1. Aufbau einer artifiziellen extrazellulären Matrix mittels trifunktioneller Photoquervernetzer

Zum Aufbau einer artifiziellen extrazellulären Matrix konnten der trifunktionelle PEG-Photoquervernetzer **6** und der trifunktionelle EDA-Photoquervernetzer **21** über 8 Stufen mit einer Gesamtausbeute von 19.7 % bzw. 1 % synthetisiert und auf einer mit NCO-sP(EO-*stat*-PO) modifizierten Mikrotiterplatte immobilisiert werden. Anschließende Inkubation mit Galektin-3 lieferte eine proteinmodifizierte Oberfläche, welche in der Lage ist weitere Glykoproteine wie ASF zu binden. Die grundsätzliche Funktion der dargestellten Verbindungen konnte so gezeigt und ihr Nutzen für zukünftige Immobilisierung von Proteinen belegt werden. Um eine maximale Signalausbeute des gebundenen Galektins bei gleichzeitig minimiertem Materialaufwand zu gewährleisten, wurde in geeigneten Experimenten die optimale Arbeitskonzentration sowohl von Photoquervernetzer für die Oberflächenmodifikation als auch von Galektin-3 für den Aufbau der Matrix ermittelt. Untersuchungen zur Effektivität des Photoquervernetzers mittels Verdrängung von Galektin-3 von der Oberfläche zeigten, dass die Bestrahlung des His₆-Tag-modifizierten Galektin-3 zu einer Modifikation führt und der His₆-Tag nicht mehr durch einen Antikörper nachgewiesen werden kann. Gleichzeitig konnte beobachtet werden, dass die Bestrahlung zu einem *Bleaching* des ebenfalls an Galektin-3 gekoppelten YFP führt, so dass ein Vergleich von bestrahlten und unbestrahlten Proben durch Fluoreszenzanalyse keine verlässlichen Ergebnisse liefert. Der Einsatz von Galektin-3-Antikörpern zum Nachweis von Galektin-3 nach der Bestrahlung zeigte, dass die erreichte Entfernung von nicht

kovalent gebundenem Protein nicht hoch genug ist, um einen messbaren Unterschied zwischen bestrahlten und unbestrahlten Proben auch nach Denaturierung mit Harnstoff zu erreichen. Die Effektivität der Photoquervernetzung konnte daher im Rahmen dieser Arbeit auf Oberflächen nicht bestimmt werden. Grundsätzlich ließ sich diese jedoch bereits in *Capture*-Experimenten, wie sie im Arbeitskreis Weinhold durchgeführt wurden bestätigen.^[4,44] Hierbei wurden kleine Moleküle, welche unter anderem ein aromatisches Azid tragen mit verschiedenen Proteinen inkubiert und reversibel vorgebundene Proteine durch Photoquervernetzung kovalent gebunden. Experimente zeigten, dass Proteine nur bei Bestrahlung mit UV-Licht kovalent gebunden werden und sich ansonsten in Lösung vollständig verdrängen lassen.

4.2. Ursachen für unspezifische *Capture*-Ausbeuten im *OffBead*-Experiment

Im Zuge dieser Arbeit konnten verschiedene tri- und bifunktionelle *Capture Compounds* synthetisiert und zur Untersuchung der unspezifischen *Capture*-Ausbeute in *OffBead*-*Capture*-Experimenten, wie sie im Arbeitskreis Weinhold beobachtet wurden, verwendet werden. Die trifunktionellen Verbindungen **30** und **31** konnten über 9 bzw. 8 Stufen mit einer Gesamtausbeute von je 6 % dargestellt werden, während die beiden bifunktionellen Verbindungen **32** und **33** über 5 bzw. 6 Stufen mit einer Gesamtausbeute von 23 % bzw. 19 % erhalten wurden. Die signifikant höhere Ausbeute für die beiden bifunktionellen Verbindungen lässt sich mit dem Fehlen der Selektivitätsfunktion erklären, welche nicht in zusätzlichen Reaktionsschritten eingeführt wurde musste. Durch geeignete *OffBead*- und *OnBead*-Experimente konnte unter Verwendung aller vier Verbindungen und den Proteinen GSL-II und WGA die Sortierfunktion Biotin als Hauptursache für die unspezifische Ausbeute in *OffBead*-*Capture*-Experimenten identifiziert werden. Es zeigte sich, dass GSL-II unspezifisch an Biotin binden und so nicht mehr durch den Zusatz von *N*-Acetylglucosamin verdrängt werden kann. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen der *OnBead*-Experimente, bei denen kaum eine unspezifische Ausbeute beobachtet wurde. Die Funktion der eingeführten Quencherfunktion in Form des Lysin-Restes konnte in dieser Arbeit aufgrund der nicht beobachteten bimolekularen Reaktion zwi-

schen aktiviertem Azid und Protein nicht gezeigt werden. Sie zeigte jedoch anhand des Beispiels von GSL-II wie sensibel das entwickelte *Capture*-System ist, da aufgrund der zusätzlichen positiven Ladung des Lysins GSL-II im *OnBead-Capture*-Experiment auch ohne Selektivitätsfunktion eingefangen werden konnte, was auf elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem positiv geladenen Lysinrest und dem unter den herrschenden Bedingungen negativ geladenen GSL-II zurückgeführt werden kann. Durch den Einsatz der vier *Capture Compounds* **30**, **31**, **32** und **33** konnten neue Erkenntnisse gewonnen werden, die in die Optimierung der Sortierfunktion und Entwicklung zukünftiger Fängerverbindungen einfließen sollten.

5. Ausblick

5.1. Untersuchung der Effektivität von Photoquervernetzern auf Oberflächen

Auch wenn die Funktion von Photoquervernetzern mehrfach gezeigt wurde^[4,24], beschränken sich diese Ergebnisse meist auf die Anwendung in Lösungen. Für das im Rahmen dieser Dissertation verwendete System muss dieser Nachweis noch erbracht werden. Um die Funktion der Photoquervernetzer auf Oberflächen bestätigen zu können, muss das hier verwendete Galektin-3 vollständig und reproduzierbar von der Oberfläche entfernt werden. Es zeigte sich, dass je nach Nachweismethode falsch-positive Signale erhalten werden und eine vollständige Entfernung des Proteins nicht erreicht werden konnte. Weitere Arbeiten müssen sich nun mit den zahlreichen Möglichkeiten einer Entfernung von Galektin-3 von der Oberfläche beschäftigen und eine geeignete Nachweismethode finden, welche weder zu falsch-negativen noch zu falsch-positiven Signalen führt. Sobald das aufgebraute Protein vollständig entfernbar ist, kann die Effektivität der Photoquervernetzung untersucht und bestätigt werden. Folgeexperimente können sich dann mit dem Aufbau von dreidimensionalen Gerüststrukturen unter Verwendung von Endothel- oder anderen Zellen widmen und eine mögliche artifizielle Matrix unter Körperbedingungen, wie zum Beispiel dem fließenden Blutstrom, untersuchen. Die hierbei gewonnenen experimentellen Daten können dann für die Verwendung und mögliche Modifikation von Implantaten verwendet werden, um zukünftige Abstoßungsreaktionen oder Immunantworten des Körpers zu verstehen und ggfs. zu unterbinden.

5.2. Optimierung zukünftiger *Capture Compounds*

Durch die Synthese neuer, bifunktioneller *Capture Compounds* konnte die Hauptursache für die unspezifische *Capture*-Ausbeute in *OffBead-Capture*-Experimenten im Aufbau der *Capture Compound* identifiziert werden. Es zeigte sich, dass Biotin in der Lage ist Proteine reversibel vorzubinden, welche anschließend durch Photoquervernetzung kovalent an die *Capture Compound* gebunden werden und so zu einer unspezifischen Ausbeute führen. Zukünftige Arbeiten können sich nun mit der Optimierung des Aufbaus der verwendeten Verbindungen beschäftigen. Hierbei sind grundsätzlich zwei verschiedene Wege denkbar. Der erste führt über die Änderung der Sortierfunktion. Magnetische Beads werden neben Streptavidin auch mit verschiedensten anderen, chemischen Modifizierungen wie Aminen, Carboxylen, Epoxiden, Tosylaten und NHS-Ester angeboten. Eine Änderung der Sortierfunktion, entsprechend zu den angebotenen magnetischen Partikeln, kann die unspezifische Bindung von Protein an die Sortierfunktion unterbinden. Wie der in dieser Arbeit eingeführte Lysinrest jedoch zeigt, kann es bei der Änderung der Sortierfunktion zu anderen, unerwarteten Effekten kommen, welche wiederum zu unspezifischer Vorbindung von Proteinen führen. Die Auswahl der Sortierfunktion kann daher nicht für alle Proteine die gleiche sein und muss je nach Protein angepasst werden. Da *Capture Compounds* wie oben beschrieben jedoch zur Identifikation von unbekannten Proteinen herangezogen werden sollen, müssten zu diesem Zweck verschiedene *Capture Compounds* mit gleicher Selektivitätsfunktion, aber unterschiedlichen Sortierfunktionen bereitgestellt werden, um so durch Vergleich eine Aussage über die Spezifität der *Capture*-Ausbeute treffen zu können. Ein zweiter Ansatz sieht die Verlängerung des Abstandes zwischen Sortierfunktion und Reaktivitätsfunktion vor. Hierbei wird Biotin als Sortierfunktion behalten, der Abstand zum aromatischen Azid jedoch durch den Einsatz einer längeren PEG-Kette erhöht. Dadurch wird Biotin weiterhin unspezifisch Proteine vorbinden, durch den großen Abstand zur Reaktivitätsfunktion sollten diese beim Bestrahlen mit UV-Licht jedoch nicht mehr kovalent verknüpft werden. Bei den folgenden Waschschritten würde die reversible, nicht kovalente Bindung dann aufgehoben werden, was zu einer spezifischen Ausbeute in *OffBead-Capture*-Experimenten führt.

6. Experimenteller Teil

6.1. Präparative und analytische Methoden

6.1.1. Verwendete Lösungsmittel

Alle verwendeten technischen Lösungsmittel werden am Rotationsverdampfer destilliert und anschließend ohne weitere Behandlung eingesetzt. Kommerziell erhältliche, absolute Lösungsmittel werden ohne weitere Aufarbeitung verwendet.

6.1.2. Chemikalien

Das verwendete Wasser stammt ausschließlich aus einer MilliQ Academic Reinstwasseranlage der Firma Millipore. Alle Chemikalien werden von den in Tabelle 1 aufgeführten Firmen bezogen und sind, soweit nicht anders angegeben, vom Reinheitsgrad p.a.

TABELLE 1. In dieser Arbeit verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Firma
Aceton- <i>d</i> 6	Acros Organics
Acetonitril	Fisher Chemical
Acetylchlorid	Merck
<i>N</i> -Acetylglucosamin	Sigma-Aldrich
Acrylamid, 30 %ig	Serva
Ameisensäure	KMF Optichem

<i>p</i> -Aminobenzoessäure	Acros
Ammoniumacetat	Merck
Ammoniummolybdat tetrahydrat	Alfa Aesar
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Serva
β -Mercaptoethanol	Serva
Biotin	Sigma-Aldrich
Bis-Tris	Gerbu
Bromphenolblau	Serva
Calciumchlorid	Grüssing
Cerammoniumnitrat	Merck
Cersulfat	Merck
Chloroform- <i>d</i> 1	Acros Organics
Chloroform (tech.)	Julius Hösch
(3-[3-Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonium]- 1-propansulfonat) (CHAPS)	Gerbu
(1-Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylidenaminoxy)- dimethylamino-morpholino-carbenium- hexafluorophosphat (COMU)	Sigma-Aldrich
Diaminoethan	Fluka
1,13-Diamino-4,7,10-trioxatridecan	Aldrich Chemistry
Dichlormethan (tech.)	Julius Hösch
Diethylether (tech.)	Julius Hösch
<i>N,N</i> -Diisopropylcarbodiimid	Aldrich
<i>N,N</i> -Dimethylacetamid	Acros Organics
Dimethylsulfoxid- <i>d</i> 6	Cambridge Isotope Laboratories
Di- <i>tert</i> -butyl-dicarbonat	Fluka
Dynabeads MyOne C1 Streptavidin	Invitrogen
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)- carbodiimid-hydrochlorid (EDC)	Acros Organics
Ethylendiamintetraacetat-Dinatrium (EDTA)	Gerbu
Essigsäure 99 %	Merck

Ethanol	Merck
Ethylacetat (tech.)	Julius Hösch
Fast Alkalische Phosphatase	Thermo Scientific
Glycerin	Gerbü
H-Lys(Boc)-OH	Bachem
1-Hydroxybenzotriazol (HOBt)	ABCR
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- -ethansulfonsäure (HEPES)	Gerbü
Isopropanol	Fisher Scientific
Kaliumcarbonat	Grüssing
Kaliumchlorid	TH Geyer
Kaliumisothiocyanat	Sigma-Aldrich
Kaliumpermanganat	Merck
Kieselgel (Korngröße 0.040 - 0.063 mm)	Merck
Magnesiumsulfat	Merck
Manganchlorid	Merck
Methanol (tech.)	Promochem
Molsieb 4 Å	Acros
3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	Gerbü
Natriumazid	Acros
Natriumchlorid	Gerbü
Natriumhydroxid	Sigma Aldrich
Natriumnitrit	Grüssing
Natriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich
Natriumdihydrogenphosphat	Gerbü
N-Hydroxysuccinimid	Aldrich
Ninhydrin	Sigma Aldrich
Palladium auf Aktivkohle	Aldrich Chemistry
Pentan (tech.)	Julius Hösch
Salzsäure (37 %ig)	Grüssing
Schwefelsäure (97 %ig)	Merck

Natriumdodecylsulfat (SDS)	Gerbu
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Acros
Tetrabutylammoniumsulfat	Sigma-Aldrich
Tetrahydrofuran	Acros Organics
Triethylamin	Fisher Chemicals
Trifluoressigsäure	Alfa Aesar
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-HCl (Tris-HCl)	Gerbu
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-X (Tris-X)	Gerbu
Tween 20	Gerbu
UDP-Galaktose	Calbiochem
Z-Glu-(OtBu)-OSu	Bachem
Z-Gly(OSu)	Bachem

6.1.3. Geräte

¹ H-NMR-Spektroskopie (300 MHz)	Varian NMR System 300
¹ H-NMR-Spektroskopie (400 MHz)	Varian NMR System 400
¹ H-NMR-Spektroskopie (600 MHz)	Varian NMR System 600
¹³ C-NMR-Spektroskopie (75 MHz)	Varian NMR System 300
¹³ C-NMR-Spektroskopie (100 MHz)	Varian NMR System 400
¹³ C-NMR-Spektroskopie (150 MHz)	Varian NMR System 600
Massenspektrometrie	ThermoFinnigan LCQ DECA XP Plus Hochaufgelöst: Finnigan MAT 95
Fluoreszenz-Photometer	Biotek Synergy 2
UV-Spektrometer	Varian Cary 3E
Mikrotiterplattenphotometer	Tecan Sunrise

6.1.3.1. HPLC

Alle HPLC-Läufe werden auf einer Agilent 1100er Serie bestehend aus Dioden-Array-Detector G1315B, zwei binären Pumpen G1361A, Autosampler G2258A, MakeUp-Pumpe G1310A und Massenspektrometer G1956B aufgenommen. Die Steuerung der Anlage er-

folgt über die Agilent Software „Chemstation“ in der Version 4.03B. Sofern nicht anders angegeben, werden alle Analysen auf einer *reverse phase* Säule MZ Aqua Perfect (C18 AQ, 250 x 4.6 mm, 5 μ m, 120 Å) der Firma MZ-Analysentechnik durchgeführt. Alle zur Herstellung der Puffer verwendeten Lösungsmittel werden vor Gebrauch mikrofiltriert. Die verwendeten Gradienten und Pufferzusammensetzungen sind in den Tabellen 2 - 6 aufgeführt.

TABELLE 2. Gradient 1, $\lambda = 242$ nm/ 272 nm.

Zeit [min]	Puffer A [%]	Puffer B [%]
0.0	80	20
5.0	80	20
35.0	30	70
36.0	0	100
46.0	0	100
47.0	80	20
57.0	80	20

Puffer A: H₂O/TFA, 100/0.01, v/v
Puffer B: Acetonitril/H₂O/TFA, 70/30/0.01, v/v/v
Fluss: 1 ml/min.

TABELLE 3. Gradient 2, $\lambda = 242$ nm/ 272 nm.

Zeit [min]	Puffer A [%]	Puffer B [%]
0.0	60	40
15.0	53.6	46.4
16.0	0	100
21.0	0	100
22.0	60	40
32.0	60	40

Puffer A: H₂O/TFA, 100/0.01, v/v
Puffer B: Acetonitril/H₂O/TFA, 70/30/0.01, v/v/v
Fluss: 1 ml/min.

TABELLE 4. Gradient 3, $\lambda = 242 \text{ nm} / 272 \text{ nm}$.

Zeit [min]	Puffer A [%]	Puffer B [%]
0.0	75	25
15.0	49.4	50.6
16.0	0	100
26.0	0	100
27.0	75	25
37.0	75	25

Puffer A: H₂O/TFA, 100/0.01, v/v

Puffer B: Acetonitril/H₂O/TFA, 70/30/0.01, v/v/v

Fluss: 1 ml/min.

TABELLE 5. Gradient 4, $\lambda = 242 \text{ nm} / 272 \text{ nm}$.

Zeit [min]	Puffer A [%]	Puffer B [%]
0.0	75	25
15.0	49.4	50.6
30.0	0	100
40.0	0	100
41.0	75	25
51.0	75	25

Puffer A: H₂O/TFA, 100/0.01, v/v

Puffer B: Acetonitril/H₂O/TFA, 70/30/0.01, v/v/v

Fluss: 1 ml/min.

TABELLE 6. Gradient 5, $\lambda = 242 \text{ nm} / 272 \text{ nm}$.

Zeit [min]	Puffer A [%]	Puffer B [%]
0.0	60	40
25.0	49.4	50.6
26.0	0	100
36.0	0	100
37.0	60	40
47.0	60	40

Puffer A: $\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$, 100/0.01, v/v
Puffer B: Acetonitril/ $\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$, 70/30/0.01, v/v/v
Fluss: 1 ml/min.

6.1.4. Reaktionskontrolle

Zur Reaktionskontrolle und Identifizierung von Produkten und Nebenprodukten bei der Säulenchromatographie wird die Dünnschichtchromatographie verwendet, welche auf kieselgelbeschichteten Glasplatten mit Fluoreszenzindikator (Merck, Kieselgel 60, Schicht 0.25 mm) durchgeführt wird. Die Detektion der einzelnen Substanzen erfolgt durch Fluoreszenzlöschung (Absorption von UV-Licht der Wellenlänge 254 nm) oder durch Eintauchen in Cerammoniummolybdat (CAM)-, Ninhydrin- oder Kaliumpermanganat-Lösung (Tabelle 7) und anschließendes Erhitzen im Heißluftstrom.

TABELLE 7. Zusammensetzung der einzelnen Färbereagenzien.

Färbereagenz	Zusammensetzung
Ninhydrin	0.3 g Ninhydrin, 100 ml Ethanol, 3 ml Essigsäure
Kaliumpermanganat	3 g KMnO_4 , 20 g K_2CO_3 , 5 ml 5 %ige NaOH, 300 ml Wasser
CAM	2.5 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 1 g $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, 90 ml Wasser, 10 ml konz. H_2SO_4

6.1.5. Verwendete Puffer

TABELLE 8. Verwendete Puffer und deren Zusammensetzung.

Puffer	Zusammensetzung
B&W+GlcNAc, pH = 7.8	50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA-Dinatrium, 1 mM NaCl, 10 mM GlcNAc, 0.1 % CHAPS
2xLektinpuffer, pH = 7.5	100 mM Natriumphosphat, 300 mM NaCl, 2 mM MnCl ₂ , 2 mM MgCl ₂ , 2 mM CaCl ₂ , 0.1 % Tween 20
Basicwash, pH = 9.0	50 mM Ammoniumacetat, 0.1 % CHAPS
Probenpuffer, pH = 6.8	50 mM Tris, 2.5 % SDS, 10 % Glycerin, 320 mM β -Mercaptoethanol, 500 ppm Bromphenolblau
3.5x NuPage-Puffer, pH = 6.5 - 6.8	26.16 % Bis-Tris
NuPage Laufpuffer	50 mM MOPS, 50 mM TRIS-X, 5 mM EDTA-Dinatrium, 0.1 % SDS
PBS-Puffer, pH = 7.5	50 mM Natriumphosphat, 150 mM NaCl

6.1.6. NuPage-Zusammensetzung

TABELLE 9. NuPage-Zusammensetzung, Trenngel (12 %ig).

H ₂ O	3040 μ l
3.5x NuPage GelPuffer	2856 μ l
Acrylamid (30 %)	4000 μ l
APS (10 %)	100 μ l
TEMED	4 μ l
Gesamtvolumen	10000 μ l

TABELLE 10. NuPage-Zusammensetzung, Sammelgel (5 %ig).

H ₂ O	1710 μ l
3.5x NuPage GelPuffer	857 μ l
Acrylamid (30 %)	500 μ l
APS (10 %)	30 μ l
TEMED	3 μ l
Gesamtvolumen	3100 μ l

6.1.7. Produktreinigung

6.1.7.1. Säulenchromatographie

Die Reinigung der Substanzen erfolgt im Allgemeinen mittels Säulenchromatographie in Glassäulen mit Kieselgel 60 (Firma Merck, Korngröße 0.040 - 0.063 mm). Dabei wird mit einem Überdruck von 0.3 - 0.5 bar gearbeitet. Das Elutionsmittel wird so gewählt, dass der R_f -Wert der zu isolierenden Substanz bei etwa 0.2 - 0.4 liegt. Die Zusammensetzung der Lösungsmittelgemische wird volumimetrisch abgemessen. Der Durchmesser und die Länge der Säule werden dem Trennproblem und der Substanzmenge angepasst.

6.1.7.2. Waters SAP-Pack Light C18 Spritzenfilter

Zur Reinigung von hydrophilen Substanzen, wie sie in den biochemischen Reaktionen dieser Arbeit dargestellt werden, wurden Waters SAP-Pack Light C18 Spritzenfilter verwendet. Diese lassen sich auf 1 ml Spritzen stecken und sind mit *reversed-phase* Kieselgel gefüllt. Die Spritzenfilter werden zunächst mit 3 ml Methanol vorkonditioniert und mit 3 ml Wasser äquilibriert. Die Spritzenfilter werden mit max. 3 ml Probenvolumen beladen und anschließend mit 3 ml Wasser gewaschen. Dies sorgt dafür, dass die polaren Substanzen wie Salze, Proteine und Galaktose von dem Filter eluiert und so von den LacNAc-haltigen Substanzen getrennt werden. Die Eluierung der Zielverbindungen erfolgt durch Spülen des Spritzenfilters mit 3 ml Acetonitril/Wasser (50/50, v/v).

6.1.8. Angabe von analytischen Daten

¹ H-NMR	Alle chemischen Verschiebungen (δ) sind in ppm, bezogen auf das Protonensignal des jeweiligen deuterierten Lösungsmittels angegeben. Abkürzungen zur Beschreibung der Signalmultiplizitäten: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, quin = Quintett; sex = Sextett, sept = Septett, oct = Oktett, m = Multiplett, bs = breites Singulett, J = Kopplungskonstante in Hz.
¹³ C-NMR	Die chemischen Verschiebungen (δ) sind in ppm, bezogen auf das Kohlenstoffsignal des jeweiligen deuterierten Lösungsmittels angegeben.
Massenspektrometrie	Die Angabe der Massen bzw. Fragmente (m/z) erfolgt als dimensionslose Zahl und deren Intensität prozentual zum Basispeak (rel. Int.).

6.2. Allgemeine Arbeitsanweisungen zu Bindungsstudien mit Galektin-3

6.2.1. Modifizierung von Mikrotiterplatten mit NCO-sP(EO-*stat*-PO)

NCO-sP(EO-*stat*-PO) modifizierte 96er Mikrotiterplatten wurden freundlicherweise von Nadine Jansen im DWI zur Verfügung gestellt. Die Modifikation folgt dem von Beer *et al.* 2012 etablierten Protokoll und wird hier kurz beschrieben.^[50] NCO-sP(EP-*stat*-PO) wird nach der Methode von Goetz *et al.* synthetisiert und in absolutem THF gelöst.^[70] Die Lösung wird mit Wasser versetzt, sodass ein Endverhältnis von THF:Wasser von 9:1 bei einer Polymerkonzentration von 1-10 mg/ml erreicht wird. Die Lösung wird 5 min. bei Raumtemperatur vorinkubiert und anschließend in die Vertiefungen einer 96er Mikrotiterplatte (Cova-LinkNHTM 96 well Mikrotiterplatte, NUNC, Langenselbold, Deutschland) (jeweils 400 μ l) gefüllt. Nach 10 min. Inkubation bei Raumtemperatur wird die überschüssige Polymerlösung entfernt und die Platte bei Raumtemperatur gelagert.

6.2.2. Kovalente Modifizierung von NCO-sP(EO-*stat*-PO)-beschichteten Mikrotiterplatten mit Fängerverbindungen

Aminomodifizierte Fängermoleküle werden in der benötigten Konzentration (0.5 mM, 1 mM, 2 mM, 5 mM und 10 mM) in Puffer (20 mM Na₂CO₃/NaHCO₃, pH = 9.4) gelöst, und in die Vertiefungen der zuvor mit NCO-sP(EO-*stat*-PO) beschichteten Mikrotiterplatte gegeben (jeweils 170 µl) (Kapitel 6.2.1). Die Platte wird über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert und am nächsten Tag von überschüssiger Aminlösung befreit. Fertige Platten werden bei 4 °C gelagert.

6.2.3. Immobilisierung von Galektin-3 auf mit Fängerverbindung modifizierten Oberflächen

Die nach Vorschrift 6.2.1 und 6.2.2 modifizierten Vertiefungen der Mikrotiterplatten werden dreimal mit PBS-Puffer (250 µl) gewaschen, mit Galektinlösung der benötigten Konzentration (i. d. R. 5 µM, 170 µl) befüllt und für 1 h bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss inkubiert. Die überschüssige Proteinlösung wird entfernt und die Vertiefungen dreimal mit PBS-Puffer (250 µl) gewaschen.

6.2.4. Kovalente Bindung von Galektin-3 an NCO-sP(EO-*stat*-PO)-modifizierte Mikrotiterplatten

Zur kovalenten Bindung von reversibel gebundenen Galektin-3 wird die nach Kapitel 6.2.3 modifizierte Mikrotiterplatte auf Eis gestellt und im Kühlraum bei 4 °C für 30 min. mit einer UV-Lampe (Caprobox, 270 nm - 310 nm) bestrahlt.

6.2.5. Inhibition der Bindung von Galektin-3

Die zu verwendene Mikrotiterplatte (Cova-LinkNHTM 96 well Mikrotiterplatte, NUNC, Langenselbold, Deutschland) wird über Nacht bei Raumtemperatur mit ASF (5 µg/ml, 200 µl pro Vertiefung) inkubiert und am Folgetag mit PBS-Puffer (3 x 250 µl) gewaschen.

Anschließend wird jede Vertiefung mit BSA (2 %ig in PBS-Puffer, 250 μ l) bei Raumtemperatur inkubiert und die Platte erneut mit PBS-Puffer gewaschen (3 x 250 μ l). Jede zu behandelnde Vertiefung wird mit His6-Gal-3 (16.67 μ M, 45 μ l) und der zu untersuchenden Fängerverbindung (variable Konzentration, 5 μ l) versetzt und jede Vertiefung erneut 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wird jede Vertiefung mit PBS-Puffer (3 x 250 μ l) gewaschen und das reversibel gebundene Galektin-3 mittels ELISA (Kapitel 6.2.6.2) detektiert.

6.2.6. Detektion von Galektin-3 auf Oberflächen

6.2.6.1. Detektion mittels Fluoreszenz

Die Fluoreszenzessung erfolgt mittels eines Mikrotiterplatten-Fluoreszenz-Photometers (Biotek Synergy 2) mit 20 μ l PBS-Puffer pro Vertiefung.

6.2.6.2. Detektion mittels ELISA

Zur Detektion mittels *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) wird jede Vertiefung mit Anti-His₆-Antikörper (POD gekoppelt, 1:1000 in PBS-Puffer, 50 μ l) befüllt und 1 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Zur Detektion wird die Antikörperlösung entfernt, die Vertiefungen dreimal mit PBS-Puffer (250 μ l) gewaschen und eine Lösung aus Peroxidasesubstrat (OPD-Substrat, Dako, 1 Tablette auf 3 ml Wasser und 1.25 μ l H₂O₂, 50 μ l pro Vertiefung) in die Vertiefungen gefüllt. OPD wird durch die an den Antikörper gekuppelte Peroxidase oxidiert, was zu einer, der Menge an gebundenem Antikörper proportionalen, Färbung der Lösung führt. Durch Zugabe von HCl (3 M, 50 μ l) wird die Reaktion gestoppt und die Farbintensität mittels eines Mikrotiterplattenphotometers (Tecan Sunrise) bestimmt. Der Zeitpunkt der HCl-Zugabe ist abhängig von der Färbung der Lösung in den Vertiefungen und kann, je nach Antikörperkonzentration, zwischen 5 und 20 min. betragen.

6.3. Allgemeine Arbeitsanweisungen zu *Capture*-Experimenten

Grundlage dieser allgemeinen Arbeitsanweisung ist die allgemeine Vorschrift von *Samir Charrack* aus dem Arbeitskreis *Weinhold*.^[4] Alle *Capture*-Experimente werden nach dieser Anleitung durchgeführt. Variable Konzentrationen sind in den entsprechenden Abschnitten dieser Arbeit angegeben. Das Waschen der verwendeten Partikel geschieht mittels Separation der magnetischen Partikel an einem Neodymmagneten, abpipettieren der überstehenden Flüssigkeit und anschließendem Resuspendieren (Die Pufferzusammensetzungen befinden sich in Kapitel 6.1.5, Tabelle 8).

6.3.1. *OffBead-Capture*-Experimente

Alle Experimente werden in Eppendorfgefäßen (500 µl) mit einem Gesamtvolumen von 100 µl durchgeführt. 2xLektinpuffer (50 µl), *Capture Compound* (2 µM Endkonzentration, 10 µl), Wasser und ggfs. Kompetitor (200 mM - 500 mM Endkonzentration) werden in einem 500 µl Eppendorfgefäß vorgelegt und kurz mittels Vortexer vermischt. Nach Zugabe des jeweiligen Proteins (ca. 2 µM Endkonzentration) wird die Lösung für 5 Min. bei 4 °C im Schüttler vorinkubiert und anschließend für 0.5 h bei 4 °C im Schüttler mittels UV-Lampe (Caprobox, 270 nm - 310 nm) bestrahlt. Anschließend werden magnetische Partikel (20 µl, 7 µM Bindungsstellen) mit Wasser (3 x 60 µl) gewaschen, der Überstand abpipettiert und mit der zuvor bestrahlten Reaktionslösung versetzt. Die Suspension wird daraufhin für weitere 45 Min. bei 4 °C im Schüttler inkubiert. Nach der Inkubation wird der Ansatz mit B&W-Puffer (3 x 180 µl), Basicwash-Puffer (3 x 180 µl), B&W-Puffer (3 x 180 µl) und abschließend mit Wasser (4 x 180 µl) gewaschen wobei der Ansatz nach jedem Pufferwechsel in ein neues Eppendorfgefäß (500 µl) überführt wird. Nach dem letzten Waschvorgang wird der Überstand abgenommen und die Partikel in Probenpuffer (20 µl) aufgenommen, die Suspension 0.5 h bei 100 °C aufgekocht und anschließend gefangene Proteine mittels denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese (NuPage-Gel, 10 µl / Lane) analysiert. Die Färbung der Banden erfolgt mittels ProteoSilver-Stain der Firma Sigma-Aldrich.

6.3.2. *OnBead-Capture-Experimente*

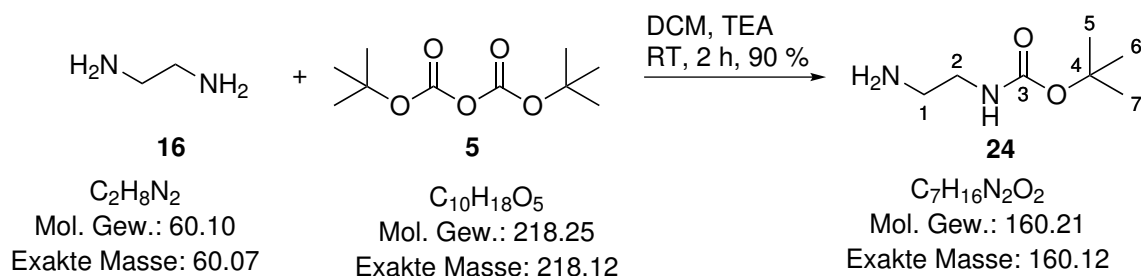
Alle Experimente werden in Eppendorfgefäßen (500 µl) mit einem Gesamtvolumen von 100 µl durchgeführt. Magnetische Partikel (20 µl, 7 µM Bindungsstellen) werden mit Wasser (2 x 30 µl) gewaschen, mit *Capture Compound* (10 µl, 100 µM) versetzt und 10 Min. bei Raumtemperatur im Schüttler inkubiert. Anschließend wird die Suspension mit 2xLektinpuffer (50 µl), Wasser, ggfs. Kompetitor (200 mM - 500 mM) und Protein (Endkonzentration ca. 3 µM) versetzt und weitere 30 Min. bei 4 °C im Schüttler inkubiert. Es folgt eine weitere halbe Stunde inkubieren bei 4 °C im Schüttler bei gleichzeitiger Bestrahlung durch eine UV-Lampe (Caprobox, 270 nm - 310 nm). Waschen der Partikel und Analyse durch Gelelektrophorese erfolgt wie zuvor für die *Offbead*-Experimente beschrieben (Kapitel 6.3.1).

6.3.3. Bestimmen der *Capture*-Ausbeute

Zur Bestimmung der *Capture*-Ausbeute wird das Program „ImageJ“ in der Version 1.48 verwendet. Proteinbanden werden mittels Integration quantifiziert und auf den internen Standard Streptavidin normiert. Dies ist möglich, da aufgrund der Versuchsdurchführung in jedem *Capture*-Ansatz die selbe Menge Partikel verwendet wird und somit die selbe Menge an Streptavidin auf dem Gel zu sehen sein muss. Durch Pipettierfehler kann es hierbei zu Abweichungen kommen, welche sich durch Normierung ausmitteln lassen. Alle Ausbeuten sind in % und auf jedem Gel oberhalb der relevanten Proteinbande angegeben.

6.4. Synthesen

6.4.1. *N*-Boc-Diaminoethan (**24**)



Diaminoethan (**16**) (2.72 ml, 40.8 mmol, 3 Äq.) wird in Methanol (227 ml) gelöst und mit Triethylamin (5.66 ml, 40.8 mmol, 3 Äq.) versetzt. Zu dieser Lösung wird langsam eine Lösung aus Di-*tert*-Butyldicarbonat (**5**) (2.97 g, 13.60 mmol, 1 Äq.) getropft. Es wird noch 2 h bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel anschließend entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (DCM/MeOH/TEA, 95/5/1, v/v) ergibt das Produkt als farbloses Öl.^[71]

Ausbeute: 1.95 g (12.2 mmol), 90 % d. Th.

DC: $R_f = 0.07$ (DCM/MeOH/TEA, 95/5/1, v/v/v)

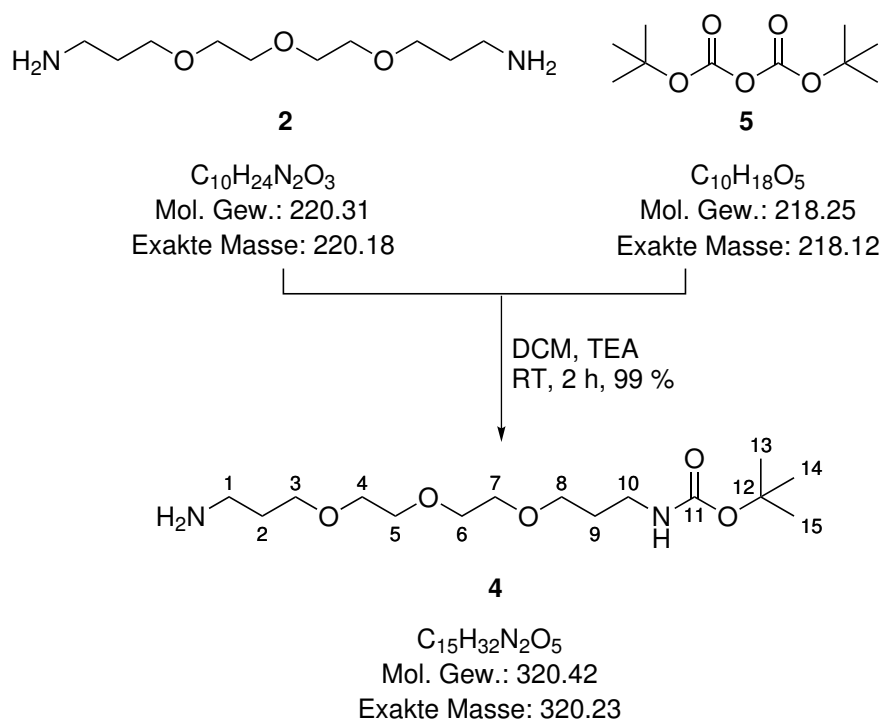
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6):

$\delta = 2.29$ (t, 2H, $^3J = 6.2$ Hz, NH_2CH_2), 1.87 (t, 2H, $^3J = 6.2$ Hz, NHCH_2), 0.63 (s, 9H, $3 \times \text{CH}_3$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO- d_6):

$\delta = 156.40$ (C3), 41.76 (C1), 40.15 (C2), 26.52 (C5 - C7) ppm.

ESI-MS (pos. Ionenmodus): 161.1 (20) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

6.4.2. *N*-Boc-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan (4)

Zu einer Lösung aus 1,13-Diamino-4,7,10-trioxa-tridecan (2) (6.20 ml, 28.2 mmol, 3 Äq.) und Triethylamin (2.61 ml, 18.8 mmol, 2 Äq.) in Dichlormethan (157 ml) wird tropfenweise unter starkem rühren eine Lösung aus Di-*tert*-butyl-dicarbonat (5) (2.05 g, 9.40 mmol, 1 Äq.) in Dichlormethan (157 ml) gegeben. Das Reaktionsgemisch wird für weitere 2 h bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel anschließend am Rotationsverdampfer entfernt und der erhaltene Rückstand mittels Säulenchromatographie (DCM/MeOH/TEA, 95/5/1, v/v/v) gereinigt. Die Zielverbindung 4 wird als farbloses Öl erhalten.^[4]

DC: $R_f = 0.06$ (DCM/MeOH/TEA, 95/5/1, v/v/v)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

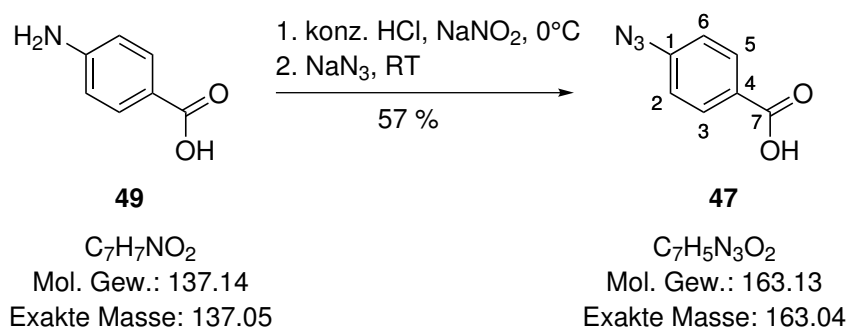
$\delta = 5.13$ (bs, 1H, NH), 3.69 - 3.48 (m, 12H, 6xOCH2), 3.28 - 3.15 (m, 2H, HNCH2), 2.91 (t, 2H, ³J = 6.4 Hz, H₂NCH2), 1.87 - 1.70 (m, 4H, NHCH₂CH2, NH₂CH₂CH2), 1.43 (s, 9H, 3xCH3) ppm.

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3):

δ = 156.20 (C11), 70.59, 70.51, 70.09, 69.73, 69.35, 69.25 (C3 - C8), 39.68 (C1), 38.58 (C10), 29.67 (C9, C2), 28.42 (C13 - C15) ppm.

ESI-MS (pos. Ionenmodus): 321.3 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 221.2 (10) $[\text{M}-\text{Boc}+2\text{H}]^+$.

6.4.3. *p*-Azidobenzoesäure (47)



p-Aminobenzoesäure (49) (4.46 g, 32.5 mmol, 1.0 Äq.) wird unter Lichtausschluss in H_2O (47 ml) gelöst, auf 0°C gekühlt und mit Salzsäure (37 %ig, 7 ml) versetzt. Die Lösung wird anschließend langsam mit Natriumnitrit (2.24 g, 32.5 mmol, 1 Äq.) in H_2O (9 ml) versetzt. Zu der entstandenen Suspension wird langsam Natriumazid (2.54 g, 39.0 mmol, 1.2 Äq.) in H_2O (10 ml) zugetropft, wobei eine starke Gasentwicklung zu beobachten ist (Die Größe des verwendeten Kolbens ist entsprechend anzupassen). Nach Zugabe des Natriumazids wird die Lösung 1 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit Ethylacetat (3 x 100 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit NaOH (3 M, 2 x 100 ml) extrahiert und das Rohprodukt durch versetzen der basischen Lösung mit HCl (6 M, 150 ml) ausgefällt. Der Niederschlag wird abfiltriert und das Filtrat mit Ethylacetat (1 x 20 ml) extrahiert. Der bereits erhaltene Feststoff wird erneut in Ethylacetat (150 ml) aufgenommen und die vereinigten organischen Phasen mit H_2O (2 x 50 ml) und ges. NaCl-Lösung (25 ml) gewaschen. Die organische Phase wird mit MgSO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer eingeeengt. Das erhaltene Rohprodukt wird anschließend mit Acetonitril gewaschen. Die Zielverbindung 47 wird als hellgelber Feststoff erhalten.^[66]

Ausbeute: 3.0 g (18.4 mmol), 57 % d. Th.

DC: $R_f = 0.27$ (DCM/MeOH/TEA, 95/5/1, v/v/v)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, Aceton- d_6):

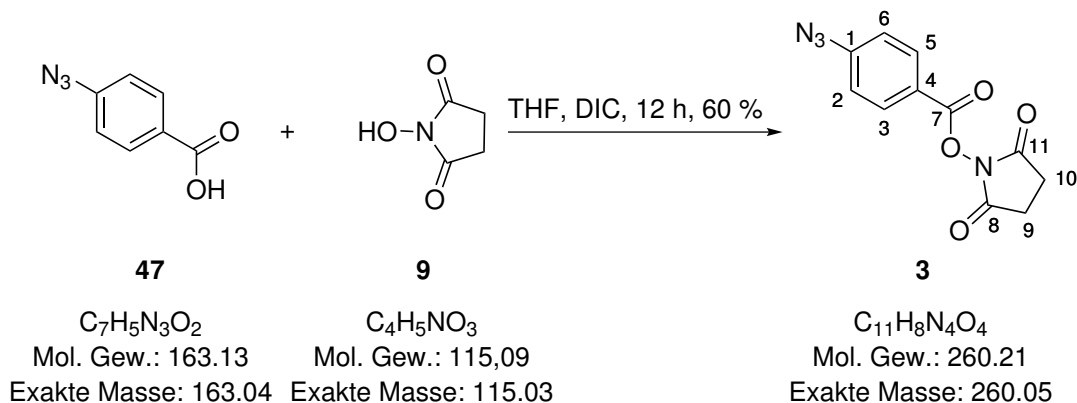
$\delta = 8.19 - 7.91$ (m, 2H, 2x CCH), $7.34 - 7.01$ (m, 2H, 2x N_3CCH) ppm.^[44]

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, Aceton- d_6):

$\delta = 165.90$ (C7), 144.68 (C1), 131.46 (C3, C5), 127.10 (C4), 118.94 (C2, C6) ppm.^[44]

ESI-MS (pos. Ionenmodus): 164.2 (10) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

6.4.4. *p*-Azidobenzoessäure-NHS-ester (3)



Zu einer klaren Lösung aus *p*-Azidobenzoessäure (**47**) (7.50 g, 46.0 mmol, 1.0 Äq.) in THF (219 ml) werden unter Lichtausschluss *N*-Hydroxysuccinimid (6.35 g, 55.2 mmol, 1.2 Äq.) und Diisopropylcarbodiimid (8.55 ml, 55.20 mmol, 1.2 Äq.) gegeben und die Reaktionsmischung für 12 h bei RT gerührt. Der Niederschlag wird abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingengt. Waschen des so erhaltenen Rohprodukts mit Diethylether und anschließend mit Methanol liefert das Zielprodukt **3** als hellgelben Feststoff.^[39]

Ausbeute: 7.2 g (27.7 mmol), 60 % d. Th.

DC: $R_f = 0.76$ (DCM/MeOH/TEA, 95/5/1, v/v/v)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, Aceton- d_6):

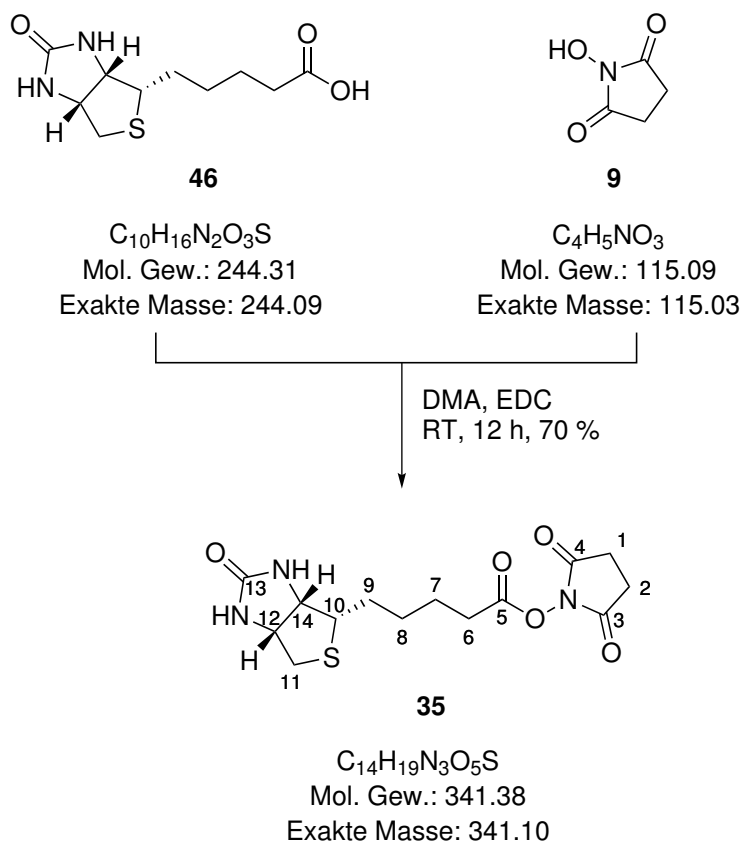
$\delta = 8.21 - 8.10$ (m, 2H, $2 \times \text{OCOCCH}$), $7.39 - 7.28$ (m, 2H, $2 \times \text{N}_3\text{CCH}$), 2.96 (s, 4H, $2 \times \text{COCH}_2$) ppm.^[44]

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, [d6] Aceton):

$\delta = 169.69$ (C8, C11), 161.18 (C7), 147.11 (C1), 132.04 (C3, C5), 121.46 (C4), 119.73 (C2, C6), 25.44 (C9, C10) ppm.^[44]

ESI-MS (pos. Ionenmodus): 283.1 (25) $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

6.4.5. Biotin-NHS-Ester (35)



Biotin (**46**) (1.00 g, 4.09 mmol, 1.0 Äq.) wird in DMA (20.45 ml) vorgelegt und mit 1 Ethyl 3 (3 di-

mehtylaminopropyl)carbodiimid (EDC) (1.02 g, 5.32 mmol, 1.3 eq.) und *N*-Hydroxysuccinimid (**9**) (0.75 g, 6.54 mmol, 1.6 Äq.) versetzt. Die Suspension wird 12 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend auf Eiswasser (20 ml) gegossen. Der Niederschlag wird abfiltriert und die Zielverbindung **35** als farbloser Feststoff erhalten.^[72]

Ausbeute: 0.976 g (2.86 mmol), 70 % d. Th.

DC: $R_f = 0.18$ (DCM/MeOH, 85/15, v/v)

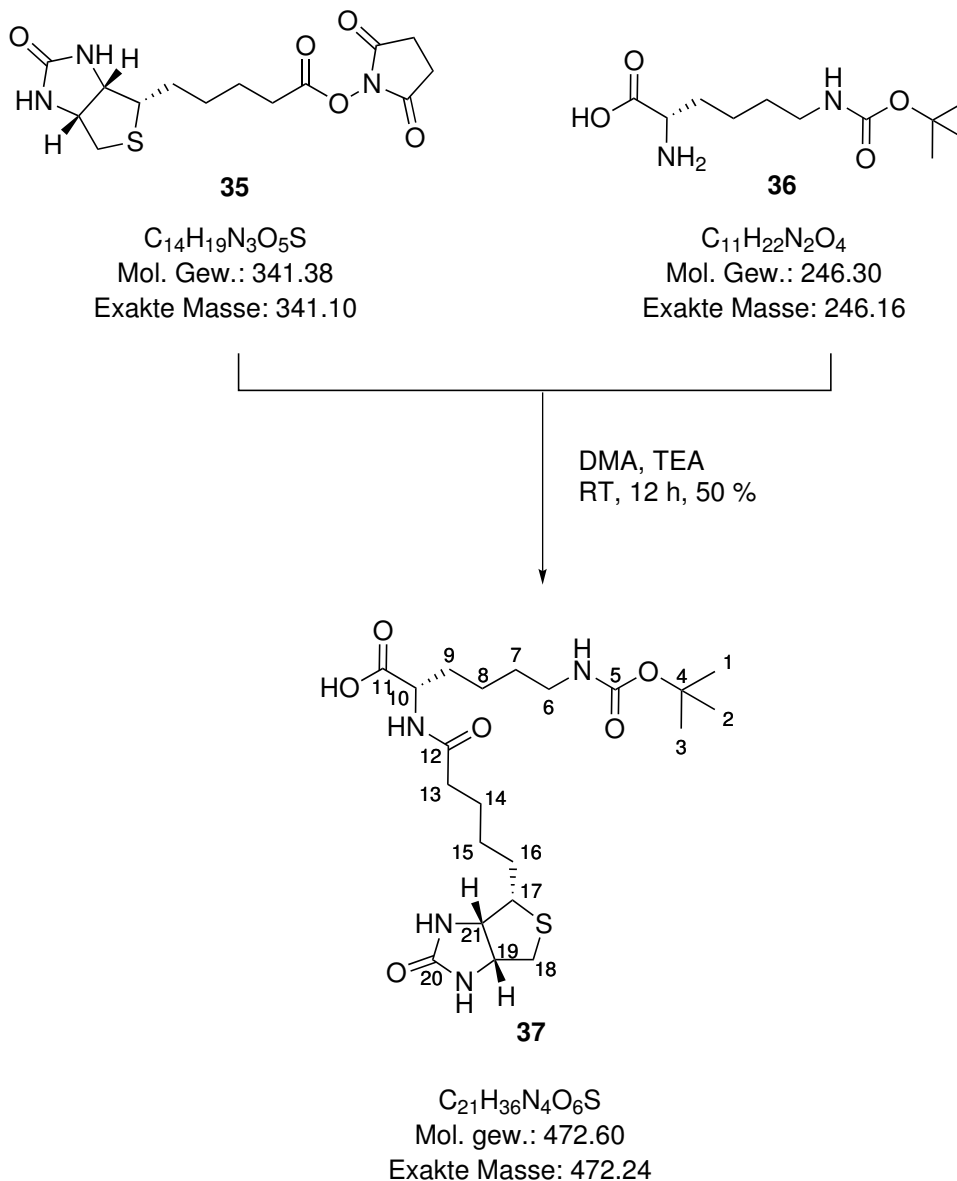
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆):

δ = 6.43 (s, 1H, CHCHNH), 6.37 (s, 1H, CH₂CHNH), 4.34 - 4.28 (m, 1H, SCH₂CH), 4.18 - 4.12 (m, 1H, SCHCH), 3.15 - 3.06 (m, 1H, SCH), 2.87 - 2.76 (m, 5H, NHS-CH₂, SCH_{2a}), 2.67 (t, 1H, ³*J* = 7.32 Hz, OCOCH₂), 2.58 (d, 1H, ³*J* = 12.33 Hz, SCH_{2b}), 1.70 - 1.35 (m, 6H, 3xBiotin-Linker-CH₂) ppm.^[73]

¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆):

δ = 170.71 (C3, C4), 169.38 (C13), 163.11 (C5), 59.60 (C12), 61.43 (C14), 55.68 (C10), 40.36 (C6), 30.43 (C11), 28.27, 28.02, 24.75 (C7 - C9), 25.89 (C1, C2) ppm.

ESI-MS (pos. Ionenmodus): 364.1 (30) [M+Na]⁺, 342.1 (100) [M+H]⁺.

6.4.6. *N*-Biotin-Lys-*N'*-Boc-OH (37)

H-Lys(Boc)-OH (**36**) (111.0 mg, 450 μ mol, 1.5 Äq.) wird in DMA vorgelegt und mit Biotin-NHS-Ester (**35**) (100.0 mg, 293 μ mol, 1 Äq.) und Triethylamin (83.2 μ l, 600 μ mol, 2 Äq.) versetzt und 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Hochvakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (DCM/MeOH, 80/20, v/v) gereinigt. Die Zielverbindung **37** wird als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 68.6 mg (145 μ mol), 49.5 % d. Th.

DC: $R_f = 0.16$ (DCM/MeOH/AcOH, 90/10/1, v/v/v)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6):

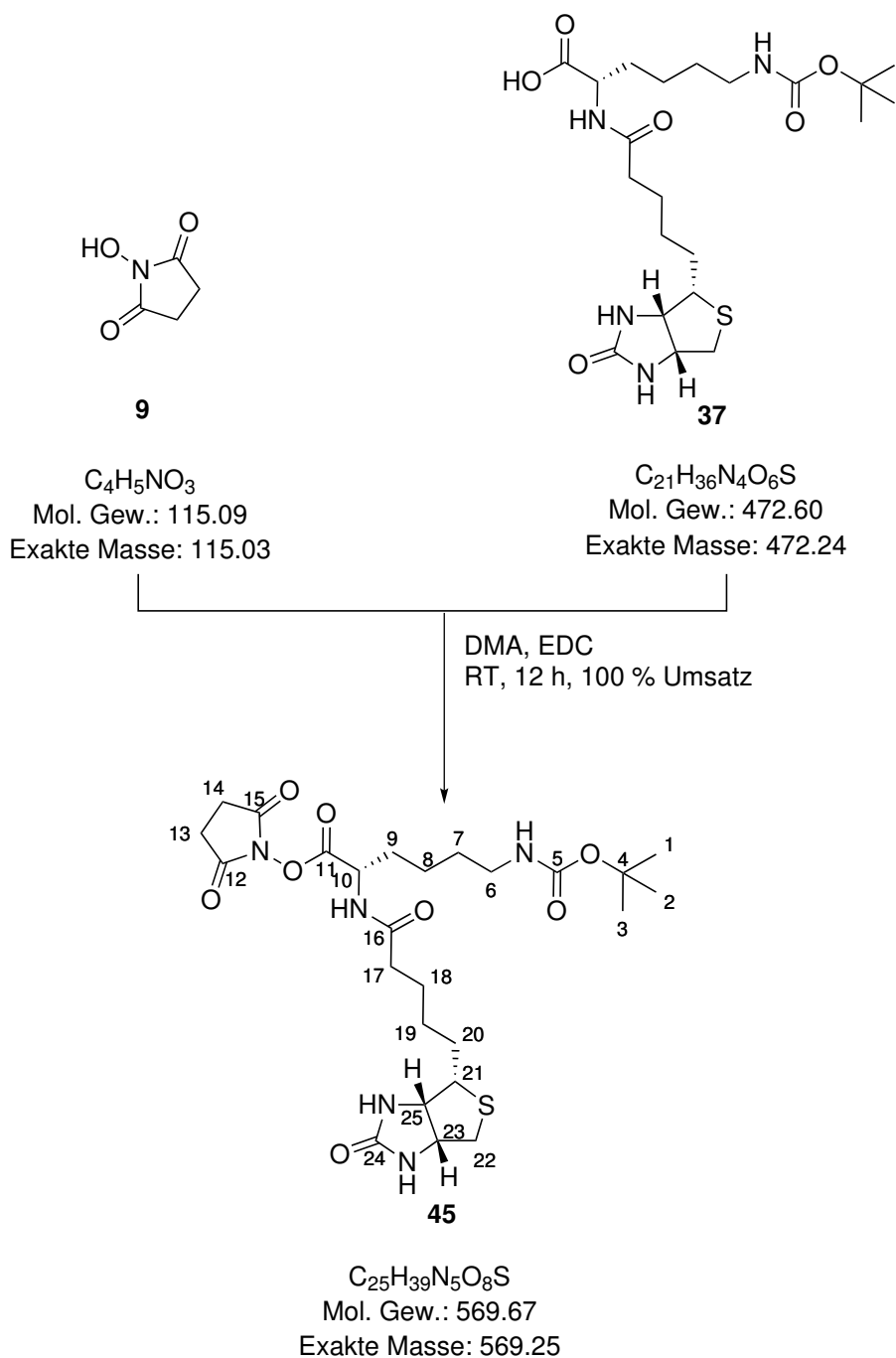
$\delta = 7.72$ (bs, 1H, OCONH), 6.74 (bs, 1H, CHNH), 6.49 (bs, 1H, SCHCHNH), 6.40 (bs, 1H, SCH₂CHNH), $4.34 - 4.27$ (m, 1H, SCH₂CHH), $4.17 - 4.10$ (m, 1H, SCHCHH), $4.09 - 4.00$ (m, 1H, H _{α}), $3.13 - 3.05$ (m, 1H, SCHH), $2.90 - 2.77$ (m, 3H, H _{ϵ} , SCH_{2a}), $2.61 - 2.55$ (m, 1H, SCH_{2b}), 2.11 (m, 2H, Biotin-CH₂), $1.72 - 1.57$ (m, 2H, H _{β}), $1.55 - 1.42$ (m, 4H, H _{γ} , Biotin-CH₂), $1.39 - 1.34$ (m, 9H, 3xCH₃), $1.34 - 1.15$ (m, 6H, 2xBiotin-CH₂, H _{δ}) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO- d_6):

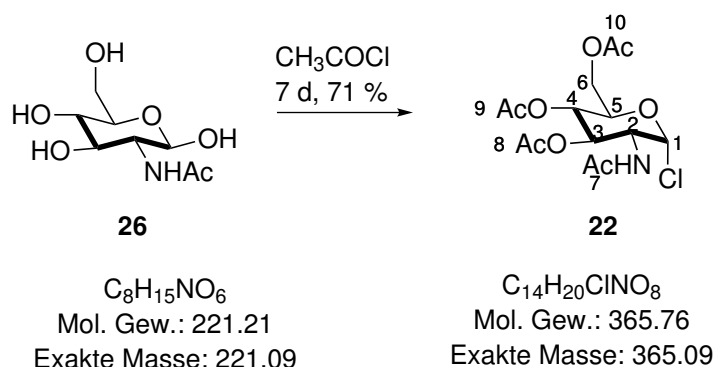
$\delta = 171.82$ (C20), 162.78 (C5), 155.56 (C11), 61.08 (C21), 59.23 (C19), 55.47 (C17), 52.53 (C10), 39.86 (C6), 39.51 (C18), 35.06 (C13), 31.35 (C14), 29.32 (C7), 28.30 (C1 - C3), 28.21 (C16), 28.09 (C8), 25.21 (C9), 22.85 (C15) ppm.

ESI-MS (pos. Ionenmodus): 511.2 (5) $[\text{M}+\text{K}]^+$, 495.3 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 473.3 (60) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

ESI-FTMS, pos.: 495.2245 (C₂₁H₃₆O₆N₄NaS) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, berechnet: 495.2253 .

6.4.7. *N*-Biotin-Lys-*N'*-Boc-OSu (45)

N-Biotin-Lys-*N'*-Boc-OH (37) (15.0 mg, 31.8 μ mol, 1.0 Äq.) wird in DMA (318 μ l) vorgelegt und mit *N*-Hydrosuccinimid (9) (11.0 mg, 95.4 μ mol, 3.0 Äq.) und EDC (18.3 mg, 95.40 μ mol, 3.0 Äq.) versetzt. Die Suspension wird 12 h bei Raumtemperatur gerührt und das Rohprodukt ohne weitere Aufarbeitung in der nächsten Stufe eingesetzt.

6.4.8. α -Chlor-*N*-acetyl-3,4,6-tri-*O*-acetylglucosamin (22)

N-Acetylglucosamin (**26**) (20.00 g, 90.40 mmol, 1.0 Äq.) wird unter starkem Rühren mit Acetylchlorid (38.70 ml, 542.40 mmol, 6 Äq.) versetzt. Die Reaktion wird über 7 d verfolgt und bei einem Verdicken der Lösung mit zusätzlichem Acetylchlorid verdünnt. Nach vollständigem Umsatz wird die Reaktionslösung in Chloroform (180 ml) aufgenommen und mit Eiswasser (250 ml) und anschließend mit eisgekühlter, ges-NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird auf ca. 50 ml eingeeengt und mit Diethylether (200 ml) versetzt. Über Nacht kristallisiert bei 4 °C das Produkt als brauner Feststoff aus. Abfiltrieren und Waschen des Niederschlages mit Diethylether (200 ml) und trocknen im Hochvakuum liefert das Zielprodukt **22**.^[67]

Ausbeute: 23.6 g (64,5 mmol), 71 % d. Th.

DC: $R_f = 0.18$ (DCM/MeOH/AcOH, 85/15/1, v/v/v)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

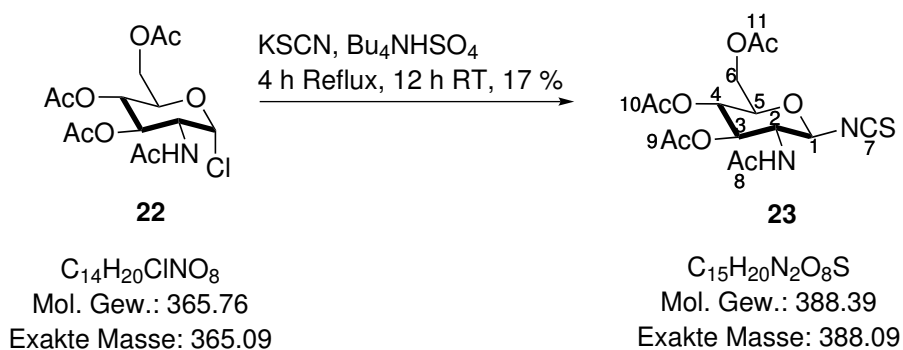
$\delta = 6.19$ (d, 1H, ³J = 3.7 Hz, NH), 5.85 (d, 1H, ³J = 8.7 Hz, H1), 5.38 - 5.16 (m, 2H, H3, H4), 4.59 - 4.47 (m, 1H, H2), 4.33 - 4.21 (m, 2H, H6), 4.18 - 4.07 (m, 1H, H5), 2.11 (s, 3H, C6O-Acetyl), 2.05 (s, 6H, C3O-Acetyl, C4O-Acetyl), 1.98 (s, 3H, NH-Acetyl) ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, 10 % Methanol-*d*₄ in CDCl₃):

$\delta = 170.71, 170.65, 169.39, 168.62$ (4xCarboxyl, C7 - C10), 88.31 (C1), 69.14 (C5), 69.03 (C4), 65.59 (C2), 61.11 (C6), 51.18 (C3), 20.45, 20.35, 20.19, 20.07 (4xMethyl, C7 - C10) ppm.

ESI-MS (pos. Ionenmodus): 388.1 (45) $[M+Na]^+$, 366.1 (40) $[M+H]^+$.

6.4.9. *N*-Acetyl-3,4,6-tri-*O*-acetylglucosamino- β -isothiocyanat (**23**)



α -Chlor-*N*-acetyl-tri-3,4,6-*O*-acetylglucosamin (**22**) (10.30 g, 28.16 mmol, 1.0 Äq.) wird in Acetonitril (150 ml) gelöst und nacheinander mit Kaliumthiocyanat (5.48 g, 56.39 mmol, 2 Äq.) und Tetrabutylammoniumbisulfat (9.57 g, 28.21 mmol, 1 Äq.) sowie Molsieb (6.10 g, 3 Å) versetzt. Der Reaktionsansatz wird unter Feuchtigkeitsausschluss 4 h refluxiert und weitere 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließende säulenchromatographische Reinigung (EtOAc/Pentan, 1/1, v/v) ergibt Zielprodukt **23** als braunen Feststoff.^[68]

Ausbeute: 1.8 g (4.63 mmol), 17 % d. Th.

DC: $R_f = 0.03$ (EtOAc/Pentan, 1/1, v/v/v)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆):

$\delta = 8.25$ (d, 1H, $^3J = 9.2$ Hz, NH), 5.36 (d, 1H, $^3J = 9.2$ Hz, H1), 5.11 (t, 1H, $^3J = 9.7$ Hz, H4), 4.89 (t, 1H, $^3J = 9.7$ Hz, H3), 4.13 (d, 1H, $^3J = 5.1$ Hz, H2), $4.09 - 3.90$ (m, 3H, H5, H6), 2.03 (s, 3H, C6O-Acetyl), 1.98 (s, 3H, C4O-Acetyl), 1.94 (s, 3H, C3O-Acetyl), 1.82 (s, 3H, NH-Acetyl) ppm.

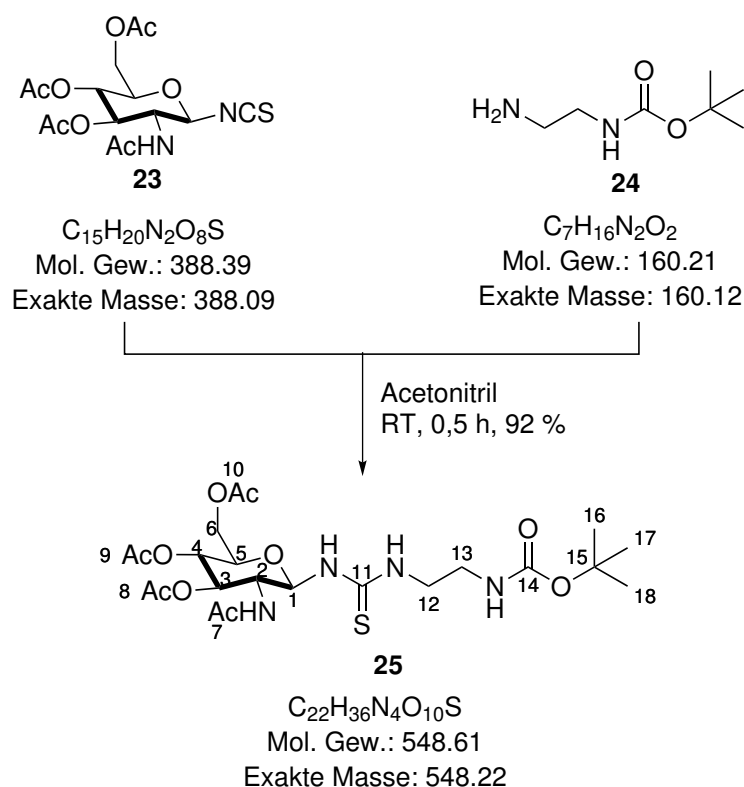
¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆):

$\delta = 170.02, 169.76, 169.58, 169.21$ (4xCarboxyl, C8 - C11), 139.81 (C7), 83.56 (C1), 72.73 (C5), 71.81 (C4), 69.08 (C2), 61.54 (C6), 54.07 (C3), $22.56, 20.52, 20.38, 20.29$ (4xMethyl, C8 - C11)

ppm.

ESI-MS (pos. Ionenmodus): 411.2 (65) $[M+Na]^+$, 389.2 (100) $[M+H]^+$.

6.4.10. β -*N*-Boc-Diaminoethylsulfocarbamido-*N*-acetyl-3,4,6-tri-*O*-acetylglucosamin (25)



N-Acetyl-3,4,6-tri-*O*-acetylglucosamino- β -isothiocyanat (**23**) (1.00 g, 2.57 mmol, 1 Äq.) wird in Acetonitril (51.50 ml) gelöst und mit *N*-Boc-Diaminoethan (**24**) (0.62 g, 3.86 mmol, 1.5 Äq.) und Triethylamin (712 μ l, 5.14 mmol, 2 Äq.) versetzt. Die Lösung wird 0.5 h bei Raumtemperatur gerührt und färbt sich während der Reaktion von rosa nach hellgelb. Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (EtOAc/Pentan, 2/2, v/v) gereinigt. Die Verbindung **25** wird als bräunlicher Feststoff erhalten.^[68]

Ausbeute: 1.30 g (2.36 mmol), 92 % d. Th.

DC: $R_f = 0.25$ (EtOAc/Pentan, 2/1, v/v)

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6):

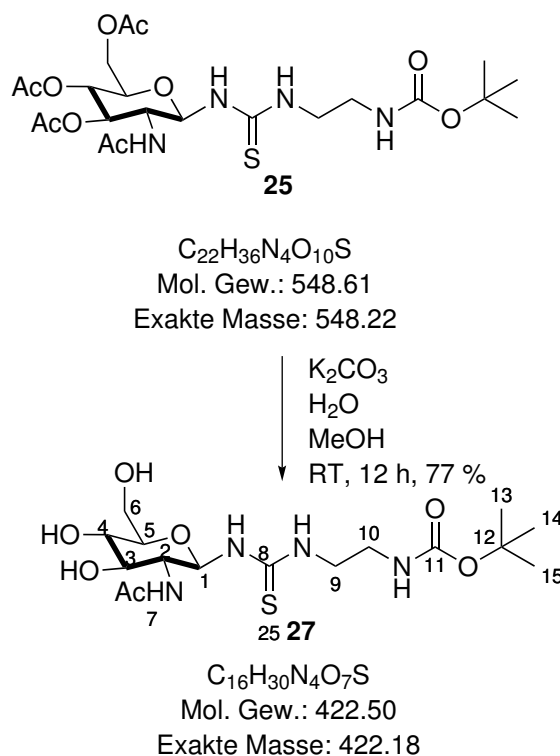
$\delta = 8.07$ (d, 1H, $^3J = 9.6$ Hz, CHNHAcetyl), 7.91 (s, 1H, OCONHH), 7.82 (s, 1H, CHNHCS), 6.84 (s, 1H, CH₂NHCS), 5.63 - 5.38 (m, 1H, H1), 5.10 (m, 1H, H4), 4.82 (t, 1H, $^3J = 9.6$ Hz, H3), 4.18 (bs, 1H, H2), 4.00 - 3.89 (m, 2H, H6), 3.82 - 3.70 (m, 1H, H5), 3.51 - 3.41 (m, 2H, OCONHCH2), 3.11 - 2.99 (m, 2H, CSNHCH2), 1.99 (s, 3H, C6O-Acetyl), 1.97 (s, 3H, C4O-Acetyl), 1.91 (s, 3H, C3O-Acetyl), 1.77 (s, 3H, NH-Acetyl), 1.38 (s, 9H, *t*-ButylCH3) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO- d_6):

$\delta = 170.40$ (C11), 170.06, 169.58, 169.39 (4xCarboxyl, C8 - C10), 156.16 (Carbonyl, C7), 155.74 (C14), 78.36 (C15), 71.92 (C5), 68.59 (C3), 61.77 (C6), 59.81 (C2), 51.88 (C13), 30.74 (C12), 28.26 (C16 - C18), 22.68, 20.59, 20.47, 20.40 (4xMethyl, C7 - C10) ppm.

ESI-MS (pos. Ionenmodus): 571.3 (35) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 549.3 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

6.4.11. β -*N*-Boc-Diaminoethylsulfocarbamido-*N*-acetylglucosamin (27)



β -*N*-Boc-Diaminoethyl-*N*-acetyl-3,4,6-tri-*O*-acetylglucosamin (**25**) (2.13 g, 3.89 mmol, 1 Äq.) wird in Methanol (38.90 ml) gelöst und mit H_2O (0.35 ml, 19.45 mmol, 5 Äq.) und K_2CO_3 (2.69 g, 19.45 mmol, 5 Äq.) versetzt und 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wird mit Ionentauscher (Dowex 50W-X8, stark sauer, Sigma-Aldrich) neutralisiert und anschließend filtriert. Das Filtrat wird am Rotationsverdampfer eingengt und es wird das Produkt (**27**) als hellbrauner Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1.27 g (3.0 mmol), 77 % d. Th.

DC: $R_f = 0.32$ (DCM/MeOH, 85/15, v/v)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O):

$\delta = 5.44$ (bs, 1H, H1), 3.92 - 3.77 (m, 2H, H6), 3.77 - 3.68 (m, 1H, H5), 3.68 - 3.55 (m, 3H, CSNHCH₂, H3), 3.54 - 3.39 (m, 2H, H4, H2), 3.30 - 3.15 (m, 2H, OCONHCH₂), 2.91 (s, 3H,

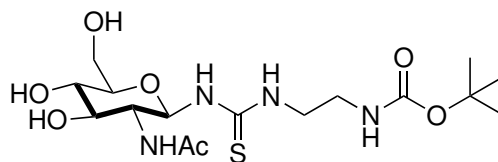
NH-Acetyl), 1.39 (s, 9H, *t*-ButylCH₃) ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, D₂O):

δ = 174.94 (C8), 158.17 (C7), 77.09 (C4), 73.96 (C3), 69.51 (C2), 60.48 (C6), 54.39 (C5), 44.15 (C9), 39.24 (C10), 27.62 (3xMethyl, C13 - C15), 21.96 (Acetyl, C7) ppm.

ESI-MS (pos. Ionenmodus): 445.1 (20) [M+Na]⁺, 423.2 (100) [M+H]⁺.

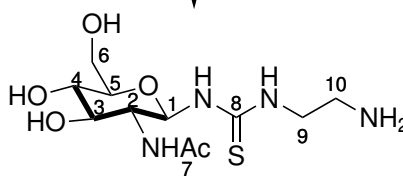
6.4.12. β-Diaminoethylsulfocarbamido-*N*-acetylglucosamin (13)



27

C₁₆H₃₀N₄O₇S
Mol. Gew.: 422.50
Exakte Masse: 422.18

1 M HCl
4°C, 28 h, 92 %



13

C₁₁H₂₂N₄O₅S
Mol. Gew.: 322.38
Exakte Masse: 322.13

Eine Lösung aus Boc-geschütztem *N*-Acetylglucosamin-Aminolinker **27** (0.40 g, 0.95 mmol, 1.0 Äq.) wird in Salzsäure (1 M, 18.9 ml) gelöst und bei 4 °C für 28 h gerührt. Nach vollständiger Reaktion wird die Lösung mit H₂O auf die Hälfte verdünnt und mit Ionentauscher (Dowex 66, Sigma Aldrich) neutralisiert. Zu der Lösung wird H₂O (94.5 ml) gegen, der Ansatz über einen Faltenfilter filtriert und der zurückbleibende Ionentauscher mit

H₂O (378 ml) gewaschen. Das Filtrat wird am Rotationsverdampfer eingeeengt und das Zielprodukt **13** als brauner Feststoff erhalten.^[68]

Ausbeute: 279.9 mg (0.87 mmol), 92 % d. Th.

DC: $R_f = 0.0$ (DCM/MeOH/AcOH, 85/15/1, v/v/v)

¹H-NMR (600 MHz, D₂O):

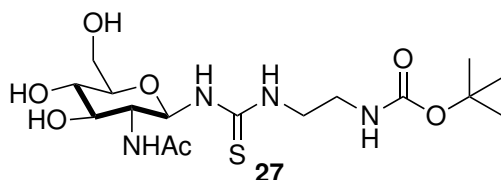
$\delta = 5.71 - 5.43$ (m, 1H, H1), $3.93 - 3.85$ (m, 2H, NHCH2), $3.84 - 3.80$ (m, 1H, H2), $3.80 - 3.73$ (m, 2H, H6), 3.65 (t, 1H, $^3J = 9.2$ Hz, H3), $3.58 - 3.54$ (m, 1H, H5), $3.52 - 3.46$ (m, 1H, H4), $3.32 - 3.18$ (m, 2H, NH₂CH2), 2.02 (s, 3H, NH-Acetyl) ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, D₂O):

$\delta = 174.99$ (C8), 77.23 (C5), 73.97 (C3), 69.50 (C4), 60.47 (C2, C6), 54.32 (C9), 38.99 (C10), 21.98 (C7) ppm.

ESI-MS (pos. Ionenmodus): 323.1 (100) [M+H]⁺.

6.4.13. β -*N*-Boc-Diaminoethylsulfocarbamido-*N*-acetylglucosamin (28)



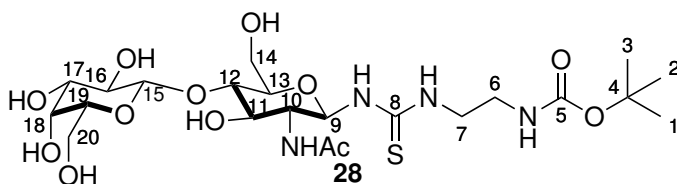
27

C₁₆H₃₀N₄O₇S

Mol. Gew.: 422.50

Exakte Masse: 422.18

1. Reaktionspuffer (1 M HEPES, 250 mM KCl, pH 7.2)
 2. Linker (7.2 mM)
 3. UDP-Gal (9 mM)
 4. MnCl₂ (0.7 mM)
 5. Alkalische Phosphatase (0.07 U/ μ L)
 6. GalT
- ↓ 30°C, ~2 d, 72 %



28

C₂₂H₄₀N₄O₁₂S

Mol. Gew.: 584.64

Exakte Masse: 584.24

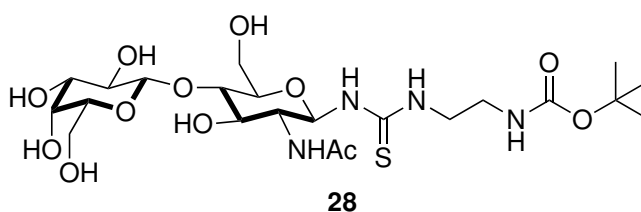
β -*N*-Boc-Diaminoethylsulfocarbamido-*N*-acetylglucosamin (**27**) (20.0 mg, 47.30 μ mol, 1.0 Äq.) wird in Reaktionspuffer (1M HEPES, 250 mM KCl, pH 7.2, 4.73 ml) gelöst und mit UDP-Galaktose (3.6 mg, 59.13 μ mol, 1.25 Äq.), MnCl₂ (0.59 mg, 4.70 μ mol, 0.1 Äq.) und Fast-Alkalischer Phosphatase (473.38 U) versetzt. Die Reaktion wird durch Zugabe von GalT gestartet und die Menge an GalT so gewählt, dass die Reaktionszeit bei ca. 2 d liegt. Die Reaktion wird mittels *reversed-phase*-HPLC verfolgt und zeigt vollständigen Umsatz. Die Reinigung erfolgt über Waters SAP-Pack Light C18 Spritzenfilter (Arbeitsanweisung in Kapitel 6.1.7.2). Die Zielverbindung **28** wird als hellbrauner Feststoff erhalten.^[68]

Ausbeute: 19.9 mg (34 μ mol), 72 % d. Th.

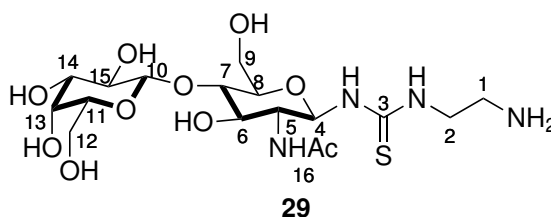
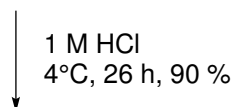
Analytische HPLC: R_t = 17.5 min (Gradient 1, Kapitel 6.1.3.1, Tabelle 2)

ESI-MS (pos. Ionenmodus): 623.2 (10) $[M+K]^+$, 607.6 (100) $[M+Na]^+$.

6.4.14. β -Diaminoethylsulfocarbamido-*N*-acetyllactosamin (29)



$C_{22}H_{40}N_4O_{12}S$
Mol. Gew.: 584.64
Exakte Masse: 584.24



$C_{17}H_{32}N_4O_{10}S$
Mol. Gew.: 484.52
Exakte Masse: 484.18

β -*N*-Boc-diaminoethylsulfocarbamido-*N*-acetyllactosamin (**28**) (15.0 mg, 25.60 μ mol, 1 Äq.) wird in Salzsäure (1 M, 512 μ l) gelöst und 26 h bei 4 °C gerührt. Nach vollständigem Umsatz wird mit Wasser (512 μ l) verdünnt und mittels Ionentauscher (Dowex 66, Sigma-Aldrich) neutralisiert. Die Lösung wird mit Wasser (2.56 ml) versetzt und über einen Faltenfilter filtriert. Der Ionentauscher wird mit Wasser (10.24 ml) gewaschen. Das Lösungsmittel wird entfernt und das Produkt am Hochvakuum getrocknet. Die Zielverbindung **29** wird als hellbrauner Feststoff erhalten.^[68]

Ausbeute: 11.1 mg (22.9 μ mol), 90 % d. Th.

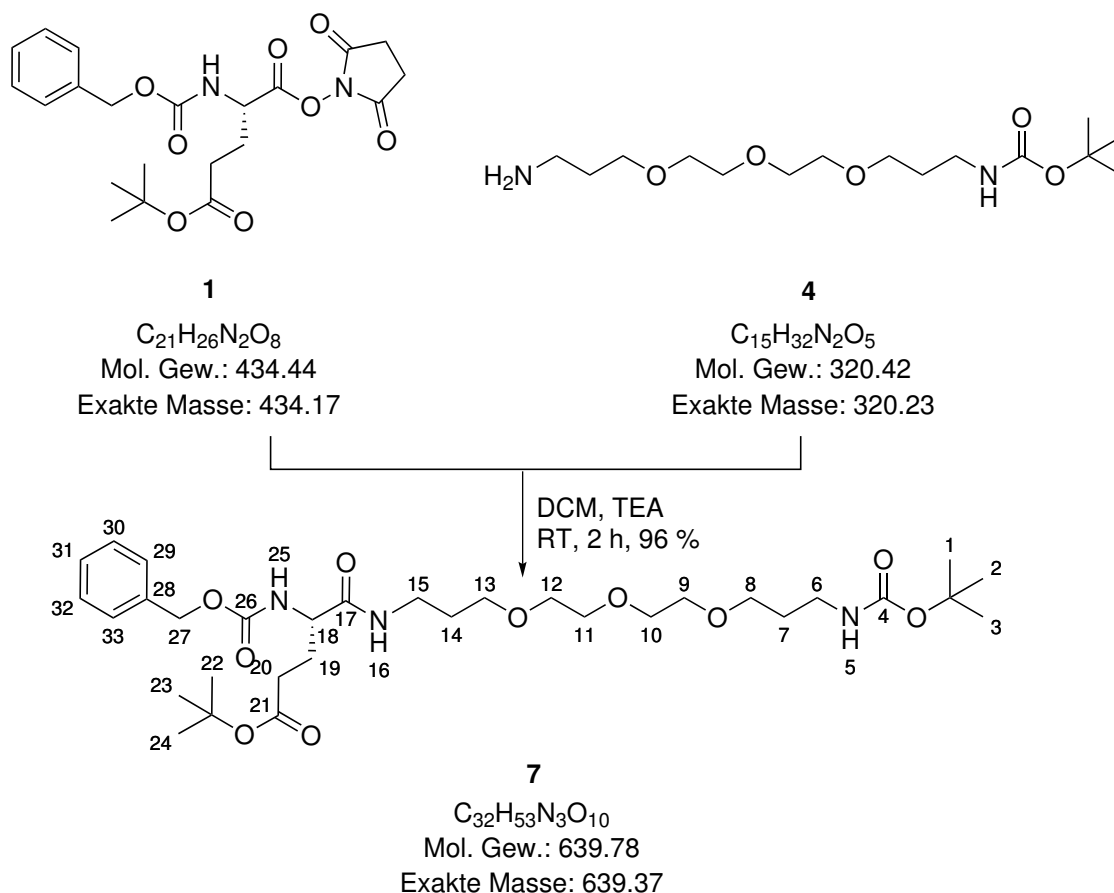
Analytische HPLC: $R_t = 3.7$ min (Gradient 1, Kapitel 6.1.3.1, Tabelle 2)

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O):

$\delta = 5.58$ (bs, 1H, GlcNAc-H1), 4.48 (d, 1H, $^3J = 7.6$ Hz, Gal-H1), 3.98 - 3.91 (m, 3H, GlcNAc-H6, GlcNAc-H2), 3.90 - 3.72 (m, 7H, NHCH_2 , GlcNAc-H3, GlcNAc-H4, Gal-H4, Gal-H6), 3.71 - 3.65 (m, 2H, Gal-H2, Gal-H5), 3.55 (t, $^3J = 7.6$ Hz, 1H, GlcNAc-H5), 3.31 - 3.17 (m, 3H, NH_2CH_2 , Gal-H3) ppm.^[68]

ESI-MS (pos. Ionenmodus): 507.2 (10) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 485.2 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

6.4.15. *N*-(*Z*)-(*S*)-Glu(*O**t*Bu)-*N'*-(Boc-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan) (7)



Unter Lichtausschluss wird Amin **4** (2.31 g, 7.20 mmol, 1.2 Äq.) in Dichlormethan (60 ml) gelöst und mit Triethylamin (2.50 ml, 18.0 mmol, 3 Äq.) und Z-Glu(OtBu)-OSu (**1**) (2.61 g, 6.00 mmol, 1 Äq.) versetzt und die Lösung für 2 h bei RT gerührt. Die Reaktion wird durch DC-Kontrolle verfolgt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der erhaltene Rückstand mittels Säulenchromatographie (EtOAc/Pentan/TEA, 60/40/1, v/v/v) gereinigt. Die Zielverbindung **7** wird als hellgelbes, hochviskoses Öl erhalten.

Ausbeute: 3.69 g (5.78 mmol), 96 % d. Th.

DC: $R_f = 0.16$ (EtOAc/Pentan/TEA, 60/40/1, v/v/v)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3):

$\delta = 7.39 - 7.24$ (m, 5H, C_6H_5), 6.86 (bs, 1H, CONH), 5.80 (bs, 1H, COCHNH), 5.10 (s, 2H, ArCH_2), 5.01 (s, 1H, OCONH), 4.25 - 4.01 (m, 1H, H_α), 3.68 - 3.47 (m, 12H, $6 \times \text{OCH}_2$), 3.45 - 3.29 (m, 2H, CONHCH_2), 3.24 - 3.14 (m, 2H, OCONHCH_2), 2.44 - 2.23 (m, 2H, H_γ), 2.15 - 2.07 (m, 1H, $\text{H}_{\beta a}$), 1.92 (m, 1H, $\text{H}_{\beta b}$), 1.82 - 1.69 (m, 4H, $2 \times \text{OCH}_2\text{CH}_2$), 1.43 (s, 18H, $2 \times \text{C}(\text{CH}_3)_3$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3):

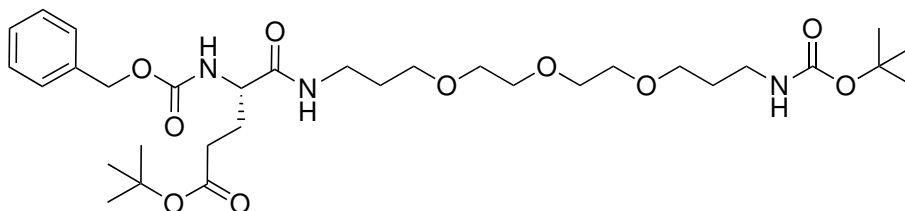
$\delta = 172.59$ (C26), 170.97 (C4), 156.04 (C21), 136.27 (C17), 128.47 - 128.102 (C28 - C33), 77.42 - 69.39 (C8 - C13), 66.67 (C27), 62.64 (C20), 38.05 (C6), 31.64 (C15), 31.37 (C19), 30.90 (C14, C7), 29.61 - 28.02 (C1 - C3, C22 - C24), 27.22 (C18) ppm.^[44]

ESI-MS (pos. Ionenmodus): 662.27 (30) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 640.07 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$.^[44]

ESI-FTMS, pos.: 662.3619 ($\text{C}_{32}\text{H}_{53}\text{O}_{10}\text{N}_3\text{Na}$) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, berechnet: 662.3731.^[44]

6.4.16. H-(S)-Glu(OtBu)-N-(Boc-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan)

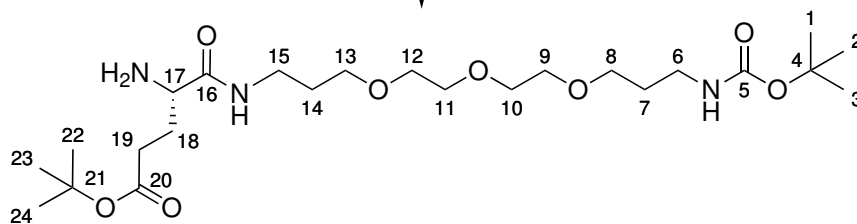
(8)



7

$C_{32}H_{53}N_3O_{10}$
Mol. Gew.: 639.78
Exakte Masse: 639.37

MeOH, Pd/C, H_2
RT, 48 h, 94 %



8

$C_{24}H_{47}N_3O_8$
Mol. Gew.: 505.65
Exakte Masse: 505.34

Zu einer Lösung aus geschütztem Amin 7 (2.27 g, 3.55 mmol, 1 Äq.) in Methanol (14.2 ml) wird Pd/C (0.71 g, 0.2 g/mmol) gegeben und die Suspension unter Wasserstoffatmosphäre (Orsatblase) für 48 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wird über Filterpapier filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer eingengt. Die Zielverbindung 8 wird als farbloses Öl erhalten.

Ausbeute: 1.69 g (3.34 mmol), 94 % d. Th.

DC: $R_f = 0.03$ (DCM/MeOH/TEA, 95/5/1, v/v/v)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ = 7.70 (bs, 1H, CONHH), 5.10 (bs, 1H, OCONHH), 3.68 - 3.53 (m, 13H, 6xO-CH2, H_α), 3.45 (m, 2H, CONH-CH2), 3.29 - 3.13 (m, 2H, OCONHCH2), 2.37 (t, 2H, ³J = 6.5 Hz, H_γ), 2.20 - 2.00 (m, 4H, H_β, NH₂), 1.86 - 1.73 (m, 4H, 2xNHCH₂CH2), 1.44 (s, 18H, 2xC(CH3)₃) ppm.

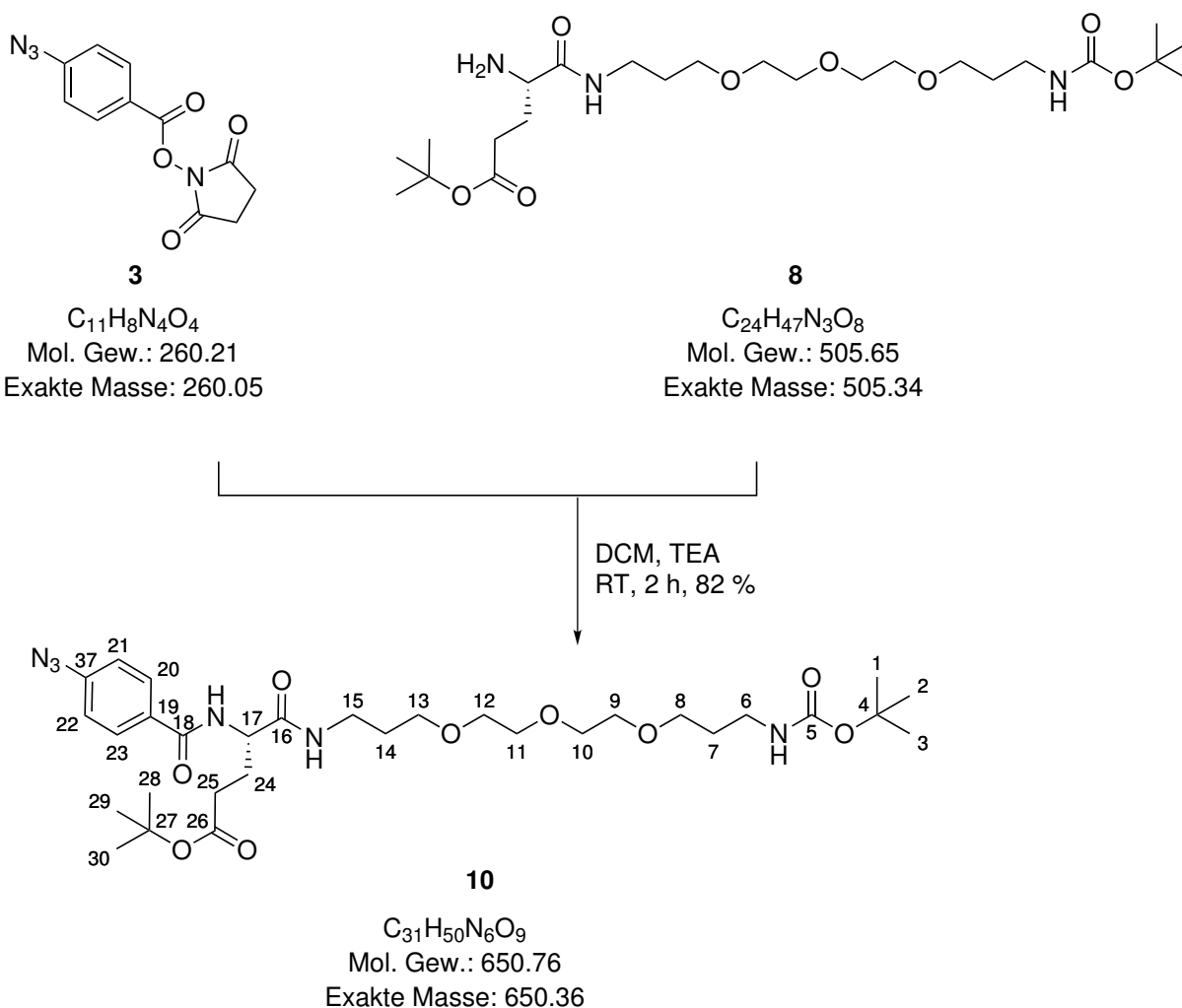
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

δ = 70.52, 70.16, 69.75 (C8 - C13), 54.59 (C15), 37.19 (C6), 31.97 (C19), 30.16 (C18), 29.61 - 29.22 (C7, C14), 28.43, 28.05 (C1 - C3, C22 - C24), 16.21 (C17) ppm.^[44]

ESI-MS (pos. Ionenmodus): 528.20 (30) [M+Na]⁺, 506.20 (100) [M+H]⁺.^[44]

ESI-FTMS, pos.: 506.3427 (C₂₄H₄₈O₈N₃) [M+H]⁺, berechnet: 506.3363.^[44]

6.4.17. *N*-(4-azidobenzamido)-(S)-Glu(OtBu)-*N'*-(Boc-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan) (10)



Zu einer Lösung aus H-(S)-Glu(OtBu)-*N*-(Boc-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan) (**8**) (0.52 g, 1.03 mmol, 1 Äq.) in Dichlormethan (10.3 ml) und Triethylamin (0.71 ml, 5.15 mmol, 5 Äq.) wird *p*-Azidobenzoesäure-NHS-ester (**3**) (0.31 g, 1.2 mmol, 1.2 Äq.) hinzugefügt und die Reaktionsmischung 2 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird entfernt und der erhaltene Rückstand säulenchromatographisch (EtOAc/Pentan/TEA 60/40/1 v/v/v) gereinigt. Die Zielverbindung **10** wird als farbloses Öl erhalten.

Ausbeute: 0.55 g (0.84 mmol), 82 % d. Th.

DC: $R_f = 0.19$ (EtOAc/Pentan/TEA, 60/40/1, v/v/v)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3):

δ = 7.86 (d, 2H, ^3J = 8.6 Hz, $2\times\text{COCCH}$), 7.40 (bs, 1H, CCONH), 7.07 (d, 2H, ^3J = 8.6 Hz, $2\times\text{N}_3\text{CCH}$), 6.97 (bs, 1H, CHCONH), 5.15 - 5.01 (m, 1H, OCONH), 4.63 - 4.51 (m, 1H, H_α), 3.68 - 3.51 (m, 12H, $6\times\text{OCH}_2$), 3.47 - 3.33 (m, 2H, CONHCH_2), 3.26 - 3.16 (m, 2H, OCONHCH_2), 2.56 - 2.45 (m, 1H, H_γ'), 2.39 - 2.28 (m, 1H, H_γ''), 2.23 - 2.13 (m, 1H, H_β'), 2.13 - 2.01 (m, 1H, H_β''), 1.85 - 1.71 (m, 4H, $2\times\text{NHCH}_2\text{CH}_2$), 1.43 (s, 18H, $9\times\text{CH}_3$) ppm.

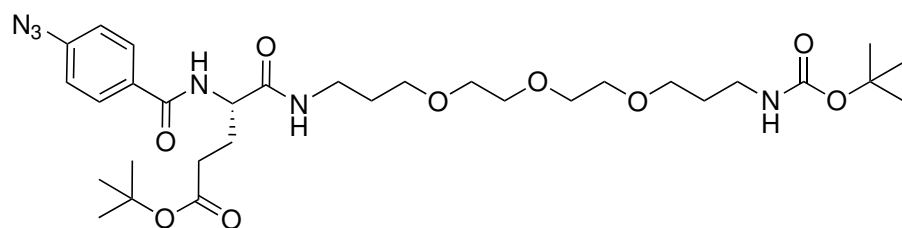
$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3):

δ = 173.28 (C5), 170.96 (C26), 166.09 (C18), 143.52 (C16), 129.01 (C20, C23), 118.91 (C21, C22), 70.49, 70.45, 70.20, 70.14, 69.76, 69.47 (C8 - C13), 53.41 (C17), 38.42 (C6), 37.97 (C15), 31.77 (C25), 29.64, 28.86 (C7, C14), 28.45 (C24), 28.06 - 27.82 (C1 - C3, C28 - C30) ppm.^[44]

ESI-MS (pos. Ionenmodus): 673.27 (40) $[\text{M}+\text{Na}]^+$.^[44]

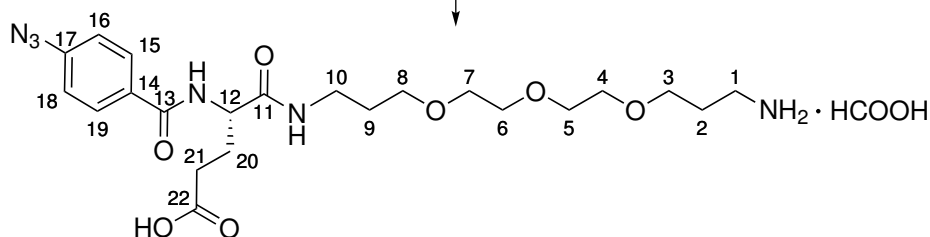
ESI-FTMS, pos.: 673.3532 ($\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{O}_9\text{N}_6\text{Na}$) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, berechnet: 673.3537.^[44]

6.4.18. *N*-(4-Azidobenzamido)-(*S*)-Glu-*N'*-(1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan) (11)

**10**

$C_{31}H_{50}N_6O_9$
Mol. Gew.: 650.76
Exakte Masse: 650.36

HCOOH
RT, 48 h, quantitativer Umsatz

**11**

$C_{22}H_{34}N_6O_7 + CH_2O_2$
Mol. Gew.: 494.54 + 46.01
Exakte Masse: 494.25 + 46.01

Das azidmodifizierte Linkergerüst **10** (0.19 g, 0.29 mmol, 1 Äq.) wird unter Lichtausschluss in Ameisensäure (3.39 ml) gelöst und 48 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt **11** als rotbraunes Öl erhalten. Da sich die eingesetzte Ameisensäure nicht vollständig aus dem zähflüssigen Produkt entfernen lässt, kann für diese Reaktion keine Ausbeute angegeben werden.

DC: $R_f = 0.00$ (EtOAc/Pentan/TEA, 60/40/1, v/v/v)

^1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$):

$\delta = 8.12$ (d, 1H, $^3J = 7.7$ Hz, CHNH), 7.91 - 7.82 (m, 2H, 2xCOCCH), 7.07 - 7.01 (m, 2H,

$2 \times \text{N}_3\text{CCH}$), 4.68 (q, 1H, $^3J = 6.1$ Hz, $\underline{\text{H}_\alpha}$), 3.72 - 3.47 (m, 12H, $6 \times \text{OCH}_2$), 3.43 - 3.26 (m, 2H, NHCH_2), 3.24 - 3.17 (m, 2H, NH_2CH_2), 2.54 - 2.38 (m, 2H, $\underline{\text{H}_\gamma}$), 2.22 - 2.02 (m, 2H, $\underline{\text{H}_\beta}$), 1.94 (quin, 2H, $^3J = 5.44$ Hz, $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.76 (quin, 2H, $^3J = 6.03$, NHCH_2CH_2) ppm.

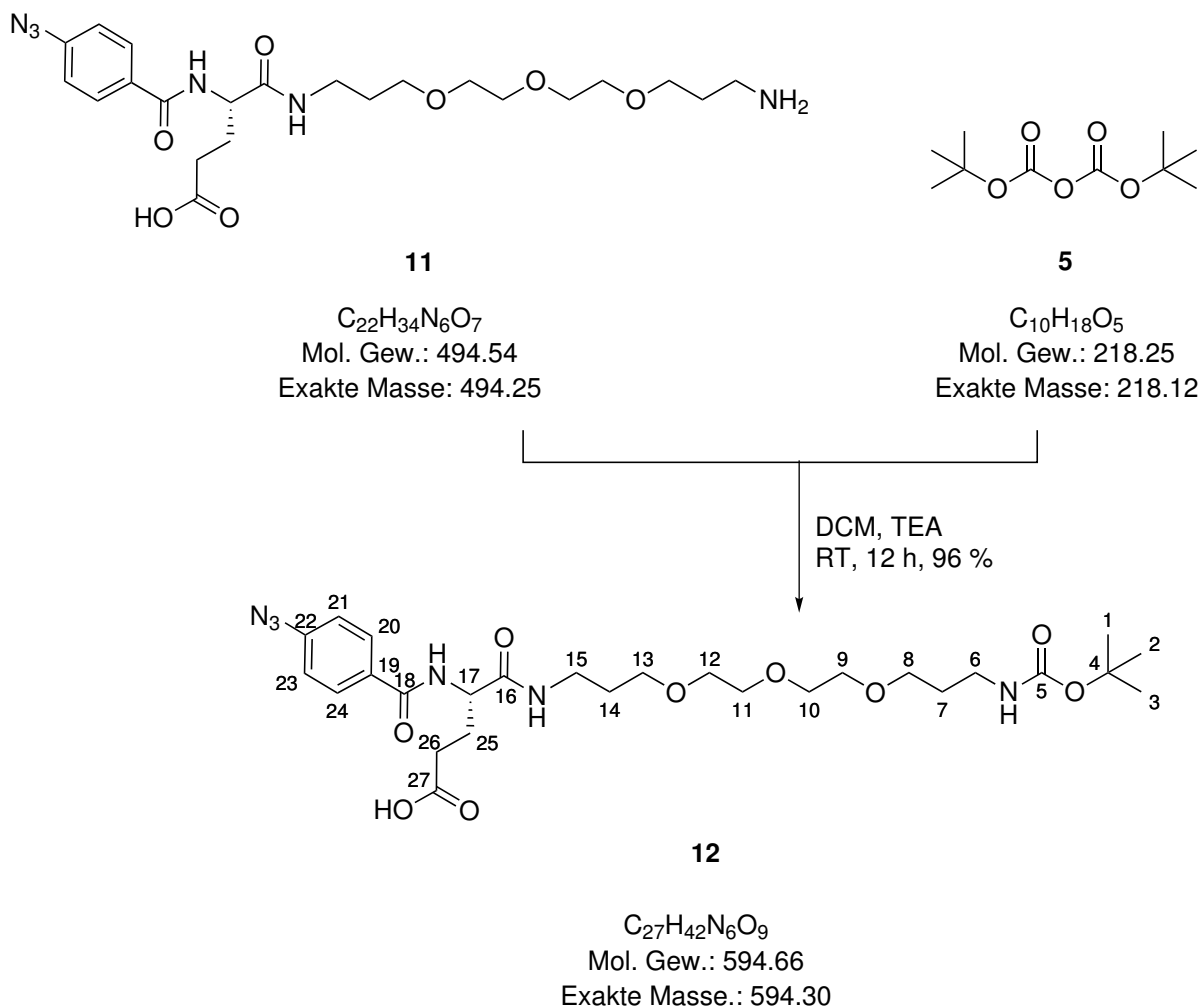
^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3):

$\delta = 172.35$ (C22), 167.05 (C13), 143.75 (C11), 129.51, 129.27 (C15, C19), 118.97 (C16, C18), 70.32 - 68.84 (C3 - C8), 40.19 (C1), 37.28 (C10), 53.31 (C12), 30.56 (C21), 28.55 (C20), 27.38 (C2), 26.24 (C9) ppm.^[44]

ESI-MS (pos. Ionenmodus): 495.20 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$.^[44]

ESI-FTMS, pos.: 495.2561 ($\text{C}_{22}\text{H}_{35}\text{O}_7\text{N}_6$) $[\text{M}+\text{H}]^+$, berechnet: 495.2567.^[44]

6.4.19. *N*-(4-Azidobenzamido)-(S)-Glu-*N'*-Boc-1,13-diamino-4,7,10,tri oxatridecan (12)



N-(4-Azidobenzamido)-(S)-Glu-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan (**11**) (0.79 g, 1.60 mmol, 1 Äq.) wird mit Triethylamin (4.44 ml, 32 mmol, 20 Äq.) in Dichlormethan (16 ml) gelöst und mit Di-*tert*-butyl-dicarbonat (**5**) (0.70 g, 3.20 mmol, 2 Äq.) versetzt. Die Lösung wird 12 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss gerührt und das Lösungsmittel anschließend entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (EtOAc/AcOH, 99/1, v/v) gereinigt. Die Zielverbindung **12** wird als gelbes Öl erhalten.

Ausbeute: 0.91 g (1.54 mmol), 96 % d. Th.

DC: $R_f = 0.11$ (EtOAc/AcOH, 99/1, v/v)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ = 7.87 (d, 2H, ³J = 8.5 Hz, 2xCOCCH), 7.62 (d, 1H, ³J = 7.5 Hz, CHNH), 7.37 - 7.29 (m, 1H, CO-NH), 7.05 (d, 2H, ³J = 8.5 Hz, 2xN₃CCH), 4.77 - 4.66 (m, 1H, H_α), 3.74 - 3.53 (m, 12H, 6xOCH₂), 3.51 - 3.29 (m, 2H, CONHCH₂), 3.21 (t, 2H, ³J = 6.3 Hz, OCONHCH₂), 2.70 - 2.38 (m, 2H, H_γ), 2.30 - 2.10 (m, 2H, H_β), 1.86 - 1.71 (m, 4H, 2xNHCH₂CH₂), 1.44 (s, 9H, 3xCCH₃) ppm.

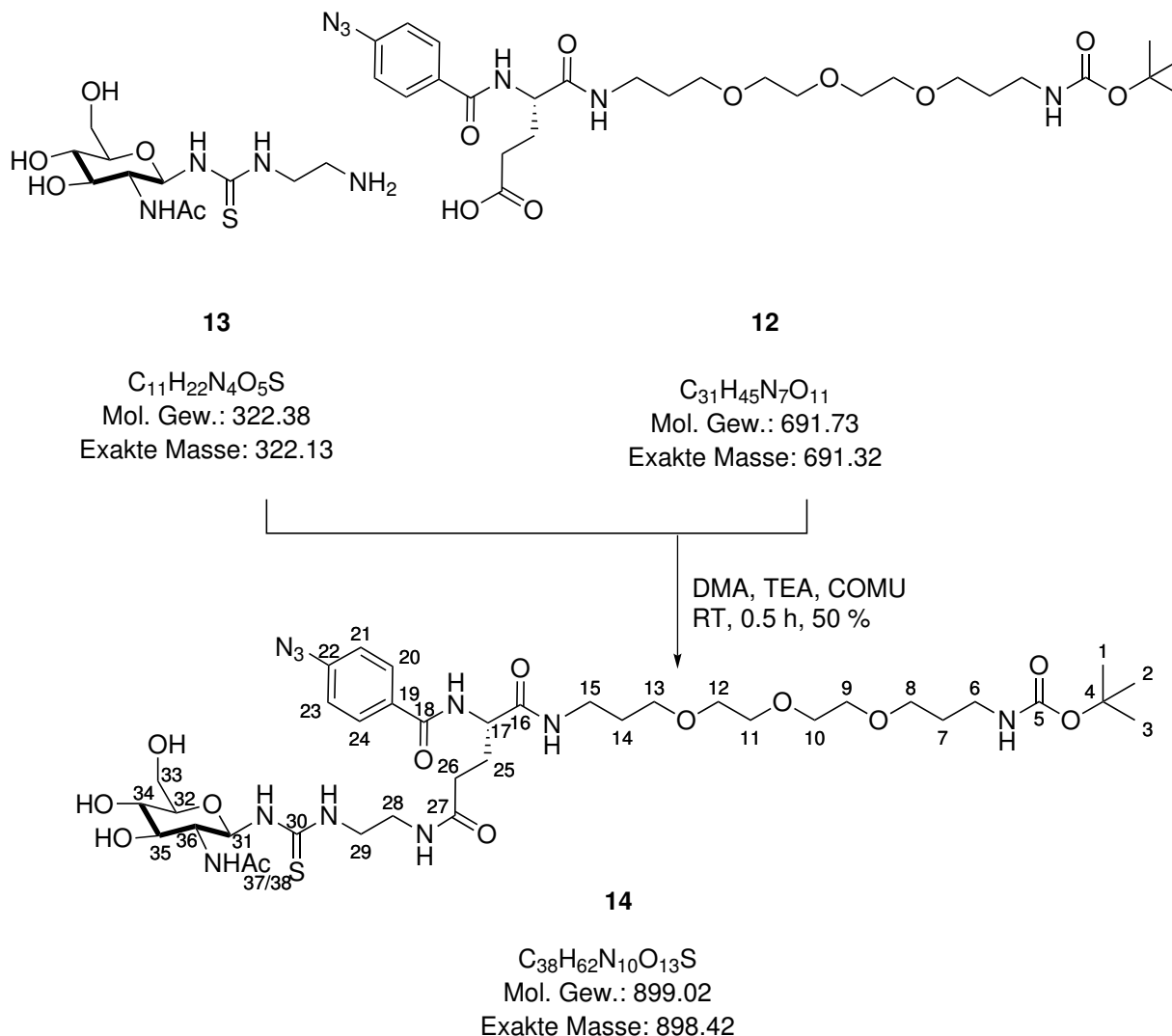
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

δ = 176.32 (C27), 143.56 (C16), 129.19 (C20, C24), 118.90 (C21, C23), 70.34, 70.16, 70.10, 69.86, 69.32, 68.41 (C8 - C13), 52.67 (C17), 38.67 (C6), 38.26 (C15), 30.37 (C26), 29.59, 28.42 (C7, C14), 28.42 (C1 - C3), 28.10 (C25) ppm.^[44]

ESI-MS (pos. Ionenmodus): 617.20 (100) [M+Na]⁺.^[44]

ESI-FTMS, pos.: 617.2907 (C₂₇H₄₂O₉N₆Na) [M+Na]⁺, berechnet: 617.2911^[44]

**6.4.20. *N*-(4-Azidobenzamido)-(S)-Glu-
(β -diaminoethylsulfocarbamido-*N*-acetylglucosamino)-*N'*-
Boc-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan (14)**



Zu einer Lösung aus modifizierter Carbonsäure **12** (124.5 mg, 0.18 mmol, 1 Äq.) und TEA (250 μ l, 1.80 mmol, 10 Äq.) in DMA (1.80 ml) werden linkermodifiziertes *N*-Acetylglucosamin **13** (87.0 mg, 0.27 mmol, 1.5 Äq.) und COMU (231 mg, 0.54 mmol, 3 Äq.) gegeben und die Lösung 0.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Hochvakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (DCM/MeOH/AcOH, 85/15/1, v/v/v) gereinigt. Das Produkt **14** wird als hellbrauner Feststoff erhalten.

Ausbeute: 80.7 mg (89.8 μmol), 50 % d. Th.

DC: $R_f = 0.21$ (DCM/MeOH/AcOH, 85/15/1, v/v/v)

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O):

$\delta = 7.85$ (d, 2H, $^3J = 8.7$ Hz, $2\times\text{COCCH}$), 7.22 (d, 2H, $^3J = 8.7$ Hz, $2\times\text{N}_3\text{CCH}$), $4.49 - 4.40$ (m, 1H, H_α), $3.91 - 3.40$ (m, 23H, $6\times\text{OCH}_2$, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$, $5\times\text{GlcNAc-CH}$, OHCH_2), $3.36 - 3.25$ (m, 2H, OCONHCH_2), $3.14 - 3.07$ (m, 2H, CHCONHCH_2), $2.47 - 2.36$ (m, 2H, H_γ), $2.24 - 2.16$ (m, 1H, $\text{H}_{\beta a}$), $2.15 - 2.06$ (m, 1H, $\text{H}_{\beta b}$), 1.99 (s, 3H, AcetylCH_3), 1.81 (quin, 2H, $^3J = 6.5$ Hz, $\text{OCONHCH}_2\text{CH}_2$), 1.72 (quin, 2H, $^3J = 6.5$ Hz, $\text{CHCONHCH}_2\text{CH}_2$), 1.41 (s, 9H, $\text{C(CH}_3)_3$) ppm.

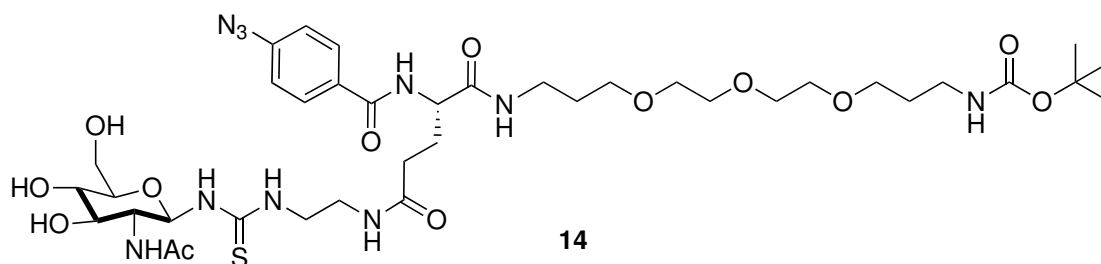
$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, D_2O):

$\delta = 177.95$ (C18), 173.18 (C27), 144.07 (C16), 129.18 (C20, C24), 119.13 (C21, C23), 77.13 (C32), 73.92 (C35), 69.57 (C34), 69.49 , 69.45 , 69.31 , 69.38 , 68.26 , 68.24 (C8 - C13), 60.57 (C33, C36), 54.38 (C17), 54.25 (C29), 37.12 (C6, C28), 36.48 (C15), 32.21 (C25), 28.15 (C14), 27.69 (C26, C7), 21.22 (C38), 8.22 (C1 - C3) ppm.

ESI-MS (pos. Ionenmodus): 921.4 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 899.4 (20) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

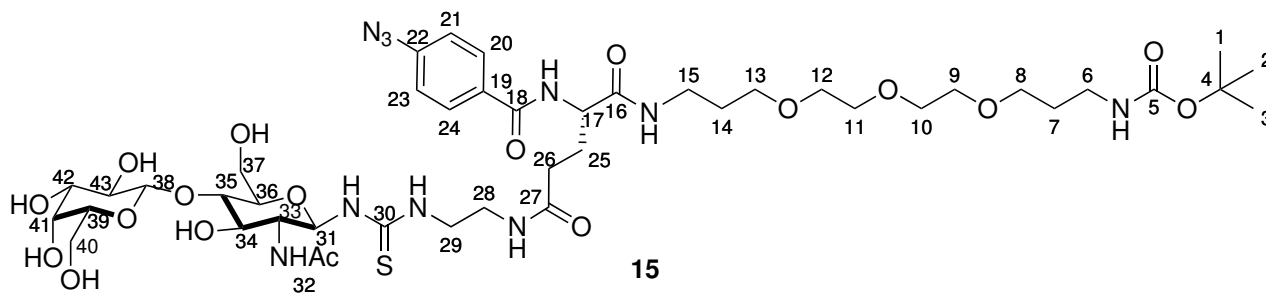
ESI-FTMS, pos.: 921.4135 ($\text{C}_{38}\text{H}_{62}\text{O}_{13}\text{N}_{10}\text{NaS}$) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, berechnet: 921.4116^[44]

6.4.21. *N*-(4-Azidobenzamido)-(S)-Glu-(β -diaminoethylsulfocarbamido-*N*-acetyllactosamino)-*N'*-Boc-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan (15)



$C_{38}H_{62}N_{10}O_{13}S$
Mol. Gew.: 899.02
Exakte Masse: 898.42

Reaktionspuffer (1 M HEPES, 250 mM KCl, pH 7.2)
Grundgerüst (7.2 mM)
UDP-Gal (9 mM)
MnCl₂ (0.7 mM)
Alkalische Phosphatase (0.07 U/ μ L)
GalT
↓
30°C, ~2 d, 61 %



$C_{44}H_{72}N_{10}O_{18}S$
Mol. Gew.: 1061.16
Exakte Masse: 1060.47

GlcNAc-modifiziertes Grundgerüst **14** (20.0 mg, 22.20 μ mol, 1 Äq.) wird in Reaktionspuffer (1 M HEPES, 250 mM KCl, pH 7.2, 2.20 ml) gelöst und mit UDP-Galaktose (17.0 mg, 27.80 μ mol, 1.25 Äq.), MnCl₂ (0.28 mg, 2.20 μ mol, 0.1 Äq.) und Fast-Alkalischer Phosphatase (222 U) versetzt. Die Reaktion wird durch Zugabe von GalT gestartet und die Menge an GalT so gewählt, dass die Reaktionszeit bei 2 d liegt. Die Reaktion wird mit-

tels *reversed-phase*-HPLC verfolgt und zeigt vollständigen Umsatz. Die Reinigung erfolgt über Waters SAP-Pack Light C18 Spritzenfilter (Arbeitsanweisung in Kapitel 6.1.7.2). Die Zielverbindung **15** wird als hellbrauner Feststoff erhalten.^[68]

Ausbeute: 14.3 mg (13.5 μ mol), 61 % d. Th.

Analytische HPLC: R_t = 16.9 min (Gradient 5, Kapitel 6.1.3.1, Tabelle 6)

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O):

δ = 7.83 (d, 2H, ^3J = 8.4 Hz, $2\times\text{COCCH}$), 7.20 (d, 2H, ^3J = 8.4 Hz, $2\times\text{N}_3\text{CCH}$), 4.47 - 4.39 (m, 1H, H_α), 3.92 - 3.56 (m, 24H, $4\times\text{OCH}_2$, CSNHCH_2 , $10\times\text{LAcNAc-CH}$, $2\times\text{OHCH}_2$), 3.55 - 3.49 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.32 - 3.25 (m, 4H, CHCONHCH_2 , $\text{CSNHCH}_2\text{CH}_2$), 3.08 (t, 2H, ^3J = 6.6 Hz, OCONHCH_2), 2.42 - 2.34 (m, 2H, H_γ), 2.22 - 2.14 (m, 1H, $\text{H}_{\beta\text{a}}$), 2.13 - 2.04 (m, 1H, $\text{H}_{\beta\text{b}}$), 1.96 (s, 3H, Acetyl CH_3), 1.77 (quin, 2H, ^3J = 6.4 Hz, $\text{OCONHCH}_2\text{CH}_2$), 1.70 (quin, 2H, ^3J = 6.4 Hz, $\text{CHCONHCH}_2\text{CH}_2$), 1.38 (s, 9H, $3\times\text{CH}_3$) ppm.

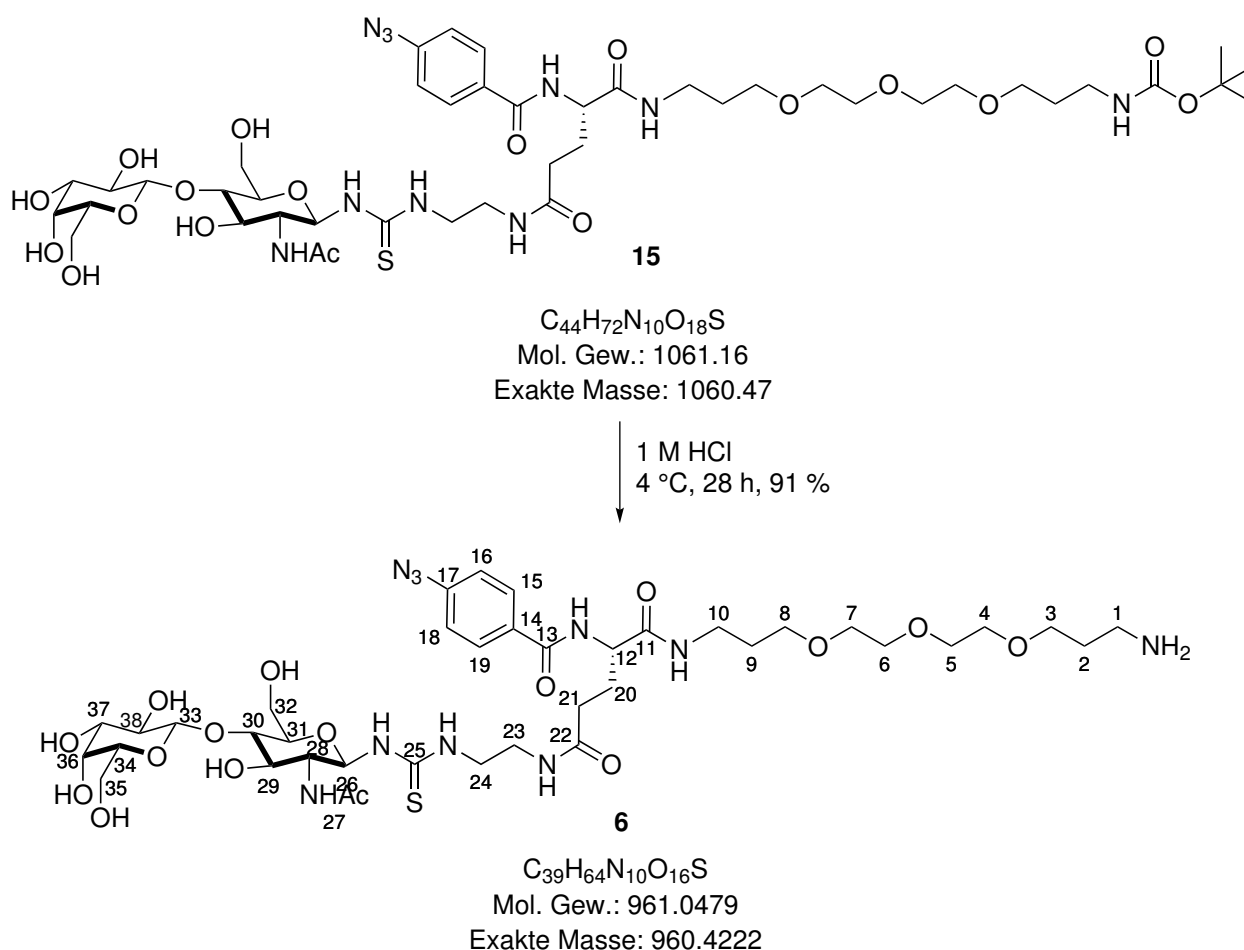
$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, D_2O):

δ = 173.25 (C18), 160.41 (C27), 156.73 (C5), 144.14 (C16), 135.74 (C30), 129.17 (C20, C24), 119.15 (C21, C23), 75.31 (C36, C39), 72.46 (C34, C42), 70.88 (C35, C41), 69.47, 69.43, 69.22, 68.47, 68.35, 68.24 (C8 - C13), 60.49 (C37, C33), 59.86 (C40, C43), 54.14 (C17), 53.87 (C29), 38.67 (C28), 37.02 (C15), 36.44 (C6), 32.16 (C25), 28.69 (C14), 28.10 (C7), 27.63 (C1 - C3), 26.76 (C26), 21.92 (C32) ppm.

ESI-MS (pos. Ionenmodus): 1083.6 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1061.6 (95) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

ESI-FTMS, pos.: 1083.4640 ($\text{C}_{44}\text{H}_{72}\text{O}_{18}\text{N}_{10}\text{NaS}$) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, berechnet: 1083.4644.

6.4.22. *N*-(4-Azidobenzamido)-(S)-Glu-(β -diaminoethylsulfocarbamido-*N*-acetyllactosamino)-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan (6)



LAcNAc-modifiziertes Grundgerüst **15** (18.0 mg, 17.0 μ mol, 1 Äq.) wird in Salzsäure (1 M, 340 μ l) gelöst und 28 h bei 4 °C gerührt. Nach vollständigem Umsatz (Reaktionskontrolle mittels *reversed-phase*-HPLC) wird die Lösung mit Wasser auf die Hälfte verdünnt, mit Ionentauscher (Dowex 66, Sigma-Aldrich) neutralisiert, mit Wasser (1.70 ml) verdünnt und über einen Faltenfilter filtriert. Der zurückbleibende Ionentauscher wird mit Wasser (6.80 ml) gewaschen und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingengt. Das Zielprodukt **6** wird als hellbrauner Feststoff erhalten.

Ausbeute: 14.9 mg (15.5 μ mol), 91 % d. Th.

DC: $R_f = 0.02$ (DCM/MeOH/AcOH, 85/15/1, v/v/v)

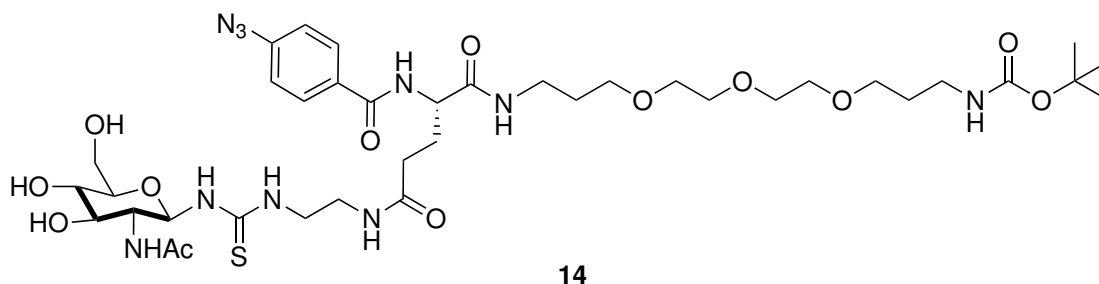
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O):

$\delta = 7.86$ (d, 2H, $^3J = 8.7$ Hz, $2\times\text{COCCH}$), 7.24 (d, 2H, $^3J = 8.7$ Hz, $2\times\text{N}_3\text{CCH}$), $4.50 - 4.40$ (m, 1H, H_α), $3.96 - 3.58$ (m, 24H, $4\times\text{OCH}_2$, CSNHCH_2 , $10\times\text{LAcNAc-CH}_2$, $2\times\text{OHCH}_2$), $3.58 - 3.52$ (m, 4H, $2\times\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), $3.36 - 3.26$ (m, 4H, CHCONHCH_2 , $\text{CSNHCH}_2\text{CH}_2$), $3.09 - 2.99$ (m, 2H, NH_2CH_2), $2.46 - 2.38$ (m, 2H, H_γ), $2.24 - 2.16$ (m, 1H, $\text{H}_{\beta a}$), $2.15 - 2.07$ (m, 1H, $\text{H}_{\beta b}$), 1.97 (s, 3H, Acetyl CH_3), 1.90 (quin, 2H, $^3J = 6.5$ Hz, $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.79 (quin, 2H, $^3J = 6.5$ Hz, $\text{CHCONHCH}_2\text{CH}_2$) ppm.

ESI-MS (pos. Ionenmodus): 983.4 (45) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 961.4 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

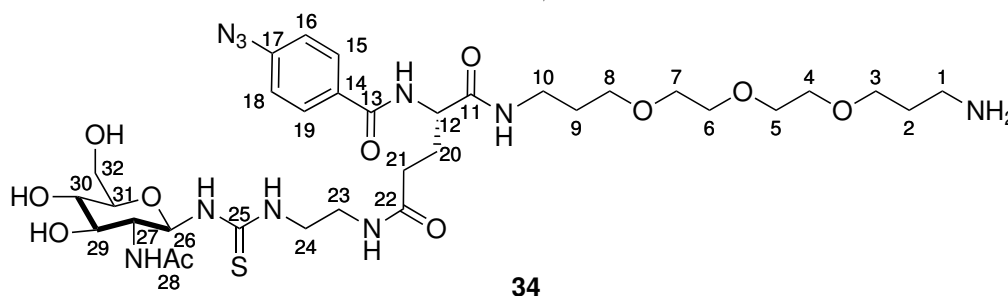
ESI-FTMS, pos.: 961.4300 ($\text{C}_{39}\text{H}_{65}\text{O}_{16}\text{N}_{10}\text{S}$) $[\text{M}+\text{H}]^+$, berechnet: 961.4301.

6.4.23. *N*-(4-Azidobenzamido)-(*S*)-Glu-(β -diaminoethylsulfocarbamido-*N*-acetylglucosamino)-*N'*-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan (34)



$C_{38}H_{62}N_{10}O_{13}S$
Mol. Gew.: 899.02
Exakte Masse: 898.42

1M HCl,
4°C, 26h, 91 %



$C_{33}H_{54}N_{10}O_{11}S$
Mol. Gew.: 798.91
Exakte Masse: 798.37

Boc-geschütztes Amin **14** (16.2 mg, 18.0 μ mol, 1.0 Äq.) wird in Salzsäure (1 M, 360 μ l) gelöst und 26 h bei 4 °C gerührt. Die Lösung wird mit Wasser (360 μ l) verdünnt und mit Ionentauscher (Dowex 66, Sigma-Aldrich) neutralisiert. Das Reaktionsgemisch wird anschließend mit Wasser (1.8 ml) versetzt und über einen Faltenfilter filtriert. Der zurückgebliebene Ionentauscher wird mit Wasser (7.2 ml) gewaschen. Das Filtrat wird am Rotationsverdampfer eingedunstet und das Produkt **34** als bräunlicher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 13.1 mg (16.4 μ mol), 91 % d. Th.

DC: $R_f = 0.06$ (DCM/MeOH/TEA, 80/20/1, v/v/v)

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O):

$\delta = 7.89 - 7.81$ (m, 2H, $2 \times \text{COCCH}$), $7.26 - 7.18$ (m, 2H, $2 \times \text{N}_3\text{CCH}$), $4.49 - 4.39$ (m, 1H, H_α), $3.96 - 3.39$ (m, 21H, $6 \times \text{OCH}_2$, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$, $5 \times \text{GlcNAc-CH}$), $3.35 - 3.25$ (m, 4H, CHCONHCH_2 , GlcNAc-CH_2), $3.12 - 3.06$ (t, 2H, $^3J = 6.6$ Hz, NH_2CH_2), $2.46 - 2.37$ (m, 2H, H_γ), $2.25 - 2.17$ (m, 1H, $\text{H}_{\beta a}$), $2.16 - 2.07$ (m, 1H, $\text{H}_{\beta b}$), 1.98 (s, 3H, AcetylCH_3), 1.94 (quin, 2H, $^3J = 6.8$ Hz, $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.79 (quin, 2H, $^3J = 6.8$ Hz, $\text{CHCONHCH}_2\text{CH}_2$) ppm.

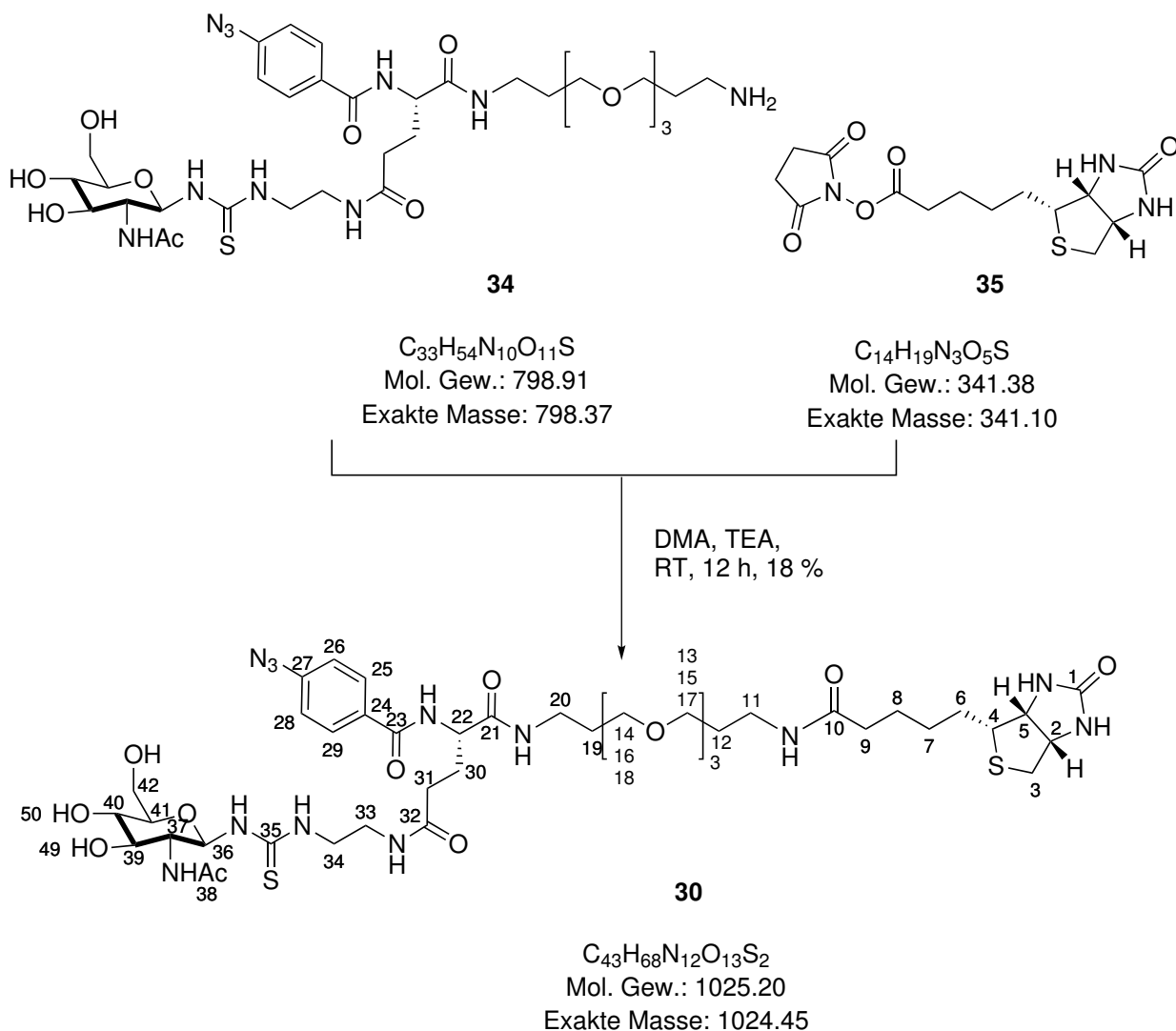
$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, D_2O):

$\delta = 215.52$ (C25), 173.33 (C13), 169.54 (C22), 144.15 (C11), 129.14 (C15, C19), 119.13 (C16, C18), 77.15 (C31), 73.84 (C29), 69.52 (C30), 69.40 , 69.33 , 69.23 , 68.23 , 68.18 (C3 - C8), 60.52 (C27, C32), 54.20 (C12), 54.02 (C24), 37.64 (C1, C23), 36.37 (C10), 32.17 (C20), 28.13 (C9), 26.73 (C21), 26.42 (C2), 21.83 (C28) ppm.

ESI-MS (pos. Ionenmodus): 821.4 (20) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 799.4 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

ESI-FTMS, pos.: 799.3767 ($\text{C}_{33}\text{H}_{55}\text{O}_{11}\text{N}_{10}\text{S}$) $[\text{M}+\text{H}]^+$, berechnet: 799.3772

6.4.24. *N*-(4-Azidobenzamido)-(*S*)-Glu-(β -diaminoethylsulfocarbamido-*N*-acetylglucosamino)-*N'*-biotinyl-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan (30)



N-(4-Azidobenzamido)-(*S*-Glu-(β -diaminoethylsulfocarbamido-*N*-acetylglucosamino)-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan (**34**) (1.60 mg, 2.00 μ mol, 1.0 Äq.) wird in DMA (20 μ l) gelöst und mit Biotin-NHS-Ester (**35**) (1.0 mg, 3 μ mol, 1.5 Äq.) und Triethylamin (8.31 μ l, 60 μ mol, 3.0 Äq.) versetzt und 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (DCM/MeOH/AcOH, 80/20/1, v/v/v) gereinigt. Die Zielverbindung **30** wird als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 0.36 mg (351 nmol), 18 % d. Th.

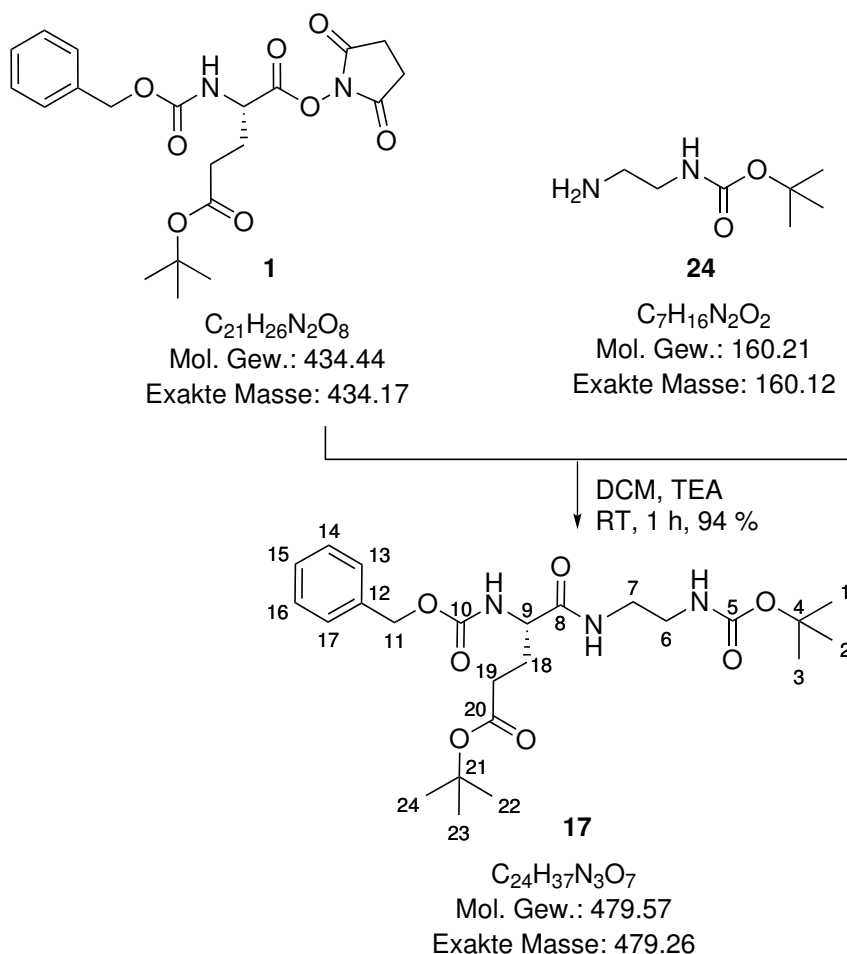
DC: $R_f = 0.15$ (DCM/MeOH/AcOH, 80/20/1, v/v/v)

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O):

$\delta = 7.83$ (d, 2H, $^3J = 8.7$ Hz, $2\times\text{COCCH}$), 7.21 (d, 2H, $^3J = 8.7$ Hz, $2\times\text{N}_3\text{CCH}$), $4.58 - 4.52$ (m, 1H, H_α), $4.46 - 4.40$ (m, 1H, SCH_2CH), $4.38 - 4.33$ (m, 1H, SCHCH), $3.91 - 3.37$ (m, 23H, $6\times\text{OCH}_2$, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$, $5\times\text{GlcNAc-CH}$, GlcNAc-CH_2), $3.29 - 3.23$ (m, 2H, PEG-Linker-CH_2), $3.22 - 3.14$ (m, 3H, PEG-Linker-CH_2 , SCH), $2.96 - 2.94$ (m, 1H, SCH_2a), $2.94 - 2.92$ (m, 1H, SCH_2b), $2.23 - 2.16$ (m, 2H, Bioin-COCH_2), $2.14 - 2.02$ (m, 4H, H_β , H_γ), 1.96 (s, 3H, Acetyl-CH_3), $1.81 - 1.70$ (m, 4H, $2\times\text{PEG-Linker-CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), $1.68 - 1.48$ (m, 4H, Biotin-CH_2), $1.40 - 1.30$ (m, 2H, $\text{Biotin-CHCH}_2\text{CH}_2$) ppm.

ESI-MS (pos. Ionenmodus): 1063.4 (10) $[\text{M}+\text{K}]^+$, 1047.4 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1025.4 (50) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

ESI-FTMS, pos.: 1047.4362 ($\text{C}_{43}\text{H}_{68}\text{O}_{13}\text{N}_{12}\text{NaS}_2$) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, berechnet: 1047.4368.

6.4.25. *N*-Z-(*S*)-Glu(O*t*Bu)-*N'*-Boc-diaminoethan (**17**)

Z-Glu(O*t*Bu)-OSu (**1**) (1.00 g, 2.30 mmol, 1.0 Äq.) wird unter Lichtausschluss in Dichlormethan (23 ml) gelöst und mit *N*-Boc-diaminoethan (**24**) (442.0 mg, 2.76 mmol, 1.3 Äq.) und Triethylamin (956 μ l, 6.90 mmol, 3 Äq.) versetzt und für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer eingeeengt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie (EtOAc/Pentan/TEA, 50/50/1, v/v/v) gereinigt. Die Zielverbindung **17** wird als farbloses Öl erhalten.

Ausbeute: 1.04 g (2.17 mmol), 94 % d. Th.

DC: R_f = 0.49 (EtOAc/Pentan/TEA, 50/50/1, v/v/v)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3):

$\delta = 7.35 - 7.21$ (m, 5H, C_5H_5), 6.69 (m, 1H, CHCONH), 5.60 (m, 1H, CHNH), $5.07 - 5.00$ (m, 2H, $\text{C}_5\text{H}_5\text{CH}_2$), 4.88 (m, 1H, OCONH), 4.18 (q, 1H, $^3J = 6.6$ Hz, H_α), $3.35 - 3.24$ (m, 2H, CONHCH_2), $3.23 - 3.10$ (m, 2H, OCONHCH_2), $2.42 - 2.14$ (m, 2H, H_γ), $2.11 - 1.94$ (m, 1H, $\text{H}_{\beta\text{a}}$), $1.92 - 1.76$ (m, 1H, $\text{H}_{\beta\text{b}}$), 1.36 (s, 18H, $2 \times \text{C}(\text{CH}_3)_3$) ppm.

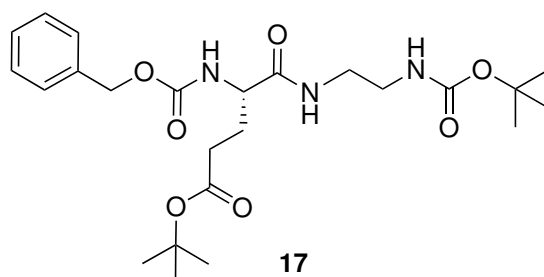
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3):

$\delta = 172.75$ (C5), 171.73 (C10), 156.56 (C20), 136.14 (C8), 128.50 , 128.15 , 128.05 (C13 - C17), 67.02 (C11), 54.54 (C9), 40.41 , 40.18 (C6-C7), 28.34 , 28.03 (C1-C3, C22-C24), 31.65 (C18, C19) ppm.

ESI-MS (pos. Ionenmodus): 518.3 (5) $[\text{M}+\text{K}]^+$, 502.3 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 380.2 (25) $[\text{M}-\text{Boc}+2\text{H}]^+$.

ESI-FTMS, pos.: 502.2524 ($\text{C}_{24}\text{H}_{37}\text{O}_7\text{N}_3\text{Na}$) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, berechnet: 502.2529 .

6.4.26. H-(S)-Glu(OtBu)-N'-Boc-diaminoethan (50)



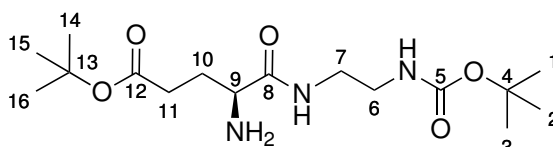
17

$\text{C}_{24}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_7$

Mol. Gew.: 479.57

Exakte Masse: 479.26

$\downarrow$ Pd/C, H_2
RT, 12 h, quantitativer Umsatz



50

$\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_5$

Mol. Gew.: 345.43

Exakte Masse: 345.23

N-Z-(*S*)-Glu(*O*tBu)-*N'*-Boc-diaminoethan (**17**) (1.04 g, 2.17 mmol, 1.0 Äq.) wird in Methanol (8.86 ml) gelöst und mit Pd/C (0.434 g) versetzt. Über eine Orsatblase wird Wasserstoff aufgegeben und die Lösung für 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Aktivkohle wird abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die Zielverbindung **50** wird als farbloses Öl erhalten. Da sich die Aktivkohle nicht quantitativ entfernen lässt wird keine Ausbeute angegeben.

DC: $R_f = 0.21$ (EtOAc/Pentan/TEA, 50/50/1, v/v/v)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3):

$\delta = 7.52$ (s, 1H, CHCONH), 5.04 (s, 1H, H_α), $3.41 - 3.32$ (m, 2H, Linker- CH_2), $3.30 - 3.22$ (m, 2H, Linker- CH_2), $2.39 - 2.28$ (m, 2H, H_γ), $2.14 - 2.00$ (m, 1H, $\text{H}_{\beta a}$), 1.80 (sept, 1H, $^3J = 6.7$ Hz, $\text{H}_{\beta b}$), 1.43 (s, 18H, $2 \times \text{CCH}_3$) ppm.

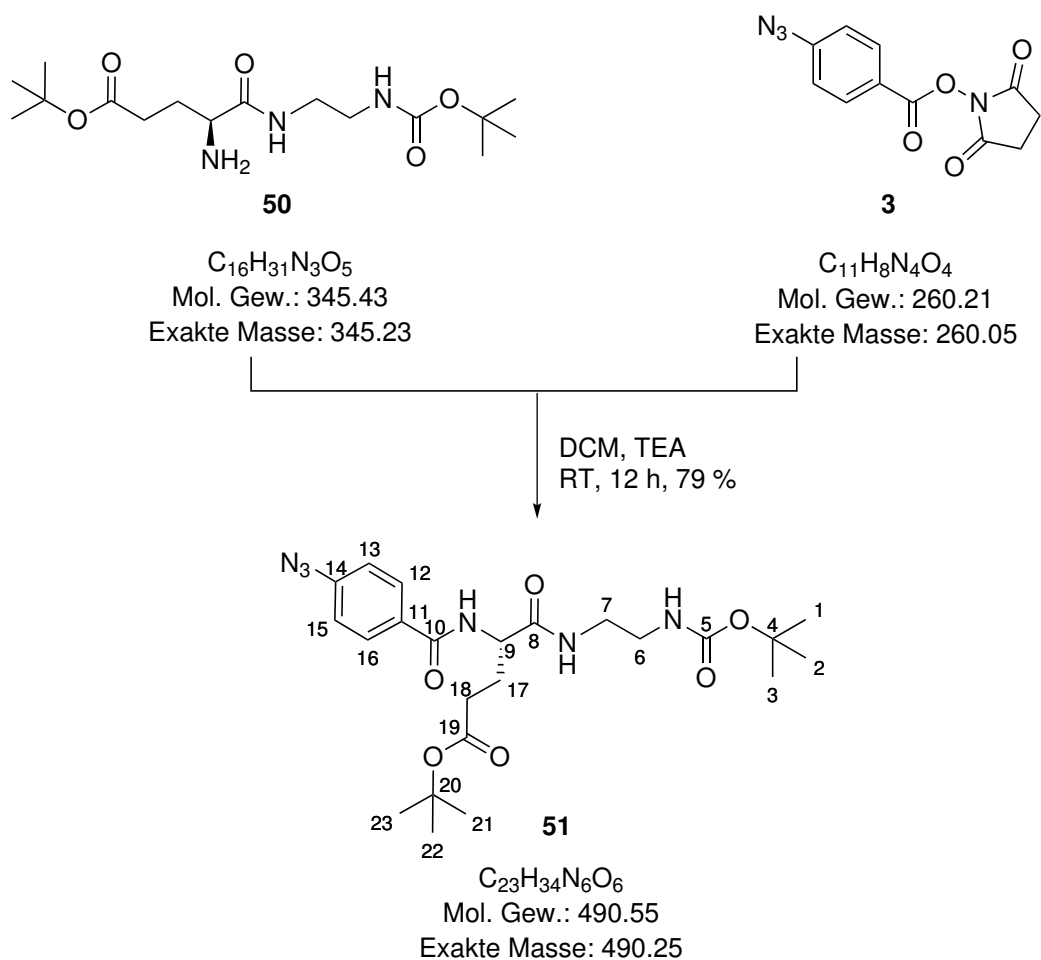
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3):

$\delta = 40.36$ (C6), 39.52 (C7), 31.22 (C11), 29.29 (C10), 28.39 , 28.06 (C1 - C3, C14 - C16) ppm.

ESI-MS (pos. Ionenmodus): 346.3 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$ -

ESI-FTMS, pos.: 346.2337 ($\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_5\text{N}_3$) $[\text{M}+\text{H}]^+$, berechnet: 346.2342.

6.4.27. *N*-(4-Azidobenzamido)-(S)-Glu-(OtBu)-*N'*-Boc-diaminoethan (**51**)



H-(S)-Glu-(OtBu)-*N'*-Boc-diaminoethan (**50**) (750 mg, 2.17 mmol, 1.0 Äq.) wird in Dichlormethan (21.7 ml) gelöst und mit Triethylamin (903 μ l, 6.51 mmol, 3 Äq.) und *p*-Azidobenzoensäure-NHS-Ester (**3**) (1.13 g, 4.34 mmol, 2 Äq.) versetzt. Die Reaktionslösung wird 12 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend säulenchromatographisch (EtOAc/Pentan/TEA, 50/50/1, v/v/v) gereinigt. Die Zielverbindung **51** wird als hellgelbes Öl erhalten.

Ausbeute: 0.85 g (1.72 mmol), 79 % d. Th.

DC: R_f = 0.29 (EtOAc/Pentan/TEA, 50/50/1, v/v/v)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

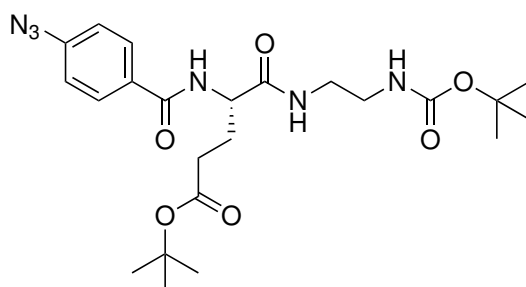
δ = 7.92 - 7.84 (m, 2H, 2xCOCCH₂), 7.55 (m, 1H, CHNH), 7.11 - 7.05 (m, 2H, 2xN₃CCH), 7.03 - 6.98 (bs, 1H, CONH), 5.08 - 4.79 (bs, 1H, OCONH), 4.55 (q, 1H, ³J = 6.3 Hz, H_α), 3.45 - 3.34 (m, 2H, Linker-CH₂), 3.33 - 3.23 (m, 2H, Linker-CH₂), 2.64 - 2.49 (m, 2H, H_{βa}), 2.44 - 2.32 (m, 2H, H_{βb}), 2.25 - 2.04 (m, 2H, H_γ), 1.48 - 1.37 (m, 18H, 2xC(CH₃)₃) ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃):

δ = 173.90 (C5), 129.06 (C13, C15), 118.93 (C12, C16), 53.93 (C9), 40.59 (C6), 40.17 (C7), 31.99 (C17, C18), 28.33, 28.05 (C1 - C3, C21 - C23) ppm.

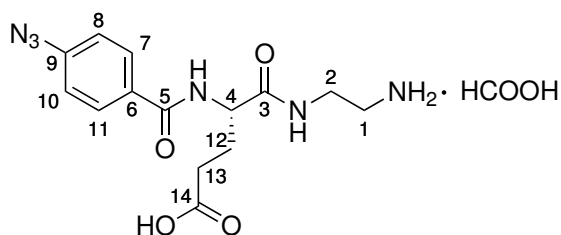
ESI-MS (pos. Ionenmodus): 513.3 (100) [M+Na]⁺, 491.3 (45) [M+H]⁺, 391.2 (100) [M-Boc+H]⁺.

ESI-FTMS, pos.: 513.2432 (C₂₃H₃₄O₆N₆Na) [M+H]⁺, berechnet: 513.2438.

6.4.28. *N*-(4-Azidobenzamido)-(S)-Glu(OH)-diaminoethan (**19**)**51**

$C_{23}H_{34}N_6O_6$
 Mol. Gew.: 490.55
 Exakte Masse: 490.25

HCOOH
 RT, 48 h, quantitativer Umsatz

**19**

$C_{14}H_{18}N_6O_4HCOOH$
 Mol. Gew.: 380.36
 Exakte Masse: 380.14

N-(4-Azidobenzamido)-(S)-Glu(OtBu-*N'*-Boc-diaminoethan (**51**) (0.85 g, 1.72 mmol, 1.0 Äq.) wird in Ameisensäure (43 ml, 1.15 mol, 667 Äq.) gelöst und 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Ameisensäure wird am Hochvakuum entfernt und das Produkt als Formiat **19** erhalten. Da das Produkt Spuren von Ameisensäure enthält, wird eine Ausbeute nicht angegeben.

DC: $R_f = 0.0$ (EtOAc/Pentan/TEA, 50/50/1, v/v/v)

^1H -NMR (600 MHz, D_2O):

$\delta = 7.81$ (d, 2H, $^3J = 8.7$ Hz, $2 \times \text{COCCH}_2$), 7.18 (d, 2H, $^3J = 8.7$ Hz, $2 \times \text{N}_3\text{CCH}$), $4.47 - 4.39$ (m,

1H, $\underline{H_\alpha}$), 3.61 - 3.46 (m, 2H, Linker- $\underline{CH_2}$), 3.15 (t, 2H, $^3J = 6.5$ Hz, Linker- $\underline{CH_2}$), 2.42 (t, 2H, $^3J = 6.5$ Hz, $\underline{H_\gamma}$), 2.18 (m, 1H, $\underline{H_{\beta a}}$), 2.08 (m, 1H, $\underline{H_{\beta b}}$) ppm.

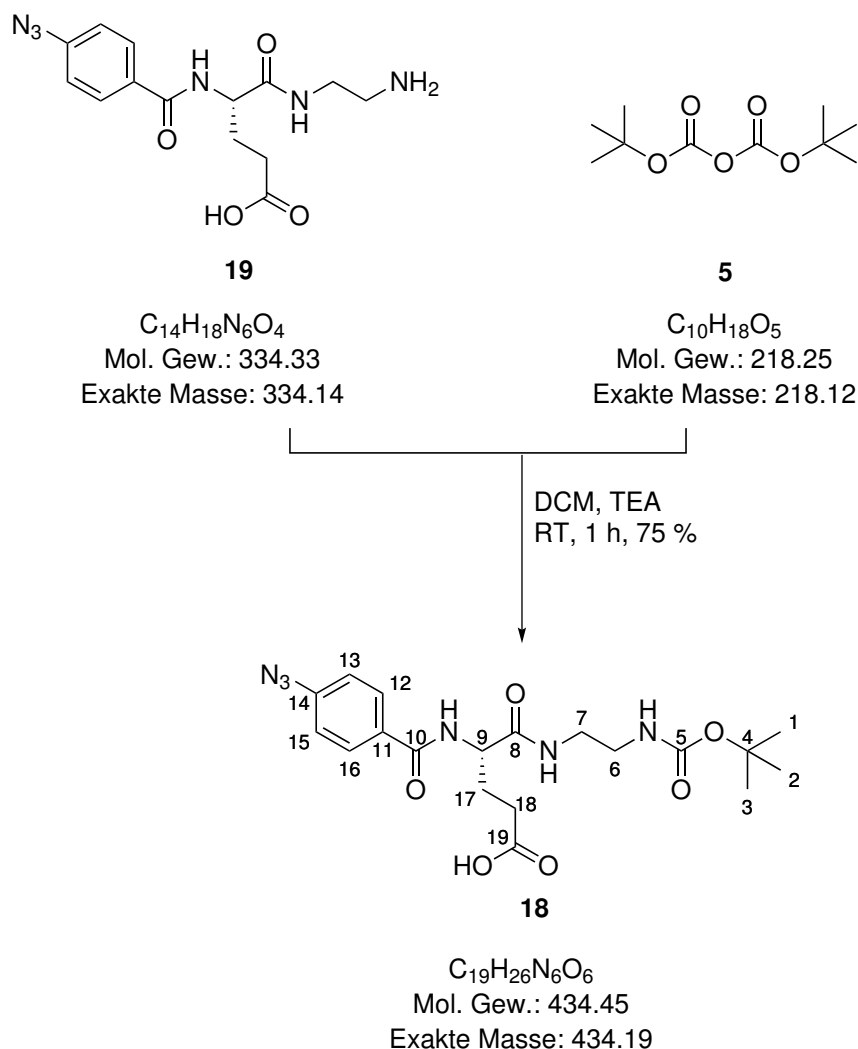
$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, D_2O):

$\delta = 174.79$ (C14), 170.06 (C5), 144.09 (C3), 129.14 (C7, C11), 119.05 (C8, C10), 54.58 (C4), 39.05 (C1), 36.89 (C2), 32.30 (C13), 26.77 (C12) ppm.

ESI-MS (pos. Ionenmodus): 335.2 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$ -

ESI-FTMS, pos.: 335.1462 ($\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{O}_4\text{N}_6$) $[\text{M}+\text{H}]^+$, berechnet: 335.1468

6.4.29. *N*-(4-Azidobenzamido)-(S)-Glu(OH)-*N'*-Boc-diaminoethan (18)



N-(4-Azidobenzamido)-(S)-Glu(OH)-diaminoethan (**19**) (401.2 mg, 1.20 mmol, 1.0 Äq.) wird in Dichlormethan (12 ml) gelöst und mit Di-*tert*-butyl-dicarbonat (**5**) (523.8 mg, 2.40 mmol, 2 Äq.) und Triethylamin (3.3 ml, 24.00 mmol, 20 Äq.) versetzt und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (EtOAc/ AcOH, 99/1 v/v) gereinigt. Die Zielverbindung **18** wird als hellgelbes Öl erhalten.

Ausbeute: 390.6 mg (0.899 mmol), 75 % d. Th.

DC: $R_f = 0.30$ (EtOAc/ AcOH, 99/1, v/v)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ = 7.83 (d, 2H, ³J = 8.5 Hz, 2xCOCCH), 7.65 (bs, 1H, CHNH), 7.02 (d, 2H, ³J = 8.5 Hz, 2xN₃CHH), 4.59 (t, 1H, ³J = 7.1 Hz, H_α), 3.36 - 3.26 (m, 2H, Linker-CH2), 3.25 - 3.14 (m, 2H, Linker-C2), 2.54 - 2.32 (m, 2H, H_γ), 2.21 - 2.10 (m, 1H, H_{βa}), 2.09 - 1.96 (m, 1H, H_{βb}), 1.37 (s, 9H, 3xCH3) ppm.

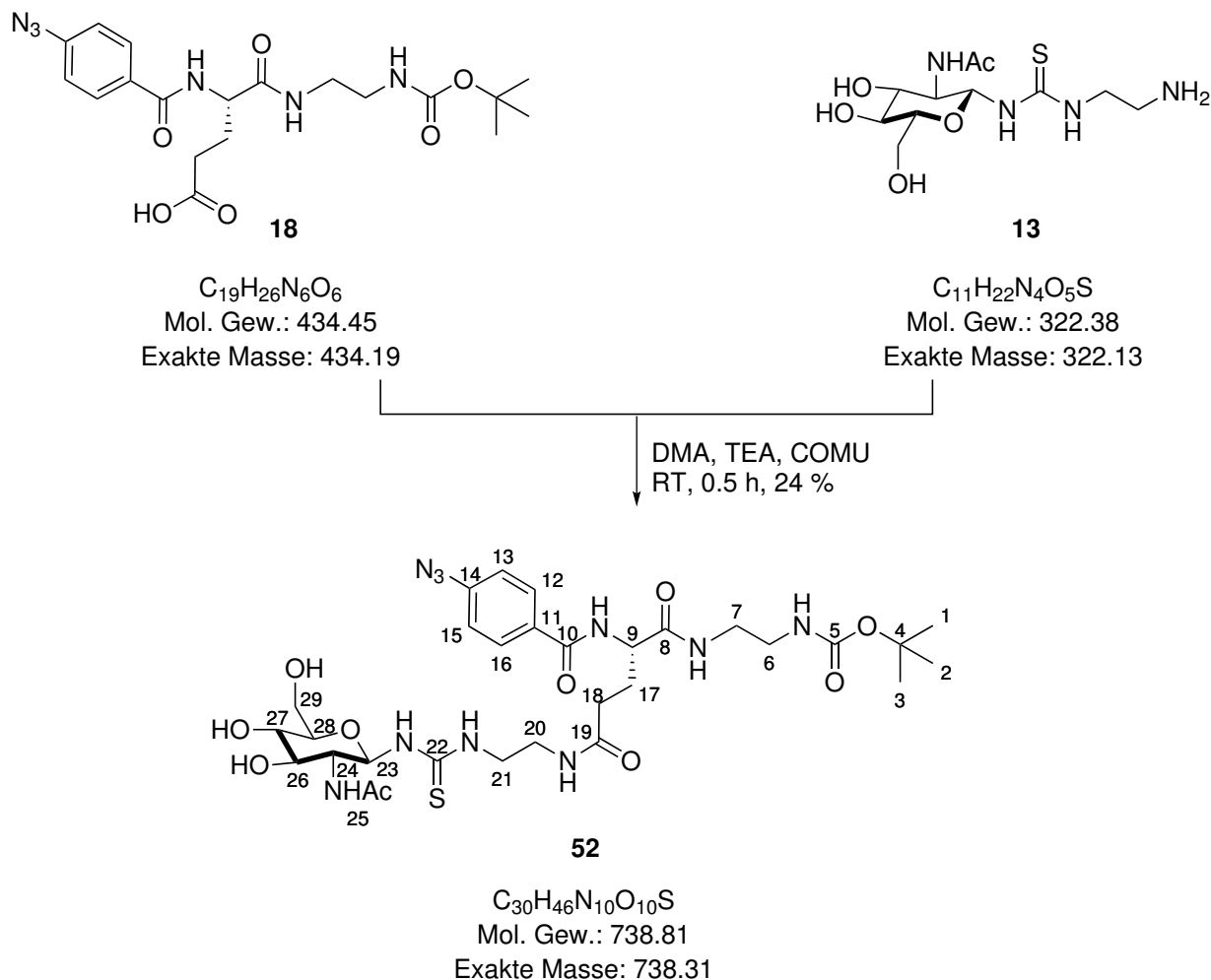
¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃):

δ = 172.09 (C5), 166.82 (C19), 156.62 (C10), 143.69 (C8), 129.07 (C12, C16), 118.85 (C13, C15), 53.02 (C9), 38.83 (C6, C7), 30.14 (C18), 28.21 (C1 - C3), 27.49 (C17) ppm.

ESI-MS (pos. Ionenmodus): 473.2 (10) [M+K]⁺, 457.2 (100) [M+Na]⁺.

ESI-FTMS, pos.: 457.1806 (C₁₉H₂₆O₆N₆Na) [M+Na]⁺, berechnet: 457.1812.

6.4.30. *N*-(4-Azidobenzamido)-(S)-Glu-O(β -diaminoethylsulfocarbamido-*N*-acetylglucosamino)-*N'*-Boc-diaminoethan (52**)**



N-(4-Azidobenzamido)-(S)-Glu(OH)-*N'*-Boc-diaminoethan (**18**) (50.0 mg, 0.12 mmol, 1.0 Äq.) wird mit β -Diaminoethylsulfocarbamido-*N*-acetylglucosamin (**13**) (55.8 mg, 0.17 mmol, 1.4 Äq.) in DMA (1.15 ml) gelöst und mit Triethylamin (159 μ l, 1.15 mmol, 10 Äq.) und COMU (148.0 mg, 0.345 mmol, 2.9 Äq.) versetzt und für 0.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird eingeeengt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (DCM/MeOH/AcOH, 80/20/1, v/v/v) gereinigt. Die Zielverbindung **52** wird als bräunlicher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 20.0 mg (27.1 μmol), 24 % d. Th.

DC: $R_f = 0.28$ (DCM/MeOH/AcOH, 80/20/1, v/v/v)

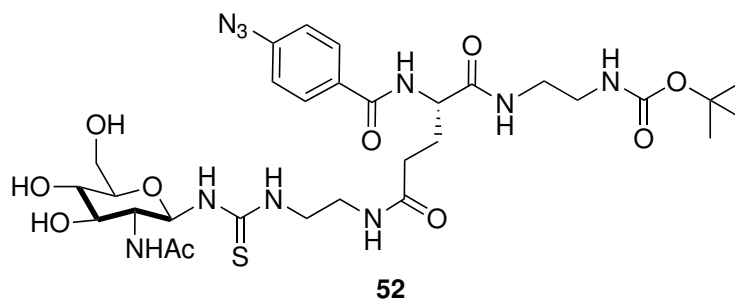
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O):

$\delta = 7.83$ (d, 2H, $^3J = 8.4$ Hz, $2 \times \text{COCCH}$), 7.19 (d, 2H, $^3J = 8.4$ Hz, $2 \times \text{N}_3\text{CH}$), 5.21 (bs, 1H, GlcNAc-H1), $4.47 - 4.39$ (m, 1H, H α), $3.85 - 3.75$ (m, 2H, GlcNAc-H6), $3.71 - 3.53$ (m, 4H, CSNHCH₂, GlcNAc-H3, GlcNAc-H5), $3.50 - 3.34$ (m, 2H, GlcNAc-H2, GlcNAc-H4), $3.33 - 3.23$ (m, 4H, Linker-CH₂, CSNHCH₂CH₂), $3.19 - 3.12$ (m, 2H, Linker-CH₂), $2.38 - 2.32$ (m, 2H, H γ), 2.17 (quin, 1H, $^3J = 8.0$ Hz, H βa), 2.06 (quin, 1H, $^3J = 8.0$ Hz, H βb), 1.95 (s, 3H, Acetyl), 1.30 (s, 9H, $3 \times \text{CH}_3$) ppm.

ESI-MS (pos. Ionenmodus): 739.3 (20) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 761.4 (15) $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

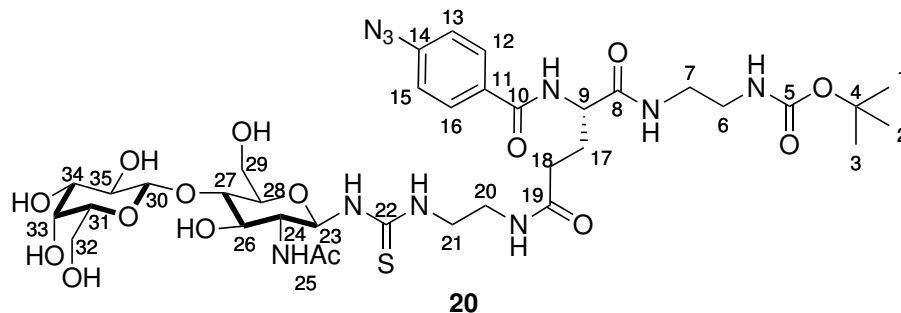
ESI-FTMS, pos.: 761.3011 ($\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_{10}\text{N}_{10}\text{NaS}$) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, berechnet: 761.3017.

6.4.31. *N*-(4-Azidobenzamido)-(S)-Glu-O(β -diaminoethylsulfocarbamido-*N*-acetylgllactosamino)-*N'*-Boc-diaminoethan (20)



$C_{30}H_{46}N_{10}O_{10}S$
Mol. Gew.: 738.81
Exakte Masse: 738.31

1. Reaktionspuffer (1 M HEPES, 250 mM KCl, pH 7.2)
2. Linker (7.2 mM)
3. UDP-Gal (9 mM)
4. $MnCl_2$ (0.7 mM)
5. Alkalische Phosphatase (0.07 U/ μ L)
6. GalT
30°C, ~2 d, 14 %



$C_{36}H_{56}N_{10}O_{15}S$
Mol. Gew.: 900.95
Exakte Masse: 900.36

GlcNAc-modifiziertes Grundgerüst **52** (20.0 mg, 27.1 μ mol, 1.0 Äq.) wird in Reaktionspuffer (2.70 ml, 1 M HEPES, 250 mM KCl, pH 7.2) gelöst und mit UDP-Galaktose (20.7 mg, 36.6 μ mol, 1.35 Äq.), $MnCl_2$ (0.34 mg, 2.71 μ mol, 0.1 Äq.) und Fast-Alkalischer Phosphatase (270.7 U) versetzt. Die Reaktion wird durch Zugabe von GalT gestartet und die Menge an GalT so gewählt, dass die Reaktionszeit bei ca. 2 d liegt. Die Reaktion wird mittels

reversed-phase-HPLC verfolgt und zeigt vollständigen Umsatz. Die Reinigung erfolgt über Waters SAP-Pack Light C18 Spritzenfilter (Arbeitsanweisung in Kapitel 6.1.7.2). Die Zielverbindung **20** wird als hellbrauner Feststoff erhalten.^[68]

Ausbeute: 3.5 mg (3.88 μ mol), 14.0 % d. Th.

Analytische HPLC: R_t = 11.2 min (Gradient 2, Kapitel 6.1.3.1, Tabelle 3)

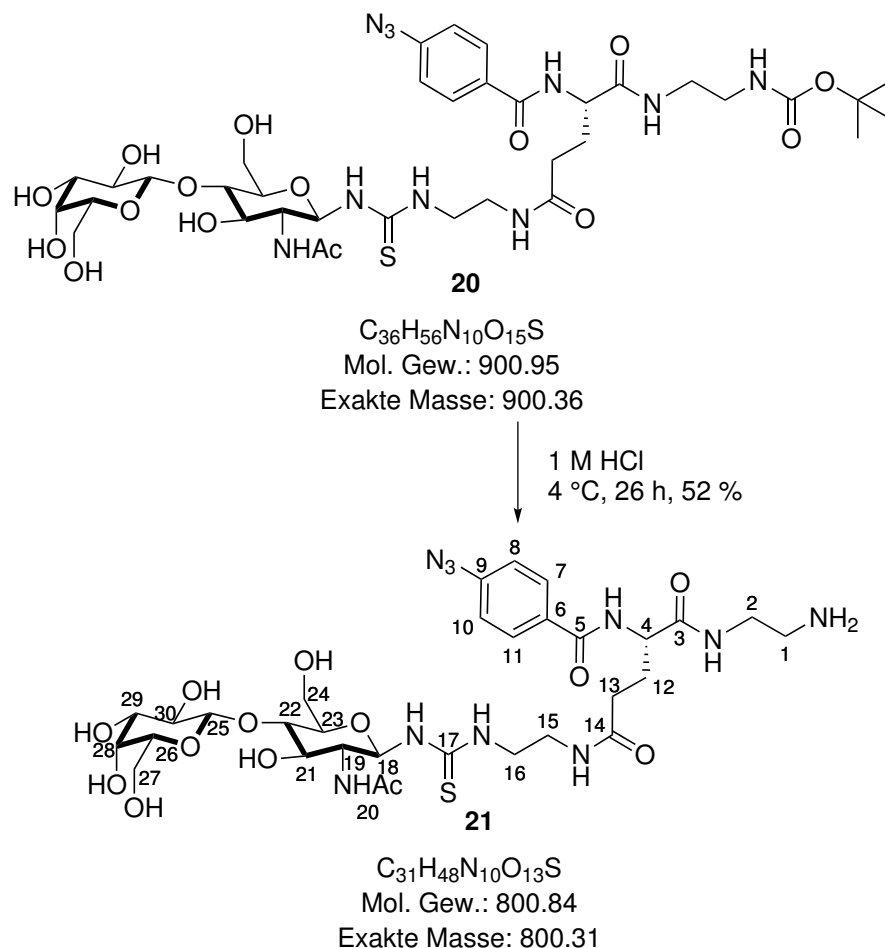
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O):

δ = 7.84 (d, 2H, ^3J = 8.5 Hz, 2xCOCCH), 7.20 (d, 2H, ^3J = 8.5 Hz, 2xN₃CH), 5.40 (bs, 1H, GlcNAc-H1), 4.50 - 4.38 (m, 2H, H_α, Gal-H1), 3.93 - 3.81 (m, 3H, GlcNAc-H2, GlcNAc-H6), 3.79 - 3.61 (m, 4H, CSNHCH2, GlcNAc-H3, GlcNAc-H4), 3.66 - 3.56 (m, 3H, Gal-H6, Gal-H4), 3.54 - 3.37 (m, 3H, Gal-H5, Gal-H2, GlcNAc-H5), 3.36 - 3.24 (m, 4H, Linker-CH₂CH2, CSNHCH₂CH2), 3.21 - 3.10 (m, 2H, Linker-CH2), 2.44 - 2.32 (m, 2H, H_γ), 2.19 (quin, ^3J = 7.2 Hz, H_{βa}), 2.09 (quin, 1H, ^3J = 7.2 Hz, H_{βb}), 1.97 (s, 3H, Acetyl), 1.33 (s, 9H, 3xCH3) ppm.

ESI-MS (pos. Ionenmodus): 923.4 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 901.4 (55) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

ESI-FTMS, pos.: 923.3540 ($\text{C}_{36}\text{H}_{56}\text{O}_{15}\text{N}_{10}\text{NaS}$) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, berechnet: 923.3545.

6.4.32. *N*-(4-Azidobenzamido)-(S)-Glu-O(β -diaminoethylsulfocarbamido-*N*-Acetylactosamino)-diaminoethan (**21**)



LacNAc-Grundgerüst **20** (47.6 mg, 52.83 μ mol, 1.0 Äq.) wird in Salzsäure (1 M, 10.6 ml) gelöst und 26 h bei 4 °C gerührt. Die Reaktionslösung wird mit Wasser (10.6 ml) verdünnt und mit Ionentauscher (Dowex 66, Sigma-Aldrich) neutralisiert. Das Gemisch wird mit Wasser (52.85 ml) verdünnt, über einen Faltenfilter filtriert und der Ionentauscher mit Wasser (211.4 ml) gewaschen. Der entschützte Zucker **21** wird als hellbrauner Feststoff erhalten.

Ausbeute: 22.1 mg (27.6 μ mol), 52 % d. Th.

Analytische HPLC: R_t = 6.1 min (Gradient 3, Kapitel 6.1.3.1, Tabelle 4)

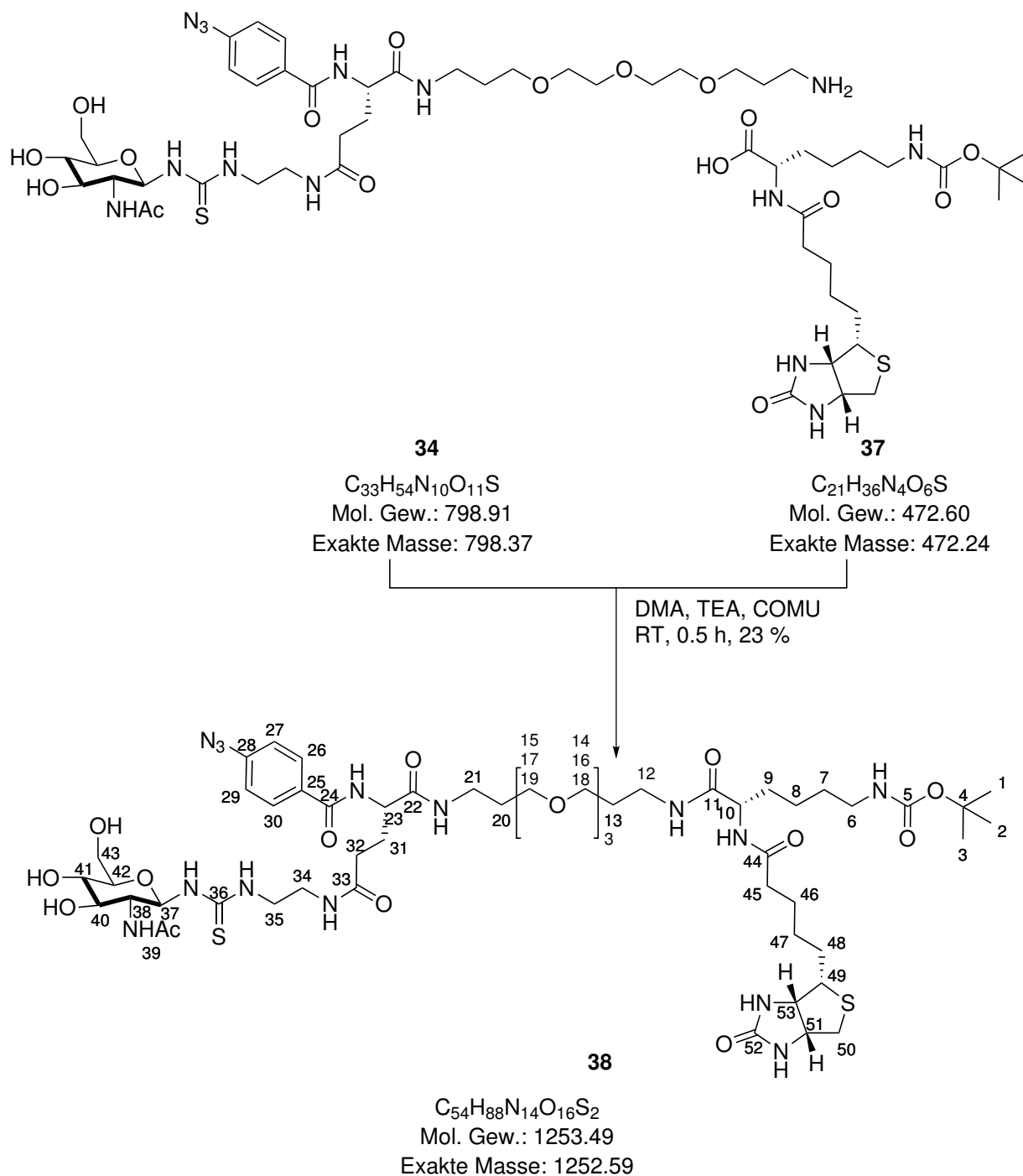
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O):

δ = 7.85 (d, 2H, ^3J = 8.4 Hz, $2\times\text{COCCH}$), 7.22 (d, 2H, ^3J = 8.4 Hz, $2\times\text{N}_3\text{CH}$), 5.51 (bs, 1H, GlcNAc-H1), 4.53 - 4.38 (m, 2H, H α , Gal-H1), 3.96 - 3.82 (m, 3H, GlcNAc-H2, GlcNAc-H6), 3.81 - 3.68 (m, 4H, CSNHCH $\underline{\text{H}_2}$, GlcNAc-H3, GlcNAc-H4), 3.68 - 3.59 (m, 3H, Gal-H6, Gal-H4), 3.57 - 3.45 (m, 3H, GlcNAc-H5, Gal-H2, Gal-H5), 3.35 - 3.22 (m, 4H, Linker-CH $\underline{2}$, CSNHCH $\underline{\text{H}_2}$ CH $\underline{2}$), 3.14 (t, 2H, ^3J = 5.9 Hz, Linker-CH $\underline{2}$), 2.46 - 2.38 (m, 2H, H γ), 2.29 - 2.19 (m, 1H, H βa), 2.16 - 2.05 (m, 1H, H βb), 1.96 (s, 3H, Acetyl) ppm.

ESI-MS (pos. Ionenmodus): 823.4 (30) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 801.4 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

ESI-FTMS, pos.: 801.3200 ($\text{C}_{31}\text{H}_{49}\text{O}_{13}\text{N}_{10}$) $[\text{M}+\text{H}]^+$, berechnet: 801.3201.

6.4.33. *N*-(4-Azidobenzamido)-(S)-Glu-O(β -diaminoethylsulfocarbamido-*N*-acetylglucosamino)-*N'*- α -biotinyl-*N''*-Boc-Lysin-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan (38)



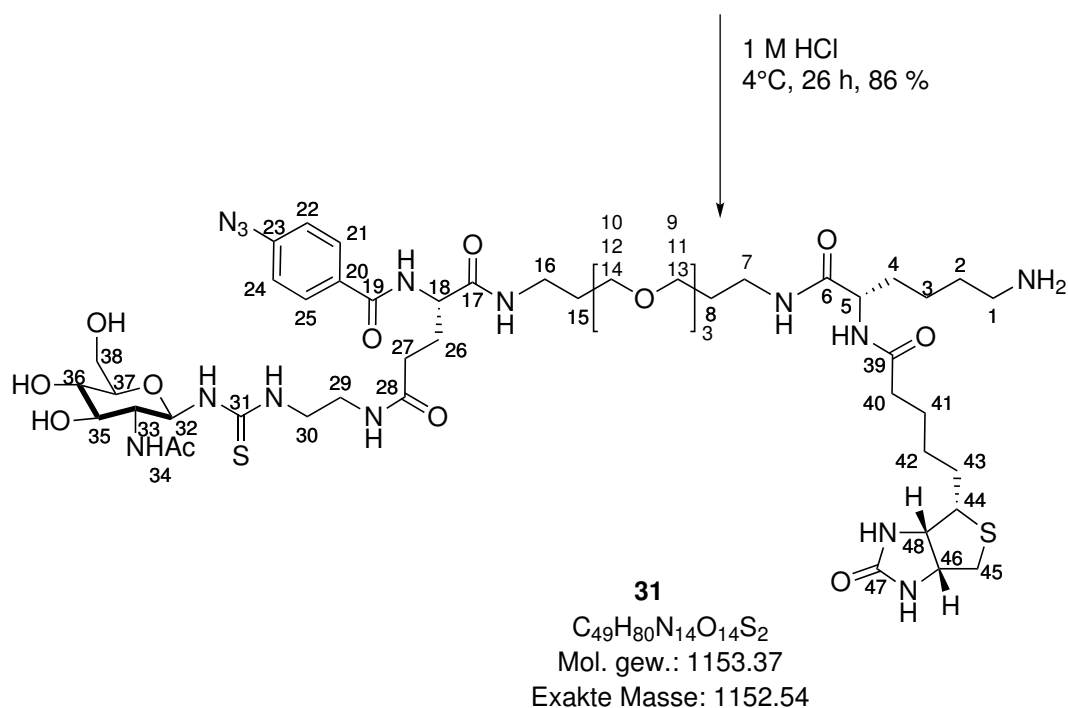
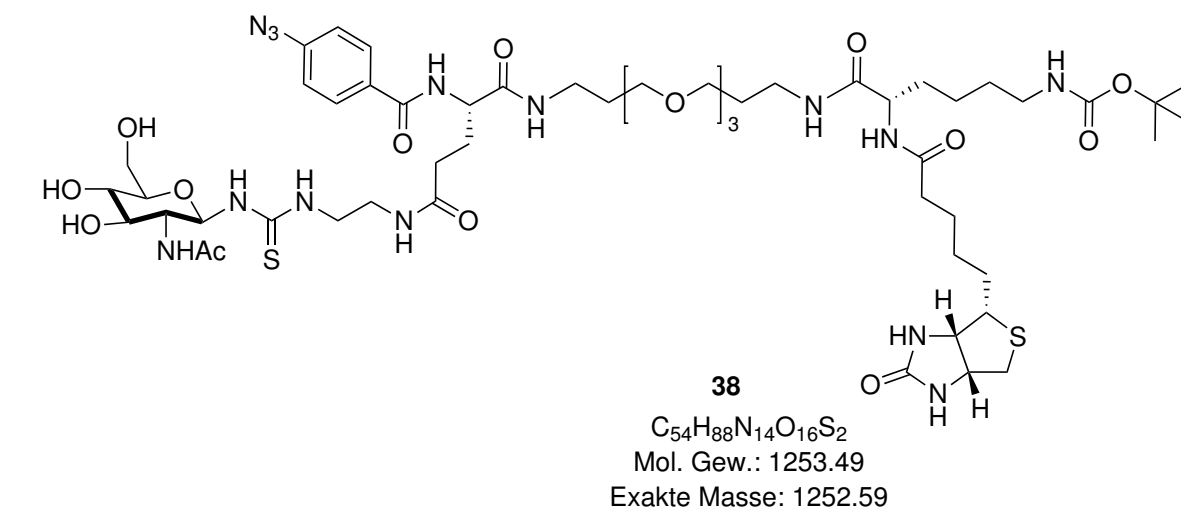
Entschütztes Amin **34** (4.7 mg, 588 μmol , 1.0 Äq.) wird in DMA (58.8 μl) gelöst und mit Triethylamin (3.2 μl , 23 μmol , 4 Äq.), *N*-Biotin-Lys-*N'*-Boc-OH (**37**) (3.3 mg, 7.0 μmol , 1.2 Äq.) und COMU (5.0 mg, 11.7 μmol , 2.0 Äq.) versetzt und 0.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wird mittels HPLC (Gradient 4, Kapitel 6.1.3.1, Tabelle 5) gereinigt und das Produkt **38** als hellbrauner Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1.7 mg (1.36 μmol), 23 % d. Th.

Analytische HPLC: R_t = 20.5 min (Gradient 4, Kapitel 6.1.3.1, Tabelle 5)

ESI-MS (pos. Ionenmodus): 1275.6 (40) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1247.6 (90) $[\text{M}-\text{N}_2+\text{Na}]^+$, 1191.5 (100) $[\text{M}-\text{Boc}+\text{H}+\text{K}]^+$, 1147.5 (80) $[\text{M}-\text{N}_2-\text{Boc}+\text{H}+\text{Na}]^+$.

6.4.34. *N*-(4-Azidobenzamido)-(S)-Glu-O(β -diaminoethylsulfocarbamido-*N*-acetylglucosamino)-*N'*- α -biotinyl-H-Lysin-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan (31)



N-(4-Azidobenzamido)-(S)-Glu-O(β -diaminoethylsulfocarbamido-*N*-acetylglucosamino)-*N'*- α -biotinyl-*N''*-Boc-Lysin-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan (38)

(1.7 mg, 1.36 μ mol, 1.0 Äq.) wird in Salzsäure (1 M, 27.2 μ l) gelöst und 26 h bei 4 °C ge-

rührt. Die Reaktionslösung wird mit Wasser (27.2 μ l) verdünnt und mit Ionentauscher (Dowex 66, Sigma-Aldrich) neutralisiert. Die wässrige Lösung wird mit Wasser (136 μ l) verdünnt, über einen Faltenfilter filtriert und der Ionentauscher mit Wasser (544 μ l) gewaschen. Das Wasser wird im Hochvakuum entfernt und die Zielverbindung **31** als hellbrauner Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1.35 mg (1.17 μ mol), 86 % d. Th.

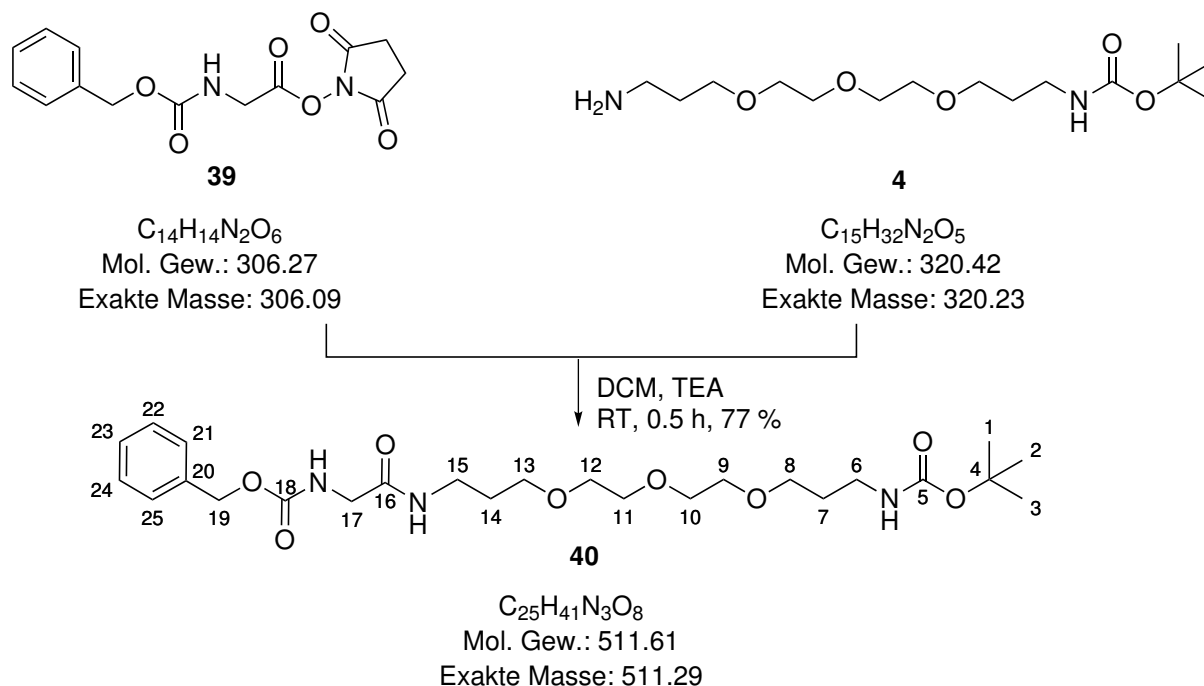
DC: $R_f = 0.12$ (DCM/MeOH/TEA, 80/20/1, v/v/v)

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O):

$\delta = 7.84$ (d, 2H, $^3J = 8.7$ Hz, $2\times\text{COCCH}$), 7.21 (d, 2H, $^3J = 8.7$ Hz, $2\times\text{N}_3\text{CCH}$), $4.60 - 4.52$ (m, 1H, Glu- H_α), $4.48 - 4.39$ (m, 1H, SCH_2CH), $4.39 - 4.33$ (m, 1H, SCHCH), $4.21 - 4.13$ (m, 1H, Lys- H_α), $3.90 - 3.39$ (m, 22H, $6\times\text{OCH}_2$, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$, $4\times\text{GlcNAc-CH}$, GlcNAc-CH_2), $3.31 - 3.20$ (m, 5H, CHCONHCH_2 , CHCONHCH_2 , SCH), $3.01 - 2.93$ (m, 2H, SCH_2), $2.43 - 2.35$ (m, 2H, Biotin- CH_2), $2.33 - 2.25$ (m, 2H, Glu- H_γ), $2.23 - 2.13$ (m, 1H, Glu- $\text{H}_{\beta\text{a}}\text{CH}_2\text{CO}$), $2.12 - 2.05$ (m, 1H, Glu- $\text{H}_{\beta\text{b}}$), 1.96 (s, 3H, Acetyl- CH_3), $1.84 - 1.29$ (m, 18H, $2\times\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, $3\times\text{Biotin-CH}_2$, Lys- H_β , Lys- H_γ , Lys- H_δ , Lys- H_ϵ) ppm.

ESI-MS (pos. Ionenmodus): 1175.5 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1153.5 (30) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

ESI-FTMS, pos.: 1153.5493 ($\text{C}_{49}\text{H}_{81}\text{O}_{14}\text{N}_{14}\text{S}_2$) $[\text{M}+\text{H}]^+$, berechnet: 1153.5498.

6.4.35. *N*-Z-Gly-*N'*-Boc-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan (40)

Z-Gly-OSu (**39**) (0.20 g, 0.65 mmol, 1.0 Äq.) wird in Dichlormethan (6.50 ml) gelöst und mit Triethylamin (270.30 μ l, 1.95 mmol, 3.0 Äq.) und *N*-Boc-1,13-Diamino-4,7,10-trioxatridecan (**4**) (0.31 g, 0.98 mmol, 1.5 Äq.) versetzt. Die Reaktionslösung wird für 0.5 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend säulenchromatographisch (DCM/MeOH, 95/5, v/v) gereinigt. Die Zielverbindung **40** wird als farbloses Öl erhalten.^[74]

Ausbeute: 0.26 g (0.5 mmol), 77 % d. Th.

DC: R_f = 0.42 (DCM/MeOH, 95/5, v/v)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

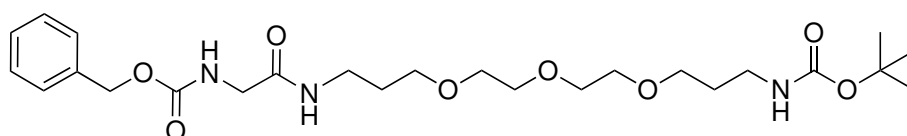
δ = 7.41 - 7.29 (m, 5H, C₅H₅), 6.97 (bs, 1H, CONH), 5.90 (bs, 1H, CbzNH), 5.14 (s, 2H, C₅H₅CH₂), 4.93 (bs, 1H, OCONH), 3.85 (d, 2H, ³J = 4.4 Hz, H _{α}), 3.66 - 3.47 (m, 12H, 6xOCH₂), 3.41 (q, 2H, ³J = 5.9 Hz, CH₂CONHCH₂), 3.23 - 3.13 (m, 2H, OCONHCH₂), 1.84 - 1.68 (m, 4H, 2xNHCH₂CH₂), 1.44 (s, 9H, 3xCH₃) ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃):

δ = 168.83 (C18), 156.50 (C5), 136.32 (C16), 128.47 (C21, C22, C24, C25), 128.12 (C23), 70.32 (C10, C11), 70.12 (C9, C12), 70.00 (C8, C13), 66.95 (C19), 44.42 (C17), 38.59 (C6, C15), 29.65 (C7, C14), 28.42 (C1 - C3) ppm.

ESI-MS (pos. Ionenmodus): 534.3 (100) [M+Na]⁺, 512.3 (40) [M+H]⁺, 412.3 (100) [M-Boc+2H]⁺.

6.4.36. H-Gly-*N'*-Boc-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan (41)



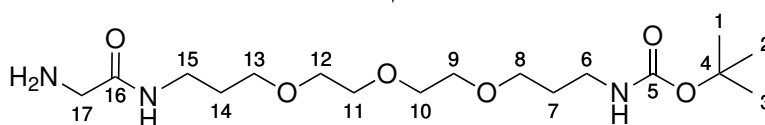
40

C₂₅H₄₁N₃O₈

Mol. Gew.: 511.61

Exakte Masse: 511.29

MeOH, Pd/H₂
RT, 12 h, quantitativer Umsatz



41

C₁₇H₃₅N₃O₆

Mol. Gew.: 377.48

Exakte Masse: 377.25

Zu einer Lösung aus *N*-Z-Gly-*N'*-Boc-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan (**40**) (489.0 mg, 0.96 mmol, 1.0 Äq.) in Methanol (3.84 ml) wird Palladium auf Aktivkohle (0.19 g) gegeben und über eine Orsatblase Wasserstoff aufgegeben. Die Reaktionslösung wird 12 h bei Raumtemperatur gerührt und die Aktivkohle über einen doppelten Faltenfilter abgetrennt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und die Zielverbindung **41** als farbloses Öl erhalten.^[74]

DC: $R_f = 0.23$ (DCM/MeOH, 95/5, v/v)

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3):

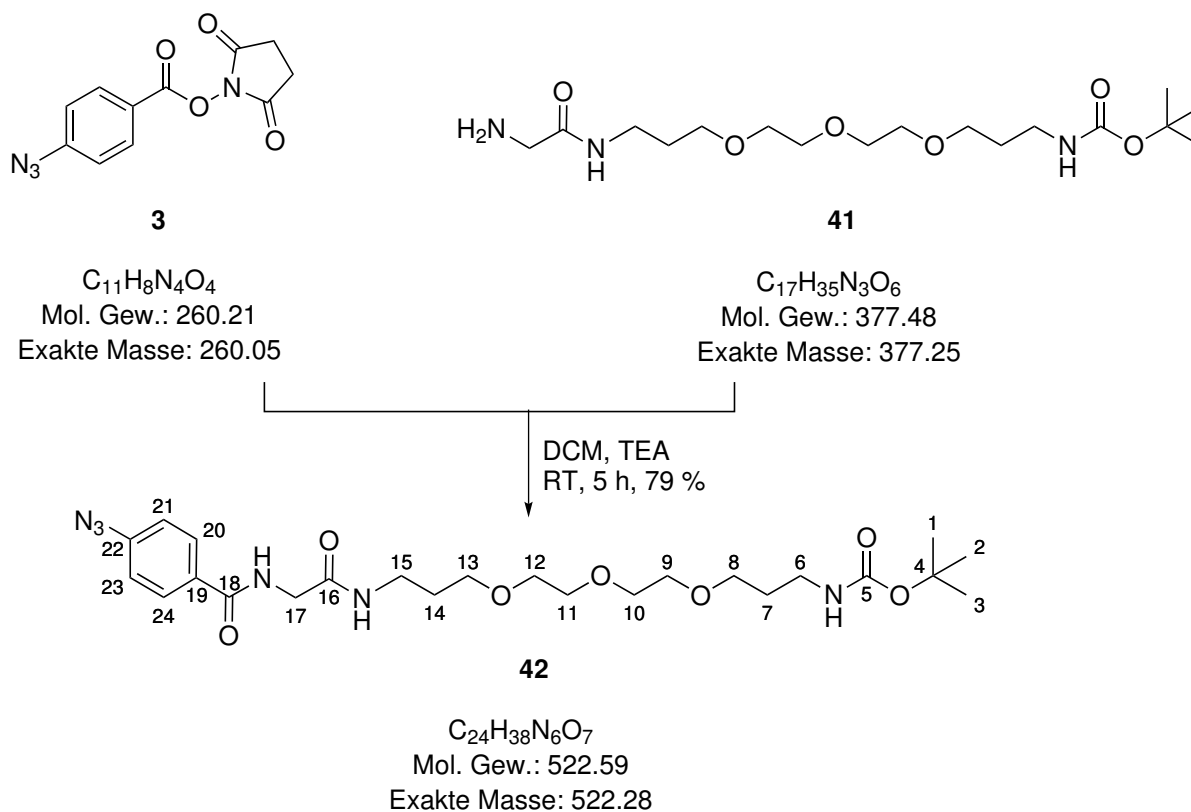
$\delta = 7.54$ (bs, 1H, CONH), 5.07 (bs, 1H, OCONH), $3.68 - 3.50$ (m, 12H, $6 \times \text{OCH}_2$), $3.42 - 3.37$ (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CONHCH}_2$), 3.36 (s, 2H, H_α), $3.26 - 3.17$ (m, 2H, OCONHCH_2), 1.80 (quin, 2H, $^3J = 6.2$ Hz, $\text{BocNHCH}_2\text{CH}_2$), 1.75 (quin, 2H, $^3J = 6.2$ Hz, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2$), 1.43 (s, 9H, $3 \times \text{CH}_3$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3):

$\delta = 70.49$ (C10, C11), 70.44 (C9, C12), 70.11 (C8, C13), 44.10 (C17), 38.36 (C6), 37.21 (C15), 29.63 (C7), 29.07 (C14), 28.43 (C1 - C3) ppm.

ESI-MS (pos. Ionenmodus): 400.3 (20) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 378.3 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 278.2 (35) $[\text{M}-\text{Boc}+\text{H}]^+$.

6.4.37. *N*-(4-Azidobenzamido)-Gly-*N'*-Boc-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan (**42**)



Zu einer Lösung aus H-Gly-*N'*-Boc-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan (**41**) (369.9 mg, 0.98 mmol, 1.0 Äq.) in Dichlormethan (9.80 ml) wird Triethylamin (271.7 μ l, 1.96 mmol, 2 Äq.) und *p*-Azidobenzoesäure-NHS-Ester (**3**) (765.0 mg, 2.94 mmol, 3.0 Äq.) gegeben und die Lösung für 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie (DCM/MeOH, 95/5, v/v) gereinigt. Die Zielverbindung **42** wird als hellgelbes Öl erhalten.

Ausbeute: 0.40 g (0.77 mmol), 79 % d. Th.

DC: R_f = 0.46 (DCM/MeOH, 95/5, v/v)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3):

δ = 7.88 (d, 2H, ^3J = 8.6 Hz, 2xCOCCH), 7.34 (bs, 1H, CH_2CONH), 7.07 (d, 2H, ^3J = 8.6 Hz,

$2\times\text{N}_3\text{CCH}$), 7.00 (bs, 1H, CCONH), 5.02 (bs, 1H, OCONH), 4.09 (d, 2H, $^3J = 4.8\text{ Hz}$, H_α), 3.67 - 3.51 (m, 12H, $6\times\text{OCH}_2$), 3.47 - 3.41 (q, 2H, $^3J = 5.8\text{ Hz}$, $\text{CH}_2\text{CONHCH}_2$), 3.24 - 3.15 (m, 2H, OCONHCH_2), 1.80 (quin, 2H, $^3J = 6.2\text{ Hz}$, $\text{BocNHCH}_2\text{CH}_2$), 1.75 (quin, 2H, $^3J = 6.2\text{ Hz}$, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2$), 1.43 (s, 9H, $3\times\text{CH}_3$) ppm.

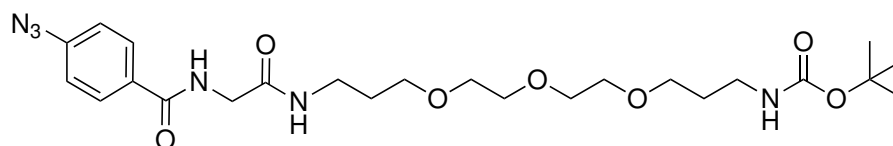
$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3):

$\delta = 168.63$ (C18), 166.44 (C5), 143.46 (C16), 129.05 (C20, C24), 118.91 (C21, C23), 70.40 (C10, C11), 70.33 (C9, C12), 70.19 (C8, C13), 43.37 (C17), 38.56 (C6), 38.25 (C15), 29.69 (C7), 28.43 (C1 - C3), 28.34 (C14) ppm.

ESI-MS (pos. Ionenmodus): 545.3 (20) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 523.3 (60) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 423.3 (100) $[\text{M}-\text{Boc}+\text{H}]^+$.

ESI-FTMS, pos.: 545.2693 ($\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_7\text{N}_6\text{Na}$) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, berechnet: 545.2700.

6.4.38. *N*-(4-Azidobenzamido)-Gly-*N'*-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan (43)



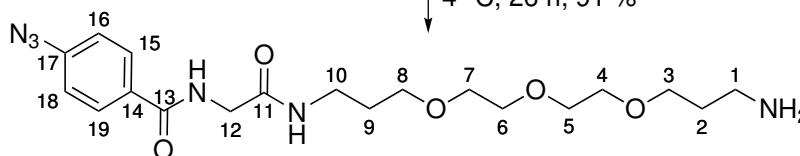
42

$\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{N}_6\text{O}_7$

Mol. Gew.: 522.59

Exakte Masse: 522.28

↓
1 M HCl,
4 °C, 26 h, 91 %



43

$\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{N}_6\text{O}_5$

Mol. Gew.: 422.48

Exakte Masse: 422.23

N-(4-Azidobenzamido)-Gly-*N'*-Boc-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan (**42**) (16.8 mg, 32.1 μ mol, 1.0 Äq.) wird in Salzsäure (1 M, 6.42 ml) gelöst und 26 h bei 4 °C gerührt. Die Reaktionslösung wird mit Wasser (6.42 ml) verdünnt und anschließend mit Ionentauscher (Dowex 66, Sigma-Aldrich) neutralisiert. Die Mischung wird mit Wasser (32.1 ml) verdünnt, über einen Faltenfilter filtriert und der zurückbleibende Ionentauscher mit Wasser (128.4 ml) gewaschen. Das Lösungsmittel wird entfernt und die Zielverbindung **43** als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 12.3 g (29.1 μ mol), 91 % d. Th.

DC: $R_f = 0.02$ (DCM/MeOH/TEA, 95/5/1, v/v/v)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3):

$\delta = 8.44$ (t, 1H, $^3J = 5.3$ Hz, COCH_2NH), 7.94 (d, 2H, $^3J = 8.4$ Hz, $2 \times \text{COCCH}$), 7.87 (m, 1H, CH_2CONH), 7.58 (bs, 2H, NH_2), 7.06 (d, 2H, $^3J = 8.4$ Hz, $2 \times \text{N}_3\text{CCH}$), 4.10 (d, 2H, $^3J = 5.3$ Hz, H_α), 3.75 - 3.44 (m, 12H, $6 \times \text{OCH}_2$), 3.34 (q, 2H, $^3J = 6.1$ Hz, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2$), 3.18 (t, 2H, $^3J = 5.1$ Hz, NH_2CH_2), 2.01 - 1.90 (m, 2H, $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.84 - 1.68 (m, 2H, NHCH_2CH_2) ppm.

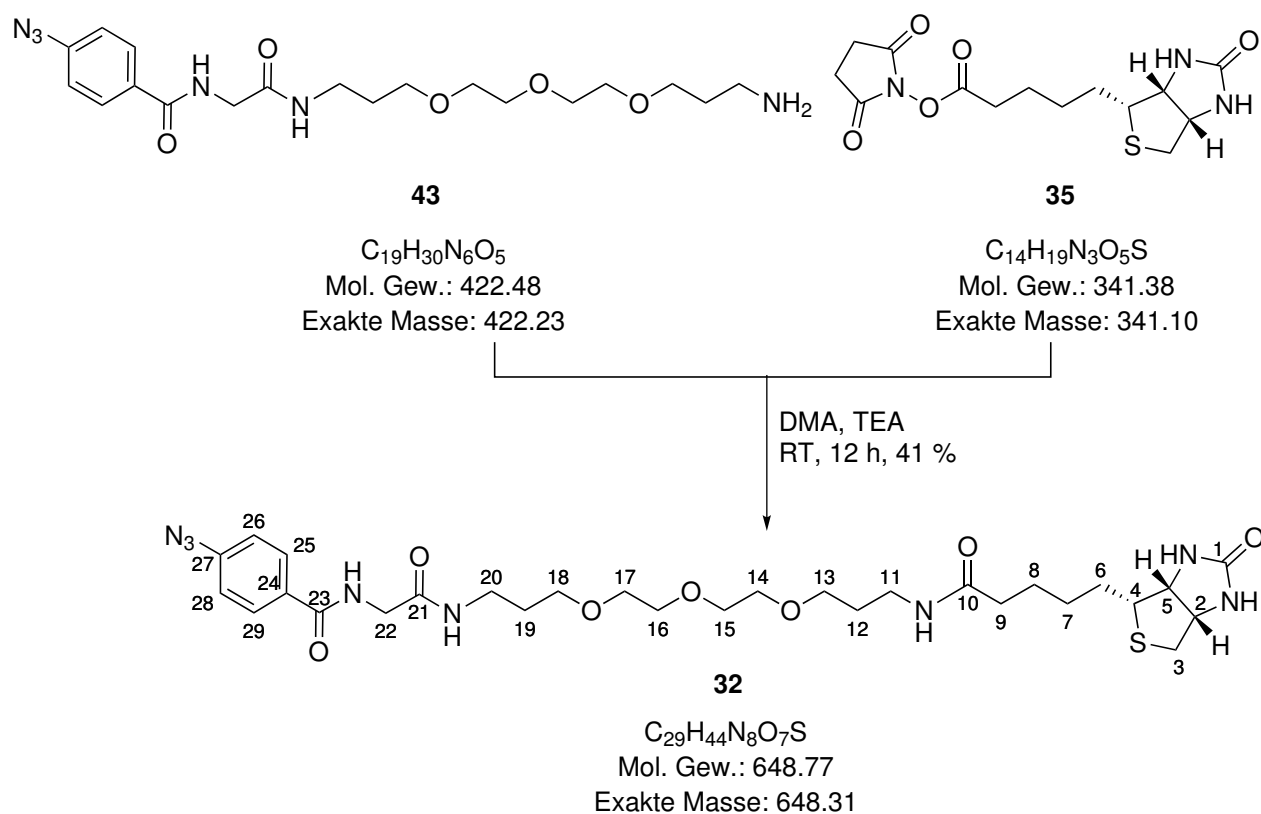
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3):

$\delta = 170.78$ (C13), 143.66 (C11), 129.30 (C15, C19), 118.94 (C16, C18), 70.41, 70.31, 69.59, 69.54, 69.47, 68.19 (C3 - C8), 43.80 (C12), 40.13 (C1), 36.52 (C10), 28.89 (C9), 26.18 (C2) ppm.

ESI-MS (pos. Ionenmodus): 423.3 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

ESI-FTMS, pos.: 423.2350 ($\text{C}_{19}\text{H}_{31}\text{O}_5\text{N}_6$) $[\text{M}+\text{H}]^+$, berechnet: 423.2356.

6.4.39. *N*-4-Azidobenzamido-Gly-*N'*-biotinyl-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan (**32**)



N-(4-Azidobenzamido)-Gly-*N'*-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan (**43**) (4.0 mg, 9.5 μ mol, 1.0 Äq.) wird in DMA (95 μ l) gelöst, mit Triethylamin (2.6 μ l, 19 μ mol, 2 Äq.) und Biotin-NHS-Ester (**35**) (4.9 mg, 14.25 μ mol, 1.5 Äq.) versetzt und 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Hochvakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (DCM/MeOH, 80/20, v/v) gereinigt. Die Zielverbindung **32** wird als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 2.5 mg (3.85 μ mol), 41 % d. Th.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6):

δ = 8.74 (t, 1H, ^3J = 5.9 Hz, COCH₂NH), 7.91 (d, 2H, ^3J = 8.7 Hz, 2xCOCCH), 7.21 (d, 2H, ^3J = 8.7 Hz, 2xN₃CCH), 6.44 (bs, 1H, Biotin-H), 6.35 (bs, 1H, Biotin-H), 4.30 (m, 1H, SCH₂CH),

4.12 (m, 1H, SCHCH), 3.82 (d, 2H, $^3J = 6.1$ Hz, H_a), 3.53 - 3.36 (m, 12H, 6xOCH₂), 3.15 - 3.01 (m, 5H, 2xCONHCH₂, SCH), 2.86 - 2.76 (m, 2H, SCH₂), 2.70 - 2.65 (m, 2H, Biotin-CH₂), 2.19 (t, 2H, $^3J = 7.4$ Hz, Linker-CH₂), 2.05 (t, 2H, $^3J = 8.1$ Hz, Linker-CH₂), 1.69 - 1.11 (m, 6H, 3xBiotin-CH₂) ppm.

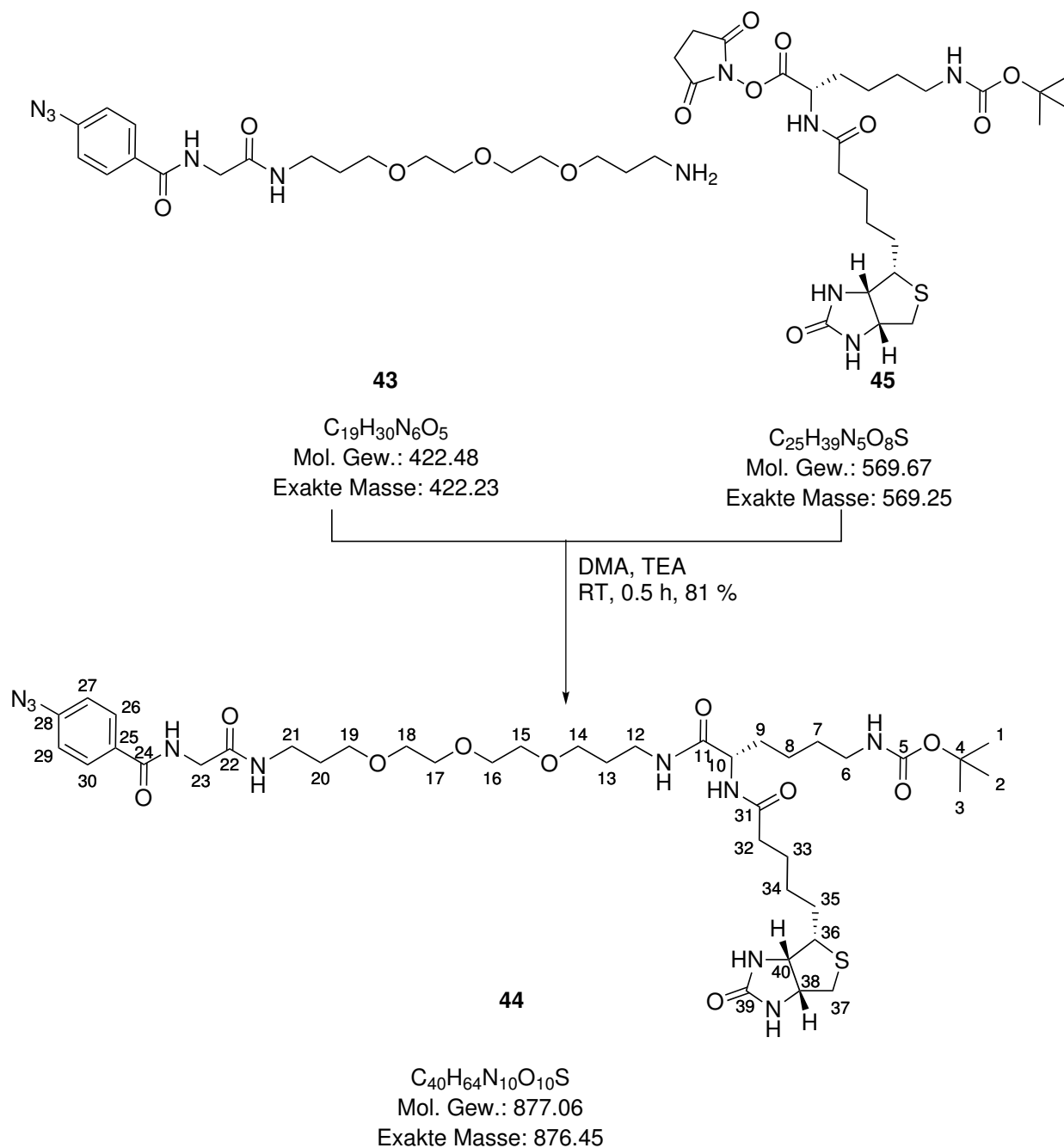
¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆):

δ = 171.96 (C23), 168.77 (C10), 165.52 (C1), 142.34 (C21), 129.28 (C25, C29), 118.87 (C26, C28), 69.76, 69.74, 69.53, 69.52 (C14 - C17), 68.11 (C13, C18), 61.06 (C5), 59.21 (C2), 55.43 (C4), 42.68 (C22), 40.04 (C3), 39.51 (C9), 35.97, 35.74 (C11, C20), 35.22 (C12, C19), 29.40, 29.32, 28.22 (C6 - C8) ppm.

ESI-MS (pos. Ionenmodus): 671.4 (60) [M+Na]⁺, 649.4 (100) [M+H]⁺.

ESI-FTMS, pos.: 671.2946 (C₂₉H₄₄O₇N₈NaS) [M+Na]⁺, berechnet: 671.2951.

6.4.40. *N*-(4-Adizobenzamido)-Gly-*N'*- α -biotinyl-*N''*-Boc-Lysin-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan (44)



Zu einer Lösung aus *N*-(4-Aminobenzamido)-Gly-*N'*-1,13-diamino-4,7,10-trioxa-tridecan (**43**) (26.8 mg, 63.5 μ mol, 1.5 Äq.) in DMA (1.21 ml) wird Triethylamin (11.7 μ l, 84.6 μ mol, 2 Äq.) gegeben und eine Lösung aus *N*-Biotin-Lys-*N'*-Boc-OSu (**45**) (24.1 mg, 42.3 μ , 1.0 Äq.)

in DMA (423 μ l) hinzugefügt. Die Lösung wird 0.5 h bei Raumtemperatur gerührt und das Lösemittel im Hochvakuum entfernt. Der Rückstand wird mittels Säulenchromatographie (DCM/MeOH, 85/15, v/v) gereinigt und die Zielverbindung **44** als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 29.9 mg (34.1 μ mol), 81 % d. Th.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6):

δ = 8.74 (m, 1H, CCONH), 7.93 (d, 2H, ^3J = 8.7 Hz, 2xCOCCH), 7.91 - 7.87 (m, 1H, COCHNH), 7.86 - 7.81 (m, 2H, 2xCONHCH₂), 7.21 (d, 2H, ^3J = 8.7 Hz, 2xN₃CCH), 6.75 - 6.70 (m, 1H, OCONH), 6.40 (bs, 1H, Biotin-NH), 6.34 (bs, 1H, Biotin-NH), 4.33 - 4.27 (m, 1H, SCH₂CH), 4.17 - 4.06 (m, 2H, SCHCH, Lys-H _{α}), 3.82 (d, 2H, ^3J = 5.7 Hz, Gly-H _{α}), 3.52 - 3.43 (m, 8H, 2xOCH₂CH₂O), 3.52 - 3.43 (m, 4H, 2xNHCH₂CH₂CH₂), 3.14 - 3.0 (m, 5H, 2xCONHCH₂CH₂), 2.89 - 2.84 (m, 2H, Lys-H _{ϵ}), 2.81 (dd, 1H, ^3J = 12.9 Hz, ^3J = 5.0 Hz, SCH_{2a}), 2.57 (d, 1H, ^3J = 12.9 Hz, SCH_{2b}), 2.16 - 2.05 (m, 2H, Biotin-CH₂), 1.66 - 1.53 (m, 4H, 2xNHCH₂CH₂), 1.53 - 1.40 (m, 6H, 3xBiotin-CH₂), 1.33 (s, 9H, 3xCCH₃), 1.34 - 1.27 (m, 6H, Lys-H _{β} , Lys-H _{γ} , Lys-H _{δ}) ppm.

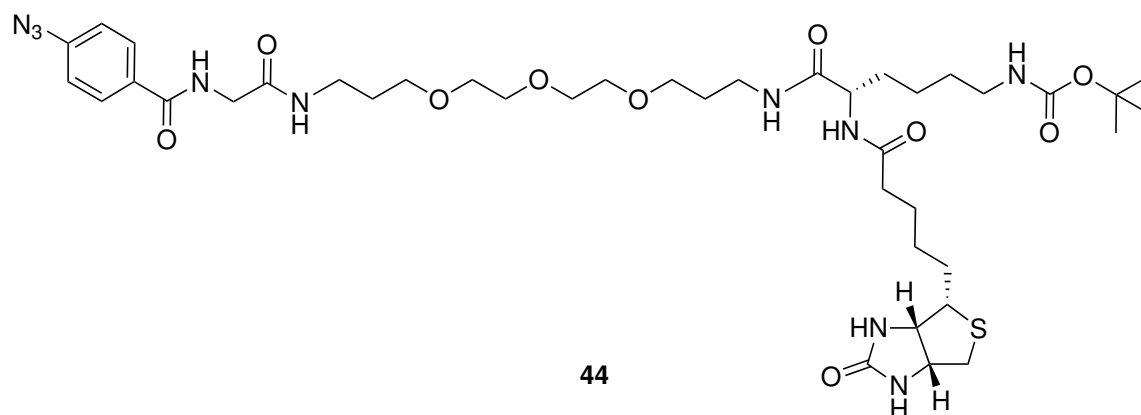
$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO- d_6):

δ = 171.96 (C24), 171.66 (C31), 168.72 (C11), 165.44 (C39), 155.51 (C5), 142.34 (C22), 129.25 (C26, C30), 118.82 (C27, C29), 69.71, 69.51, 69.49 (C15 - C18), 68.08, 67.97 (C14, C19), 61.02 (C10), 59.17 (C38), 55.41 (C40), 52.43 (C36), 42.64 (C23), 40.05 (C6), 39.51 (C37), 35.92 (C12, C21), 35.74 (C32), 29.30, 28.26 (C13, C20), 31.86, 25.23, 28.20 (C33 - C35), 29.26, 29.21, 22.77 (C7 - C9), 8.50 (C1 - C3) ppm.

ESI-MS (pos. Ionenmodus): 899.5 (5) [M+Na]⁺, 877.5 (15) [M+H]⁺.

ESI-FTMS, pos.: 899.4420 (C₄₀H₆₄O₁₀N₁₀NaS) [M+Na]⁺, berechnet: 899.4425.

6.4.41. *N*-(4-Adizobenzamido)-Gly-*N'*- α -biotinyl-H-Lysin-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan (33)



44

$C_{40}H_{64}N_{10}O_{10}S$
Mol. Gew.: 877.06
Exakte Masse: 876.45

1 M HCl,
4 °C, 26 h, 43 %



33

$C_{35}H_{56}N_{10}O_8S$
Mol. Gew.: 776.95
Exakte Masse: 776.40

Das Boc-geschützte Amin 44 (27.4 mg, 31.2 μ mol, 1.0 Äq.) wird in Salzsäure (6.24 ml, 1 M) gelöst und bei 4 °C für 26 h gerührt. Die Reaktionslösung wird mit Wasser (6.24 ml) ver-

dünnt, mit Ionentauscher (Dowex 66, Sigma-Aldrich) neutralisiert, das Gemisch erneut mit Wasser (31.2 ml) verdünnt und über einen Faltenfilter filtriert. Der zurückbleibende Ionentauscher wird mit Wasser (124.8 ml) gewaschen und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingengt. Die Zielverbindung **33** wird als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 10.4 mg (13.4 μ mol), 42.9 % d. Th.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6):

δ = 8.74 (m, 1H, CCONH), 7.93 (d, 2H, ^3J = 8.7 Hz, 2xCOCCH), 7.91 - 7.84 (m, 3H, 3xCONH), 7.22 (d, 2H, ^3J = 8.7 Hz, 2xN₃CCH), 6.40 (bs, 1H, Biotin-NH), 6.36 (bs, 1H, Biotin-NH), 4.33 - 4.28 (m, 1H, SCH₂CH), 4.21 - 4.14 (m, 1H, SCHCH), 4.13 - 4.09 (m, 1H, Lys-H _{α}), 3.82 (d, 2H, ^3J = 5.7 Hz, Gly-H _{α}), 3.53 - 3.44 (m, 8H, 2xOCH₂CH₂O), 3.42 - 3.35 (m, 4H, 2xNHCH₂CH₂CH₂), 3.15 - 3.05 (m, 5H, 2xCONHCH₂, SCH), 2.82 (dd, 1H, ^3J = 12.4, ^3J = 5.7 Hz, SCH_{2a}), 2.73 (t, 2Hm ^3J = 6.4 Hz, Lys-H _{ϵ}), 2.58 (d, 1H, ^3J = 12.4 Hz, SCH_{2b}), 2.17 - 2.09 (m, 2H, Biotin-CH₂), 1.67 - 1.56 (m, 4H, 2xNHCH₂CH₂), 1.54 - 1.40 (m, 6H, 3xBiotin-CH₂), 1.38 - 1.19 (m, 6H, Lys-H _{β} , Lys-H _{γ} , Lys-H _{δ}) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO- d_6):

δ = 171.52 (C19), 168.72 (C26, C6), 165.45 (C34), 142.35 (C17), 129.25 (C21, C25), 118.83 (C22, C24), 69.71, 69.51, 69.49 (C10 - C13), , 68.07, 67.98 (C9, C14), 62.46 (C5), 61.03 (C33), 55.43 (C35), 52.18 (C31), 42.65 (C18), 38.70 (C1), 39.51 (C32), 35.92 (C7, C16), 34.96 (C27), 31.52, 30.18 (C8, C15), 31.52, 28.23, 26.80 (C28 - C30), 29.30, 29.26, 22.38 (C2 - C4) ppm.

ESI-MS (pos. Ionenmodus): 799.4 (80) [M+Na]⁺, 777.5 (100) [M+H]⁺.

ESI-FTMS, pos.: 777.4076 (C₃₅H₅₇O₈N₁₀S [M+H]⁺, berechnet: 777.4082.

Abkürzungsverzeichnis

AfBPP	Affinity-based protein profiling
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASF	Asialofetuin
BSA	Riderserumalbumin (<i>Bovine serum albumin</i>)
CAM	Cerammoniummolybdat
CHAPS	(3-[3-Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]- 1-propansulfonat)
COMU	(1-Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylidenaminoxy)- dimethylamino-morpholino-carbenium- hexafluorophosphat
CRD	<i>Carbohydrate Recognition Domain</i>
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DIC	<i>N,N</i> -Diisopropylcarbodiimid
DMA	<i>N,N</i> -Dimethylacetamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECM	<i>extracellular matrix</i>
EDA	Ethylendiamin
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat-Dinatrium
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
GalT	β -1,4-Galactosyltransferase
ges.	gesättigt

GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GSL-II	Griffonia (Bandeira) simplicifolia Lektin-II
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
ISC	Intersystem-Crossing
LacNAc	N-Acetylactosamin
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
NHS	N-Hydroxysuccinimid
PBS	<i>Phosphate balanced saline</i>
Pd/C	Palladium auf Kohle
PEG	Polyethylenglykol
POD	Peroxidase
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
TEA	Triethylamin
TEMED	Tetramethylethylenediamin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-HCl
Tris-X	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-X
WGA	<i>Wheat Germ Agglutinin</i>
YFP	<i>Yellow fluorescent protein</i>

Literaturverzeichnis

- [1] M. R. Wilkins, J.-C. Sanchez, A. A. Gooley, R. D. Appel, I. Humphery-Smith, D. F. Hochstrasser und K. L. Williams, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **1996**, 13, 19.
- [2] S. G. Gregory, K. F. Barlow, K. E. McLay, R. Kaul, D. Swarbreck, A. Dunham, C. E. Scott, K. L. Howe, K. Woodfine, C. C. A. Spencer, M. C. Jones, C. Gillson, S. Searle, Y. Zhou, F. Kokocinski, L. McDonald, R. Evans, K. Phillips, A. Atkinson, R. Cooper, C. Jones, R. E. Hall, T. D. Andrews, C. Lloyd, R. Ainscough, J. P. Almeida, K. D. Ambrose, F. Anderson, R. W. Andrew, R. I. S. Ashwell, K. Aubin, A. K. Babbage, C. L. Bagguley, J. Bailey, H. Beasley, G. Bethel, C. P. Bird, S. Bray-Allen, J. Y. Brown, A. J. Brown, D. Buckley, J. Burton, J. Bye, C. Carder, J. C. Chapman, S. Y. Clark, G. Clarke, C. Clee, V. C. and R. E. Collier, N. Corby, G. J. Coville, J. Davies, R. Deadman, M. Dunn, M. Earthrowl, A. G. Ellington, H. Errington, A. Frankish, J. Frankl, , L. French, P. Garner, J. Garnett, L. Gay, M. R. J. Ghorl, R. Gibson, L. M. Gilby, W. Gillett, R. J. Glithero, D. V. Grafham, C. Griffiths, S. Griffiths-Jones, R. Grocock, S. Hammond, E. S. I. Harrison, E. Hart, E. Haugen, P. D. Heath, S. Holmes, K. Holt, P. J. Howden, A. R. Hunt, S. E. Hunt, G. Hunter, J. Isherwood, R. James, C. Johnson, D. Johnson, A. Joy, M. Kay, J. K. Kershaw, M. Kibukawa, A. M. Kimberley, A. King, A. J. Knights, H. Lad, G. Laird, S. Lawlor, D. A. Leongamornlert, D. M. Lloyd, J. Loveland, J. Lovell, M. J. L. R. Lyne, S. Martin, M. Mashreghi-Mohammadi, L. Matthews, N. S. W. Matthews, S. McLaren, S. Milne, S. Mistry, M. J. F. Moore, T. Nickerson, C. N. O'Dell, K. Oliver, A. Palmeiri, S. A. Palmer, A. Parker, D. Patel, A. V. Pearce, A. I. Peck, S. Pelan, K. Phelps, B. J. Phillimore, R. Plumb, J. Rajan, C. Raymond, G. Rouse, C. Saenphimmachak, H. K. Sehra, E. Sheridan, R. Shownkeen, S. Sims, C. D. Skuce, M. Smith, C. Steward, S. Subramanian, N. Sycamore, A. Tracey, A. Tromans, Z. V.

- Helmond, M. Wall, J. M. Wallis, S. White, S. L. Whitehead, J. E. Wilkinson, D. L. Willey, H. Williams, L. Wilming, P. W. Wray, Z. Wu, A. Coulson, M. Vaudin, J. E. Sulston, R. Durbin, T. Hubbard, R. Wooster, I. Dunham, N. P. Carter, G. McVean, M. T. Ross, J. Harrow, M. V. Olson, S. Beck, J. Rogers und D. R. Bentley, *Nature* **2006**, *441*, 315.
- [3] J. C. Venter, M. D. Adams, A. Halpern, A. Awe, A. Wang, A. Levitsky, A. Zandieh, A. Yao, A. Carver, A. Love, A. Basu, A. E. Gabrielian, A. Gluecksmann, A. G. Clark, A. Center, A. Cravchik, A. Kejariwal, A. Glodek, A. D. Mays, A. Muruganujan, A. Narechania, A. Sprague, A. J. Levine, A. Delcher, A. Xia, A. K. Naik, B. Gropman, B. Neelam, B. Lazareva, B. Shue, B. Ruhfel, B. Karlak, B. Murphy, B. Walenz, B. Hart, C. Dahlke, C. Fosler, C. Evangelista, C. Slayman, C. Jordan, C. Nelson, C. Haynes, C. A. Evans, C. Heiner, C. Kraft, C. D. Kodira, C. Ibegwam, C. Carter, C. Yan, C. Xiao, C. Vech, C. Mobarry, C. Pfannkoch, C. Sitter, D. Ely, D. Hostin, D. Busam, D. Fasulo, D. H. Huson, D. Ma, D. Baldwin, D. Allen, D. May, D. Wu, D. Romblad, D. Nusskern, D. Gilbert, D. Jennings, D. B. Rusch, E. Venter, E. Beasley, E. Suh, E. Winn-Deen, E. Pratts, E. Stewart, E. W. Myers, F. Gong, F. Zhong, F. Mann, F. Ali, F. Kalush, F. Lu, G. Subramanian, G. Wang, G. Spier, G. V. Merkulov, G. L. G. Miklos, G. G. Sutton, H. O. Smith, H. Gire, H. M. Moore, H. Qureshi, H. Baden, H. Zhang, H. Mi, H. An, I. Barrow, I. Dew, I. Chandramouliswaran, I. McMullen, J. Baxendale, J. Jordan, J. Abu-Threideh, J. Ye, J. Houck, J. Haynes, J. Zaveri, J. D. Gocayne, J. Johnson, J. Hoover, J. R. Wortman, J. Heil, J. Wetter, J. Wang, J. Li, J. Peck, J. Zhang, J. Sun, J. McDaniel, J. Nadeau, J. Carnes-Stine, J. Kasha, J. Lopez, J. Scott, J. F. Abril, K. Chaturvedi, K. A. Ketchum, K. Beeson, K. Diemer, K. Eilbeck, K. Zaveri, K. Remington, K. Nelson, K. Graham, K. Biddick, K. Glasser, K. Wolfe, K. V. Sjolander, K. Reinert, K. Dodson, L. Kagan, L. Kline, L. Zheng, L. Florea, L. Chen, L. Moy, L. Davenport, L. Doup, L. Curry, L. Blick, M. Nodell, M. Caminha, M. Dombroski, M. Skupski, M. Gorokhov, M. Lewis, M. Yandell, M. Peterson, M. Barnstead, M. Newman, M. Reardon, M. E. Higgins, M. Moy, M. Wang, M. Wen, M. Simon, M. Donnelly, M. Flanigan, M. Harris, M. Hunkapiller, M. J. Campbell, M. Simpson, M. Cargill, M. Smallwood, M. L. Cheng, M. Zhan, M.-H. Wei, M. Wu, M. Williams, M. Coyne, N. Guo, N. Milshina, N. Garg, N. Nguyen, N. N. Tint, N. Zinder, P. Caulk, P. Dunn, P. D. Thomas, P. Amanatides, P. W. Li, P. Guan, Q. Zhao, Q. Zhang, R. Bo-

- lanos, R. Desilets, R. Thomas, R. Strong, R. Brandon, R. J. Mural, R. J. Roberts, R. M. Ballew, R. Scott, R. A. Holt, R. Rodriguez, R. Sanders, R. Guigo, R. Wides, R. Charlab, R. Lippert, R.-R. Ji, R. Schwartz, R. Turner, S. Broder, S. Levy, S. Windsor, S. Kravitz, S. Henderson, S. Murphy, S. Koduru, S. Zhao, S. Williams, S. C. Zhu, S. Yooseph, S. Sato, S. Esparham, S. Istrail, S. Hannenhalli, S. Glanowski, S. Danaher, S. Ferriera, S. McCawley, S. Salzberg, S. Pan, S. Tse, S. Dietz, S. Baumhueter, S. Hladun, T. Hatton, T. J. Heiman, T. Smith, T. Howland, T. Stockwell, T. McIntosh, T. Woodage, T. Nguyen, V. A. Narayan, V. D. Francesco, V. A. McKusick, V. Bafna, V. Puri, V. Bonazzi, W. Ge, W. Shao, W. Gan, W. Zhang, W. Zhong, W. Majoros, W. Rowe, X. Liu, X. H. Zheng, X. Zhu, X. Lin, X. Wang, Y.-H. Chiang, Y. Lei, Y. Liang, Y.-H. Rogers, Z. Ke, Z. Y. Wang, Z. Li, Z. Gu, Z. Lai und Z. Deng, *Science* **2001**, 291, 1304 .
- [4] S. Charrack, *Synthese und Anwendung von trifunktionellen Fängerverbindungen für die Proteomforschung*, Dissertation, RWTH Aachen University **2011**.
- [5] J. Klose, *Humangenetik* **1995**, 26, 231.
- [6] K. G. Kenrick und J. Margolis, *Anal Biochem* **1970**, 33, 204.
- [7] G. Dale und L. Latner, *Clinica Chimica Acta* **1968**, 24, 61.
- [8] V. Macko und H. Stegemann, *Physiol Chem* **1969**, 350, 917.
- [9] M. Karas und F. Hillenkamp, *Analytical Chemistry* **1988**, 60, 2299 .
- [10] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong und C. M. Whitehouse, *Science* **1989**, 246, 64 .
- [11] K. C. Hansen, G. Schmitt-Ulms, R. J. Hirsch, M. A. Baldwin und A. L. Burlingame, *Molecular and Cellular Proteomics* **2003**, 2, 299 .
- [12] N. Khainovski, S. NPillai, S. Daniels, S. Purkayastha, P. Juhasz, S. M. M. Bartlet-Jones, F. He, A. Jacobson und D. J. Pappin, *Molecular and Cellular Proteomics* **2004**, 3, 1154 .
- [13] L. Yongsheng, M. P. Patricelli und B. F. Cravatt, *Proc Natl Acad Sci USA* **1999**, 96, 14694.
- [14] K. T. Barglow und B. F. Cravatt, *Nature Methods* **2007**, 4, 822.

- [15] Y. Hatanaka, M. Hashimoto, K. I. P. Hidari, Y. Sanai, Y. Nagai und Y. Kanaoka, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1995**, 5, 2859.
- [16] Y. Hatanaka, M. Hashimoto, S. Nishihara, H. Narimatsu und Y. Kanaoka, *Carbohydrate Research* **1996**, 294, 95.
- [17] Y. Hatanaka, U. Kempin und P. Jong-Jip, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 5639.
- [18] Y. Hatanaka, M. Hashimoto und Y. Kanaoka, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 453.
- [19] R. J. Pieters, D. T. S. Rijkers und R. M. J. Liskamp, *QSAR* **2007**, 26, 1181.
- [20] L. Ballell, M. van Scherpenzeel, K. Buchalova, R. M. J. Liskamp und R. J. Pieters, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4, 4387.
- [21] M. v. Scherpenzeel, E. E. Moret, L. Ballell, R. M. J. Liskamp, U. J. Nilsson, H. Leffler und R. J. Pieters, *ChemBioChem* **2009**, 10, 1724.
- [22] T. K. Lindhorst, M. Märten, A. Fuchs und S. D. Knight, *Beilstein* **2010**, 6, 810.
- [23] M. Wiegand und T. K. Lindhorst, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 4841.
- [24] M. Hüben, *Synthese von S-Adenosyl-L-methionin-Analoga für enzymatische DNA-Markierung und funktionelle Proteomuntersuchungen*, Dissertation, RWTH Aachen University **2009**.
- [25] A. Singh, E. R. Thornton und F. H. Westheimer, *J. Biol. Chem.* **1962**, 237, 3006.
- [26] G. W. J. Fleet, R. R. Porter und J. R. Knowles, *Nature* **1969**, 224, 511.
- [27] L. L. A. Reiser, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 92, 7487.
- [28] N. P. Gritsan und M. S. Platz, *Chem. Rev.* **2006**, 106, 3844.
- [29] R. A. Moss, M. S. Platz und M. H. Jones, *John Wiley & Sons* **2004**.
- [30] J. Wang, J. Kubicki, G. Burdzinski, J. C. Hackett, T. L. Gustafson, C. M. Hadad und M. S. Platz, *J. Org. Che* **2007**, 72, 7581.
- [31] R. D. McCulla, G. Burdzinski und M. S. Platz, *Org. Lett.* **2006**, 8, 1637.

- [32] W. L. Karney und W. T. Borden, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 1378.
- [33] S. J. Kim, T. P. Hamilton und H. F. Schaefer, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 5349.
- [34] R. S. Pandurangi, P. Lusiak, R. R. Kuntz, W. A. Volkert, J. Rogowski und M. S. Platz, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 9019.
- [35] R. Poe, K. Schnapp, M. J. T. Young, J. Grayzar und M. S. Platz, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 5054.
- [36] J. F. W. Kaena und S. X. Cai, *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 3640.
- [37] S. X. Cai, D. J. Glenn und J. F. W. Kaena, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 1299.
- [38] R. S. Pandurangi, S. R. Karra, K. V. Katti, R. R. Kuntz und W. A. Volkert, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 2798.
- [39] R. Bofinger, *Synthese eines Tri-LacNac-Photo-Quervernetzers zum Aufbau einer stabilen, artifizialen, extrazellulären Matrix*, Diplomarbeit, RWTH Aachen **2010**.
- [40] R. Har-El und M. L. Tanzer, *FASEB Journal* **1993**, 7, 1115.
- [41] M. P. Lutolf und J. A. Hubbell, *Nature Biotechnology* **2005**, 23, 47.
- [42] T. E. Hardingham und A. J. Fosang, *FASEB Journal* **1992**, 6, 861.
- [43] K. Beck, I. Hunter und J. Engel, *FASEB Journal* **1990**, 4, 148.
- [44] S. Lowins, *Synthese von LacNac-Photo-Quervernetzern zur Galektin-vermittelten Anlagerung von Zellen.*, Diplomarbeit, RWTH Aachen University **2011**.
- [45] C. E. Römer und L. Elling, *Galectins: Structures, Binding Properties and Function in Cell Adhesion*, Biomaterials Physics and Chemistry **2011**.
- [46] Z. Cao, N. Said, S. Amin, H. K. Wu, A. Bruce, M. Garate, D. K. Hsu, I. Kuwabara, F.-T. Liu und N. Panjwani, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 42299.
- [47] K.-I. Kassai und J. Hirabayashi, *JB Review* **1996**, 119, 1.

- [48] M. T. Elola, C. Wolfenstein-Todel, M. F. Troncoso, G. R. Vasta und G. A. Rabinovich, *Cell. mol. Life Sci.* **2007**, 64, 1679.
- [49] C. E. Kupper, S. Böcker, H. Lui, C. Adamzyk, J. van de Kamp, T. Recker, B. Lethaus, W. Jahnen-Dechent, S. Neuss, G. Müller-Newen und L. Elling, *Curr. Pharm. Des.* **2013**, 19, 5457.
- [50] M. V. Beer, C. Rech, S. Diederich, K. Hahn, K. Bruellhoff, M. Möller, L. Elling und J. Groll, *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, 403, 517.
- [51] J. G. T. Ameringer, J. P. Spatz und M. Moeller, *Langmuir* **2005**, 21, 1991.
- [52] J. Salber, S. Grater, M. Harwardt, M. Hofmann, D. Klee, J. Dujic, J. H. Huang, J. D. Ding, S. Kippenberger, A. B. A, J. Groll, J. P. Spatz und M. Möller, *Small* **2007**, 3, 1023.
- [53] J. Groll, J. Fiedler, E. Engelhard, T. Ameringer, S. Tugulu, H. A. Klok, R. E. Brenner und M. Moeller, *J Biomed Mat Res Part A* **2005**, 74A, 607.
- [54] S. H. Barondes, *Trends Biochem. Sci.* **1988**, 13, 480.
- [55] N. Sharon und H. Lis, *Science* **1989**, 246, 227.
- [56] C. L. Diaz, L. S. Melchers, P. J. J. Hooykaas, B. J. J. Lugtenberg und J. W-Kijne, *Nature* **1989**, 338, 579.
- [57] M. J. Chrispeels und N. V. Raikhel, *The Plant Cell* **1991**, 3, 1.
- [58] K. Zhu, J. E. Huesing, R. E. Shade, R. A. Bressan, P. M. Hasegawa und L. L. Murdock, *Plant Physiology* **1996**, 110, 195.
- [59] K. Zhu-Salzman, R. E. Shade, H. Koiwa, R. A. Salzman, M. Narasimhan, R. A. Bressan, P. M. Hasegawa und L. L. Murdock, *Proc Natl Acad Sci USA* **1998**, 95, 15123.
- [60] H. Lis und N. Sharon, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 637.
- [61] H. Rhem, *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*, 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag **2006**.

- [62] S. Nakamura-Tsuruta, J. Kominami, M. Kamei, Y. Koyama, T. Suzuki, M. Isemura und J. Hirabayashi, *J. Biochem* **2006**, *140*, 285.
- [63] P. N. Shankar, K. D. Wilkinson und I. J. Goldstein, *Arch. Biochem. Biophys.* **1976**, *177*, 330.
- [64] J. E. Lampb, S. Shibata und I. J. Goldstein, *Plant Physiology* **1983**, *71*, 879.
- [65] Y. Nagata und M. M. Burger, *The Journal of biological chemistry* **1974**, *249*, 3116.
- [66] S. Suwal und M. K. H. Pflum, *Angewandte Chemie* **2010**, *49*, 1627.
- [67] D. Horton, *Org. Syn. Coll.* **1973**, *5*, 1.
- [68] B. Sauerzapfe, K. Krenek, J. Schmiedel, W. W. Wakarchuk, H. Pelantova, V. Kren und L. Elling, *Glycoconjugate Journal* **2009**, *26*, 141.
- [69] K. Motoyama, Y. Nakashima, Y. Aramaki, F. Hirayama, K. Uekama und H. Arima, *Journal of drug delivery* **2010**, 2011.
- [70] H. Goetz, U. Beginn, C. F. Bartelink, H. J. M. Grunbauer und M. Moeller, *Macromol Mater eng* **2002**, *287*, 223.
- [71] M. Pittelkow, R. Lewinsky und J. B. Christensen, *Synthesis* **2002**, *15*, 2195.
- [72] R. Kottani, R. A. Valiulin und A. G. Kutateladze, *Proc Natl Acad Sci USA* **2006**, *103*(38), 13917.
- [73] A. Baschieri, A. Matteucci, S. Muzzioli, L. Symbri, S. Stagni, V. Fiorini und M. Massi, *Organometallics* **2014**, *33*, 6154.
- [74] A. Homma, H. Sato, A. Okamachi, T. Emura, T. Ishizawa, T. Kato, T. Matsuura, S. Sato, T. Tamura, Y. Higuchi, T. Watanabe, H. Kitamura, K. Asanuma, T. Yamazaki, M. Ikemi, H. Kitagawa, T. Morikawa, H. Ikeya, K. Maeda, K. Takahashi, K. Nohmi, N. Izutani, M. Kanda und R. S. and, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 4647.
- [75] L. A. Carpino und G. Y. Han, *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3404.

-
- [76] F.-E. Chen, X.-X. Chen, H.-F. Dai, Y.-Y. Kuang, B. Xie und J.-F. Zhao, *Advanced Synthesis & Catalysis* **2005**, 347, 549.
- [77] M. R. Cline, S. M. Mandel und M. S. Platz, *Biochemistry* **2007**, 46, 1981.
- [78] V. H. G. Han, M. Tamaki, *J. Peptide Res.* **2001**, 58, 338.
- [79] E. Gérard, A. Meulle, O. Feron und J. Marchand-Brynaert, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22, 586.
- [80] R. Gibson, Bergmeier, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 3216.
- [81] R. Lui, X. Chen, S. H. Gellman und K. S. Masters, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 16296.
- [82] G. O. Nevstad und J. Songstad, *Acta Chem. Scand.* **1984**, B38, 469.
- [83] C. E. Römer und L. Elling, *Intechopen* **2011**.
- [84] A. Voigt, *Zur Chemie photolytisch generierter Arylnitrene in Polymermatrizen*, Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin **1998**.
- [85] E. Weinhold, C. Dalhoff, M. Hüben, T. Lenz, P. Poot, E. Nordhoff und H. Köster, *ChemBioChem* **2010**, 11, 256.

Anhang

A. Danksagung

Herzlich bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Elmar Weinhold für die Möglichkeit diese Dissertation in seinem Arbeitskreis anzufertigen. Die Zeit war sehr spannend und hat mir sehr viel Freude bereitet. Auch danke ich Herrn Prof. Dr. Albrecht für die Übernahme der Zweitkorrektur.

Ein großes Dankeschön geht an Kerstin Glensk, welche mir mit der Präp der GalT eine große Hilfe und immer für ein nettes Gespräch zu haben war. Ich wünsche Dir, dass du ersteinmal keine GalT mehr herstellen musst.

Ein ganz besonderer Dank geht an Sophia Böcker aus dem Helmholtz Institut, welche die biologischen Experimente zur Oberflächenmodifikation durchführte und immer für anregende und zielorientierte Diskussionen verfügbar war. Der Austausch mit Ihr war eine wahre Freude und hat vieles erleichtert.

Gleichzeitig danke ich Nadine Jansen aus dem DWI an der RWTH Aachen für die Präparation der Mikrotiterplatten. Gerade am Ende meiner Zeit als es bei Ihr stressig war, hat Sie es immer noch geschafft diese Platten für mich zu beschichten. Vielen Dank dafür.

Was wären die 3.5 Jahre ohne Gisela gewesen. Und wie oft hast du dafür gesorgt, dass ich nicht das ganze Labor auseinandernehme, weil wiederum etwas nicht an seinem Ort oder nicht aufgefüllt war. Zahlreiche Leben hast du in dieser Zeit gerettet. Vielen Dank für deine Hilfe und die spaßige Zeit.

Auch meine Forschungsstudenten und Bacheloranden möchte ich hier dankend erwähnen. Besonders hervorheben möchte ich hierbei Janine Potreck für ihre Hartnäckigkeit bezüglich des Einsatzes von COMU als Direktkupplungsreagenz. COMU hat mir die Arbeit sehr vereinfacht und manche Reaktionen erst möglich gemacht.

Auch dem gesamten Arbeitskreis Weinhold danke ich für 3.5 spannende Jahre in denen viel passiert ist und wir viel Spaß hatten. Es war eine tolle Zeit.

Auf diesem Wege möchte ich auch den Damen und Herren aus der NMR- und der Massenabteilung für die Aufnahme der zahlreichen NMR- und Massenspektren danken. Vielen herzlichen Dank an Herrn Dr. Räuber, der die 600 MHz-Spektren ermöglichte und am Ende viele Langzeitmessungen übers Wochenende laufen ließ. Frau Schellenberg aus dem Geschäftszimmer bin ich sehr dankbar für die unkomplizierte Abwicklung von Geschäften aller Art und ihre bewundernswerte Ruhe bei allen Problemen die auftraten und sicherlich noch auftreten werden. Es war eine Freude mit Ihnen zusammenzuarbeiten.

3 Menschen, die meinen bisherigen Werdegang maßgeblich mitgeprägt haben und dies noch immer tun, möchte ich an dieser Stelle ebenfalls ganz herzlich Danken. Dr. Bernd Singer, Dr. Cornelius Arendt und Dr. Carsten Puke sind Kollegen und Freunde, die mich nicht nur technisch/wissenschaftlich sondern auch menschlich sehr vieles gelehrt haben und die ich sehr schätze.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Freundin, Rebecca Tings, weil Sie mich außerhalb des Labors ertragen und meine Gemütsschwankungen ausbaden musste. Sie hat mich aufgebaut, wenn die Experimente mal wieder nicht funktioniert haben und sich mit mir gefreut, wenn es dann doch geklappt hat. Vielen Dank für diese tolle Zeit und auf viele weitere Jahre.

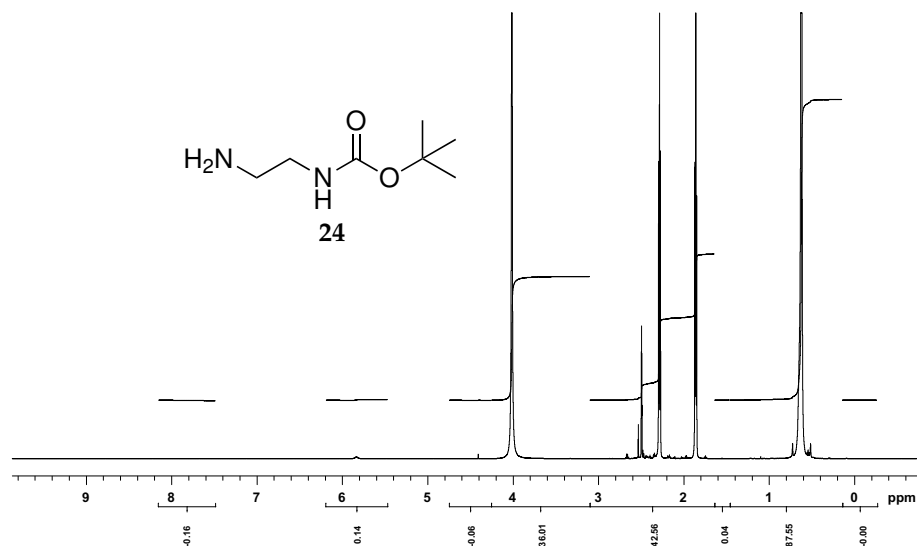
Der mit Abstand größte Dank gilt meiner Mutter. Sie hat dieses Studium vom Bachelor über den Master bis hin zu dieser Dissertation in seiner ganzen Vielfalt und Länge unterstützt und mir so diesen Abschluss ermöglicht. Nach mehr als 8 Jahren Studium bist Du nun sicherlich froh, dass dieser Weg zu Ende ist und ich der Arbeitswelt endlich zur Verfügung stehe. Vielen lieben Dank für deine Unterstützung in all den Jahren.

Zu guter Letzt die 2 Chaoten vom Dienst. Meine Brüder. Auch wenn es mit euch ein ums andere Mal anstrengend war und immernoch ist habe ich euch lieb und möchte nicht ohne euch sein. Geschwister haben ist doch schön.

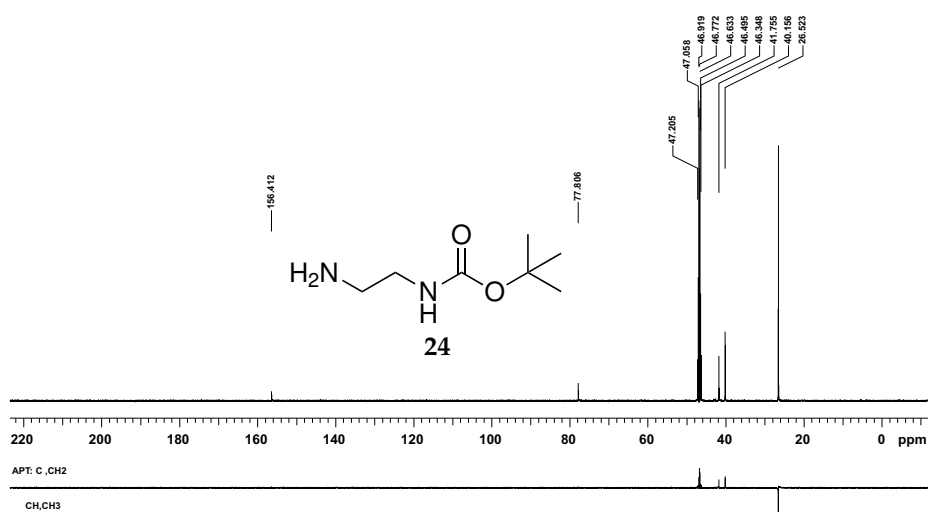
B. Spektren

N-Boc-Diaminoethan (24)

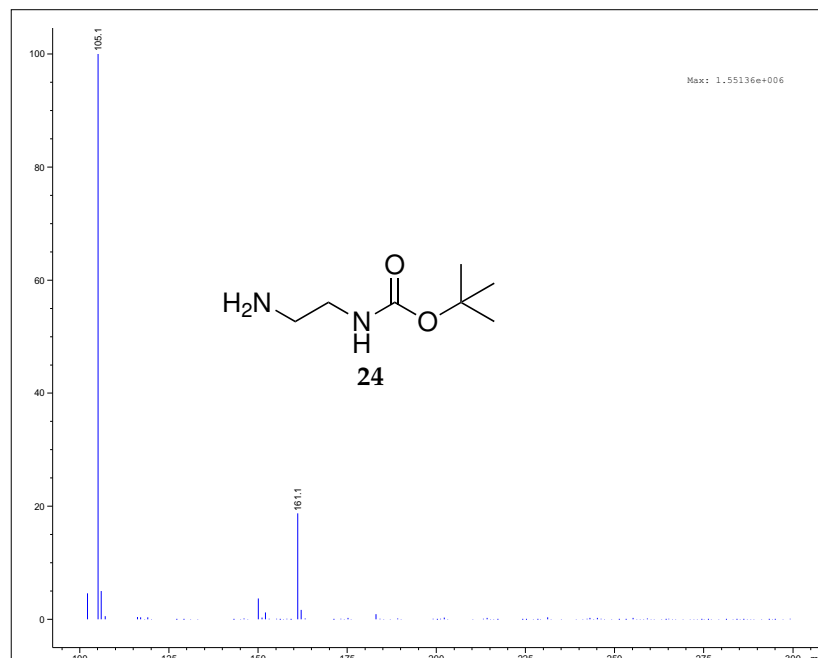
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

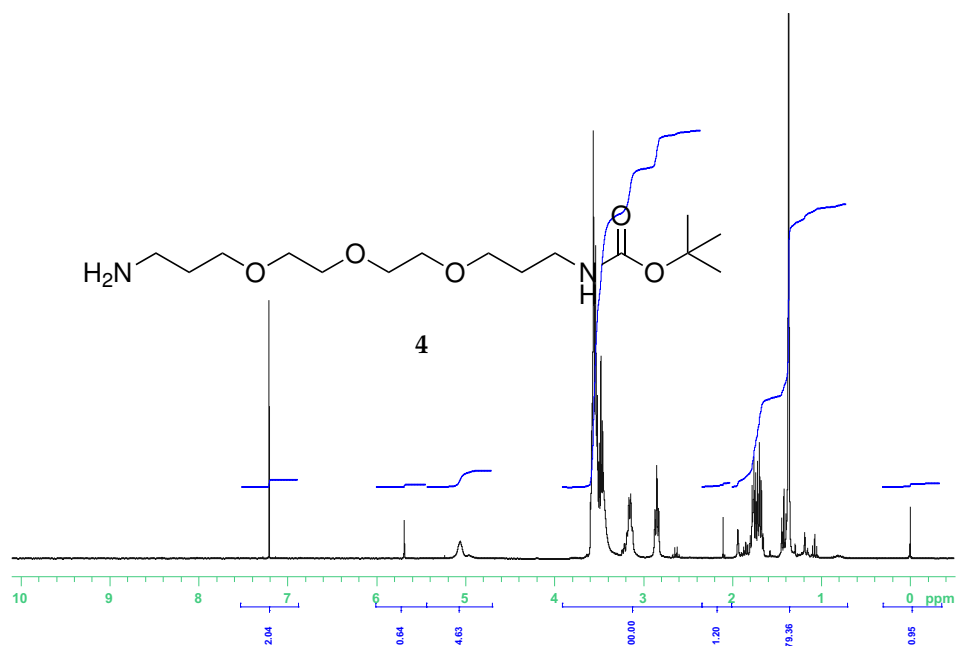


ESI-MS (positiver Ionenmodus)

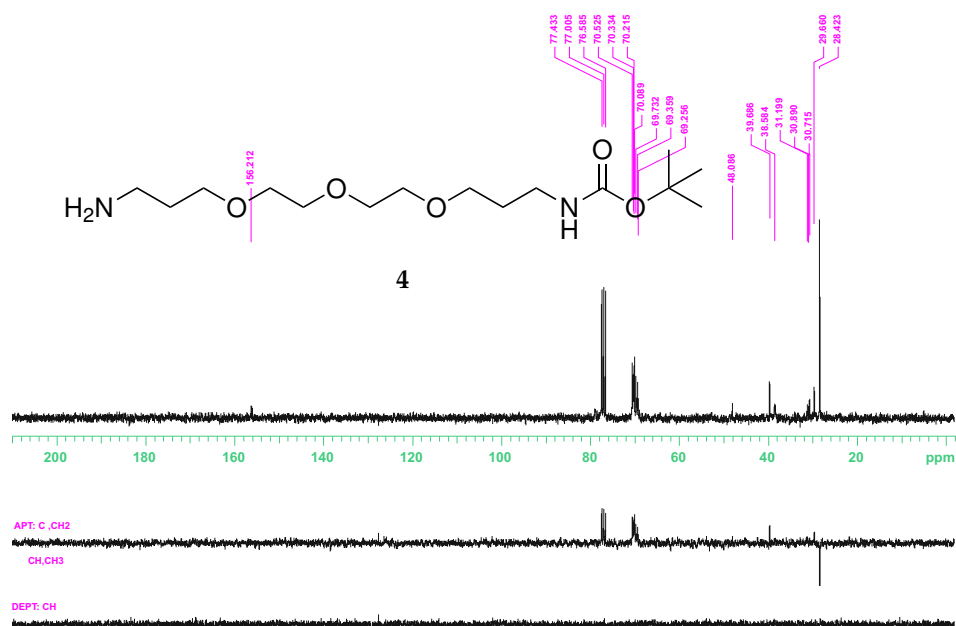


N-Boc-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan (4)

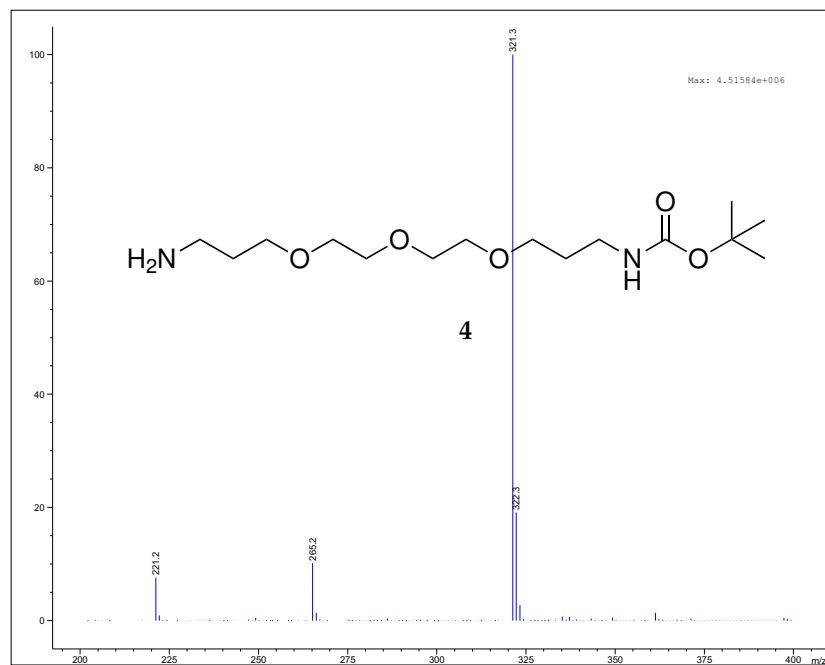
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3)



$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3)

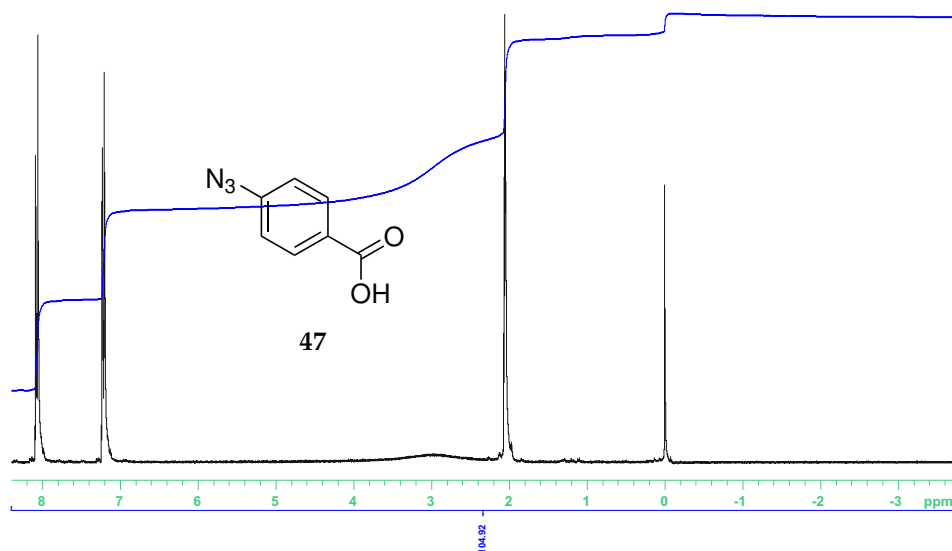


ESI-MS (positiver Ionenmodus)

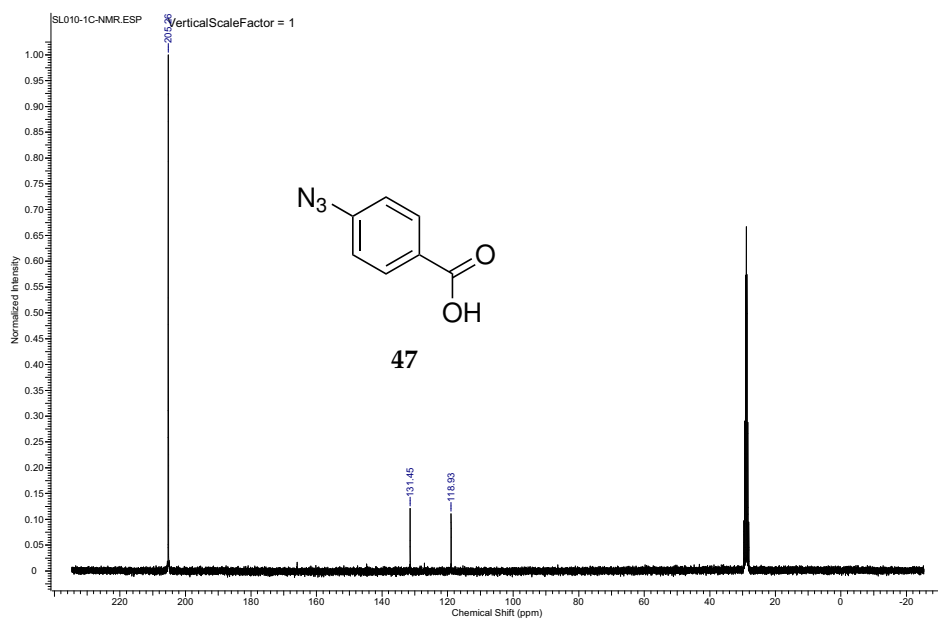


p-Azidobenzoessäure (47)

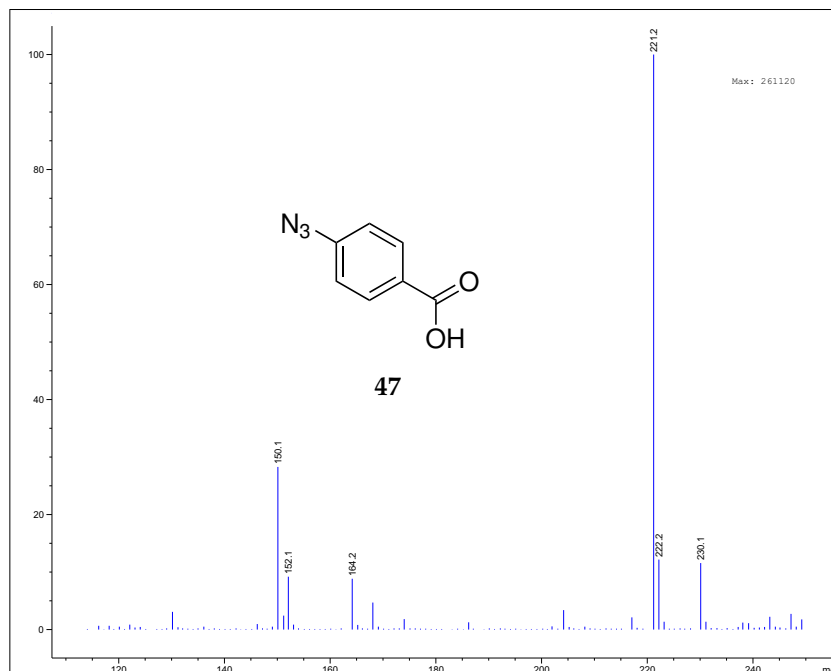
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, Aceton- d_6)



$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, Aceton- d_6)

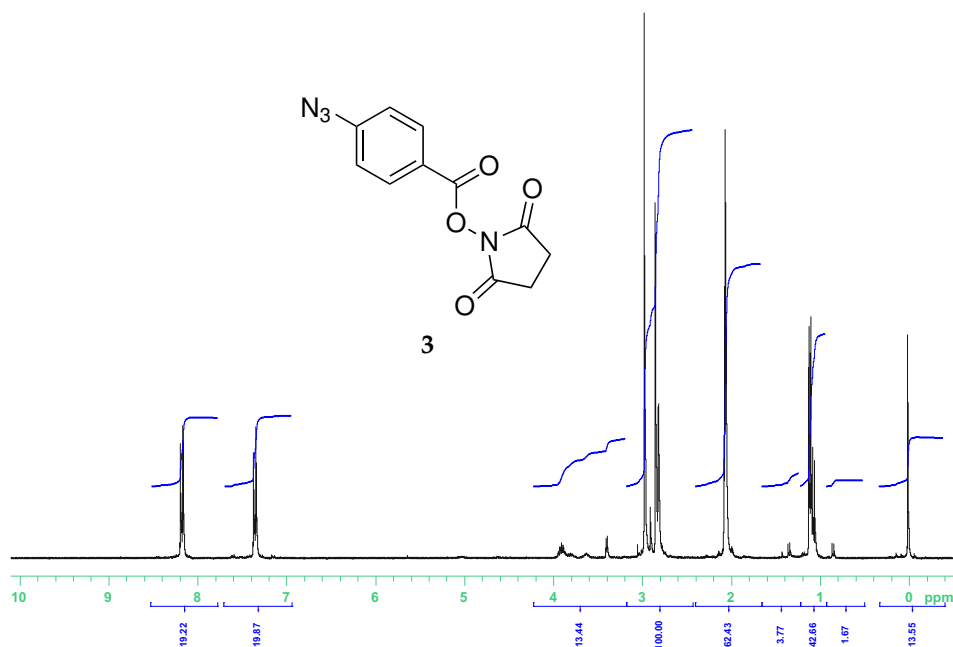


ESI-MS (positiver Ionenmodus)

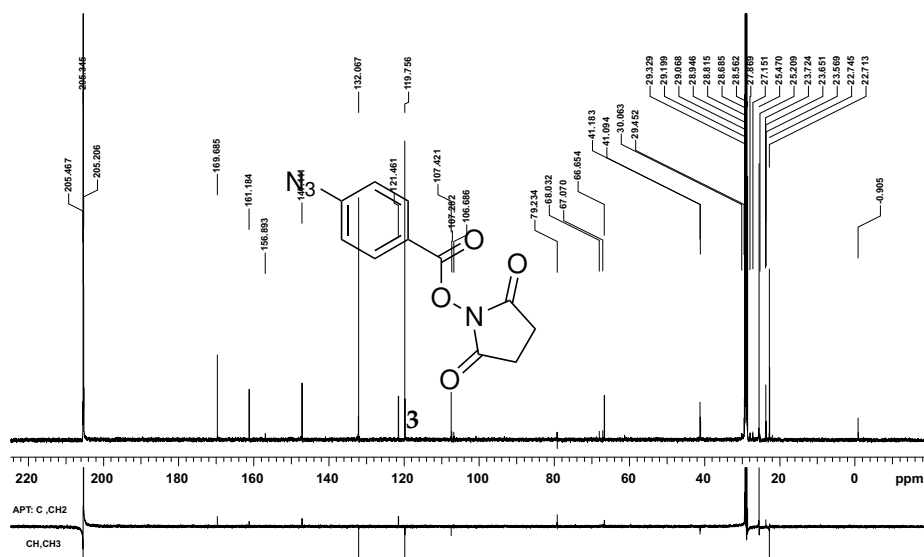


p-Azidobenzoësäure-NHS-ester (3)

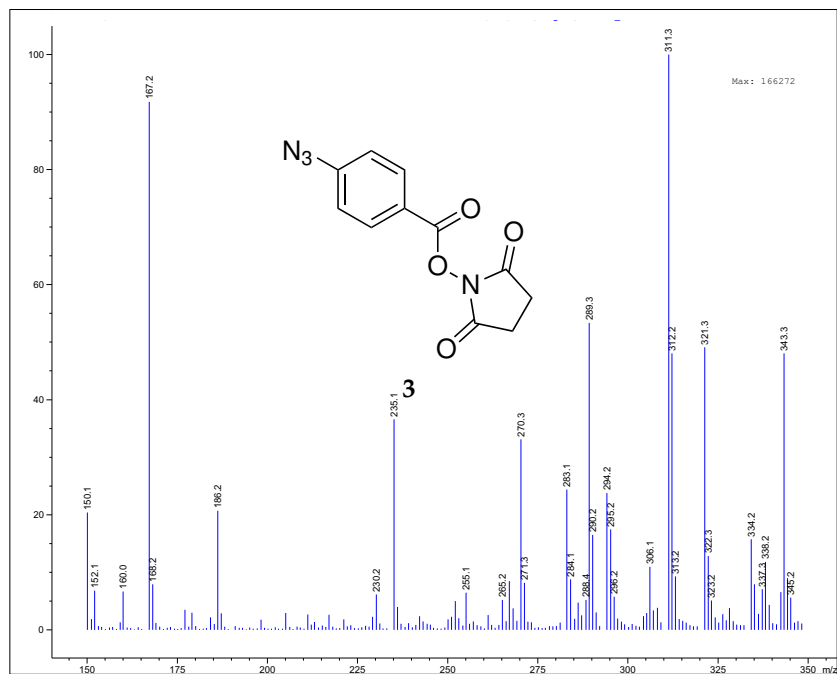
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, Aceton- d_6)



$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $[d_6]$ Aceton)

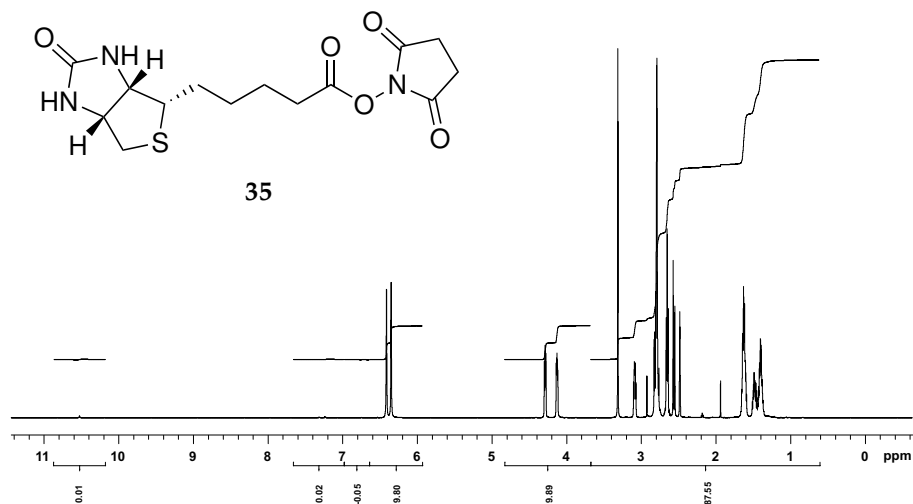


ESI-MS (positiver Ionenmodus)

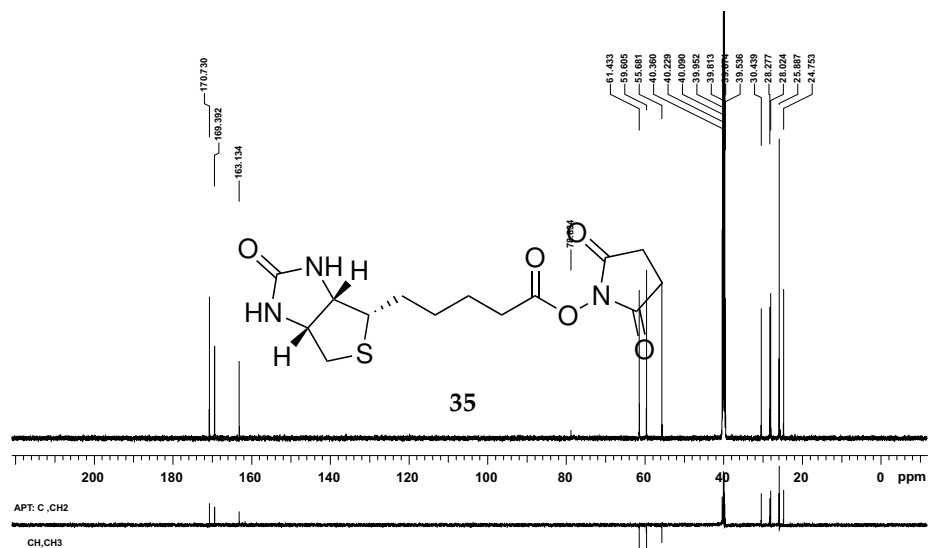


Biotin-NHS-Ester (35)

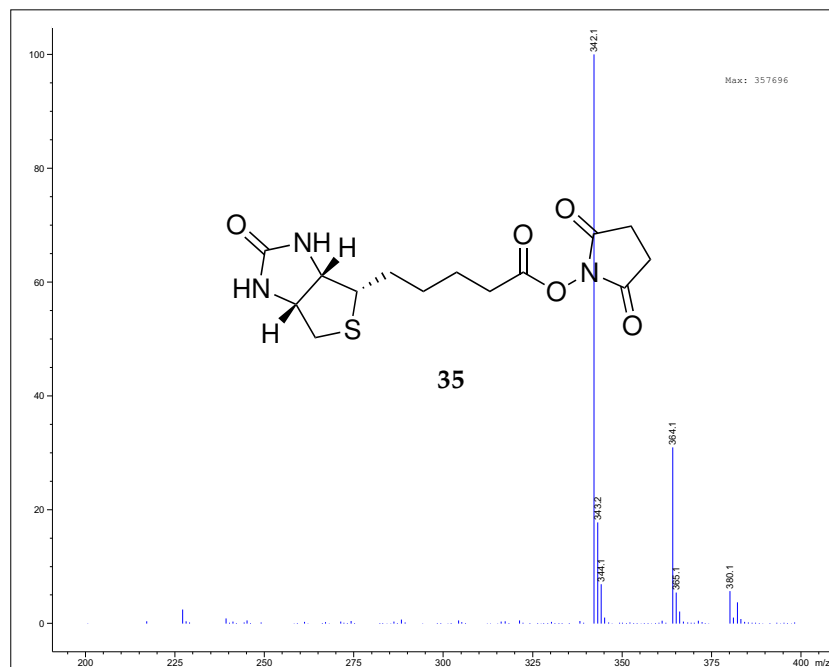
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

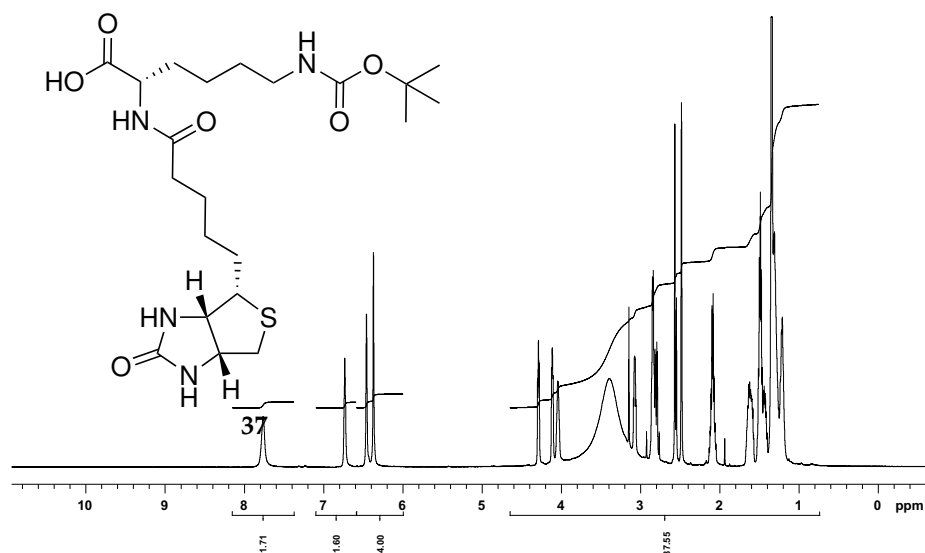


ESI-MS (positiver Ionenmodus)

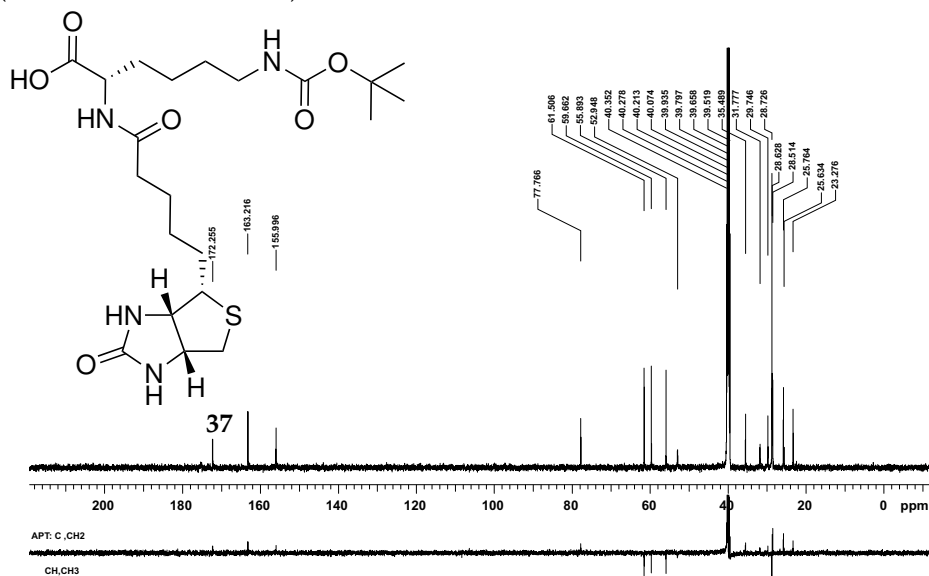


N-Biotin-Lys-*N'*-Boc-OH (37)

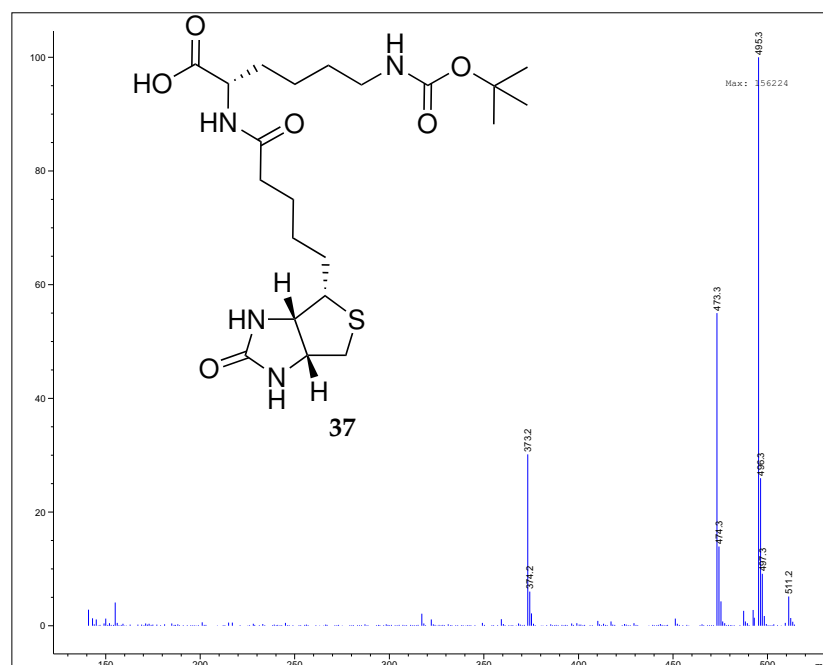
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



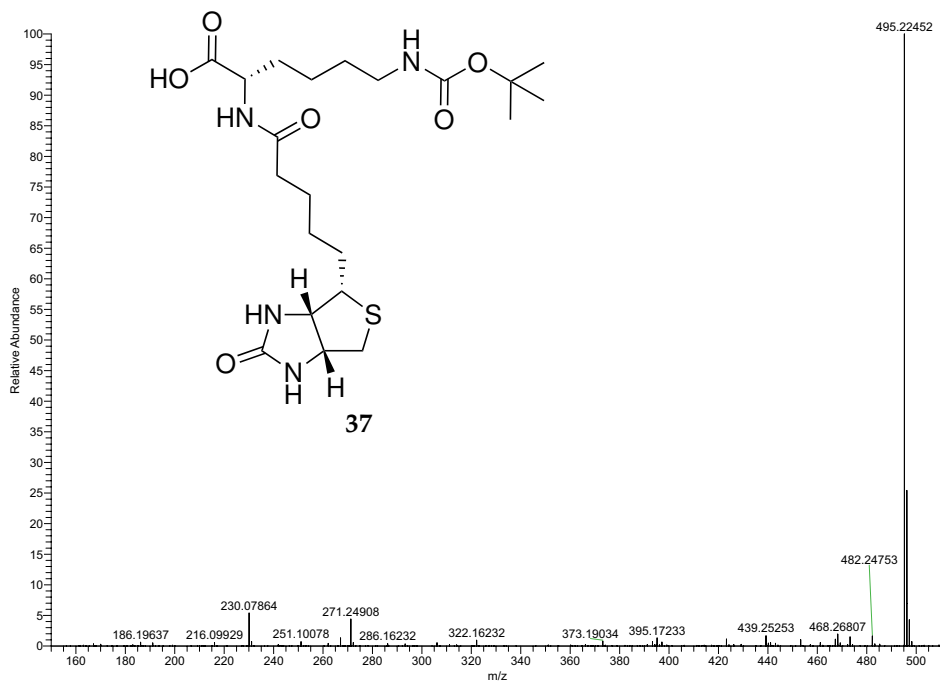
$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

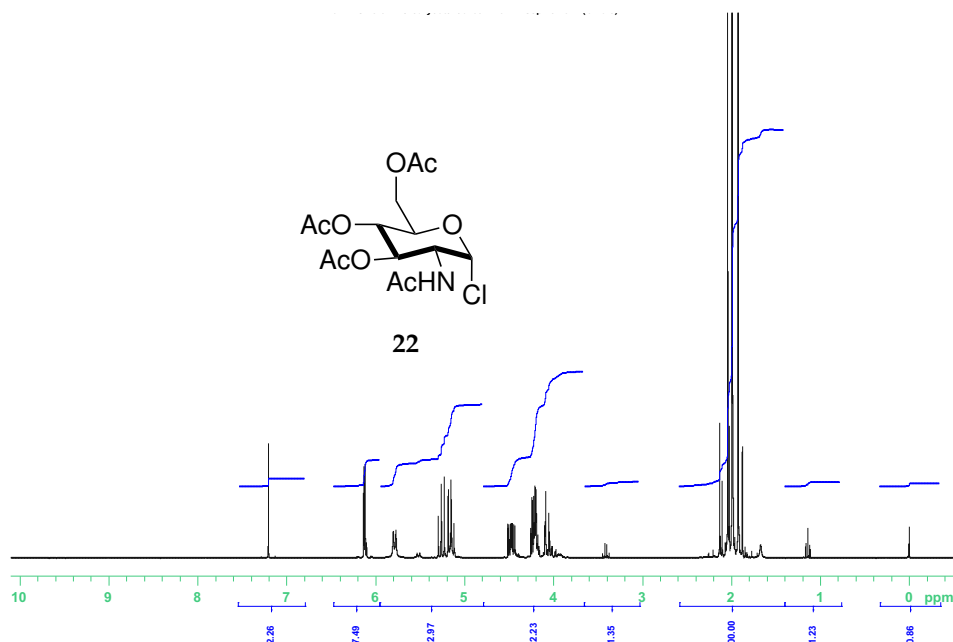
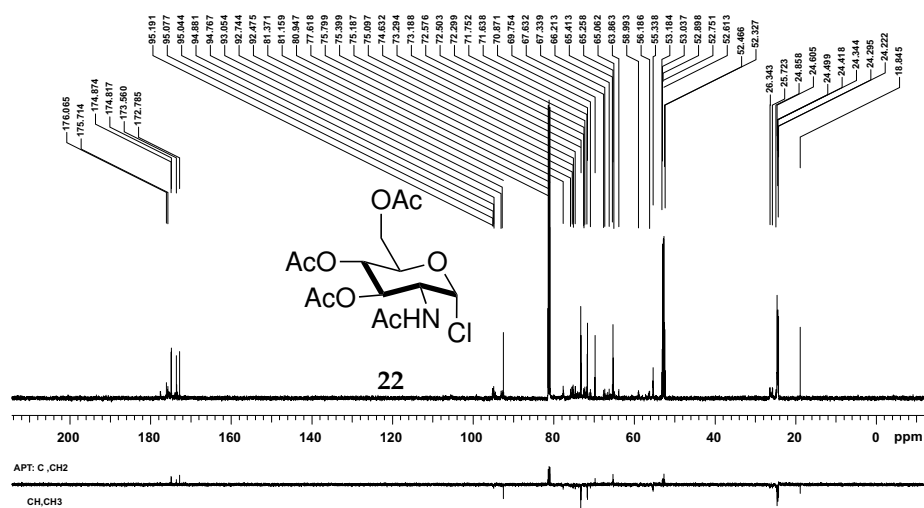


ESI-MS (positiver Ionenmodus)

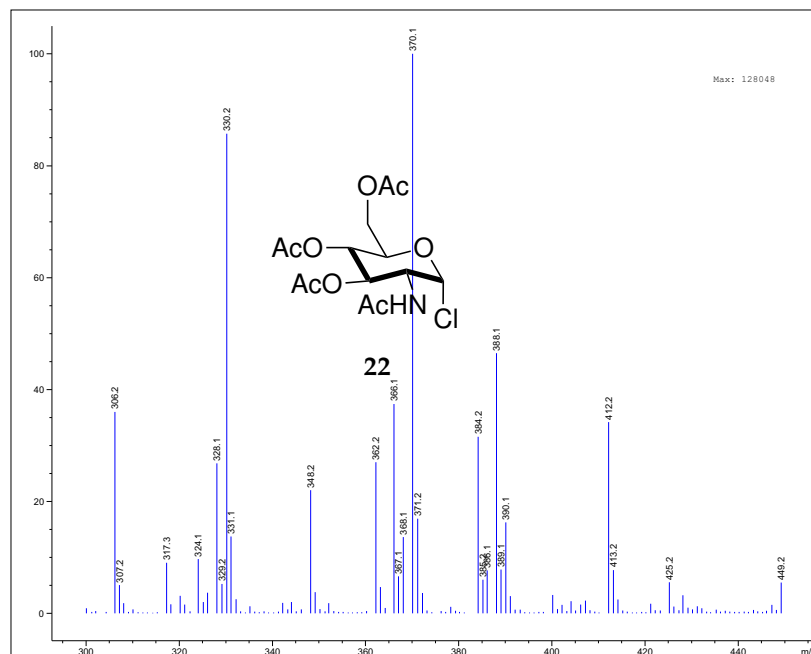


ESI-FTMS, pos.



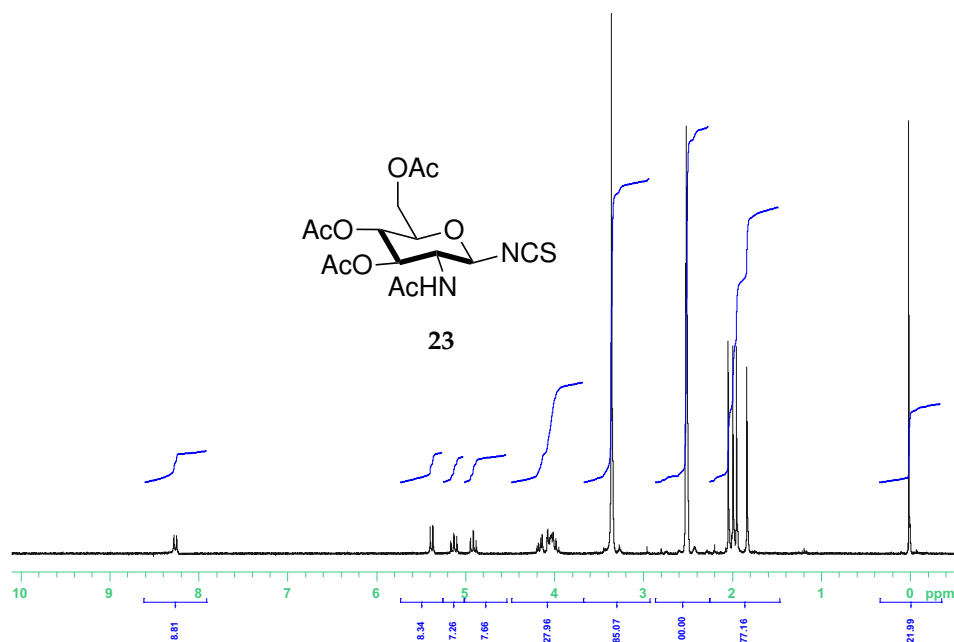
α -Chlor-*N*-Acetyl-3,4,6-tri-*O*-Acetylglucosamin (22) $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, 10 % Methanol- d_4 in CDCl_3)

ESI-MS (positiver Ionenmodus)

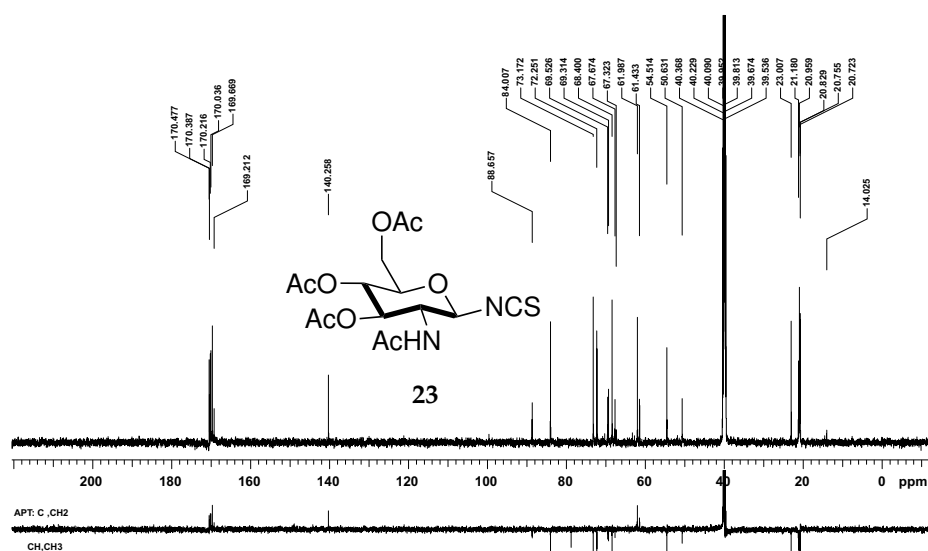


N-Acetyl-tri-3,4,6-*O*-Acetylglucosamino- α -isothiocyanat (23)

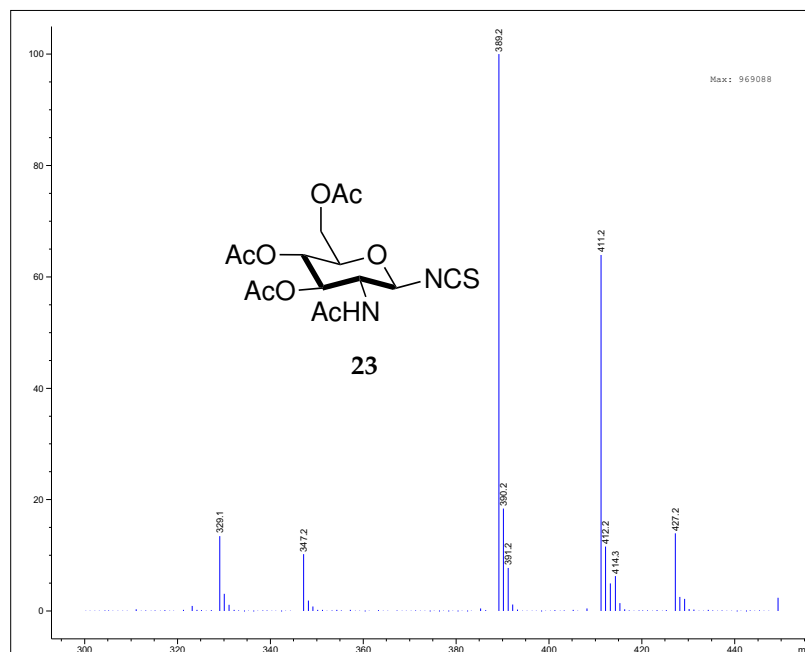
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

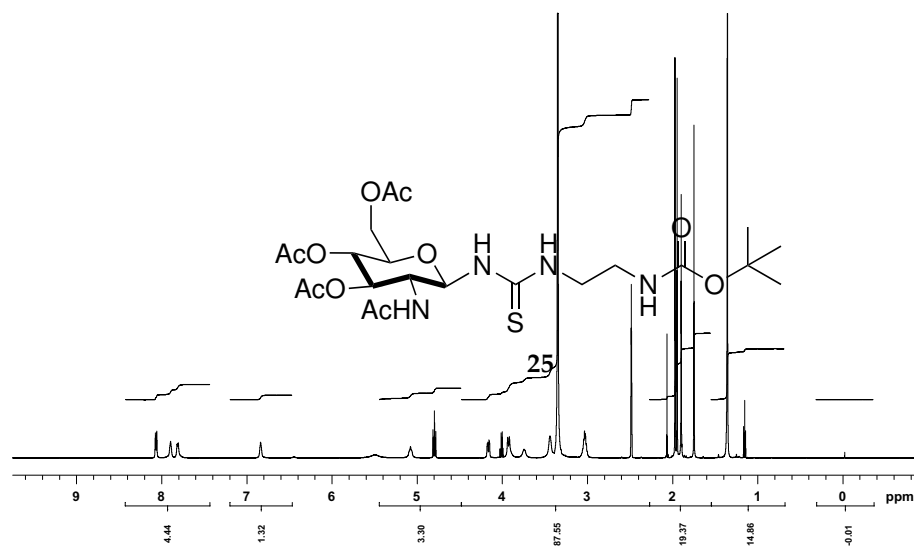


ESI-MS (positiver Ionenmodus)

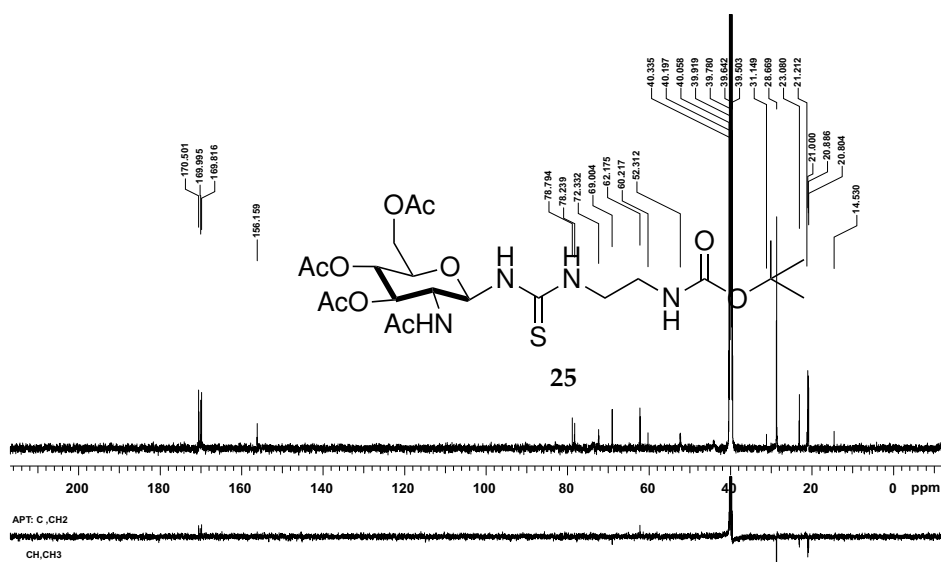


β -*N*-Boc-diaminoethylsulfocarbamido-*N*-Acetyl-3,4,6-tri-*O*-Acetylglucosamin (25)

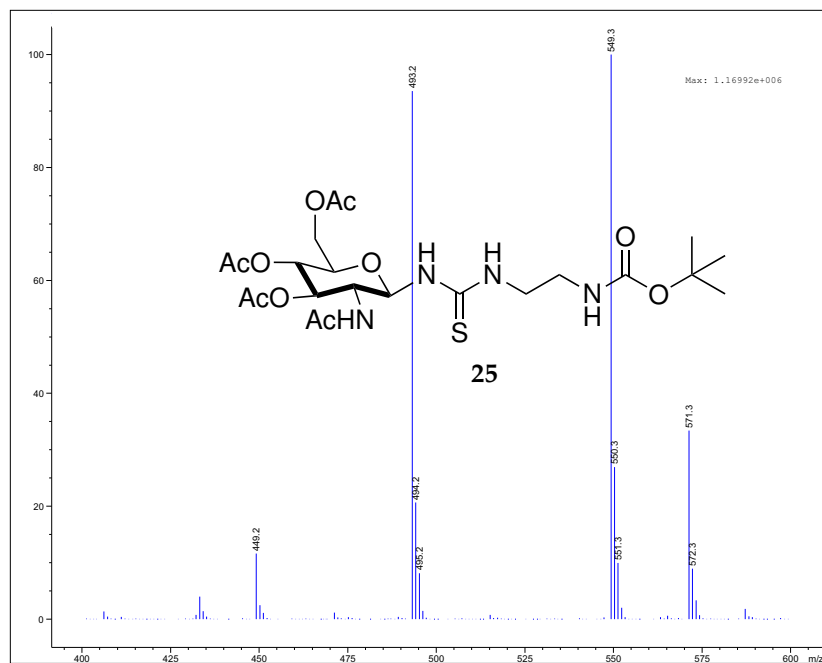
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

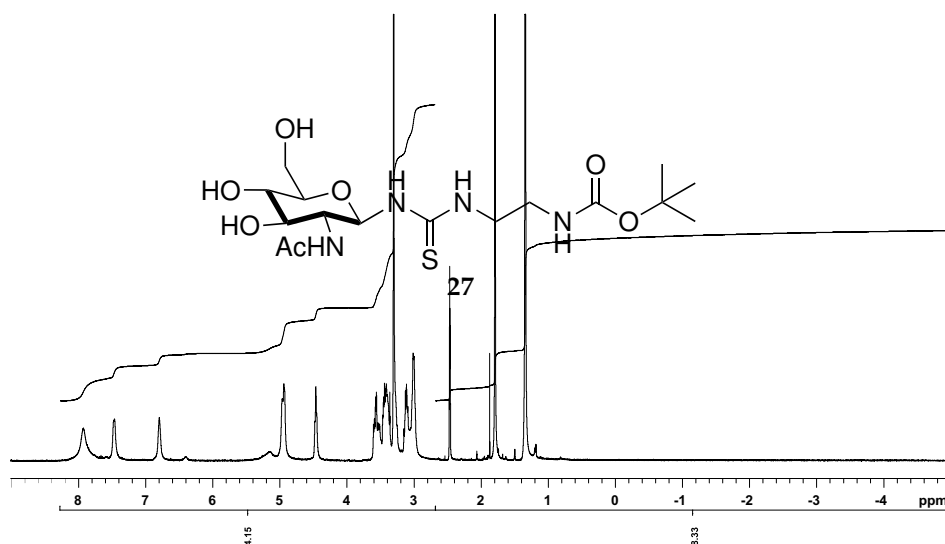


ESI-MS (positiver Ionenmodus)

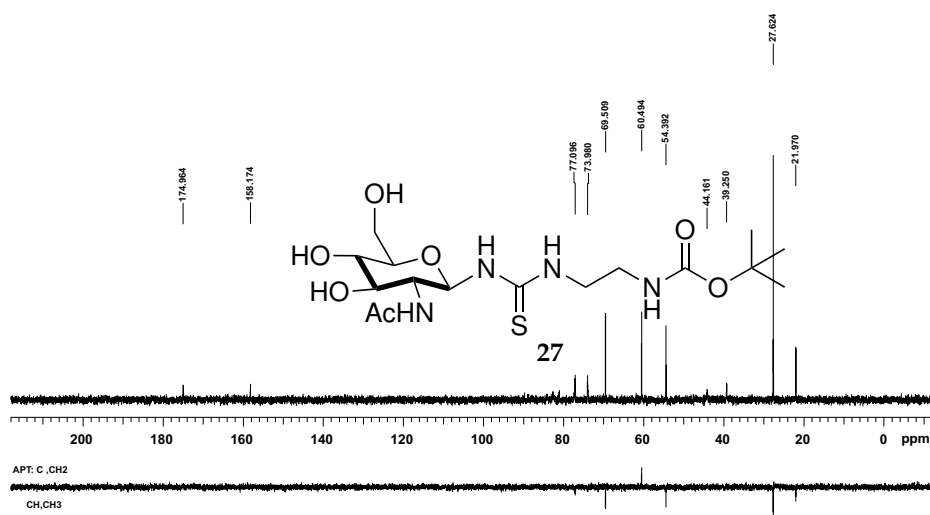


β -*N*-Boc-diaminoethylsulfocarbamido-*N*-Acetylglucosamin (27)

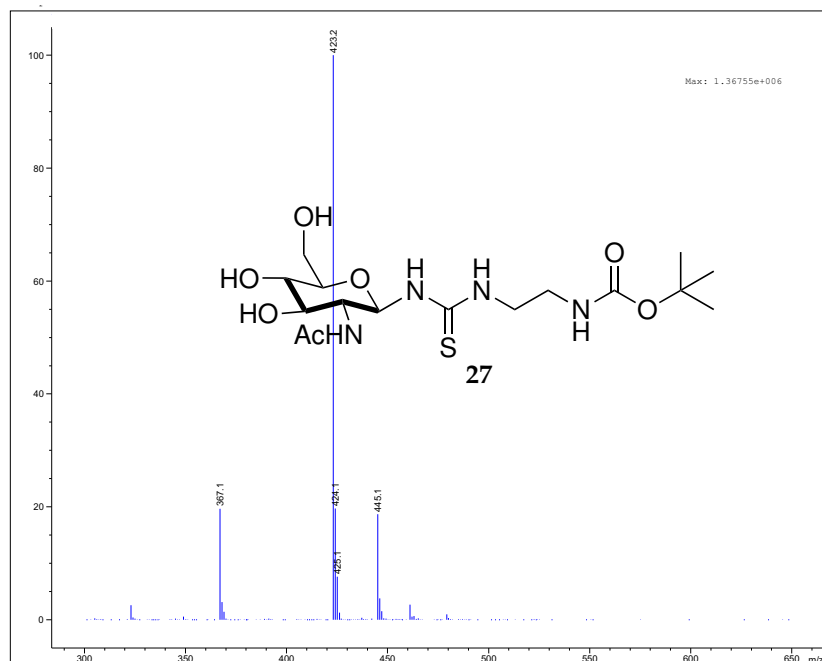
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O)



$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, D_2O)

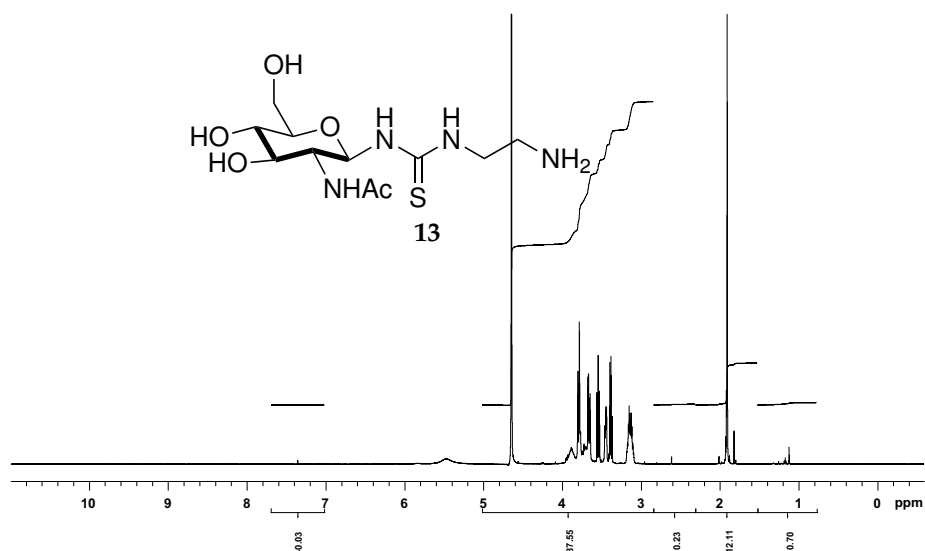


ESI-MS (positiver Ionenmodus)

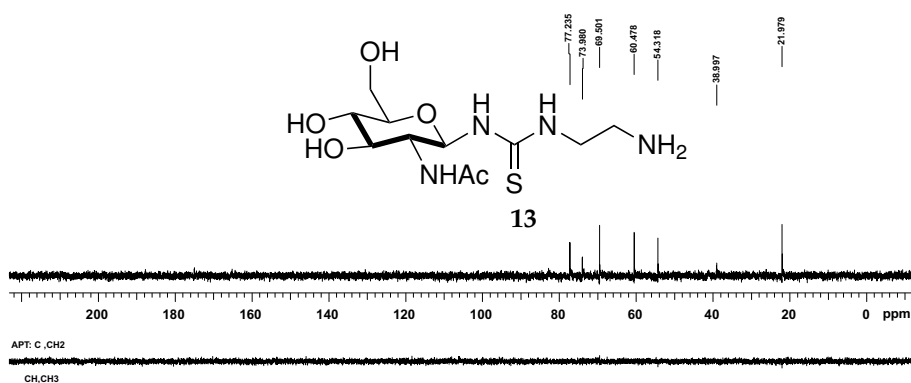


β -Diaminoethylsulfocarbamido-*N*-Acetylglucosamin (13)

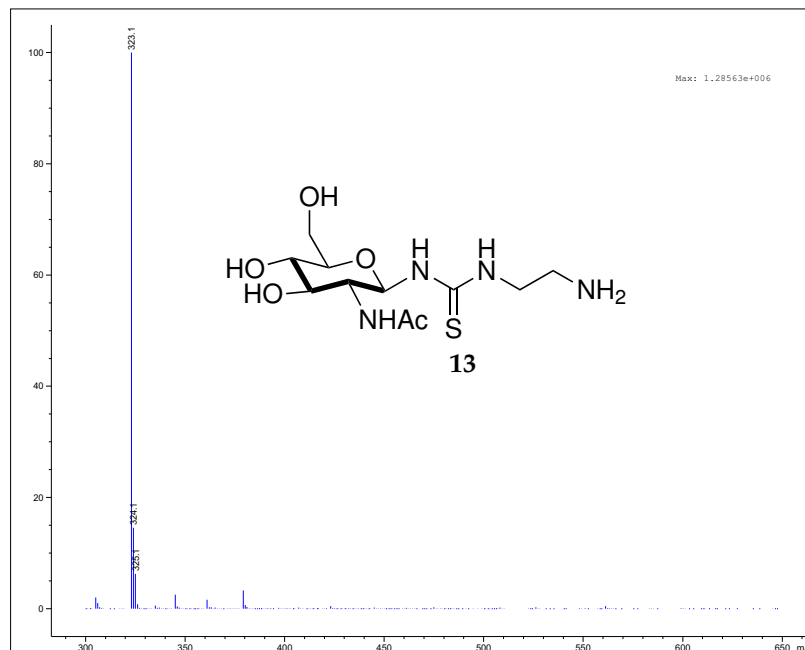
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O)



$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, D_2O)

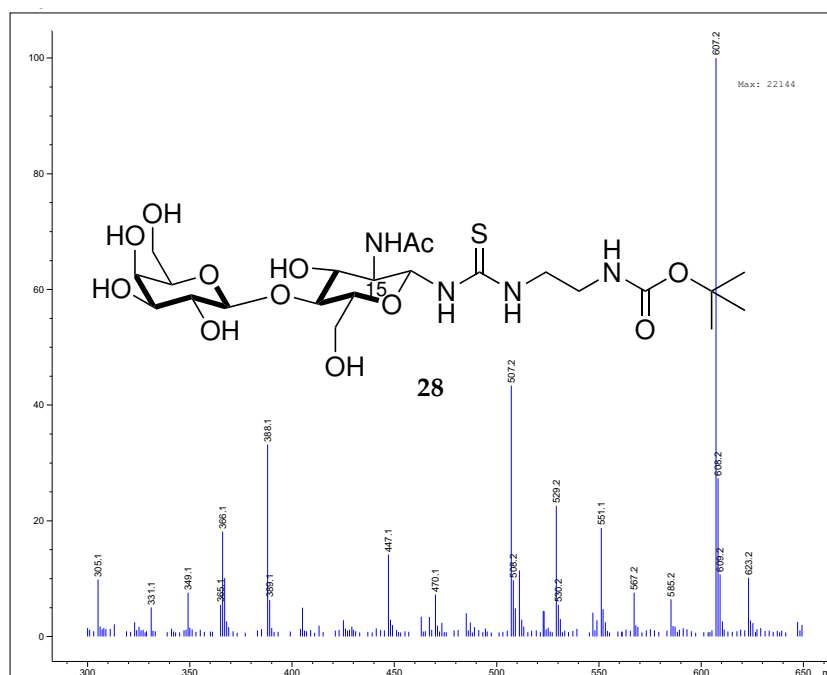


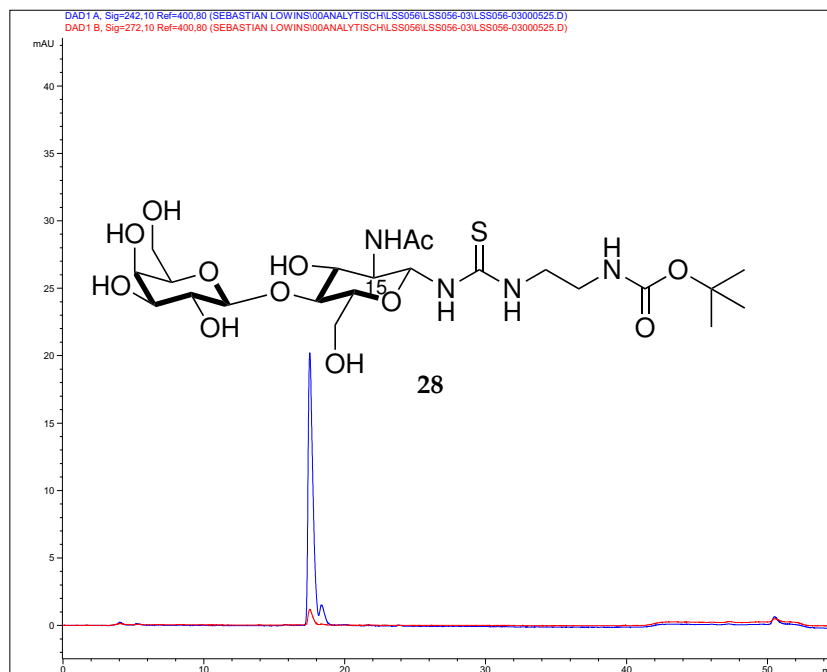
ESI-MS (positiver Ionenmodus)



β -*N*-Boc-diaminoethylsulfocarbamido-*N*-Acetyllactosamin (28)

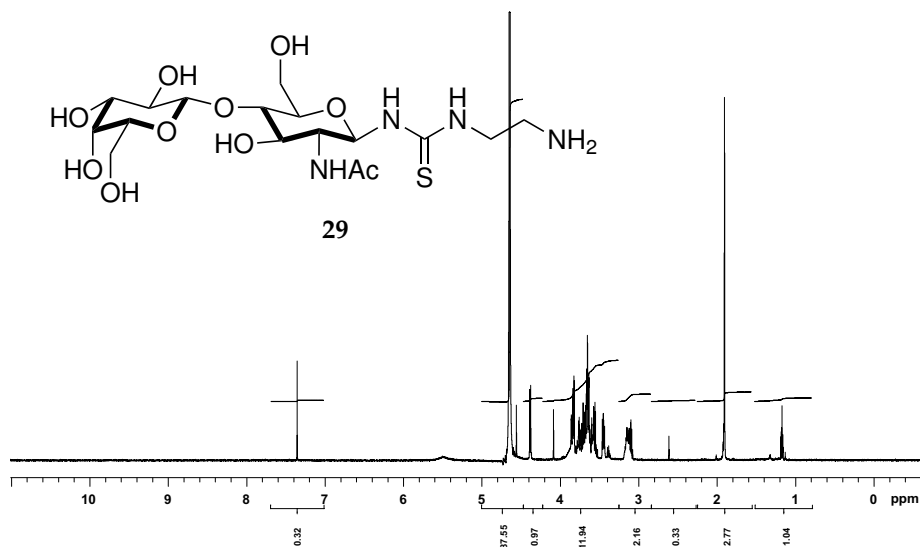
ESI-MS (positiver Ionenmodus)



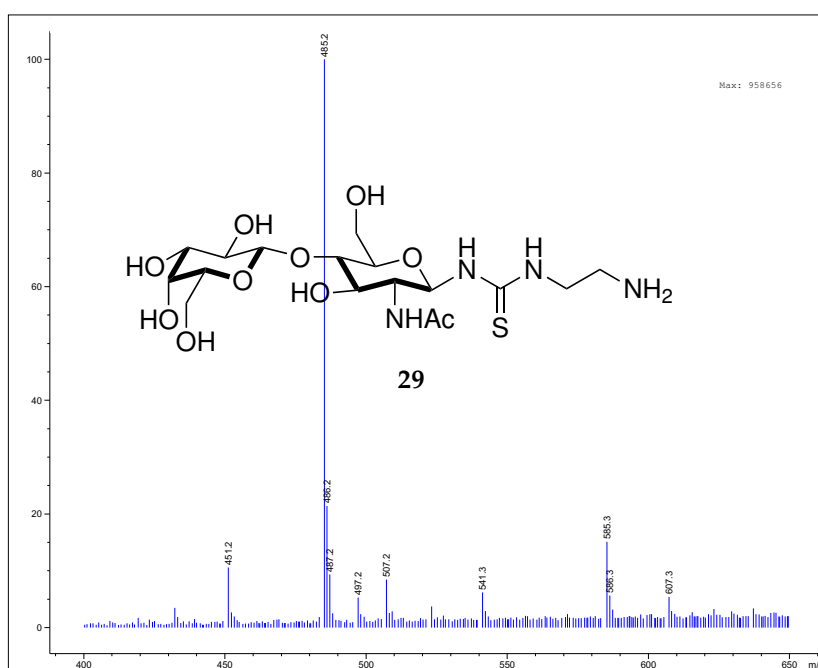
HPLC, *reversed phase*, Gradient 1, Kapitel 6.1.3.1, Tabelle 2

β -Diaminoethylsulfocarbamido-*N*-Acetylactosamin (29)

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O)

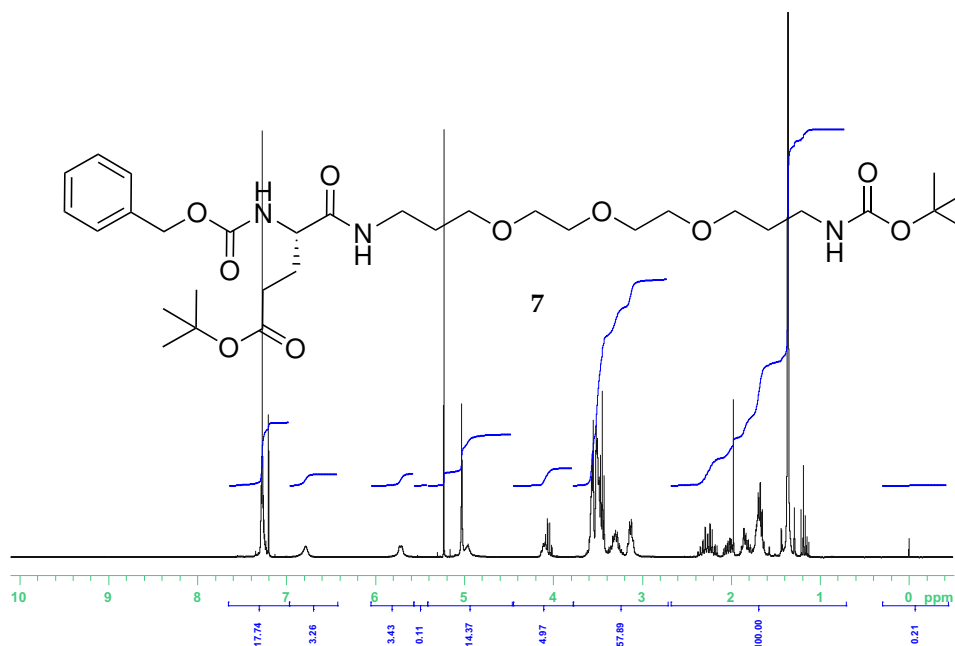


ESI-MS (positiver Ionenmodus)

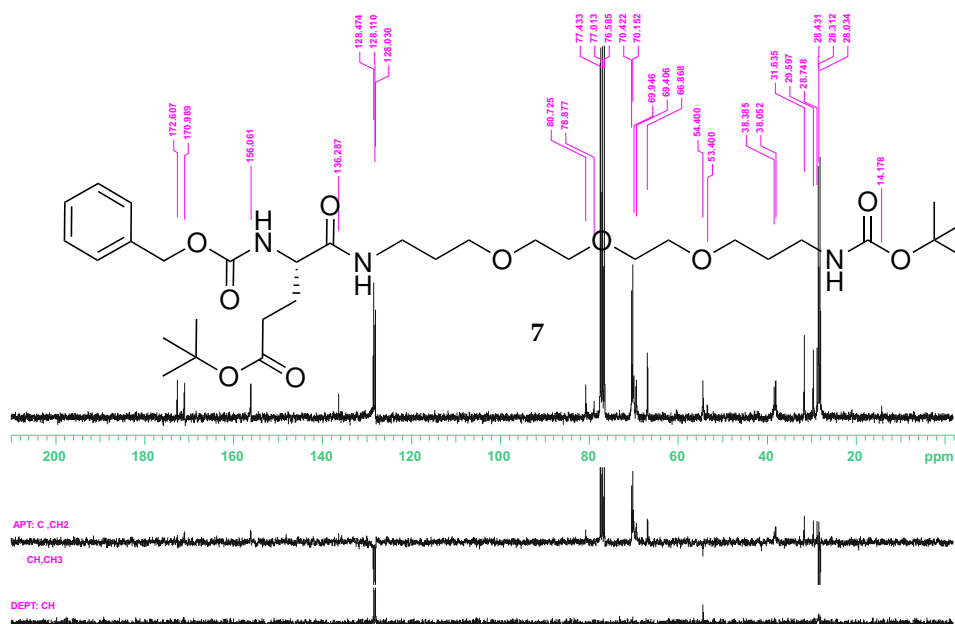


N-(*Z*)-(*S*)-Glu(*O**t*Bu)-*N*'-Boc-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan (7)

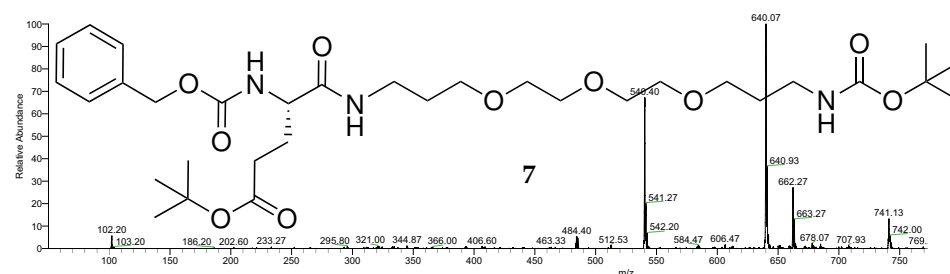
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)



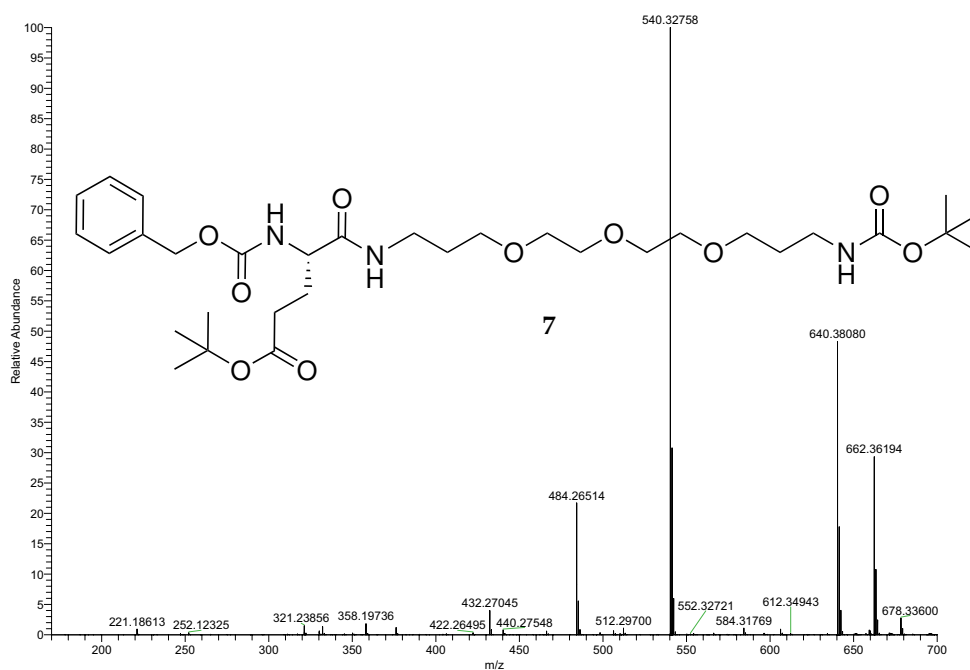
$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3)



ESI-MS (positiver Ionenmodus)

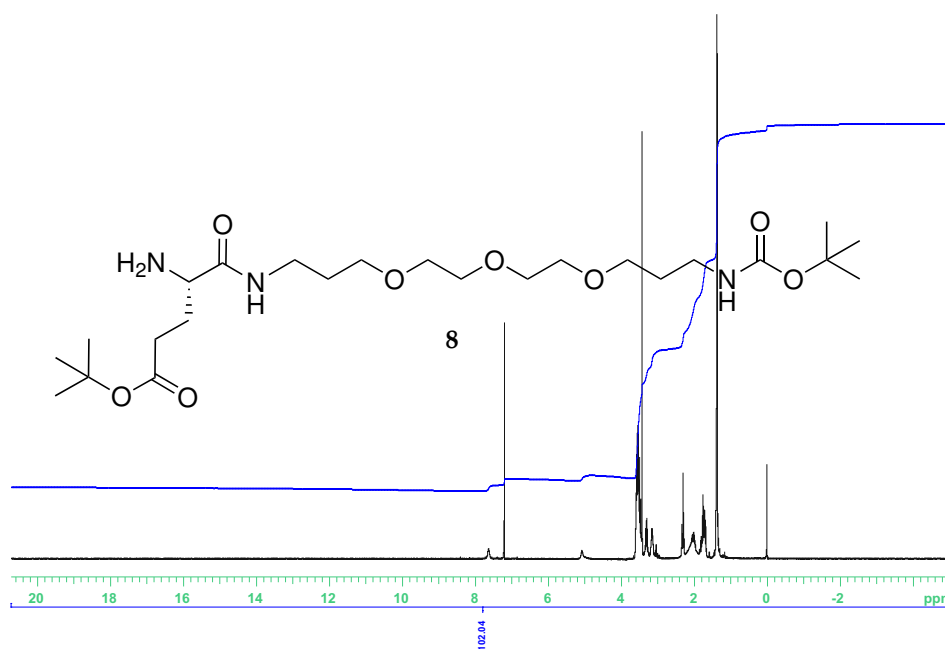


ESI-FTMS, pos.

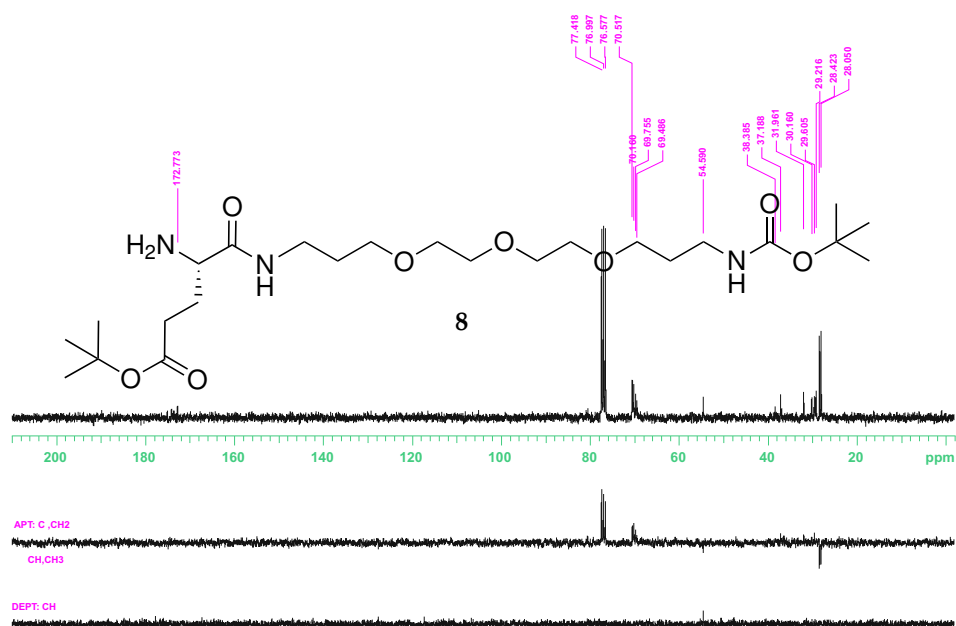


H-(S)-Glu(OtBu)-N-Boc-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan (8)

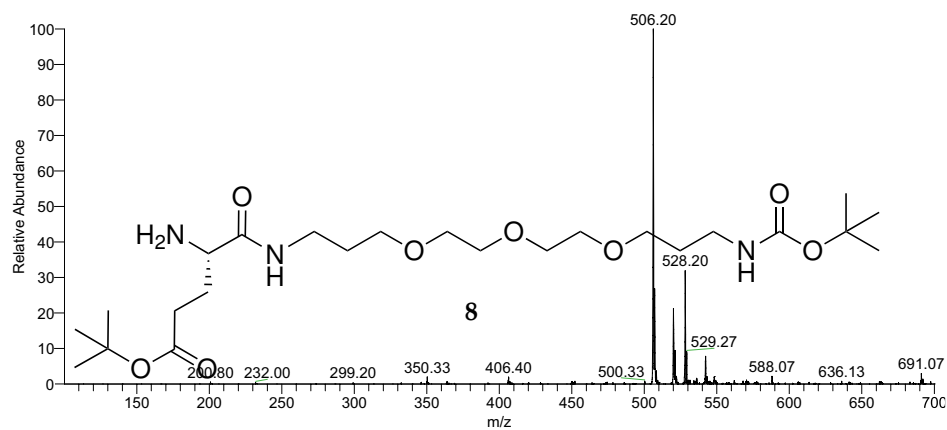
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3)



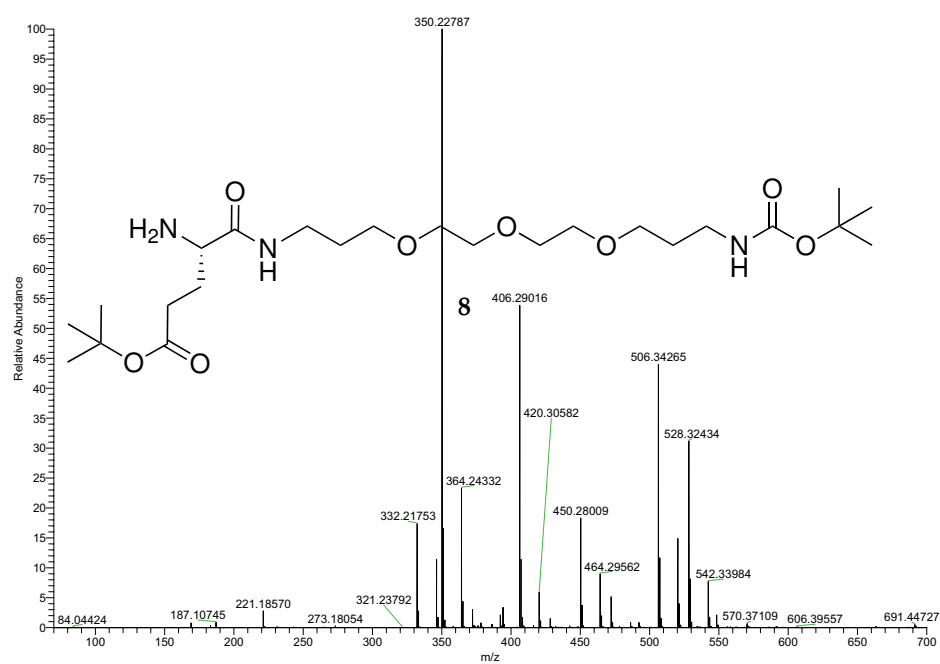
$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3)



ESI-MS (positiver Ionenmodus)

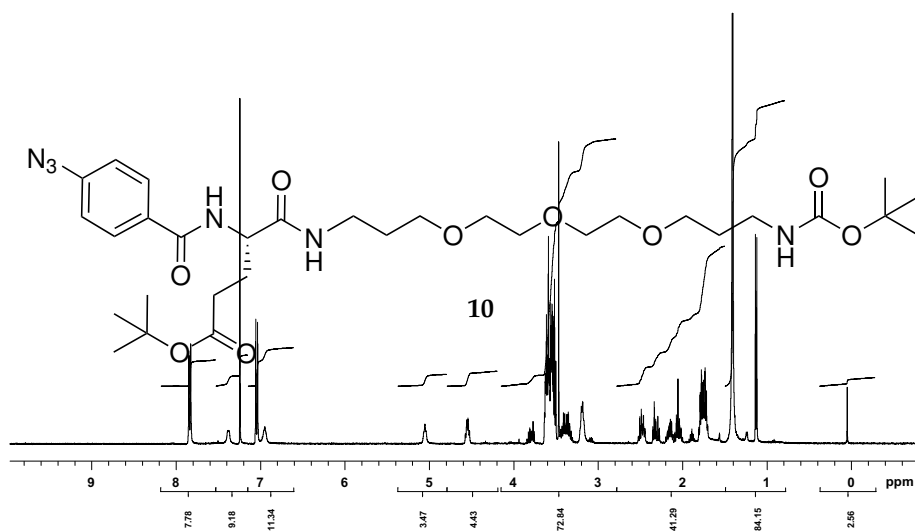


ESI-FTMS, pos.

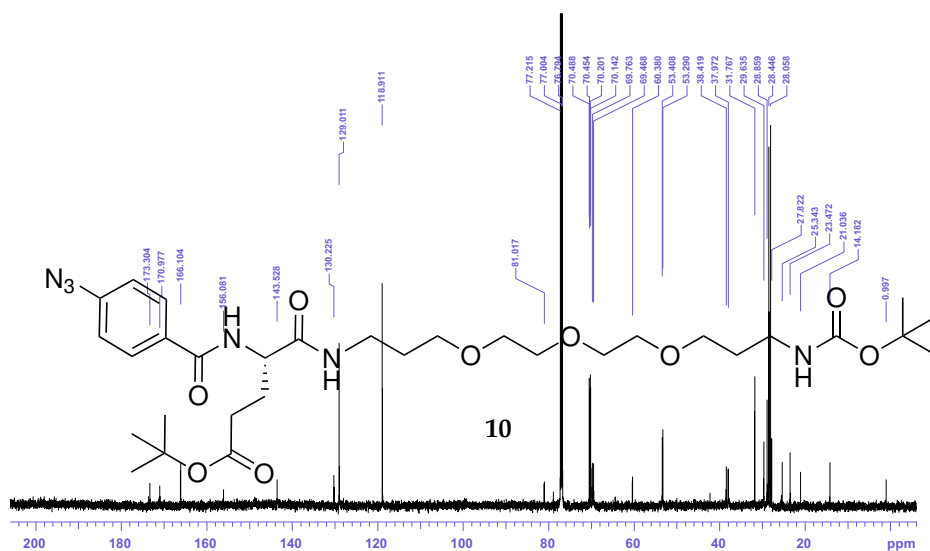


N-(4-azidobenzamido)-(*S*)-Glu(*O**t*Bu)-*N'*-Boc-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan (10)

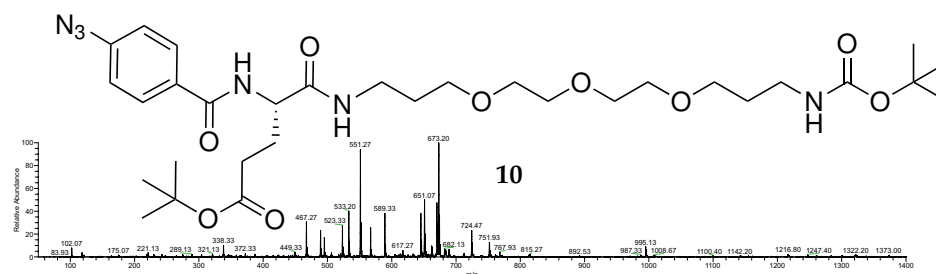
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)



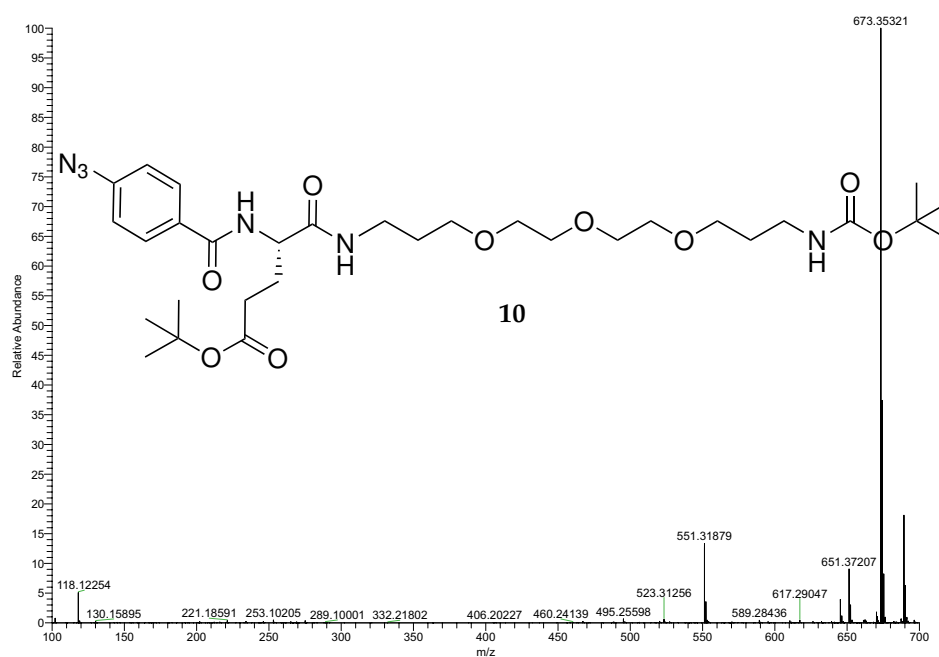
$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3)

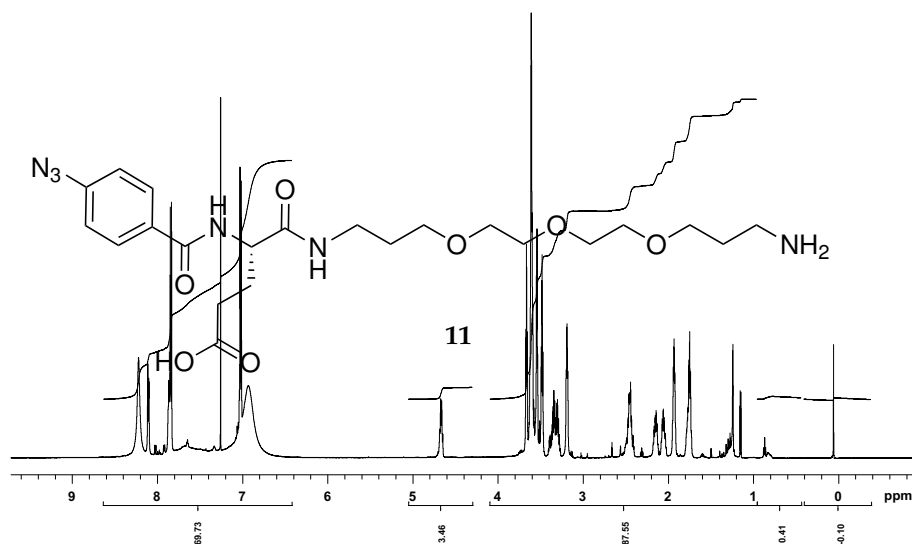
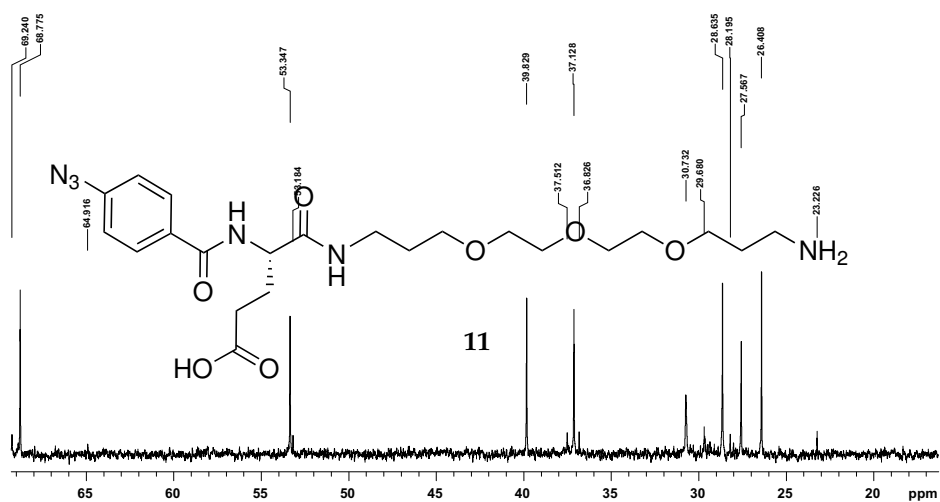


ESI-MS (positiver Ionenmodus)

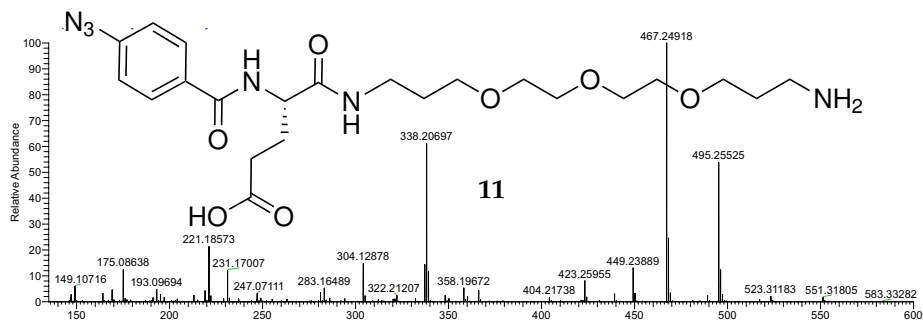


ESI-FTMS, pos.

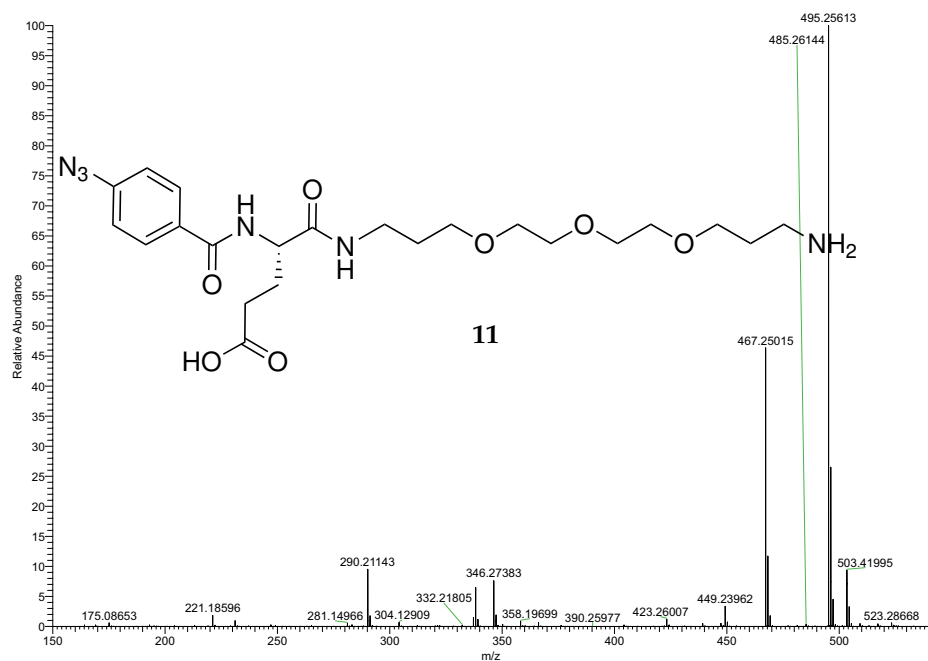


¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃)¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃)

ESI-MS (positiver Ionenmodus)

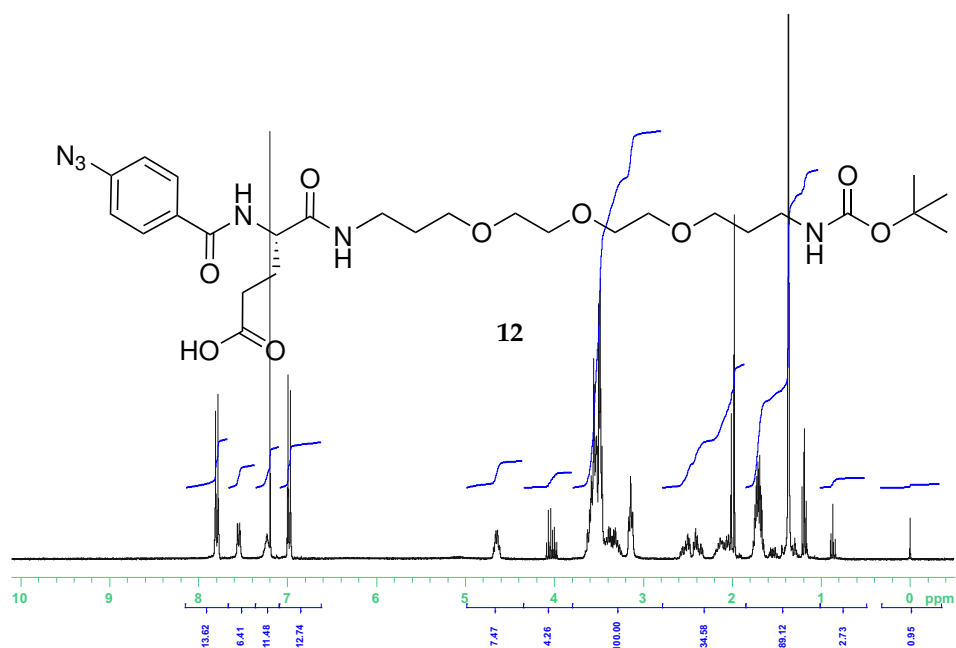


ESI-FTMS, pos.



N-(4-Azidobenzamido)-(*S*)-Glu-*N'*-Boc-1,13-diamino-4,7,10,tri-oxatridecan (12)

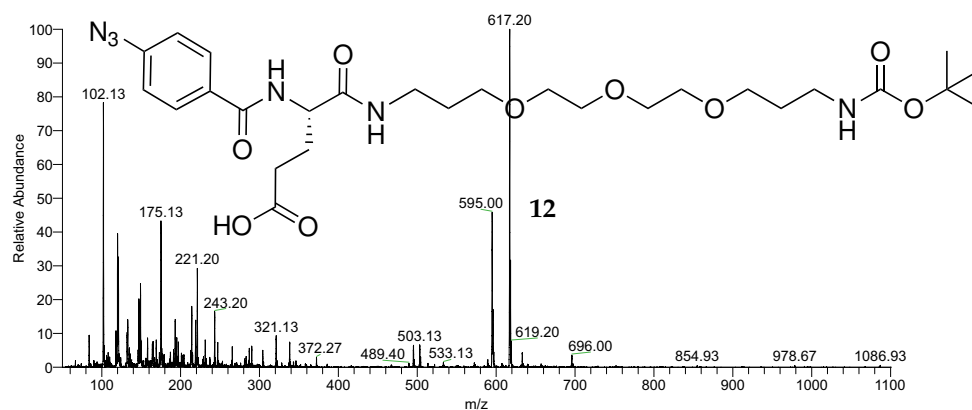
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3)



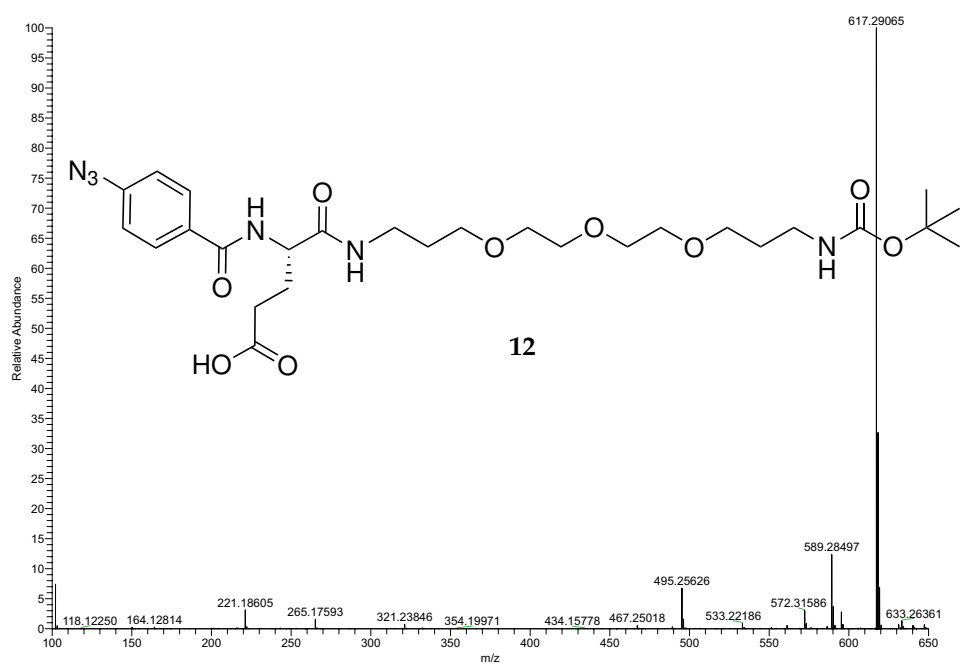
$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3)



ESI-MS (positiver Ionenmodus)

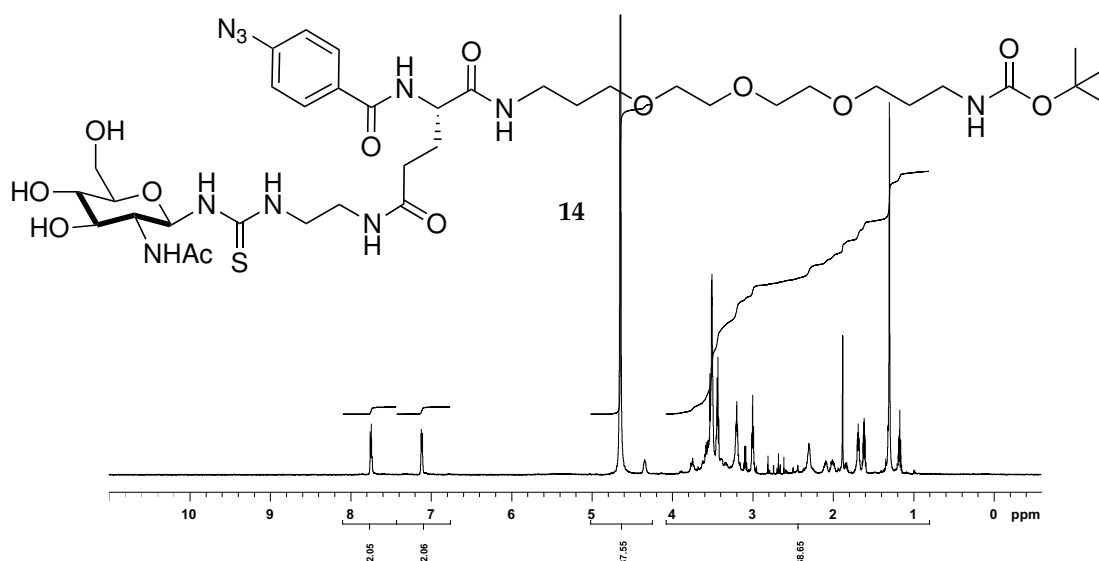


ESI-FTMS, pos.

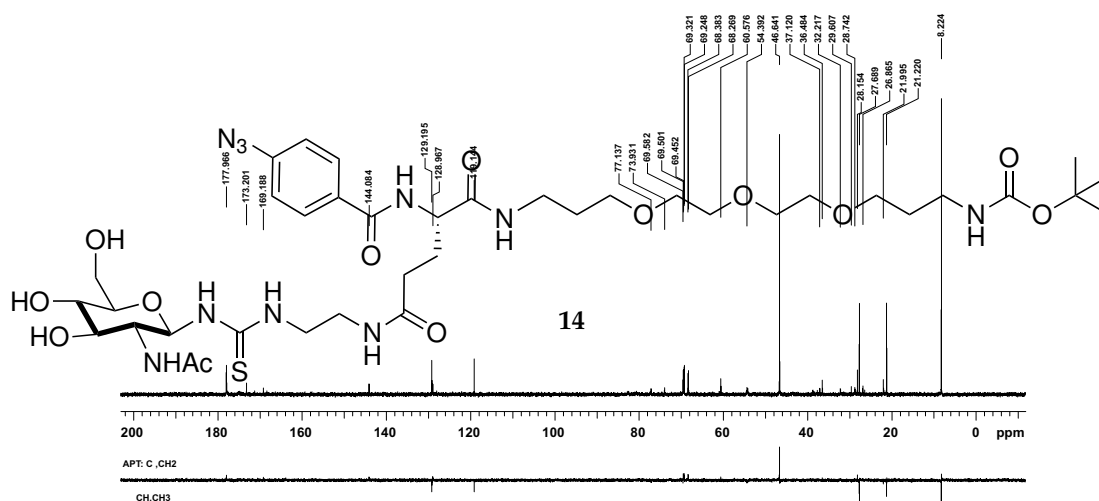


***N*-(4-Azidobenzamido)-(*S*)-Glu-O**
(β -Diaminoethylsulfocarbamido-*N*-Acetylglucosamino)-
***N'*-Boc-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan (14)**

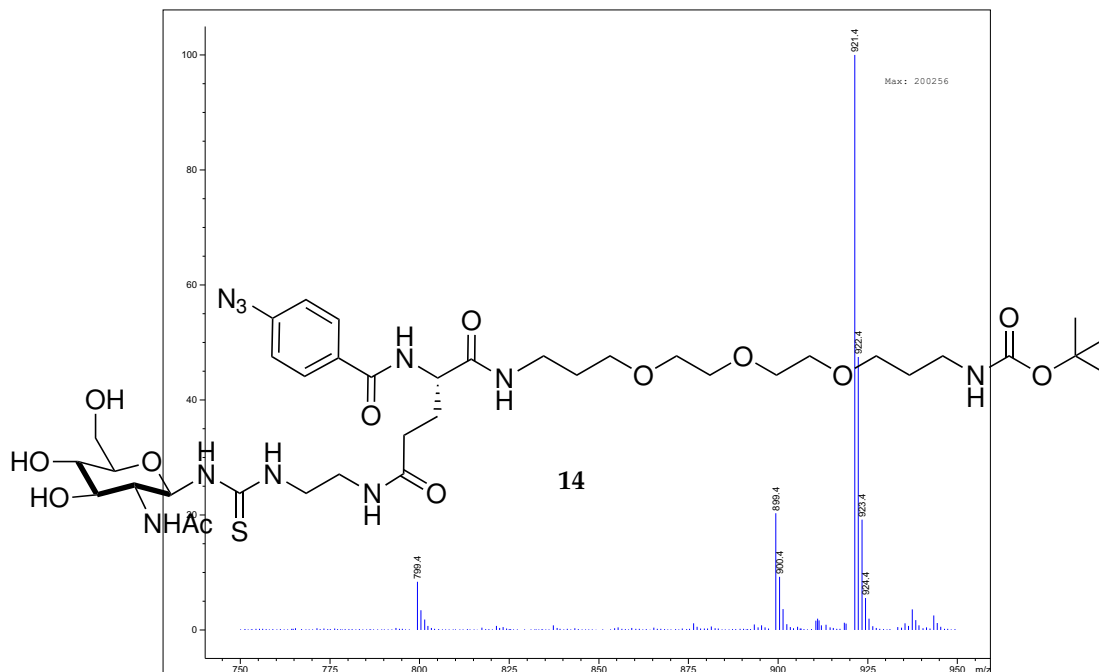
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O)



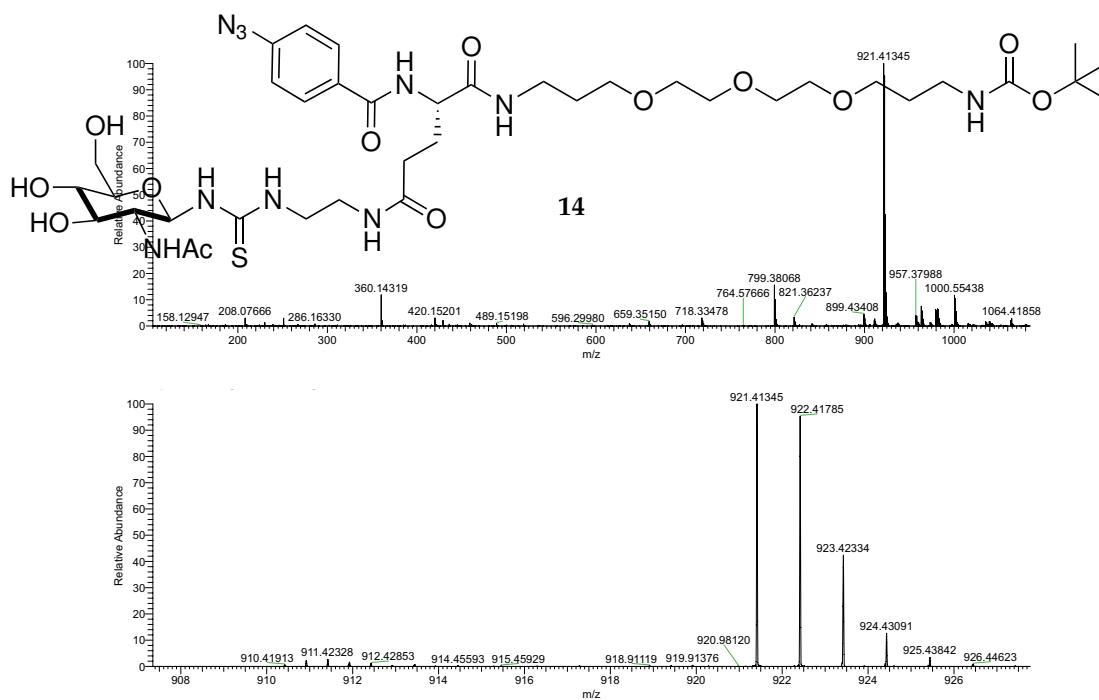
$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, D_2O)



ESI-MS (positiver Ionenmodus)

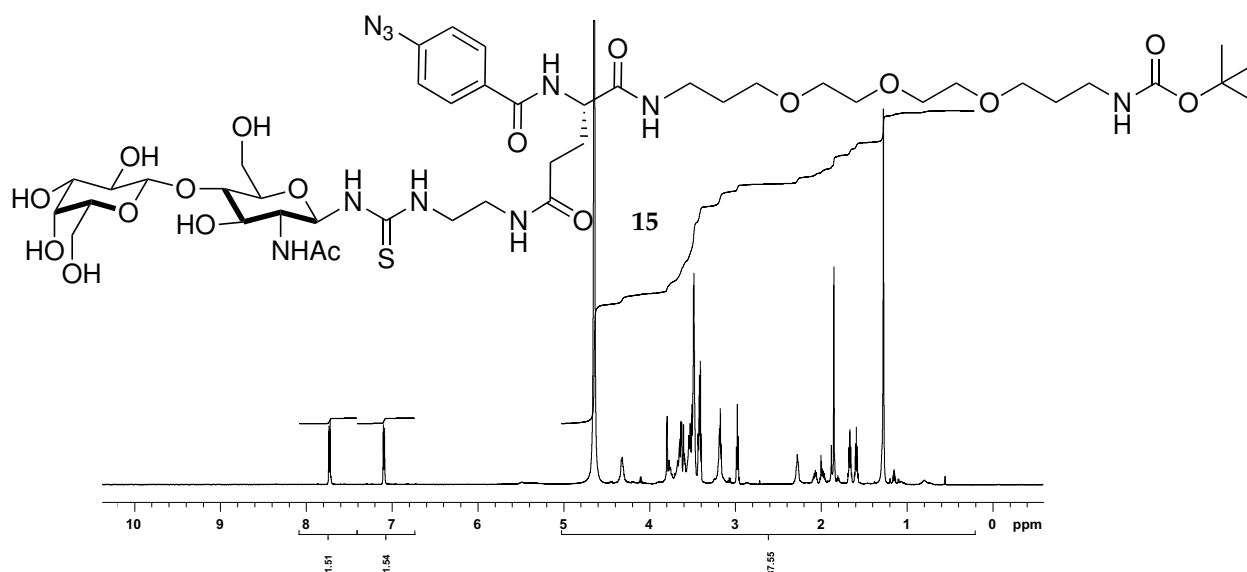


ESI-FTMS, pos.

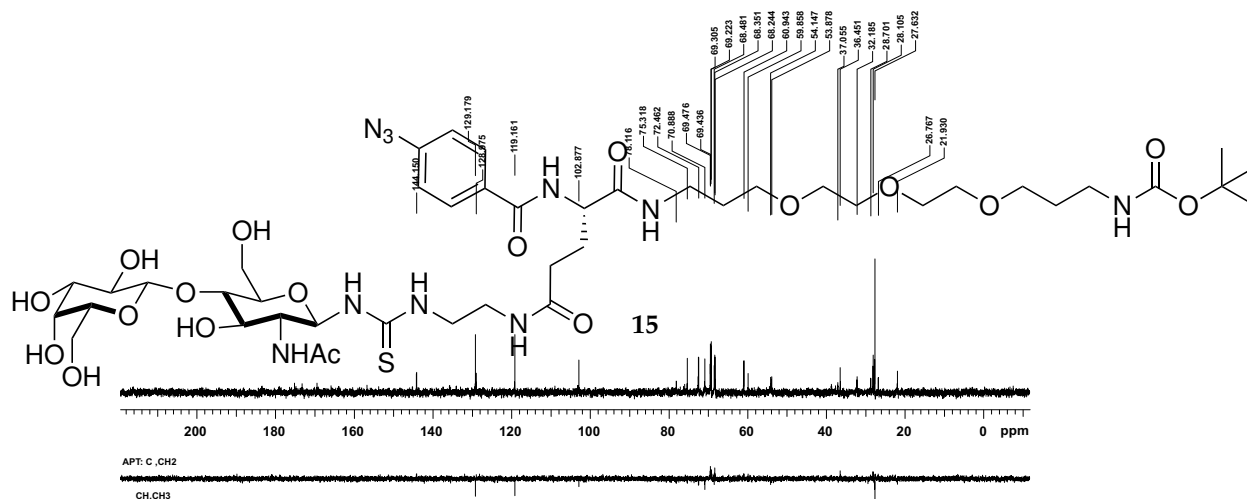


***N*-(4-Azidobenzamido)-(*S*)-Glu-O**
(β -Diaminoethylsulfocarbamido-*N*-Acetyllactosamino)-
***N'*-Boc-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan (15)**

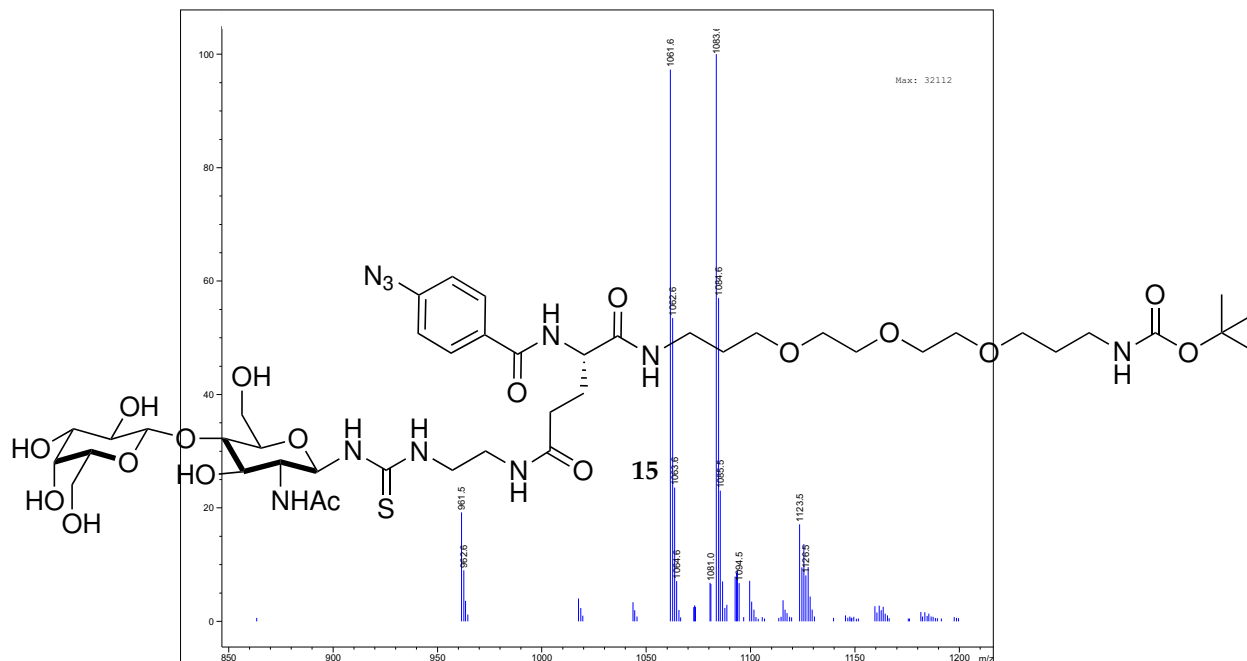
¹H-NMR (600 MHz, D₂O)



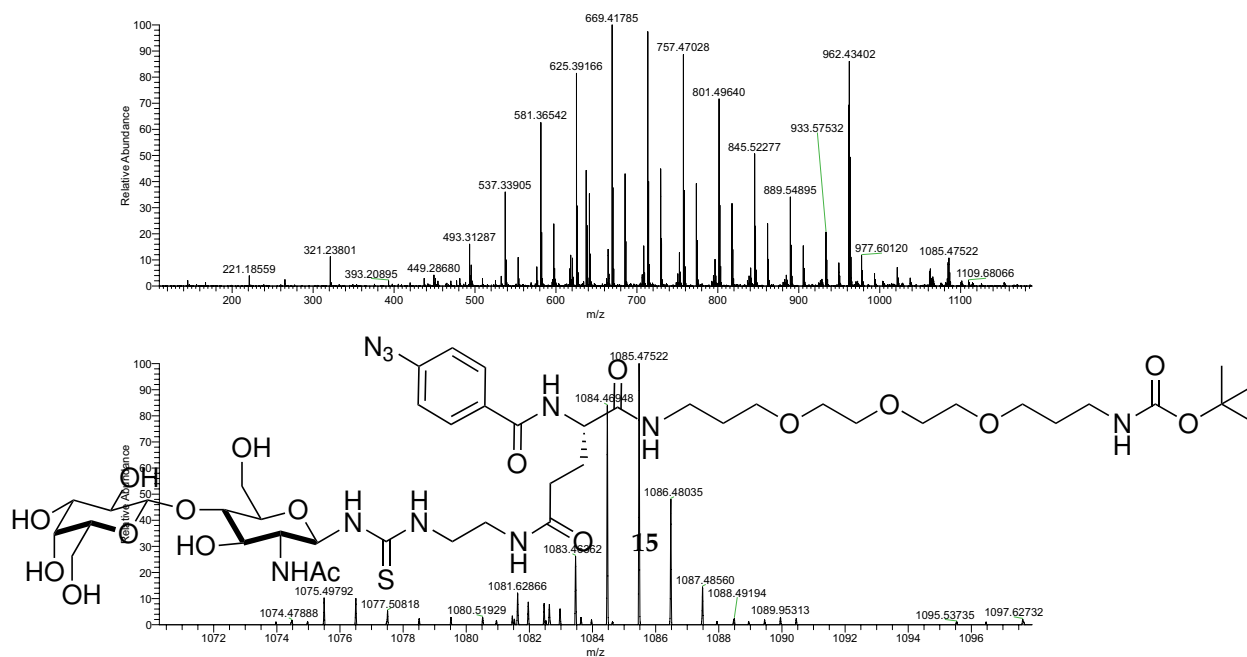
¹³C-NMR (150 MHz, D₂O)



ESI-MS (positiver Ionenmodus)

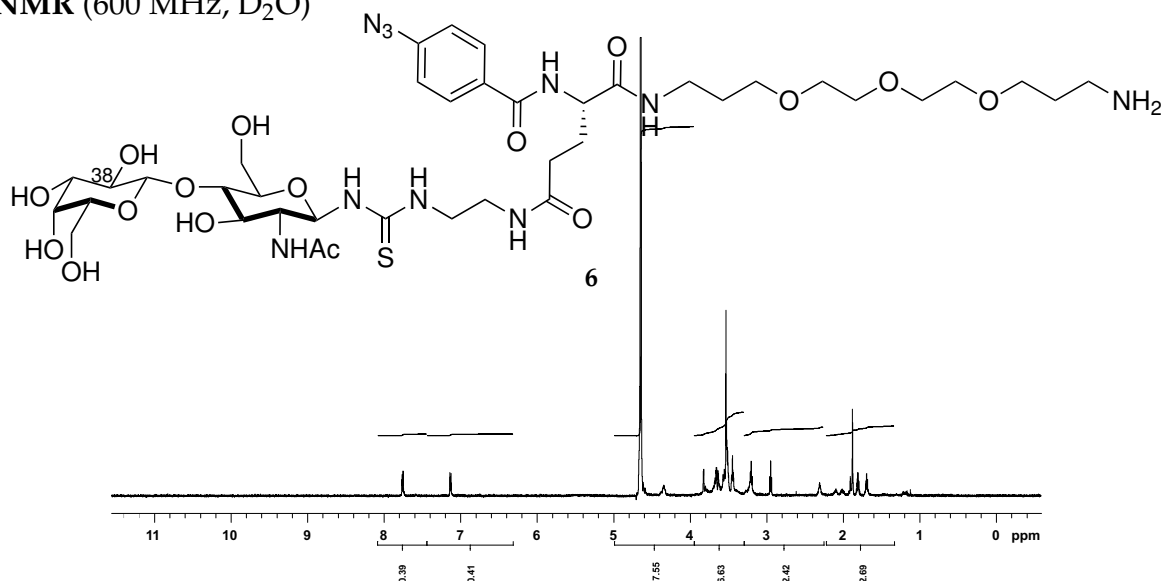


ESI-FTMS, pos.

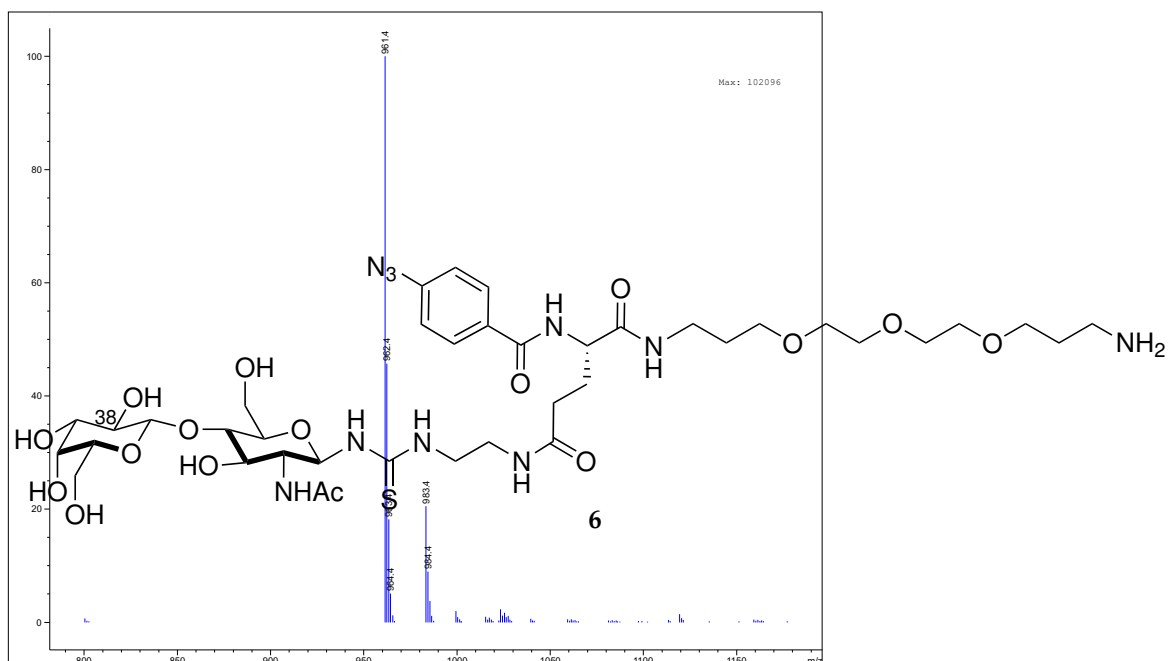


***N*-(4-Azidobenzamido)-(*S*)-Glu-O**
(β -Diaminoethylsulfocarbamido-*N*-Acetyllactosamino)-
***N'*-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan (6)**

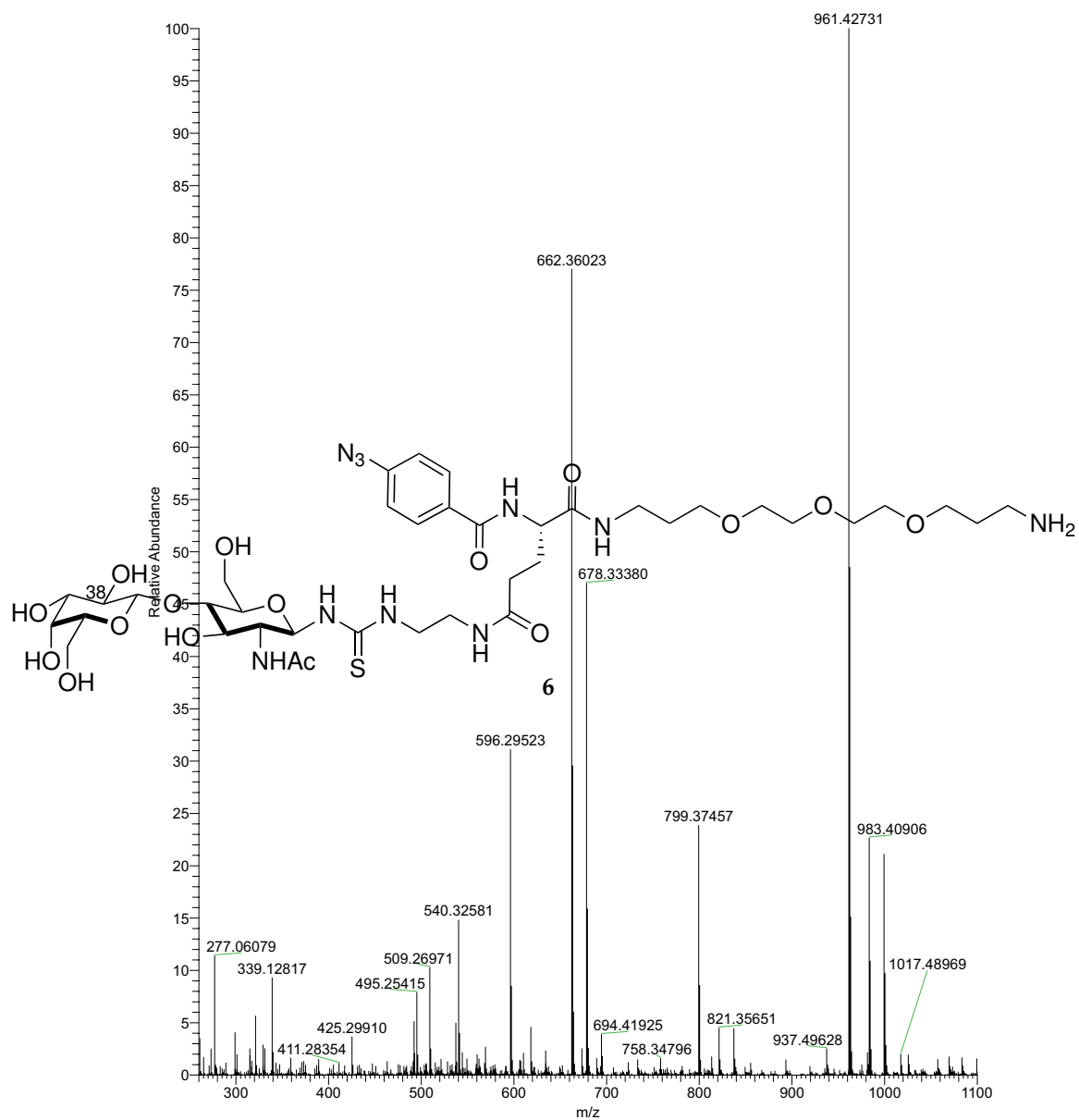
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O)



ESI-MS (positiver Ionenmodus)

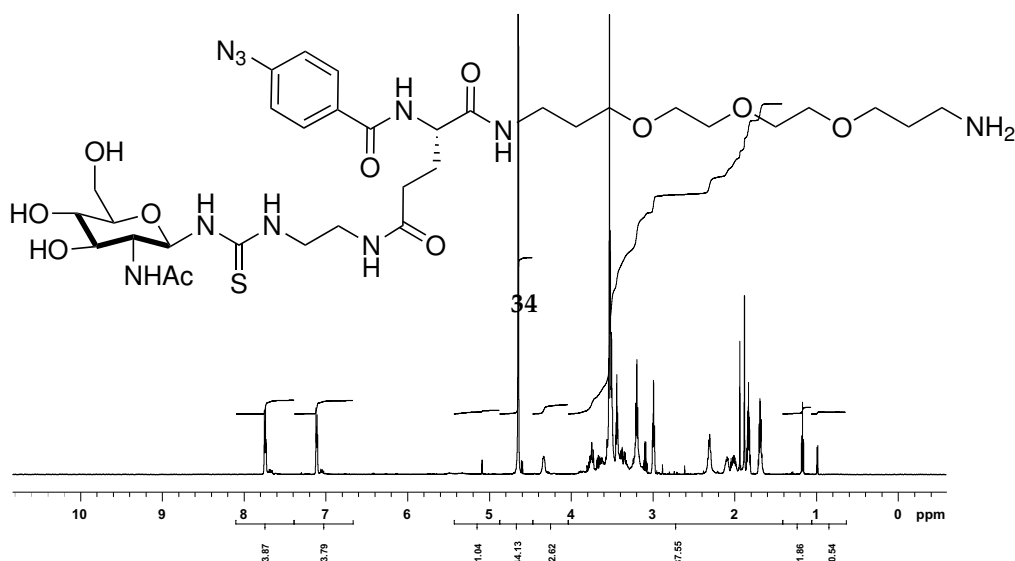


ESI-FTMS, pos.

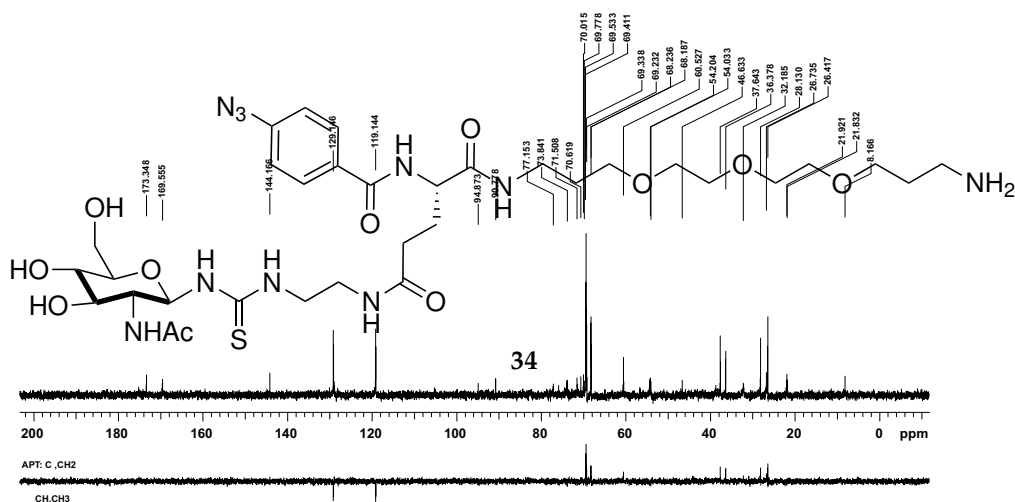


N-(4-Azidobenzamido)-(*S*)-Glu-O
(β -Diaminoethylsulfocarbamido-*N*-Acetylglucosamino)-
N'-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan (34)

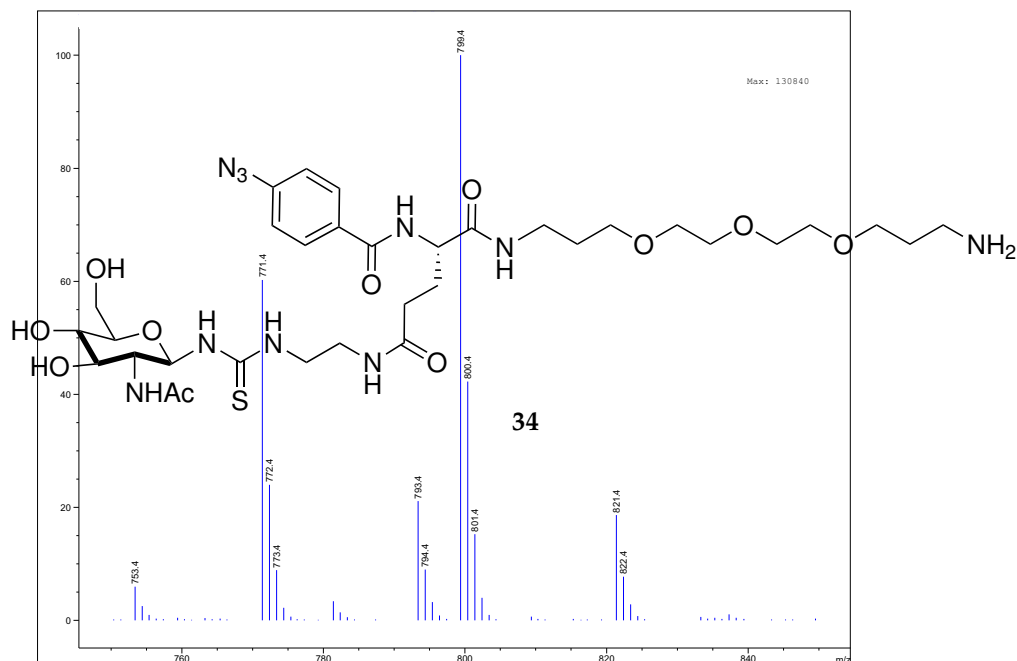
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O)



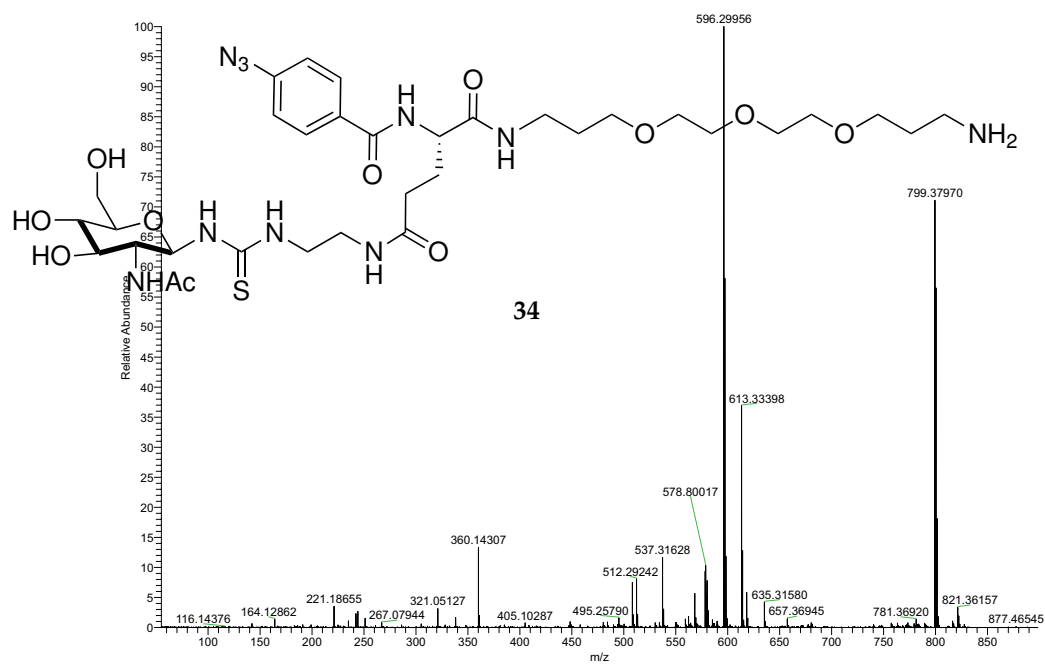
$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, D_2O)



ESI-MS (positiver Ionenmodus)

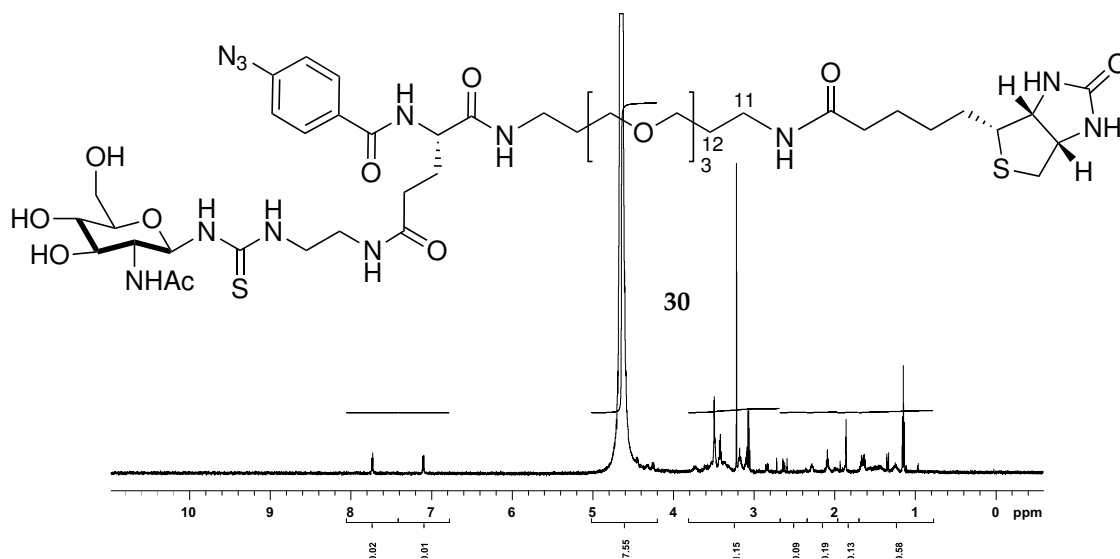


ESI-FTMS, pos.

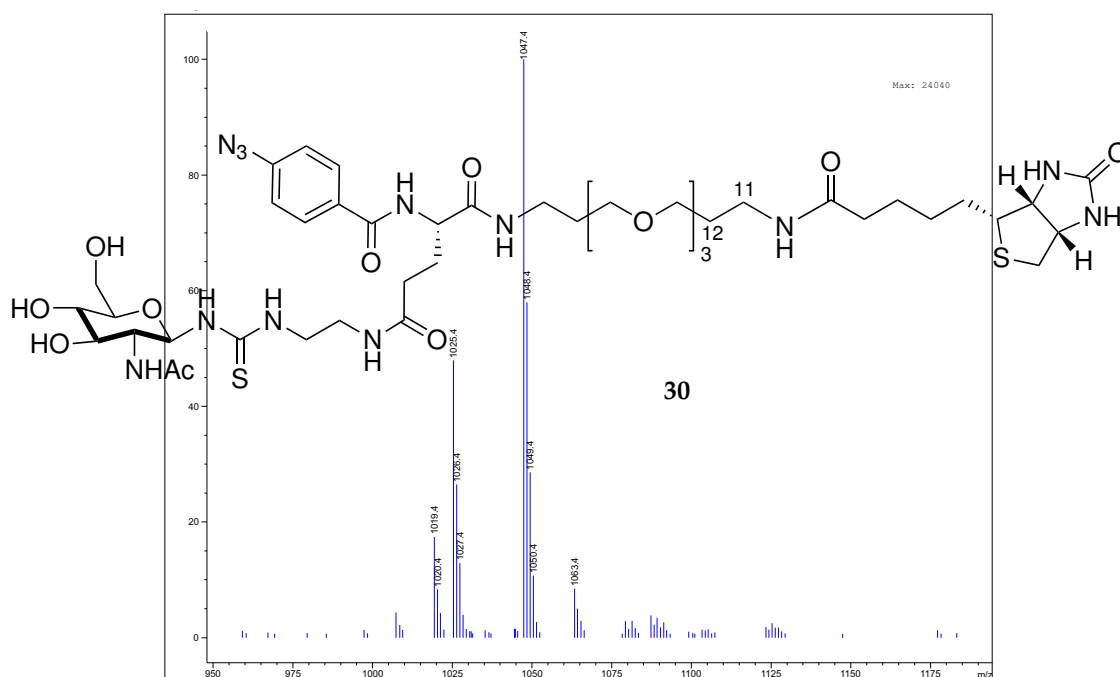


N-(4-Azidobenzamido)-(*S*)-Glu-O(β -Diaminoethylsulfocarbamido-*N*-Acetyllactosamino)-*N'*-biotinyl-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan (30)

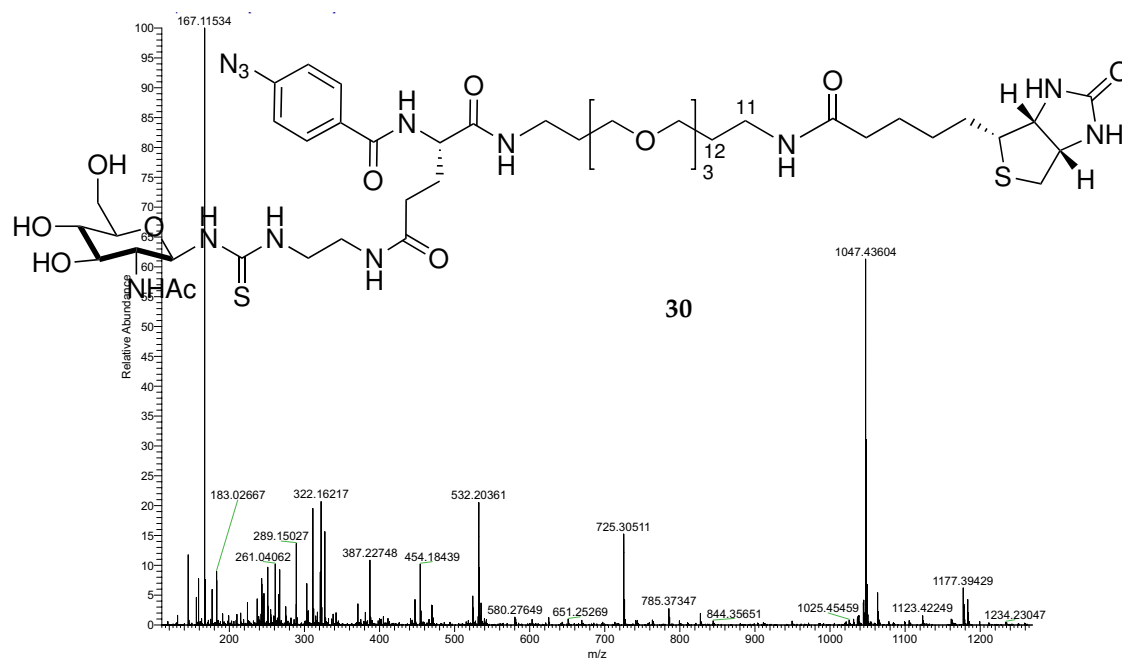
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O)

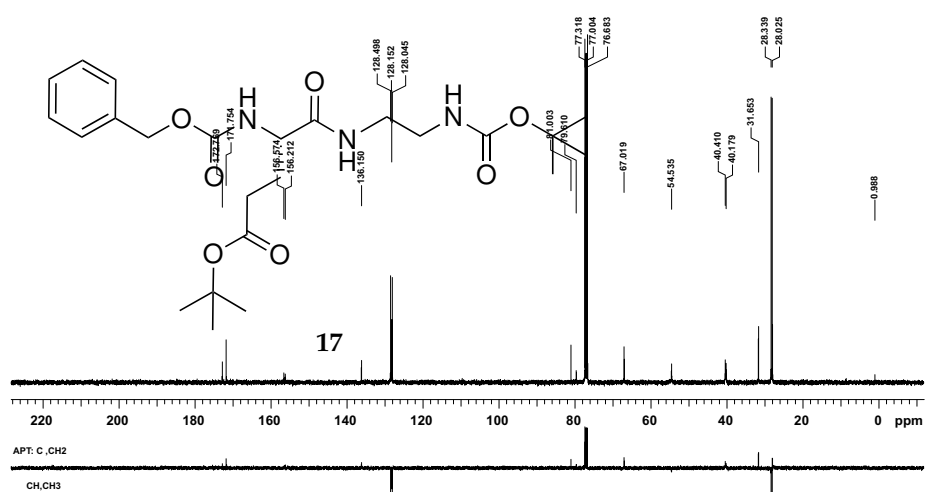


ESI-MS (positiver Ionenmodus)

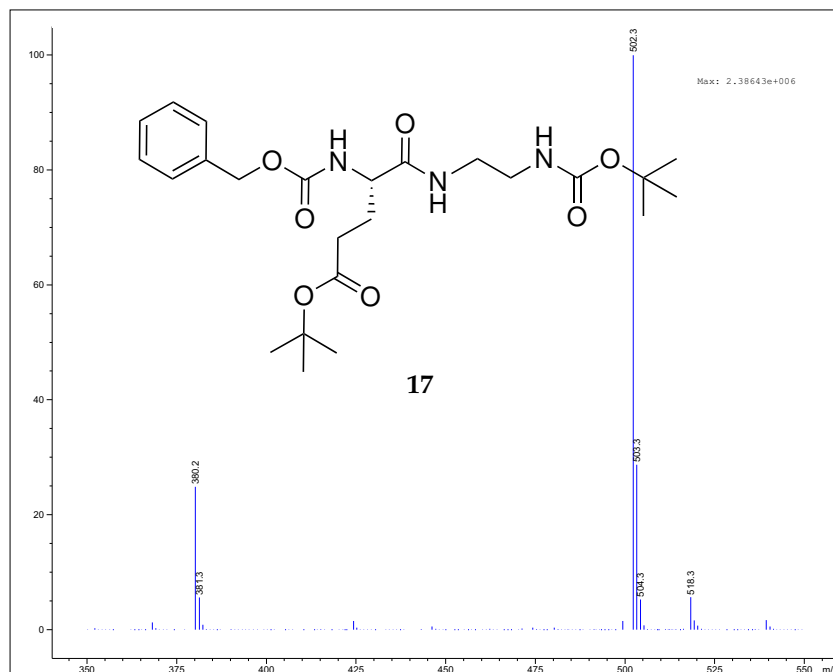


ESI-FTMS, pos.

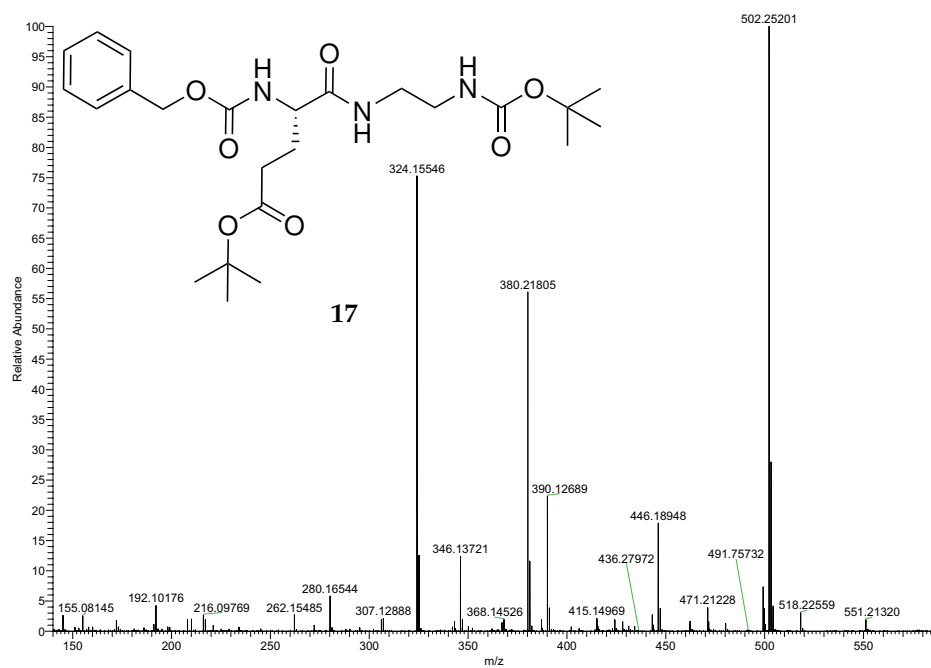


¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)

ESI-MS (positiver Ionenmodus)

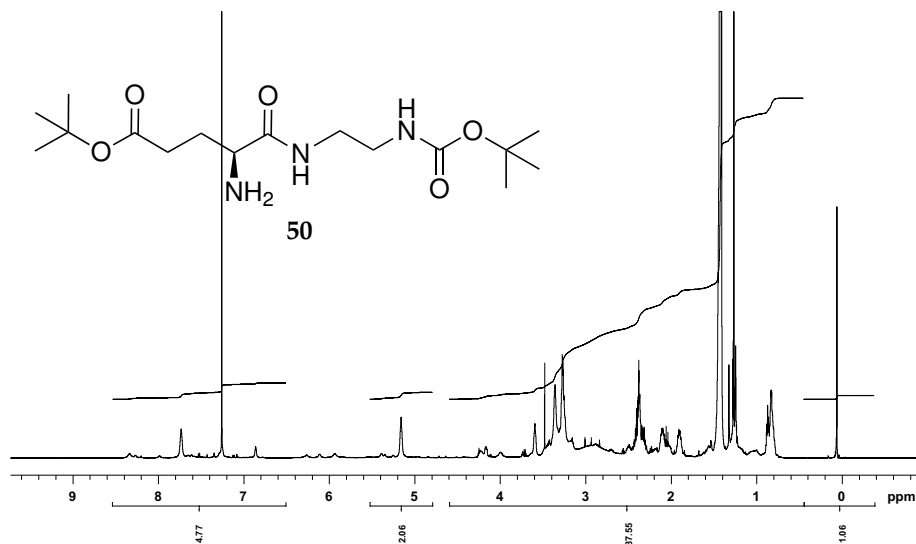


ESI-FTMS, pos.

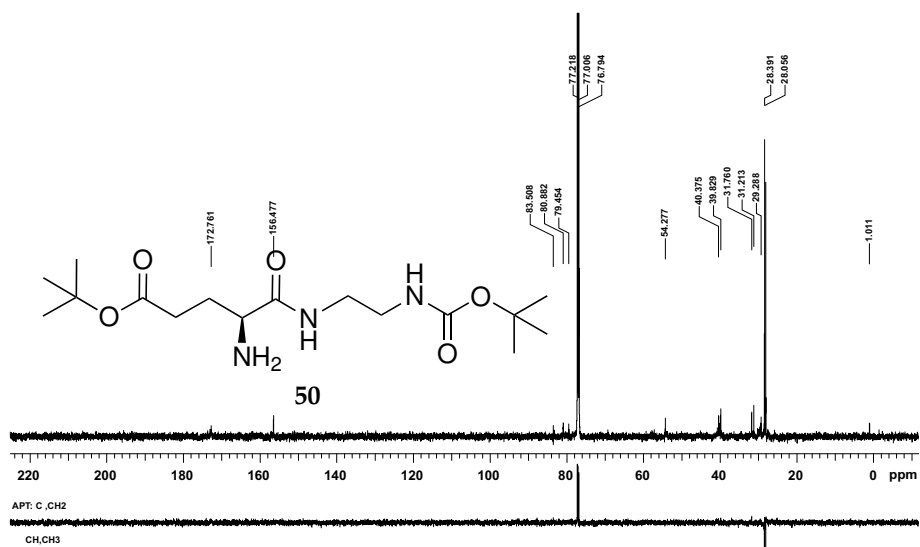


H-(*S*)-Glu(*O**t*Bu)-*N*'-Boc-diaminoethan (50)

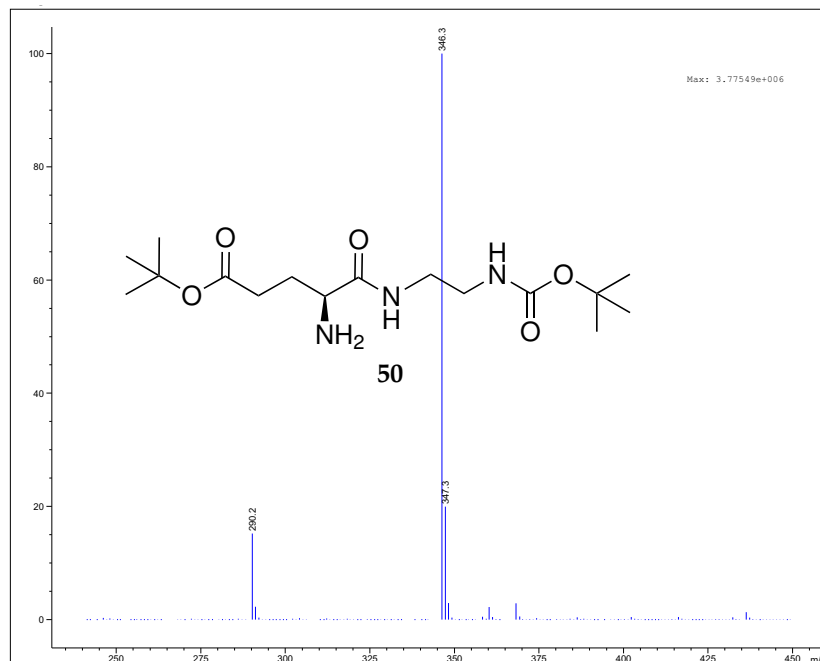
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)



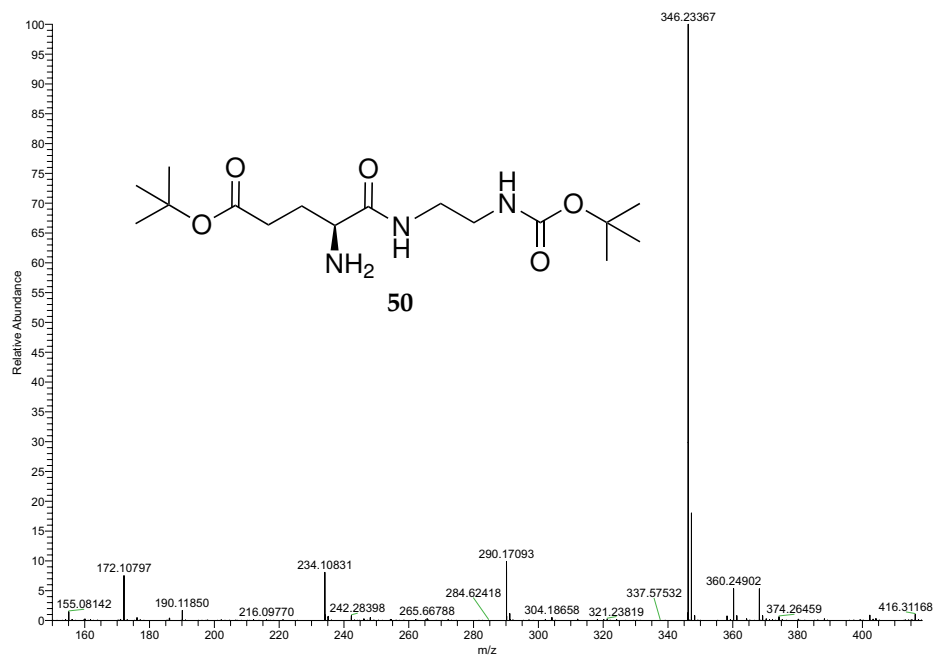
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3)



ESI-MS (positiver Ionenmodus)

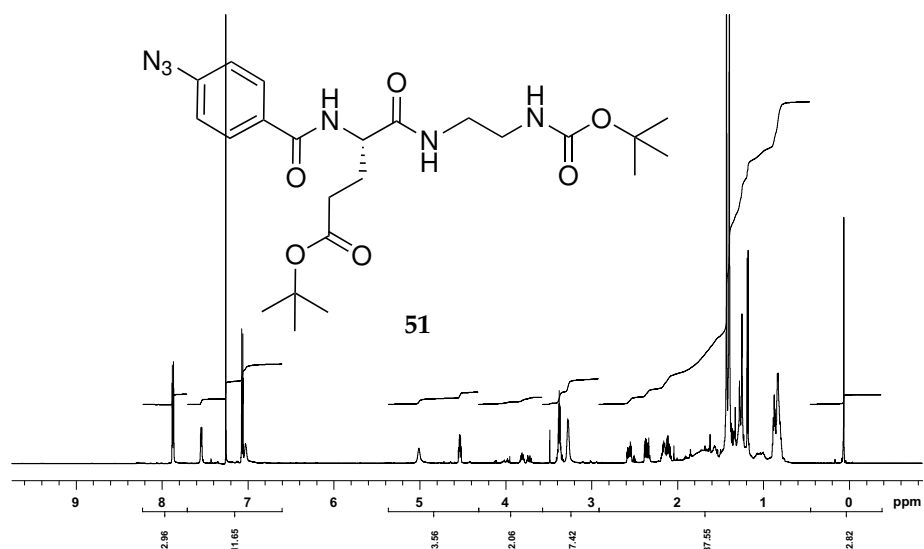


ESI-FTMS, pos.

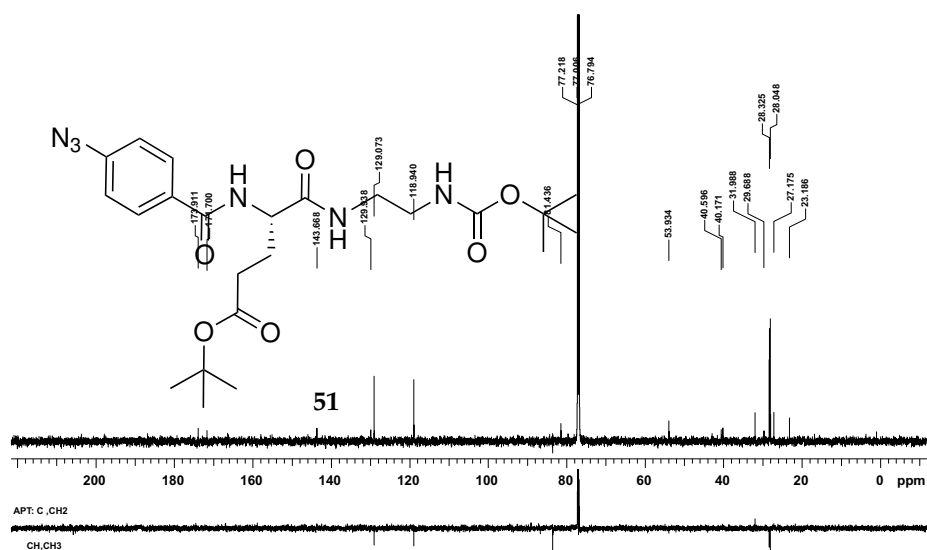


N-(4-Azidobenzamido)-(*S*)-Glu-(*O**t*Bu)-*N'*-Boc-diaminoethan (51)

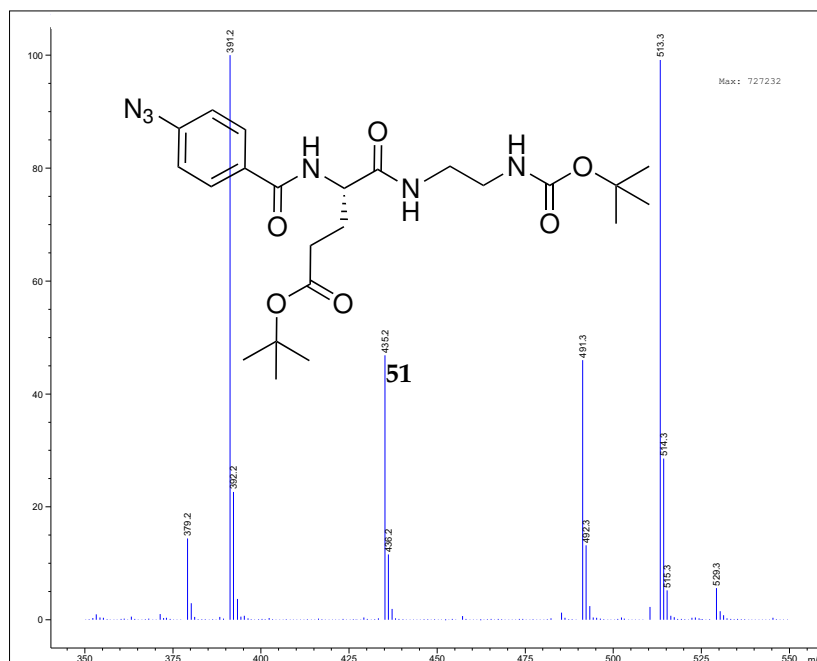
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)



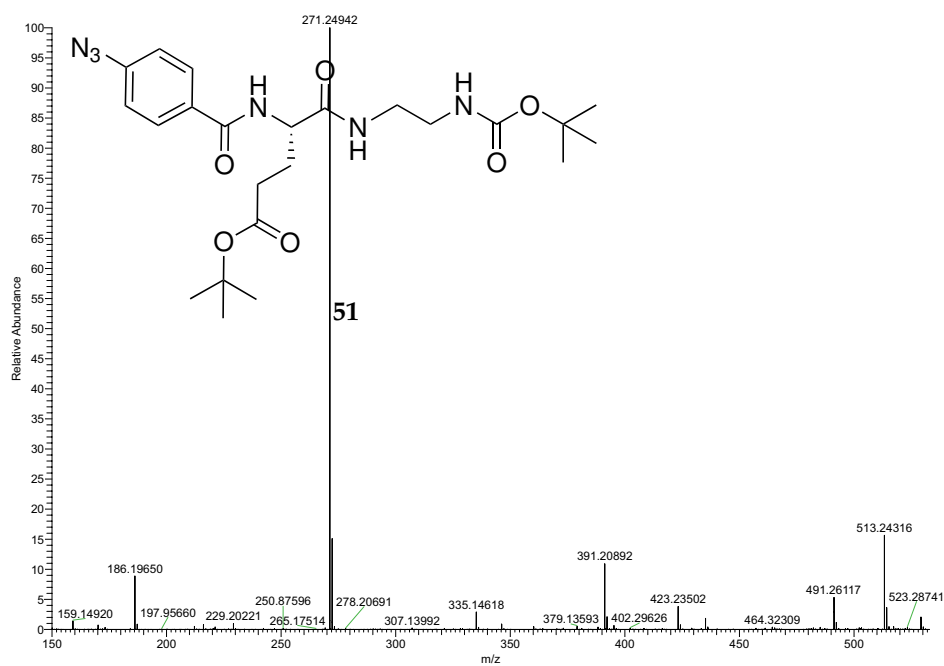
$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3)



ESI-MS (positiver Ionenmodus)

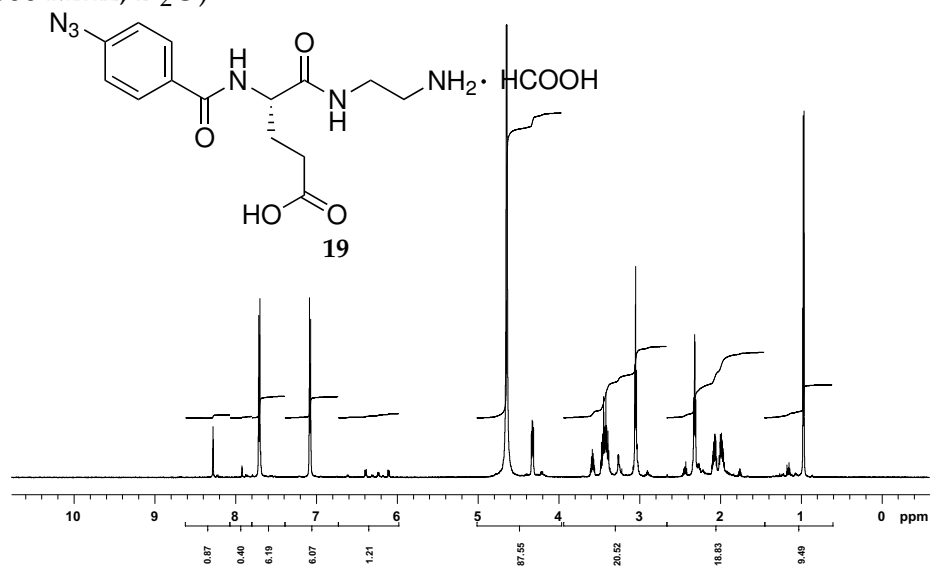


ESI-FTMS, pos.

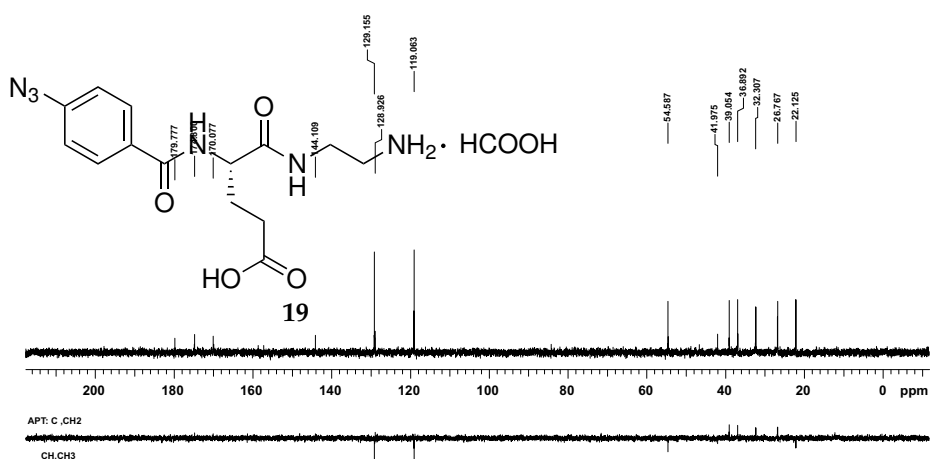


N-(4-azidobenzamido)-(*S*)-Glu(OH)-*N'*-diaminoethan (19)

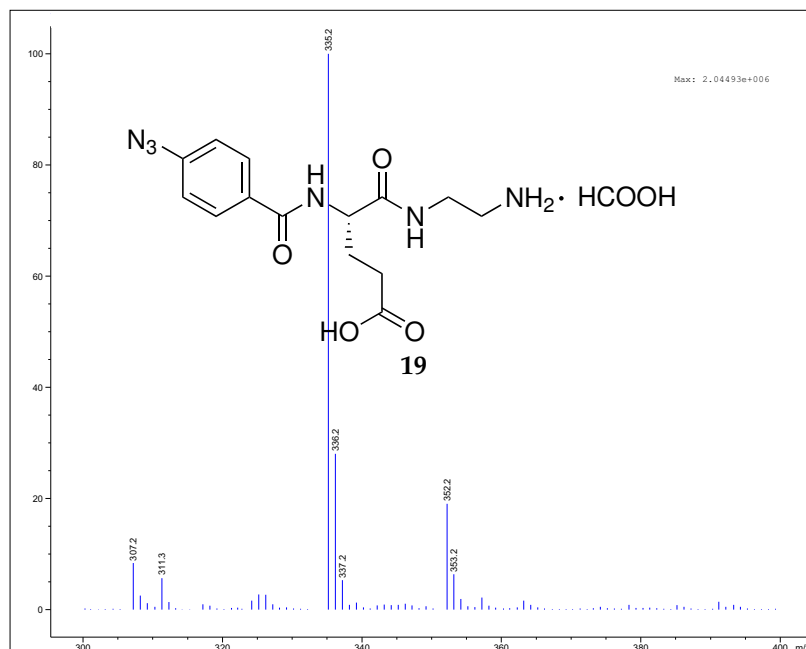
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O)



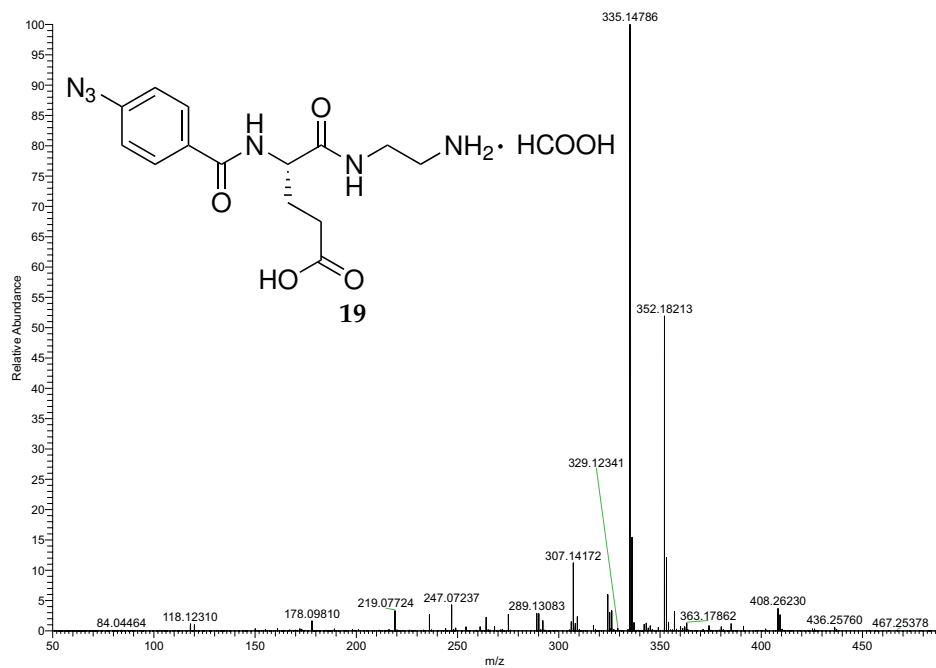
$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, D_2O)



ESI-MS (positiver Ionenmodus)

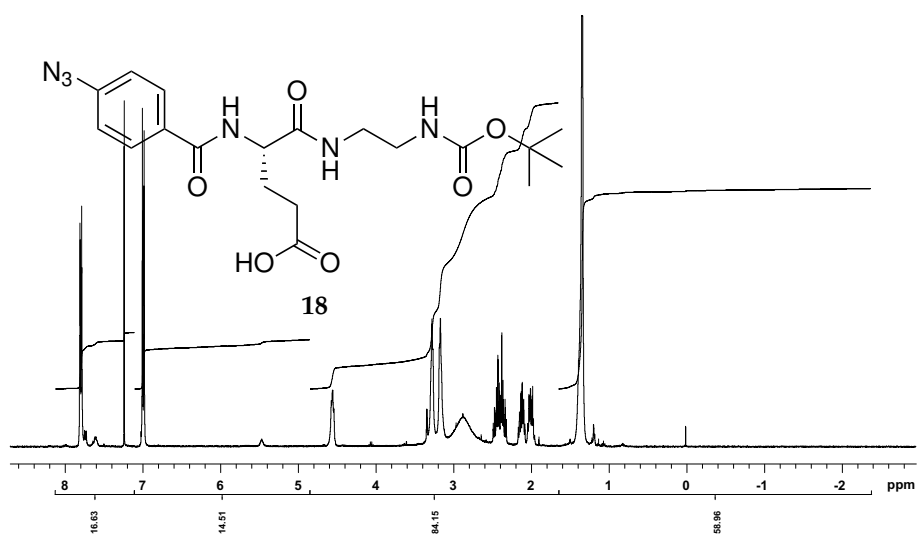


ESI-FTMS, pos.

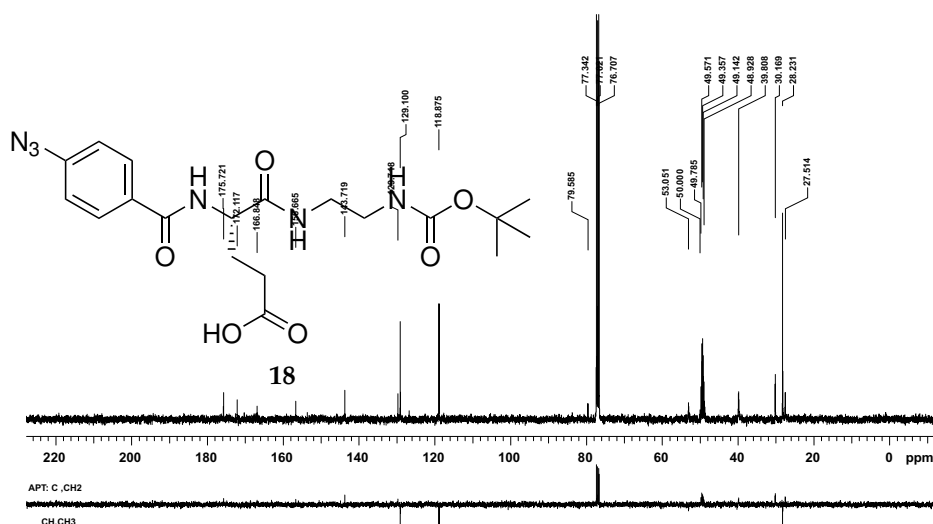


N-(4-azidobenzamido)-(*S*)-Glu(OH)-*N'*-Boc-diaminoethan (18)

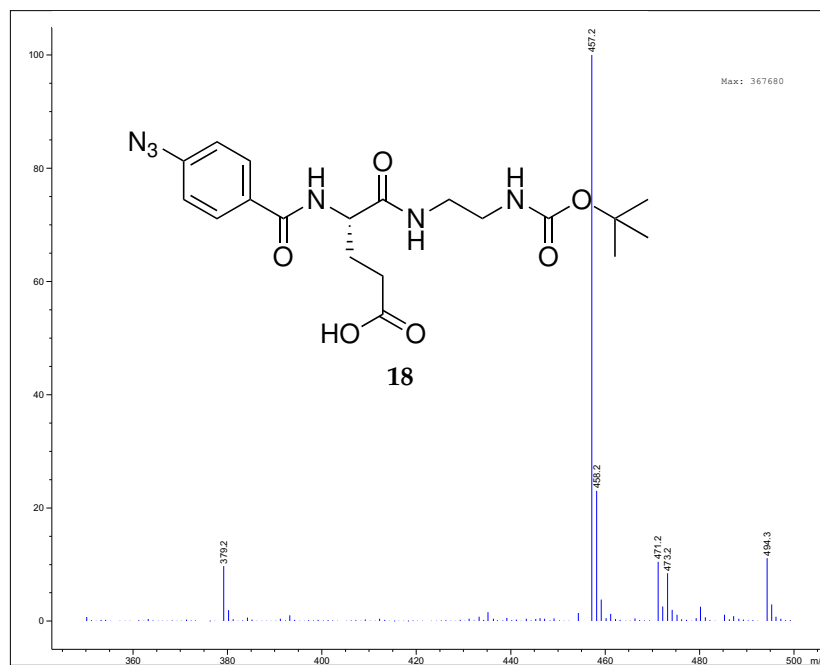
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)



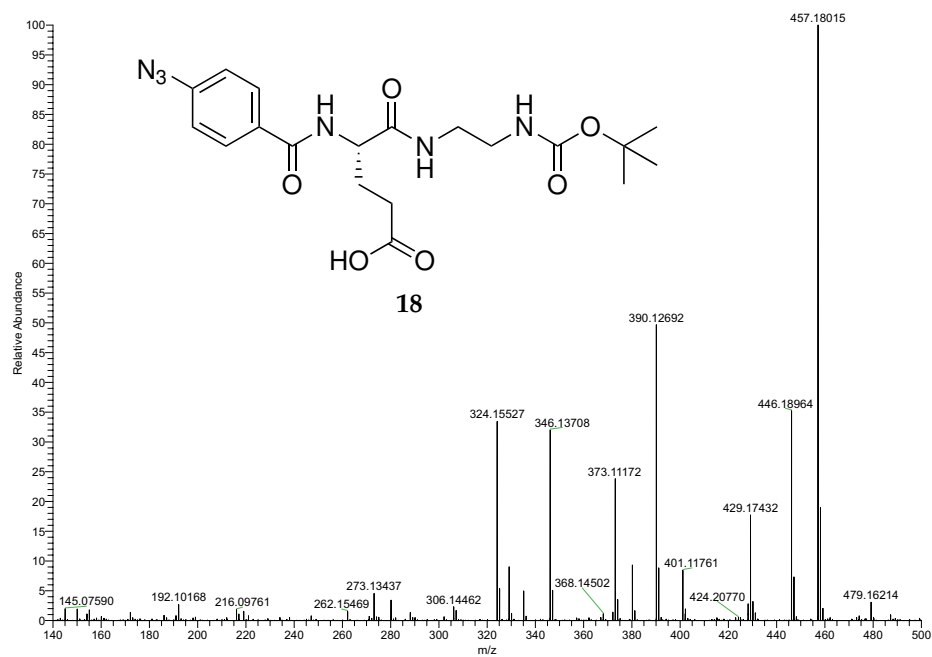
$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3)



ESI-MS (positiver Ionenmodus)

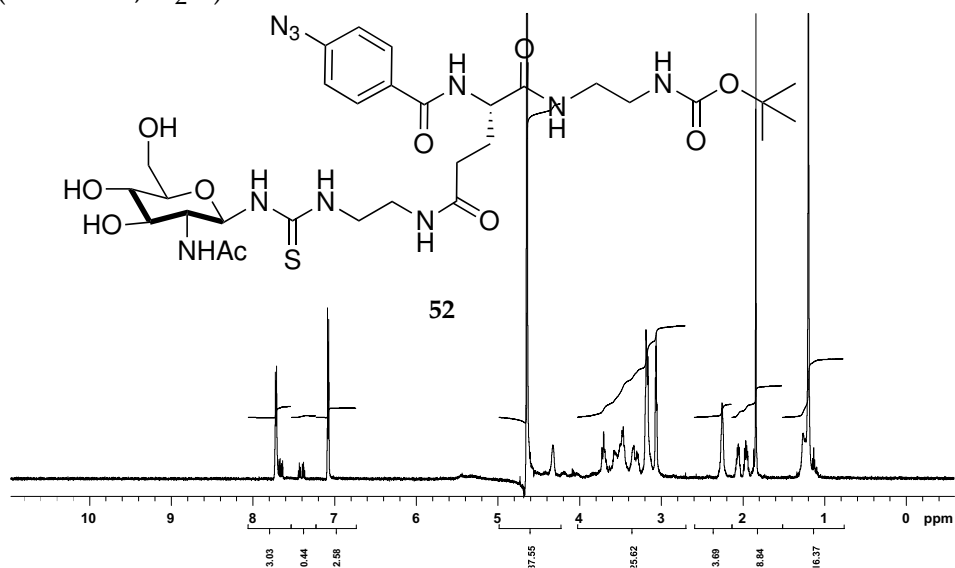


ESI-FTMS, pos.

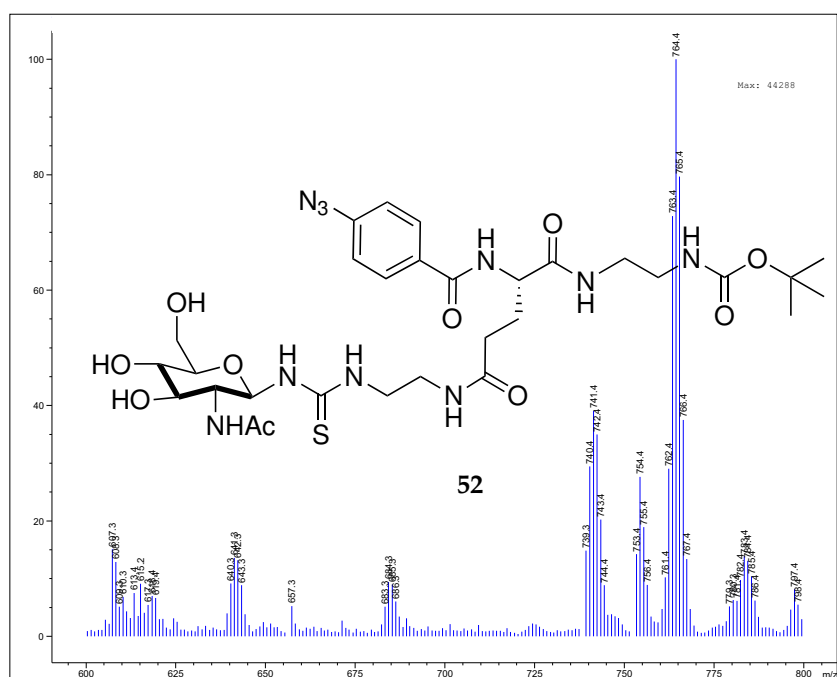


N-(4-Azidobenzamido)-(*S*)-Glu-O(β -Diaminoethyl-sulfocarbamido-*N*-Acetylglucosamino)-*N'*-Boc-diaminoethan (**52**)

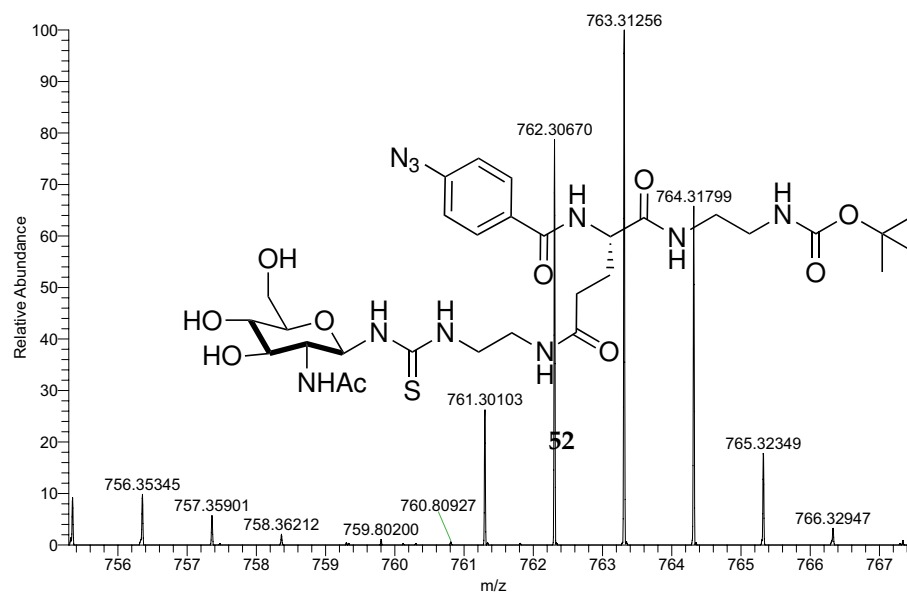
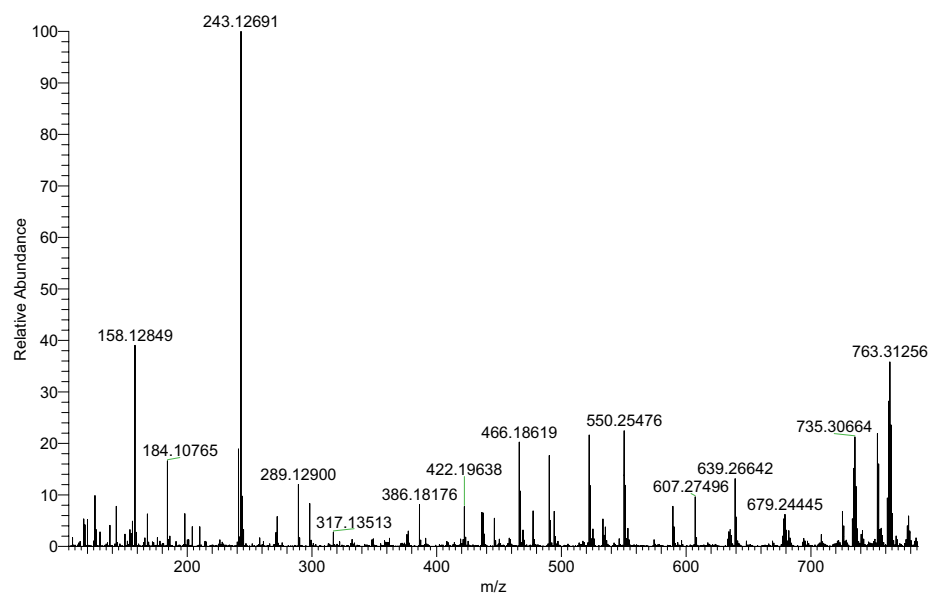
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O)



ESI-MS (positiver Ionenmodus)

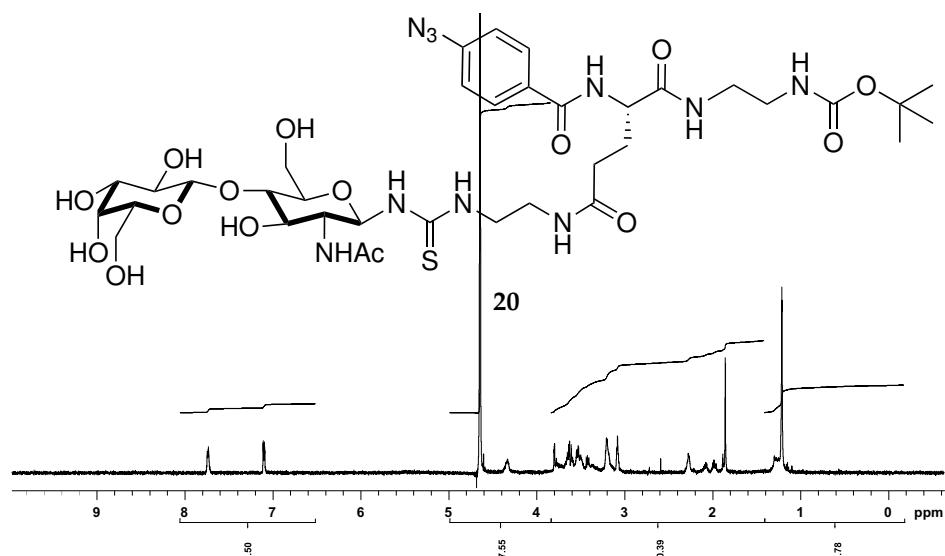


ESI-FTMS, pos.

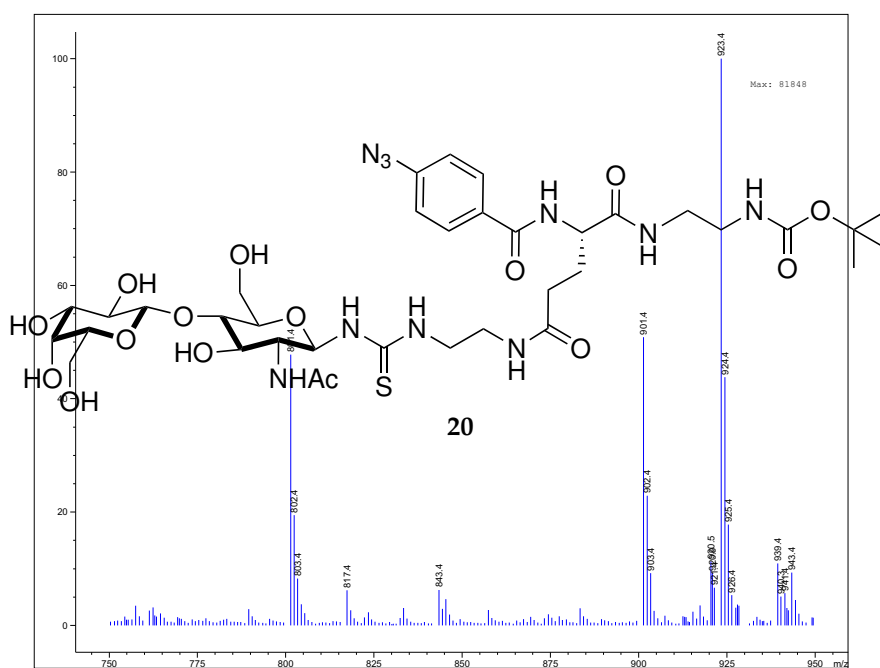


N-(4-Azidobenzamido)-(*S*)-Glu-O(β -Diaminoethylsulfocarbamido-*N*-Acetylgllactosamino)-*N'*-Boc-diaminoethan (20)

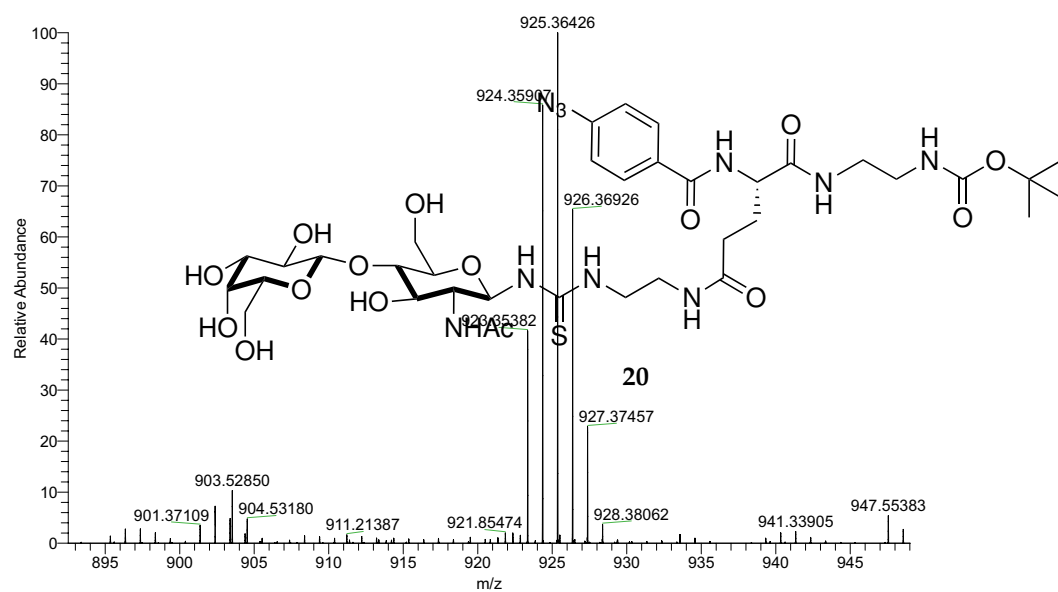
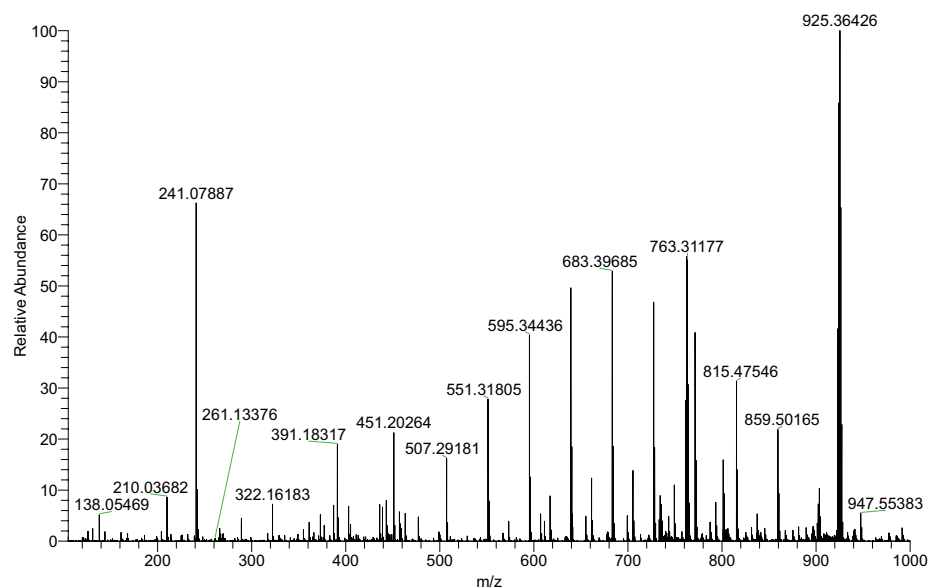
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O)



ESI-MS (positiver Ionenmodus)

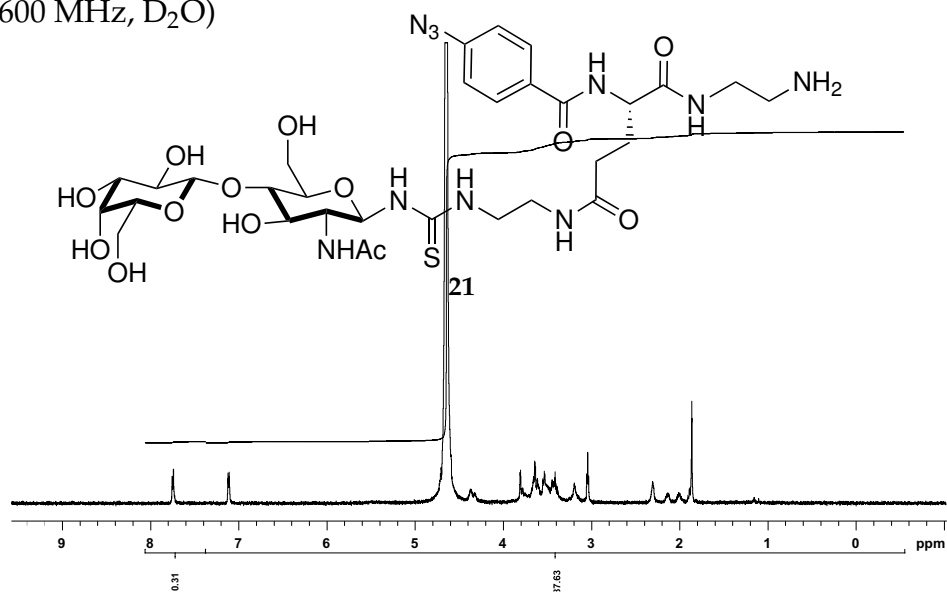


ESI-FTMS, pos.

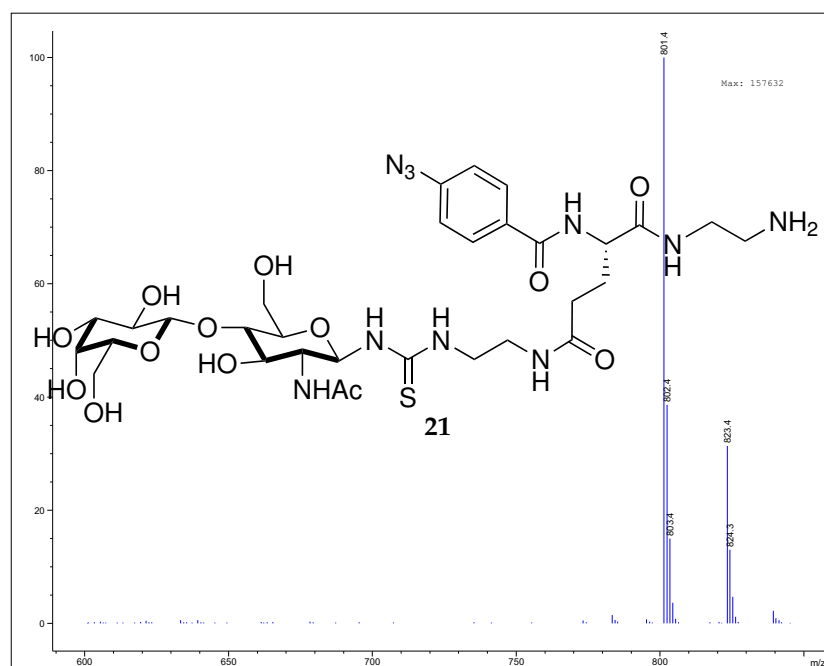


N-(4-Azidobenzamido)-(*S*)-Glu-O(β -diaminoethylsulfocarbamido-*N*-Acetylglactosamino)-*N'*-diaminoethan (21)

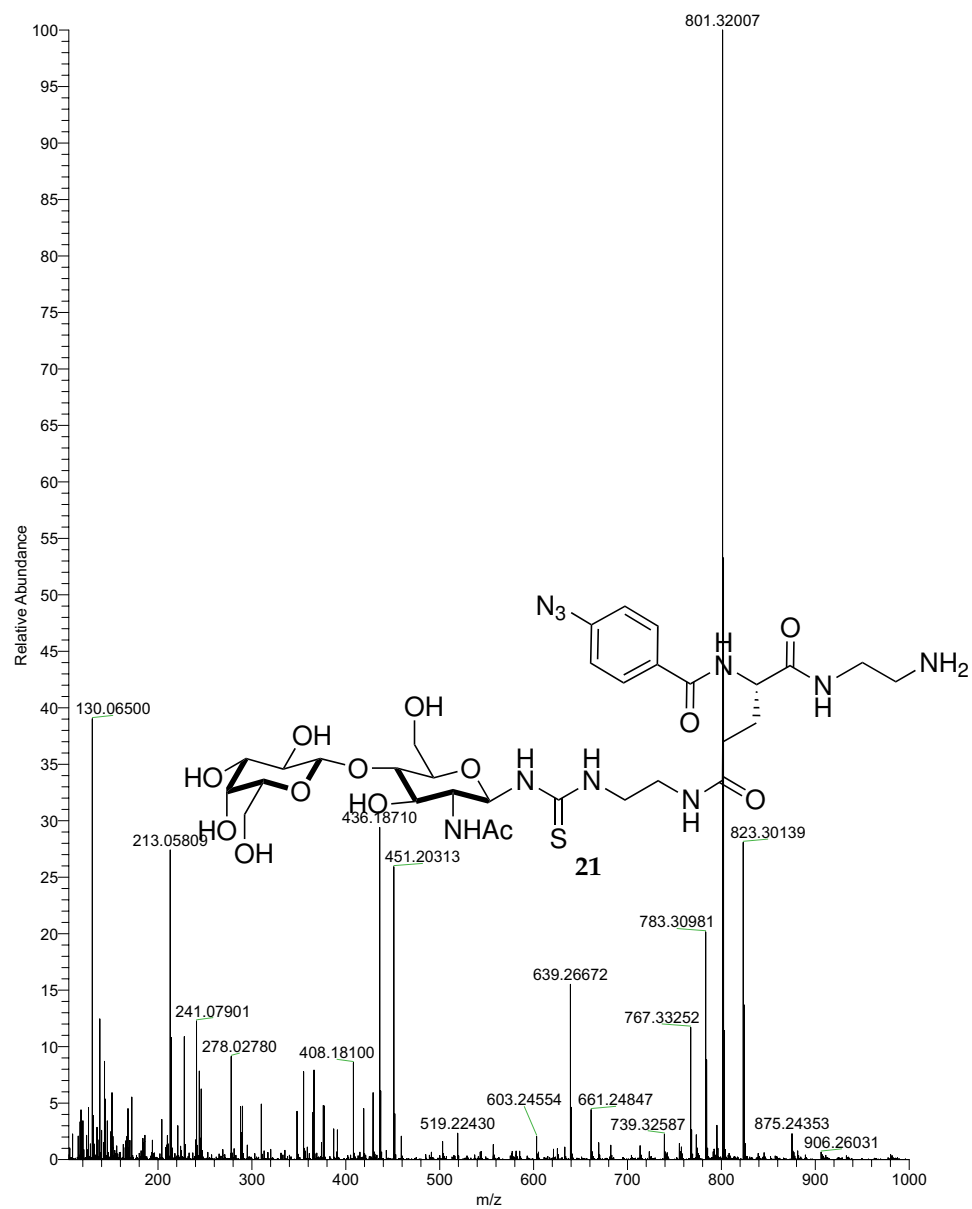
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O)



ESI-MS (positiver Ionenmodus)

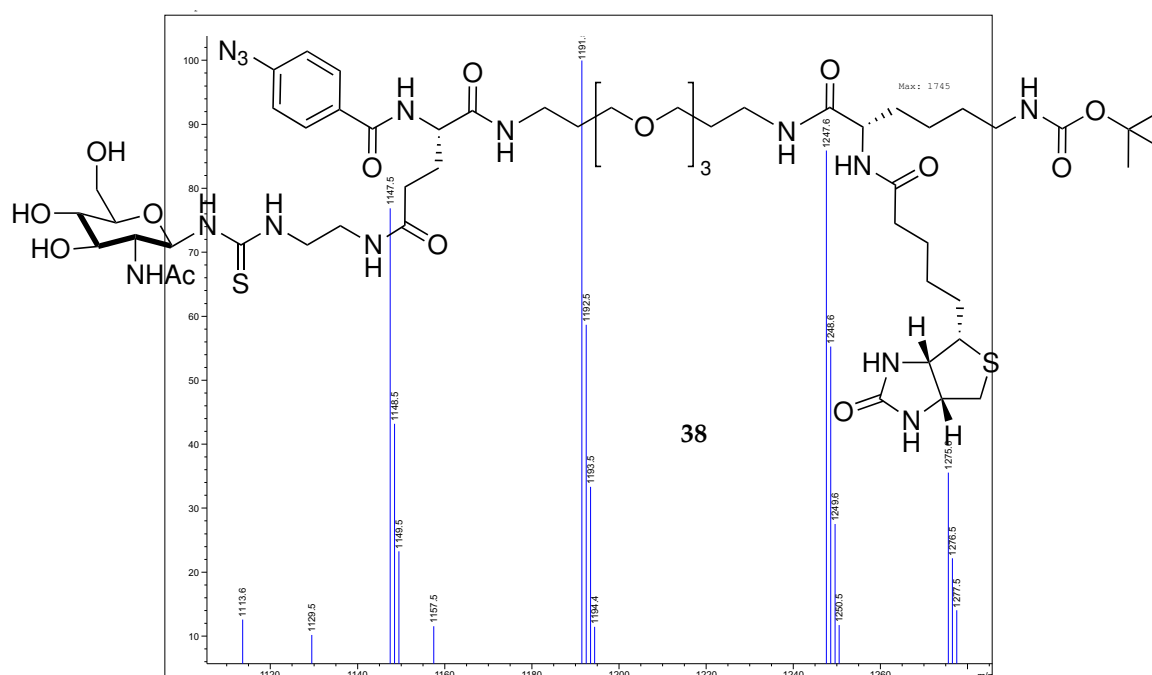


ESI-FTMS, pos.

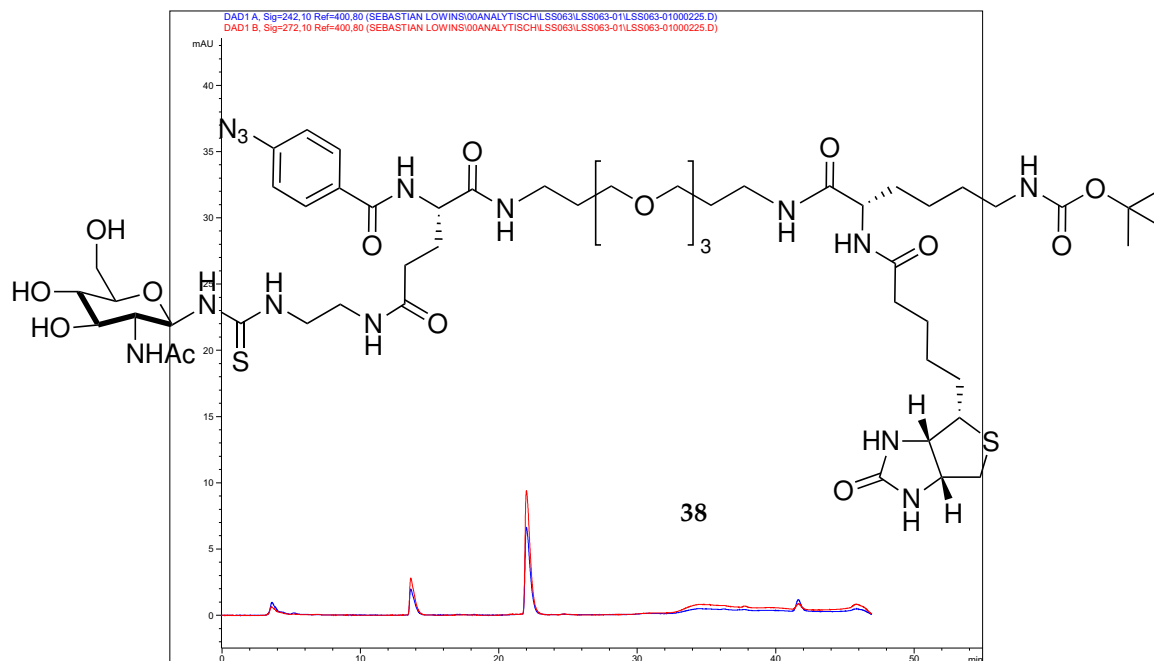


N-(4-Azidobenzamido)-(*S*)-Glu-O(β -Diaminoethylsulfocarbamido-*N*-Acetylglucosamino)-*N'*- α -biotinyl- γ -Boc-Lysin-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan(38)

ESI-MS (positiver Ionenmodus)

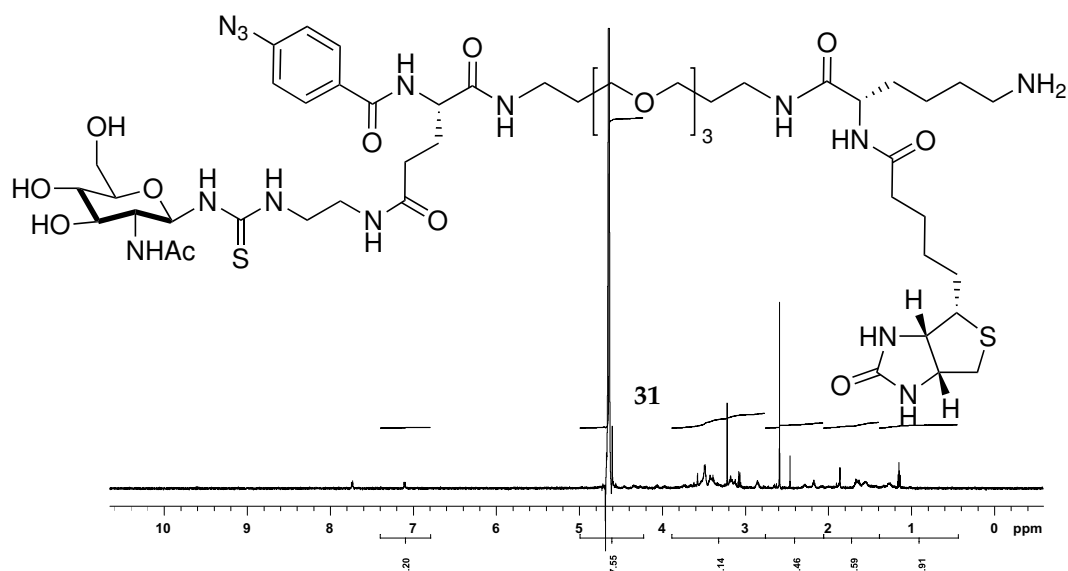


HPLC, reversed phase, Gradient 4, Kapitel 6.1.3.1, Tabelle 5

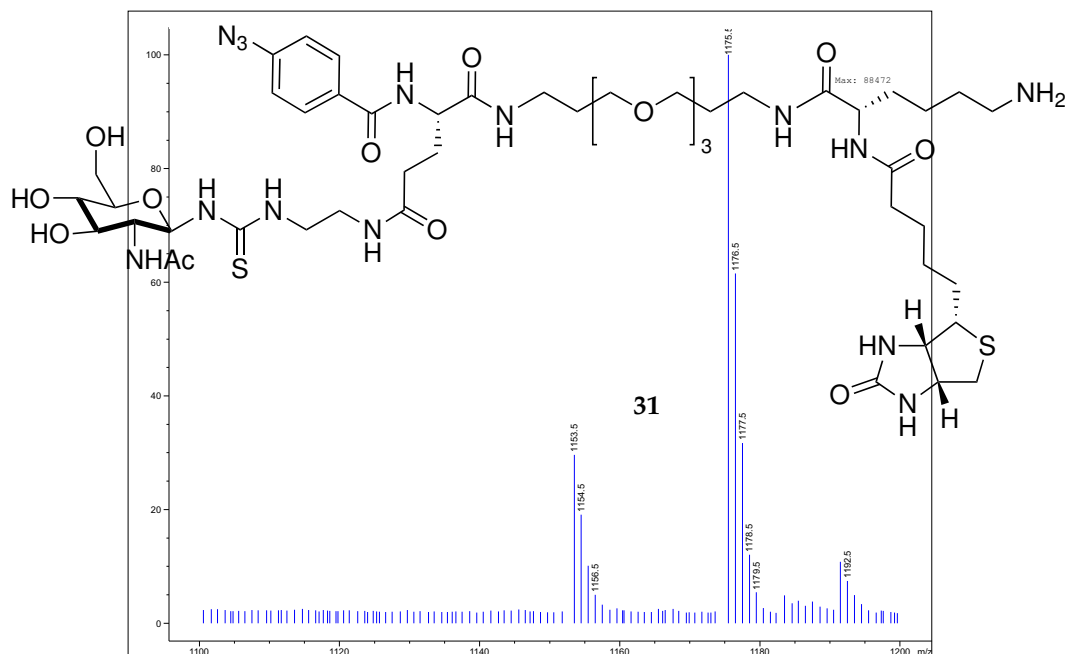


N-(4-Azidobenzamido)-(*S*)-Glu-O(β -
Diaminoethylsulfocarbamido-*N*-Acetylglucosamino)-*N'*-
 α -biotinyl- γ -NH₂-Lysin-1,13-diamino-4,7,10-
trioxatridecan
(31)

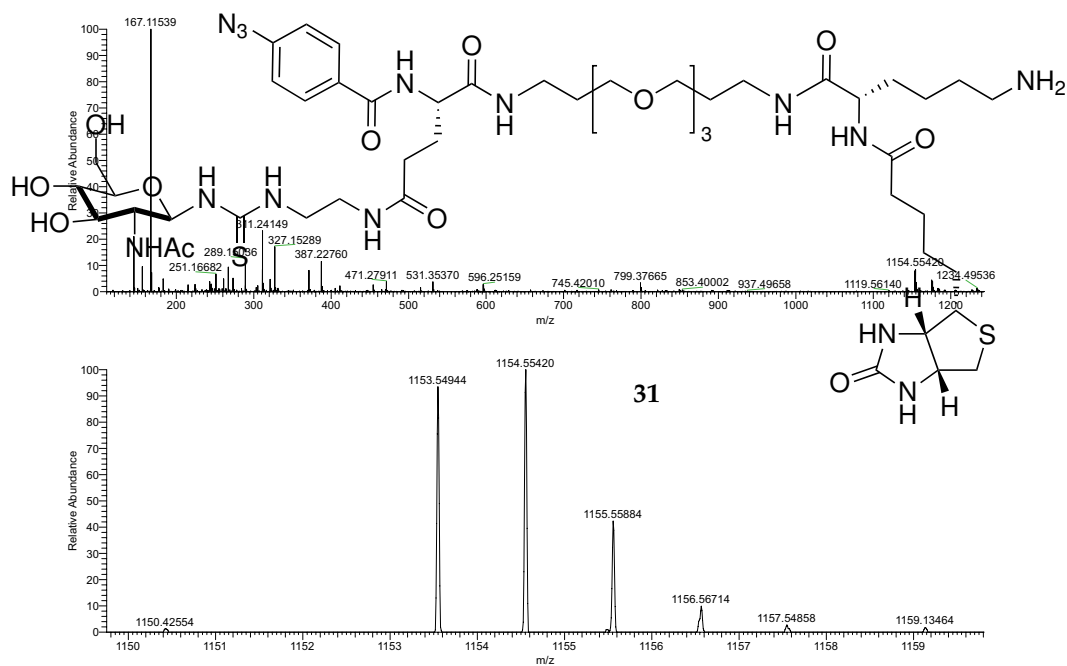
¹H-NMR (600 MHz, D₂O)



ESI-MS (positiver Ionenmodus)

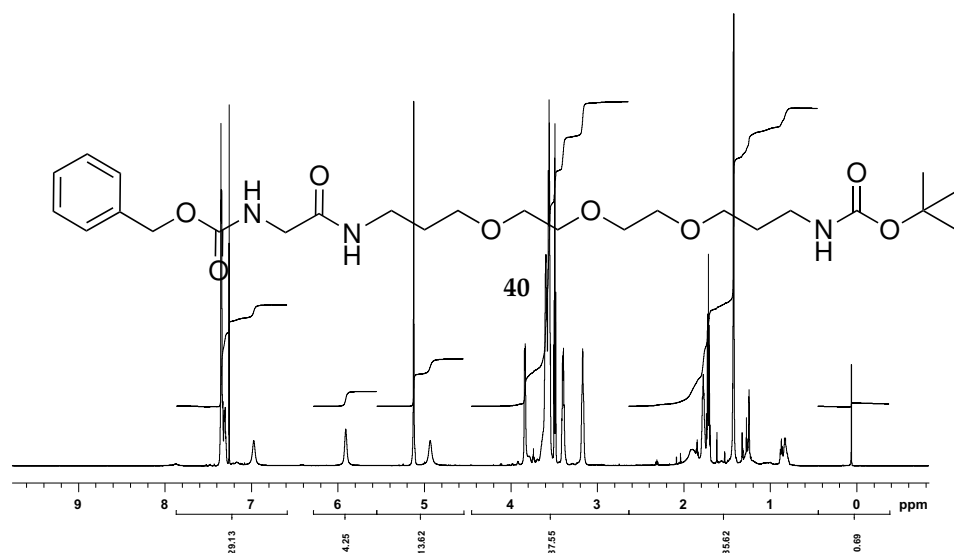


ESI-FTMS, pos.

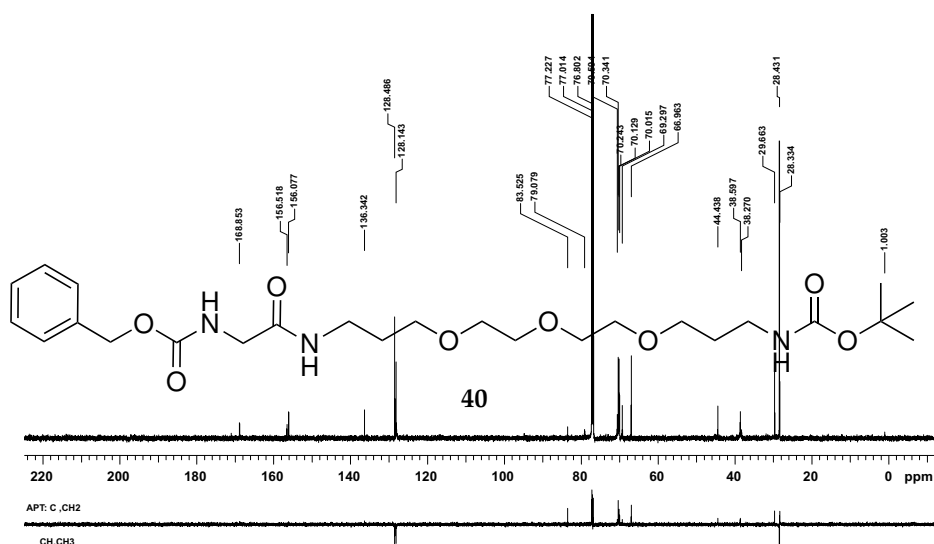


N-Z-Gly-*N*'-Boc-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan (40)

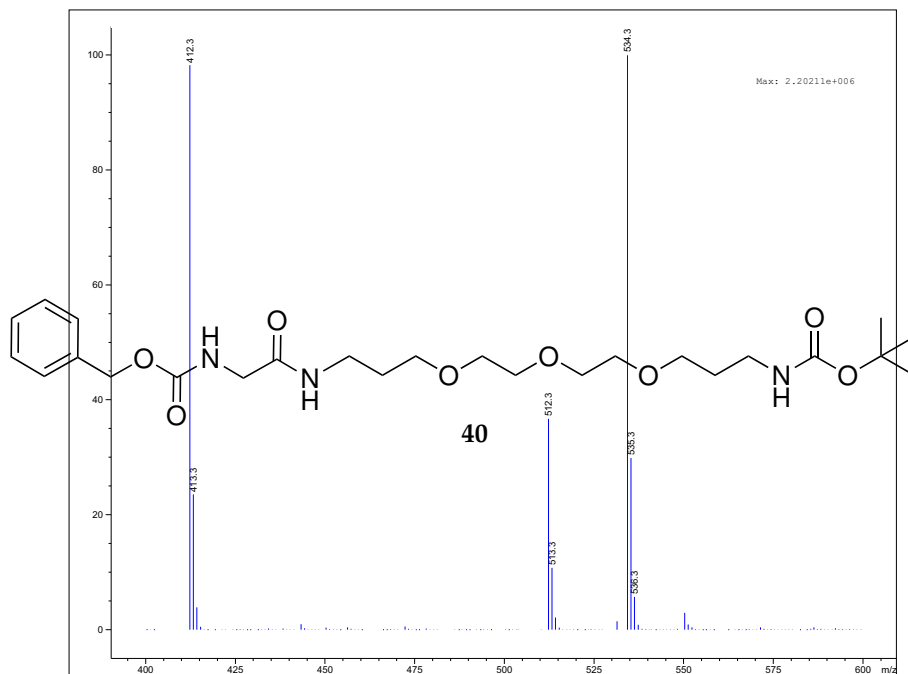
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)

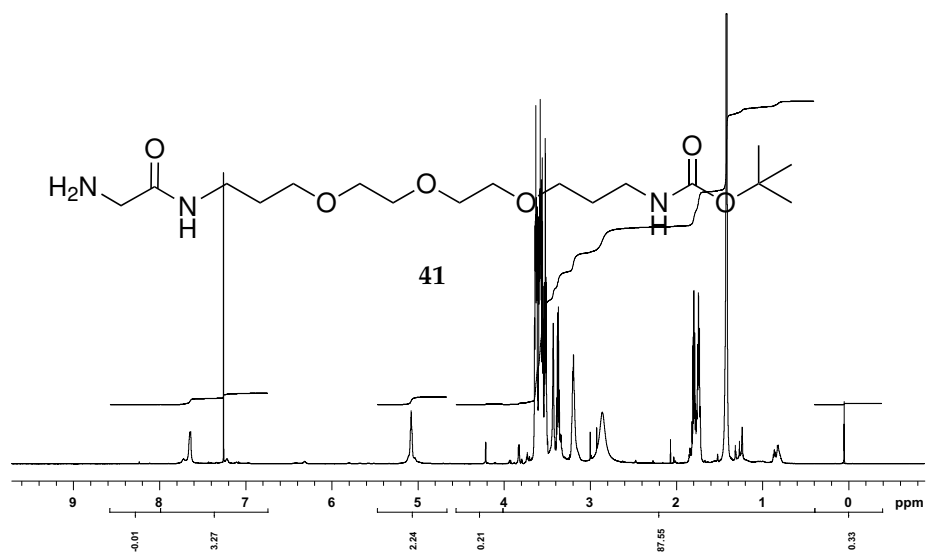
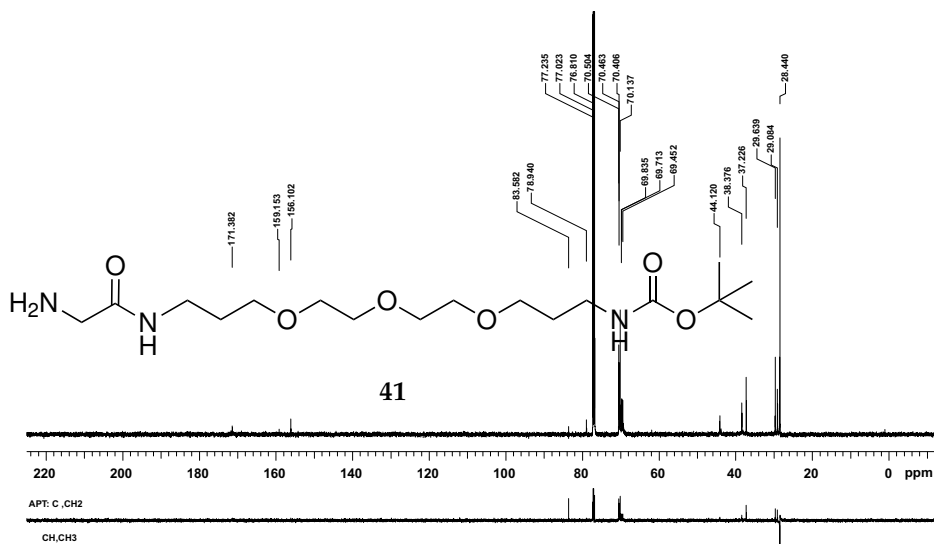


$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3)

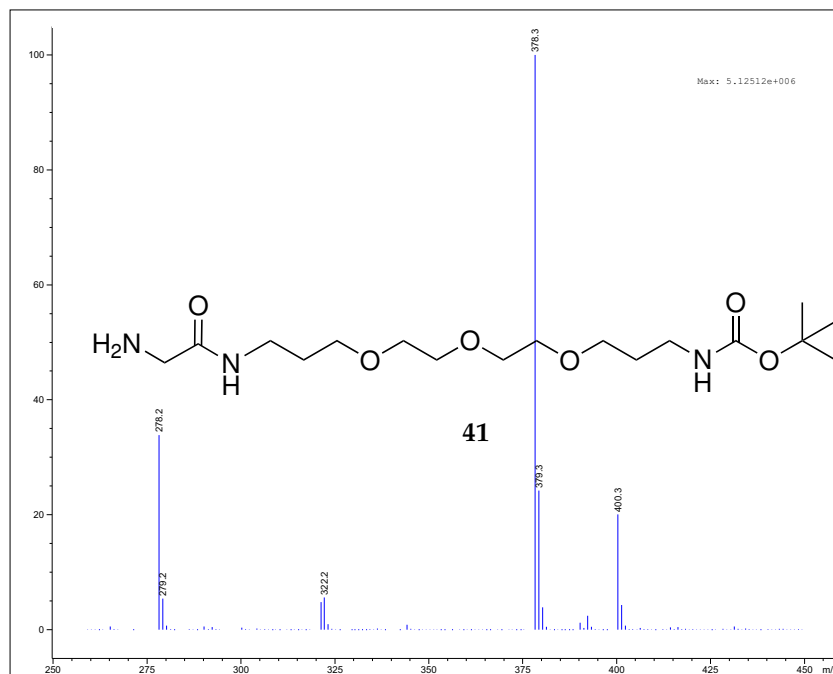


ESI-MS (positiver Ionenmodus)



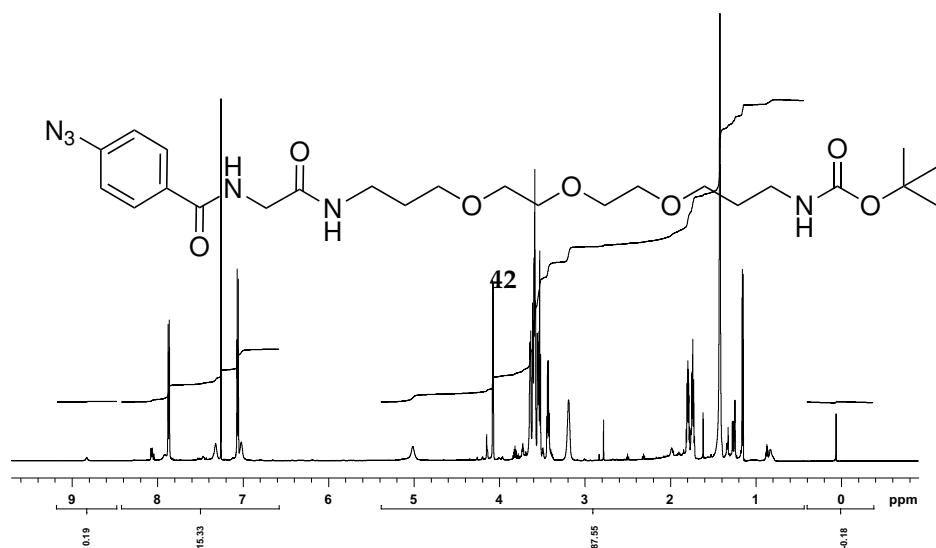
H-Gly-*N'*-Boc-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan (41)¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃)¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃)

ESI-MS (positiver Ionenmodus)

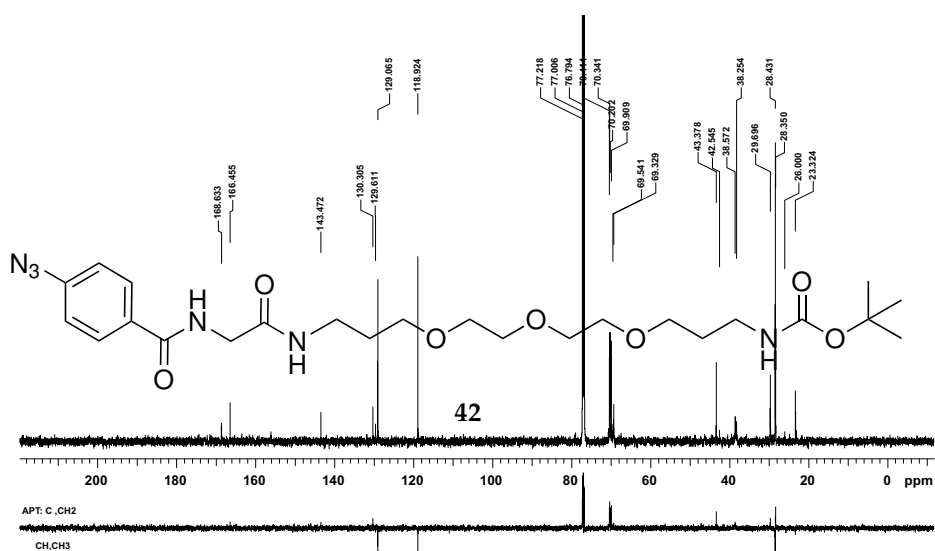


N-4-Azidobenzamido-Gly-*N'*-Boc-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan (42)

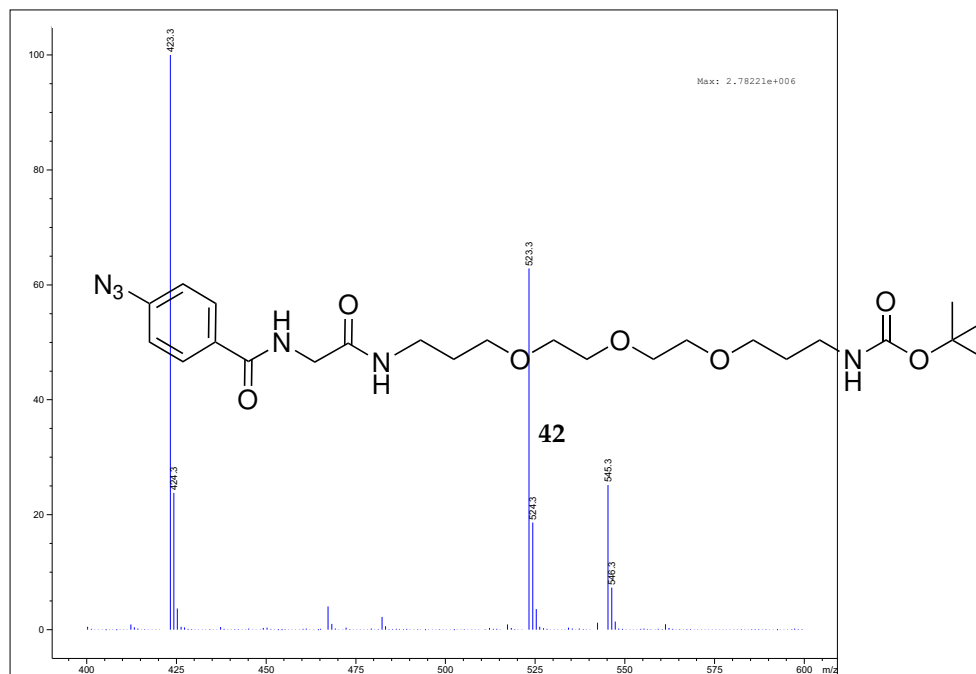
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)



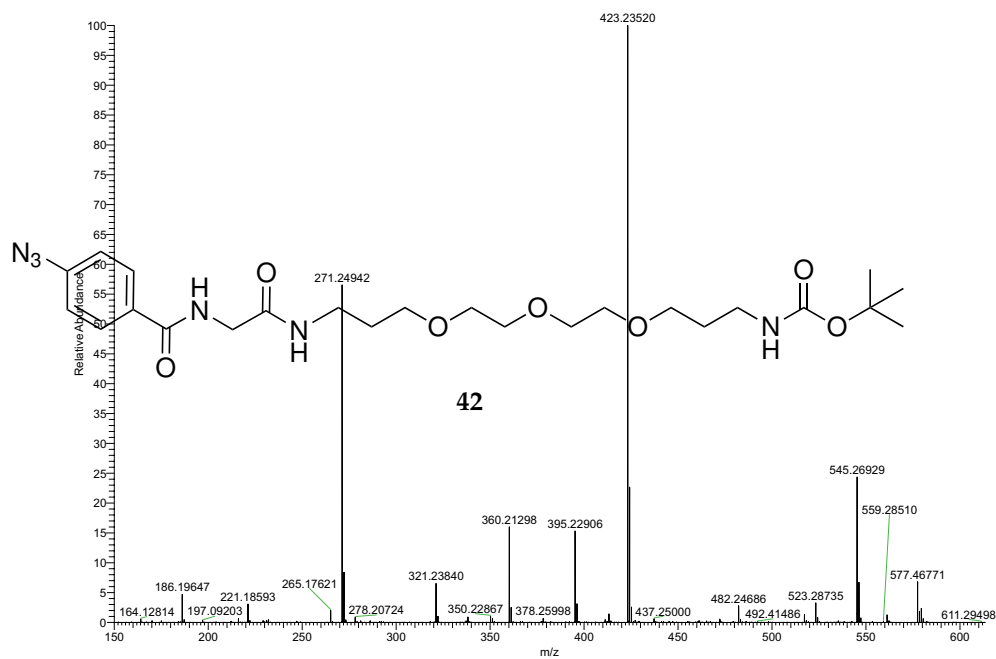
$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3)



ESI-MS (positiver Ionenmodus)

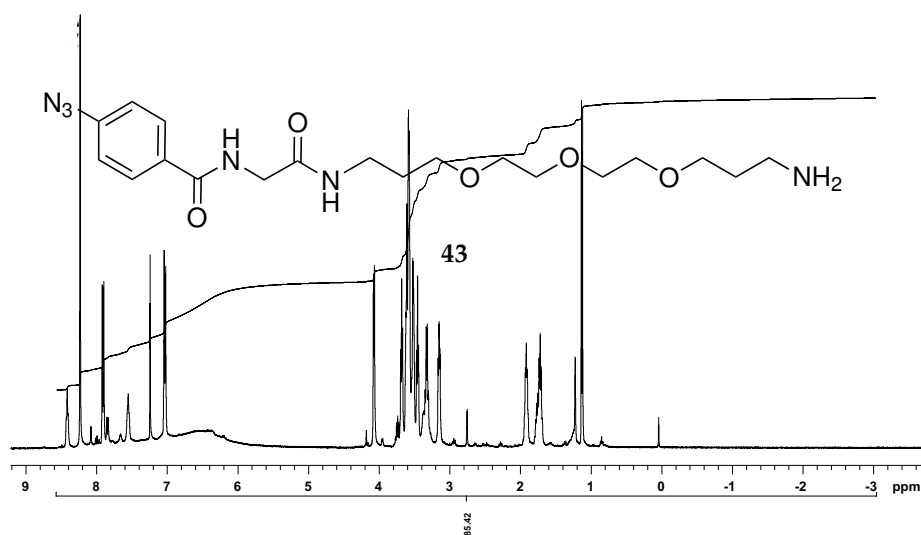


ESI-FTMS, pos.

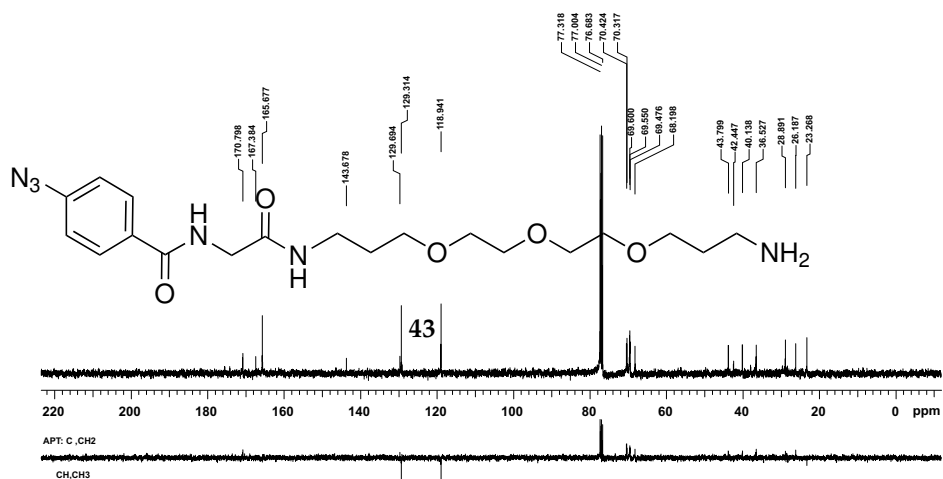


N-4-Azidobenzamido-Gly-*N'*-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan (43)

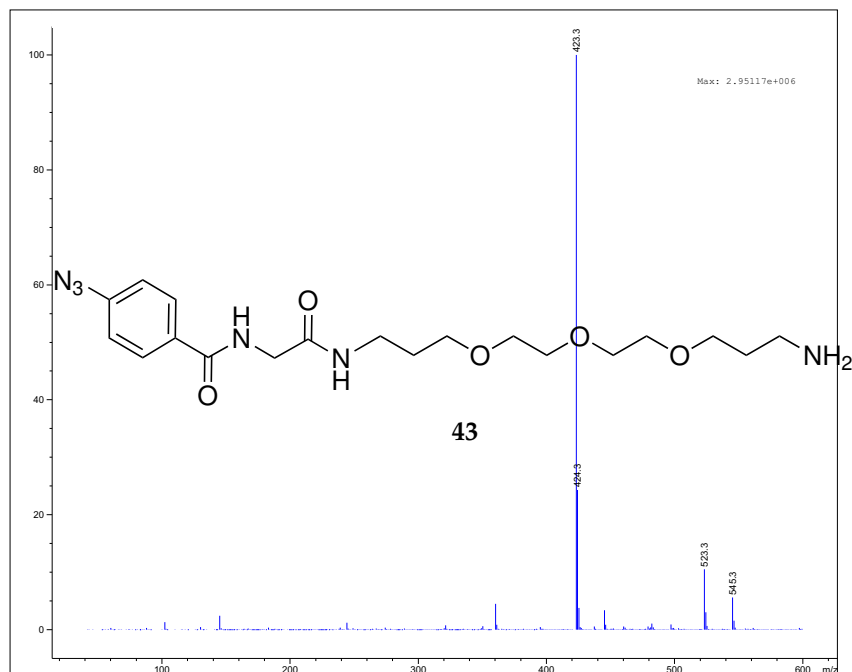
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)



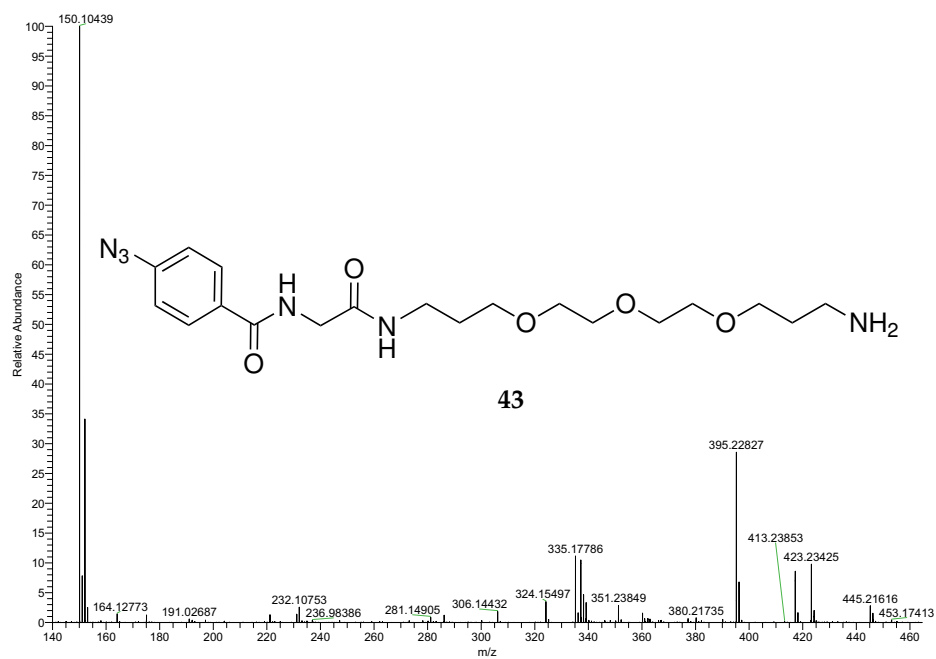
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3)



ESI-MS (positiver Ionenmodus)

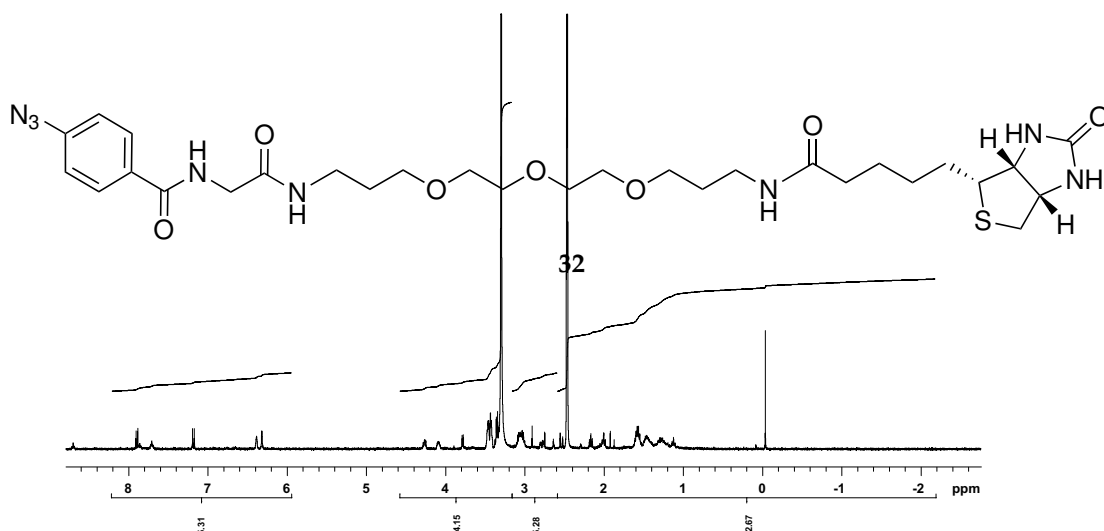


ESI-FTMS, pos.

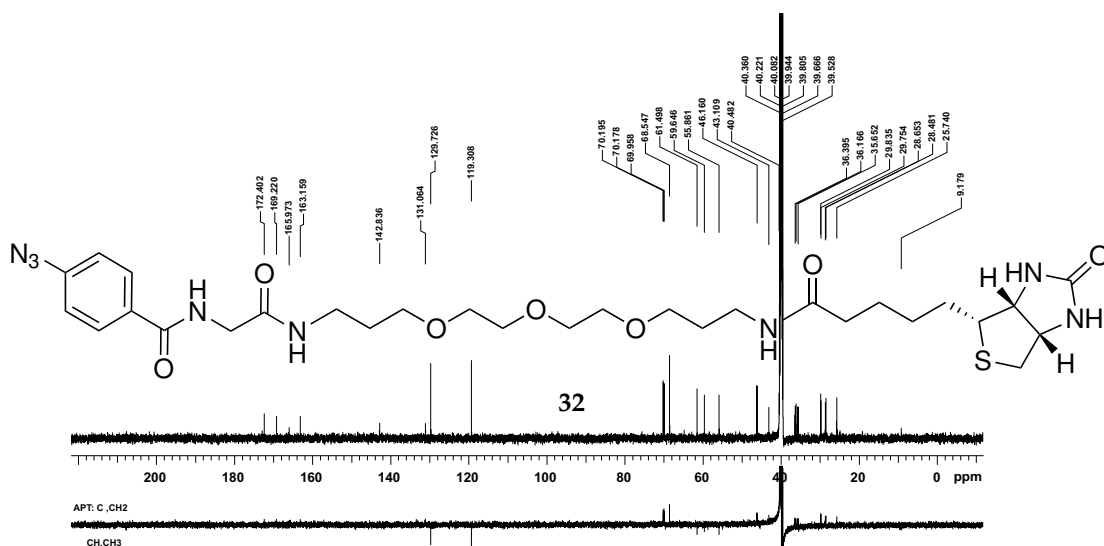


N-4-Azidobenzamido-Gly-*N'*-biotinyl-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan (32)

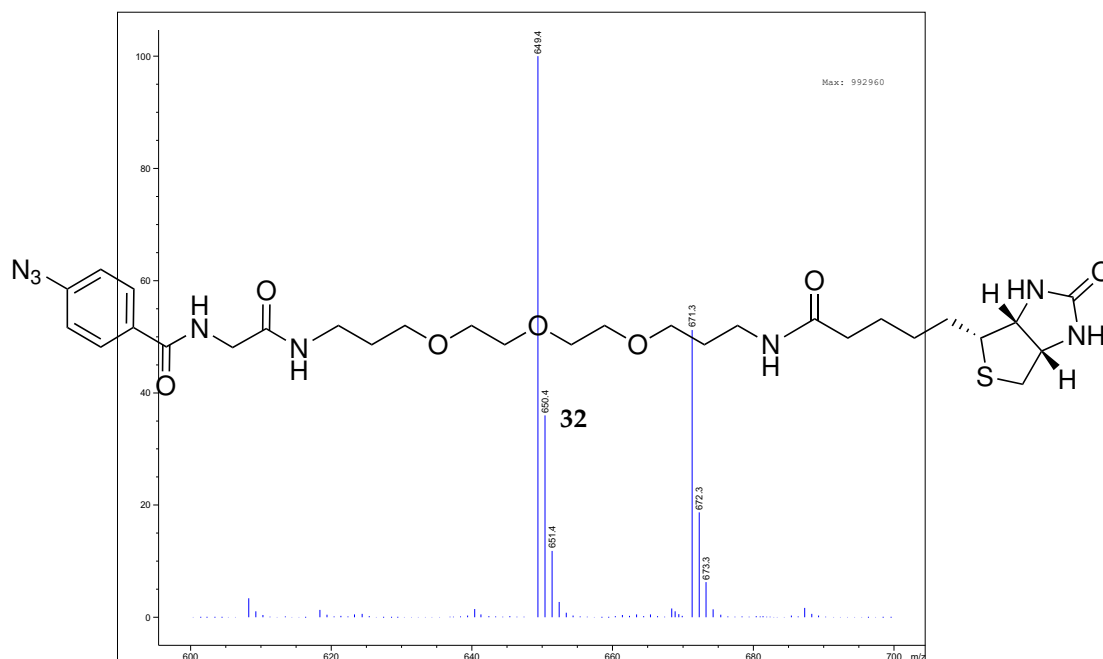
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-*d*₆)



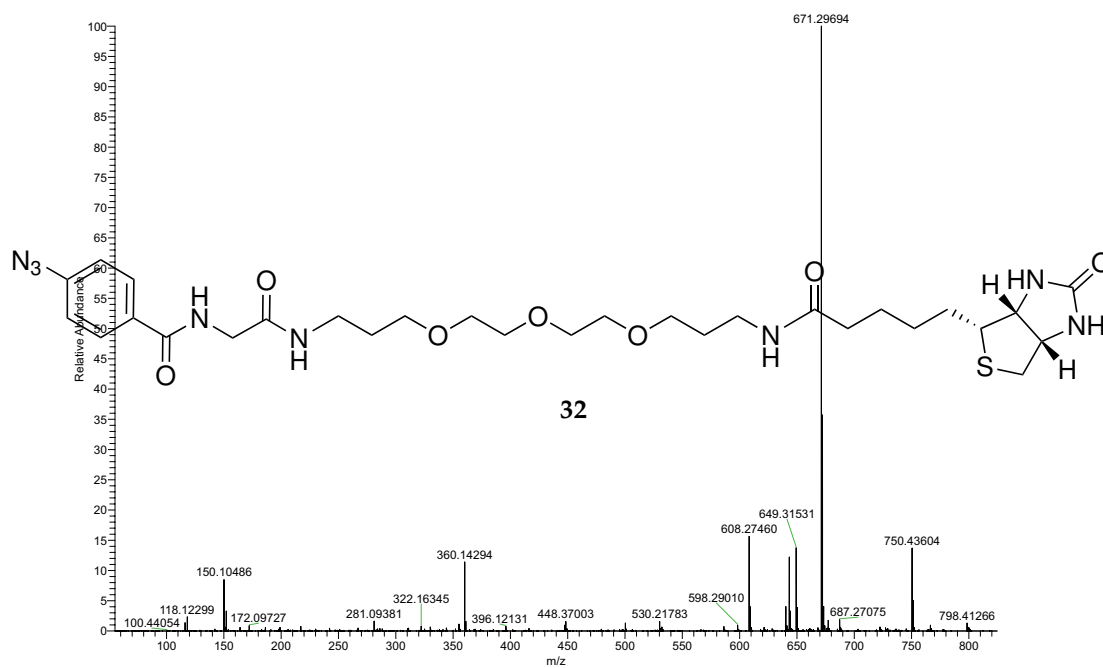
$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO-*d*₆)



ESI-MS (positiver Ionenmodus)

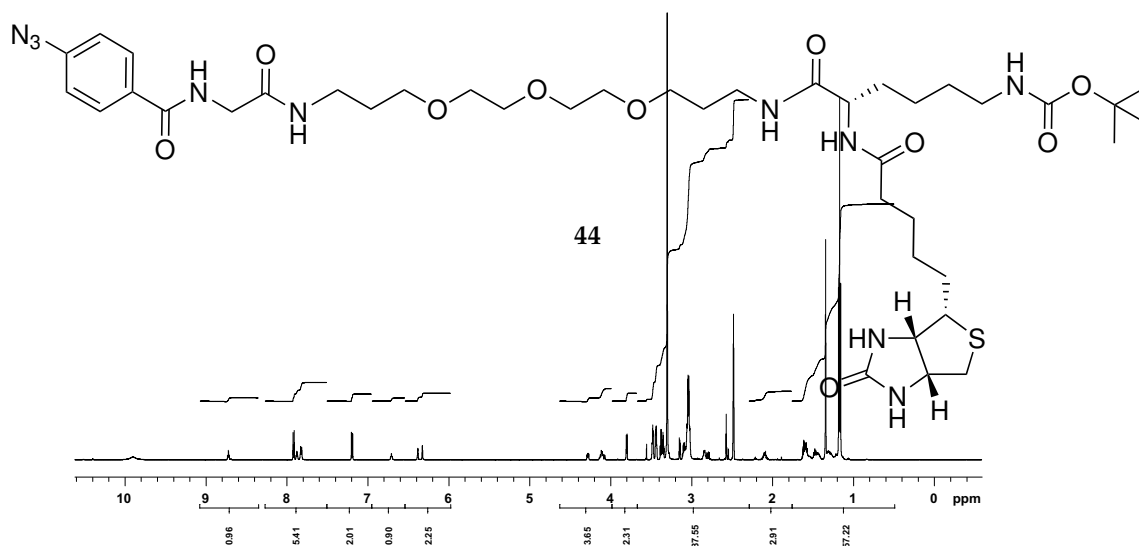


ESI-FTMS, pos.

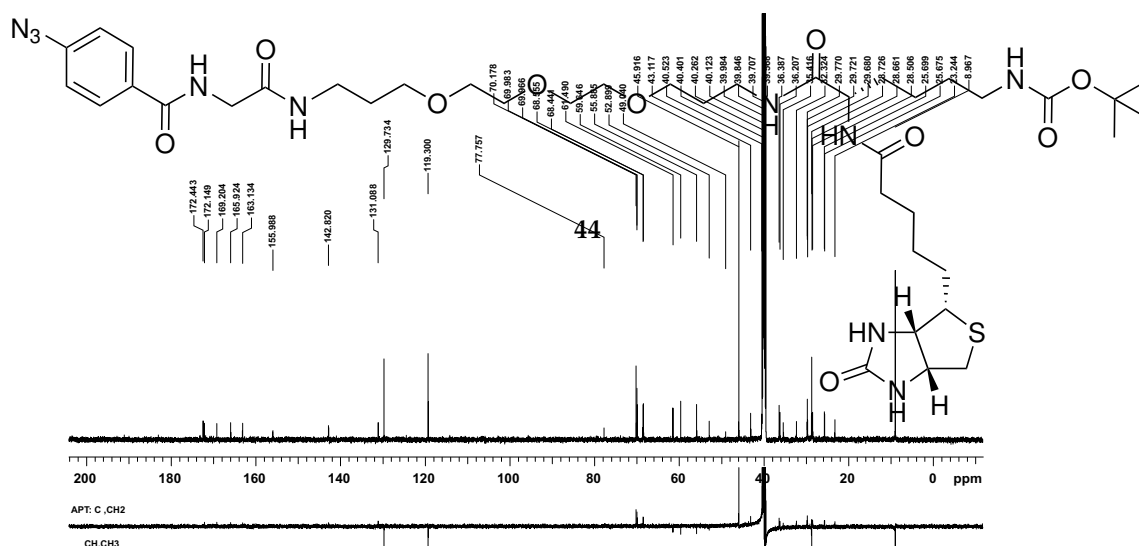


N-(4-Adizobenzamido)-Gly-*N'*- α -biotinyl- γ -Boc-Lysin-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan (44)

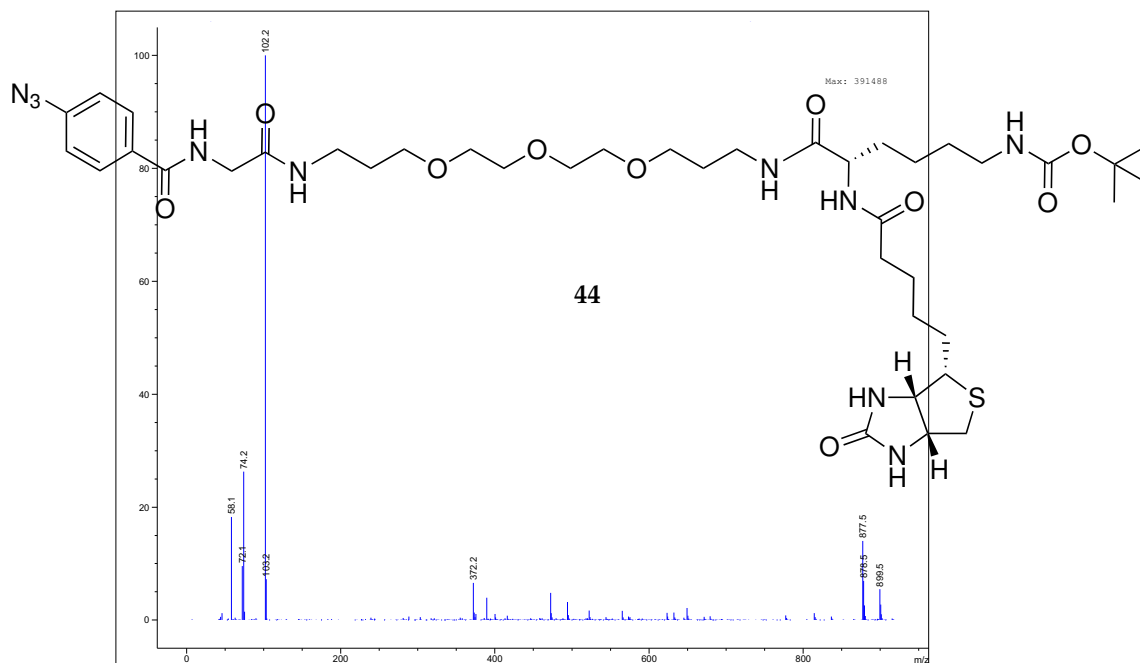
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6)



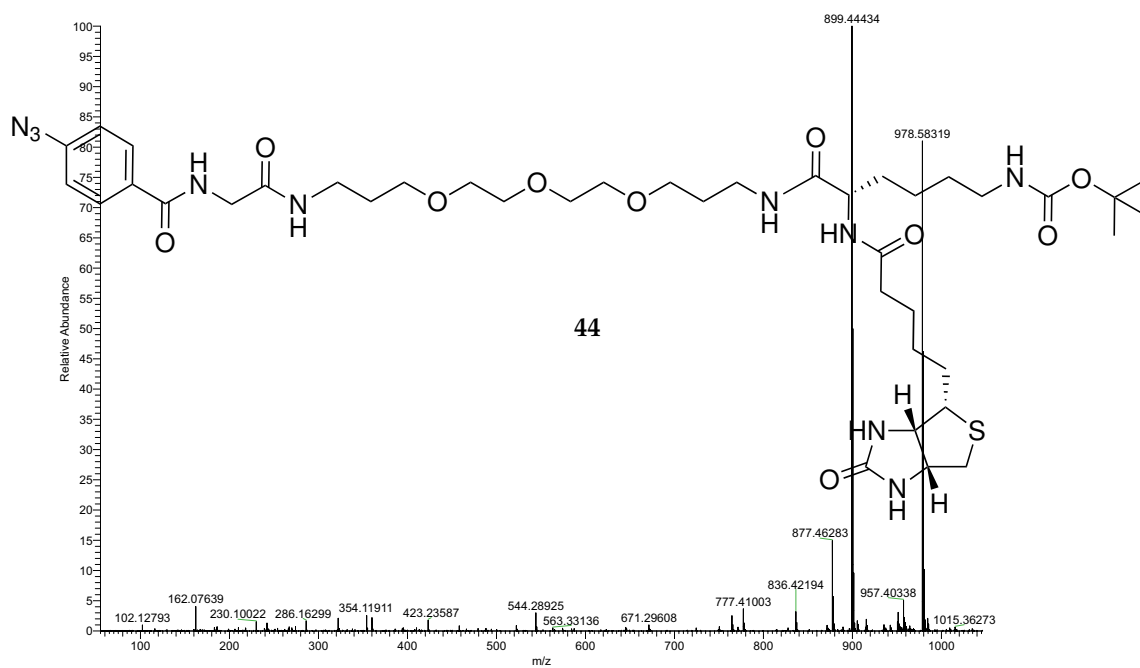
$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO- d_6)



ESI-MS (positiver Ionenmodus)

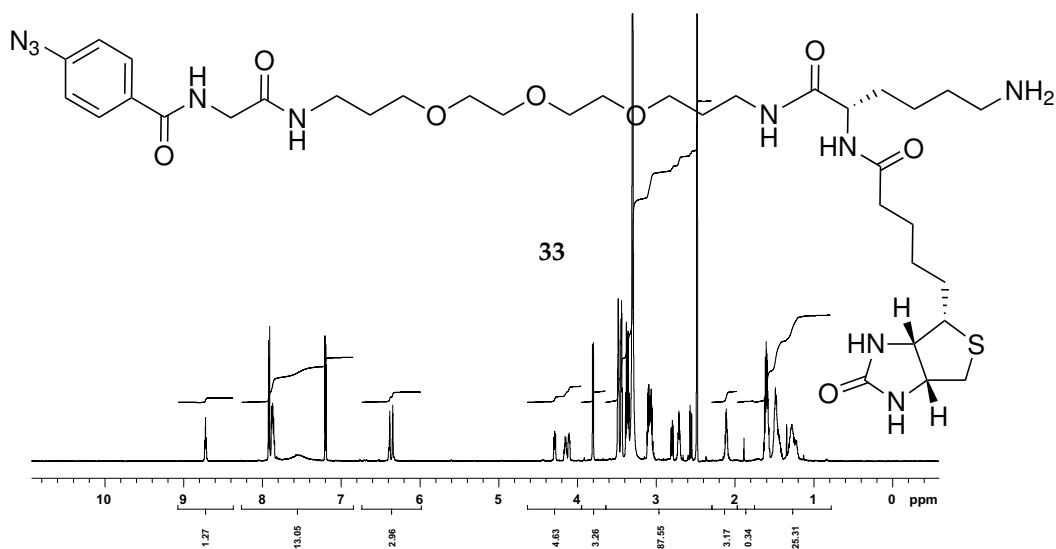


ESI-FTMS, pos.

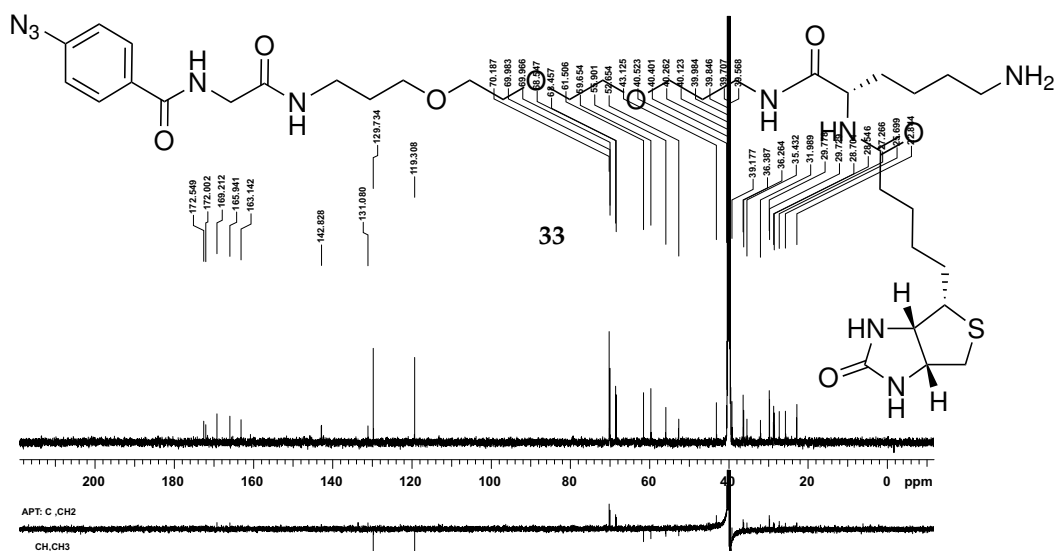


N-(4-Adizobenzamido)-Gly-*N'*- α -biotinyl- γ -H-Lysin-
1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan (33)

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO-*d*₆)



$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO-*d*₆)



Mass spectrum of compound **33**. The x-axis represents the mass-to-charge ratio (m/z) from 700 to 850, and the y-axis represents relative intensity from 0 to 100. The base peak is at m/z 777.5. Other significant peaks are labeled at m/z 778.5, 779.4, 801.4, and 802.4. The chemical structure of **33** is shown as an inset, featuring a 4-azidobenzoyl group, a bis(2-azidoethyl) ether linker, and a 2-azidoethyl amide group, all connected to a 1,3-dithiane-2-carboxamide moiety.

[illegible]

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Sebastian Lowins
E-Mail	Sebastian.Lowins@rwth-aachen.de
Geburtsdatum	12.10.1986
Familienstand	Ledig

Ausbildung

11.2011 - 04.2015	RWTH Aachen University Promotionsstudium im Fach Chemie „Synthese und Anwendung von Kohlenhydrat- Fängerverbindungen zur selektiven Isolierung von Lektinen und Adhäsion von Zellen“ Oberflächenmodifikation - Photocrosslinking - Einfangen von Enzymen
10.2009 - 09.2011	RWTH Aachen University Masterstudium im Fach Chemie (Abschluss mit 1.8) Vertiefungsrichtungen: Synthese (SYN) und Katalyse (KAT) Abschlussarbeit mit dem Thema „Synthese von LacNAc- Photoquervernetzern zur Galektin-vermittelten Anlagerung von Zellen“ - Synthese von Fängerverbindungen - Photocrosslinking
10.2006 - 09.2009	RWTH Aachen University Bachelorstudium im Fach Chemie (Abschluss mit 3.0) Abschlussarbeit mit dem Thema „Über die Erweiterung des substratspektrums für <i>N</i> -Heterozyklisch Carben katalysierte gekreuzte intermolekulare Benzoin Kondensationen“
08.1997 - 06.2006	Math.-Naturwissenschaftliches Gymnasium (Abschluss mit 2.3) Abitur, Leistungskurse: Chemie und Biologie