

Monodisperse, sequenzdefinierte N-Acetylglucosaminsulfat-Oligomere
und deren Anwendung in der Biologie und Biomedizin

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Sebastian Bauer

aus Düsseldorf

Düsseldorf, Juli 2020

aus dem Institut für Organische und Makromolekulare Chemie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. Laura Hartmann
2. Priv.-Doz. Dr. Klaus Schaper

Tag der mündlichen Prüfung: 26.10.2020

Eidesstattliche Versicherung



Ich, Sebastian Bauer, geboren am 27.12.1988 in Düsseldorf, versichere an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Düsseldorf, der

Unterschrift

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Laura Hartmann für die Aufnahme in ihren Arbeitskreis und die Betreuung der vorliegenden Doktorarbeit. Ihre permanente Gesprächsbereitschaft, die interessante Themenstellung und die zahlreichen Anregungen trugen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei. Ihre umfassende Tätigkeit in internationalen und interdisziplinären Feldern ermöglichten zudem die hochinteressanten Kooperationsthemen in dieser Arbeit.

Ich danke Priv.-Doz. Dr. Klaus Schaper für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Frau Dr. M. Tabatabai und danke ich für die stetige Betreuung, die zahlreichen Diskussionen und für die fachliche Unterstützung, auch über diese Abschlussarbeit hinaus. Ich danke ihr zudem für das Korrekturlesen und die vielen motivierenden Worte.

Danke an meine Kooperationspartner: Dr. Kim Silberreis und Dr. Jens Dervedde vom Institut für Laboratoriumsmedizin der Charité Universitätsmedizin Berlin, Laura Soria Martinez und Prof. Dr. Mario Schelhaas am Institut für zelluläre Virologie der westfälischen Wilhelms-Universität (WWU) Münster, sowie Kai Hußnätter und der Arbeitsgruppe von Dr. Kerstin Schipper am Institut für Mikrobiologie der HHU Düsseldorf unter Leitung von Prof. Dr. Michael Feldbrügge, für die großartige fachliche und interdisziplinäre Zusammenarbeit.

Ich danke vielmals meinen lieben Kollegen Fadi, Fawad, Özgür und Josip mit denen ich Diskussionen in alle Himmelsrichtungen führen konnte. Die lange Zeit am Lehrstuhl wird uns unsterblich in Erinnerung bleiben. Außerdem möchte ich allen meinen Laborkolleginnen und -kollegen des Lehrstuhls für die großartige Zeit zusammen danken.

Herzlichen Dank an Stephanie Scheelen, Birgit Ohlers und Sonja Coors für die Hilfsbereitschaft und die zuverlässigen Messungen. Maria Beuer danke ich für die zahlreichen NMR-Messungen. Dr. Peter Tommes und Ralf Bürgel für die Unterstützung in der Massenspektrometrie.

Ebenso gebührt mein Dank meiner Familie und meinen Freunden, die mich in jeder Phase meines Studiums uneingeschränkt unterstützten. Danke Jory, dass du den Stress mitgemacht hast.

Zu guter Letzt danke ich der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf für eine wundervolle Studienzeit, welche einen großen Abschnitt meines Lebens ausgemacht hat.

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Versicherung.....	I
Danksagung.....	III
Inhaltsverzeichnis.....	V
Veröffentlichungen	VIII
Kurzzusammenfassung.....	IX
Abstract.....	XI
Abkürzungsverzeichnis.....	XIII
Strukturverzeichnis	XVI
Einleitung	1
1.1 Glycosaminoglykane	1
1.1.1 Geschichte und Klassifizierung.....	1
1.1.2 Biosynthese	5
1.1.3 Biologische Aktivität.....	7
1.1.4 GAG-Mimetika und deren Anwendung in der Biologie	9
1.2. Glycooligomere	11
1.2.1. Hintergründe.....	11
1.2.2 Festphasensynthese.....	12
1.3 Sulfatisierungen	15
Motivation und Aufgabenstellung	18
2. Motivation und Aufgabenstellung	18
Ergebnisse und Diskussion	20
3.1 Synthese sulfatisierter Glycooligomere	20
3.1.1. Übersicht.....	20
3.1.2 Synthese eines Zuckerbausteins	23
3.1.2.1 Azidiertes Glucosamin.....	23
3.1.2.2 Sulfatisierung von GlcNAc-Azid.....	24
3.1.2.3 Analytik des sulfatisierten <i>N</i> -Acetylglucosamin-Azids	29
3.1.3 GlcNAc-Oligomersynthesen	39
3.1.4 Synthese sulfatisierter GlcNAc-Oligomere.....	45
3.1.4.1 Sulfatisierung an der festen Phase.....	46

3.1.4.2 Klickreaktion von sulfatisertem GlcNAc-Azid an alkinhaltigen Oligomeren in Lösung	50
3.1.4.3 Sulfatisierung von GlcNAc-Oligomeren in Lösung.....	52
3.1.5 Analytik der sulfatisierten GlcNAc-Glycooligomere	55
3.1.6 Einfluss auf L-Selektin Inhibierung, Komplementaktivierung und Blutkoagulation von sulfatisierten GlcNAc-Glycooligomeren	67
3.1.7 HPV-Inhibierung der sulfatisierten GlcNAc-Oligomere	70
3.2. Synthese von GlcNAc-Oligomermodifizierten Nickelbeads	75
3.2.1 Hintergrund	75
3.2.2 Synthese	76
3.2.3 Bindungsstudien	77
Zusammenfassung und Ausblick	85
4. Zusammenfassung und Ausblick	85
Experimenteller Teil	89
5.1 Materialien und Methoden	89
5.2 Synthesen	92
5.2.1 Bausteinsynthesen	92
5.2.1.1 (2R,3S,4R,5R,6R)-5-Acetamido-2-(acetoxymethyl)-6-azidotetrahydro-2H-pyran-3,4-diyl diacetat (OAc-GlcNAc-N ₃ , 1)	92
5.2.1.2 N-((2R,3R,4R,5S,6R)-2-Azido-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-3-yl)acetamid (GlcNAc-N ₃ , 2)	94
5.2.1.3 Natrium (2R,3R,4R,5R,6R)-5-Acetamido-6-azido-2-((sulfonatooxy)methyl)tetrahydro-2H-pyran-3,4-diyl bis(sulfat) ((3-6S)-GlcNAc-N ₃ , 3) ..	94
5.2.1.4 EDS (4) und TDS (5) Bausteine.....	96
5.2.2 (GlcNAc)Oligomersynthesen	97
5.2.2.1 (1)-GlcNAc(OAc)-(1)-Amid (OAc- O1)	101
5.2.2.2 (1)-GlcNAc-(1)-2-Aminoethylamid (O2).....	102
5.2.2.3 (1)-GlcNAc-(1)-2-Carboxyethylamid (O3)	102
5.2.2.4 EDS-(3)-GlcNAc(OAc)-(5)-Amid (OAc- O4)	103
5.2.2.5 EDS-(2,4)-GlcNAc-(4)-Aminoethylamid (O5)	104
5.2.2.6 EDS-(2,4)-TDS-(4)-Carboxyethylamid (O6-Alkin)	105
5.2.2.7 EDS-(2,4)-TDS-(4)-Amid (O7)	105
5.2.2.8 (6)-TDS-(6)-Carboxyethylamid (O8).....	106
5.2.2.9 EDS-(2,4)-GlcNAc-(4)-Amid (O9).....	107
5.2.2.10 (1-6)-GlcNAc-(6)-Carboxyethylamid (O10)	111
5.2.2.11 (1-8)-GlcNAc-(8)-Amid (O11)	114

5.2.2.12 (1-10)-GlcNAc-(10)-Amid (O12).....	117
5.2.2.13 NH ₂ -(1-8)-GlcNAc-(8)-Amid (O13)	120
5.2.3 Sulfatisierungen an der Festphase	123
5.2.3.1 Synthese von Trichloroethylchlorosulfat (TCES-Cl).....	125
5.2.3.2 Experimente mit TCES-Cl an GlcNAc-modifizierten Oligomeren	126
5.2.3.3 Versuch der Umsetzung von GlcNAc-N3 (2) mit TCES-Cl	127
5.2.4 Sulfatisierungen in Lösung	129
5.2.4.1 Klickreaktion von O7 mit sulfatisiertem GlcNAc-Azid (3).....	129
5.2.4.2 Klickreaktion von O8 mit sulfatisiertem GlcNAc-Azid (3).....	130
5.2.4.3 Sulfatisierungen mit Trimethylamin-Schwefeltrioxid	131
5.2.4.4 EDS-(2,4)-GlcNAc(3-6S)-(4)-Amid (O9-S).....	132
5.2.4.5 (1-6)-GlcNAc(3-6S)-(6)-Carboxyethylamid (O10-S)	140
5.2.4.6 (1-8)-GlcNAc(3-6S)-(8)-Amid (O11-S)	142
5.2.4.7 (1-10)-GlcNAc(3-6S)-(10)-Amid (O12-S).....	144
5.2.5 Sulfaisierung von Mannose- und Galactose-Polymeren	147
5.3 Biologische, biomedizinische und Inhibierungsstudien	149
5.3.1 Blutkoagulation, L-Selektininhibierung und Komplementaktivierung.....	149
5.3.2 HPV-Inhibierung und strukturelle Aktivierung.....	152
5.3.3 Cts1-, GST- und WGA-Interaktion mit Chitin- und O13-gecoateten Nickelbeads....	152
Anhang	156
6.1 Literaturverzeichnis.....	156
6.2 Abbildungsverzeichnis.....	163
6.3 Tabellenverzeichnis.....	167
6.4. Graphen und Spektren	168

Veröffentlichungen

Im Laufe dieser Doktorarbeit entstandene Publikationen:

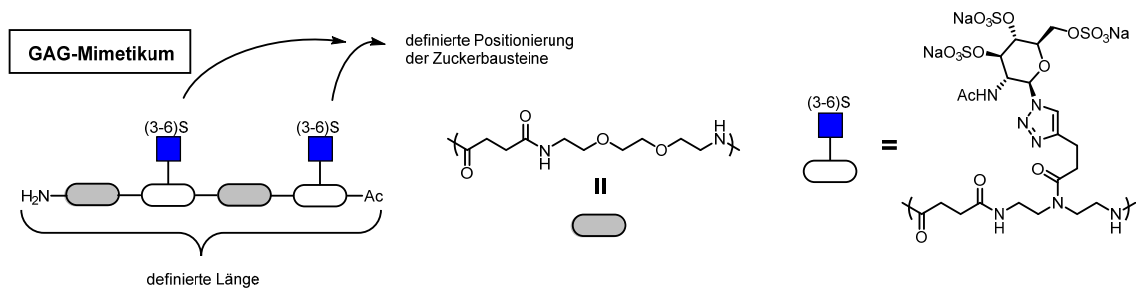
L. Soria-Martinez, S. Bauer, M. Giesler, S. Schelhaas, J. Materlik, K. A. Janus, P. Pierzyna, M. Becker, N. L. Snyder, L. Hartmann, *Journal of the American Chemical Society* **2020**:

“Prophylactic Antiviral Activity of Sulfated Glycomimetic Oligomers and Polymers”.

Eigenanteil: Synthese der TDS-, EDS- und GlcNAc-Azid-Bausteine nach literaturbekannten Methoden^[3-5]. Festphasensynthese aller GlcNAc-Glycooligomere, deren Aufreinigung und Charakterisierung mit Hilfe geeigneter, analytischer Methoden. Sulfatisierung aller GlcNAc-Oligomere, sowie aller Mannose- und Galactose-Polymere, Aufreinigung der Sulfate und deren Charakterisierung mit Hilfe geeigneter, analytischer Methoden.

Kurzzusammenfassung

Glycosaminoglycane (GAGs) sind eine wichtige Klasse bioaktiver Polymere. Es handelt sich um häufig stark sulfatisierte Polysaccharide, die sich auf den Oberflächen nahezu aller Zellen befinden und die an zahlreichen Prozessen etwa in der Zellerkennung und der Strukturgebung verschiedener Gewebearten von Bedeutung sind. Die Isolation natürlicher GAGs liefert in der Regel Mischungen von Molekülen unterschiedlicher Kettenlänge und Sulfatisierungsgrade sowie Verunreinigungen. Für ein besseres Verständnis der Struktur-Eigenschaftsbeziehung ist daher der Zugang zu definierten Strukturen wünschenswert. Die Vollsynthese der natürlichen Strukturen ist sehr aufwendig, eine Alternative bieten daher die sogenannten Glycomimetika.



Im Rahmen dieser Arbeit sollten Glycomimetika erzeugt werden, an denen auf einem synthetischen, linearen Gerüst sulfatisierte Monosaccharide in der Seitenkette positioniert sind. Als monodisperse Strukturen sind diese Mimetika weitaus besser definiert als ihre natürlichen Vertreter. Dies sollte durch eine Festphasensynthese nach Merrifield erreicht werden. Als Monosaccharid-Baustein wurde azidiertes N-Acetyl-D-Glucosamin (GlcNAc) verwendet, da GlcNAc bis auf Chondroitin in allen GAGs vorkommt. Dieser Baustein ermöglicht dann die Verknüpfung an alkinhaltigen Oligoamiden, die über etablierte Protokolle der sogenannten Festphasenpolymersynthese zugänglich sind, und liefert somit Zugang zu monodispersen, sequenzdefinierten GlcNAc-Oligomeren.

Eine Sulfatisierung war nötig, um die Strukturen weiter an ihr natürliches Vorbild anzugleichen. Hinsichtlich der Festphasensynthese ist die Sulfatisierung eine Herausforderung, da Sulfate in vielen Medien instabil sind, gerade bei den in der Festphasensynthese oft stark sauren Abspaltbedingungen. GlcNAc kann vor der Festphasensynthese, an der Festphase, oder nachdem ein GlcNAc-Oligomer bereits vollständig von der Festphase getrennt wurde sulfatisiert werden. Die einzelnen Schritte wurden im Rahmen dieser Arbeit etabliert und deren optimale Reihenfolge bewertet, um am Ende die gewünschten Strukturen zu isolieren.

Gute Ergebnisse wurden durch Festphasensynthese von GlcNAc-Oligomeren und deren anschließende Sulfatisierung in Lösung mit Hilfe eines Trimethylamin-Schwefeltrioxidkomplex erzielt. Die Analytik der gebildeten Sulfate stellte sich als herausfordernd heraus. ESI-MS Analysen führten bei hochgeladenen Strukturen zu starken Fragmentierungen. Die sulfatisierten Strukturen zeigten eine zu hohe Polarität für RP-HPLC-Methoden. SAX-HPLC Methoden führten zur Auftrennung der Strukturen, konnten wegen der starken Puffer allerdings nicht mit ESI-MS gekoppelt werden. IR-Spektroskopie war gut geeignet, um eine erfolgreiche Sulfatisierung zu verfolgen. Mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie konnten die Sulfatisierungen quantifiziert werden.

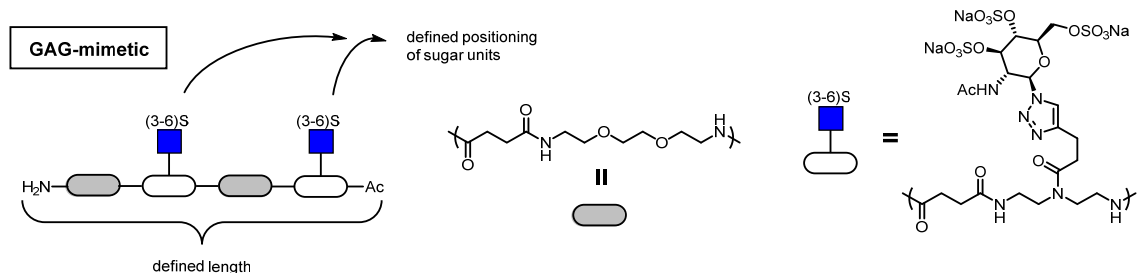
Die sulfatisierten GlcNAc-Oligomere wurden anschließend in Kooperation mit Partnern aus der Medizin und Virologie auf ihre biologische Aktivität und mögliche, biomedizinische Anwendungen getestet. Die Strukturen sind zum Beispiel in der Lage L-Selektin zu inhibieren. Weiterhin zeigen sich inhibitorische Effekte zum humanen Papillomavirus Typ 16 (HPV-16). Die Infizierung von HeLa-Zellen durch HPV-16 wird durch die synthetisierten Strukturen verhindert. Beim Vergleich mit höher geladenen Strukturen stellte sich allerdings heraus, dass die Inhibierung durch die niedermolekularen Oligomere jedoch weniger effizient ist als zum Beispiel die von Heparin als natürlichem GAG. Anders als Heparin zeigten die sulfatisierten Strukturen keinen Einfluss auf die Blutkoagulation, was aus therapeutischer Sicht durchaus vorteilhaft sein kann. Die sulfatisierten Oligomere zeigten weiterhin keinen Einfluss auf die Aktivierung des Komplementsystems.

In einem weiteren Projektteil und in Kooperation mit Partnern aus der Biologie wurde ein unsulfatisiertes GlcNAc-Oligomer mit NHS-aktivierten Nickelbeads gekoppelt (NHS = N-Hydroxysuccinimid), um seine Eigenschaft als Chitinmimetikum zu bewerten. Im Vergleich zu kommerziellen Nickelbeads, die Chitin auf der Oberfläche tragen, wurde hierbei die Effektivität einer Anbindung der Endochitinase Cts1 und dem Weizenkernagglutinin WGA untersucht. Die synthetisierte Struktur zeigte Affinität zu beiden untersuchten Proteinen.

Zusammenfassend konnten erfolgreich GAG-Mimetika auf Basis sequenzdefinierter, vollständig sulfatisierter GlcNAc-modifizierter Oligoamide hergestellt werden. Die gewonnenen Strukturen zeigten interessante biologische Eigenschaften etwa als Selektin-Inhibitoren oder Inhibitoren der viralen Adhäsion, wie sie auch von natürlichen GAG Strukturen bekannt sind. Basierend auf den hier gewonnenen Erkenntnissen zur Synthese und den Eigenschaften der GAG-Mimetika können nun weitere Variationen etwa bei der Länge und Valenz der Oligomere, aber auch bei der Positionierung der Sulfatgruppen vorgenommen und auf ihre Beeinflussung der resultierenden biologischen Eigenschaften untersucht werden. Solche Studien könnten dann langfristig auch der Entwicklung neuartiger antiviraler Wirkstoffe dienen.

Abstract

Glycosaminoglycans (GAGs) form an important class of bioactive polymers. They are typically highly sulfated polysaccharides, that can be found on the surface of almost every cell and contribute to many processes, such as cell-communication or structural development of certain tissues. Isolation of natural GAGs mostly leads to mixtures. These mixtures contain variations of polymer chain length or different degrees of sulfation. They also may show severe contaminations. To better understand structure-effect relationships of GAGs, access to better defined structures is desirable. Unfortunately, a total synthesis of natural structures is highly demanding. Therefore, glycomimetics are a suitable alternative.



Here, glycomimetics were synthesized, that contain sugar moieties as side chains on a defined synthetic scaffold. As monodisperse structures these mimetics are more precise than their natural counterparts. Monodispersity was achieved by solid phase synthesis (SPS), similar to the process established by Merrifield for peptide synthesis. In this work an azido N-acetyl glucosamine (GlcNAc) building block was used, as GlcNAc is a building block in all GAGs, except for chondroitine. With use of this building block and click-reaction onto alkyne-containing oligoamides readily available from previously established solid phase polymer synthesis protocols, monodisperse, sequence-defined GlcNAc-oligomers are now accessible.

In the next step, sulfation was necessary to then create the targeted GAG mimetics. Regarding solid phase synthesis, sulfation is quite challenging, because sulfates are fragile under many conditions, such as the strong acidic cleavage conditions, that are used within SPS. GlcNAc may be sulfated before the addition to the oligomeric scaffold, sulfated in attached form on solid phase or sulfated after the GlcNAc-oligomer has been completely removed from solid phase. The single steps for these different options were established and evaluated within this work and an optimized route was identified to yield and isolate the final structures.

Good results have been achieved after total cleavage of the GlcNAc-oligomers from solid support and their subsequent sulfation in solution. For this, a trimethylamine sulfurtrioxide complex was used. Analytics of the yielded sulfates, however, proved to be challenging. ESI-MS analysis caused severe fragmentation, especially with highly charged structures. RP-HPLC methods were not suitable as the sulfated structures showed too high polarity for the reversed phase chromatography. SAX-HPLC methods led to successful separation of the charged structures, but because of the strong buffers needed for these methods, subsequent ESI mass spectra could not be obtained. Finally, IR-spectroscopy was suitable to follow sulfation reaction and $^1\text{H-NMR}$ -spectroscopy allowed for quantification of sulfation.

Sulfated GlcNAc-oligomers were then tested for their biological activity and possible biomedic applications in collaboration with partners from medicine and virology. For example, the structures were able to inhibit the binding of L-selectin to its natural ligand. Furthermore, inhibitory effects could be shown towards human papillomavirus HPV-16. Here, the infection of HeLa-cells by HPV-16 was inhibited by the synthesized structures. However, comparing to structures with higher charge and length such as heparin, the smaller sized structures revealed to be less effective as inhibitors. Different to heparin, the sulfated GlcNAc-oligomers showed no influence on blood coagulation, which however may even prove useful from a therapeutical point of view. Further, the synthesized structures showed no influence on the complementary system.

In a second project and in collaboration with partners from biology, a non-sulfated GlcNAc-oligomer was coupled to NHS-activated magnetic nickel beads (NHS = N-hydroxy succinimide), to test its properties as a chitin mimetic. Compared to commercial nickel beads that are surface-modified by chitin the effectiveness of a binding to endochitinase Cts1 and wheat germ agglutinine WGA was investigated. The synthesized structure showed affinity to both proteins.

In conclusion, GAG-mimetics have been successfully synthesized on basis of sequence defined, completely sulfated GlcNAc-modified oligoamides. The yielded structures showed interesting biological properties such as selectin-inhibition or viral adhesion as it is known for natural GAG structures. Based on these findings towards synthesis and properties of GAG-mimetics a strategy can be developed for the variation of length or valency of the oligomers. In addition, changes in sugar positioning and orientation of sulfate groups can be done to investigate the influence on biological activities. Such studies can be first steps for the development of new antiviral therapeutics.

Abkürzungsverzeichnis

2CT	2-Chlorotrityl
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
AcCl	Essigsäurechlorid
AcOH	Essigsäure
AG	Arbeitsgruppe
AK	Arbeitskreis
Äq.	Äquivalente
CaCl ₂	Calciumchlorid
CBB	Coomassie Brilliant Blue
CDCl ₃	deutertes Chloroform
ConA	Concanavalin A
Cts1	Endochitinase Cts1
CuAAC	Kupferkatalysierte Alkin-Azid Klickreaktion (engl. Copper-catalyzed alkyne-azide clickreaction)
d.S.	Sulfatisierungsgrad (engl. degree of sulfation)
D ₂ O	deutertes Wasser
DABCO	1,4-Diazabicyclo(2.2.2)octan
DCM	Dichlormethan
DiPEA	Diisopropylethylamin
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMAP	N,N-Dimethyl-4-aminopyridin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO- <i>d</i> ₆	deutertes Dimethylsulfoxid
EDA	Ethylendiamin
EDS	Ethylendioxo-diaminoethyl-succinic acid
ESI-MS	Elektronensprayionisierung Massenspektroskopie
Et ₂ O	Diethylether
EXT1 und EXT2	Glycosyltransferasen EXT 1 und 2
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FT-IR	Fouriertransformations-Infrarotspektroskopie
FXa	Faktor Xa
GAG	Glycosaminoglycan
Gew.-%	Gewichtsprozent
GlcNAc	N-Acetyl-D-glucosamin
Gly	Glycin
GnT	N-Acetylglucosamintransferase
GST	Glutathion-S-Transferase
H ₂ O	Wasser
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HAS1, 2 und 3	Hyaluronansynthase 1, 2 und 3

HBr	Bromwasserstoffsäure
HeLa	Henrietta Lacks
Heparin dp2	Heparin Polymerisationsgrad 2 (engl. degree of polymerization)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure
HIT	Heparin-induzierte Thromozytopenie
HN3	Stickstoffwasserstoffsäure
HOBT	Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. high performance liquid chromatography)
HPV 16	Humaner Papillomavirus Typ 16
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration (engl. inhibitory concentration) bei der eine 50 %-ige Inhibierung vorliegt
ITC	Isotherme Titrationskalorimetry (engl. isothermic titration calorimetry)
k.I.	keine Inhibierung
LC	Flüssigkeitschromatographie (engl. liquid chromatography)
m/z	Masse-zu-Ladungswert
MALDI-TOF	Matrix assistierte Laser-Desorption-Ionisierung
MeCN	Acetonitril
MeOH-d4	deutiertes Methanol
MWCO	Molekulargewichtsgrenze (engl. molecular weight cut off)
N ₃	Azid
Na-ascorbat	Natriumascorbat
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazid
NaOAc	Natriumacetat
NB	Nickelbead(s)
NH ₂	Amin
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMR	Kernspinresonanz (engl. nuclear magnetic resonance)
OAc	O-Acetyl
OH	Hydroxy
PEG	Polyethylenglycol
pH-E.	pH-Elution
PTT	Partielle Thromboplastinzeit (engl. partial thromboplastic time)
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyridinophosphonium-hexafluorophosphat
R	Rest
RAM	Rinkamid
RICM	reflection interference contrast microscopy
RP-HPLC	Reversed phase high performance liquid chromatography
SAX	Starker Anionenaustausch (engl. strong anion exchange)
sLE ^x	Sialyl Lewis X
SO ₃	Schwefeltrioxid
SPC	Weiche kolloidale Probe (engl. soft colloidal probe)
SPS	Festphasensynthese (engl. solid phase synthesis)

STD	engl. saturation-transfer difference
s-Tyr	Tyrosinsulfat
TBA	tert-Butylammonium
TBACl	tert-Butylammoniumchlorid
TCA	Trichloroessigsäure (engl. trichloro acetic acid)
TCES	Trichloroethylsulfat
TCES-Cl	Trichloroethylchlorosulfat
TDS	Triplebond-diethylenetriamine-succinic acid
TFA	Trifluoroessigsäure (engl. trifluoro acetic acid)
TfEtOH	Trifluoroethanol
TG	Tentagel®
TMA	Trimethylammonium
TMA*SO ₃	Trimethylamin-Schwefeltrioxid
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trt	Trityl
UFH	Unfraktioniertes Heparin
UHMS	engl. Ultra high resolution mass spectroscopy
UMP	Uridinmonophosphat
Vol.-%	Volumenprozent
VWD	Variabler Wellenlängendetektor
WGA	Weizenkeimagglutinin WGA

Strukturverzeichnis

Nomenklatur

Zuckebausteine: Das Präfix bezeichnet die Art der OH-Gruppenmodifizierung (OAc: Acetylierung, S: Sulfatisierung). Der N₃-Suffix bezeichnet den Austausch der anomeren OH-Gruppe durch die Azidfunktionalität

Beispiel: OAc-GlcNAc-N₃; peracetyliertes, anomer-azidiertes GlcNAc

Oligomere: Das EDS-Präfix verdeutlicht, ob das Oligomer mit EDS-Spacern ausgestattet ist. Ein NH₂-Präfix weist auf einen ungekappten N-Terminus hin. Die erste Klammer bezeichnet die Positionierung der TDS Bausteine. GlcNAc oder TDS weisen auf einen GlcNAc-gekoppelten oder freien TDS-Baustein hin. GlcNAc erhält einen Suffix wenn OAc-geschützt oder sulfatisiert. Die letzte Klammer bezeichnet die Gesamtlänge des Oligomers. Der Gesamtsuffix bezeichnet die Art des C-Terminus.

Beispiel: EDS-(2,4)-GlcNAc-(4)-Aminoethylamid; Oligomer mit vier Wiederholungseinheiten. C-Terminus mit Aminoethylamid. N-Terminus durch Acetylschutzgruppe gekappt. EDS an Position 1 und 3, TDS mit gekoppeltem GlcNAc an Position 2 und 4. GlcNAc trägt freie OH-Gruppen.

- 1 OAc-GlcNAc-N₃: (2R,3S,4R,5R,6R)-5-Acetamido-2-(acetoxymethyl)-6-azidotetrahydro-2H-pyran-3,4-diyldiacetat
- 2 GlcNAc-N₃: N-((2R,3R,4R,5S,6R)-2-Azido-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-3-yl)acetamid
- 3 (3-6S)-GlcNAc-N₃: Natrium (2R,3R,4R,5R,6R)-5-Acetamido-6-azido-2-((sulfonatooxy)-methyl)-tetrahydro-2H-pyran-3,4-diyl bis(sulfat)

- 4 EDS: 1-(9H-Fluoren-9-yl)-3,14-dioxo-2,7,10-trioxa-4,13-diazaheptadecan-17-säure
- 5 TDS: 1-(9H-Fluoren-9-yl)-3,11-dioxo-7-(pent-4-ynoyl)-2-oxa-4,7,10-triazatetradecan-14-säure
- O1 (1)-GlcNAc-(1)-Amid
- O2 (1)-GlcNAc-(1)-Aminoethylamid
- O3 (1)-GlcNAc-(1)-Carboxyethylamid
- O4 EDS-(3)-GlcNAc-5-Amid
- O5 EDS-(2,4)-GlcNAc-(4)-Aminoethylamid
- O6 EDS-(2,4)-GlcNAc-(4)-Carboxyethylamid
- O7 EDS-(2,4)-TDS-(4)-Amid
- O8 (6)-TDS-(6)-Carboxyethylamid
- O9 EDS-(2,4)-GlcNAc-(4)-Amid
- O10 (1-6)-GlcNAc-(6)-Carboxyethylamid
- O11 (1-8)-GlcNAc-(8)-Amid
- O12 (1-10)-GlcNAc-(10)-Amid
- O13 NH₂-(1-8)-GlcNAc-(8)-Amid
- O9-S EDS-(2,4)-GlcNAc(3-6S)-(4)-Amid
- O10-S (1-6)-GlcNAc(3-6S)-(6)-Carboxyethylamid
- O11-S (1-8)-GlcNAc(3-6S)-(8)-Amid
- O12-S (1-10)-GlcNAc(3-6S)-(10)-Amid

Kapitel I

Einleitung

1.1 Glycosaminoglykane

1.1.1 Geschichte und Klassifizierung

Wir befinden uns in Baltimore, Maryland, im Jahre 1916. Die medizinische Forschung befindet sich im Aufschwung. Seit Ende des 19. Jahrhunderts konnten immer mehr Krankheitserreger für schreckliche Erkrankungen, wie Milzbrand^[6], Typhus^[7], Tuberkulose^[8], Pest^[9] oder Leukämie^[10], entdeckt werden. Doch die Maßstäbe der modernen Medizin sind noch lange nicht erreicht. Viele der uns heute gängigen Methoden und Therapien sind damals noch undenkbar. Der amerikanische Physiologe und langjährige Dekan der medizinischen Fakultät der Johns-Hopkins-Universität William Henry Howell ist intensiv mit der Forschung zur Erschließung neuer Möglichkeiten beschäftigt, die Gerinnung des menschlichen Blutes zu beeinflussen. Schon einige Jahre zuvor fand er Hinweise auf thromboplastisch (prokoagulant) aktive Phospholipide in bestimmten Zellgeweben^[11]. Die genaue Beschaffenheit dieser thromboplastischen Substanzen ist jedoch nicht geklärt und es herrscht Uneinigkeit gegenüber deren exakter molekularer Struktur^[12-16]. Auch über antikoagulante Naturstoffe ist zu dieser Zeit noch wenig bekannt.

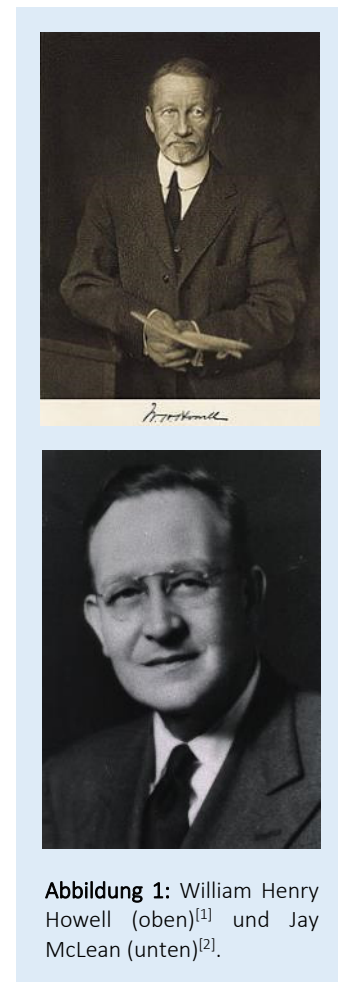


Abbildung 1: William Henry Howell (oben)^[1] und Jay McLean (unten)^[2].

Den besagten Substanzen wurde damals schon die Eigenschaft nachgesprochen die Gefahr vor Thrombosen durch ihren Einfluss auf die Blutgerinnung eindämmen zu können. Sie stellten somit ein wichtiges Instrument zur Erschließung der modernen operativen Medizin dar.

Zusammen mit seinem Medizinstudenten Jay McLean untersucht Howell zunächst Cephalin, eine Substanz der prokoagulante Eigenschaften durch die Aktivierung von Prothrombin nachgesprochen werden^[17]. In der Hundeleber findet McLean, wie er glaubt, Phosphatide mit bemerkenswerten Eigenschaften. Die antikoagulanten Eigenschaften dieser Phosphatide scheinen zunächst so einzigartig und gegensätzlich gängiger Meinungen zu Phospholipiden, dass vermutet wird, es handle sich um einen durch Verunreinigungen hervorgerufenen Effekt. Kritiker bezeichneten den Fund später sogar als nicht reproduzierbaren Zufall. Tatsächlich war McLean auch eher mit dem Versuch beschäftigt die Reinheit des prokoagulanten Cephalin zu optimieren. Howell und McLean selbst wussten nicht, dass es sich bei den antikoagulanten Substanzen um sulfatisierte Strukturen im Lebergewebe handelte. An Charles Best richtet sich McLean viele Jahre später und spricht davon, wie Howell zunächst daran zweifelte, dass McLean eine tatsächliche antikoagulante Substanz gefunden hat^[18].

„It was discovered ,incidentally‘ in the course of the problem but not ,accidentally‘.“

McLean beschreibt den Fund von Heparin als Resultat ausführlicher Arbeit an einem wissenschaftlichen Problem - nicht als Zufall, wie viele Kritiker behaupten.^[18]

McLean verließ die Johns-Hopkins-Universität und als Howell schließlich 1918 mit seinem Medizinstudenten Luther Emmett Holt Jr. ebenfalls eine antikoagulante Substanz isolieren kann, nennt er sie Heparin (altgr. *Hepar* „Leber“), abgeleitet von McLeans Fundort, obwohl sie sich von der von McLean gefundenen Substanz unterscheidet. Erstmals nicht als „Kontamination“ einer Aufreinigungsmethode für andere Naturstoffe isolierte Howell Heparin erst 1922 durch wässrige Extraktion^[19], welche er bis 1926 optimierte und auf dem *International Physiological Congress* vorstellte^[20]. Hier sprach er auch das erste Mal von einem wasserlöslichen Polysaccharid. Heparin wurde durch Protokolle von Charles Best, David Scott und Arthur Charles mit besserer Qualität aufgereinigt, um dessen Nebenwirkungen zu reduzieren und die Möglichkeit zu etablieren es als Therapeutikum vorzustellen^[21-24]. Im April 1937 wurde Heparin schließlich ohne Nebenwirkungen am Menschen eingesetzt^[25-26]. Zwischen der Entdeckung von Heparin und dessen ersten Einsatz am Menschen lagen also knapp über 20 Jahre. Es sollte noch weitere Jahre dauern, bis Heparin in den 1940er Jahren als Medikament eingeführt wurde^[27].

Die lange Wartezeit zwischen der ersten Entdeckung von Heparin und dessen klinischer Nutzung deutet bereits die Schwierigkeit in dessen Aufreinigung an. Ende der 40er Jahre meldeten

Monloney und Taylor ihre Methoden zur Aufreinigung von Heparin zum Patent an^[28]. Das aufbereitete Heparin wies hier erstmals gute Konzentrationen und Ausbeuten auf, auch wenn es noch als Rohprodukt vorlag. Es konnte nun durch kommerzielle Präparation in größeren Mengen vertrieben werden.

Doch nicht nur die Aufreinigung von Heparin erwies sich als herausfordernd. Analytische Methoden waren noch lange nicht so ausgereift, wie sie es heute sind und zudem oft lediglich auf Nachweisreaktionen beschränkt. So fand Howell erstmals Hinweise auf Glucuronsäure^[29], ehe Charles und Scott durch eine α -Naphtalinprobe ebenfalls die Existenz von Sacchariden beweisen konnten^[21-24]. Weitere von Howell, Charles und Scott angewandte Methoden waren die sehr ungenaue Lassaigue-Probe als Stickstoffnachweis oder Methoden zur Bestimmung des Aschegehalts. Die Reinheit von Heparin wurde weitestgehend mit dessen antikoagulanter Aktivität korreliert. Johan Erik Jorpes beschäftigte sich intensiver mit der chemischen Aufklärung von Heparin. Jedoch lieferten die altmodischen und für fragile Sulfate oft inadäquaten Methoden stark verfälschte Ergebnisse. Weiterhin ließ gerade der Anteil an gefundenen Proteinen auf noch stark verunreinigte Heparin-Fraktionen schließen^[30].

Erst in den späten sechziger Jahren wurden mildere Spaltreagenzien eingesetzt^[31-35], um Desulfatisierung, sowie Verkohlung zu vermeiden und Heparinfragmente durch schonende Methoden, wie Protonen-NMR^[36-37], untersucht. So konnte erstmals die Hauptsequenz aus 2-Sulfato-iduronsäure und N,6O-Disulfato-glucosamin (**Abbildung 2**) mit präzisen Angaben der Sulfatisierungsstruktur erschlossen werden^[38]. Des Weiteren wurde klar, dass die Art der Zucker und Positionierung der Sulfate stark davon abhängt, welches Gewebe untersucht wird und ob es sich um Säugetier- oder aquatisches Gewebe handelt^[39]. Die NMR-spektroskopischen Untersuchungen wurden von Perlin et al. durchgehend betrieben. Daraus wurde schließlich klar, dass die obengenannte Hauptsequenz bei Rindergewebe 85% und bei Schweinen 75% der Gesamtstruktur ausmacht. Die restlichen Zwischensequenzen werden überwiegend von D-Glucuronsäure und 6O-Sulfato-N-Acetylglucosamin ausgefüllt^[40]. In der Summe ergeben sich so etwa 2,7 Sulfate pro dimerer Wiederholungseinheit und eine totale Ladung von durchschnittlich -75, bei Molmassen von 5-40 kDa^[41-43]. Damit handelt es sich bei Heparin um die höchste, natürlich vorkommende negative molekulare Ladungsdichte^[42]. Das Heparingerüst zieht sich dimensional hauptsächlich in einer helikalen Form auf. Zudem kann eine sehr stark weniger sulfatisierte Form namens Heparansulfat (HS) beschrieben werden, welche sich auf den Oberflächen nahezu aller natürlichen Zellen, in Form eines Proteoglycans, befindet.^[44]

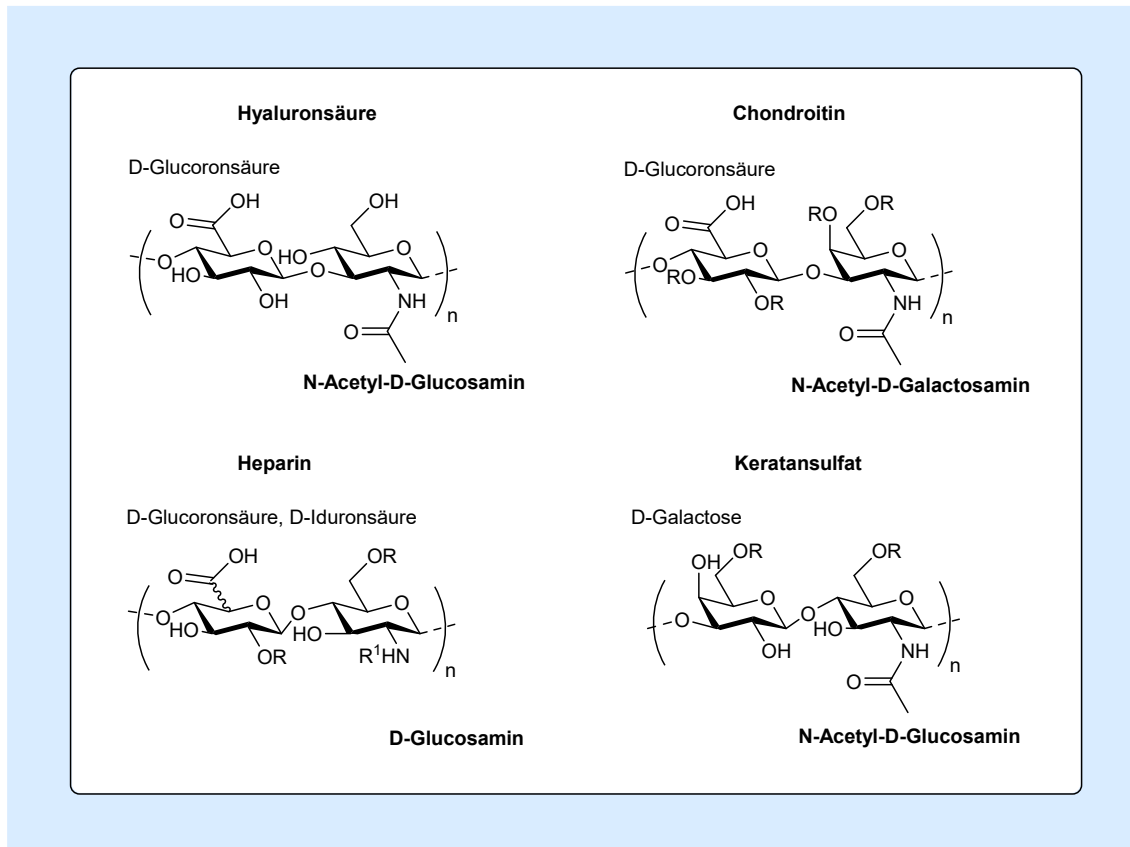


Abbildung 2: Vier Hauptklassen der Glycosaminoglykane.

Weitere Glycosaminoglykane (GAG, *plural* GAGs), also Glucosamin enthaltende und aus dimeren Wiederholungseinheiten aufgebaute Polysaccharide sind Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat und Keratansulfat (**Abbildung 2**). Anders als Heparin wurden sie nicht aufgrund ihrer biologischen Aktivität entdeckt, sondern zunächst als strukturelle Elemente in Knorpel, Bindegewebe oder Bandscheiben identifiziert. Es wurde davon ausgegangen, dass die GAGs hauptsächlich dazu dienen, den extrazellulären Raum strukturgebend auszufüllen^[45]. Der deutsche Biochemiker und Mediziner Karl Meyer gilt als einer der Pioniere im Bereich der Glycosaminoglykane. Ihm gelang es mit verschiedenen Kollegen mehrere Strukturen im Bindegewebe und der extrazellulären Matrix aufzuklären. Meyer et al. entdeckten unter anderem die GAG-Strukturen Hyaluronsäure und Keratansulfat. Chondroitinsulfat wurde tatsächlich schon Ende des neunzehnten Jahrhunderts beschrieben und von Levene und La Forge detailliert untersucht^[46-47]. Meyer et al. gelang die erstmalige Isolierung von Chondroitinsulfat B und zusätzlich die strukturelle Unterscheidung zwischen Chondroitinsulfat A und C^[48-52]. Keratansulfat wurde 1939 von Suzuki beschrieben, bevor Meyer et al. es genauer untersuchten^[53].

Zusammenfassend für diesen Abschnitt kann man feststellen, dass die Entdeckung nahezu aller GAGs interessanterweise auf strukturelle Untersuchung von spezifischem, meist tierischem Gewebe, zurückzuführen ist. Durch die stetig modifizierte Isolation der Substanzen und technisch immer moderner werdende Analysemethoden war es möglich, die komplizierten Naturstoffe mit hoher Präzision zu beschreiben. Daraus wird heutzutage die Möglichkeit geschaffen diese Substanzen auf synthetischem Wege nachzustellen, um mehr über natürliche Bindungen verstehen zu können, ohne den negativen Einfluss der Kontaminationen zu erleiden, welche sich in den meisten GAG-Fractionen finden. Für das Verständnis ihrer Wirkungsweise ist es unerlässlich, sich mit der synthetischen Nachstellung natürlicher Glycosaminoglykane und deren Bindungsmechanismen zu ihren spezifischen Substraten auseinanderzusetzen.

1.1.2 Biosynthese

Glycosaminoglykane werden, bis auf Hyaluronsäure, im Golgi-Apparat oder im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert. Die Anordnung der typischen dimeren Zuckerstruktur des Heparansulfats aus Uronsäure und (N-Acetyl)glucosamin lässt sich auf drei verschiedene enzymatische Kategorien zurückführen. Glycosyltransferasen EXT-1 und EXT-2 sind für die Seitenkettenanlagerungen der Saccharide verantwortlich. Sie liegen als stabiler, heterodimerer Komplex im Golgi-Apparat vor^[54-56]. Drei verschiedene Sulfotransferasen (N-Deacetylase-N-sulfotransferase, 2-O-, 3-O- und 6-O-Sulfotransferase) sind für die Sulfatisierung und Epimerase für die Umwandlung der Uronsäuren verantwortlich^[57-58]. Durch Komplexbildung der Enzyme ist es wahrscheinlich, dass stets mehrere Saccharide gleichzeitig modifiziert werden. Dadurch entstehen, je nach Zelltyp und Organismus, zahlreiche verschiedene Variationen an Zuckersequenzen^[59]. Bei Heparin und Heparansulfat entstehen durch fünf verschiedene Umwandlungsmöglichkeiten im Disaccharid (Epimerisierung, 2-O, 3-O, 6-O, sowie N-Sulfatisierung) 32 unterschiedliche strukturelle Möglichkeiten (2^5)^[44]. Das geringer sequenzierte, jedoch höher sulfatisierte, freiliegende Heparin wird durch die gleichen Enzyme in Mastzellen synthetisiert^[60-62].

Die Startsequenz und Kettenbildung, sowie deren gleichzeitige Sulfatisierung bei Chondroitinsulfat geschieht auf gleiche Weise, wie bei Heparansulfat, jedoch unterscheiden sich die Enzyme. Die Sequenzierung der Saccharide geschieht durch Transferasen von Galactose und

Uronsäure, wohingegen die Sulfatisierung durch spezifische Chondroitin-sulfotransferasen ausgeführt wird. Eine N-Sulfatisierung findet, wie bei allen GAGs außer Heparin, nicht statt^[63].

Auch die Biosynthese von Keratansulfat kann durch diese Prozesse beschrieben werden. Die spezifische β 4-Galactose wird durch sieben verschiedene Galactosyltransferasen angebaut^[64-65]. Die N-Acetylglucosamintransferase (GnT) von Keratansulfat ist noch nicht einstimmig aufgeklärt, jedoch wird eine entscheidende Rolle der β 3Gn-T7, erstmals von Seko und Yamashita, beschrieben^[66-67]. Für die Sulfatisierung konnten verschiedene Enzyme beschrieben werden^[68-70].

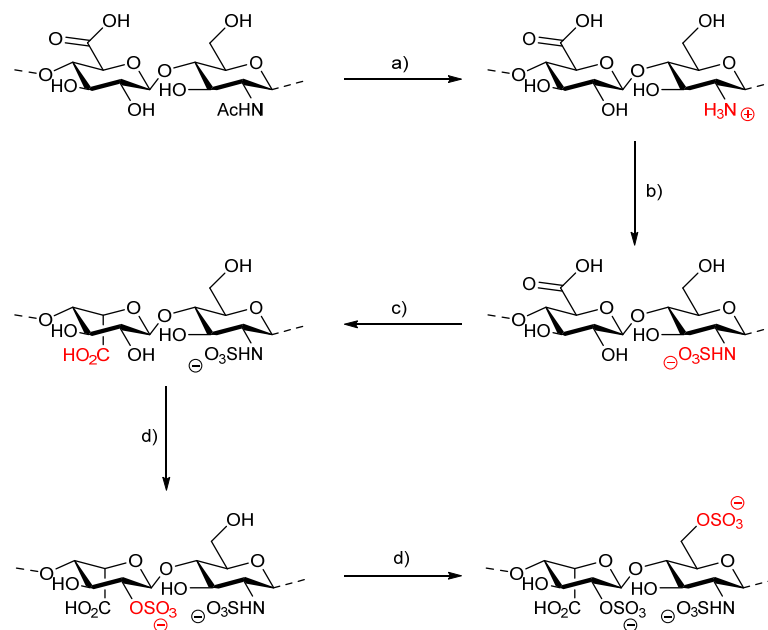


Abbildung 3: Nach Lindahl et al. randomisierte, posttranslationale Modifikation von Heparin-Proteoglykanen^[71]. (a) N-Deacetylase (b) N-Sulfotransferase (c) Uronosyl-C5-Epimerase (d) O-Sulfotransferase.

Hyaluronsäure wird als einziges GAG nicht im Golgi-Apparat synthetisiert, sondern im zellulären Plasma. Hier wird es mit den Bausteinen Uridinmonophosphat(UDP)-Glucuronsäure und UDP-N-Acetylglucosamin durch Hyaluronansynthase Isoenzyme aufgebaut (HAS1, 2 und 3). Die UDP-Saccharide dienen jedoch nicht nur als Basis für das Hyaluronsäure Grundgerüst. Sie spielen ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der HAS-Synthesen und deren Enzymatischer Aktivität und Stabilität^[72-74].

1.1.3 Biologische Aktivität

Die wohl entscheidendste Eigenschaft des Heparins ist dessen Möglichkeit Antithrombin III zu binden und zu aktivieren. Dies führt zu einem indirekten Einfluss auf die Blutgerinnungskaskade und gerinnungshemmende Eigenschaften durch Hemmung des Faktors Xa. Lindahl et al., die sich auch mit der Strukturaufklärung von Heparin befassten waren darum bemüht herauszufinden, welche Sequenzen von Heparin bei der Antithrombin-Bindung eine entscheidende Rolle spielen. Zu Zeiten, in denen kommerzielles Heparin lediglich in 50% der Fälle aktiv war, brachen sie Heparin auf ein Octamer mit hoher Aktivität herunter^[75]. Diese frühe Erkenntnis ließ auf die Frage schließen, ob vom ganzen Heparingerüst lediglich gewisse Sequenzen für eine hohe Bindungsstärke zu Antithrombin III sorgen. Choay et al. beschäftigten sich ebenso mit dieser Fragestellung^[76-77]. In selektiven Synthesen mit bis zu 80 Einzelschritten gelang es ihnen hochaktive Pentasaccharide zu entwickeln, mit dem entscheidenden Schritt durch eine Methylierung des anomeren Endes Stabilität zu gewinnen und unspezifische Bindungen zu vermeiden^[78-79]. Diese Entdeckung führte zu einem starken Fokus auf die Erschließung eines optimierten, synthetischen Pentasaccharids^[80] und letztendlich zur Substanz Fondaparinux^[81], welche zu einem „Paradigmenwechsel in der Antikoagulation“^[82] führte (**Abbildung 4**).

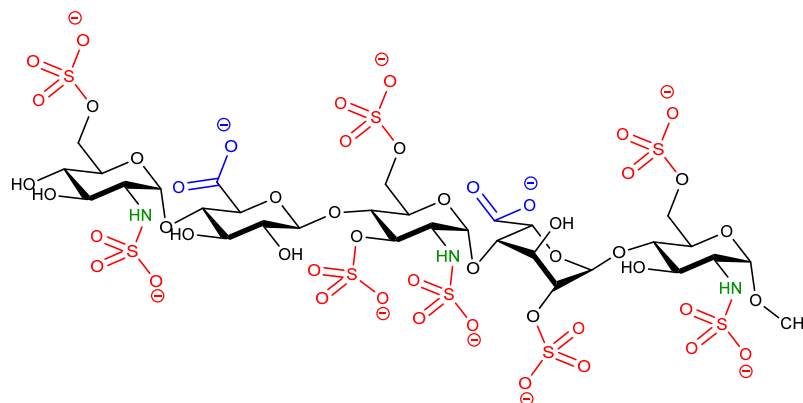


Abbildung 4: Das hochaktive Pentasaccharid Fondaparinux. Hervorgehoben sind die Sulfatgruppen (rot), Stickstoffatome des Glucosamins (grün) und Carbonsäuren (blau).

Dieses hochgeladene Fragment von Heparin mit insgesamt zehn negativen Ladungen bildet also die Hauptbindungsdomäne aus und ist gleichzeitig die Ursache dafür, dass unfraktioniertes Heparin (UFH) mit geringen Konzentrationen dieser Sequenz die vorher genannte, schlechte

Aktivität besitzt. Bei UFH (3000 - 30.000 Da) führen viele dieser Domänen zu einer multivalenten Wirkung mit Hemmungen des Faktors Xa (FXa) und Thrombin, wobei jedoch Effizienz durch nicht-bindende Teile stark schwankt und insgesamt schwach ausfällt. Niedermolekulares Heparin (NMH, 1000 - 10.000 Da) hat eine höhere Effizienz, doch nur Fondaparinux ist in der Lage FXa spezifisch zu hemmen^[82].

Aufgrund der aufwendigeren Gewinnung der fraktionierten Heparine wird jedoch immer noch UFH zur breiten Anwendung von u.a. Thrombose- und zur Embolieprophylaxe, sowie bei Herzinfarkten oder Dialyse verwendet. Doch durch die hohe Varietät der hochmolekularen Heparine und der unspezifischen Wirkung kann es immer zu Komplikationen bei der Therapie kommen, insbesondere einer Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT), welche die Anzahl an Thrombozyten nachhaltig beeinträchtigt^[83-85]. Durch die Gewinnung aus tierischem Gewebe kann es immer wieder zu Kontaminationen und nachteiligen Effekten kommen^[86-87]. Außerdem kann die Dosis für jeden Patienten zu unterschiedlichen Wirkungen führen^[88-90]. Dies führt dazu, dass sich der Patient im besten Fall unter ständiger Aufsicht während der Therapie befinden sollte.

Trotz der strukturellen Verwandtschaft von Chondroitin mit Heparin, erhielt dieses in der Regel weniger Aufmerksamkeit in der Forschung. Dennoch können der Struktur zahlreiche signalgebende Wirkungen und Einflüsse in der Entwicklung des Zellgewebes, Organen und der Zellteilung nachgewiesen werden^[91].

Auch Hyaluronsäure besitzt neben strukturgebenden Einflüssen außerordentliche, signalgebende Eigenschaften. Das Molekulargewicht entscheidet maßgeblich darüber, ob zum Beispiel die Zellvitalität erhöht wird, oder ob es gegensätzlich zu Entzündungen kommen kann^[72].

Die zahlreichen Sulfatisierungen sorgen für eine außerordentliche Feuchtevermittlungsfähigkeit von GAGs, wie Keratansulfat, welches in erster Regel für die Hydratation des Gewebes verantwortlich ist^[92-93]. Insbesondere für die Pufferung des Hornhautgewebes ist die Struktur von außerordentlicher Wichtigkeit. Veränderungen der GAG-Konzentrationen führen zur makulären Hornhautdystrophie^[94]. Für andere Zellstrukturen hat Keratansulfat im Gegensatz zu den anderen GAGs jedoch eine untergeordnete Rolle^[66].

Die biologische Aktivität und signalgebende Wirkung der Glycosaminoglykane ist ausgesprochen weitreichend. GAGs binden zu einer Vielzahl unterschiedlicher Proteine^[95]. Die biologische Aktivität der GAGs macht sie für therapeutische Anwendungen interessant. Neben der beschriebenen antikoagulanten Wirkung bieten die Glycosaminoglykane zahlreiche, wichtige therapeutische Effekte an. Chancen zur Anwendung finden sich unter anderem in der Behandlung

von neurodegenerativen Krankheiten, wie multipler Sklerose^[96], sowie in der Geweberegeneration^[97] oder Krebstherapie^[98]. Gerade Heparin besitzt eine hohe Vielseitigkeit in der therapeutischen Anwendung und beeinflusst unter anderem die Aktivität des humanen Papillomavirus (HPV), welcher für Gebärmutterhalskrebs verantwortlich ist. HPV-Typ-16 benötigt proteoglycane Heparansulfat um Bindungen mit Wirtszellen einzugehen^[99]. Heparin-Oligosaccharide können außerdem entzündungshemmend wirken, da sie L- und P-Selektin binden, welche für die Steuerung von Entzündungsreaktionen verantwortlich sind.^[100]

1.1.4 GAG-Mimetika und deren Anwendung in der Biologie

Da die große Varietät in der Struktur von GAGs zu starken Abweichungen und unspezifischem Verhalten führen kann, herrscht großes Interesse in der Synthese von definierten Molekülen, die in der Lage sind, das Verhalten der Glycosaminoglykane zu imitieren. Diese GAG-Mimetika können von den natürlichen Strukturen abgeleitet werden. Idealerweise haben diese Strukturen ähnliche, oder sogar verbesserte biologische Eigenschaften bei einfacherer Zugänglichkeit, bieten erhöhte Stabilität an und können durch ihre Synthesestrategie in der Lage sein, niedrige Dispersitäten, oder biologische Abbaubarkeit zu generieren. Des Weiteren kann das polymere, sowie oligomere Rückgrat der Strukturen kontrolliert werden^[101].

Solche GAG-Mimetika können beispielsweise durch synthetische Gerüste, wie Polymere oder Dendrimere aufgebaut werden, welche mit einer Varietät an säurebasierten Anionen ausgestattet sind, um wie bei den GAGs, negative Ladungen zu erzeugen. Hohe Anionendichten können auch durch einfache Sulfonsäure-Homopolymere dargestellt werden, wie von Liekens et al. gezeigt^[102-103]. Deren Fähigkeit GAG-ähnliche Faktoren zu beeinflussen zeigt, dass eine Präsentation von Carboxylgruppen oder Sulfaten auf spezifischen Sacchariden nicht zwangsläufig notwendig ist und dass negative Ladungen für Bindungsmechanismen zu diversen Proteinen ausreichend sein können. Ähnliche Strukturen wurden von Sangaj et al.^[104] und Nguyen et al.^[105] untersucht. Weitere strukturelle Ähnlichkeiten zu GAGs, insbesondere als Heparinmimetika, konnten durch die Implementierung von Carbonsäuren^[106-110] oder anhängende Zuckerderivate^[111-123] erzielt werden (**Abbildung 5**). Es konnte gezeigt werden, dass anionische Dendrimere interessantes biologisches Verhalten haben, insbesondere bei der Inhibierung von L-Selektin^[124] und dass sie vielversprechendes Potential bei der Nanomedizin beinhalten^[125].

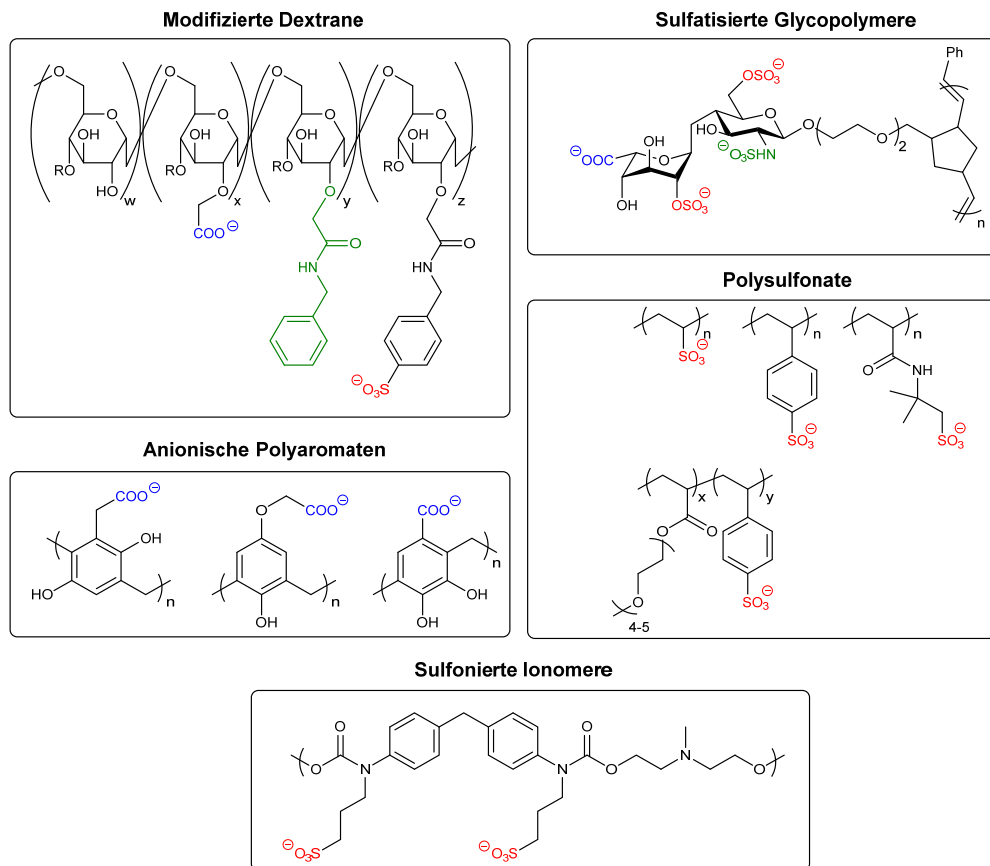


Abbildung 5: Beispiele von GAG-Mimetika Polymeren. In Anlehnung an: Paluck et al. "Heparin-Mimicking Polymers: Synthesis and Biological Applications".^[101]

Jedoch bleibt die Frage offen, wie präzise die Präsentation von negativen Ladungen und Zuckern, wie sie durch die Festphasensynthese erreicht werden kann (Kapitel 1.2.2), bestimmte Bindungsmechanismen beeinflussen kann. In der Literatur finden sich wenig Beispiele für die Festphasensynthese von GAG-Mimetika. Bei der festphasenvermittelten Synthese von sulfatisierten Peptiden aus natürlichen Aminosäuren konnte ein erheblicher, spezifischer Einfluss auf die, für die Signalisierung wichtigen, vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren gefunden werden^[126]. Da es sich bei festphasensynthetisierten Molekülen um sehr genau definierte Strukturen handelt, besteht die Möglichkeit Struktur-Wirkungsbeziehungen mittels nachgestellter GAG-Domänen genauer zu untersuchen. Um eine höhere strukturelle Verwandtschaft zu natürlichen GAGs zu schaffen, können synthetisierte Gerüste mit Sacchariden modifiziert werden. Diese sogenannten Glycooligomere werden im Folgenden genauer beschrieben.

1.2. Glycooligomere

1.2.1. Hintergründe

Eine Methode zur Synthese hochpräziser und monodisperser GAG-Mimetika könnte die Möglichkeit eröffnen eine Bibliothek vielseitiger Strukturen zu generieren, um wichtige Fragen in Bezug auf Struktur-Wirkungs-Beziehungen beantworten zu können. Zur Synthese von monodispersen, sequenzdefinierten Glycooligomeren durch die Festphasensynthese (*engl.* SPS: solid phase synthesis) existieren etablierte Protokolle. Monodispersität beschreibt die Eigenschaft von Polymeren und Oligomeren, dass alle Einzelmoleküle die gleiche Größe, beziehungsweise Kettenlänge besitzen. Sequenzdefinition beinhaltet die Möglichkeit, die genaue Positionierung der einzelnen Monomere im poly- oder oligomeren Rückgrat zu bestimmen.

Die Stufenweise Anordnung von maßgeschneiderten Synthesebausteinen an der Festphase führt zu Oligoamiden an denen analog eine Funktionalisierung mit Zuckerliganden stattfinden kann. Diese Strategie erlaubt es strukturelle Parameter, wie der Anzahl, Positionierung und der Art des Liganden entlang des oligomeren Rückgrats, sowie deren Zusammensetzung oder Architektur zu bestimmen^[3, 127-130].

Solche Glycooligomere können zu systematischen Studien zu Bindungsaffinitäten und -aviditäten, beispielsweise hinsichtlich des Modell-Lektins Concanavalin A (ConA) genutzt werden, doch darüber hinaus auch zur Erschließung neuartiger, bioaktiver Materialien. Insbesondere in Hinblick auf synthetische Impfstoffe oder antibakterielle Substanzen bieten sich therapeutische Chancen^[131-133].

In dieser Arbeit soll die Strategie der Festphasensynthese genutzt werden, um monodisperse, sequenzdefinierte Glycooligomere herzustellen, welche als GAG-Mimetika gesehen werden können. Dazu sollen etablierte Protokolle verwendet und anschließend gezielt modifiziert werden. Diese Protokolle werden im Weiteren genauer beschrieben.

1.2.2 Festphasensynthese

Hintergrund

Die Festphasensynthese entwickelte sich in den sechziger Jahren aus dem Anspruch heraus, Proteine und Peptide auf synthetischem Wege nachzustellen. Der amerikanische Chemiker Robert Bruce Merrifield führte die nach ihm benannte Synthese erstmalig zielführend zur Synthese eines Tetrapeptids ein^[134]. Bei der heterogenen Synthese werden die Bausteine der Stufenwachstumsreaktion an ein nicht gelöstes, polymeres Konstrukt, das sogenannte Harz, addiert. Vorteile dabei sind, dass die Wachstumsreaktion pro Syntheseschritt nur um eine Stufe erweitert wird und unerwünschte Polymerisationen nicht stattfinden können. Bei Aminosäuren wird hierbei in der Regel das Amin mit einer Schutzgruppe versehen. Weiterhin können unerwünschte Nebenprodukte und Überschüsse durch Waschen und Filtrieren unproblematisch verworfen werden. Zur Generierung hoher Reinheiten müssen große Überschüsse genutzt werden, um vergleichsweise geringe Ausbeuten zu erhalten. Dies macht die Methode nicht sonderlich effizient. Dennoch ist sie unverzichtbar zur synthetischen Erzeugung monodisperser und sequenzdefinierter Verbindungen^[135]. Merrifield, dem unter anderem mit Bernd Gutte die Synthese der Ribonuklease A aus 124 Aminosäuren gelang^[136], erhielt für seine Forschungen 1984 den Nobelpreis in Chemie.

Die altbekannte Synthese, welche früher zur Abspaltung des synthetisierten Produktes vom Harz harsche Bedingungen mit Substanzen, wie Fluorsäure, benötigte, wurde bereits vielfach erweitert. Bei der Wahl des Harzes kann mittlerweile auf zahlreiche, kommerzielle Systeme zurückgegriffen werden. Zur Synthese von monodispersen, sequenzdefinierten Glycooligomeren können vorzugsweise Tentagel®-Harze (Fa. RAPP Polymere) mit guten Quellungseigenschaften in organischen Lösungsmitteln und unterschiedlichsten Linkern eingesetzt werden, um die synthetischen Bausteine effizient zu koppeln.

Bausteine

Als Bausteine zur etablierten Synthese von Glycooligomeren dienen das alkinhaltige TDS (*engl.*: triplebond-diethylenetriamine-succinic acid), an welches durch die Alkingruppe mittels Kupfer-Klick Reaktion Zucker ligiert werden können. EDS (*engl.*: ethylenedioxi-diethylenamine-succinic

acid) dient als flexibler Spacer, um das Gesamtkonstrukt beweglicher und hydrophiler zu machen^[3]. Die Bausteine werden aus den entsprechenden Aminen gewonnen. TDS startet mit Diethylentriamin welches durch die außerordentlich große, aromatische Tritylkomponente selektiv und primär geschützt werden kann (**Abbildung 6**). Ethyltrifluoroacetat eignet sich für die gezielte Aminolyse mit Hilfe des zweiten primären Amins (a). Als weiterer Schritt kann nun das Alkin über 4-Pentinsäure eingeführt werden (b). Letztendlich wird das Trifluoroacetat durch die festphasenkompatible Fmoc-Schutzgruppe ausgetauscht (c) und die Bernsteinsäure eingeführt (d, e). Beim EDS Baustein können die Schritte (b) bis (e) eingespart werden, da dieser nicht über eine zusätzliche funktionelle Gruppe verfügt. Hier wird der tritylierte Baustein direkt Fmoc geschützt und succiniert. Die Fmoc-Schutzgruppe ist nötig, da sonst der Baustein während der Festphasensynthese polymerisieren kann und nicht mehr sukzessive an das Harz gebracht werden kann.

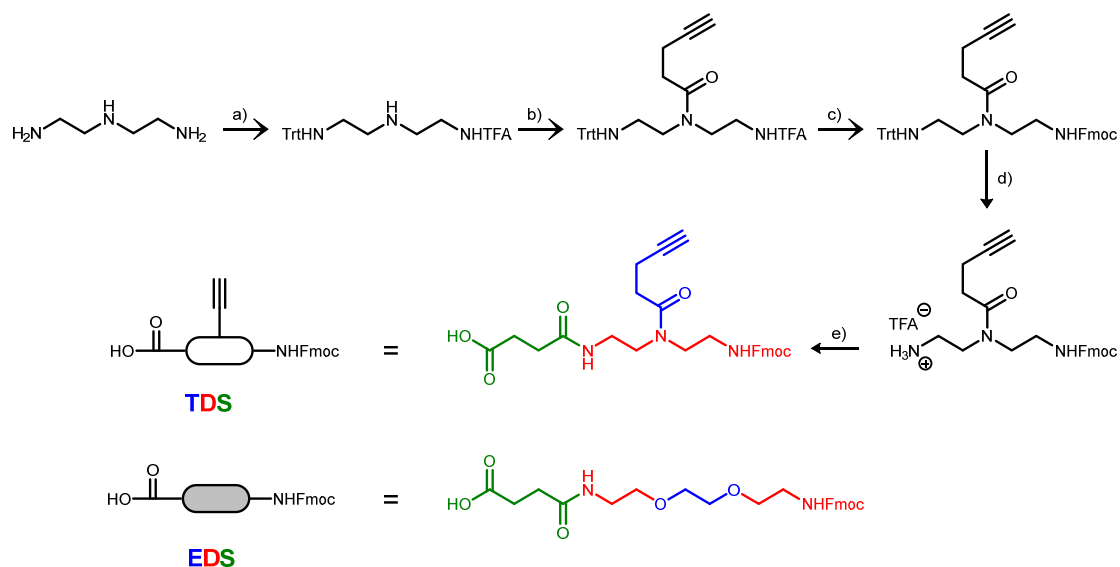


Abbildung 6: Synthese von TDS. (a) Trt-Cl, TFAOEt (b) 4-Pentinsäure + PyBOP (c) KOH in MeOH, Fmoc-Cl (d) Trifluoroessigsäure (e) Bernsteinsäureanhydrid, Triethylamin. Analog EDS.^[3]

In dieser Arbeit sollen aus den Bausteinen TDS und EDS oligomere Grundgerüste zur Herstellung von Glycosaminoglycan-Mimetika aufgebaut werden. Dafür sollen, wie in literarischen Beispielen, azidierte Zuckerderivate hergestellt werden. Diese Art der Festphasensynthese wurde bereits erfolgreich zur Ligation verschiedener, azidierter Zucker verwendet, unter anderem Mannose^[3], Galactose^[137] oder Fucose^[138] und sie ist nahezu beliebig auf eine Vielzahl azidierter Derivate anwendbar.

Festphasensynthese von Glycooligomeren

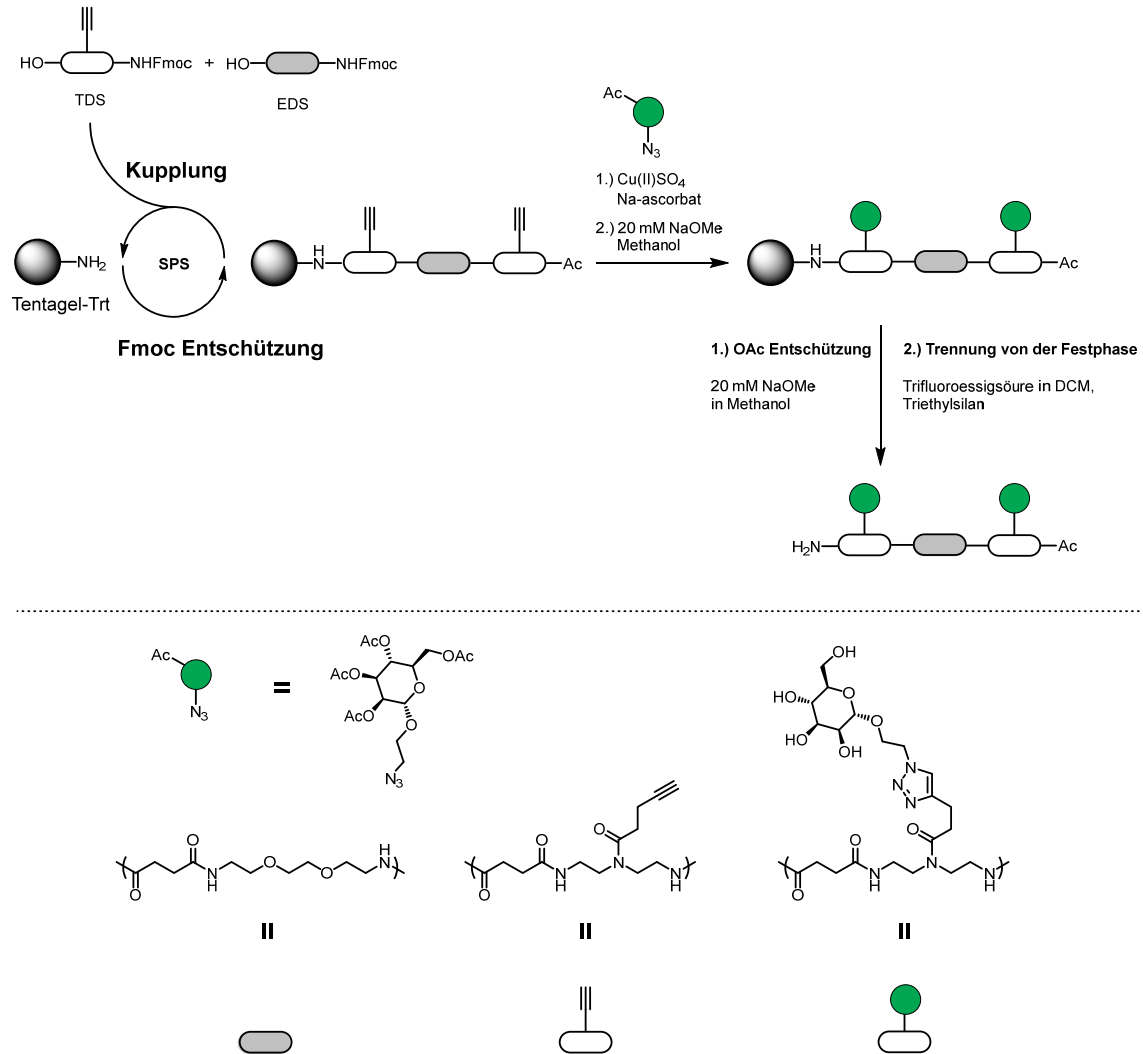


Abbildung 7: Festphasensynthese von Glycooligomeren. Beschrieben anhand eines Mannoseglycooligomers nach Ponader et al.^[3].

Zur Festphasensynthese von Glycooligomeren (**Abbildung 7**) wird zunächst der C-Terminus der gewünschten Verbindung kovalent an das Harz gebunden. Im gezeigten Beispiel geschieht dies durch einen Tritylchloridlinker am Tentagelharz, welcher zunächst mit Ethylendiamin funktionalisiert wird. Alternativ kann auch ein Fmoc-geschütztes Tentagel S[®] RAM Harz (RAM = Rinkamid) durch Piperidin entschützt werden, um das notwendige Amin freizusetzen. Nun kann der erste Baustein durch die Carbonsäure mit Aktivierungsreagenzien, wie Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat (PyBOP), an das freie Amin

gekuppelt werden. Als Beschleuniger können überschüssiges Hydroxybenzotriazol (HOBt) und nicht-nucleophile Basen, wie Diisopropylethylamin (DIPEA) eingesetzt werden.

Nach der Kupplungsphase wird das Harz gewaschen. Hierbei werden überschüssiger Baustein, HOBt, DIPEA, PyBOP und das aus PyBOP gebildete, stabile Phosphorsäuretriimid entfernt. Nach der Kupplung wird die Fmoc-Schutzgruppe entfernt und der nächste Kupplungsschritt kann erfolgen. So ergibt sich für die Festphasensynthese ein kontinuierlicher Kreislaufprozess bis zur gewünschten Kettenlänge und Sequenz. Nach Abschluss dieser Einzelschritte wird der N-Terminus in der Regel mit der stabilen Acetylgruppe gekappt.

Die Ligation des azidierten Zuckers geschieht durch die kupferkatalysierte Azid-Alkin Klickreaktion (*engl.*: copper-catalyzed azide-alkyne clickreaction, CuAAC). Die Art der Klickchemie wurde 2001 konzeptionell von Kolb, Finn und Sharpless definiert^[139]. Die in dieser Arbeit verwendete CuAAC wurde von Huisgen als unkatalysierte Variante etabliert^[140], wirklich herausragend funktioniert sie allerdings erst unter Einsatz einer Kupfer(I)-Spezies. Der genaue Ablauf der Reaktion war lange Zeit umstritten. Tatsächlich handelt es sich nicht um eine klassische Cycloaddition, welche konzertiert und ohne Zwischenprodukte abläuft. Rostovtsev et al. postulierten 2002 einen allgemein anerkannten Mechanismus^[141].

Nach der vollständigen Synthese wird die Verbindung vom Harz abgespalten, zum Beispiel durch Trifluoroessigsäure und ein Silan, welches mit dem Harz reagiert, um Salzbildung zu vermeiden. Das abgespaltene Oligomer kann ausgefällt werden (Diethylether) und je nach Bedarf präparativ aufgereinigt werden.

1.3 Sulfatisierungen

Wie beschrieben, bedient sich die Natur enzymatischer Mechanismen, um sulfatisierte Strukturen zu erzeugen. In der organischen Synthese bietet sich jedoch der direkte Weg an, um eine OH-Gruppe in die negativ geladene OSO₃-Gruppe zu überführen. Additiv setzt sich diese Funktionalität aus Alkohol und dem gasförmigen Schwefeltrioxid (SO₃) zusammen, beziehungsweise Alkohol und Schwefelsäure unter Abscheidung von Wasser. Diese aggressiven Substanzen sind allerdings im Labor nicht leicht handzuhaben und können aufgrund ihrer stark exothermen Reaktivität unerwünschte Nebenreaktionen verursachen. Gerade bei Kohlenhydraten, welche in dieser Arbeit eingesetzt werden sollen, zeichnen sich durch diese

Substanzen Verkohlungsreaktionen ab. Grund der unerwünschten Reaktionen ist die generelle Instabilität der Sulfate gegenüber sauren Bedingungen und hohen Temperaturen, auch bei den beschriebenen, natürlichen Sulfaten, wie Heparin^[142-143]. Einmal sulfatisierte Strukturen verlieren durch die labilen Sulfatgruppen weitere Modifizierungsmöglichkeiten, weshalb die Sulfatisierung in der organischen Chemie oft als letzter Schritt der Synthese erfolgen muss.^[144]

Durch die Sulfatisierung kommt es zu starken Veränderungen der chemischen und physikalischen Eigenschaften des Moleküls^[144]. Bei Mehrfachsulfatisierung steigt zudem drastisch die negative Ladungsdichte der Verbindungen^[145]. Da die bei den Sulfatisierungsreaktionen entstehenden Nebenprodukte ähnliche Eigenschaften haben müssen diese Veränderungen bei der Synthese beachtet werden, um die Produkte aufzureinigen zu können.

Die Problematik des Einsatzes von SO_3 -Gas als direktes Sulfatisierungsreagenz wurde angedeutet. Zusammen mit anderen problematischen Faktoren, wie der Handhabbarkeit, Tendieren die Zielverbindungen unter Einsatz dieser Spezies auch zu unerwünschten Polymerisationsreaktionen^[146]. Um die Reaktivität von SO_3 bezüglich zu Sulfatisierung zu erhalten, die ungewollten Nebenreaktion und das schlechte Handling allerdings zu verhindern, kam es in der Vergangenheit immer häufiger zum Einsatz von Amin-gebundenen SO_3 -Komplexen. Diese Feststoffverbindungen enthalten aktives SO_3 als reaktive Spezies und können leicht durch das Einleiten von gasförmigem SO_3 in die entsprechende Base hergestellt werden^[147]. Verschiedenste Gerüste aus Alkoholen (**Abbildung 8**), Phenolen, Aminen oder Thiolen konnten durch diese Pyridin-, Trimethylamin-, Triethylamin- oder auch DMF-Komplexe sulfatisiert werden.^[148-152]

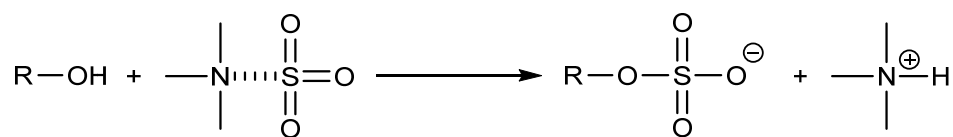


Abbildung 8: Beispiel der Reaktion eines unbestimmten Alkohols (R) mit Trimethylamin-Schwefeltrioxid (TMA^*SO_3).

Gerade für die Sulfatisierung von Alkoholgruppen in Kohlenhydraten soll unter anderem der Trimethylamin-Schwefeltrioxid-Komplex (TMA^*SO_3) besonders gut geeignet sein. Wessel et al. beschreiben die Sulfatisierung von *beta*-D-Glucopyranosederivaten anhand dieser Spezies.^[153]

Die gute Reaktivität und Handhabbarkeit der Amin-Schwefeltrioxid-Komplexe soll auch in dieser Arbeit als Hauptkomponente genutzt werden, um die Alkoholgruppen von N-Acetyl-Glucosaminderivaten und -oligomeren zu sulfatisieren. Die besondere Herausforderung dabei ist eine geeignete Schnittstelle zu finden, welche den kompatiblen Einsatz von organischer Synthese, Festphasensynthese, Abspaltungen und Sulfatisierungen möglich macht, um monodisperse und sequenzdefinierte, sulfatisierte GlcNAc-Oligomere herzustellen.

Kapitel II

Motivation und Aufgabenstellung

Glycosaminoglycane (GAGs) bilden eine hochinteressante Spezies in der Biologie und Biomedizin aus. GAGs, wie Chondroitin, Hyaluronsäure und Keratansulfat sind für viele Prozesse bei der Zell-Zell-Adhäsion, Zellentwicklung oder Zellvitalität relevant. Neben diesen zellmechanistischen Faktoren spielen sie auch in der Strukturgebung oder Hydratation des Gewebes eine wichtige Rolle. Insbesondere das vielseitige Heparin zeigt darüber hinaus entscheidende Einflüsse bei Zell-Pathogen-Adhäsion. Neben zahlreichen weiteren Eigenschaften ist dieses unter anderem in der Lage die Blutkoagulation, sowie die Aktivität des humanen Papillomavirus (HPV) oder von Selektinen zu beeinflussen.

Die Biosynthese der GAGs zeigt sich zwar definiert in der Zusammensetzung der einzelnen Disaccharide, ist jedoch weitestgehend randomisiert, wenn es zum Grad der Sulfatisierung oder der Ausbildung unterschiedlicher Kettenlängen kommt. Durch die strukturelle Ungleichmäßigkeit der GAGs ist es schwierig spezifische und unspezifische Bindungsfaktoren zu unterscheiden. Die Isolierung definierter, aktiver Einheiten ist zudem mit hohem Aufwand verbunden.

Daher ist es von Interesse künstliche GAGs mit höherer chemischer Definiertheit herzustellen, um Struktur-Wirkungsbeziehungen zu finden. Eine Möglichkeit bildet die Synthese sogenannter Glycomimetika, synthetische Gerüste z.B. auf Basis definierter Oligomere, die Zuckerseitenketten tragen.

Sulfatisierte Glycomimetika können eine Vielzahl an interessanten biomedizinischen Aussagen beinhalten, wenn sie mit hoher Präzision hergestellt werden. Die Fähigkeit strukturelle Begebenheiten zu kontrollieren könnte zum Vorteil haben, Struktur-Wirkungsbeziehungen mit hoher Genauigkeit abzuleiten und Vorhersagen über spezifisches Bindungsverhalten zu treffen. Durch Anwendungen synthetisierter Glycosaminoglycan-Mimetika mit struktureller Überlegenheit gegenüber natürlichen Substanzen im Sinne der Positionierung maßgeschneiderter Zuckerliganden, kann sich in der Biologie und Biomedizin die Chance ergeben, neue Erkenntnisse über biologische Struktur- und Bindungsmechanismen zu gewinnen.

Eine Kombination aus Festphasensynthese, kupferkatalysierter Azid-Alkin Cycloaddition (engl. *copper catalyzed azide-alkyne cycloaddition*, CuAAC) und Amin-Schwefeltrioxid-Sulfatisierung soll

in dieser Arbeit genutzt werden, um hoch sulfatisierte Glycooligomere mit bedeutender struktureller Präzision herzustellen. Die gewonnenen Strukturen sollen im Anschluss, mit Hilfe von wissenschaftlichen Kooperationen, auf ihre biologischen und biomedizinischen Eigenschaften untersucht werden, um ein erstes Bild über deren potenzielle Anwendungsgebiete zu schaffen. Aus diesem Zusammenhang ergeben sich die folgenden Aufgabenstellungen:

- Synthese eines geeigneten, azidhaltigen Zuckerliganden auf Basis von Glucosamin zur Anwendung in der Festphasensynthese.
- Sulfatisierung des Zuckerliganden zur Entwicklung eines Precursors für die Festphasensynthese sulfatisierter Glycooligomere.
- Anwendung der etablierten TDS-EDS-Festphasensynthese zur Herstellung alkinhaltiger Oligomere.
- Entwicklung einer Synthesestrategie zur vollständigen Darstellung sulfatisierter Glycooligomere auf Basis der erzeugten Vorstrukturen.
- Schlüssige analytische Diskussion der hergestellten Strukturen.
- Anwendung der sulfatisierten Glycooligomere als Heparin-Mimetika in biologischen Assays der Kooperationspartner, wie L-Selektin-Bindungsstudien, Blutkoagulation oder HPV-Inhibierung.
- Einsatz der nicht-sulfatisierten Glycooligomere als Chitinmimetika und Etablierung einer biologischen Methode als Bindungsassay.

Kapitel III

Ergebnisse und Diskussion

3.1 Synthese sulfatisierter Glycooligomere

3.1.1. Übersicht

Die Synthese sulfatisierter Glycooligomere kann nach verschiedenen Routen verlaufen. Essenziell ist dabei jedoch die Anwendung der etablierten Festphasensynthese zur Herstellung eines monodispersen und sequenzdefinierten Rückgrats. Auch für die kovalente Anbindung des Zuckers an das synthetische Rückgrat (Ligation) sollten etablierte Protokolle verwendet werden. Die in der Einleitung beschriebenen, zur Synthese von Mannose-, Galactose- und Glucoseoligomeren verwendeten Bausteine EDS und TDS wurden auch in dieser Arbeit verwendet. Als Mimetika für Glycosaminoglycane (GAGs) kamen verschiedene Saccharide in Frage. Unter Berücksichtigung des TDS-Bausteins war an dieser Stelle allerdings unbedingt die Einführung eines Azids von Nöten. Die Entscheidung bei der Wahl des Zuckers fiel auf Glucosamin (GlcN), da es bis auf Chondroitin in allen GAGs vorkommt^[40, 48-52]. Die N-acetylierte Version (GlcNAc) ist dabei für synthetische Derivate leichter zugänglich, da man die Nucleophilie des Amins nicht berücksichtigen muss. Bei Synthesestrategien, die für den Zuckerbaustein eine Acetylierung voraussetzen, wird das Amin ohnehin in eine N-Acetylgruppe überführt. Der Nachteil hierbei ist, dass sich das Amin folglich nur sehr schwer in ein N-Sulfat überführen lässt, da es sich bei der N-Acetylschutzgruppe um eine sehr stabile Verbindung handelt. Dies wurde jedoch für eine erfolgreiche Bausteinsynthese in Kauf genommen. Eine azidierte Variante des N-Acetyl-glucosamins (**1**, OAc-GlcNAc-N₃) ließe sich, beruhend auf den etablierten Protokollen zu verschiedensten Glycooligomeren^[3, 127, 129-130, 133, 137-138, 154-155], leicht mit der Festphasensynthese kombinieren. Die getesteten möglichen synthetischen Routen zur Herstellung eines azidierten Glucosamins werden in Kapitel 3.1.2.1 weiter behandelt. Für den fertigen Zucker ergeben sich nun mehrere Möglichkeiten zur Entwicklung monodisperser, sulfatisierter Glycooligomere (**Abbildung 9**). Entscheidende Unterschiede sind hierbei, wann und in welcher Form die Ligation des Zuckerbausteins an der Festphase stattfindet und wann das Oligomer abgespalten wird. Die grundsätzlichen Möglichkeiten werden im Folgenden kurz erläutert.

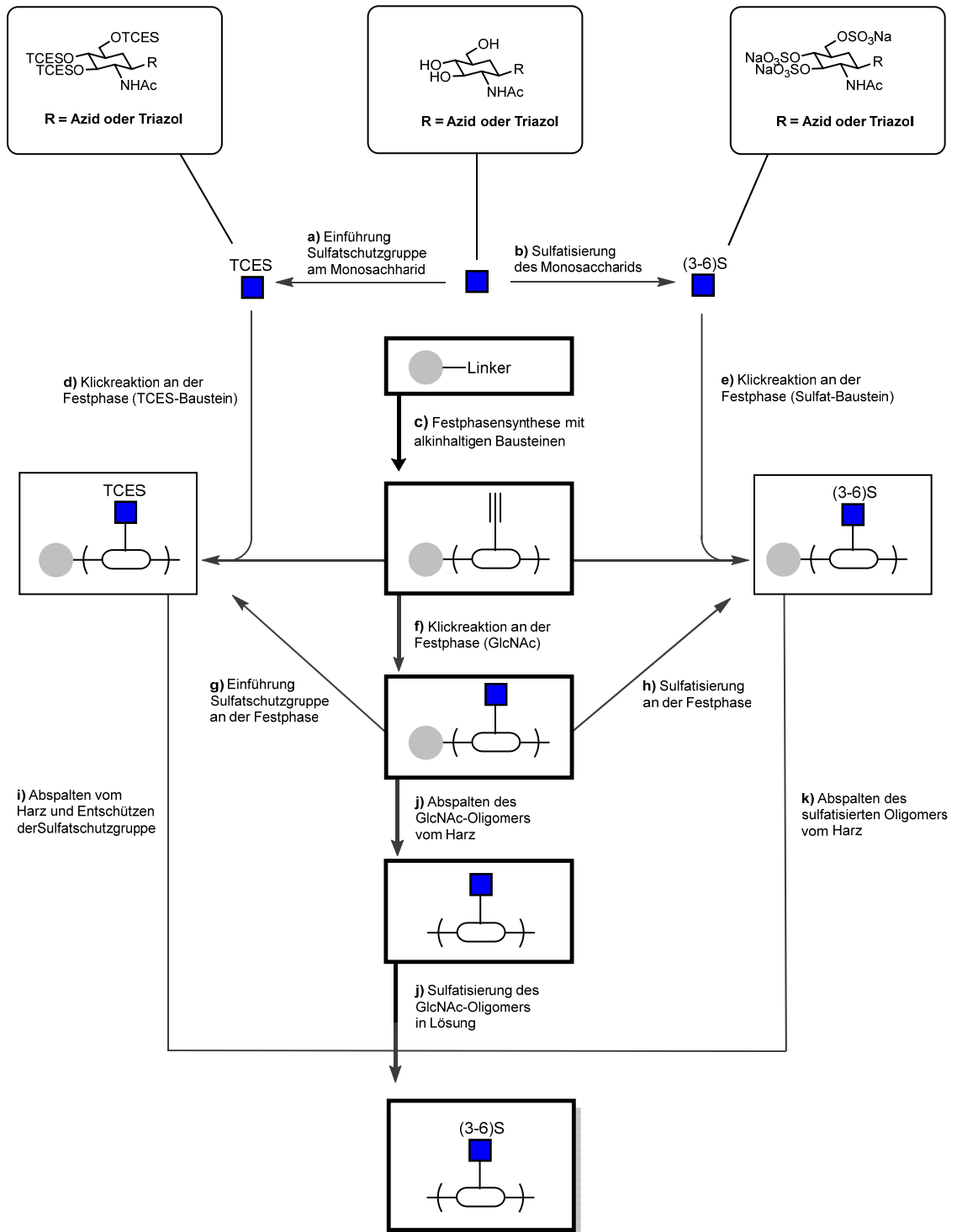


Abbildung 9: Schematische Darstellung der optionalen Syntheserouten für das gewünschte sulfatisierte Oligomer.

Sulfatisierung des Saccharidbausteins: Hierbei wird der Zucker bereits vor der Anbringung an das oligomere Gerüst sulfatisiert. Anschließend kann dieser durch eine Kupfer-Klick-Reaktion ligiert werden. Dies kann an der Festphase oder in Lösung geschehen.

Sulfatisierung des Glycooligomers an der Festphase: Noch vor der Abspaltung vom Harz wird das Glycooligomer an der Festphase sulfatisiert. Hierbei können Reaktionsüberschüsse ausgewaschen werden. Allerdings müssen auch die zum Teil sehr harschen Abspaltbedingungen und deren Kompatibilität mit den sulfatisierten Oligomeren berücksichtigt werden.

Sulfatisierung des Glycooligomers in Lösung: Es wird ein vollständiges, unmodifiziertes Glycooligomer an der Festphase synthetisiert und abgespalten. Das fertige Oligomer wird dann in Lösung sulfatisiert. Hierbei ist die Aufreinigung aufwendiger als an der Festphase, allerdings müssen keine harschen Abspaltbedingungen mit fragilen Sulfatisierungsprodukten abgeglichen werden. Des Weiteren ist eine präparative Aufreinigung der unmodifizierten Glycooligomere aufgrund etablierter Methoden einfacher.

Der GlcNAc-Saccharidbaustein **1** (Kapitel 3.1.2.1) kann auf verschiedene Weisen für die Festphasensynthese angepasst werden (**Abbildung 9**). Schon vor der Oligomerisierung ist die Funktionalisierung des GlcNAc mit Sulfatgruppen (**b**) oder Sulfatschutzgruppen (**a**) möglich. TCES steht für die Sulfat-Schutzgruppe Trichloroethylchlorosulfat. Diese Zucker können an TDS-enhaltene Oligomere an der Festphase durch Klickreaktion gebracht werden (**c**, **d** und **e**). Nicht aufgeführt in **Abbildung 9** sind die möglichen Klickreaktionen der Zuckerbausteine an alkinhaltigen Oligomeren in Lösung nach deren Abtrennung von der Festphase. Hierzu ist ein Abspalten der Oligomere vor Schritt (**f**) nötig. Weitere synthetische Routen beschreiben die Funktionalisierung des unmodifizierten GlcNAc an der Festphase, nachdem es per Klickreaktion an das Oligomer gebracht wurde (**f**, **g** und **h**). Modifizierte GlcNAc-Oligomere an der Festphase müssten dabei unter Erhalt ihrer Struktur vom Harz abgetrennt werden (**i**, **k**). Letztlich kann auch ein GlcNAc-Oligomer vollständig synthetisiert, aufgereinigt und in Lösung sulfatisiert werden (**j**, **l**). Im Verlauf dieser Arbeit sollte ein optimaler Syntheseweg gefunden werden. Die hier schematisch gezeigten, getesteten Synthesen werden genauer beschrieben und die Ergebnisse mit den Vor- und Nachteilen der jeweiligen Routen bewertet. Der optimierte Weg sollte anschließend zur Synthese verschiedener Glycosulfatoligomere verwendet werden.

3.1.2 Synthese eines Zuckerbausteins

3.1.2.1 Azidiertes Glucosamin

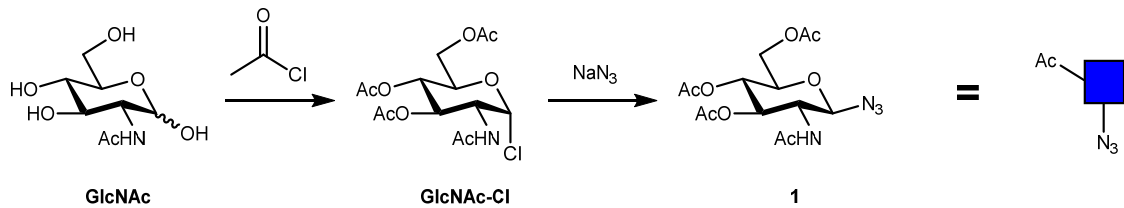


Abbildung 10: Synthese von peracetyliertem N-Acetylglucosamin- β -azid (**1**), OAc-GlcNAc-N₃.^[4-5]

Für die Entwicklung eines geeigneten Saccharidbausteins, N-Acetylglucosamin- β -azid (**1**), zur Herstellung von Glucosamin-basierten Mimetika an der Festphase und dessen anschließender Sulfatisierung war es notwendig verschiedene literaturbekannte Verfahren miteinander zu vergleichen und zu bewerten. Ausgegangen wurde dabei stets von Glucosaminhydrochlorid oder N-Acetylglucosamin. Die Versuche hierzu erfolgten im Rahmen der Bachelorarbeit von Jennifer Materlik^[156].¹

Als geeignetste GlcNAc-Bausteinsynthese stellte sich letztendlich die direkte Azidierung unter Einsatz von Acetylchlorid (Ac-Cl) und Natriumazid heraus^[4-5]. Bei dieser Syntheseroute wird GlcNAc vollständig acetyliert und die anomere OH-Gruppe durch ein Azid substituiert (**Abbildung 10**).

¹Jennifer Materlik beschäftigte sich im Laufe ihrer, von Sebastian Bauer angeleiteten Bachelorarbeit (*Synthese sulfatisierter Glucosamin-Bausteine für die Festphasenpolymersynthese*, 2016)^[156] mit Synthesestrategien zur Herstellung eines festphasenkompatiblen, sulfatisierten GlcNAc-Azid Bausteins, welcher für die Klickreaktion an alkinhaltigen Oligoamiden verwendet werden kann. Sie schaffte es nach Ausschluss verschiedener Strategien azidiertes GlcNAc für die Festphase zu synthetisieren (siehe Kapitel 3.1.2.1). Unter Verwendung verschiedener Sulfatisierungsreagenzien und Aufreinigungsmethoden gelang es ihr erstmalig einen sulfatisierten GlcNAc-Azid Baustein herzustellen, wie ¹H-NMR-spektroskopisch bewiesen werden konnte, auch wenn dieser noch mit einigen Verunreinigungen versehen war. Ihre Vorleistungen hierzu halfen, die Synthese von sulfatisierten GlcNAc-Azid im Laufe dieser Doktorarbeit weiter zu optimieren, wie in Kapitel 3.1.2.2 beschrieben wird. Des Weiteren führte sie erstmals einen Versuch durch, das sulfatisierte GlcNAc-Azid festphasenanalogue per Klickreaktion an ein festphasengebundenes, alkinhaltiges Oligoamid anzubringen. Diese Strategie zur Herstellung sulfatisierter GlcNAc-Oligomere wurde jedoch in dieser Doktorarbeit verworfen und durch Versuche zur Klickreaktion des sulfatisierten GlcNAc-Azids in Lösung erweitert (siehe Kapitel 3.1.4.2).

3.1.2.2 Sulfatisierung von GlcNAc-Azid

Der hergestellte azidierte Baustein des N-Acetylglucosamin sollte für verschiedene Synthesestrategien zur Darstellung sulfatisierter Oligomere verwendet werden. OAc-geschütztes N-Acetylglucosamin- β -azid (**1**), sowie dessen entschützte Form (**2**) kamen zum Einsatz, um GlcNAc-Oligomere herzustellen. Dazu wurde ein etabliertes Protokoll mit Hilfe der bekannten EDS und TDS Bausteine verwendet (Kapitel 3.1.3)^[3]. Die Klickreaktion an alkinhaltigen Vorstrukturen war nicht nur mit unsulfatisierten GlcNAc-Bausteinen vorgesehen. Weitere Strategien beinhalteten die Verwendung von sulfatisierten GlcNAc-Azid Vorstrukturen sowie Sulfatschutzgruppen am Zucker. In diesem Kapitel wird die Sulfatisierung des GlcNAc-Bausteins beschrieben.

Die Etablierung der Sulfatisierung für das Monosaccharid war des Weiteren ein wichtiger Schritt zur Erstellung eines Protokolls, welches, wie sich herausstellte, auch für die Strategie einer direkten Sulfatisierung von GlcNAc-haltigen Oligomeren verwendet werden konnte (Kapitel 3.1.4.3). Hierbei ist festzuhalten, dass Versuche an GlcNAc-N₃ (**1**) und GlcNAc-Oligomeren (**O9-O12**) teilweise parallel durchgeführt wurden, woraus sich optimierte Protokolle ergaben. Im Rahmen der Bachelorarbeit von Jennifer Materlik wurden verschiedene Methoden, nach literaturbekannten Beispielen verwendet, um sulfatisiertes N-Acetylglucosamin herzustellen^[156]. Im Laufe dieser Doktorarbeit wurden diese Synthesen weiter optimiert (**Tabelle 1**).

Jennifer Materlik konnte erstmalig eine vollständige Sulfatisierung des azidierten GlcNAc-Bausteins nachweisen, jedoch enthielt das Produkt noch zahlreiche Kontaminationen. Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte ein Einsatz von fünf Äquivalenten des Sulfatisierungsreagenz TMA*SO₃ bei Temperaturen bis 70 °C als effizient zur vollständigen Umsetzung aller OH-Gruppen nachgewiesen werden und auch die Reinheit noch weiter verbessert werden, wie die Analytik in Kapitel 3.1.2.3 zeigt. Natriumacetat stellte sich als am geeignetsten zur Entfernung des Sulfatisierungsreagenz heraus, konnte jedoch als womöglich finale Kontamination des Produktes nicht vollständig entfernt werden.

Eine gemeinsame Bedingung aller Sulfatisierungsstrategien liegt darin, dass zur Umsetzung der OH-Gruppen diese zunächst entschützt werden mussten. Dies geschieht durch eine basische Verseifung mittels einer 20 mM Natriummethanolatlösung (NaOMe) in Methanol. Im Anschluss der Entschützung, die als irreversible Verseifung klassifiziert werden kann (**Abbildung 11**), kann

überschüssiges Methanolat durch ein Protonen-donierendes Harz neutralisiert werden (Amberlyst IR-120 H⁺-Form). Dies hat den Vorteil, dass nach einer Filtration durch bloßes Abdestillieren des Reaktionsgemischs der entschützte Zucker rückstandslos, ohne Nebenprodukte isoliert werden kann.

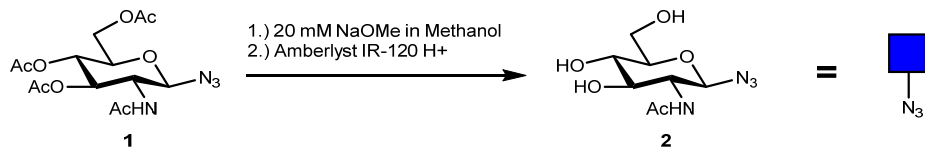


Abbildung 11: OAc-Entschützung von peracetyliertem GlcNAc-Azid.

Die freigelegten OH-Gruppen in Struktur **2** konnten nun genutzt werden, um den Zucker zu sulfatisieren. Hinsichtlich der Sulfatisierungsstrategie existieren zahlreiche Literaturbeispiele. In dieser Arbeit lag der Fokus zunächst auf stickstoffgebundenen Schwefeltrioxidkomplexen. In **Tabelle 1** sind verschiedene Ansätze zur Synthese von sulfatisiertem GlcNAc-Azid (**3**) dargestellt.

Jennifer Materlik untersuchte im Rahmen ihrer Bachelorarbeit die als Ansätze 1, 2 und 3 beschriebenen Synthesestrategien. Beste Ergebnisse wurden im Laufe der Bachelorarbeit von Jennifer Materlik unter Einsatz von Trimethylamin-Schwefeltrioxid (TMA*SO₃) erzielt (Ansätze 2 und 3). Zur Aufreinigung wurden weitere Methoden nach literarischen Vorbildern verwendet. Hierzu zählten eine Präzipitations-Strategie nach Lee et al.^[150], sowie einer säulenchromatographischen Methode mit Hilfe von Sephadex[®] LH-20 (GE Healthcare)^[121]. Erstmals konnte hier per ¹H-NMR-Untersuchung eine vollständige Sulfatisierung aller freien OH-Gruppen gezeigt werden.

Doch auch eine erfolgreiche, vollständige Sulfatisierung konnte das Problem der schwierigen Aufreinigung nicht lösen. Daher wurden ausgehend von diesen Ergebnissen im Rahmen dieser Arbeit weitere Studien zur Synthese und Aufreinigung von **3** durchgeführt (Ansätze 4, 5 und 6).

Generell können dem Reaktionsgemisch einige Reaktionsprodukte mit ähnlichem Molekulargewicht und einer ähnlichen Polarität beiliegen. Der sulfatisierte Zucker kann trotz eines Ionenaustausches, je nach dessen Effizienz, noch unterschiedliche Kationen tragen. Auch unterschiedliche Ladungszustände können sich in Abhängigkeit von pH-Wert und Lösungsmittel ergeben. Da mit bis zu 50-fachen Überschüssen gearbeitet wurde, lag der Sulfatisierungskomplex

noch in großen Teilen im Reaktionsgemisch vor. Reaktionsunterbrecher (Quencher), wie Natriumhydrogensulfat oder Methanol, welche in den tabellarisch genannten Beispielen aus der Literatur beschrieben werden waren nicht in der Lage, den Komplex vollständig zu dissoziieren. Dies machte sich häufig durch ein vom Komplex hervorgerufenen Signal bei 2,8-2,9 ppm (D_2O) im 1H -NMR-Spektrum bemerkbar. Ziel des Quenchings war ein Abfangen des Schwefeltrioxids als Sulfat unter Abgasen des bei Raumtemperatur gasförmigen Trimethylamin, je nach Löslichkeit im jeweiligen Lösungsmittel.

Tabelle 1: Ansätze zur Optimierung der Sulfatisierung von GlcNAc- N_3 (2).

Ansatz	Sulfatisierungsbedingungen ^[nach]	Quencher	Aufreinigung
1*	50 äq. Py*SO ₃ , Et ₃ N, 2d, 55 °C ^[157]	Dowex® DR-2030	Silica-, C ₁₈ -Chromatographie
2*	43 äq. TMA*SO ₃ , DMF, 12h, 50 °C ^[150]	NaHCO ₃ , Ethanol	Präzipitation
3*	15 äq. TMA*SO ₃ , DMF, 12h, 60 °C ^[121]	Methanol	Sephadex® LH-20
4	5 äq TMA*SO ₃ , DMF, 20h, 60 °C ^[153]	Methanol	Na ⁺ -Austausch, Präzipitation
5	5 äq TMA*SO₃, DMF, 20h, 70 °C^[153]	10% NaOAc	Sephadex® LH-20, Präzipitation
6	5 äq TMA*SO ₃ , DMF, 19h, 70 °C ^[158]	TBAHSO ₄	Extraktion

(Ansatz 5 - fett markiert - eignete sich gut zur analytischen Beschreibung in Kapitel 3.1.2.3), *Ansätze 1-3 wurden im Laufe einer Bachelorarbeit von Jennifer Materlik behandelt.^[156]

Somit konnten im Reaktionsgemisch neben dem gewünschten Produkt und eventuellen Nebenprodukten noch Komplex, diverse Sulfate, sowie gelöstes TMA oder SO₃ vorliegen. Des Weiteren konnten im 1H -NMR noch unaufgeklärte Signale zwischen 4-2 ppm beobachtet werden. Folgereaktionen des sulfatisierten Zuckers oder des eingesetzten Komplexes werden in der Literatur nicht beschrieben. Möglicherweise handelt es sich hierbei auch um prozessbedingte Verunreinigungen aus dem technischen Herstellungsprozess der eingesetzten Komponenten. Diese Signale wurde durch die weiter beschriebenen Aufreinigungsmethoden nach und nach reduziert.

Im Laufe der Doktorarbeit erwies sich die Reaktion mit fünf Äquivalenten TMA*SO₃ bei 60 °C bis 70 °C als optimal und reproduzierbar zur vollständigen Sulfatisierung heraus (**Abbildung 12**). Bei 70 °C hat die Reaktion eine hohe Umsetzungseffizienz auch bei geringeren Überschüssen, ohne dass die Gefahr einer Verkohlung des Zuckers besteht (vgl. Kapitel 3.1.4.3). Die Aufreinigung musste jedoch noch optimiert werden.

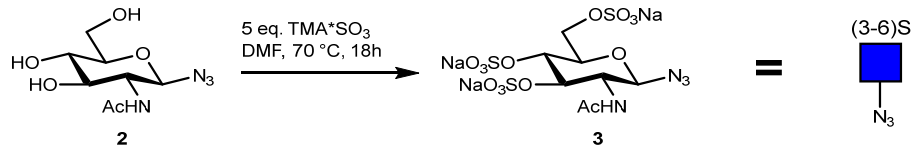


Abbildung 12: Sulfatisierung von GlcNAc-N₃ nach Optimierung der Bedingungen.

Ein Natrium-Ionenaustausch mit Hilfe von Amberlyst IL-120-Na⁺ wurde vorgenommen, um die Aufreinigung weiter zu verbessern (**Tabelle 1**, Ansatz 4), da das Quenchen mit Methanol, wie es in der Literatur beschrieben wird, nicht in einem Ionenaustausch resultiert. Es konnte beobachtet werden, dass sich die Löslichkeit des Reaktionsgemisches dabei wesentlich verändert. Ausfallendes Rohprodukt enthielt jedoch, analytisch nachweisbar, neben einem Zuckergemisch in verschiedenen Sulfatisierungsstufen auch weiterhin den Komplex. Doch auch ein weiteres Nachkristallisieren nach Einengen des Reaktionsgemisches zeigte keine Verbesserung der Reinheit. Daraufhin wurde versucht die Präzipitationsstrategie weiter zu optimieren. Lösemittel unterschiedlicher Polaritäten wurden verwendet (Dimethylformamid, Methanol, Aceton, Dichlormethan und Ether), doch in den verschiedenen ausgefallenen Fraktionen oder Überständen konnte in keinem Fall vollständig aufgereinigtes Produkt wiedergefunden werden. Auffällig bei der Strategie mit Amberlyst-Na-Austausch war das Vorliegen eines Zuckergemisches in mehreren Analysefraktionen, welches bei anderen Aufarbeitungsmethoden mit ähnlichen Reaktionsbedingungen nicht gefunden wurde. Denn bei diesen wurde stets vollständig sulfatisiertes Rohprodukt nachgewiesen. Hier ist nicht auszuschließen, dass eine Nachreaktion mit dem Austauscherharz stattfindet, auch wenn das Harz vor Verwendung gründlich mit Methanol gespült wurde. Je nach Material wäre es jedoch möglich, dass sich das Harz in einem sauren Zustand befindet und so zur Desulfatisierung beiträgt. Im weiteren Verlauf wurde daher von Austauscherharzen abgesehen und der Einsatz von Natrium-haltigen schwachen Basen bevorzugt.

In einem weiteren Ansatz wurden verschiedenen Aufarbeitungsmethoden kombiniert (**Tabelle 1**, Ansatz 5). Die Reaktion wurde unter den beschriebenen, optimierten Bedingungen betrieben. Als Quencher kam eine 10-%ige Natriumacetatlösung nach einer Methode von Wessel und Bartsch zur Sulfatisierung von Kohlenhydraten aus dem Jahre 1995 zum Einsatz^[153]. Nach Einengen des Reaktionsgemisches aus DMF konnte Nebenprodukt, wenn auch nicht vollständig, als Niederschlag verworfen werden. In der Methode wird außerdem Wasser als Eluent für eine Sephadex® LH-20 Trennung vorgeschlagen. Das Rohprodukt vor dieser Chromatographie stellte sich als das sauberste im Vergleich mit den anderen Aufarbeitungsmethoden bis hierhin heraus, obwohl lediglich der Quencher variiert wurde. Dennoch enthielt es in geringerem Maße TMA*SO₃-Komplex und einige unbekannte Spezies als Verunreinigungen. Daher erfolgte eine weitere Fraktionierung durch die genannte LH-20 Säule. Diese erwies sich als effizient, um alle zum Teil auch unbekanntes Kontaminationen zu entfernen. Natriumacetat lief jedoch in jeder Fraktion mit. Ein teilweises Ausfällen von Natriumacetat in methanolischer Lösung konnte dessen Gehalt im Produkt reduzieren, dies jedoch nicht vollständig und mit erheblichen Ausbeuteverlusten. In keinem Ansatz war es möglich, die Salzkontaminationen rückstandslos zu entfernen. In der Publikation von Wessel und Bartsch wird ein Ausbreiten von Natriumacetat in alle Fraktionen bei der Aufreinigung nicht beschrieben. Zum Beweis der schlechten Trennleistung bezüglich Natriumacetat wurden Vorlauf und Nachlauf der Trennung untersucht. Auch in diesen Fraktionen findet man Natriumacetat. Weiterhin wurde die Trennleistung mit einem Dichlormethan-Methanol-Gemisch (5:1, V/V) untersucht, welches laut der genannten Veröffentlichung von Lee et al. zur selektiven Präzipitation ähnlicher Strukturen geeignet ist^[150]. Doch auch mit diesem Lösungsmittelgemisch war bei der Trennung in allen Fraktionen des sulfatisierten Zuckers Natriumacetat zu finden. Die ¹H-NMR-Analytik einzelner Fraktionen zeigt Ähnlichkeiten zur Trennung mit Wasser. Die Polarität und Hydrophilie des Eluenten scheinen die Trennleistung der Säule zur weiteren Separation von Natriumacetat und Produkt nicht weiter zu beeinflussen. Daher wurde auf die Untersuchung weiterer Lösemittelgemische verzichtet.

Durch Beladung der Sulfate mit Tetrabutylammonium-Kationen (TBA⁺) sollte es tendenziell möglich sein sie in eine organische Phase zu extrahieren (**Tabelle 1**, Ansatz 6). Dies wurde in einem weiteren Experiment untersucht. Campos et al. beschreiben eine Methode den Kationenaustausch an der festen Phase durchzuführen^[158]. Diese Methode wurde in einem Experiment in Lösung angewendet. Hier konnte gezeigt werden, dass die Beladung mit TBA ermöglicht das Sulfat mit Dichlormethan zu extrahieren. Ein deutlich zu hoher Anteil der TBA-Protonen im ¹H-NMR-Spektrum deutete jedoch darauf hin, dass auch große Teile des

eingesetzten Tetrabutylammoniumhydrogensulfats mit extrahiert werden. In Kombination mit einer ESI-Massenanalytik ließ sich zudem feststellen, dass der Extrakt unvollständig sulfatisiertes GlcNAc enthält, obwohl die gleichen Sulfatisierungsbedingungen wie vorher gewählt wurden. Das ESI-MS wird durch den TBA-Austausch jedoch deutlich klarer, was durch eine bessere Flüchtigkeit des alkylierten Salzes erklärt werden kann.

Zusammengefasst konnten in diesem Kapitel einige Methoden zur Synthese und Aufreinigung von sulfatisertem GlcNAc-Azid (**3**), aufbauend auf der Bachelorarbeit von Jennifer Materlik, untersucht werden. Im Folgenden wird die Analytik dieses Bausteins erläutert.

3.1.2.3 Analytik des sulfatisierten *N*-Acetylglucosamin-Azids

Die einzelnen Syntheseschritte wurden wie im vorherigen Kapitel beschrieben, kontinuierlich über analytische Einzeluntersuchungen kontrolliert. Die Analytik sulfatisierter Proben stellt sich zum Teil als sehr herausfordernd dar. Da sich hier im Laufe dieser Doktorarbeit neben synthetischen Herausforderungen ebenfalls eine Lernkurve ergab, wurden die analytischen Methoden dabei stets variiert und weiterentwickelt. Dies geschah zum Teil parallel zu den Sulfatisierungsversuchen der GlcNAc-Oligomere (Kapitel 3.1.4), auf deren Analytik in den jeweiligen Kapiteln eingegangen wird.

Grundsätzlich bieten sich die hier gebildeten Organosulfate aufgrund ihrer chemischen Beschaffenheit für eine Vielzahl qualitativer und quantitativer Methoden an. Die spezifische Protonenumgebung ermöglicht ^1H -NMR-Spektroskopie. Massenspektrometrie lässt sich ebenfalls anwenden, bedarf jedoch aufgrund der zum Teil hohen Ladung und Labilität der Proben besonderer Anpassungen. Chromatographische Methoden stellen eine besondere Herausforderung dar. Die sulfatisierten Zielmoleküle müssen nicht nur in ihrer Polarität, sondern auch durch ihre Ladung getrennt werden. Elementaranalyse kann aufgrund stetig existenter Verunreinigungen bei der Syntheseoptimierung und der starken Hygroskopie der Sulfate nicht mit hoher Sicherheit eingesetzt werden. Schnelle Methoden, wie IR-Spektroskopie, bieten sich durch deutliche Änderungen der funktionellen Gruppen während der Sulfatisierung ebenfalls an. Klassische Methoden zur Reaktionskontrolle, wie Dünnschichtchromatographie, konnten aufgrund der hohen Polarität des sulfatisierten *N*-Acetylglucosamin nicht verwendet werden. Die

in diesem Kapitel besprochene Analytik bezieht sich, sofern nicht anders beschrieben, auf das Produkt des Ansatzes 5 (**Tabelle 1**), nach beschriebener Aufreinigung durch die Sephadex® LH-20 Säule und weiterer Präzipitation mit Methanol.

IR-Spektroskopie

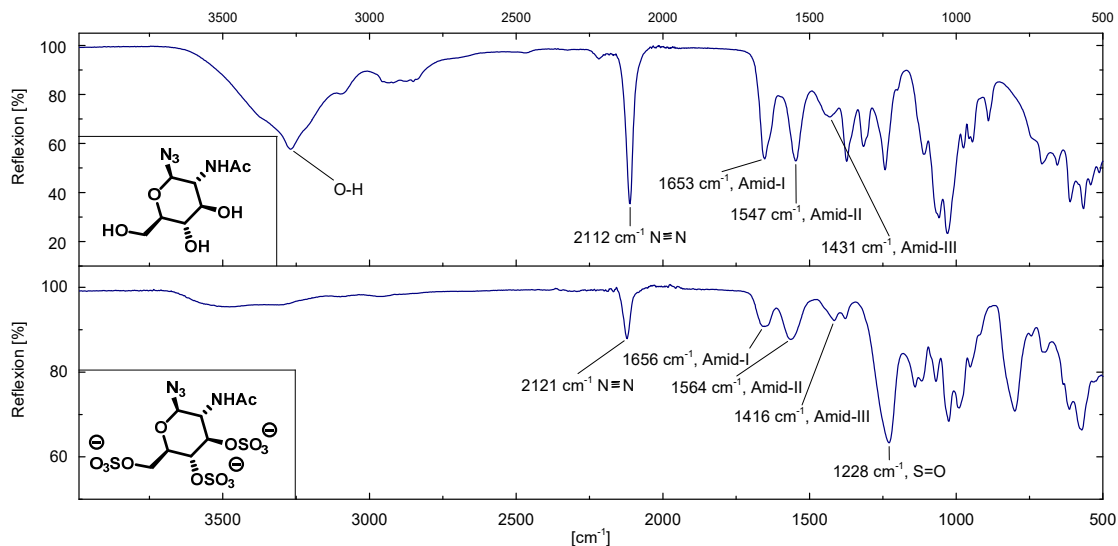


Abbildung 13: FTIR-Spektrum von Verbindung **2** (oben) und **3** (unten).

Das Fouriertransformations-Infrarotspektrometer (FT-IR), hat den großen Vorteil, analytische Ausprägungen mit sehr geringen Probenmengen in wenigen Augenblicken zu generieren. Die Absorbanz einzelner Schwingungen macht die chemische Umwandlung von funktionellen Gruppen nach Reaktionsablauf sehr deutlich. Im Laufe der Doktorarbeit wurde auf diese Methode immer wieder zur schnellen, qualitativen Untersuchung von Reaktionsproben zurückgegriffen.

Abbildung 13 zeigt das FT-IR-Spektrum des sulfatisierten GlcNAc-Azids (**3**) gegenüber einer unsulfatisierten, deacetylierten Probe (**2**). Die dominierende Spezies im sulfatisierten Zucker im Gegensatz zur Ausgangsverbindung ist die Sulfatgruppe (OSO_3^-). Dies wird durch die gebildete und klar ausgeprägte Bande bei 1228 cm^{-1} ersichtlich. Dabei handelt es sich um die S=O-Streckschwingung. Diese Art der Schwingung kommt im Zielmolekül ganze sechs Mal vor, was zu einer deutlichen relativen Reduzierung der Amidbanden (1653 cm^{-1} : Amid-I, 1564 cm^{-1} : Amid-II, 1416 cm^{-1} : Amid-III) und der Azidbande (2121 cm^{-1}) führt. Ein weiteres Indiz für das Abreagieren der OH-Gruppen ist durch die starke Abnahme der durch die O-H-Streckschwingung verursachten Bande im Bereich über 3000 cm^{-1} ersichtlich. Die Sulfatisierung hat einen Einfluss auf alle

Schwingungen im Molekül, was an leichten Abweichungen der Bindungsenergien im Vergleich zum Edukt (**Abbildung 13**, oben) zu erkennen ist. Insgesamt konnte somit schnell eine Umsetzung des Zuckers nachvollzogen werden. Alleine darauf sollte sich dabei allerdings nicht verlassen werden, gerade da es schwierig ist, aus dem IR-Spektrum eine quantitative Aussage zu treffen. Des Weiteren können einzelne Bindungen im Fingerprintbereich, wie die S=O-Streckschwingung auch immer durch andere funktionelle Gruppen als erwartet verursacht werden, da sich Absorptionsbanden in diesem Bereich durch eine sehr große Datenbank an funktionellen Gruppen beschreiben lassen.

ESI-Massenspektrometrie

Das in dieser Arbeit verwendete Agilent Technologies 1260 Infinity HPLC System ausgestattet mit einem AT 6120 Quadropol Element war ausgezeichnet zur schnellen quantitativen und qualitativen Untersuchung von sehr kleinen Probenmengen geeignet. Das massenspektrometrische (MS) Element ließ sich zudem unproblematisch vom restlichen System trennen, was eine schnelle MS-Analyse durch Direkteinlass und Elektronensprayionisierung (ESI) möglich machte.

Generell lassen sich die meisten organischen Moleküle durch die ESI-Methode sehr gut Ionisieren. Dazu werden in der Regel Protonen verwendet. Durch den Einsatz von organischen Säuren, wie Ameisensäure oder Trifluoressigsäure werden die Substanzen mit Protonen beladen und können mittels einer Normalmethode (Detektierung positiver Ladungen) im Quadropol leicht detektiert werden. Bei negativ geladenen Molekülen, wie Organosulfaten, wird die Detektierung umgepolt und die Substanz in der Negativmethode ausgewertet. Dies ist allgemein auch ohne Probleme möglich. Bei erhöhter natürlicher Ladungszahl, wie sie aufgrund des niedrigen pKs-Wertes von Sulfaten bei mehrfacher Sulfatisierung gegeben ist, kann es jedoch zu Problemen bei der Ionisierung kommen, da hierfür besonders bei Salzen eine hohe Ionisierungsenergie nötig ist. Zudem sind die Fragmentierungsmöglichkeiten bei Zuckersulfaten noch nicht vollständig aufgeklärt. Liu et al. befassten sich beispielsweise explizit mit der Aufklärung der Massenspektrometrie von ähnlichen Glucosaminsulfaten. Hier wurde herausgefunden, dass es in Abhängigkeit der Sulfatisierungsposition erhebliche Unterschiede bezüglich Ionenstabilität und Fragmentierungsarten gibt^[157].

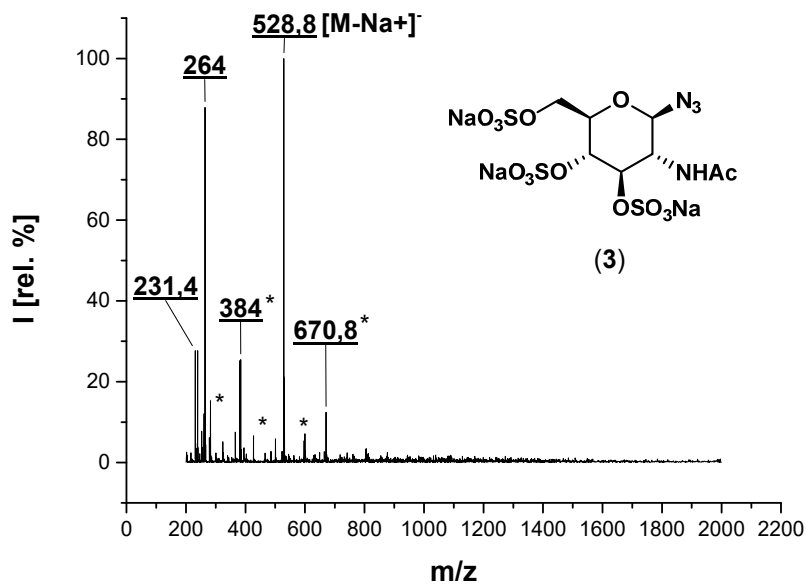


Abbildung 14: ESI-MS von **3** ($C_8H_{11}N_4Na_3O_{14}S_3$, 551,91 g/mol) mit $H_2O/MeCN$ (95/5 v/v) als Eluent. Gefundene Massereferenz 528.8 für $[M-Na]^+$. *Einige Signale konnten nicht genau identifiziert werden.

Die Probleme der ESI-MS-Detektierung von sulfatisierten Glucosaminen wurden auch beim hier sulfatisierten N-Acetylglucosamin-Azid (**3**) deutlich, wie das in **Abbildung 14** dargestellte Spektrum zeigt. Im ESI-MS Spektrum ist das 100%-Signal mit einem m/z -Wert von 528.8 g/mol zu erkennen, welches auf einfach ionisierte vollständig sulfatisierte Produkt (**3-Na⁺**) hindeutet. Doch neben dieser Massezahl finden sich noch weitere, zum Teil auch unaufgeklärte Fragmentierungsspezies. Der Direkteinlass für das ESI-MS des sulfatisierten Zuckers wurde im Vergleich zur in der Arbeitsgruppe häufig angewendeten Methode angepasst. Die in der Standardmethode eingesetzte Ameisensäure führt nicht nur zu einer durch Protonenbeladung erschwerten Ionisierung und somit schwachen Detektion. Auch zeigt sich hier die Labilität der Sulfatgruppen gegenüber Säuren. Das gleiche Produkt zeigt im ESI-MS unter Einfluss von Ameisensäure, auch nach einer sehr kurzen Laufzeit von wenigen Minuten hydrolysiertes Produkt (**Abbildung 15**).

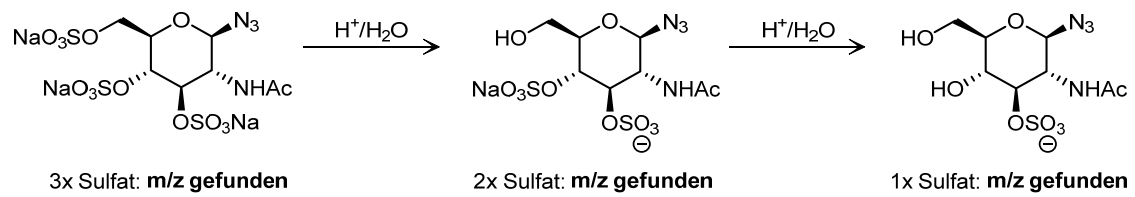


Abbildung 15: Durch Ameisensäure bedingte Desulfatisierung bei der ESI-MS Analyse von **3**.

Diese Erkenntnis zeigt auch, dass es durch die Messmethode möglich ist, verschiedene Sulfatisierungsstufen im Quadropol zu unterscheiden. Da beim finalen Produkt keine partiell sulfatisierten Verbindungen in der Methode detektiert wurden, kann davon ausgegangen werden, dass das Produkt vollständig sulfatisiert wurde. Dieses Ergebnis kann von den weiteren eingesetzten analytischen Methoden bestätigt werden. Offen bleibt die Frage, wie genau es zu Fragmentierungen kommen kann. Für m/z kleiner als das 100% Signal von $[\text{M}-\text{Na}^+]$ lassen sich zahlreiche Bindungsbrüche und Elektronenpaarumlagerungen postulieren. Schwieriger wird es bei höheren m/z -Werten, wie dem oft gefundenen Signal von etwa 670,8. Hierfür konnten keine geeigneten Vorschläge, wie Dimere oder Beladungen mit höergewichtigen Kationen (TMA) gefunden werden. Die Entstehung des oft gefundenen Fragments mit m/z -Wert 231.46 ist in **Abbildung 16** postuliert. Das System kann hierbei vermutlich durch die Eliminierung der gasförmigen Stickstoffwasserstoffsäure (HN_3) sehr leicht Energie konvertieren. Die Umlagerungen ähneln dabei den von Liu et al. vorgeschlagenen Fragmentierungsmechanismen^[157].

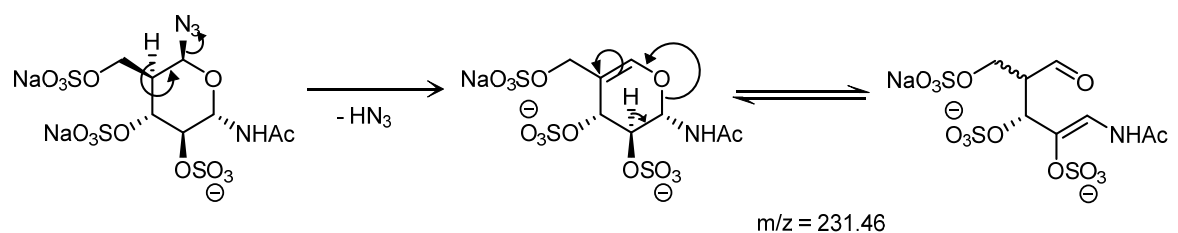


Abbildung 16: Vorgeschlagener Mechanismus der Abspaltung von Stickstoffwasserstoffsäure im ESI-MS.

Weiterhin kann man festhalten, dass das Rauschverhältnis in der Negativmethode stets etwas höher war als im Vergleich zur Positivmethode. Dies wurde dadurch verstärkt, dass sich wie in der Syntheseoptimierung beschrieben auch immer mutmaßlich Salze in der Probe befunden haben, welche bei der Synthese angefallen sind und das Massesignal dadurch an relativer Intensität

verliert. Der Einfluss der Kontaminationen auf die Massenspektrometrie ist nicht aufgeklärt. Nicht auszuschließen ist, dass die nicht zuordenbaren Signale aus dem Analysesystem selbst stammen, wie teilweise durch Leerproben gezeigt werden konnte. So konnten m/z-Werte, wie 264 und 282 durch Leerproben als Systemkontaminationen klassifiziert werden.

Eine interessante Eigenschaft zeigte sich, wie im vorherigen Kapitel beschrieben, bei der Untersuchung des Produktes aus TBA-Extraktion. Auch wenn der Prozess, nicht die gewünscht hohe Sulfatisierungsstufe und Reinheit erreichte, zeigt das zugehörige Massenspektrum eine wesentlich höhere Qualität hinsichtlich der Aufklärungsmöglichkeit einzelner Signale. Alle dominanten Signale lassen sich klar zuordnen und das Rauschen fällt deutlich geringer aus. Möglicherweise führt die höhere Volatilität und des TBA-modifizierten Salzes zu einer besseren Ionisierbarkeit, oder einer erhöhten Resistenz gegenüber Fragmentierungen. Dieser Effekt wurde im späteren Verlauf der Arbeit bei der Synthese sulfatisierter Glycooligomere unter Einsatz von TBA-Kationen weiter untersucht, konnte allerdings bei diesen Strukturen nicht bestätigt werden (Kapitel 3.1.4.1).

¹H-NMR Spektroskopie

Die ¹H-NMR Spektroskopie stellt ein wichtiges Instrument zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der sulfatisierten N-Acetylglucosamine dar. Während der Syntheseoptimierung wurde sie verwendet, um die Reinheit der entstandenen Zwischenprodukte und Fraktionen der chromatographischen Methoden, wie Sephadex® LH-20, zu untersuchen.

Betrachtet man das Spektrum der bisher reinsten gewonnenen Fraktion aus Sephadex® LH-20 Chromatographie und Methanolpräzipitation, lassen sich gut die einzelnen Protonen der sulfatisierten Pyranose erkennen (**Abbildung 17**). Die ³J_{HH}-Kopplungskonstanten der Ringprotonen helfen bei ihrer exakten Zuordnung. Mit 8,80 - 10,20 Hz liegen die Konstanten im für axiale Protonen typischen Bereich. Die Pyranose behält also auch nach Sulfatisierung ihre ⁴C₁ Sesselkonformation. Signifikant ist ebenfalls die Kopplungskonstante von -11,60 Hz der vicinalen Protonen **B** (C_{6a}) und **E** (C_{6b}). Was sich im Gegensatz zum Spektrum des unsulfatisierten N-Acetylglucosamin deutlich ändert, ist die ³J_{HH}-Konstante des C₆-Protons **E** zum C₅-Proton **B** (7,90 Hz). Die Ursache liegt vermutlich in der erhöhten elektrostatischen Abstoßung durch die sperrigen, negativ geladenen Sulfatgruppen.

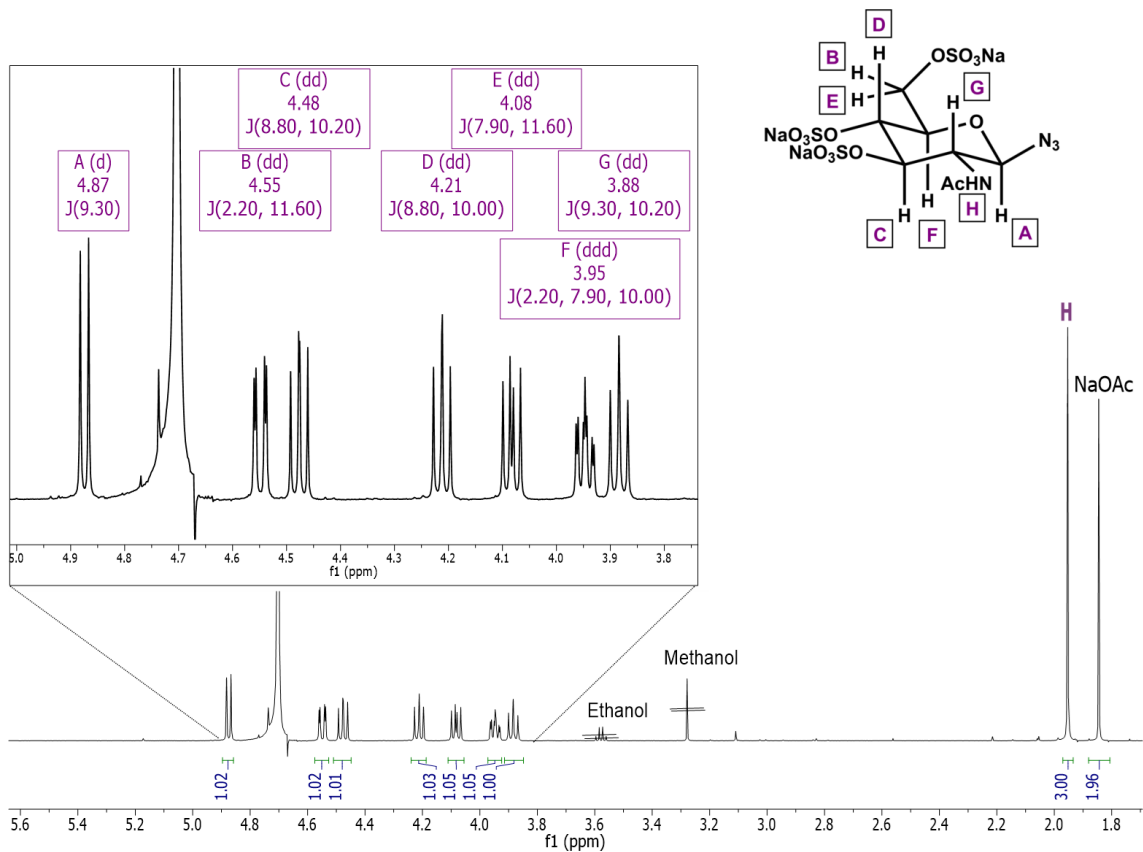


Abbildung 17: ¹H-NMR von Verbindung **3** (600 MHz, D₂O). Vergrößert sind die Signale, welche durch die Ringprotonen A-G verursacht werden. Die Kopplungskonstanten *J* [Hz] können für alle Protonen zugeordnet werden und deuten zum Teil konformative Auswirkungen an, die sich durch die Sulfatisierung ergeben.

Die höhere Tieffeldverschiebung von Proton **C** (C₃) gegenüber den weiteren Ringprotonen deutet auf eine Orientierung der Sulfatgruppe in ebendiese Richtung, entgegengesetzt des ringinternen Sauerstoffatoms hin. Die Intensitäten aller Ringprotonen korrelieren mit der Intensität der Acetylgruppe **H**. Das anomere Proton **A** zeigt zu 100% eine axiale ³J_{HH}-Konstante von 9,30 Hz. Beim Produkt handelt es sich also, wie bei der nicht sulfatiserten Vorstufe, um ein vollständiges β-Anomer. Wie beschrieben, lässt sich auch der Anteil an Natriumacetat (NaOAc) abbilden. Generell ist ein Vergleich zwischen sulfatisierter und nicht sulfatisierter Spezies per ¹H-NMR interessant, da sich neben chemischen Verschiebungen auch konformelle Veränderungen erkennen lassen. In Anlehnung an Wessel et al. wurde Verbindung **3** auf Veränderungen in der Konformation des Sechsrings untersucht^[153].

Tabelle 2: Kopplungskonstanten von nicht sulfatisertem und sulfatisertem N-Acetylglucosamin (GlcNAc) (300 MHz $^1\text{H-NMR}$, D_2O).

	$^3J_{1,2}$	$^3J_{2,3}$	$^3J_{3,4}$	$^3J_{4,5}$	$^3J_{5,6a}$	$^3J_{5,6b}$	$^2J_{6a,6b}$
(3-6S) GlcNAc- N_3 (3)	9,3	10,2	8,8	10,0	2,2	7,9	- 11,6
GlcNAc- N_3 (2)	9,3	10,3	8,8	9,9	2,2	5,6	- 12,4

Das Anomer hat nach der Sulfatisierung die gleiche Kopplungskonstante und bleibt daher konformativ ungestört (**Tabelle 2**). Beim erwähnten Proton **C** ($^3J_{2,3}$) ist eine Differenz (ΔJ) von 0,1 Hz zu erkennen, wodurch die getroffene Aussage unterstützt werden kann, dass es hier einen Effekt durch die Rotation der C_6 -Sulfatgruppe gibt. Die nächste Kopplungskonstante bleibt wieder konstant bei 8,8 Hz. Erst in Bindungsnähe der flexiblen C_6 -Sulfatgruppe treten wieder Unterschiede auf. Drastische Abweichungen gibt es, wie beschrieben, bei $^3J_{5,6b}$ mit 2,3 Hz und $^3J_{6a,6b}$ mit 0,8 Hz Differenz. $^3J_{5,6b}$ bleibt bei 2,2 Hz, möglicherweise egalieren sich die Effekte hier wieder.

Generell lässt sich konstatieren, dass das Ringgerüst in seiner Konformation weitestgehend unverändert bleibt. Ähnlich der Untersuchungen von Wessel et al. an sulfatisierter D-Glucopyranose liegen anomerer Effekt und Ladungswechselwirkungen hierbei im Gleichgewicht^[153]. Die $^4\text{C}_1$ -Konfiguration wird möglicherweise durch den schwächeren anomeren Effekt des Azids, gegenüber dem von Sauerstoff bei üblichen Glucosederivaten noch stärker favorisiert. Die C_6 -Gruppe kann entgegen der Ringspannung frei rotieren, was sich durch eine stark veränderte Konformation anhand der Differenzen der Kopplungskonstanten zeigt. Dies zu erkennen ist wichtig, um die Bindungsaffinität sulfatisierter Saccharide besser zu verstehen. Bei veränderten Bindungseigenschaften gegenüber der unsulfatisierten Spezies sind die ringinternen Sulfate und deren Ladungen entscheidend, da eine Konformationsänderung ausgeschlossen werden kann. Nur die C_6 -Gruppe kann, limitiert durch Ladungsbarrieren, rotieren. In natürlichen Glucosaminoglycanen ist diese Gruppe in der Regel immer sulfatisiert. Ihre veränderte Beweglichkeit und Anpassungsfähigkeit macht sie vermutlich äußerst wichtig für spezifische Bindungen.

SAX-HPLC

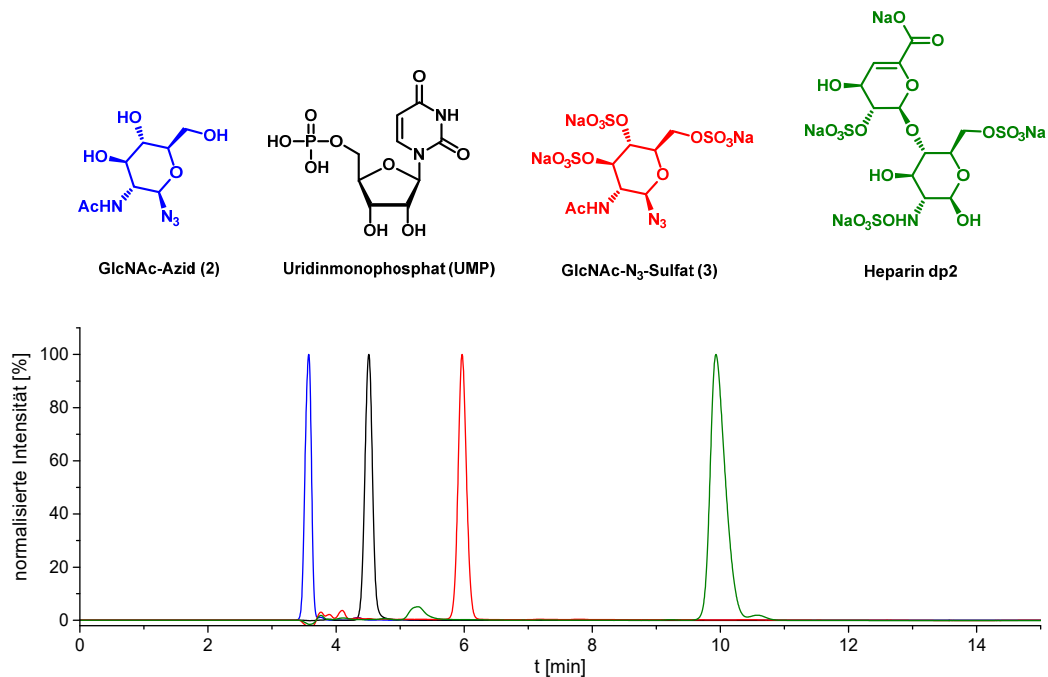


Abbildung 18: SAX-HPLC von Verbindung **2** und **3** im Vergleich mit Uridinmonophosphat und Heparin dp₂¹ und Phosphatpuffer (pH 7) als Laufmittel.

Vollständig sulfatisiertes GlcNAc (**3**) diente nicht nur als mögliche Vorstruktur sulfatisierter Glycooligomere, sondern auch als sehr gut geeignete, niedermolekulare Testreferenz von Sulfaten in einer Anionenaustauschchromatographie. Aufgrund der hohen Ladung der Sulfate ist der Einsatz klassischer HPLC-Methoden, wie *reverse phase* (RP)-HPLC nicht geeignet. Abhilfe schafft ein stark austauschendes System, wie die starke Anionenaustausch-HPLC (engl. strong anion exchange, SAX). Für diese Methode wurde eine Zorbax[®] SAX Säule (4,6 x 25 mm, 5 µm) verwendet. Die Inbetriebnahme erfolgte mit einem Agilent[®] 1200 Series LC System. Als mobile Phase wurde ein pH 7 Phosphatpuffer eingestellt. Anionen werden bei dieser Methode durch ammoniumfunktionalisierte Silicapartikel zurückgehalten.

Weniger stark geladene Verbindungen, sowie ungeladene oder gar positiv geladene Strukturen eluieren daher früher. Die injizierten Substanzen wurden durch UV-Detektion bei 214 nm ermittelt. Dadurch konnten aromatische Systeme, Doppelbindungen oder Amide der gemessenen Substanzen detektiert werden. Durch den Vergleich mit Substanzen

unterschiedlicher Ladungen konnte das Verhalten der dreifach negativ geladenen Verbindung **3** besser bewertet werden (**Abbildung 18**). Die unsulfatisierte Verbindung **2** eluiert bereits nach 3,6 Minuten, was ungefähr der Retentionszeit des Injektionsvolumens entspricht. Daran erkennt man, dass ungeladene Verbindungen vom System nicht zurückgehalten werden.

Die Retentionszeit steigt mit erhöhten negativen Ladungen. Uridinmonophosphat (UMP) ist eine von Agilent empfohlene, zweifach negativ geladene Testsubstanz, welche nach 4,5 Minuten eluiert. Daran wird der Effekt zunehmender, ladungsbezogener Interaktionen sichtbar. Das dreifachgeladene GlcNAc-sulfat (**3**) eluiert nach 6,0 Minuten. Heparin dp2¹ ist ein Heparinfragment mit vier möglichen, negativen Ladungen, welches schließlich nach 9,9 Minuten eluiert. Durch diese Testreihe kann der Einfluss der Sulfatisierung auf die SAX-HPLC gezeigt werden. Eine nicht geladene Glycostruktur wird von der Säule nicht ausgetauscht, wohingegen eine Sulfatisierung zu einer Erhöhung der Retentionszeit führt. UMP und Heparin dp2 zeigen weiterhin, dass die Retention sehr gut mit der Anzahl der Ladungen korreliert, auch wenn die Ladungsquelle variiert (Phosphat bei UMP, Carboxylat neben Sulfaten bei Heparin dp2). Die Methode ist geeignet zur Bestimmung von N-Acetylglucosaminsulfaten, auch wenn hier, wie vorher beschrieben, noch Salzkontaminationen vorliegen. Auf die Bedeutung der SAX-HPLC wird im Verlauf der Arbeit bei Untersuchung der sulfatisierten Glycooligomere weiterhin eingegangen.

¹Heparin dp2 wurde nach einer literaturbekannten Methode von Bärbel Blaum (Universität Tübingen) hergestellt^[154] und zu Verfügung gestellt.

3.1.3 GlcNAc-Oligomersynthesen

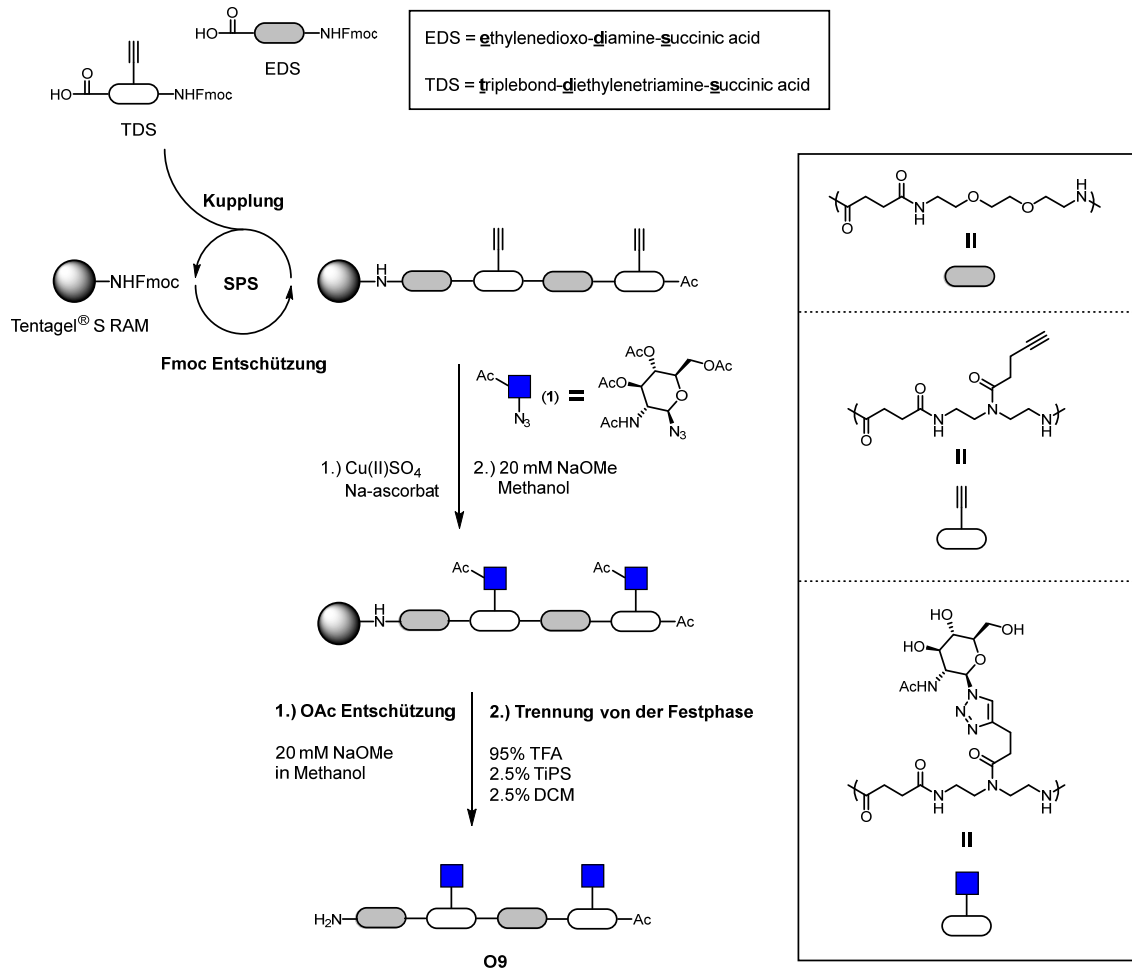


Abbildung 19: Synthese von GlcNAc-Oligomeren, beschrieben Anhand GlcNAc-Oligomer O9.

Die Synthesestrategie zur Herstellung sulfatisierter Glycooligomere erforderte zunächst die Festphasensynthese von alkinhaltigen Oligomeren, welche anschließend mit azidmodifiziertem N-Acetylglucosamin (1) in einer Klickreaktion umgesetzt wurden. Die Synthese der N-Acetylglucosamin-Glycooligomere erfolgte nach der im Arbeitskreis etablierten Festphasensynthese^[3]. Als maßgeschneiderte, synthetische Bausteine, die in der Einleitung beschrieben wurden, kamen der EDS Spacer mit flexiblem, wasserlöslichem Ethylendioxo-Rückgrat und das alkinhaltige TDS zum Einsatz. Deren C-terminale Carboxylgruppe und Fmoc-geschützten N-Termini ermöglichen die Synthese von Oligoamiden an der festen Phase. Durch gezielte Positionierung der Bausteine während der Festphasensynthese kann die Stelle der Dreifachbindungen im Oligomergerüst genau definiert werden. Bis auf einige Ausnahmen, die an späterer Stelle beschrieben werden, wurde das fertige Oligomergerüst nach

der letzten Kupplungsreaktion mit einer Acetylschutzgruppe versehen. Durch die ebenfalls festphasenkompatible CuAAC wurde der Zucker anschließend an das Gerüst gebunden. Zur Zuckerligation wurden in der Vergangenheit bereits einige Protokolle entwickelt^[3, 127, 129-130]. In den Bachelorarbeiten von Jennifer Materlik und Kevin Janus wurde erstmals peracetyliertes GlcNAc-azid (**1**) eingesetzt^[156, 159]. Die Synthese und Aufreinigung wurden im Laufe dieser Doktorarbeit weiter optimiert. In Einzelfällen war der gebräuchliche Einsatz von 30 mol-% Katalysator nicht ausreichend, um alle Alkine umzusetzen. Möglicherweise wird ein Teil des Katalysators durch das Amid abgefangen, welches durch das freie Elektronenpaar in der Lage sein könnte, Kupferionen zu komplexieren. Abhilfe schafft hier ein 30-prozentiger Überschuss Katalysator im Verhältnis zum Zucker. Restliches Kupfer kann sehr gut mit Hilfe von Natriumdiethyldithiocarbamat in einem Waschschrift der Festphase entfernt werden. Ebbesen et al. zeigten, dass sich dieses Reagenz sehr gut zur Entfernung von Kupfer aus Glycooligomeren verwenden lässt^[128]. Nachdem alle Dreifachbindungen abreagiert sind, was durch RP-HPLC Messungen geprüft werden kann, wurden die Zucker durch den Einsatz von 20 mM Natriummethanolat in Methanol entschützt und das Glycooligomer anschließend durch ein Abspaltreagenz von der Festphase getrennt. Oligomere, mit denen an der Festphase weitergearbeitet wurde, wurden in analytischen Mengen abgespalten. Für spätere Reaktionen in Lösung wurden Oligomere **O9-O13** vollständig abgespalten und durch präparative HPLC aufgereinigt. Weitere Charakterisierung der Oligomere erfolgte durch ¹H-NMR und ESI-MS. In diesem Kapitel sollen die hergestellten GlcNAc-Oligomere übersichtlich dargestellt werden (**Tabelle 3**). Deren jeweiliger Einsatzbereich wird dann in folgenden Teilen dieser Arbeit weiter erläutert.

Zu den hergestellten Oligomeren sind die jeweiligen, strategischen Anwendungsgebiete innerhalb dieser Arbeit dargestellt. Bei den mit Oligomeren **O1-O3** handelt es sich um Oligomere, deren Synthese einer Untersuchung zur Sulfatisierung an der Festphase dienen (SPS). **O2** wurde von Kevin Janus im Laufe seiner Bachelorarbeit synthetisiert und untersucht (vgl. Kapitel 3.1.4.1)^[159]. Die Abspaltung vom Harz sollte in Vollständigkeit erst nach einer Sulfatisierung erfolgen. TCES (**O1, O4 - O6**) steht für Trichloroethylchlorosulfat, einer Sulfat-Schutzgruppe, die später genauer beschrieben wird (3.1.4). Die Reaktion erfolgte hier ebenfalls vor Abspaltung des Oligomers. Alle weiteren Oligomere, bis auf **O7**, wurden in der gezeigten Art vom Harz abgetrennt und durch präparative HPLC aufgereinigt. Bei **O7** und **O8** wurden die Oligomere schon vor der Ligation eines Zuckers vom Harz entfernt. Es sollte im

III - Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 3: Synthetisierte (Glyco-)Oligomere. O2 wurde von Kevin Janus (Bachelorarbeit) synthetisiert.^[159]

Probe	Harz	Struktur	Anwendung
O1	TG SRAM		SPS, TCES
O2	Trt-EDA		SPS
O3	Trt-Gly		SPS
O4	TG SRAM		TCES
O5	Trt-EDA		TCES
O6	Trt-Gly		TCES
O7	TG SRAM		Click
O8	Trt-Gly		Click
O9	TG SRAM		Lösung
O10	Trt-Gly		Lösung
O11	TG SRAM		Lösung
O12	TG SRAM		Lösung
O13	TG SRAM		MB

Legende

TG SRAM	-	Tentagel® S RAM	SPS	-	Sulfatisierung an der Festphase
Trt-EDA	-	Tentagel-trityl-ethylendiamin	TCES	-	Sulfatisierung mit Trichloroethylsulfat
Trt-Gly	-	2-Chlorotritylglycin	Lösung	-	Sulfatisierung in Lösung
Click	-	Klickreaktion in Lösung	MB	-	Herstellung von Nickel Magnetic Beads

Anschluss eine Klickreaktion in Lösung mit sulfatisertem GlcNAc (**3**) erfolgen. **O9 - O12** beschreiben GlcNAc-Oligomere, die für Sulfatisierungsreaktionen in Lösung eingesetzt wurden. Da es sich hierbei um erstmals präparativ aufgereinigte GlcNAc-Oligomere handelt, werden sie im nächsten Abschnitt genauer beschrieben. **O-10** enthält einen basenlabilen Trityl-Glycin-Linker, daher musste der Zucker schon vor der Klickreaktion deacetyliert werden. Die Klickreaktion ließ sich dennoch, ohne besondere Vorkommnisse, gut durchführen. Bei **O13** handelt es sich um einen Sonderfall. Dieses Oligomer wurde nicht zur Sulfatisierung verwendet, sondern zur Herstellung GlcNAc-modifizierter Nickelbeads, wie sie in Kapitel 3.2 beschrieben werden. Die Synthese erfolgte allerdings unter gleichen Bedingungen, mit dem Unterschied, dass der N-Terminus nach Abspaltung der Fmoc-Gruppe nicht acetyliert wurde.

Der Abschnitt „Harz“ der **Tabelle 3** zeigt das eingesetzte Festphasenharz der jeweiligen Strategie. Sehr gut etabliert ist die Synthese der Glycooligomere unter Einsatz des Tentagel S[®] RAM (TG SRAM). RAM steht für Rink-Amid, ein Linker, der in 95-%iger Trifluoroessigsäure abgespalten wird. Da solche Bedingungen nicht immer für die Sulfatisierungsreaktionen geeignet sind, wurden auch leichter abspaltbare Linker, wie Trityl-ethyldiamin (Trt-EDA) und 2-Chlorotryl-Glycinester (Trt-Gly) verwendet.

Als analytische Beispiele sollen die erstmals vollständig aufgereinigten GlcNAc-Oligomere **O9-O12** dienen. Die Aufreinigung erfolgte gut mittels RP-HPLC bei leichten Gradienten von 10-12,5 % Acetonitril in Wasser und 0,1 % Ameisensäure. Die Gesamtausbeute der Oligomere lag zwischen 32 und 40 %, abgesehen von **O10**. Bei diesem Oligomer wurde ein labiler Trityl-Glycin Linker eingesetzt. Die Carboxylendgruppe des Glycins sorgte für stark veränderte Löslichkeitseigenschaften und erschwerte somit das sonst einfache Ausfällen der Verbindungen in Diethylether. Dies führte dazu, dass die Ausbeute dieses Oligomers deutlich geringer ausfiel. Alle GlcNAc-Oligomere zeigten per RP-HPLC (5-50 % Acetonitril in Wasser über 30 Minuten) eine relative Reinheit von über 95 % (Integration des UV-Signals bei 214 nm). Die Strukturen konnten mittels ¹H-NMR Spektroskopie ebenfalls nachgewiesen werden, welche bei **O9** anhand des Vergleichs mit der sulfatiserten Spezies später genauer erläutert wird.

Sehr interessant sind die ESI-MS Untersuchungen der GlcNAc-Oligomere. Anhand **Abbildung 20** können Fragmentierungsprozesse bei ebendiesen beschrieben werden. Ähnliche Prozesse konnten auch bei Strukturen in der Bachelorarbeit von Kevin Janus gefunden werden^[159]. Bei **Abbildung 20** handelt es sich um das ESI-MS-Spektrum von **O9**. Das Hauptsignal des mit Natrium beladenen Oligomers ($m/z = 794$) kann gefunden werden. Zudem fällt ein m/z -Wert von 568,9 auf. Hierbei handelt es sich um ein zweifach protoniertes Fragment von **O9**, bei dem es zu

Bindungsbrüchen zwischen Zucker und Triazol gekommen ist (M' , **Abbildung 20**). Die einfach protonierte Form ($m/z = 1136,55$) und ein nur einmal fragmentiertes Produkt ($m/z = 670,5$) können ebenfalls detektiert werden. In **Abbildung 21** wird ein möglicher Mechanismus vorgeschlagen. Eine Protonierung am N_1 -Atom des Triazols ist wahrscheinlich, da es sich um die Stelle mit der höchsten Basizität, ähnlich zu Pyridin oder Imidazol, handelt. Diese kationische Form ist durch die mögliche Übertragung der Ladung auf das N_3 -Atom mesomeriestabilisiert. Durch Bindungsbruch zum Zucker regeneriert sich das Triazol in einer durch das ESI-MS ermittelbaren Spezies und die Ladung überträgt sich auf die Pyranose, deren ringinterner Sauerstoff durch Mesomerie zur Ladungsstabilisierung beiträgt. Eine zusätzliche Protonierung des Triazols ist ebenfalls durch Mesomeriestabilisierung begünstigt, ohne dass das System seine Aromazität einbüßt. Dies resultiert in dem starken Signal durch zweifache Zuckerfragmentierung bei $m/z = 568,9$. Das entstandene Zuckerfragment kann mit einem m/z -Wert von 204 gefunden werden. Bei **O9** kann außerdem, wie beschrieben, das Signal einer einfachen Zuckerfragmentierung bei $m/z = 670,5$ detektiert werden

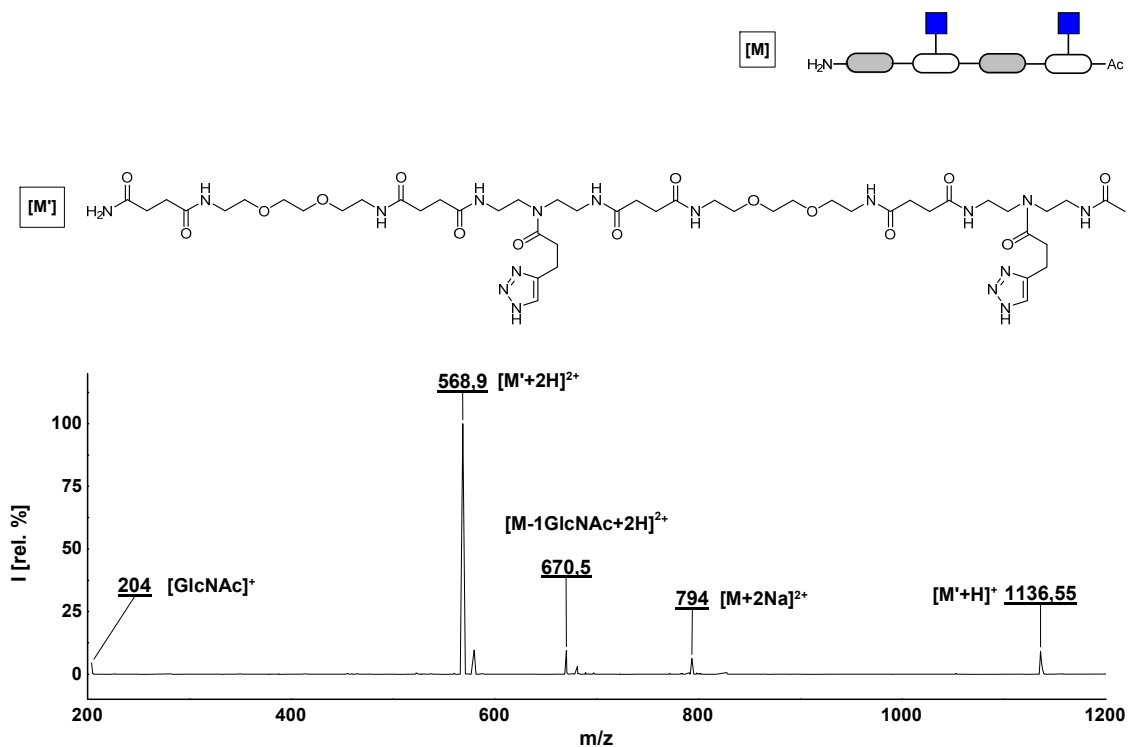


Abbildung 20: ESI-MS-Spektrum von **O9**. Fragmentor 100 Volt, 0,1 % Ameisensäure. Zur Erläuterung siehe **Abbildung 21**. (Tabellarische Darstellung der Fragmente: siehe experimentellen Teil).

Bei Verbindung **O9** lässt sich das ESI-MS-Spektrum trotz dieser Fragmentierungen gut deuten, da hier lediglich zwei GlcNAc-Einheiten ligiert sind und demnach nur maximal zwei verschiedene

Fragmente entstehen können. Die Massen lassen sich sehr gut zuordnen, somit bestätigt diese Art der Spaltung sogar zusätzlich die Struktur des Oligomers. Schwieriger wird es bei den Oligomeren **O10-O12**, die eine höhere Zuckervalenz besitzen. Hier können zahlreiche Fragmentierungsprodukte mit unterschiedlichen Beladungen entstehen. Die erhöhte Masse der Substanzen führt außerdem zu zusätzlichen Isotopenverteilungen.

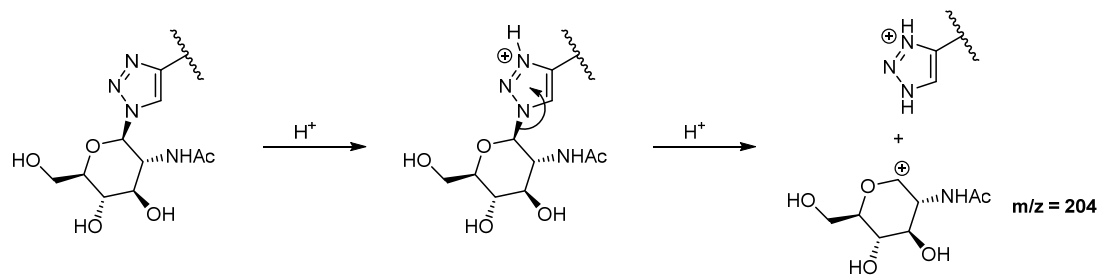


Abbildung 21: Protoneninduzierte Fragmentierung von GlcNAc-Glycooligomeren im ESI-MS.

In der Folge entstehen sehr stark fragmentierte ESI-MS-Spektren, wie im Spektrum von **O12** zu erkennen ist (**Abbildung 22**, oben). Neben den zahlreichen Fragmenten sticht hier wieder das Zuckerfragment bei einem m/z -Wert von etwa 204 heraus. Zur besseren Detektion war eine Anpassung der Messung notwendig. Zunächst wurde die Ameisensäure aus dem Laufmittel entfernt. Da sich die Messung zwar verbesserte, aber noch immer starke Fragmentierungen auftraten wurde weiterhin der Fragmentor sukzessive von 100 Volt auf 40 Volt reduziert. Eine weitere Anpassung ist möglich, würde allerdings das Detektionsvolumen im Quadropol zu stark reduzieren. Das optimierte Spektrum ist in **Abbildung 22** unten zu erkennen. Nach wie vor existiert ein Signal des fragmentierten Zuckers bei 204, welches sich nicht vollständig reduzieren ließ. Alle weiteren Signale lassen sich jedoch dem gewünschten Produkt zuordnen.

Durch die Optimierung der ESI-MS-Analysenmethode konnten von allen GlcNAc-Oligomeren gut bewertbare Spektren aufgenommen werden. Die Methodik konnte außerdem für die Messungen von hochauflösenden UHMS-Spektren verwendet werden (engl. *Ultra High Resolution Mass Spectroscopy*). Somit gelang es für alle präparativ aufgereinigten GlcNAc-Oligomere eine schlüssige Analytik zu generieren. Die Triazol-Abspaltung kam nicht nur bei ESI-MS Messungen vor. Unter Verwendung von aziden Matrizen konnte eine ähnliche Fragmentierung mittels MALDI-TOF Spektroskopie detektiert werden (siehe **Anhang, Abbildung 5** bis **Anhang, Abbildung 8**). Eine Methode mit derer die Fragmentierung hier verhindert wird, konnte jedoch bislang nicht ermittelt werden.

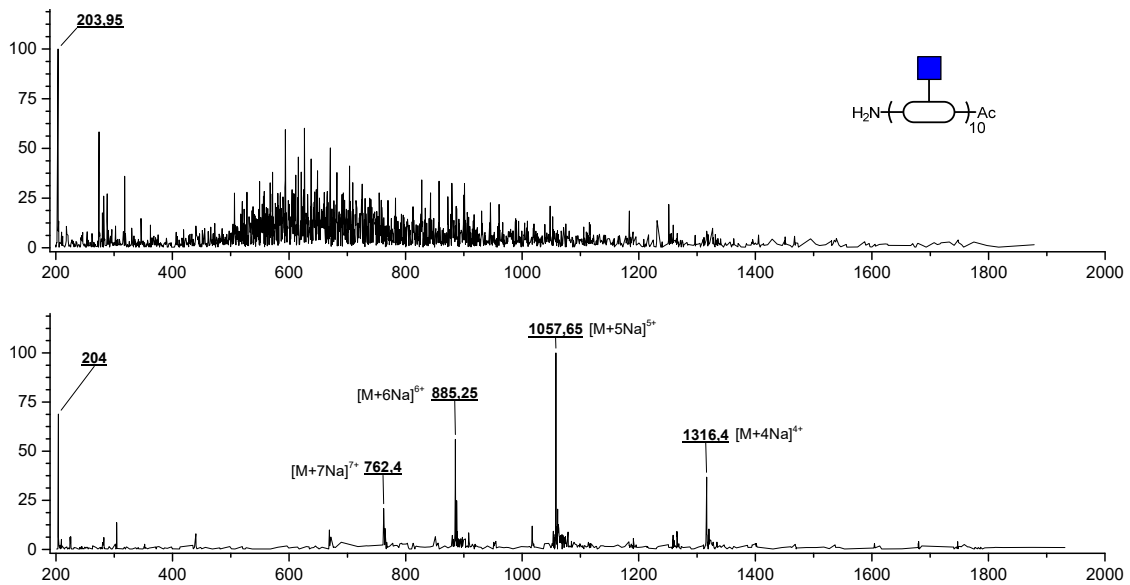


Abbildung 22: ESI-MS-Spektrum von **O12**. Oben eine stark fragmentierende Aufnahme mit 100 Volt Fragmentorspannung und 0,1 % Ameisensäure. Unten eine stark verbesserte Messung mit 40 Volt Spannung, ohne Einsatz von Ameisensäure.

Insgesamt konnte eine Serie von GlcNAc-Oligomeren und alkinhaltigen Vorstufen hergestellt werden. Die Synthese erfolgte, wie beschrieben, nach etablierten Protokollen. Jedoch mussten einige Punkte angepasst werden, wie die Katalysatorkonzentration bei der CuAAC mit GlcNAc-Azid (**1**), oder die Qualität der ESI-MS-Analytik. Die präparativ aufgereinigten Oligomere **O8-13** konnten allesamt analytisch nachgewiesen werden. Substanzen, mit denen an der Festphase weitergearbeitet wurde, wurden wie beschrieben in analytischen Mengen abgetrennt und erfolgreich per LC/MS-Analyse untersucht.

3.1.4 Synthese sulfatisierter GlcNAc-Oligomere

Im vorherigen Kapitel wurde die Synthese von GlcNAc-Oligomeren mittels Festphasensynthese beschrieben. Anhand dieser Übersicht sollen nun verschiedene Strategien beschrieben werden, welche zur Synthese sulfatisierter GlcNAc-Oligomere eingesetzt wurden. Die zahlreichen Möglichkeiten zur Herstellung sulfatisierter Glycooligomere wurden zu Beginn der Ergebnisdiskussion dargestellt. Arbeiten zu verschiedenen Verfahren wurden zum Teil parallel

durchgeführt, sie werden allerdings an dieser Stelle einzeln betrachtet. Aus der Gesamtheit und Bewertung aller Strategien ergab sich letztendlich eine optimierte Route, wie in den nächsten Kapiteln erläutert wird.

3.1.4.1 Sulfatisierung an der festen Phase

Im Rahmen der Bachelorarbeit von Kevin Janus wurde ein einfache Verbindung (**O2**), bestehend nur aus einem TDS-Baustein mit GlcNAc ligiert am Tentagel® S Trityl Harz mit Ethylendiaminspacer (Trt-EDA) an der Festphase sulfatisiert¹. Ein Vorteil des Trt-EDA-Harzes gegenüber TG SRAM sind mildere Abspaltbedingungen. Dies sollte aufgrund der bekannten Instabilität von Sulfaten gegenüber Säuren berücksichtigt werden^[160]. Ein 15-facher Überschuss TMA*SO₃ wurde von Kevin Janus für 12 Stunden bei 60 °C mit dem **O2**-modifizieren Harz versetzt und anschließend mit fünfprozentiger TFA/DCM-Lösung für 60 Minuten abgespalten und in Diethylether gefällt. Eine ¹H-NMR-Analyse zeigte jedoch nur eine teilweise erfolgreiche Sulfatisierung. Aufgrund der Labilität der Sulfate testete Kevin Janus weiterhin im Laufe seiner Bachelorarbeit neben mild-sauren Bedingungen nach Sulfatisierung eine Abspaltung von der festen Phase mittels Bortrifluorid. Liu et al. zeigten, dass diese Methode geeignet ist, um sulfatisierte Saccharide ohne Desulfatisierung von der Festphase zu trennen^[157]. Bei seinen Versuchen jedoch schien die Methode aus nicht vollständig aufgeklärten Gründen inkompatibel mit der Festphasensynthese zu sein.^[159]

¹Kevin Janus beschäftigte sich im Laufe seiner, von Sebastian Bauer angeleiteten Bachelorarbeit (*Einführung von Sulfatgruppen an D-Glucosamin-Seitenketten in Präzisionsglycopolymeren*, 2016)^[159] mit ersten Versuchen zur festphasenanalogen Sulfatisierung von N-Acetyl-D-glucosamin (GlcNAc) Oligomeren. Von den in dieser Arbeit vorgestellten GlcNAc-Oligomeren stellte er **O2** her, allerdings ohne vollständige präparative Aufreinigung. Neben der Festphasensynthese von Oligomer **O2** führte an diesem festphasenanalogen Sulfatisierungen durch und verwendete verschiedene Abspaltungsstrategien, um den Erhalt der sulfatisierten Strukturen nach der Abspaltung zu überprüfen. Ergänzend zu seinen festphasenanalogen Sulfatisierungen mit **O2** wurden im Laufe dieser Doktorarbeit weitere Methoden zur Sulfatisierung an der Festphase getestet (Kapitel 3.1.4.1).

Jennifer Materlik versuchte in ihrer Bachelorarbeit parallel dazu an ähnlichen Oligomeren eine sulfatisierte, jedoch noch stark verunreinigte Probe GlcNAc-Sulfat (**3**) per Kickreaktion am Harz umzusetzen. Doch auch hier zeigten sich nach Abspaltung mit fünfprozentiger TFA/DCM-Lösung keine zufriedenstellenden Ergebnisse.^[156]

Ein Problem bei der Sulfatisierung an der Festphase ist, dass sich nicht erschließt, ob die Sulfatisierungsbedingungen per se nicht ausreichen, um den Zucker vollständig zu sulfatisieren, oder ob es durch die harschen Abspaltbedingungen zu Desulfatisierungen kommt.

Dennoch wurden im Laufe dieser Doktorarbeit noch wenige weitere Versuche an der Festphase durchgeführt. Tentagel S[®] RAM wurde ebenfalls verwendet, um ein divalentes **O9** mit zweifacher Zuckervalenz an der Festphase zu sulfatisieren, obwohl dieses System sehr harsche Abspaltbedingungen mit hohen TFA-Konzentrationen benötigt. Campos et al. schlagen in ihren Arbeiten eine Tetrabutylammonium(TBA)-Beladung der Sulfate vor, um sie sehr gut vor Desulfatisierung zu schützen^[158]. Das **O9**-Modifizierte Harz wurde mit 40 Äquivalenten TMA*SO₃ für 18 Stunden bei 70 °C in DMF gerührt. Diese Bedingungen zeigten sich, wie in Kapitel 3.1.4.3 gezeigt wird, sehr gut für Sulfatisierungen in Lösung. Nach Aufarbeitung mit 10 % Natriumacetatlösung wurde mit Hilfe von Tetrabutylammoniumchlorid (TBACl) ein Kationenaustausch vorgenommen. Die Abspaltung vom Harz erfolgte mit 90 %-iger TFA-Lösung bei 0 °C für 30 Minuten (**Abbildung 23**).

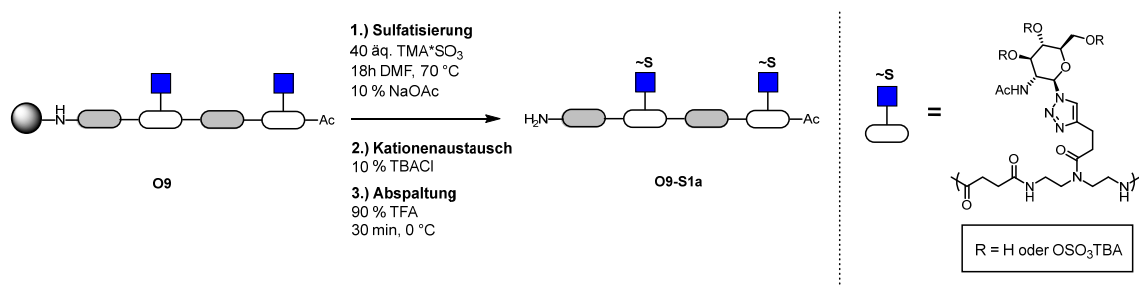


Abbildung 23: Darstellung der TBA-Stabilisierung nach Sulfatisierung von **O9** an der festen Phase und anschließende Abspaltung mit 90 Vol.-%iger TFA-Lösung.

Jedoch konnten auch hier ¹H-NMR und ESI-MS Untersuchungen lediglich eine partielle Sulfatisierung zeigen. Neben dem sechsfach sulfatisierten Produkt, liegen hier auch noch größtenteils fünf bis zweifach sulfatisierte Oligomere vor. Möglicherweise kommt es bei Zuckern einfacher zu Desulfatisierungen als bei den von Campos et al. gezeigten Aminosäurederivaten.

Es wurden noch weitere Versuche mit dem sehr labilen Trityl-Glycinester-Harz unternommen (**O3**), jedoch zeigte sich hier sogar schon eine Abspaltung vom Harz während der Sulfatisierungsreaktion. Möglicherweise ist der Linker zu labil für diese Reaktion.

Um die Sulfatgruppen weiter gegenüber Abspaltbedingungen zu stabilisieren, wurde der Versuch unternommen eine Sulfatschutzgruppe einzuführen. Als Beispiele können hierfür die Veröffentlichungen betrachtet werden, welche Trichloroethylsulfat als Sulfatschutzgruppe für Saccharide einsetzen. Liu et al. führten erstmals Trichloroethylchlorosulfat (TCES-Cl) als Reagenz zur Bildung dieser Schutzgruppe ein^[161]. Diese funktionelle Gruppe lässt sich anschließend durch katalysierte Hydrierung wieder in eine Sulfatgruppe überführen. Die Synthese von TCES-Cl erfolgte nach Warabi et al.^[162] und wurde erstmals zur Sulfatisierung von **O1**, **O4**, **O5** und **O6** an der Festphase verwendet (**Abbildung 24**).

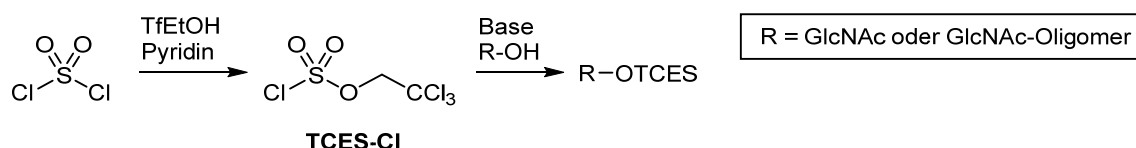


Abbildung 24: Bildung einer 2,2,2-Trichloroethylsulfat (TCES) Gruppe nach Liu et al^[161].

Die Reaktion an der Festphase mit **O1** und **O4** verlief allerdings mit einer großen Anzahl an Nebenreaktionen, wie durch RP-HPLC/MS Analyse gezeigt werden konnte. Bei labileren Linkern mit mildereren Abspaltbedingungen wurden OH-Gruppen entweder nicht umgesetzt (z. B. bei **O5**) oder das Oligomer löste sich während der Reaktion mutmaßlich vom Harz (wie bei **O6**). Die Nebenreaktion lassen sich auf die Beschreibung von Ingram et al. zurückführen, welche postulieren, dass es bei der Reaktion mit TCES-Cl zur Ausbildung von Chlorosubstituenten kommt^[163]. Abhilfe soll der Einsatz von *N*-Methylimidazol als Base schaffen. Andere Gruppen beschreiben den auch hier verwendeten Einsatz von DABCO oder DMAP unter guten Ausbeuten^[104, 161, 164-165]. Doch die Reaktionen an den beschriebenen Oligomeren **O1** und **O4** führten auch unter Einsatz von DABCO oder DMAP zu Nebenreaktionen. Wie Ingram et al. beschrieben haben, wäre der Einsatz eines vorher synthetisierten *N*-Methylimidazolium-TCES-Salzes möglich gewesen. Dies wurde jedoch nicht versucht, auch weil die Reaktion des entschützten GlcNAc-Azids (**2**) mit TCES-Cl unter Einsatz von DMAP zur Bildung eines ähnlichen Ammoniumsalzes führte, wie durch ¹H-NMR-Analyse und ESI-MS (**Abbildung 25**) nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz zu den Veröffentlichungen von Ingram et al. kam es im Anschluss

dieser Salzbildung jedoch nicht zur Umsetzung der OH-Gruppen des *N*-Acetylglucosamin. Weitere Versuche mit TCES wurden nicht vorgenommen. Dies lag auch daran, dass bei der Untersuchung des Reagenzes trotz Lagerung bei -20 °C unter Argon, gegenläufig der Beschreibung von Liu et al. zu Zersetzungsreaktionen innerhalb von drei Monaten kam, wie durch ¹H-NMR Untersuchungen gezeigt werden konnte.

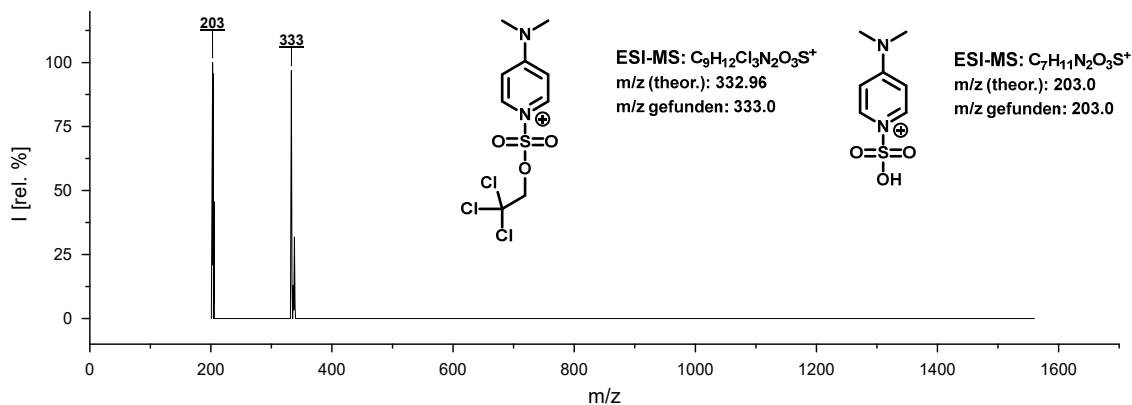


Abbildung 25: ESI-MS des bei der Reaktion von TCES-Cl mit GlcNAc-Azid (**2**) unter Einsatz von DMAP entstandenen Salzes. Dieses Salz führte nicht zur Entstehung von TCES-Schutzgruppen am Saccharid, wie ähnlich von Ingram et al. mit Imidazoliumsalzen beschrieben wird^[163]. Die gefundenen Fragmente korrelieren mit ¹H-NMR Ergebnissen.

Bei älteren Proben von TCES-Cl führte dies zu stark exothermen Säure-Base-Reaktionen nach hinzufügen von DABCO oder DMAP. Doch auch frische Ansätze des TCES-Cl führten nicht zu den gewünschten Reaktionsprodukten.

Weitere Reaktionen zur Sulfatisierung an der Festphase wurden nicht vorgenommen. Die Abspaltung vom Harz ist mit zu vielen möglichen Nebenreaktionen verbunden. Aufgrund der Reaktion an der festen Phase können Zwischenstufen und Sulfatisierungsgrad zudem vor Abspaltung nicht ausreichend aufgeklärt werden. Stattdessen wurde mit Versuchen in Lösung fortgefahren.

3.1.4.2 Klickreaktion von sulfatisiertem GlcNAc-Azid an alkinhaltigen Oligomeren in Lösung

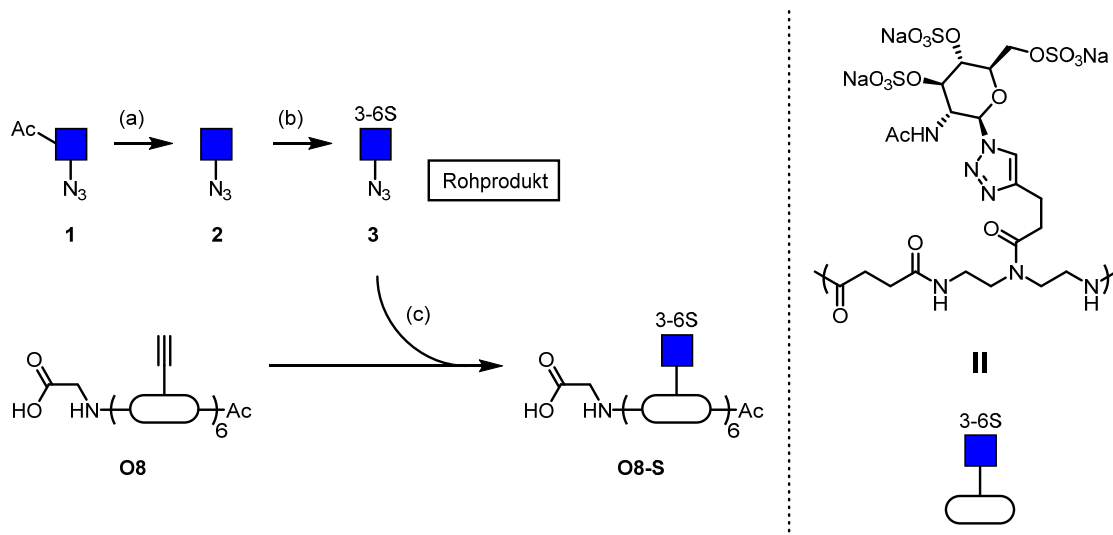


Abbildung 26: Klickreaktion mit sulfatisiertem GlcNAc (**3**) und alkinhaltigem Oligomer (**O8**) in Lösung. (a) 20 mM NaOMe in Methanol (b) 5 äq. TMA*SO₃, DMF, 18h, 70 °C (c) 3 äq. GlcNAc-S, 1,3 äq Cu(II)SO₄, 1,3 äq Na-Ascorbat.

Die Oligomere **O7** - **O12** wurden genutzt, um sulfatisierte GlcNAc-Oligomere durch Reaktionen in Lösung herzustellen. Bei **O7** und **O8** handelt es sich um die Oligomere, welche vor der Anbringung von GlcNAc vom Harz abgespalten wurden. **O8** ließ sich ähnlich, wie **O9** - **O13** durch präparative RP-HPLC mit hohen Reinheiten (>95 %, HPLC) isolieren. Einzig das Laufmittel der HPLC musste aufgrund der fehlenden Zucker und damit geringeren Polarität isokratisch auf eine höhere Acetonitrilkonzentration eingestellt werden. **O7** diente als schnell synthetisierte Vorstufe zum Versuch zur Untersuchung der Reaktivität einer Fraktion des synthetisierten GlcNAc-Sulfats (**3**) aus der Sephadex® LH-20 Chromatographie. Das Oligomer wurde ohne präparative Aufreinigung eingesetzt. Außerdem wurde der N-Terminus nicht durch einer Acetylgruppe geschützt, sondern die Fmoc-Gruppe beibehalten. Grund war eine bessere mögliche analytische Bestimmung der Zielstruktur mit Fluoreszenzdetektoren an der HPLC. Katalysatoren und sulfatisiertes GlcNAc-Azid (**3**) wurden für die Klickreaktion in größeren Mengen als nach NMR-Analyse eingeschätzt, eingesetzt. Grund dafür war, dass dem Zucker beiliegendes Natriumsulfat nicht quantifiziert werden konnte. Nach der Klickreaktion wurde das Rohprodukt durch Dialyse aufgereinigt und mittels ESI-MS-Analyse untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass der Zucker teilweise an das Oligomer gebunden wurde. Alle nachgewiesenen Verbindungen enthielten allerdings noch

mindestens eine Alkylgruppe. Des Weiteren konnten die Zuckerreste lediglich als Gemisch aus zwei- oder dreifach sulfatisierter Form nachgewiesen werden. Unklar ist, ob die Bedingungen der Klickreaktion zu einer Desulfatisierung geführt haben. Analytisch betrachtet lag der Zucker jedoch, wie beschrieben, vor der Klickreaktion in vollständig sulfatisierter Form vor.

Zur Erhöhung der Alkinkonzentration wurde **O8** mit sechs TDS-Einheiten versetzt, damit das Azid des sulfatisierten GlcNAc (**3**) mehr Angriffsmöglichkeiten erhält. Die Anbringung eines Glycinlinkers sollte die Löslichkeit im Falle einer unvollständigen Klickreaktion erhöhen und Vergleichbarkeit zu **O10** schaffen. Der N-Terminus wurde wieder mit einer Acetylgruppe versetzt, um die Stabilität der Verbindung zu erhöhen und eventuelle Einflüsse durch die Fmoc-Gruppe zu verhindern. Zur Klickreaktion wurde ein neuer Ansatz GlcNAc-Azid (**2**) mit optimierten Bedingungen sulfatisiert und direkt als Rohprodukt eingesetzt (**Abbildung 26**). Die Aufreinigung erfolgte mittels Natriumdiethyldithiocarbamat und anschließend mit Hilfe von Spintubes (MWCO: 2000 Da) dialysiert. Zur Analyse wurden ESI-MS und ¹H-NMR eingesetzt. Im ESI-MS Spektrum konnten, nach Anpassung der Messung, lediglich di- und monosulfatisierte Zuckerfragmente detektiert werden. Diese Anpassungen werden in Kapitel 3.1.5 weiter erläutert. Das ¹H-NMR Spektrum zeigt jedoch eine sehr hoch sulfatisierte Form von **O8**, wenn auch unvollständig und mit Kontaminationen versehen.

Diese Synthesestrategie schien also zur Herstellung sulfatisierter GlcNAc-Oligomere geeignet zu sein. Nachteile stellten sich dennoch heraus. Lediglich etwa 1 Gew.-% Ausbeute konnten bei der Reaktion gewonnen werden. Außerdem ließ die leicht braune Färbung des Produkts darauf schließen, dass sich nach der Aufreinigung mittels Spintube-Dialyse noch Kupfer-Thiocarbamat-Komplex in der Probe befindet. Möglicherweise sind diese Ausbeuteverluste auf den Einsatz der Spintubes zurückzuführen. Alternativ könnte eine Dialyse unter Verwendung von Dialyseschläuchen zur Aufreinigung verwendet werden. Generell zeigt dieses Experiment jedoch den Nachteil der Klickreaktion in Lösung gegenüber der Klickreaktion an der festen Phase. Bei den Experimenten in Lösung müssen die Nebenprodukte mühsam durch aufwendige Methoden entfernt werden, wohingegen sie bei der Festphasensynthese mit geringem Aufwand gewaschen werden können. Ohne den Einsatz von Natriumdiethyldithiocarbamat kann Kupfer nicht vollständig aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden. Da in parallel durchgeführten Arbeiten zur Sulfatisierung von GlcNAc-Oligomeren in Lösung gute Ergebnisse erzielt wurden (Kapitel 3.1.4.3), wurde die Strategie der Klickreaktion in Lösung, trotz guter Aussichten, nicht weiterverfolgt.

3.1.4.3 Sulfatisierung von GlcNAc-Oligomeren in Lösung

Nachdem die vielseitigen Strategien zur Sulfatisierung von GlcNAc-Oligomeren im Einzelnen erläutert wurden, soll nun die Methode beschrieben werden, welche sich als am erfolgreichsten herausstellte. Zur Sulfatisierung in Lösung wurden die Oligomere **O9-O12**, wie beschrieben, vollständig von der Festphase getrennt und präparativ aufgereinigt. Die Entwicklung dieser Synthesestrategie wird anhand des divalenten Oligomers **O9** beschrieben. Zur Erschließung der geeigneten Bedingungen wurden Literaturbeispiele verglichen. Da die Strategien im Laufe dieser Arbeit parallel getestet wurden, finden sich ähnliche Beispiele der zuvor beschriebenen Methoden wieder.

In einem ersten Versuch wurde **O9**, noch ohne präparative HPLC-Aufreinigung, mit einem 12,5-fachen Überschuss TMA*SO₃ auf jede OH-Gruppe bei 60 °C im Ofen versetzt. Die Reaktion lief 72 Stunden und wurde anschließend mit Natriumdihydrogencarbonat gequench und per Dialyse aufgereinigt. Das ¹H-NMR zeigte eine Konvertierung der OH-Gruppen, allerdings unvollständig und mit einer hohen TMA-Kontamination (siehe **Anhang, Abbildung 1**). Dass Bicarbonat nicht optimal zur Entfernung von restlichem Sulfatisierungsreagenz geeignet ist, stellte sich schon bei Versuchen am Monosaccharid in Kapitel 3.1.2.2 heraus. Mittels Dialyse schien eine Entfernung des Reagenzes nicht ausreichend zu sein. Möglicherweise tauscht Natriumdihydrogencarbonat aufgrund geringer Basenstärke potenziell entstehende Trimethylammoniumkationen nicht ausreichend aus, sodass sie sich auch nach der Dialyse noch auf den Zuckern befinden. Durch ¹H-NMR-Spektroskopie konnten mindestens 23 % unvollständig sulfatisiertes Produkt nachgewiesen werden. Dazu korrelierten ESI-MS-Untersuchungen, bei denen 3-6-fach sulfatisiertes Produkt detektiert werden konnte. Wie vorher beschrieben, führte auch bei den sulfatisierten GlcNAc-Oligomeren der Zusatz von 0,1 % Ameisensäure bei der ESI-MS-Analyse zu Desulfatisierungen. Die Intensität der Signale für 5- und 6-fach sulfatisiertes Produkt nahm gegenüber Messmethoden ohne Einsatz von Ameisensäure deutlich ab, wohingegen die Intensität der 3- bis 4-fach sulfatisierten Spezies zunahm. Außerdem konnte zweifach sulfatisiertes Produkt detektiert werden, welches ohne den Einsatz von Säure bei der ESI-MS-Analyse nicht entstanden ist.

Im nächsten Experiment wurde sowohl versucht, die Umsetzung der OH-Gruppen voranzutreiben, als auch die Entfernung der Nebenprodukte zu optimieren. Als stark reaktive Methode führten Raghuraman et al. die Mikrowellen-assistierte Sulfatisierung von kleinen

Molekülen ein^[166]. Dieses Konzept wurde auf **O9** angewendet. Dazu wurde **O9** zusammen mit TMA*SO₃ in einem Pyridin-Acetonitrilgemisch (1:10 V/V) gelöst und in einer Rampe bis zu 100 °C gerührt. Bei der Mikrowellensynthese wurde allerdings festgestellt, dass trotz kurzer Reaktionszeiten sofortige Desulfatisierungen und möglicherweise Verkohlungen des Glycooligomers eingesetzt haben. Es konnten partielle Eliminierungsprodukte in der ESI-MS-Analyse detektiert werden (**Abbildung 27**, weiter: **Anhang, Abbildung 2** und **Anhang, Abbildung 3**). Dazu wurde eine deutliche, dunkle Verfärbung des Reaktionsgemisches nach der Synthese festgestellt.

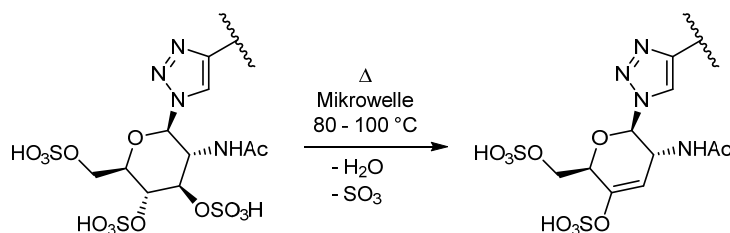


Abbildung 27: Vorgeschlagene Eliminierungsreaktion des per ESI-MS-Analyse detektierten Produkts aus der Mikrowellen-assistierten Sulfatisierung von **O9**.

Generell ließen sehr starke Verfärbungen während der Sulfatisierung bei Bedingungen über 80 °C auf ein Verkohlen des Glycooligomers schließen. Die temperaturkontrollierte Erzwingung der Sulfatisierung war also nur begrenzt möglich. Aufgrund der harschen Bedingungen wurde daraufhin von der Mikrowellenstrategie abgesehen. Eine weitere Methode zur Verbesserung der Reaktivität wurde von Krylov et al. vorgeschlagen^[167]. Hierbei kommt Trifluorsulfonsäure als äußerst starke Brønsted-Säure zum Einsatz. Diese Reaktion verspricht die Freisetzung von SO₃ *in situ*, welches sich anschließend mit Alkoholen zum Organosulfat umsetzt. Hier führte der Einsatz dieses Reagenzes jedoch nicht zur gewünschten Umsetzung von OH-Gruppen zu den jeweiligen Sulfaten. Da sich in parallelen Experimenten bessere Ergebnisse zeigten, wurden auch hier die Reaktionsbedingungen nicht weiter optimiert. Als Alternative zur Dialyse wurde im Laufe der Arbeit die Sephadex® G10 Säulenchromatographie verwendet. Dieses System verspricht eine Aufreinigung ähnlich zur Größenausschlusschromatographie (Gel-Permeations-Chromatographie, GPC), auch bei kleineren Molekülen. In den Fraktionen dieser Chromatographie konnte neben den Produkten jedoch auch immer ein hohes Maß an Kontaminationen gefunden werden. Wie auch bei der Sulfatisierung des Zuckers festgestellt wurde, lag das Problem der Kontaminationen nicht nur in der Aufreinigung, sondern vor allem in der Wahl des Quenchers. Am geeignetsten zur Entfernung überflüssiger

Sulfatisierungsreagenzien und Salze erwies sich das Quenchen mit zehnpromzentiger Natriumacetatlösung und anschließender Dialyse unter Kationenaustausch mit halbgesättigter Natriumchloridlösung. In der Regel reichte sogar die Behandlung mit Natriumacetat für einen Ionenaustausch aus. Dies liegt vermutlich in einer erhöhten Effizienz von Natriumacetat, gegenüber Natriumhydrogencarbonat oder Methanol, das komplexierte SO_3 durch Säure-Base-Reaktion zu deaktivieren, ohne dabei unerwünschte Nebenreaktionen zu vermitteln. Die optimierten Sulfatisierungs- und Quench-Bedingungen lassen sich von einer ähnlichen, bereits vorher zitierten Methode nach Wessel et al ableiten^[153]. Es handelt sich um die Methode, mit welcher auch das funktionalisierte Monosaccharid GlcNAc-Azid (**2**), wie vorher beschrieben, sulfatisiert wurde. Es konnte gezeigt werden, dass fünf Äquivalente SO_3 im Komplex zu jeder OH-Gruppe des Oligomers ausreichen, um eine vollständige Sulfatisierung innerhalb von 17 Stunden bei 70 °C durchzuführen. Allerdings war dieses Ergebnis nicht immer reproduzierbar. Gegebenenfalls ist die Sulfatisierungseffizienz auch abhängig vom Alter des Komplexes. Obwohl das Sulfatisierungsreagenz stets über Phosphorpentoxid und Stickstoffatmosphäre gelagert wurde, ist aufgrund schlechter werdender Löslichkeit anzunehmen, dass der $\text{TMA}^+\text{SO}_3^-$ -Komplex im Laufe der Zeit an Reinheit und Effektivität (aktives SO_3) verliert. Daher wurden die Reaktionsbedingungen zur Sicherheit auf 40 Äquivalente angepasst. Die Synthese unter optimierten Bedingungen wird in **Abbildung 28** gezeigt. Weitere Oligomere, welche unter diesen Bedingungen synthetisiert wurden, sind in **Tabelle 4** des folgenden Kapitels dargestellt.

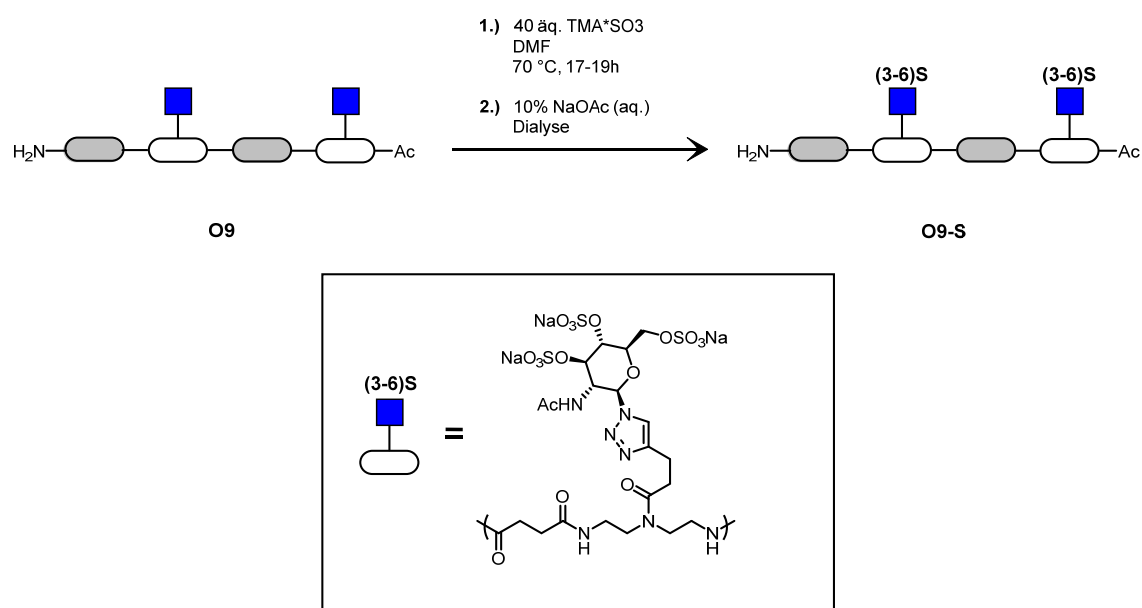


Abbildung 28: Sulfatisierung von **O9** in DMF unter optimierten Bedingungen.

3.1.5 Analytik der sulfatiserten GlcNAc-Glycooligomere

Anhand von **O9-S1** (Tabelle 4) soll die Analyse der sulfatiserten Glycooligomere beschrieben werden. Zur Erläuterung der ESI-MS-Problematik bei hochgeladenen Strukturen und für die HPLC-Analytik werden anschließend auch die höhervalenten Strukturen betrachtet.

IR-Spektroskopie

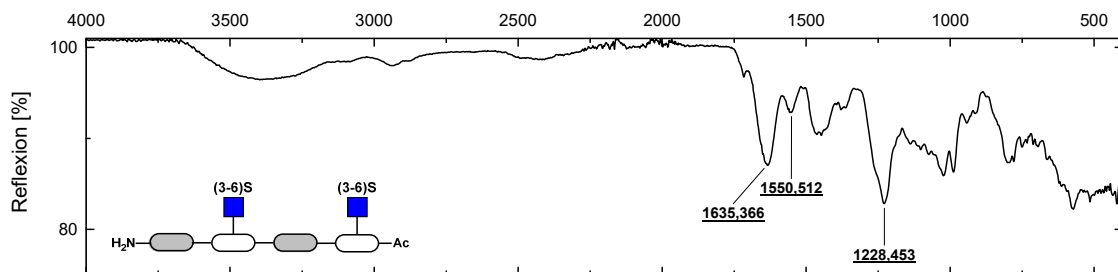


Abbildung 29: FT-IR-Spektrum von O9-S1.

Wie in Kapitel 3.1.2.3 beschrieben, eignete sich auch bei den sulfatiserten Glycooligomeren die FT-IR-Spektroskopie sehr gut zur qualitativen Überprüfung der Produkte. Die Produktspektren ließen sich hierzu mit denen des sulfatiserten GlcNAc (**3**) vergleichen, auch die Vergleiche mit den unsulfatiserten GlcNAc-Oligomeren helfen bei der Deutung der einzelnen Signale. **O9-S1** (Abbildung 29) zeigt die typischen Amidbanden der C=O, bzw. C=N-Streckschwingung bei 1636 und 1551 cm⁻¹, aufgrund der an der Festphase geknüpften Amidgruppen. Wie beim sulfatiserten Monosaccharid **3** tritt bei allen sulfatiserten Oligomeren die sehr starke Bande der S=O-Streckschwingung bei 1228 cm⁻¹ auf. Auch nachgewiesene gering sulfatisierte Strukturen zeigen eine ähnlich stark ausgeprägte Bande in diesem Bereich. Eine quantitative Aussage über den Grad der Sulfatierung ist somit also nicht möglich mittels der FT-IR. ¹H-NMR-Untersuchungen sind hier geeigneter zur qualitativen Untersuchung. Bei den während der Syntheseoptimierung angefallenen chromatographischen Fraktionen und ausgefallenen Nebenprodukten konnte jedoch mittels FT-IR innerhalb weniger Minuten überprüft werden, bei welcher Spezies es sich um sulfatisiertes Oligomer handelte.

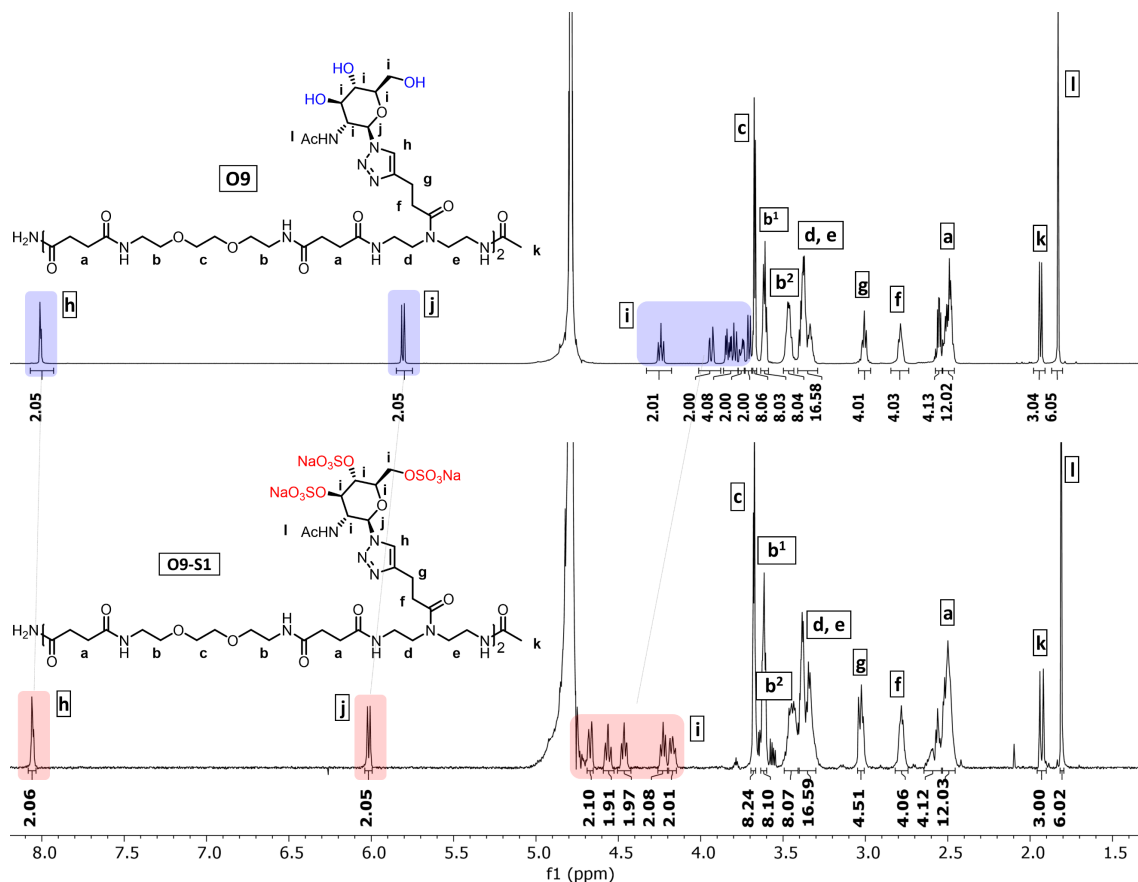
¹H-NMR-Spektroskopie

Abbildung 30: ¹H-NMR-spektroskopischer Vergleich zwischen O9 und O9-S1 (600 MHz, D₂O).

Die Umsetzung der OH-Gruppen konnte sehr gut durch ¹H-NMR-spektroskopische Untersuchungen verfolgt werden (Abbildung 30). Am auffälligsten ist hierbei ein starker Shift der Zuckerprotonen (i), den Protonen, welche durch die Sulfatisierung am meisten beeinflusst werden. Der Übergang der Tieffeldverschiebung von unsulfatisierter Spezies zum finalen Produkt ist in **Abbildung 30** farblich markiert. Die Intensität dieser Tiefeldverschiebung nimmt ab, je weiter man sich von der Stelle mit der höchsten Sulfatisierungsdichte wegbewegt. Sie ist jedoch immer noch sehr deutlich beim β-anomeren Proton (j) erkennbar und kann auch noch beim Triazol-Proton (h) gezeigt werden. Ähnliche Untersuchungen von Krylov et al. an vergleichbaren Sacchariden haben gezeigt, dass der Sulfatisierungsgrad anhand der Signale des anomeren Protons quantifiziert werden kann^[167]. Das Oligomerrückgrat zeigt keine chemische Verschiebung gegenüber des unsulfatisierten GlcNAc-Oligomers, da es sich zu weit von der sulfatisierten Stelle entfernt befindet (2,4-3,8 ppm). Man sieht jedoch eine Verbreiterung der Signale, welche möglicherweise auf veränderte, sterische Anforderungen der Zielstruktur zurückzuführen sind,

resultierend aus elektrostatischer Abstoßung der Anionen (**b**, **c**, **d**, **e**). Im Spektrum kann außerdem eine zusätzliche Tieffeldverschiebung der Bernsteinsäureprotonen (**a**) gefunden werden. Es gibt starke Hinweise darauf, dass dieser Shift durch eine Sulfatisierung des C-terminalen Amids an der letzten Bernsteinsäureeinheit verursacht wird. Denn im ESI-MS-Spektrum der Struktur kann eine siebenfach sulfatisierte Spezies nachgewiesen werden (siehe Abschnitt ESI-MS). Des Weiteren wurde im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des an der Festphase sulfatisierten Oligomers **O9-S1a** (vgl. **Abbildung 23**) eine solche Verschiebung nicht festgestellt (siehe **Anhang, Abbildung 4**). Diese ist hier nicht möglich, da es an der Festphase nicht zu einer Sulfatisierung an dieser Stelle kommen kann. Ein vorgeschlagenes Schema dieser Sulfatisierung ist in **Abbildung 31** dargestellt. Die zugehörige Masse kann per ESI-MS, wie später gezeigt, nachgewiesen werden. Bei Glycooligomer **O10** wurde ein Glycin-Linker eingesetzt, um zu untersuchen, ob sich im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum eine ähnliche Verschiebung zeigt. Tatsächlich kann diese nicht im Spektrum von **O10-S** gefunden werden, da die endständige Carbonsäure nicht sulfatisiert werden kann. Lediglich die Verschiebung durch das Glycin-Ende, welche auch beim nicht-sulfatisierten Oligomer auftritt, ist zu sehen. Da diese Sulfatisierung allerdings nicht immer auftritt, wird das C-terminale Amid der entsprechenden sulfatisierten Oligomere im Folgenden als nicht-sulfatisiert dargestellt.

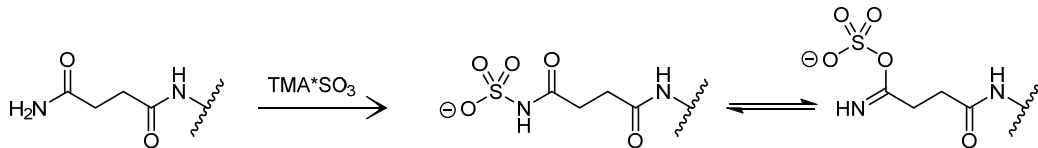
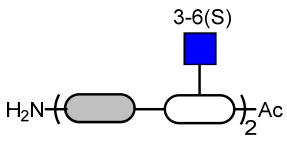
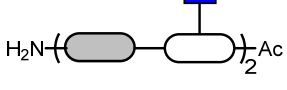
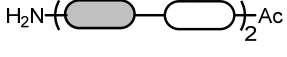
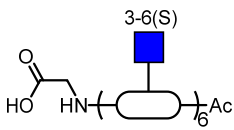
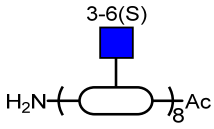
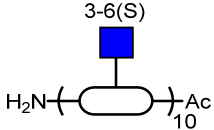


Abbildung 31: Vorgeschlagene Sulfatisierung des C-terminalen Amids der Tentagel S[®] RAM synthetisierten GlcNAc-Oligomere.

Zudem sieht man diese Verschiebung bei Oligomeren **O11-S** und **O12-S** nicht in dieser Form. Grund dafür könnte sein, dass sich diese Protonen zur genauen Quantifizierung dieser partiellen Sulfatisierung zu sehr überlagern. Ein Ringproton des N-Acetylglucosamin (**i**) kann nicht gefunden werden, da es vermutlich unter dem großen Lösemittelsignal von HDO liegt (4,79 ppm). Dieses Signal erschwert zudem die Quantifizierung der Ringprotonen, da es die Basislinie der umlagernden Protonen erhöht. Daher wurde das Signal des Anomers zur Bestimmung der vollständig OH-konvertierten Moleküle verwendet. Dazu wurde das am weitesten tieffeldverschobene Zuckerproton (**j**) mit den Signalen der nur partiell sulfatisierten Moleküle im Bereich 5,20 -5,98 ppm verglichen. Die Sulfatisierungsgrade aller GlcNAc-Oligomere sind tabellarisch dargestellt (**Tabelle 4**). Alle NMRs der sulfatisierten Oligomere **O10-**, **O11-** und **O12-S**

lassen sich mit denen von **O9-S** vergleichen. Die Zuckerprotonen zeigen die gleiche Tieffeldverschiebung. Die Art des Backbones (EDS-Spacing und vicinale GlcNAc-Reste) wirkt sich nicht auf die chemische Verschiebung aus. Die Backbonesignale passen in ihren Intensitäten alle zu den Zuckersignalen. Vereinzelt sind jedoch Signale zu erkennen, welche von nur partiell sulfatierten Oligomeren stammen. Diese Signale fallen im Bereich zwischen 3,7 und 4,7 ppm an. In manchen Spektren von **O9-S** ist eine unaufgeklärte Kontamination bei 3,05 ppm zu erkennen (innerhalb **g**), welche nicht durch Dialyse entfernt werden konnte.

Tabelle 4: Reaktionsbedingungen der Sulfatisierung in DMF und dazugehöriger Anteil vollständig sulfatierten Oligomers im finalen Produkt.

Struktur	M [g/mol]	Äq. ^a TMA*SO ₃	T ^b [°C]	T ^c [h]	d.S. ^d [%]
O9-S1 	2255,3	40	60	115	> 99
O9-S2 	2255,3	40	70	18	95,0
O9-S3 	2255,3	40	70	18	98,5
O10-S 	5045,0	50	70	19	98,7
O11-S 	6702,3	40	70	18	89,9
O12-S 	8837,6	40	70	18	85,2

(a) - Äquivalente TMA*SO₃ bezogen auf die OH-Gruppen des Oligomers

(b) - Reaktionstemperatur

(c) - Reaktionszeit

(d) - ¹H-NMR ermittelter Sulfatisierungsgrad - relativer Anteil vollständig sulfatierten Oligomers

Anhand **Tabelle 4** wird der Sulfatisierungsgrad der Oligomere ersichtlich. Gemeint ist damit der relative Anteil der Oligomere, bei denen alle OH-Gruppen des *N*-Acetylglucosamin zu Organosulfat umgesetzt wurden sind. Die restlichen Prozente resultieren aus partiell sulfatierten Strukturen. Man erkennt eine Tendenz, dass der Sulfatisierungsgrad mit

zunehmender Valenz abnimmt. Die Effektivität der Sulfatisierung sinkt also mit zunehmender Anzahl anhängender GlcNAc-Einheiten. Bei **O10-S** sieht man, dass mit erhöhter Äquivalenz des Sulfatisierungsreagenz der Grad der Sulfatisierung in Relation etwas erhöht ist. Die Bedingungen hätten sicherlich noch weiter optimiert werden können. Allerdings muss man festhalten, dass die Ergebnisse auch nicht immer reproduzierbar waren. Zum Teil reichten schon 5 Äquivalente zum Erhalt eines hohen Sulfatisierungsgrads bei **O9** aus, andere Ansätze hingegen zeigten zu späterem Zeitpunkt eine geringere Effektivität. Dies sieht man auch bei den prozentualen Unterschieden zwischen **O9-S2** und **O9-S3**. Die Tendenzen sind also mit Vorsicht zu betrachten.

ESI-Massenspektrometrie

Wie schon bei der Analyse des monosacchariden Sulfates erläutert wurde, kommt es beim Einsatz von Ameisensäure zu Desulfatisierungsreaktionen während der ESI-MS-Analyse. Bei der Messung von Verbindung **O9-S** ohne Zusatz von Ameisensäure in der Negativmethode, kann sie in 6- und 7-fach sulfatisierter Form detektiert werden. Diese Übersulfatisierung resultiert, wie beschrieben, mit hoher Wahrscheinlichkeit aus der Sulfatisierung des C-terminalen Amids. Für eine Sulfatisierung an anderer Stelle konnten keine respektiven Massen beschrieben werden. Das allgemeine Rauschen in der Negativmethode fällt höher aus, jedoch konnten keine Signale detektiert werden, welche auf eine geringere Sulfatisierung schließen lassen. Bei Produkten, die laut NMR-Analyse eine deutlich geringere, vollständige Sulfatisierung aufweisen, lassen sich hingegen auch ein- bis fünffach sulfatisierte Oligomere detektieren. Die Zuordnung der ESI-MS Signale von **O9-S1** aus **Abbildung 32** ist in **Tabelle 5** zu finden. Die höhervalenten und dadurch höher geladenen Strukturen **O10-S** bis **O12-S** konnten durch ESI-MS nicht vollständig aufgeklärt werden. Von natürlich sulfatisierten Strukturen, wie Glycosaminoglycanen ist bekannt, dass verschiedene Faktoren das Ergebnis der ESI-MS-Spektren beeinflussen können. So können viele unterschiedliche Ladungszustände existieren und die Oligomere können unterschiedliche, partiell desulfatisierte Strukturen haben. Außerdem gibt es bei Sulfaten die Möglichkeit stabile Addukte mit ubiquitären Alkali- und Erdalkalitionen zu bilden. In der Vergangenheit wurden verschiedene Methoden untersucht, die Analytik durch gezielte Einstellung der Kationen und Fragmentierung zu erleichtern und spezielle Sulfatisierungsmuster zu entschlüsseln^[168-171]. Daher wurden die ESI-Experimente zur Detektierung der sulfatisierten Oligomere ebenfalls einzeln, mit

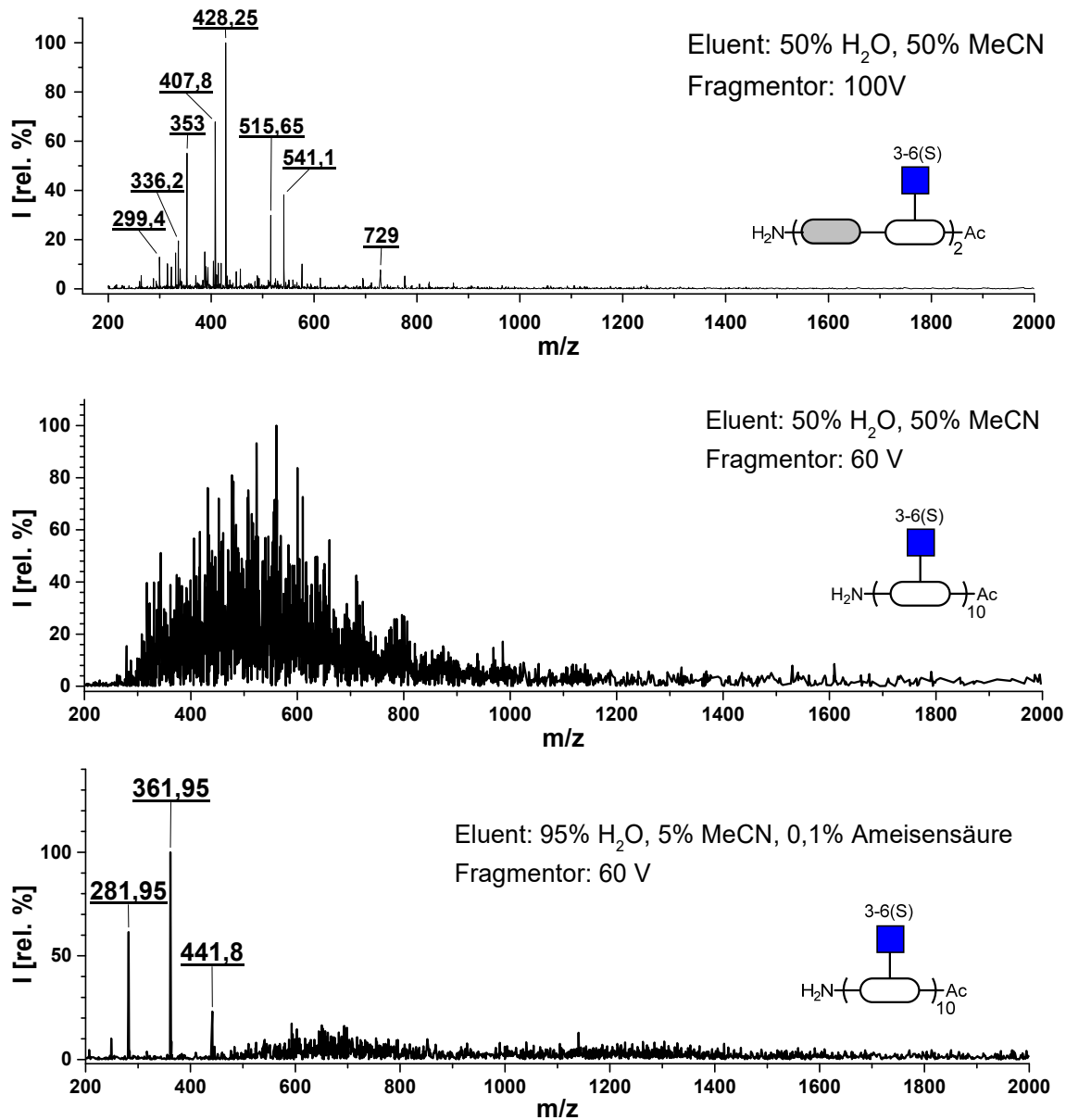


Abbildung 32: ESI-MS-Spektren von O9-S1 (oben) und v O12-S unter verschiedenen Bedingungen (mittig, unten).

unterschiedlichen Fragmentierungsspannungen, angepasst. Bei Betrachtung des Spektrums von O12-S mit einer Fragmentorspannung von 60 Volt (H₂O:MeCN, 1:1 Vol.%) findet man eine hohe Anzahl an Signalen im Detektionsfeld von 200 bis 2000 m/z (Abbildung 32, mittig). Hierbei kommt es offensichtlich zu einer starken Fragmentierung, obwohl die Fragmentorspannung gegenüber der Detektion von O9-S1 schon angepasst wurde. Durch die Reduzierung der Spannung konnten die Fragmente klar beeinflusst werden, ohne jedoch Signale zu generieren, denen spezifische Massen

Tabelle 5: Berechnete und gefundene m/z Werte für 6- und 7-fach sulfatisertes N-Acetylglucosaminoligomer **O9** (vgl. **Abbildung 32**, oben).

7x sulfatisiert [C ₆₄ H ₁₀₀ N ₁₉ O ₄₆ S ₇ Na ₇]		6x sulfatisiert [C ₆₄ H ₁₀₁ N ₁₉ O ₄₃ S ₆ Na ₆]	
m/z berechnet	m/z gefunden	m/z berechnet	m/z gefunden
[M-7Na] ⁷⁻ = 299.2	299.4	[M-6Na] ⁶⁻ = 335.9	336.2
[M-6Na] ⁶⁻ = 352.9	353.0	[M-5Na] ⁵⁻ = 407.7	407.8
[M-5Na] ⁵⁻ = 428.1	428.3	[M-4Na] ⁴⁻ = 515.4	515.7
[M-4Na] ⁴⁻ = 540.8	541.1		
[M-3Na] ³⁻ = 728.8	729.0		

zugeordnet werden konnten. Das Lösemittel wurde wieder mit 0,1 Vol.-% Ameisensäure versetzt und auf einen 95 Vol.-%igen Wassergehalt justiert, um spezifische Fragmentierungen zu erzwingen. Diese Fragmente sind in **Abbildung 32** (unten) zu erkennen. Bei diesen Fragmenten handelt es sich um die ein- bis dreifach sulfatisierten, einzelnen Fragmente des N-Acetylglucosamin. Daran wird deutlich, wie entscheidend die Polarität und Protizität des Lösemittels für die Bildung solch hochpolarer und geladener Fragmente sind. Die Fragmentierungsprodukte und dazugehörige Ladungszahlen werden in **Abbildung 33** dargestellt.

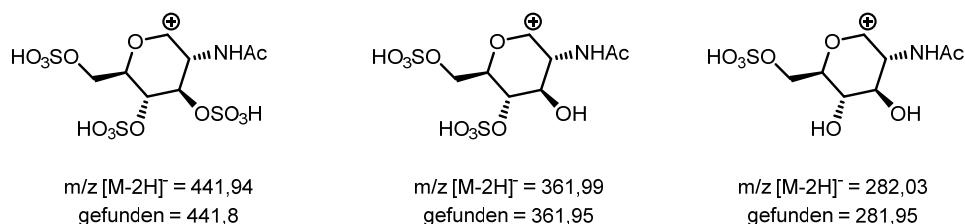


Abbildung 33: ESI-MS detektierte Fragmente von **O12-S** (vgl. **Abbildung 32**). Die Position der nicht umgesetzten OH-Gruppen kann dabei variieren.

Durch die Ameisensäure liegen die Fragmente im Vergleich zur ESI-MS Untersuchung von **O9-S1** auch nicht in Natrium-beladener, sondern in protonierter Form vor. Interessanterweise können diese Fragmente auch nicht durch ähnliche Spannungs- und Lösemiteileinstellungen bei der divalenten Struktur **O9-S** gefunden werden. Grund dafür ist möglicherweise die kleinere Molekülgröße und Ladungszahl, was eine bessere Detektierbarkeit in unfragmentierter Form

bewirkt. Aufgrund der hohen Ladungszahl bei den höher sulfatisierten Strukturen wird eine hohe Ionisierungsenergie benötigt, um Kationen zu abstrahieren und die m/z-Werte in detektierbare Regionen zu führen. Daher ist es energetisch wahrscheinlicher die Strukturen, abhängig von Spannung und Lösemittel, in kleinere leichte Fragmente mit geringerer Ladung umzuwandeln, welche durch mesomere Effekte und Lösemittelleffekte eine gute Stabilität erhalten. Im Gegensatz zu den unsulfatisierten Vorstufen konnten jedoch keine Triazolfragmente in der Negativmethode detektiert werden (vgl. **Abbildung 20** und **Abbildung 21**). Zu sehen sind einige gedämpfte Signale im Bereich 450 bis 2000, die möglicherweise aus verschiedenen Ladungszuständen und Isotopenverteilungen resultieren. Der Fragmentor wurde nicht weiter reguliert, da sich das Detektionsvolumen, also die Anzahl der vom Detektor ermittelten Massen, bereits auf einem niedrigen Niveau befand. Generell konnte durch die ESI-MS-Analyse jedoch ein messbares Sulfatisierungsmuster gezeigt werden.

SAX-HPLC Analyse

Zur chromatographischen Analyse wurde, wie schon beim monosacchariden GlcNAc-Sulfat (**3**), eine Zorbax® SAX Säule verwendet (vgl. Kapitel 3.1.2.3, **Abbildung 18**). Es wurden zunächst die gleichen Bedingungen für das sulfatisierte Glycooligomer **O9-S1** eingesetzt. Hierbei kam es jedoch nicht zu einer detektierbaren Eluierung der Substanz. Aufgrund der höheren Ladung könnte die Ionenstärke des Puffes zu schwach sein, um das Glycooligomer von der stationären Phase zu trennen. Daher wurde eine Methode von Trehy et al. adaptiert, um die Glycooligomersulfate zu eluieren^[172]. Doch auch mit sehr starken NaCl-Gradienten (0,02 - 1,5 M) konnte die Struktur nicht eluiert werden. Scheinbar existieren zwischen dem sulfatisierten Oligomer und der Säule zusätzlich noch hydrophobe Wechselwirkungen, welche nicht durch einen starken Salzgradienten aufgehoben werden können. Dabei kommt vermutlich besonders das ungeladene und recht unpolare Amidrückgrad (abgesehen vom EDS-Spacer) zum Tragen.

Um die hydrophoben Wechselwirkungen zu überkommen, wurde zu einem stark ionischen Gradienten auch der Anteil eines organischen Lösemittels erhöht. Dabei musste allerdings auch auf eine mögliche Präzipitation des Oligomers, oder des im Eluenten enthaltenen Salzes, geachtet werden. Letztlich wurde der maximale organische Anteil auf 30 Vol.-% Acetonitril in Wasser

adjustiert. Bei dieser Konzentration war es möglich einen starken Gradienten Natriumchlorid einzusetzen.

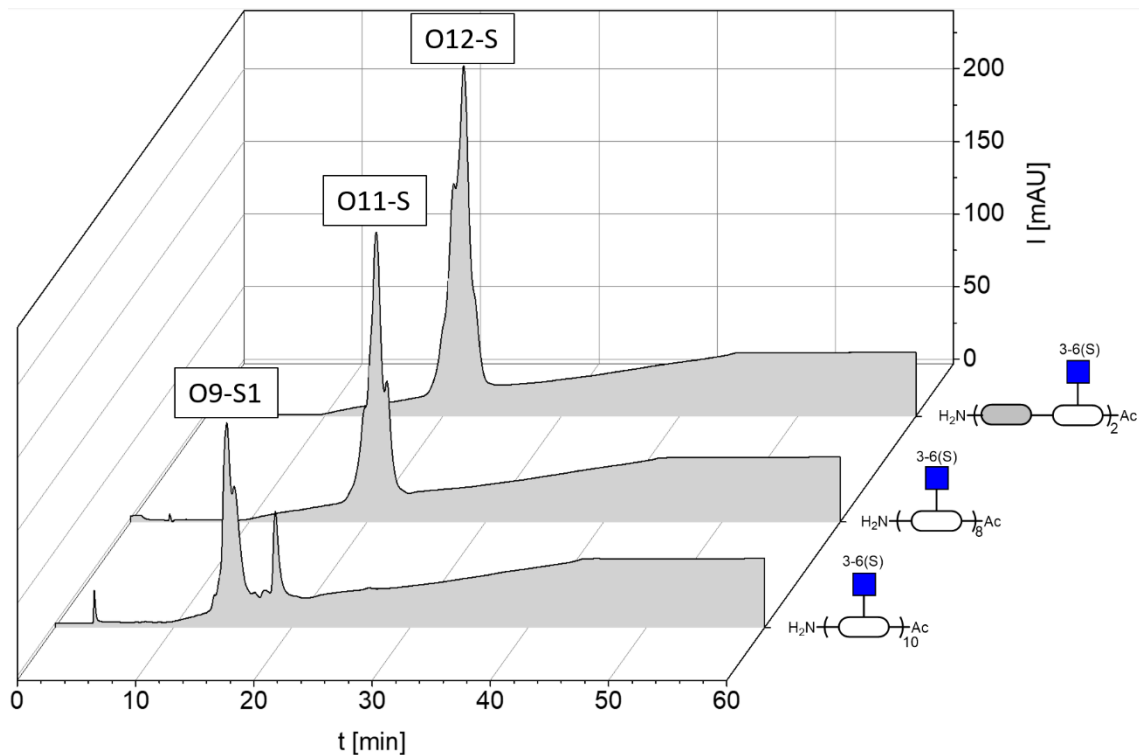


Abbildung 34: SAX-HPLC der sulfatisierten Oligomere **O9-S1**, **O11-S** und **O12-S**.
Elutionsgradient: 1,5-30 Vol.-% Acetonitril bei 40-800 mM NaCl.

So konnten alle sulfatisierten Glycooligomere erfolgreich eluiert und detektiert werden. **Abbildung 34** zeigt die Chromatogramme der Strukturen **O-9**, **O11** und **O12** in sulfatisierter Form, welche hintereinander gemessen wurden. **O10** ist nicht zu sehen, da es an einem anderen Tag gemessen wurde und es durch leichte Puffer-, Druck- und Temperaturunterschiede zu moderaten Schwankungen bei der Eluationszeit kam und es deswegen nicht vergleichbar dargestellt werden konnte. In den vergleichbaren Proben der dargestellten Chromatogramme sieht man eine mit der Ladung der Moleküle steigende Retentionszeit, auch wenn der Unterschied zwischen **O11-S** und **O12-S**, mit Retentionsmaxima von 20,8 und 21,8 Minuten, sehr gering ausfällt. Deutlicher ist der Unterschied zwischen dem divalenten, sechsfach negativ geladenen **O9-S1** und dem 24-fach geladenen, octavalenten **O11-S**, da hier auch der Ladungsunterschied wesentlich größer ist. Auffällig ist die bimodale Verteilung von **O9-S**. Möglicherweise ist sie Resultat der teilweisen, wie vermutet siebenfachen Sulfatisierung der Struktur durch das primäre Amid. Diese Auftrennung

sieht man bei isokratischer Trennung mit 60 Vol.-% Acetonitril noch deutlicher (siehe experimentellen Teil). Ein zweites Maximum sieht man bei **O11-S** und **O12-S** nicht. Ein solches Signal, verursacht durch eine Sulfatisierung des primären Amids, ist aufgrund der ohnehin höheren Ladung möglicherweise nicht zwingend sichtbar. Möglicherweise ist der Einfluss der Ladungen auf die Retentionszeit bei geringeren Ladungen deutlicher, wie es beim Chromatogramm in Kapitel 3.1.2.3 zu sehen ist (**Abbildung 18**). Daraus resultiert eventuell auch der geringe Anstieg der Zeiten zwischen O11-S und O12-S. Zudem könnte eine Sulfatisierung des primären Amids bei **O11-S** und **O12-S** auch geringer ausgefallen sein. Auch die ^1H -NMR-Spektren dieser Verbindungen zeigten den entsprechenden Shift nicht so deutlich wie Verbindung **O9-S**. Möglicherweise ist die Amid-Endgruppe bei den höhervalenten Strukturen nicht so leicht zugänglich. Auch der fehlende EDS-Spacer zum C-Terminus könnte die Sulfatisierung an dieser Stelle sterisch zusätzlich erschwert haben. Aufgrund der Fragmentierung bei der ESI-MS-Analyse konnte dieses Phänomen massenspektrometrisch nicht nachvollzogen werden. Eine bisher nicht diskutierte Ursache der Signalverteilungen bei der SAX-HPLC könnten unterschiedliche Ladungszustände sein. Allerdings sollten die Systeme aufgrund der Pufferung durchweg negativ geladen sein. Eine im nächsten Abschnitt beschriebene Erklärung der Signalaufteilungen könnte weiterhin auf der Möglichkeit beruhen, dass die Oligomersulfate Aggregate bilden und Überstrukturen mit unterschiedlichem Elutionsverhalten entstehen. Zur genaueren Beschreibung der einzelnen Elutionsabschnitte wäre eine präparative Aufreinigung der sulfatisierten Oligomere sinnvoll. Dieser Schritt erfolgte im Laufe dieser Arbeit allerdings aufgrund fehlenden Equipments nicht.

Generell konnte durch die starke Anionenaustauschchromatographie gezeigt werden, dass sich diese gut für die sulfatisierten GlcNAc-Oligomere applizieren lässt. Durch geeignete Anpassung der Laufmittel-Puffer konnten alle Strukturen erfolgreich eluiert werden. Da das System aufgrund der gepufferten Lösungen nicht an ein ESI-MS-Gerät gekuppelt werden kann, kann keine exakte Strukturaufklärung der einzelnen Fraktionen betrieben werden. Daher dient diese Methode nicht idealerweise zur Reinheitsbestimmung, wie etwa die RP-HPLC für die Analytik der nicht sulfatisierten GlcNAc-Oligomere.

Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Die hohe Ladungsdichte von bis zu 31 möglichen Ladungen bei Verbindung **O12-S** erhöht die Hydrophilie des Moleküls sehr stark. Allerdings enthält die Struktur durch das Amid-Rückgrat auch Anteile, die zu intra- und intermolekularen Wechselwirkungen führen können. Aufgrund von Ergebnissen zu später beschriebenen Untersuchungen mit L-Selektin und HPV16 wurde die Möglichkeit der Verbindung in wässrigen Systemen Aggregate zu bilden untersucht. Um den hydrodynamischen Radius in verschiedenen Elektrolyten zu bestimmen wurde ein Nicocomp ZLS 3000 System (Particle Sizing Systems) verwendet. Das jeweilige Maximum der Größenverteilungskurven (**Abbildung 35**) wurde zur Bestimmung der Partikelgrößen selektiert. **O12-S** wurde verwendet, da es das höchste Molekulargewicht und die höchste Ladungsmenge aller sulfatisierten Glycooligomere hat. **Abbildung 35** zeigt eindeutig ein elektrolytenabhängiges Verhalten des hydrodynamischen Radius.

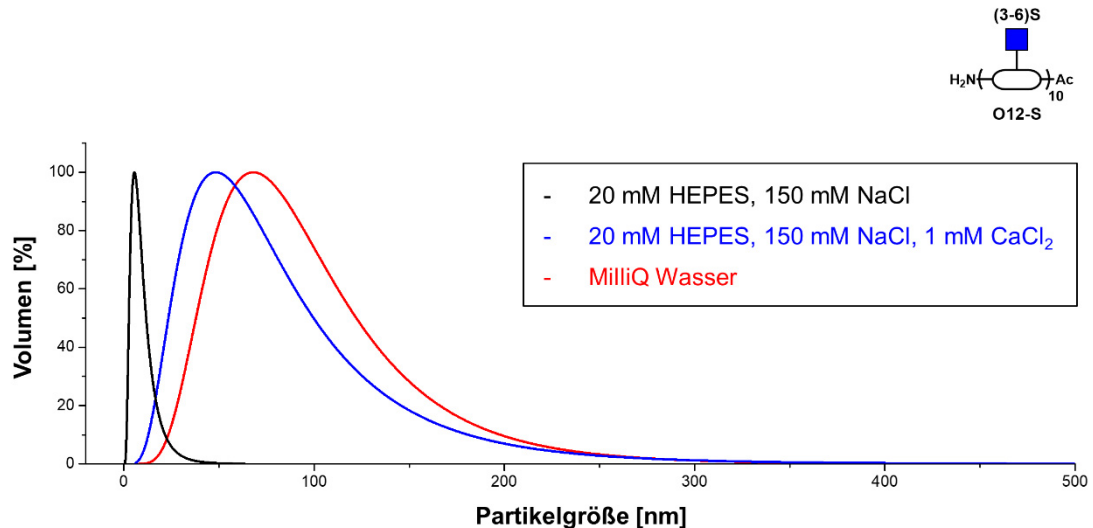


Abbildung 35: Größe zu Volumen Verteilung aus der dynamischen Lichtstreuung von O12-S, gemessen in drei verschiedenen Puffern.

Bei einer Konzentration von 3,6 mg/ml zeigt die Verbindung **O12-S** in Wasser ein Maximum der Verteilung bei 68 nm. Während der Messungen mit geringeren Konzentrationen gab es Probleme eine stabile Autokorrelationsfunktion zu erhalten. Die Verbindung hat in MilliQ-Wasser den

größten Radius. Eine mögliche Erklärung ist, dass es aufgrund intermolekularer Wechselwirkungen zu einer mizellenähnlichen Anlagerung der Moleküle kommt, bei der sich die Sulfatgruppen umorientieren. Im gleichen Puffer, wie bei den Experimenten mit L-Selectin, kam es zu einer Verringerung des Radius auf 45 nm. Der Puffer enthält mit 20 mM HEPES, 150 mM NaCl und 1 mM CaCl₂ einen sehr starken Elektrolyten, welcher in der Lage sein sollte, Aggregationen durch starke Ladungseffekte zu verhindern. Möglicherweise spielen die Calciumkationen eine Rolle bei der intermolekularen Verbindung der Strukturen durch die Sulfatgruppen, sodass mit 45 nm ein noch immer größerer Radius entsteht als es einzelne Moleküle vermuten lassen. Die Existenz relativ langlebiger Salzbrücken, die von Calciumkationen geformt werden können^[173-174], könnte durch die große Anzahl an Sulfatgruppen derart verstärkt werden, dass ein Effekt auch bei geringen Ca²⁺-Konzentrationen von 1 mM gemessen werden kann. Dies würde eine Aggregation trotz der sehr starken Salzkonzentration (150 mM NaCl) erklären. Bekräftigt wird diese Hypothese, wenn man sich den Radius beim System ohne Calciumkationen ansieht. Hier sieht man einen deutlich geringeren hydrodynamischen Radius von 5,7 nm. Der starke, ionische Puffer sorgt dafür, dass die Aggregation unterdrückt wird und der Radius in den Bereich fällt, wie er für Einzelmoleküle zu erwarten ist. Im Allgemeinen sieht man zwischen den drei Systemen nicht nur Unterschiede bei der durchschnittlichen Partikelgröße, sondern auch bei der Breite der Verteilungen. Bei den Aggregaten sieht man eine große Verteilung, was auf eine Vielzahl unterschiedlicher Zusammenlagerungen schließen lässt. Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass Calciumkationen einen sichtbaren Effekt auf das Aggregationsverhalten von sulfatisierten GlcNAc-Glycooligomeren haben können und dass dieser Effekt bei den späteren Messungen berücksichtigt werden muss.

3.1.6 Einfluss auf L-Selektin Inhibierung, Komplementaktivierung und Blutkoagulation von sulfatisierten GlcNAc-Glycooligomeren

Dr. Kim Silberreis und Dr. Jens Dervedde vom Institut für Laboratoriumsmedizin der Charité Universitätsmedizin Berlin führten an ausgewählten sulfatisierten GlcNAc-Glycooligomeren die im Folgenden vorgestellten Inhibitionsstudien von L-Selektin durch¹. Die Arbeitsgruppe befasste sich, schon in der Vergangenheit mit solchen Studien^[124]. Dabei wird ein etabliertes, kompetitives SPR-Verfahren eingesetzt (Surface Plasmon Resonance)^[175]. Das beschriebene Verfahren wurde in Kombination mit den sulfatisierten Glycooligomeren **O9-S2**, **O11-S** und **O12-S** verwendet um den inhibitorischen Einfluss auf die Bindung zwischen L-Selektin und seinem natürlichen Liganden, Tyrosinsulfat- (s-Tyr) und Sialyl Lewis X (sLe^x), zu untersuchen (**Tabelle 6**). Des Weiteren wurde das Verhalten der Glycooligomersulfate während der Blutkoagulation (**Tabelle 6**) und auf die Inhibierung der Komplementaktivität von Dr. Kim Silberreis und Dr. Jens Dervedde evaluiert¹. Auch diese Ergebnisse werden im Folgenden dargestellt.

Komplemetinhibierung

Bei der Komplementinhibierung spielen Sulfate, wie Heparin, häufig eine wichtige Rolle^[176]. Obwohl die Strukturen **O9-S2**, **O11-S** und **O12-S** Ähnlichkeit zur Ladungsart des Heparins besitzen (sulfatisiertes Saccharid), konnte die Komplementaktivierung nur um etwa 10 % gesenkt werden. Auch bei Konzentrationen bis 2 µM konnte keine stärkere Inhibierung festgestellt werden.

Dies ist vermutlich auf die im Vergleich zu Heparin geringere Größe und Ladungsdichte der Glycooligomere zurückzuführen. Die sulfatisierten Glycooligomere zeigen jedoch Spezifität gegenüber L-Selektin, ohne größeren Einfluss auf weitere Systeme, wie Proteine

¹Dr. Kim Silberreis (Institut für Laboratoriumsmedizin) erhielt Proben sulfatisierter GlcNAc-Oligomere, die im Laufe dieser Arbeit entstanden sind und führte hierzu eigenständig Versuche zur L-Selektin-Inhibierung, Komplementaktivität und Blutkoagulation durch. Die Auswertung der Daten erfolgte ebenfalls durch Dr. Kim Silberreis.

der Komplementkaskade und unterscheiden sich somit von anderen nicht-natürlichen sulfatisierten Makromolekülen, wie etwa dendrischen Polyglycerolsulfaten^[177].

Tabelle 6: Partielle Thromboplastinzeit und mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀) der L-Selektin-Inhibitionsstudien von sulfatisierten GlcNAc-Glycooligomeren.

Struktur	M [g/mol] ^a	Zuckervalenz	Ladung ^b	dS ^c [%]	PTT ^d [s]	IC ₅₀ [μM] ^e
O9-S2	2255.3	2	- 7	95.0	27.6	k.I.
O11-S	6702.3	8	- 25	89.9	29.7	0.6
O12-S	8337.6	10	- 31	85.2	29.9	2.2

(a) Molekulargewicht des Oligomers bei vollständiger Sulfatisierung

(b) Maximalladung bei zusätzlicher Sulfatisierung des primären Amids

(c) Grad der Sulfatisierung; relativer Anteil der vollständig OH-Gruppen umgesetzten Oligomere (¹H-NMR)

(d) Partielle Thromboplastinzeit (engl. PTT) bei 10 μg/ml, Negativkontrolle: 27,7 s, Heparin > 100 s

(e) IC₅₀-Werte der L-Selektin-Inhibition, k.I. - keine Inhibition

Einfluss auf die Blutkoagulation

In **Tabelle 6** sind die partiellen Thromboplastinzeiten (*engl.* partial thromboplastin time, PTT) bei einer Glycooligomer-Konzentration von 10 μg/ml zu sehen. Wie durch die PTT gezeigt werden kann, haben die Glycooligomersulfate wenig Einfluss auf die Blutkoagulation. Im Vergleich zur Negativkontrolle konnte eine Verlängerung der Koagulationszeit von 2 Sekunden nachgewiesen werden, die aber deutlich unter der antikoagulanten Wirkung des Heparins (> 100 s) liegen. Strukturelle Unterschiede, wie die Ladungsverteilung und die Valenz, zwischen Heparin und den Glycooligomeren könnten hier zu Grunde liegen. Während Heparin unter anderem N-Sulfatisierungen aufweist, fehlen diese bei den Glycooligomeren. Heparin bindet über seine (N-)Sulfatisierungen affin an Antithrombin und führt somit zur Verlängerung der Koagulationszeit. Diese Eigenschaft führt dazu, dass der Einsatz von Heparin als therapeutische Applikation limitiert ist^[42, 178]. Die Glycooligomere hingegen weisen diese N-Sulfatisierungen nicht auf, was zu einer geringeren Bindungsaffinität gegenüber Antithrombin führen könnte. Dadurch wäre die verminderte, aber vorzuziehende Eigenschaft eines Therapeutikums, die Koagulationszeit wenig zu beeinflussen, gegeben.

L-Selektin Inhibierung

Tabelle 6 kann weiterhin entnommen werden, welchen inhibitorischen Einfluss die Glycooligomere auf die Bindung von L-Selektin an seine natürlichen Liganden s-Tyr und sLe^X-aufweisen. Hierfür wurde die mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀) mittels des bereits beschriebenen kompetitiven SPR-Verfahrens ermittelt. Da für die divalente Struktur von **O9-S2** kein IC₅₀-Wert ermittelt werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass die geringe Ladung und Valenz der Struktur die kationischen und zuckerspezifischen Bindungsstellen des L-Selektins gegenüber seinen Liganden nicht ausreichend abschirmen kann.

Die Verbindungen **O11-S** und **O12-S** weisen IC₅₀-Werten im nano- und mikromolaren Bereich auf. Multivalenz könnte eine Rolle in der Bindung zu L-Selektin spielen, da die Erhöhung der Zuckervalenz im Vergleich zu **O9-S2** zur Inhibierung führt. Allerdings bleibt unklar, ob die stärkere Bindung lediglich ein Effekt der Präsentation negativer Ladungen auf der Oberfläche ist, oder ob die spezifischen Zucker und deren Positionierung eine entscheidende Rolle spielen. *N*-Acetylglucosamin-spezifische Wechselwirkungen könnten auch durch eine Übersulfatisierung der Strukturen gedämpft sein. Die decavalente Struktur **O12-S** scheint die Bindung im Vergleich zur octavalenten Struktur **O11-S** nicht zu verstärken. Eine höhere Ladung führt nicht zwangsläufig zu einer stärkeren Bindung, allerdings sind einzelne Zucker bei **O12-S** durch den niedrigeren Sulfatisierungsgrad gegebenenfalls auch weniger stark mit negativen Ladungen behaftet. Die natürlichen Liganden von L-Selektin zeigen, dass dessen Bindungsaffinität von Sulfaten (s-Tyr) und anderen Anionen (Sialyl Lewis X) abhängig ist.

Nach Eintritt des IC₅₀-Wertes stellt man teilweise einen Anstieg des SPR-Signals fest (siehe Experimentellen Teil). Dazu kommen hohe Standardabweichungen bei allen Experimenten. Wie durch DLS-Experimente gezeigt werden konnte (Kapitel 3.1.5), könnten Ca²⁺ beinhaltende Puffer, wie bei der L-Selektin Bindungsstudie eingesetzt, eine Aggregation der sulfatisierten Glycooligomere bewirken und daher zu den beschriebenen Effekten des Experiments führen. Da geringere Konzentrationen als 3,6 mg/ml allerdings zu mangelhaften Autokorrelationskurven beim DLS-Experiment führten, konnte ein konzentrationsabhängiger Zusammenhang der Aggregation im Bereich der L-Selektinbindungsstudien (10 - 1000 µg/ml) nicht untersucht werden.

Die IC₅₀-Werte im mikro- und nanomolaren Bereich sind bei ähnlichen Experimenten, zum Beispiel mit polydendrischen Anionen zu finden^[124]. *N*-Acetylglucosamin scheint die Bindung zu

L-Selektin nicht stärker zu beeinflussen, wenn man mit Strukturen vergleicht, die keine spezifischen Zucker aufweisen. Jedoch ist auch die abweichende Architektur (linear gegenüber verzweigt) der Strukturen zu berücksichtigen.

In vergangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Zuckerdichte, Positionierung und Molekulargewicht der Glycooligomere die Bindung zu Lektinen stark beeinflusst^[179]. Eine ähnliche Strategie könnte auch mit den sulfatisierten Glycooligomeren erfolgen, um so eine Verstärkung der Inhibierung zu erreichen. Dazu könnte die Ladungsdichte, spezifische Sulfatisierung der Zucker oder die Positionierung der Zucker auf dem Oligomergerüst variiert werden.

3.1.7 HPV-Inhibierung der sulfatisierten GlcNAc-Oligomere

In diesem Kapitelabschnitt wird sich mit der Fragestellung befasst, ob sulfatisierte GlcNAc-Oligomere in der Lage sind die Infektion von HeLa-Zellen (ATCC®) durch den Humanen Papillomavirus Typ 16 (HPV-16) zu inhibieren. Wie in der Einleitung beschrieben, benötigt HPV-16 Heparansulfat, welches sich auf den Heparansulfatproteoglycanen (HSPGs) befindet, um Bindungen zu Wirtzellen einzugehen^[99]. Die stark sulfatisierten GlcNAc-Oligomere sollten dieses Verhalten imitieren, die Bindungsstellen für Heparansulfat auf dem Virus-Partikel absättigen und dadurch die HPV-16-Infektionsrate von HeLa-Zellen inhibieren. Alle hier vorgestellten zugehörigen Experimente wurden von Laura Soria Martinez am Institut für zelluläre Virologie der westfälischen Wilhelms-Universität (WWU) Münster unter Leitung von Prof. Dr. Mario Schelhaas durchgeführt¹.

In den Studien wurden die sulfatisierten Oligomere **O9-O12** untersucht (**Abbildung 37**). In einem „Add-On“ Experiment wurden die Oligomere mit HPV-16 inkubiert und anschließend zu den HeLa-Zellen gegeben (Abbildung 36). Die Anzahl der ohne Inhibitor infizierten Zellen wurde als relativer Infektionsgrad festgesetzt. **Abbildung 37** zeigt die relativen Infektionsraten der eingesetzten Oligomere. Eine Infektion über 100% bedeutet, dass mehr Zellen infiziert waren als

¹Laura Soria Martinez (Institut für zelluläre Virologie) erhielt Proben sulfatisierter GlcNAc-Oligomere und führte eigenständig Versuche zu HPV-16-Inhibierung durch, wie in Kapitel 3.1.7 beschrieben werden. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte ebenfalls durch Laura Soria Martinez. Diese Arbeiten wurden bereits in einer gemeinsamen Publikation veröffentlicht^[180].

es ohne Zusatz von Glycooligomer, oder Negativkontrolle (**O10**) der Fall war. Zur visuellen Unterstützung wurden die Infektionsraten tabellarisch mit einer bedingten Formatierung unterlegt, abhängig von der Zahl der infizierten Zellen.

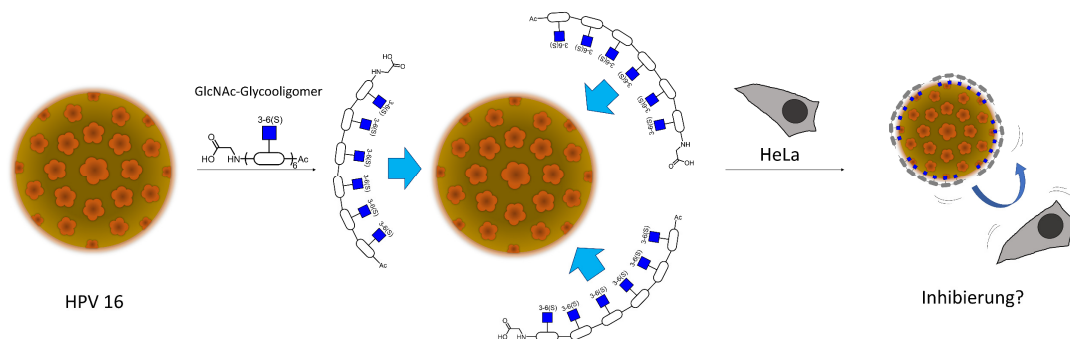
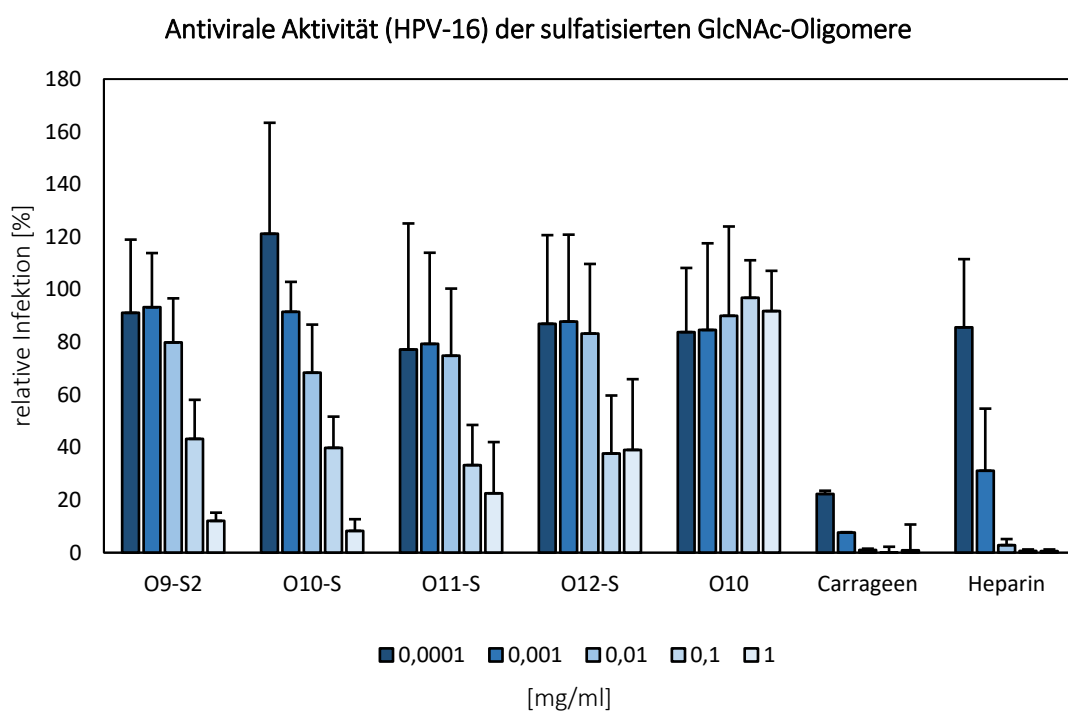


Abbildung 36: Schematische Darstellung der HPV-Inhibierungsstudien mit sulfatiserten GlcNAc-Glycooligomeren. Das jeweilige Oligomer wird mit HPV inkubiert und anschließend mit HeLa-Zellen kombiniert. Zum Schluss wird die Infektionsrate der Zellen überprüft.

Bereits die divalente Struktur ist in der Lage HPV-16 zu inhibieren. Hier sieht man eine stetige Abnahme der Infektion, welche mit der eingesetzten Konzentration korreliert. Bei 1 mg/ml bleiben lediglich 12,06% der Zellen nach Inkubation mit HPV-16 infiziert. Der Inhibierungseffekt wird bei **O10-S** verstärkt, dessen Amidgerüst sechs sulfatisierte N-Acetylglucosaminreste trägt. Hier wird in jedem Konzentrationsbereich, bis auf 10^{-3} mg/ml eine geringere relative Infektion als bei **O9-S2** erreicht. Auch die finale Rate liegt mit 8,28% restlich infizierten Zellen unter dem Niveau von **O9-S2**. Sehr intensiv ist die Bindung zu HPV allerdings nicht verstärkt.

Möglicherweise handelt es sich hier um stark ladungsabhängige Wechselwirkungen. Ein Multivalenzeffekt mit deutlich verstärkter Bindung ist nicht erkennbar. Betrachtet man das octavalente und decavalente Oligomer **O11-S** und **O12-S** fällt zunächst auf, dass dieser stetige Abfall der Infektion hier auch vergleichbar mit **O10-S** auftaucht. Deutliche Unterschiede gibt es allerdings bei der finalen Konzentration von 1 mg/ml. Bei **O11-S** mit acht anhängigen Zuckern fällt die Infektion lediglich auf 22,55% ab. Eine Konzentration von 1 mg/ml führt bei **O12-S** gar zu einem Anstieg der Infizierten HeLa-Zellen gegenüber 0,1 mg/ml. Zudem wird das Niveau der Inhibierungsrate von **O11-S** nicht erreicht. Ein Grund, dass die Oligomere **O10-S** und **O12-S** weniger stark als **O9-S2** und **O10-S** inhibieren könnte sein, dass diese Strukturen einen NMR-nachweislich niedrigeren Sulfatisierungsgrad besitzen. Des Weiteren wurde bereits über die Möglichkeit der sulfatisierten GlcNAc-Oligomere diskutiert in wässrigen Medien Aggregate zu bilden (Kapitel 3.1.5), dies muss jedoch weiter untersucht werden.



Struktur	dS ^a [%]	^b Relative Infektion bei Konzentration [mg/ml]				
		10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻²	0,1	1
O9-S2	97,0	91,15	93,28	79,9	43,24	12,06
O10-S	98,7	121,2	91,56	68,4	39,83	8,28
O11-S	89,9	77,21	79,36	74,86	33,26	22,55
O12-S	85,2	86,98	87,84	83,28	37,68	39,06
O10	0	83,81	84,65	90,03	96,88	91,81

Abbildung 37: Inkubation von HPV-16 mit den sulfatisierten Oligomeren und daraus untersuchte relative Infektion von HeLa-Zellen. (a) Grad der Sulfatisierung; relativer Anteil der vollständig OH-Gruppen umgesetzten Oligomere (¹H-NMR). (b) Infektion der HeLa-Zellen mit HPV-16 bezogen auf die Rate ohne vorherige Inkubation mit Inhibitoren. Angegeben sind die Mittelwerte des Experiments.

Die Experimente wurden durch den Einsatz sulfatisierter Galactose- und Mannose-Polymere erweitert (**Abbildung 38**) und publiziert^[180]. Die zur Sulfatisierung verwendeten Polymere wurden von Markus Giesler am Lehrstuhl für Makromolekulare Chemie (Prof. Laura Hartmann) der Heinrich-Heine-Universität (HHU) Düsseldorf synthetisiert und im Rahmen dieser Arbeit sulfatisiert. Zur Sulfatisierung der Polymere wurden die gleichen Bedingungen, wie bei der Sulfatisierung der Oligomere **O9-S-O12-S** nach Optimierung eingesetzt (siehe experimentellen Teil). An dieser Stelle kann die zusammenfassende Aussage getroffen werden, dass die sulfatisierten Polymere einen starken Inhibierungseffekt auf HPV-16 haben und es teilweise zu einem kompletten Abfall der Infektionsrate kam. Diese Beobachtung bestätigt die Vermutung,

dass es sich bei der Inhibierung dieser Art um einen rein ladungsgetriebenen Prozess handelt. Eine zuckerspezifische Wechselwirkung, kann wie durch den Einsatz verschiedener Saccharide gezeigt, nicht festgestellt werden, da die sich Wirkung der Mannose- und Galactosepolymere ähnelte. Es lässt sich vermuten, dass eine starke Inhibierung lediglich über die Erhöhung der Ladungsmenge und Bindungspartner erreicht wird.

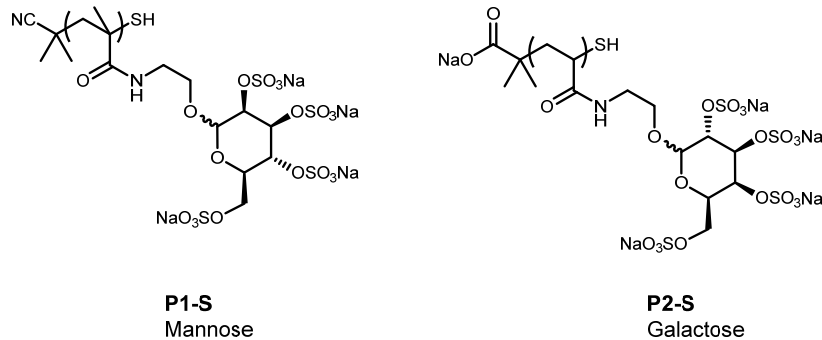


Abbildung 38: Sulfatisierte Mannose- und Galactosepolymere¹, welche ebenfalls in den Inhibierungsstudien mit HPV-16 eingesetzt wurden. Die unsulfatisierten Polymerer wurden von Markus Giesler zu Verfügung (Institut für Makromolekulare Chemie, Prof. Hartmann, HHU Düsseldorf) gestellt.

Diese im Laufe der Doktorarbeit entstandenen vorläufigen Ergebnisse wurden allerdings in enger Kooperation mit dem Institut für zelluläre Virologie der WWU Münster kontinuierlich, auch nach Abschluss dieser Arbeit, weiterentwickelt. Gerade der Bezug auf eine strukturelle Aktivierung von HPV-16 bleibt spannend, denn HPV-16 benötigt bekanntlich Heparansulfat um HaCaT-Zellen und deren extrazelluläre Matrix zu binden^[181]. Dieser Prozess benötigt sehr spezifische Bindungen, was entweder durch Maßschneidern mittels Festphasensynthese, wie in dieser Arbeit, oder durch geeignete Zucker erreicht werden kann. Die vorläufigen Ergebnisse zeigten, dass die sulfatisierten GlcNAc-Oligomere in der Lage sind die Infektion von HeLa-Zellen durch HPV-16 zu inhibieren.

In **Abbildung 39** ist ein „Seed over“ Experiment zu sehen, welches mit **O10-S**, dem stärksten Inhibitor aus dem „Add-On“, durchgeführt wurde. Hierbei wird Oligomer-inkubiertes HPV-16 an eine ECM-Oberfläche gebunden und mit HaCaT-Zellen beschichtet.

¹Markus Giesler (Lehrstuhl für Makromolekulare Chemie) synthetisierte im Rahmen seiner Doktorarbeit die entsprechenden, unsulfatisierten Polymere, welche per Sulfatisierung zur Synthese der Verbindungen **P1-S** und **P2-S** dienen.

Diese Zellen wurden mit NaClO₃ behandelt, welches das Enzym blockiert, welches Sulfate auf die HaCaT Zellen aufträgt. Wenn das Glycomimetikum die richtige Struktur hat, ist HPV-16 in der Lage die Zellen zu infizieren. Dieser Effekt konnte bei Heparin festgestellt werden.^[182]

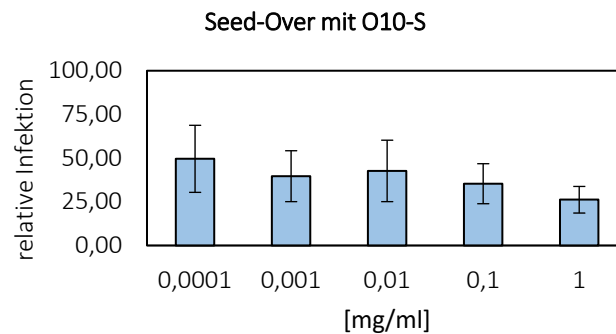


Abbildung 39: Seed-Over von **O10-S**-inkubiertem HPV-16 mit NaClO₃-behandelten HaCaT-Zellen bei verschiedenen Oligomerkonzentrationen.

Die relative Infektion der HaCaT-Zellen durch O10-S-inkubiertes HPV-16 steigt auf maximal 49,6% bei 10⁻⁴ mg/ml. Dieser Wert liegt nur knapp über dem experimentell ermittelten Basiswert der Infektion von 30-40%^[182]. Das Oligomer ist also mutmaßlich nicht in der Lage HPV-16 für eine Infektion strukturell zu aktivieren. Dazu hat es scheinbar nicht die richtige Struktur, was auf die Unterschiede zu Heparin zurückzuführen sein könnte (höhere Rate an N-Acetylierung, Rückgrat und Molekulargewicht).

Ergänzend zu diesen, hier gezeigten Experimenten können die folgenden Aussagen zusammengefasst werden: Die sulfatisierten Glycopolymere sind starke HPV-16 Antagonisten, die HPV-16-Infektionsrate kann durch die sulfatisierten Glycooligomere *in vitro* reduziert werden und die Inhibierung durch Glycooligomere und Glycopolymere läuft auf unterschiedliche Art und Weise ab. *In vivo* Experimente (Maus) zeigten, dass nur die Glycopolymere in der Lage sind eine antivirale Aktivität zu zeigen.^[180]

Es bleibt herauszufinden, ob durch maßgeschneiderte, sequenzdefinierte und monodisperse Glycooligomere ein stärkeres, antagonistisches Verhalten gegenüber HPV-16 erhalten werden kann, oder ob neben der spezifischen Bindung auch die reine Menge an Ladungen entscheidend ist, wie sie in Makromolekülen, wie Heparin oder den sulfatisierten Polymeren **P1-S** und **P2-S** zu finden sind (**Abbildung 38**).

3.2. Synthese von GlcNAc-Oligomermodifizierten Nickelbeads

3.2.1 Hintergrund

Die in dieser Arbeit synthetisierten GlcNAc-Oligomere **O9-O12** zeigten insbesondere nach präparativer Aufreinigung durch HPLC eine hohe Reinheit. Daher sollte auch ein unsulfatisiertes GlcNAc-Oligomer in seinen Bindungen zu spezifischen Substraten untersucht werden. Geeignete Rezeptoren, wie die Chitinase Cts1 und Weizenkern-Agglutinin (*engl.* wheat germ agglutinin, WGA) sollten dieses auf das Verhalten als Chitinmimetika untersuchen. Die Arbeitsgruppe von Dr. Kerstin Schipper am Institut für Mikrobiologie der HHU Düsseldorf unter Leitung von Prof. Dr. Michael Feldbrügge beschäftigt sich umfassend mit Studien rundum die Biotechnologie pflanzlicher Pilze und der Endochitinase Cts1^[183]. Cts1 wird unkonventionell während der Zellteilung in der Hefephase des Pilzes sekretiert. Neben der Grundlagenforschung^[184-185] am Sekretionsprozess wird in der Arbeitsgruppe auch ein Proteinexpressionssystem^[186-187] basierend auf der Chitinase als *Carrier* etabliert. Bisher konnte keine effiziente und gleichzeitig spezifische Aufreinigungsmethode für Cts1 Fusionsproteine aus dem Kulturüberstand etabliert werden. Daher wurden in Kooperation mit Kai Hußnätter Versuche unternommen, eine neue Methode basierend auf Chitinmimetika zu etablieren. Konventionell werden hierzu Fe₂O₃-magnetisierte Nickelbeads eingesetzt, welche Chitin auf der Oberfläche tragen. Die starke Bindung von Chitin zu Cts1 ermöglicht hierbei das Protein am Partikel zu binden und von Kontaminationen sowie anderen Proteinen zu trennen^[188]. Bei Chitin besteht jedoch, wie bei vielen weiteren Polysacchariden, immer die Gefahr, dass es zu unspezifischen Wechselwirkungen kommt und Kontaminationen mit eingefangen werden. Maßgeschneiderte GlcNAc-Bausteine, wie die in dieser Arbeit synthetisierten GlcNAc-Oligomere könnten aufgrund ihrer Verwandtschaft mit Chitin in der Lage sein, Cts1 ausreichend und spezifisch zu binden. Zur Entwicklung einer Aufreinigungsmethode wurden NHS-aktivierte (N-Hydroxysuccinimid) Nickelbeads mit GlcNAc-Oligomer **O13** inkubiert, um oligomermodifizierte, magnetische Beads herzustellen. Diese Beads wurden mit Cts1 inkubiert, um dessen Bindung an **O13** zu untersuchen. Bei diesem Oligomer handelt es sich um eine Struktur mit acht GlcNAc-Einheiten. Bei einer starken Bindung von Cts1 könnte gezeigt werden, dass es möglich ist durch Festphasensynthese geeignete Liganden für Cts1 zu entwickeln. Als Referenz für die Experimente wurde WGA gewählt, da es eine sehr spezifische Bindung zu GlcNAc zeigt^[189-190].

3.2.2 Synthese

Die Festphasensynthese von **O13** erfolgte unter den gleichen Bedingungen, wie bei **O9-O12**. Anders allerdings als bei diesen Strukturen wurde hier der N-Terminus nach Anbringung des letzten TDS-Bausteins nicht mit Essigsäureanhydrid gekappt, sondern als freies Amin belassen. Dieses Amin diente als Verbindungsstelle zu den Nickelbeads unter der Bildung einer weiteren Amidgruppe (**Abbildung 40**). Bei den Beads handelte es sich um Pierce™ NHS-aktivierte, magnetische Beads (ThermoFisher Scientific). Der Hersteller bietet ein Protokoll zur Anbringung von Proteinen an (siehe experimenteller Teil), welches für die Reaktion mit **O13** verwendet wurde, da die Verbindung bei Proteinen ebenfalls über freie Amine von Aminosäuren, wie Lysin, stattfindet.

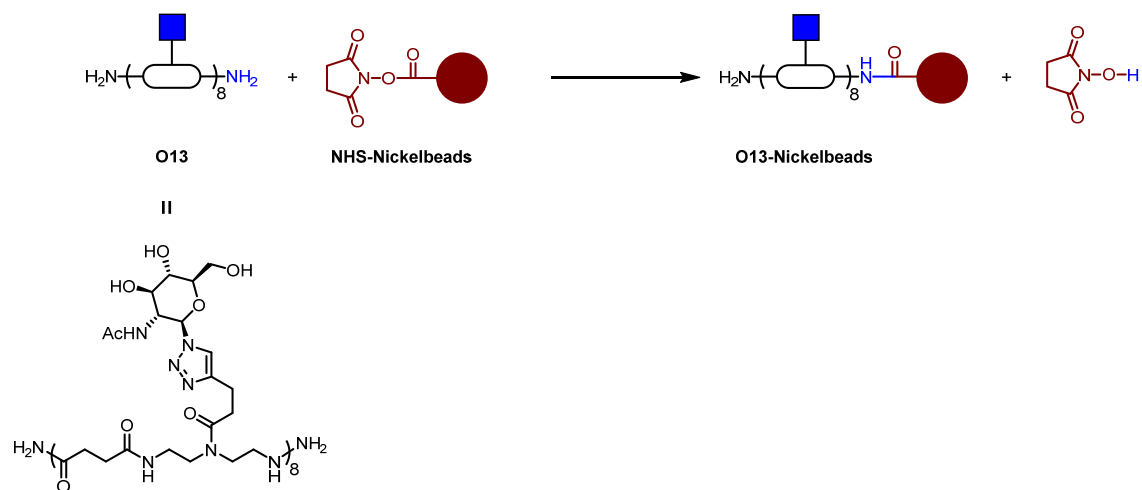


Abbildung 40: Kupplung von GlcNAc-Octamer an NHS-aktivierte, magnetische Nickelbeads.

Zur Einstellung der Amine für die Kupplungsreaktion wurde mit einem 50 mM Boratpuffer bei pH 8,5 gearbeitet. Nachdem Oligomer und Beads inkubiert wurden, konnten restliche, freie NHS-Gruppen mit Ethanolamin gekappt werden. Ähnlich zur Festphasensynthese, in welcher die Reaktion an der festen Phase stattfindet, kann auch für Nickelbeads dieser anwendungsfreundliche Ansatz genutzt werden. Durch die besondere Eigenschaft der Beads können diese durch Magneten festgehalten werden, sodass Überstände und Nebenprodukte einfach gewaschen werden können.

Schwierig allerdings stellt sich die Analytik der GlcNAc-Oligomer beschichteten Beads heraus, da hier lediglich auf Festkörperanalytik zurückgegriffen werden kann, welche möglicherweise durch die großen Mengen an Nickel und magnetischem Eisen(III)-Oxid erschwert wird. Effektivere Spektroskopie zum Nachweis einer erfolgreichen Reaktion, wie $^1\text{H-NMR}$ - oder ESI-MS-Spektroskopie, konnten hier nicht eingesetzt werden. Eine geeignete Titration für GlcNAc-Reste auf den Beads konnte im Laufe dieser Arbeit ebenfalls nicht etabliert werden. So blieben als Nachweis für eine erfolgreiche Kupplung lediglich die Ergebnisse aus den vorläufigen Bindungsstudien mit Cts1 und WGA.

3.2.3 Bindungsstudien

Interaktion mit Cts1

Zusammen und unter Anleitung von Kai Hußnätter¹ (AG Schipper, Institut für Mikrobiologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) wurden Versuche zum Vergleich der **O13-Nickelbeads (O13-NB)** und kommerziell erhältlicher chitinbeschichteter Magnetbeads (Chitin-B, New England BioLabs Inc.) durchgeführt. Für den Versuch wurde rekombinantes und mittels His-Tag Affinitätschromatographie aus *Escherichia coli* aufgereinigtes Cts1 von Kai Hußnätter zu Verfügung gestellt. Die Beads wurden mit dem Protein inkubiert, dann mit Puffer gewaschen und anschließend mit Elutionspuffer (pH 2) das Protein von den Beads gelöst. Zur Kontrolle der Gesamtbeladung und Elution, erfolgte eine vollständige Entfernung des Proteins von den magnetischen Beads durch thermische Behandlung.

¹**Kai Hußnätter** (Institut für Mikrobiologie) betreute die Versuche zur Proteinbindung von Cts1, GST und WGA methodisch, praktisch und fachlich, wie sie in Kapitel 3.2.3 beschrieben werden. Er stellte die Proteine Cts1 und GST zu Verfügung, sowie die notwendigen Puffer, Instrumente, Geräte und Materialien aus dem Institut für Mikrobiologie. Die Inkubationen der Beads mit den jeweiligen Proteinen, deren Elution und Vorbereitung für die SDS-PAGE führten Sebastian Bauer und Kai Hußnätter gemeinsam durch. Die jeweiligen SDS-PAGE und CBB-Quantifizierungen zur Bewertung der Proteinbindungen führte Kai Hußnätter selbstständig durch. Die Auswertung und Diskussion der Ergebnisse erfolgte durch Sebastian Bauer und Kai Hußnätter gemeinsam.

Die üblicherweise vom Hersteller empfohlene Menge Protein stellte sich als zu hoch heraus, was u.a. zu stark verschmierte Banden in der SDS-PAGE und falsch-positiven Werte in der Negativkontrolle führte, und wurde angepasst. **Abbildung 41** zeigt die Ergebnisse der ersten Versuchsreihe. Sie stellt die SDS-PAGE (Kai Hußnätter) aller im Folgenden erläuterten Fraktionen dar, nachdem die Gele mit dem Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau (CBB) eingefärbt wurden (Kai Hußnätter). Zunächst erkennt man Cts1 in den Inputfraktionen (**a**) wieder, als Kontrolle, dass Protein mit den Beads inkubiert wurde. Ebenfalls zu sehen ist ein Proteinstandard, mit dessen sich die Molmassen der Fraktionen zuordnen lassen. Der Durchlauf (**b**) zeigt, dass bei den **O13-NB** große Mengen Cts1 ungebunden im Überstand geblieben sind, welche jedoch in den Waschfraktionen (**c**) vollständig entfernt werden.

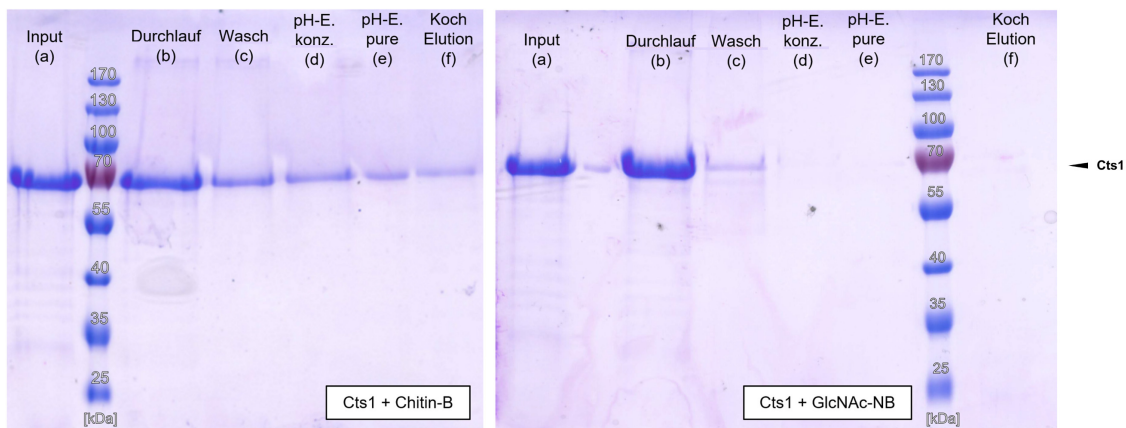


Abbildung 41: SDS PAGE Bindungsstudien der Interaktion zwischen Cts1 und kommerziellen Chitinbeads, sowie O13-Nickelbeads, durchgeführt von Kai Hußnätter. (a) Inputkontrolle des eingesetzten Cts1. (b) Ungebundenes Protein nach Inkubation. (c) Waschfraktionen nach Inkubation. (d) 200 µl kombinierte und aufkonzentrierte pH 2 Eluierungsfractionen. (e) Reine 20 µl pH 2 Eluierungsfraction. (f) Fraction der Beads nach Aufkochen mit Laemmli/NaOH-Puffer (95 °C).

Was sich durch starke Banden schon im Durchlauf andeutete, kann in den Eluierungsfractionen **d-e** bestätigt werden. Cts1 bindet nicht an die oligomermodifizierten O13-Nickelbeads. Auch zu erkennen ist, dass eine reine Elution mit pH 2 Puffer nicht ausreicht, um das Protein vollständig von den kommerziellen Beads zu entfernen. Erst durch das Aufkochen (**f**) wird Cts1 vollständig eluiert. Die Chitinase benötigt für die Bindung offenbar Eigenschaften, die vom Mimetikum abweichen. Scheinbar gibt es entscheidende strukturelle Unterschiede zwischen Chitin und **O13**, sodass **O13** nicht der Lage ist das Verhalten von Chitin ausreichend in diesem spezifischen Versuch zu imitieren. Neben der geringen Molmasse kommt mutmaßlich auch die

unterschiedliche Verknüpfung zu tragen, da GlcNAc bei Chitin α -1,4-glycosidisch verknüpft ist, wohingegen **O13** die Zucker einzeln und über Triazole ligiert auf dem Oligomer-Gerüst trägt.

Interaktion mit WGA und Quantifizierung

Um die Validität der entwickelten Methode zu gewährleisten und zu zeigen, dass **O13** erfolgreich an die Nickelbeads koppelt, wurden weitere Versuche vorgenommen. Dazu wurden die Chitinbeads und **O13**-Nickelbeads mit WGA versetzt. Sollte hierbei weiterhin keine Bindung erfolgen, könnte man davon ausgehen, dass **O13** nicht an die Nickelbeads gekuppelt wurde. Des Weiteren wurde das Protein Glutathion-S-Transferase (GST) eingesetzt, welches von Kai Hußnätter heterolog in *E. coli* hergestellt wurde. Kai Hußnätter zeigte im Laufe seiner Arbeiten, in vorläufigen Experimenten, dass GST nicht an die Chitinbeads bindet, so dass diese eine geeignete Negativkontrolle darstellt.

Die Versuchsreihe zeigte, dass sowohl die Chitinbeads als auch **O13**-Nickelbeads erfolgreich WGA binden können. Zudem konnte gezeigt werden, dass GST nicht an die **O13**-Nickelbeads bindet. Dies bestätigt, dass **O13** erfolgreich kovalent an die Nickelbeads gebunden werden konnte und die modifizierten Beads außerdem keine unspezifischen Bindungen eingehen. Durch die von Kai Hußnätter vorgenommene Einfärbung des Gels konnte, ebenfalls von Kai Hußnätter ein RGB-Abgleich der CBB-Einfärbung mit guter Korrelation zu den tatsächlichen Proteinkonzentrationen, sowohl bei Cts1 als auch WGA, vorgenommen werden.

Die Ergebnisse der Bindungsstudie mit Quantifizierung durch CBB-RGB-Abgleich sind in **Abbildung 42** zu sehen (berechnete Ergebnisse nicht gezeigt). Die Standardreihen zeigen die Intensitäten der CBB-gefärbten Banden bei verschiedenen definierten Proteinkonzentrationen.

Betrachtet man den Vergleich der beiden Durchlaufaktionen (**b**) wird deutlich, dass die Bindung von WGA durch die **O13**-Nickelbeads im Vergleich zur Bindung von Cts1 durch die Chitinbeads sehr hoch ausfällt. Auch wenn noch ein leichter Schatten/schwache Bande beim Durchlauf von WGA zu sehen ist, liegt dieser unter der Berechnungsgrenze der Quantifizierungsmethode. Dies wird deutlich, wenn man den Schatten mit der Stärke der 1 μ g Standardbande vergleicht.

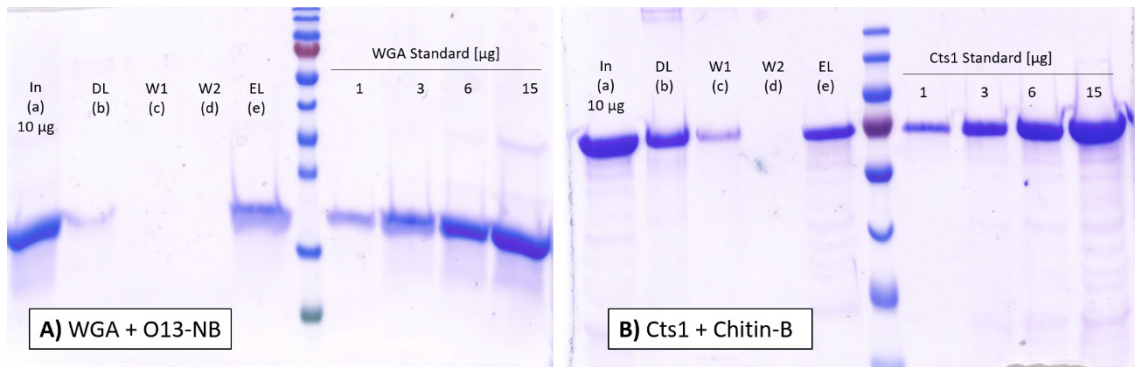


Abbildung 42: SDS-PAGE Bindungsstudien der Interaktion zwischen A) GlcNAc-Oligomer-Nickelbeads (O13-NB) und WGA, sowie zwischen B) Chitinbeads (Chitin-B) und Cts1, durchgeführt von Kai Hußnätter. (a) Inputkontrolle mit 10 µg Protein. (b) Durchlauf des nicht gebundenen Proteins. (c) Waschfraktionen nach Inkubation. (d) Letzte Waschfraktion als Nachweis über vollständige Entfernung des Überstandes. (e) Die Beads wurden sofort durch Auskochen mit Laemmli -Puffer bei 95 °C eluiert.

Die Bindung des WGA durch die **O13-Nickelbeads** (**Abbildung 42, A**) war so stark, dass in keiner der Waschfraktionen WGA nachgewiesen werden konnte. Ähnlich gute Eigenschaften zeigten die Chitinbeads bei der Aufnahme von WGA (**Abbildung 43, A2**). Trotz der WGA-freien Durchlaufs- und Waschfraktionen konnten in der Eluierfraktion (**e**) bei der Quantifizierung über den von Kai Hußnätter berechneten RGB-Abgleich lediglich etwa 47,5% des Inputs nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Im Vergleich dazu finden sich in der Eluatfraktion der Interaktion zwischen Cts1 und Chitinbeads nur etwa 27,3% des Inputs wieder, wohingegen etwa 26,1% im Durchlauf bleiben. Der Schatten in der ersten Waschfraktion (**c**) liegt unter der Nachweisgrenze der Quantifizierungsmethode. Möglicherweise fällt die Beladung mit 10 µg Chitin etwas zu hoch und deutlich über der Kapazitätsgrenze der Chitinbeads aus.

Woher die fehlenden relativen Anteile in Bezug auf die Inputkontrolle kommen ist unklar. Neben Masseverlusten durch Pipettieren ist auch ein unvollständiges Ausfällen der Proteine in Trichloressigsäure denkbar, auch wenn diese Verbindung in der Regel sehr gut zum Ausfällen von Proteinen geeignet ist. Möglicherweise ist die Bindung zwischen Protein und modifizierten Beads jedoch auch so stark, dass selbst ein Auskochen (**e**) nicht zur vollständigen Abtrennung ausreicht. Auch denkbar ist, dass die Kapazitätsgrenze der Beads, wie beschrieben, erreicht ist. Bei der Interaktion zwischen WGA und **O13-NB** jedoch spricht gegen diese Begründung, da sich keine quantifizierbare Menge Protein in der Durchlaufraktion befindet und sich somit keine Überladung der Beads feststellen lässt.

Grundsätzlich lässt sich konstatieren, dass die Modifizierung der NHS-aktivierten Nickelbeads mit **O13** erfolgreich war. Die Interaktion zu WGA schneidet im Vergleich zu der etablierten Methode

zwischen Cts1 und Chitinbeads sehr gut ab. Auch wenn die Beschaffenheit der Struktur **O13** nicht ausreicht, um Cts1 zu binden, konnte eine starke Wechselwirkung mit WGA gezeigt werden. Wie anfänglich beschrieben ist die Interaktion zwischen WGA und GlcNAc-Strukturen bekannt, jedoch bietet die Synthese der GlcNAc-Oligomer-modifizierten Nickelbeads und deren Bindungsstudien einen konzeptionellen Beweis, dass die hier hergestellten Glycooligomere auf solchen Oberflächen zur Bindung zu Lektinen fähig sind.

Inhibierungsstudie

Das freie Oligomer **O13** diente in einer dritten Versuchsreihe dazu, Inhibierungseigenschaften gegenüber WGA und Cts1 bei der Anbindung an Chitinbeads zu überprüfen. Dazu wurden die beiden Proteine jeweils mit den entsprechenden Beads inkubiert. Die Bead-gebundenen Proteine wurden anschließend mit zunehmenden Konzentrationen von **O13** beziehungsweise GlcNAc als Referenz eluiert, was einer kompetitiven Elution entspricht, da die Eluenten mit den Beads um die Bindung zum Protein konkurrieren. Ein Ablösen des Lektins bzw. der Chitinase, welches wiederum per SDS-PAGE/CBB-Färbung überprüft wurde (Kai Hußnätter), weist den Eluenten eine Inhibierungseigenschaft nach. Die Ergebnisse aus diesem Experiment sind in **Abbildung 43** zu sehen.

Experimente **A1** und **A2** zeigen zur Überprüfung des Experiments und als quantitative Referenz der Bindung von Cts1 und WGA zu den Chitinbeads. Die Zahlen stehen für die quantitative Referenz der Bandenstärke bei der Methode durch den RGB-Abgleich in Mikrogramm (Kai Hußnätter). Banden ohne Zahlen lagen unterhalb der Nachweisgrenze der Quantifizierungsmethode. Bei Cts1 eluierten abzüglich des Durchlaufs 92,2% des Proteins, bei WGA 81,3%.

Experimente **B1** und **B2** zeigen die Eluierung der durch Chitinbeads gebundenen Proteine Cts1 (**B1**) und WGA (**B2**) durch einen GlcNAc-Konzentrationsgradienten, im Vergleich zu einer anschließenden Kocheluierung (**e**). GlcNAc ist in der Lage, die Bindung zwischen Cts1 und Chitinbeads zu inhibieren, aber nicht zwischen WGA und Chitinbeads.

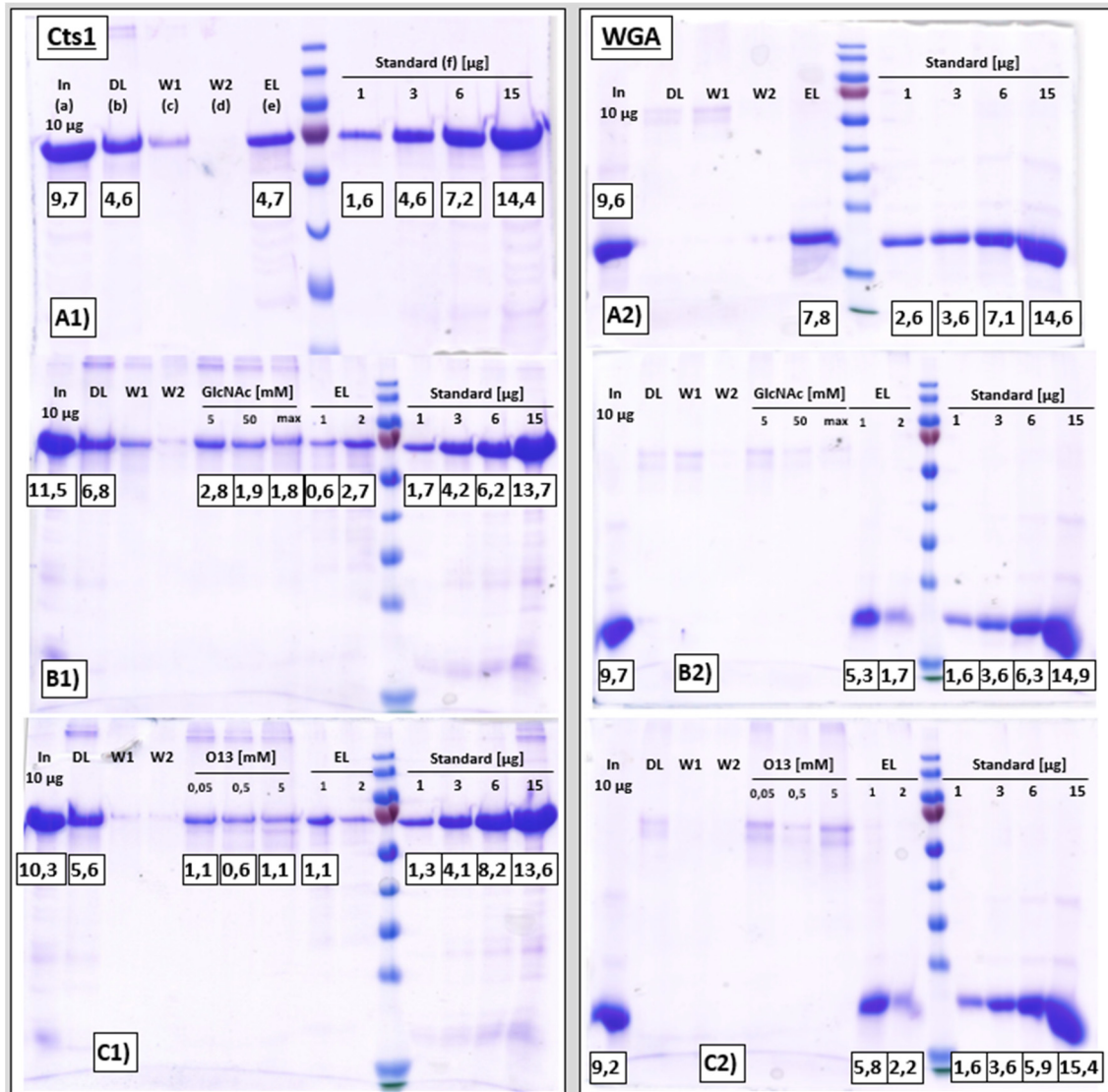


Abbildung 43: SDS-PAGE der kompetitiven Hemmung zwischen WGA, bzw. Cts1 und O13, bzw. GlcNAc zu chitinmodifizierten, magnetischen Beads, durchgeführt von Kai Hußnätter. (a) Inputkontrolle mit 10 µg Protein. (b) Durchlauf des nicht gebundenen Proteins. (c) Waschfraktionen nach Inkubation. (d) Letzte Waschfraktion als Nachweis über vollständige Entfernung des Überstandes. (e) Die Beads wurden sofort durch Auskochen mit Laemmli/NaOH-Puffer bei 95 °C eluiert. (f) CBB-gefärbter Proteinstandard zur Konzentrationskalibrierung per RGB-Abgleich. Die Zahlen unter den Banden stehen für die berechneten Mengen in µg.

C1 und **C2** zeigen zu **B** ähnliche Experimente, jedoch wurde hier ein O13-Konzentrationsgradient verwendet, um die Bindung der Proteine, an die Chitinbeads zu verhindern. Wie bei Experiment **B** wird die Bindung zwischen Cts1 und Chitinbeads inhibiert, jedoch nicht die zwischen WGA und Chitinbeads.

In Experimenten **B** und **C** wird auch bei hohen Konzentrationen Cts1 nicht vollständig von den Beads entfernt, wie bei den Kochelutionen (**EL**) zu sehen ist. Zur genaueren Überprüfung müsste untersucht werden, ob weitere Elutionsschritte mit GlcNAc oder O13 zu einem weiteren Ablösen des Proteins führen, bevor dieses vollständig ausgekocht wird.

Die Quantifizierungsmethode hat Defizite, denn die kumulative Menge aller Elutionen liegt teilweise über der theoretischen Menge an Protein (Input). Grund dafür ist eine ungenaue Kalibrierung, was ebenso immer wieder dazu führte, dass deutlich sichtbare Banden unterhalb der Nachweisgrenze lagen. Diese sind bei den Cts1-Experimenten unter anderem sehr gut in den Waschfraktionen zu sehen. Weiterhin ist es möglich, dass die Anlagerung des Inhibitors an die Proteine eine CBB-Färbung und damit die Quantifizierung beeinflussen können.

Fazit

Zusammenfassend zu den in diesem Kapitel gezeigten Proteinbindungsexperimenten lässt sich folgendes konstatieren. Dem ersten Experiment (**Abbildung 41**) kann entnommen werden, dass die **O13**-Nickelbeads nicht in der Lage waren, Cts1 zu binden. Freies **O13** in Lösung kann jedoch, wie hier gezeigt, die Bindung von Cts1 zu Chitin inhibieren.

Gegenteilig verhält sich **O13** zu WGA. An die Nickelbeads gebunden, vermag es WGA zu binden, wie es in **Abbildung 42** zu sehen ist. In Lösung ist es jedoch, wie GlcNAc, nicht in der Lage die Bindung zwischen WGA und Chitin in Form der kommerziellen Beads zu inhibieren. Ungeklärt ist, inwiefern der Wechsel zwischen Waschpuffer und Puffer mit Zusatz schon einen Einfluss auf die Elution hat. Flexibilität und Austauschvermögen scheinen wichtige Faktoren bei der Bindung von **O13** zu Chitin und WGA zu sein. In Lösung ist ein mehrfaches Anlagern des Glycooligomers möglich und die Dissoziation kann durch bindungsschemische Gleichgewichte möglicherweise besser kompensiert werden als in starrer Form am Nickelbead, basierend auf einer Vielzahl an austauschenden Molekülen. Die kompetitive Mechanik des Experiments lässt außerdem darauf schließen, dass **O13** und GlcNAc geeignet sind, die Bindung von Cts1 zu Chitin zu lösen, ohne selbst stark an das Protein zu binden, da auch eine mehrfache Elution nicht zur vollständigen Abtrennung ausreichte.

WGA scheint zu stark durch das Chitin auf den magnetischen Beads gebunden zu sein, um von **O13** oder GlcNAc gelöst zu werden. Es liegt nahe, dass hier die schiere Anzahl an Bindern im Chitin den mono- und oligosacchariden Profilen der eingesetzten Strukturen im kompetitiven Assay deutlich überlegen sind. Im Vergleich stellt sich wiederhin heraus, dass der Chitinbinder Cts1 nicht stark genug an Chitin bindet, um ein kompetitives Ablösen durch niedermolekulare Strukturen

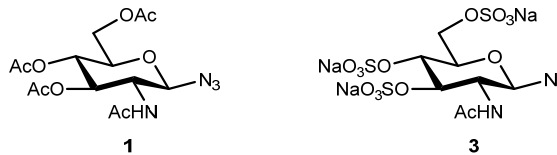
zu verhindern. Gegebenenfalls ist das Bindungsverhalten von Cts1 zu den Chitinbeads weniger spezifisch als das von WGA.

Durch GlcNAc gecoatete Nickelbeads, mit vermeintlich deutlich schwächeren Bindungsprofilen wären für vergleichbare Experimente interessant zu testen. Untersuchungen mit weiteren, maßgeschneiderten Molekülen, wie den hier synthetisierten GlcNAc-Glycooligomeren, könnten essenziell sein, um Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu entschlüsseln. Der SDS-PAGE Proteinnachweis mit anschließender CBB-Färbung könnte bei Optimierung der Quantifizierungsmethode durch ähnliche Konzentrationsgradienten, wie in der Eluierung in **Abbildung 43** gezeigt, dazu genutzt werden, charakteristische IC_{50} -Werte zu generieren. Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen, dass mit weiterer Entwicklung und Optimierung potenziell ein Werkzeug zur bildlichen und quantifizierbaren Darstellung von Inhibierungsstudien entwickelt werden kann.

Kapitel IV

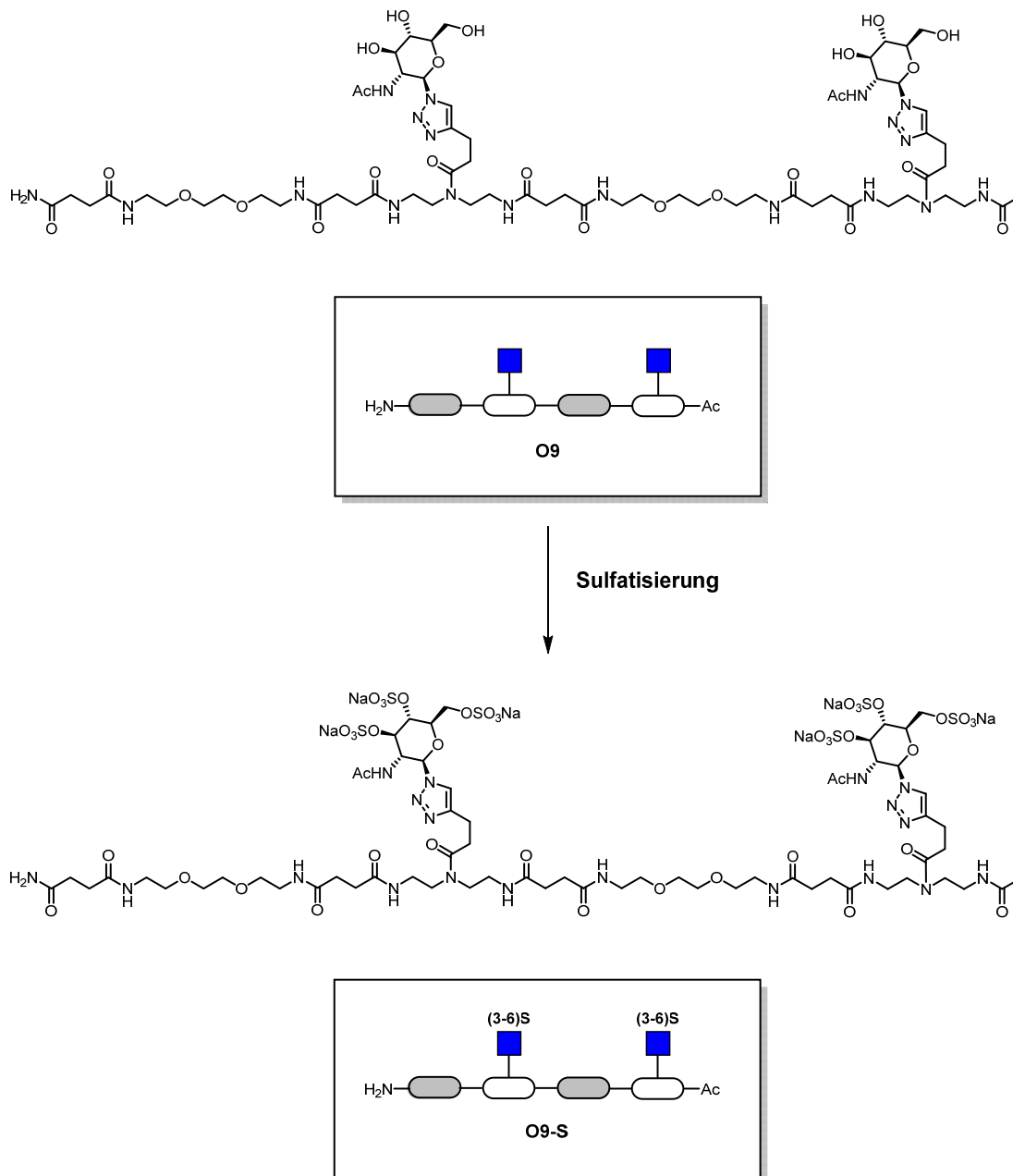
Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Kombination aus Festphasensynthese, kupferkatalysierter Azid-Alkin Cycloaddition (engl. *copper catalyzed azide-alkine cycloaddition*, CuAAC) und Amin-Schwefeltrioxid-Sulfatisierung verwendet um sulfatisierte und nicht-sulfatisierte *N*-Acetylglucosamin-Glycooligomere herzustellen. Anomerisch azidiertes *N*-Acetylglucosamin (OAc-GlcNAc-N₃, **1**) wurde für unterschiedliche Synthesestrategien verwendet. In einer CuAAC wurde es eingesetzt, um GlcNAc-Oligomere mit bis zu zehn anhängenden Zuckerresten zu erzeugen. Außerdem kam es zum Einsatz, um eine sulfatisierte GlcNAc Vorstufe herzustellen (**3**), welche ebenfalls in ihrer Eignung als festphasenkompatibles Klickreagenz bewertet wurde. Die Synthese der sulfatisierten Vorstufe war zudem ein wichtiger Faktor zur Erschließung geeigneter analytischer Methoden für die Aufklärung sulfatisierter Strukturen.



Zahlreiche synthetische Routen zur Herstellung sulfatisierter GlcNAc-Oligomere wurden bewertet. Darunter fielen die Sulfatisierung des azidierten Zuckerbausteins zur anschließenden Klickreaktion mit alkinhaltigen Zwischenstufen, die Sulfatisierung von GlcNAc-Oligomeren an der Festphase und die Sulfatisierung in Lösung, nachdem die GlcNAc-Oligomere von der Festphase getrennt und vollständig aufgereinigt wurden. Die letztere Methode eignete sich schließlich am besten zur Synthese der Zielstrukturen dieser Arbeit.

Vorweg wurde eine Festphasensynthese mit den etablierten und literaturbekannten TDS (engl. *triplebond diethyleneamine succinic acid*) und EDS (engl. *ethylendioxo diamine succinic acid*) Bausteinen eingesetzt, um erstmals GlcNAc-haltige Glycooligomere herzustellen.



Die synthetisierten GlcNAc-Oligomere konnten analytisch vollständig aufgeklärt werden. Hierbei wurden etablierte chromatographische, NMR- und massenspektrometrische Methoden verwendet. Die Reinheitsbestimmung erfolgte per RP-HPLC und es konnten relative Reinheiten von über 95% ermittelt werden. Die MS-Analytik zeigte Fragmentierungsmuster, welche sich später bei den sulfatisierten Strukturen als sehr nützlich zum Verständnis der beobachteten Signale herausstellten.

Anhand geeigneter Beispiele der Literatur wurden die Sulfatisierungsbedingungen entscheidend optimiert. Hierbei wurden verschiedene Sulfatisierungsreagenzien, Schutzgruppen und

Katalysatoren, sowie Auffangreagenzien für Schwefeltrioxidkomplexe getestet. Zur Aufreinigung wurden verschiedene Methoden der Chromatographie, Präzipitation, Ionenaustausch, Extraktion und Dialyse bewertet. Am geeignetsten hat sich die Sulfatisierung mit Trimethylammoniumschwefeltrioxid Komplex herausgestellt, mit anschließender Natriumacetatbehandlung und Aufreinigung mittels Dialyse gegen Wasser. Die Syntheseoptimierung erfolgte anhand eines GlcNAc-divalenten Oligomers (**O9**) und wurde erfolgreich auf Oligomere mit bis zu zehn GlcNAc-Einheiten angewendet.

Eine Kombination aus FT-IR-, ¹H-NMR- und ESI-MS-Spektroskopie wurde verwendet, um die sulfatiserten Strukturen analytisch nachzuweisen. Zur chromatographischen Untersuchung wurde erfolgreich eine analytische Methode mittels starker Anionenaustauschchromatographie (SAX-HPLC) etabliert. Der analytische Nachweis der sulfatiserten Strukturen bleibt, auch im literarischen Kontext, herausfordernd. Dennoch konnten zufriedenstellende Ergebnisse erzielt und die Strukturen größtenteils aufgeklärt werden.

In Zusammenarbeit mit Kai Hußnätter, innerhalb der Arbeitsgruppe von Dr. Kerstin Schipper (Institut für Mikrobiologie, Prof. Dr. Michael Feldbrügge, HHU Düsseldorf) wurden mit Hilfe der nicht-sulfatiserten GlcNAc-Oligomere erstmals modifizierte, magnetische Nickelbeads hergestellt. Solche Beads werden bevorzugt zur Aufreinigung von Proteinen aus Mischungen eingesetzt. Im Vergleich mit Chitin-beladenen magnetischen Beads wurden Bindungsstudien zu den Proteinen Cts1 und WGA durchgeführt. Ein achtvalentes GlcNAc-Oligomer zeigte hierbei, je nach Methode, unterschiedliches Bindungsverhalten. Es wurde festgestellt, dass GlcNAc-Oligomere sowohl mit Cts1 als auch WGA interagieren. Als besonders entscheidend hat sich dabei herausgestellt, ob das Oligomer fest an Beads verankert ist, oder frei in Lösung vorliegt. Erste Ergebnisse zeigen, dass die hier etablierten Methoden in Zukunft potenziell als quantitativer Assay, oder auch zur Proteinaufreinigung genutzt werden könnten.

Die sulfatiserten GlcNAc-Oligomere wurden auf verschiedene biologische und biomedizinische Anwendungen getestet. Es konnte gezeigt werden, dass die Oligomere in der Lage sind die Bindung von L-Selektin zu seinen s-Tyrosin- und SiaLex-Liganden zu inhibieren. Kim Silberreis führte unter Leitung von Dr. Jens Dornedde (Institut für Laboratoriumsmedizin der Charité Universitätsmedizin Berlin) mit Hilfe der sulfatiserten Strukturen entsprechende Experimente durch. Die Oligomere führten jedoch nicht zu einer verringerten Blutkoagulationsrate, was ein entscheidender Unterschied zu ähnlichen, natürlichen Inhibitoren, wie Heparin ist.

Außerdem konnte durch den Einsatz der sulfatiserten Glycooligomere die Infektionsrate von HeLa-Zellen durch den humanen Papillomavirus HPV-16 reduziert werden. Studien zu den HPV-Viren wurden von Laura Soria Martinez und Prof. Dr. Mario Schelhaas der westfälischen Wilhelms-Universität (WWU) Münster durchgeführt.

Aufgrund vielversprechender Ergebnisse werden diese Studien auch nach Abschluss dieser Doktorarbeit weiter intensiv verfolgt. Glycopolymere, welche von Markus Giesler (HHU Düsseldorf) polymerisiert wurden, konnten unter Einsatz der in dieser Arbeit optimierten Sulfatisierungsbedingungen erfolgreich sulfatisiert werden. Gerade in Verbindung mit diesen sulfatisierten Polymeren konnten erste interessante Ergebnisse im Hinblick auf die strukturelle Aktivierung von HPV-16 erzielt werden.

Hier gilt es weitere Untersuchungen durchzuführen, um positionsrelevantes, molekulargewichtsabhängiges und zuckerspezifisches Verhalten im Hinblick auf die Bindungseigenschaften bewerten zu können. Die Berücksichtigung von monodispersen, sequenzdefinierten Glycooligomeren zeigte schon in ähnlichen Beispielen durch deren valenz- und positionsbedingte Vielfältigkeit die Chance Struktur-Wirkungsbeziehungen zu entschlüsseln. Daraus ergibt sich kurzfristig die Möglichkeit wichtige Erkenntnisse über Bindungsmechanismen zu gewinnen, um langfristig maßgeschneiderte Therapeutika mit weniger Nebenwirkungen entwickeln zu können.

Kapitel V

Experimenteller Teil

5.1 Materialien und Methoden

Materialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Materialien wurden, wenn nicht anders beschrieben, vom Lehrstuhl für Makromolekulare Chemie (AG Hartmann) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zu Verfügung gestellt. Chemikalien wurden käuflich bei einschlägigen Herstellern wie Sigma Aldrich (Merck), Acros Organics, Fluka oder Alfa Aesar erworben. Lösungsmittel für die Festphasensynthese wurden in der Qualität peptide grade (DMF), HPLC-grade (MeCN) oder p.a. (Diethylether, DCM) erworben. Wasser wurde in Ultrapure-Qualität (MilliQ) und einem spezifischen Widerstand von 18 M Ω cm (25 °C) durch ein Thermo Scientific Barnstead MicroPure ST System aufbereitet. Harze für die Festphasensynthese mit der Bezeichnung Tentagel[®] wurden von der Firma RAPP Polymere erworben. H-Gly-2CT wurde von der Firma Iris Biotech erworben.

Methoden

¹H-NMR

¹H-NMR-Spektren wurden mit einem Bruker AVANCE III 300 (für 300 MHz) und 600 (für 600 MHz) bei Raumtemperatur aufgenommen. Chemische Verschiebungen wurden relativ zu den Lösemittelsignalen der deuterierten Lösungsmittel als δ in *parts per million* (ppm) aufgenommen. Multipletts wurden als Singulett (s), Doublett (d), Triplett (t), Quartett (q) oder Multiplett (m), beziehungsweise als pseudo-Signal (p) beschrieben.

Elektronenspray -Ionisierungs-Massenspektrometrie (ESI-MS)

ESI-MS-Spektren wurden mit einem Agilent Technologies 6120 Quadropol aufgenommen, welches an ein HPLC/MS-System gekoppelt war (siehe RP-HPLC/MS).

Ultra High Resolution Massenspektrometrie (UHR-MS)

UHR-MS-Spektren wurden mit einem Bruker UHR-QTOF maXis 4G per Direkteinlass (Spritzenpumpe) und einer ESI-Quelle, gefolgt von einem Quadropol-TOF Massenanalysator aufgenommen.

Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time Of Flight (MALDI-TOF)

MALDI-TOF-Spektren wurden mit einem MALDI-TOF Ultraflex I (Bruker Daltonics) unter Verwendung gängiger Matrizen in Acetonitril-Wasser-Gemischen aufgenommen.

FT-IR

FT-IR-Spektren wurden mit einem Fourier-Transformations-IR-Spektrometer FT-IR-55XB der Firma Nicolet aufgezeichnet.

Gefriertrocknung

Gefriertrocknungen wurden mit einem Alpha 1-4 LD und einem Instrument der Martin Christ Freeze Dryers GmbH durchgeführt (-42 °C; 0,1 mbar).

High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)

SAX-HPLC (engl.: *Strong Anion Exchange*, starker Anionenaustausch) wurde mit einem Agilent Technologies 1200 Series LC System mit AT 1200 G1322A Entgaser, G1311A quartärer Pumpe, G1329A Autosampler (flüssig), G1316A temperierten Säulenkompartiment und G1314B variablen Wellenlängendetektor (214 nm) durchgeführt. Pufferlösungen wurden vorbereitet mit 50 mM Mononatriumphosphat and 800 mM Natriumchlorid (wenn erforderlich). Der pH-Wert wurde mit Natriumhydroxid (1 M) auf 7 eingestellt. Der Puffer wurde durch GE Healthcare LifeScience

Whatman™ 0.2 µm mixed cellulose filter per Unterdruck abgesaugt und mit HPLC-Grade Acetonitril (MeCN) vermischt (wenn erforderlich). Anionenaustausch wurde auf einer Agilent Zorbax SAX-Säule (5 µm, 4.6x250 mm mit 4.6x12.5 mm Vorsäule) bei Raumtemperatur durchgeführt.

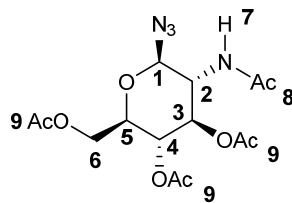
RP-HPLC/MS (Reversed Phase-HPLC/Massenspektroskopie) wurde mit einem Agilent Technologies 1260 Infinity System unter Verwendung eines AT 1260 G4225A Entgasers, G1312B binärer Pumpe, G1329B Autosampler (flüssig), G1316C temperierten Säulenkompartiment, G1314F variablen Wellenlängendetektor (214 nm) und einem AT 6120 Quadropol (ESI) durchgeführt. Die mobile Phase bestand aus Puffer C (H₂O:MeCN 95:5, 0,1 % Ameisensäure) and Puffer D (H₂O:MeCN 5:95, 0,1 % Ameisensäure). HPLC-Läufe wurden mit Poroshell 120 EC-C18 (3.0x50 mm, 2.5 µm) RP-Säule (Agilent) durchgeführt. Es wurde eine Flussrate von 0,4 ml/min 95% Puffer A and 5% Puffer B (0-5 min), gefolgt von einem linearen Gradienten zu 100% Puffer B (5-30 min) bei 25 °C eingestellt.

Präparative RP-HPLC wurde mit einem Agilent 1260 Infinity System und variablen Wellenlängendetektor (214 nm) durchgeführt. Zur GlcNAc-Oligomeraufreinigung wurde eine UG80 C18 RP-Säule von Shiseido (20x250 mm, 5 µm) mit einem Gradient von 10-12.5% Acetonitril in Wasser bei Raumtemperatur in 15 min verwendet. Die mobile Phase enthielt 0,1% Ameisensäure.

5.2 Synthesen¹

5.2.1 Bausteinsynthesen

5.2.1.1 (2R,3S,4R,5R,6R)-5-Acetamido-2-(acetoxymethyl)-6-azidotetrahydro-2H-pyran-3,4-diyl diacetat (OAc-GlcNAc-N₃, **1**)



Verbindung **1** wurde aus N-Acetylglucosamin unter Verwendung von Acetylchlorid und Natriumazid nach einem bekannten Verfahren hergestellt.^[4-5]

¹Abbildungen und Tabellen zu den Spektren von **1**, **O9** bis **O12**, **P1-S** und **P2-S**, sowie **O9-S** bis **O12-S** in Anlehnung an und mit Berechtigung von: L. Soria-Martinez, S. Bauer, M. Giesler, S. Schelhaas, J. Materlik, K. A. Janus, P. Pierzyna, M. Becker, N. L. Snyder, L. Hartmann, *Journal of the American Chemical Society* **2020**: "Prophylactic Antiviral Activity of Sulfated Glycomimetic Oligomers and Polymers". Copyright (2020) American Chemical Society.^[180]

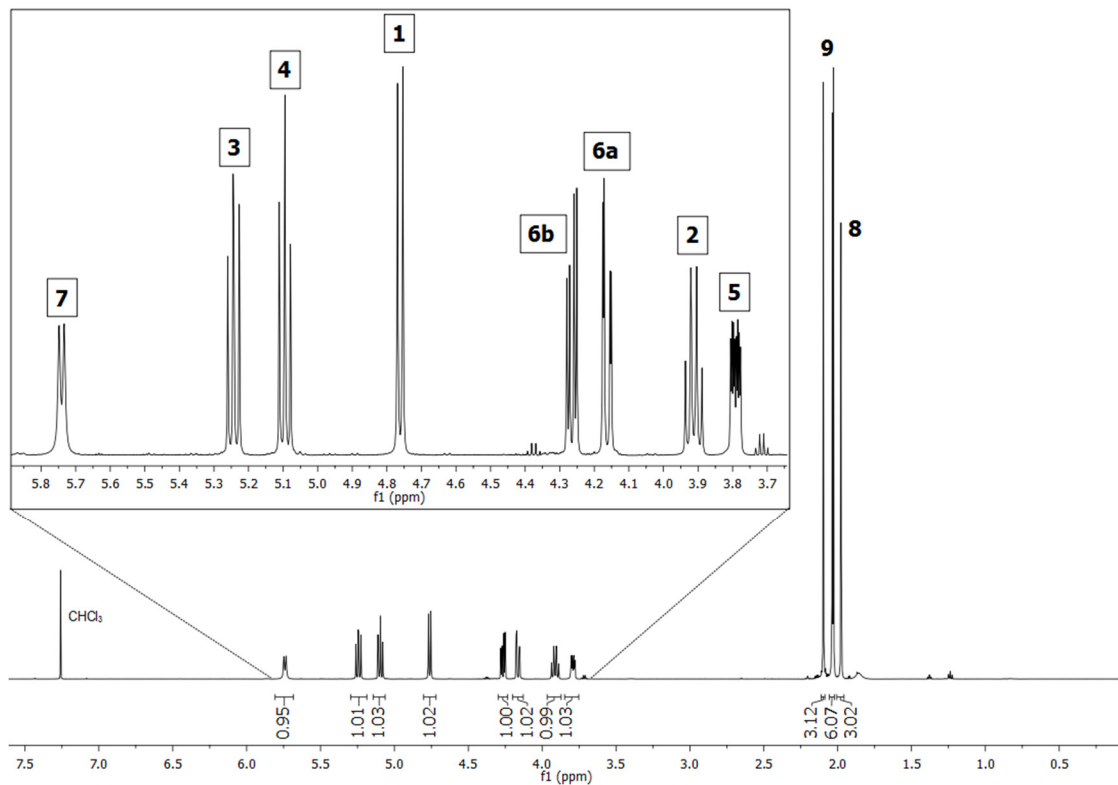


Abbildung 44: $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) Von Verbindung 1.

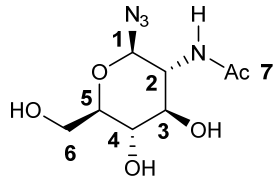
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1,98 (s, 3H, H-8); 2,03 (s, 3H, H-9a); 2,04 (s, 3H, H-9b); 2,10 (s, 3H, H-9c); 3,79 (ddd, 1H, H-5, J [Hz]: $H_{5-6a} = 2,3$, $H_{5-6b} = 4,9$, $H_{4-5} = 10,1$); 3,91 (ddd, 1H, H-2, J [Hz]: $H_{1-2} = 9,2$, $H_{2-3} = 10,6$, $H_{2-7} = 8,9$); 4,16 (dd, 1H, H-6a, J [Hz]: $H_{5-6a} = 2,3$, $H_{6a-6b} = -12,4$); 4,27 (dd, 1H, H-6b, J [Hz]: $H_{5-6b} = 4,9$, $H_{6a-6b} = -12,4$); 4,76 (d, 1H, H-1, J [Hz]: $H_{1-2} = 9,2$); 5,09 (dd; 1H; H-4; J [Hz]: $H_{3-4} = 9,3$, $H_{4-5} = 10,1$); 5,24 (dd; 1H; H-3; J [Hz]: $H_{2-3} = 10,6$, $H_{3-4} = 9,3$); 5,74 (d; 1H; H-7; J [Hz]: $H_{2-7} = 8,9$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 170,04; 169,62; 169,52; 169,25; 87,48; 72,77; 72,26; 68,13; 61,66; 52,48.

IR: ν [cm^{-1}] = 3362 (w, [N-H]); 2944 (w, [C-H/ CH_2]); 2879 (w, [C-H/ CH_2]); 2104 (s, [N_3]); 1741 (vs, C=O [OAc]); 1663 (s, C=O [NHAc]); 1518 (s, ν [C-H] + δ [N-H]).

ESI-MS: m/z theor. für $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_8^+$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 373,1, gefunden: 373,2.

5.2.1.2 N-((2R,3R,4R,5S,6R)-2-Azido-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-3-yl)acetamid (GlcNAC-N₃, **2**)

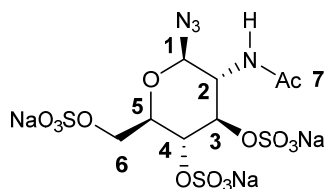


100 mg Natriummethanolat wurden in 1 l Methanol gelöst, bevor 1 g (26,9 mmol) **1** dazugegeben wurden. Das Gemisch wurde 1h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend durch sukzessive Zugabe von Amberlyst IR-120 H⁺ auf einen pH-Wert von 7 gebracht. Die Lösung wurde filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt, um **2** in quantitativer Ausbeute zu erhalten.

¹H-NMR (600 MHz; MeOH-d₄): δ [ppm] = 4,52 (d; J = 9,3 Hz; 1H); 3,90 (dd; J = 2,1; 12,1 Hz; 1H); 3,72 (dd; J = 5,4; 12,1 Hz; 1H); 3,38 (ddd; J = 2,1; 5,4; 9,3 Hz; 1H); 3,35 (dd; J = 2,1; 12,1 Hz; 1H); 2,0 (s; 3H)

¹³C-NMR (100MHz; MeOH-d₄): δ [ppm] = 173,85; 170,47; 90,27; 80,37; 75,86; 71,82; 62,63; 56,66; 22,90.

5.2.1.3 Natrium ((2R,3R,4R,5R,6R)-5-Acetamido-6-azido-2-((sulfonatooxy)methyl)tetrahydro-2H-pyran-3,4-diyl bis(sulfat) ((3-6S)-GlcNAC-N₃, **3**)



Verbindung **3** wurde aus **2** nach einem bekannten Verfahren von Wessel et al^[153] durchgeführt. Die Aufreinigung erfolgte nach verschiedenen, in Kapitel 3.1.2.2 beschriebenen Methoden. Eine Ausbeute wurde nicht bestimmt, da das finale Produkt stets Salzkontaminationen enthielt.

Beispielhaft wurden 100 mg (407 μmol) **2** mit 858 mg $\text{TMA}^+\text{SO}_3^-$ (6,2 mmol) in 14 mL trockenem DMF unter Stickstoffatmosphäre gelöst. Die klare, farblose Lösung wurde 42 Stunden bei 70 °C gerührt und anschließend bei 0 °C gekühlt. Der sich dabei bildende, weiße Niederschlag wurde abzentrifugiert und das klare, leicht gelbliche Dekantat zu 10 g einer 10 Gew.-% Natriumacetatlösung bei 0 °C gegeben und eine Stunde gerührt. Das Lösemittel wurde per Rotationsverdampfer und Coevaporation mit Wasser bei 60 °C abgezogen. 53 mg des Rohprodukts wurden zur Analyse zurückgehalten und der Rest in 2 mL MilliQ-Wasser gelöst und mit Hilfe einer 1,5 x 20 cm Sephadex LH20 Säule mit MilliQ-Wasser in 1 mL Fraktionen eluiert. Fraktion 9 wurde mit Methanol gewaschen und die sich dabei bildenden, weißen Partikel durch Zentrifugieren entfernt. Das Lösemittel des Dekantats wurde entfernt und der zurückbleibende, weiße Feststoff analysiert.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz; D_2O) δ [ppm]: 2,04 (s; 3H; H-7); 3,88 (dd; 1H; H-2; $^3J_{\text{H1-H2}} = 9,3$ Hz; $^3J_{\text{H2-H3}} = 10,2$ Hz); 3,95 (ddd; 1H; H-5; $^3J_{\text{H5-H6a}} = 2,2$ Hz; $^3J_{\text{H5-H6b}} = 7,9$ Hz; $^3J_{\text{H4-H5}} = 10,0$ Hz); 4,08 (dd; 1H; H-6b; $^3J_{\text{H6a-H6b}} = -11,6$ Hz; $^3J_{\text{H5-H6b}} = 7,9$ Hz); 4,21 (dd; 1H; H-4; $^3J_{\text{H3-H4}} = 8,8$ Hz; $^3J_{\text{H4-H5}} = 10,0$ Hz); 4,48 (dd; 1H; H-3; $^3J_{\text{H2-H3}} = 10,2$ Hz; $^3J_{\text{H3-H4}} = 8,8$ Hz); 4,55 (dd; 1H; H-6a; $^3J_{\text{H6a-H6b}} = -11,6$ Hz; $^3J_{\text{H5-H6a}} = 2,2$ Hz); 4,87 (d; 1H; H-1; $^3J_{\text{H1-H2}} = 9,3$)

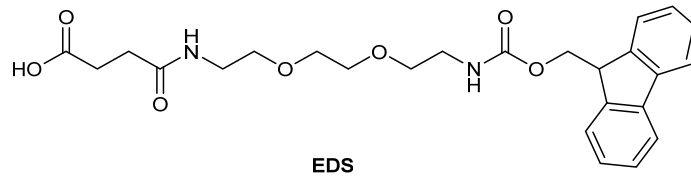
SAX-HPLC: 20 Minuten Phosphatpuffer (70 mM, pH 7). $t_{\text{R}} = 6,0$ Minuten (VWD 214 nm).

ESI-MS: m/z theor. $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_4\text{Na}_3\text{O}_{14}\text{S}_3$ $[\text{M-Na}]^- = 528,9$; gefunden: 528,8.

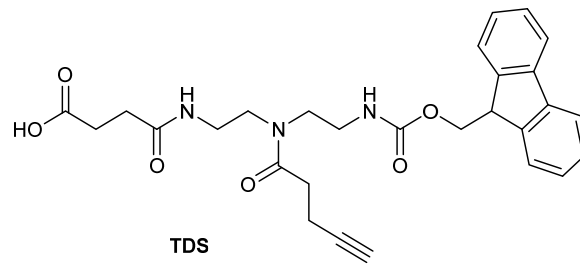
FT-IR ν [cm^{-1}]: 2122 (N_3), 1652 (Amid-I), 1564 (Amid-II), 1416 (Amid-III), 1229 (Sulfat-Streckschwingung).

5.2.1.4 EDS (4) und TDS (5) Bausteine

1-(9H-Fluoren-9-yl)-3,14-dioxo-2,7,10-trioxa-4,13-diazaheptadecan-17-säure (EDS, 4)



1-(9H-Fluoren-9-yl)-3,11-dioxo-7-(pent-4-ynoyl)-2-oxa-4,7,10-triazatetradecan-14-säure (TDS, 5)



Die Bausteine EDS (4) und TDS (5) wurden nach einem bekannten Verfahren synthetisiert.^[3]

5.2.2 (GlcNAc)Oligomersynthesen

Tabelle 7: Zur Oligomersynthese verwendete Harze.

Harz	Linker	C-Terminus nach Abspalten	Hersteller
Tentagel® S RAM ^a	Rink-Amid	Primäres Amid	RAPP Polymere
Tentagel® S Trityl-Ethylendiamin ^b	Tritylamin	2-Aminoethylamid	RAPP Polymere
2-Chlorotrityl Glycinester (H-Gly-2CT) ^c	Tritylester	Glycinamid	Iris Biotech

(a) Nach Hersteller 0,24 - 0,25 mmol/g Beladung.

(b) Hergestellt aus Tentagel® S TRT-Cl Harz (0,25 mmol/g) durch Substitution mit über KOH getrocknetem Ethylendiamin. Beladung berechnet durch Fmoc-Phenylalanin-Kupplung (UV-VIS): 0,25 mmol/g.

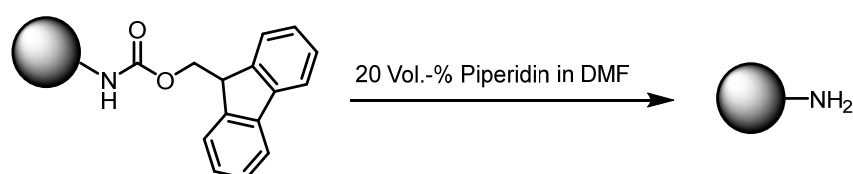
(c) Nach Hersteller 0,44 mmol/g Beladung.

Harz-Vorbehandlung

Für jede Festphasen-Reaktionssequenz wurde das Festphasenharz (**Tabelle 7**) in einen BD Spritzenreaktor mit Fritte gefüllt. Die Größe Spritze (5, 10 oder 20 ml) wurde so gewählt, dass das Harz nach Quellen in den verwendeten Lösungsmitteln nicht mehr als 50% des Gesamtvolumens der Spritze ausmachte. Je nach Mengenbedarf wurde mit 0,05, 0,1 oder 0,2 mmol Harz-Ansätzen, ausgerechnet aus der jeweiligen Beladung, gearbeitet. Vor jedem Reaktionsschritt wurde die Spritze samt Harz vollständig mit Dichlormethan (DCM) aufgezogen und 20 Minuten gequollen.

Fmoc-Abspaltung

Sofern sich eine Fmoc-Schutzgruppe am Harz, oder der letzten Bausteineinheit befand, konnte diese durch zweimaliges, vollständiges Aufziehen einer 25 %-igen Piperidinlösung in DMF entfernt werden. Durch 10-maliges Aufziehen von DMF und drei DCM-Waschgänge wurde die Spritze anschließend neutralisiert und für den nächsten Reaktionsschritt vorbereitet.

**Abbildung 45:** Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe an der Festphase.

Kupplung

Zur Bausteinkupplung (EDS oder TDS) wurde ein fünffacher Überschuss des Bausteins in DMF gelöst und vor der Zugabe zum Harz mit einem 10-fachen Überschuss DiPEA aktiviert. Die Kupplung erfolgte bei Raumtemperatur und konstantem Schütteln über 90 Minuten. Anschließend wurde das Harz 10x mit DMF und 3x mit DCM gewaschen.

Mengenbeispiel:

0,05 mmol Tentagel® S RAM: 126 mg (0,25 mmol) TDS oder 117 mg (0,25 mmol) EDS, 85 µl (0,5 mmol) DiPEA in 1 ml DMF pro Kupplungsschritt.

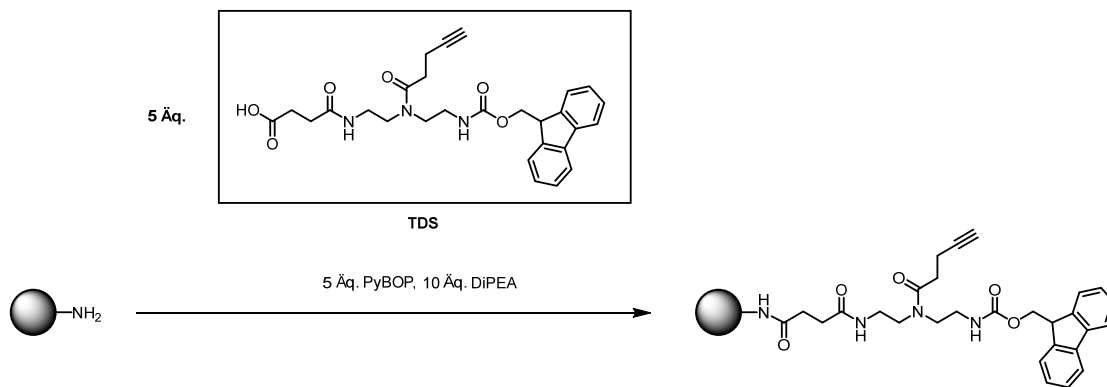


Abbildung 46: Beispiel einer Bausteinkupplung anhand des TDS-Bausteins.

N-terminale Acetylierung

Nach der letzten Fmoc-Entschützung wurde das Harz mit Essigsäureanhydrid (50 ml pro mmol Harz) für 30 Minuten geschüttelt. Nach der Acetylierung wurde das Harz 10x mit DMF und 3x mit DCM gewaschen.

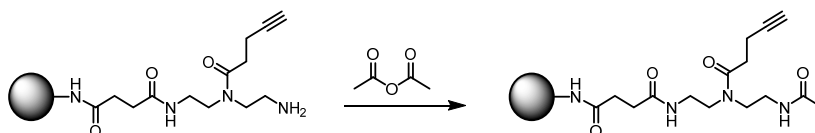


Abbildung 47: Beispiel einer Acetylierung anhand einer endständigen TDS-Einheit.

GlcNAc-Azid Klickreaktion

Für die Ligation wurde ein dreifacher Überschuss pro Alkingruppe OAc-GlcNAc-N₃ (**1**) in wenig DMF gelöst und mit je einem 1,3-fachen Überschuss Kupfer(II)-sulfat und Natriumascorbat in Wasser vermisch und zum Harz gegeben.

Mengenbeispiel:

Für Oligomer **O9** auf 0,25 mmol Tentagel® S RAM: 447 mg (1.2 mmol) OAc-GlcNAc-N₃ in 2 ml DMF; 249 mg (1.56 mmol) CuSO₄ und 309 mg (1.56 mmol) Natriumascorbat in 2 ml Wasser.

Die Klickreaktion wurde über Nacht bei Raumtemperatur durchgeführt. Restliches Kupfer wurde mit einer 0,2 M Natriumdiethyldithiocarbamat-Lösung in DMF/Wasser (1:1), DMF/Wasser (1:1) und DCM so lange in Zyklen entfernt, bis sich sowohl das Harz als auch die Lösung nicht länger färbten.

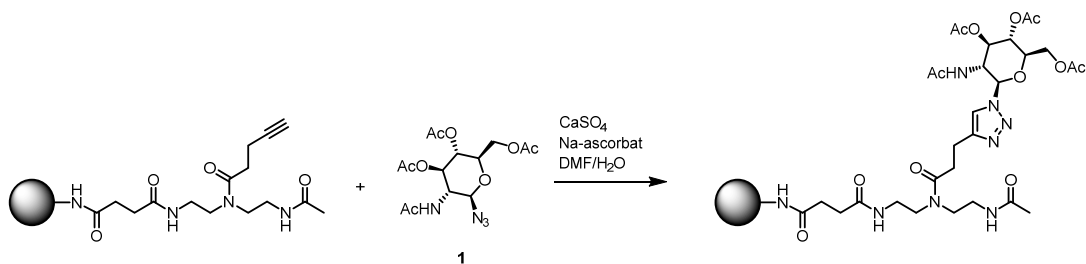


Abbildung 48: Beispiel einer Klickreaktion eines alkinhaltigen Oligomers mit OAc-GlcNAc-N₃ (**1**).

O-Acetyl Entschützung

Die O-Acetylschutzgruppen des GlcNAc-Bausteins (**1**) nach Klickreaktion wurden durch eine 20 mM Natriummethanolat-Lösung in Methanol durch 30-minütiges Schütteln entfernt. Das Harz wurde anschließend 5x mit Methanol und 3x mit DCM gewaschen.

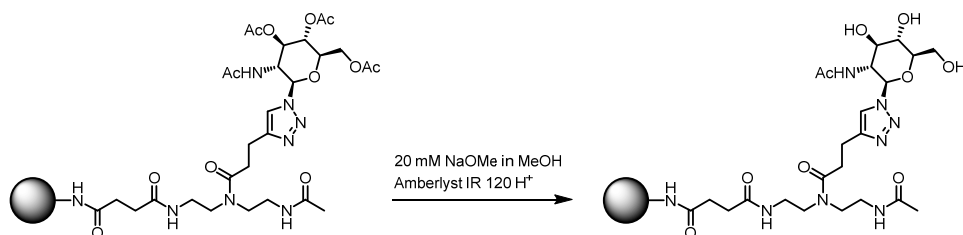


Abbildung 49: Beispiel der OAc-Entschützung nach Kupfer-Klick-Reaktion

Abspalten des Oligomers vom Harz

Tabelle 8: Harze und deren Abspaltbedingungen.

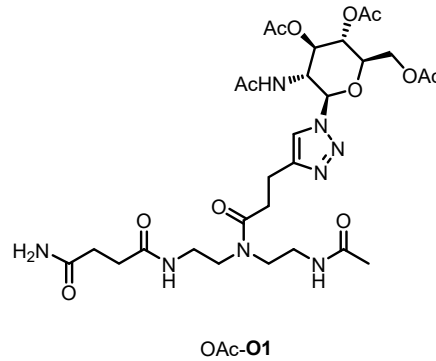
Harz	Bedingung
Tentagel® S RAM	95% Trifluoroessigsäure, 2,5% Triethylsilan, 2,5% DCM
Tentagel® S Trityl-Ethylendiamin	5-50% Trifluoroessigsäure, 45-90% DCM, 5% Triethylsilan
2-Chlorotriptyl Glycinester (H-Gly-2CT)	0,5-1% Trifluoroessigsäure, 1% Triethylsilan, 98-98,5% DCM

Das Abspalten der Harze erfolgte in den nach Herstellerangaben geeigneten Mischungen (**Tabelle 8**). Hierbei wurden 30 ml pro mmol Harz zugegeben und für 60-70 Minuten geschüttelt. Anschließend wurde das Spaltprodukt in 40 ml eiskaltem Diethylether oder Aceton (bei sehr hydrophilen Produkten mit Glycin-N-Terminus) ausgefällt. Das Harz wurde in DCM oder Methanol (bei sehr hydrophilen Produkten mit Glycin-N-Terminus) gewaschen und nach Einengen ebenfalls gefällt. Die ausgefallenen Feststoffe wurden mehrmals im Fällungsmittel gewaschen und anschließend im Hochvakuum getrocknet. Letztlich wurde das Oligomer getrocknet und nach Bedarf durch präparative HPLC aufgereinigt.

Glycooligomere **O1-O8** kamen für Vorversuche und die Etablierung eines optimierten Sulfatisierungs-Protokolls zum Einsatz. Mit Ausnahme von **O7** und **O8** wurden sie lediglich in analytischen Mengen von der Festphase getrennt.

Glycooligomere **O9-12** wurden für etablierte Sulfatisierungs-Protokolle eingesetzt. Diese Verbindungen, sowie **O13**, wurden für die biologischen Studien eingesetzt, durch präparative HPLC aufgereinigt, und einer ausführlicheren Analytik unterzogen.

5.2.2.1 (1)-GlcNAc(OAc)-(1)-Amid (OAc-**O1**)



Verbindung OAc-**O1** wurde nach der beschriebenen Festphasensynthese in analytischen Mengen vom Harz getrennt. **O1** wurde nach Deacetylierung auch per LC/MS untersucht jedoch eluiert die Probe direkt mit dem Injektionsvolumen.

LC/MS

RP-HPLC (5-95% Acetonitril, 0,1% Ameisensäure in 10 min)

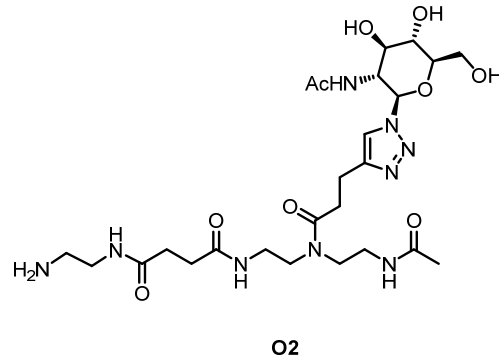
$t_R = 5,2$ min

ESI-MS

OAc-**O1** m/z theor.: $C_{29}H_{44}N_8O_{12}Na^+$: 719,3; gefunden: 719,3

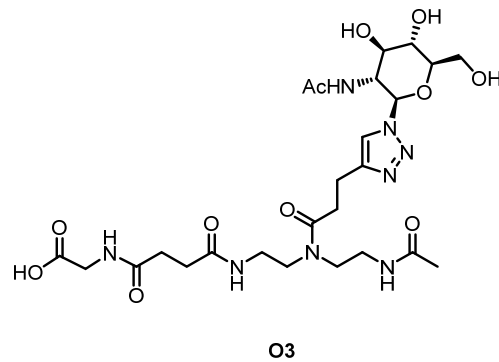
O1 m/z theor.: $C_{23}H_{38}N_8O_9Na^+$: 593,27; gefunden: 593,2

5.2.2.2 (1)-GlcNAc-(1)-2-Aminoethylamid (**O2**)



Verbindung **O2** wurde von Kevin Janus im Rahmen seiner Bachelorarbeit hergestellt.^[159]

5.2.2.3 (1)-GlcNAc-(1)-2-Carboxyethylamid (**O3**)



Verbindung **O3** wurde nach der beschriebenen Festphasensynthese in analytischen Mengen vom Harz getrennt. Bei Oligomer **O3** mit Glycinlinker wurde der Zucker **1** vor der Klickreaktion in Zucker **2** umgewandelt (siehe Protokoll für Verbindung **2**).

LC/MS

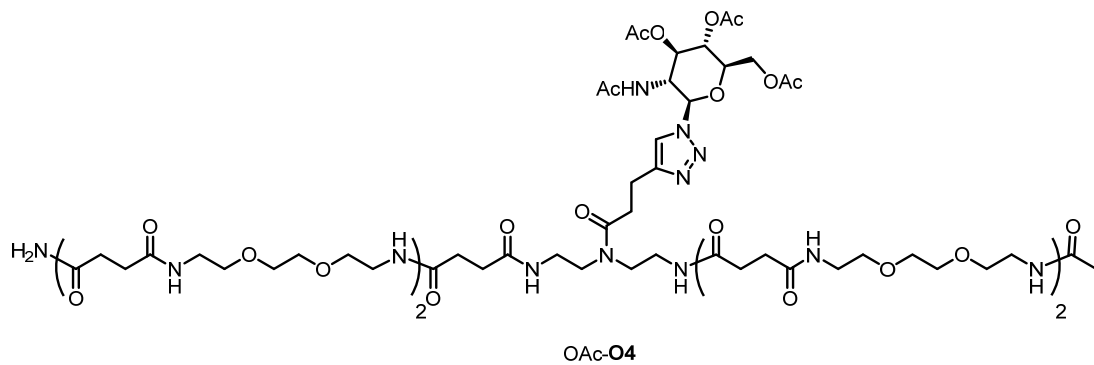
RP-HPLC (5-95% Acetonitril, 0,1% Ameisensäure in 10 min)

$t_R = 1,3$ min

ESI-MS

m/z theor.: $C_{25}H_{43}N_9O_9Na^+$: 651,27; gefunden: 651,2

5.2.2.4 EDS-(3)-GlcNAc(OAc)-(5)-Amid (OAc-O4)



Verbindung OAc-O4 wurde nach der beschriebenen Festphasensynthese in analytischen Mengen vom Harz getrennt.

LC/MS

RP-HPLC (5-95% Acetonitril, 0,1% Ameisensäure in 10 min)

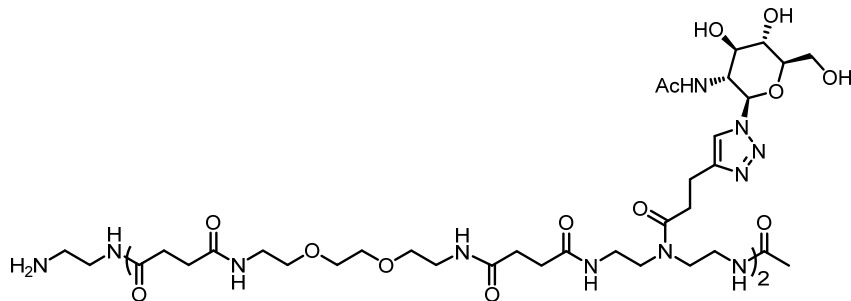
$t_R = 5,8$ min

ESI-MS

m/z theor.: $C_{69}H_{118}N_{16}O_{28}^{2+}$: 809,41; gefunden: 809,5

$C_{69}H_{119}N_{16}O_{28}^{3+}$: 539,95; gefunden: 540,2

5.2.2.5 EDS-(2,4)-GlcNAc-(4)-Aminoethylamid (O5)



Verbindung **O5** wurde nach der beschriebenen Festphasensynthese in analytischen Mengen vom Harz getrennt.

LC/MS

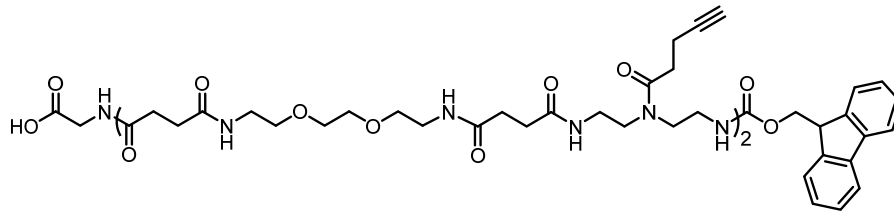
RP-HPLC (5-95% Acetonitril, 0,1% Ameisensäure in 10 min)

$t_R = 4,9$ min

ESI-MS

Hauptsignal	m/z theor.: $C_{66}H_{113}N_{20}O_{25}Na^{2+}$: 804,40; gefunden: 804,5
Ein GlcNAc fragmentiert	m/z theor.: $C_{58}H_{101}N_{19}O_{25}^{2+}$: 691,87; gefunden: 692,0
Zwei GlcNAc fragmentiert	m/z theor.: $C_{25}H_{43}N_9O_9Na^+$: 590,33; gefunden: 590,4
GlcNAc ⁺	m/z theor.: $C_8H_{14}NO_5^+$: 204,09; gefunden: 204,0

5.2.2.6 EDS-(2,4)-TDS-(4)-Carboxyethylamid (**O6**-Alkin)



Verbindung **O6**-Alkin wurde nach der beschriebenen Festphasensynthese, vor Klickreaktion mit **1**, in analytischen Mengen vom Harz getrennt.

LC/MS

RP-HPLC (5-95% Acetonitril, 0,1% Ameisensäure in 10 min)

$t_R = 10,2$ min

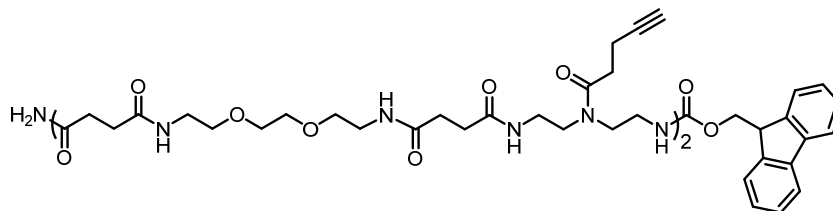
ESI-MS

m/z theor.: $C_{63}H_{90}N_{11}O_{18}^+$: 1288,65; gefunden: 1288,5

m/z theor.: $C_{63}H_{91}N_{11}O_{18}^{2+}$: 644,83; gefunden: 645,0

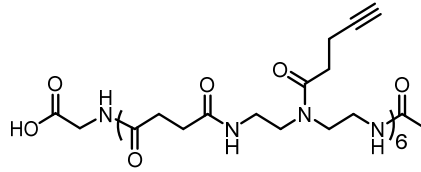
m/z theor.: $C_{63}H_{92}N_{11}O_{18}^{3+}$: 430,22; gefunden: 430,5

5.2.2.7 EDS-(2,4)-TDS-(4)-Amid (**O7**)



Verbindung **O7** wurde nach Anschluss an die Abspaltung vom Tentagel® S RAM Harz (Ausbeute 13,8 mg, 11,2%) ohne weitere Analytik für die Klickreaktion in Lösung eingesetzt (5.2.4.1).

5.2.2.8 (6)-TDS-(6)-Carboxyethylamid (**O8**)



Verbindung **O8** wurde nach Abspaltung vom Harz durch präparative RP-HPLC aufgereinigt.

Eluent: 20% MeCN in Wasser, 0,1% Ameisensäure, isokratisch.

$t_R = 11$ min

Ausbeute = 100 mg (58,8%)

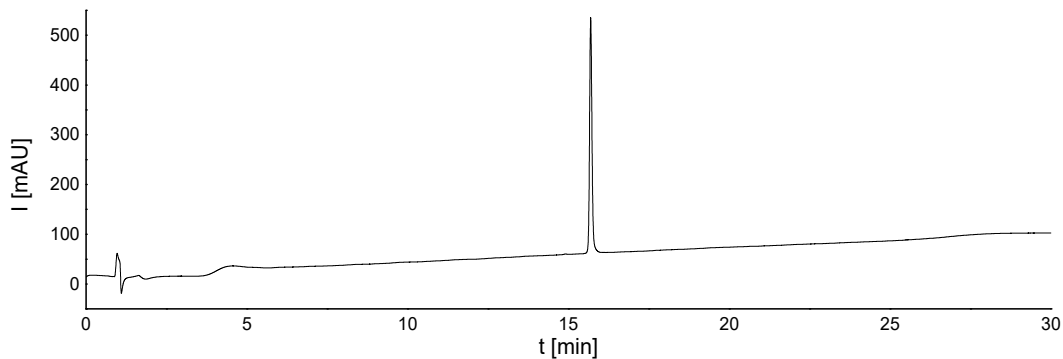
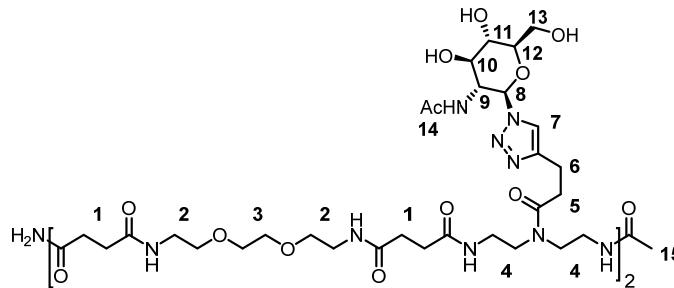


Abbildung 50: RP-HPLC von Verbindung **O8**. Bedingungen. MeCN (5% in Wasser) zu MeCN (50% in Wasser), 0,1% Ameisensäure in 30 Minuten. Variabler Wellenlängendetektor (VWD) 214 nm. Relative Reinheit >95 %.

ESI-MS

m/z theor.: $C_{82}H_{123}N_{19}O_{21}^{2+}$: 854,96; gefunden: 855,0

m/z theor.: $C_{82}H_{124}N_{19}O_{21}^{3+}$: 570,31; gefunden: 570,5

5.2.2.9 EDS-(2,4)-GlcNAc-(4)-Amid (**09**)

Verbindung **09** wurde durch präparative RP-HPLC aufgereinigt und nach Entfernung des RP-HPLC Eluenten (*in vacuo*) und Zugabe von 1 ml MilliQ-Wasser gefriergetrocknet. Die Gesamtausbeute betrug 100 mg (32,4%). Präparative RP-HPLC-Bedingungen: 10-12.5% MeCN (H₂O, 0.1% Ameisensäure) in 10 min.

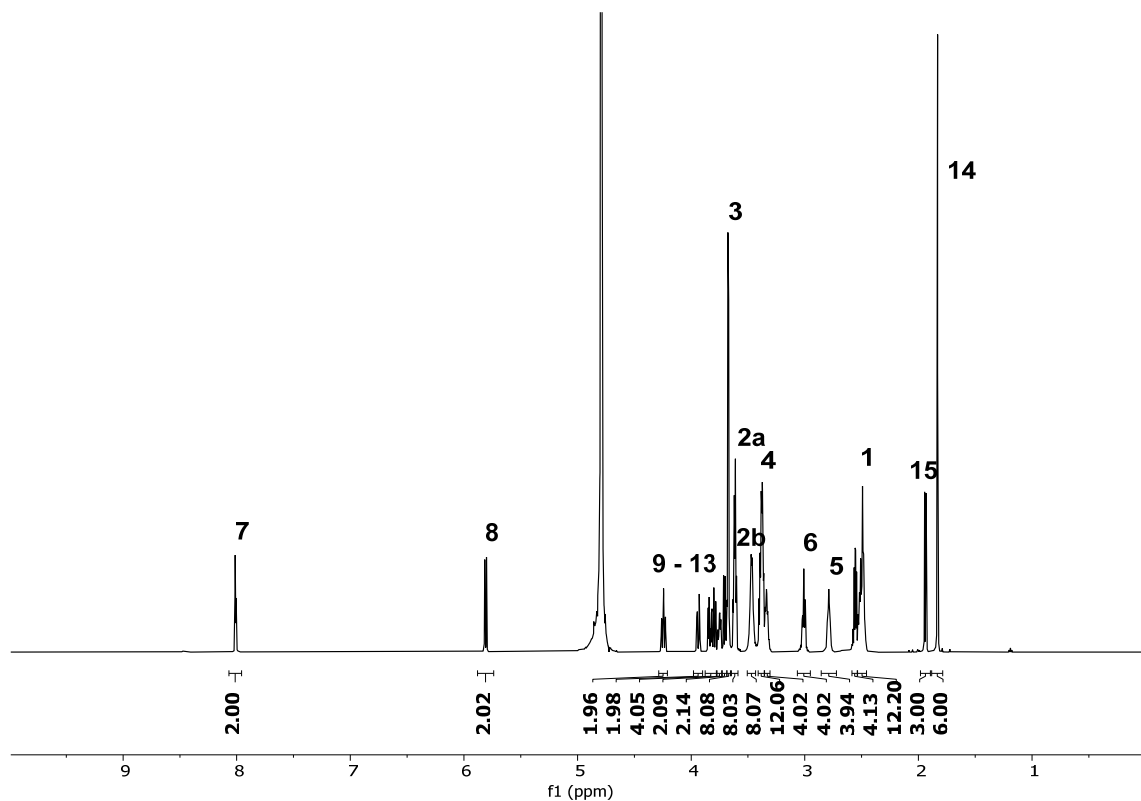


Abbildung 51: ¹H-NMR (600 MHz, D₂O) Von Verbindung **09**.

¹H-NMR

¹H-NMR (600 MHz, D₂O): δ [ppm] = 1,83 (s, 6H, H-14); 1,93 & 1,95 (2x s, 3H, H-15); 2,45-2,52 (m, 12H, H-1); 2,52-2,59 (m, 4H, H-1 C-terminus); 2,79 (m, 4H, H-5); 3,01 (m, 4H, H-6); 3,30-3,35 (m, 4H, H-4 N-terminus); 3,35-3,41 (m, 12H, H-4); 3,43-3,52 & 3,59-3,64 (m, 16H, H-2) 3,65-3,69 (m, 8H, H-3); H-9/10/11: 3,70 (m, 2H), 3,80 (dd, ³J_{HH} = 8,9 & 10,3 Hz, 2H), & 4,24 (m, 2H); 3,75 (ddd, 2H, H-12, J [Hz]: H_{12-13a} = 1,8, H_{12-13b} = 5,1, H₁₂₋₁₁ = 9,8); 3,84 (dd, 2H, H-13a, J [Hz]: H_{13a-13b} = -12,6, H_{13a-12} = 5,1); 3,94 (dd, 2H, H-13b, J [Hz]: H_{13a-13b} = -12,6, H_{13b-12} = 1,8); 5,81 (d, 2H, H-8, J = 9,6 Hz); 8,01 (m, 2H, H-7).

Anmerkung: Zuckerprotonen 9-11 konnten aufgrund nicht zuordenbarer J-Werte nicht klar differenziert bewertet werden.

HRMS

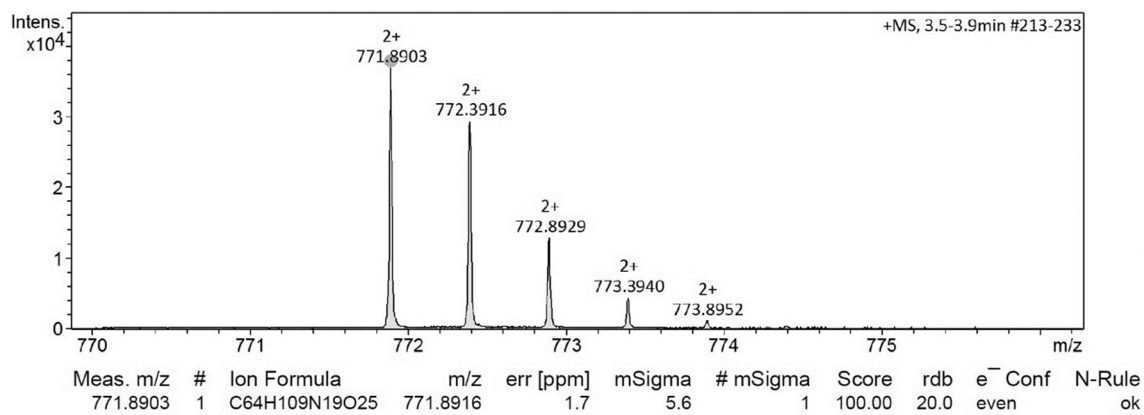


Abbildung 52: UHR-MS von Verbindung O9.

ESI-MS

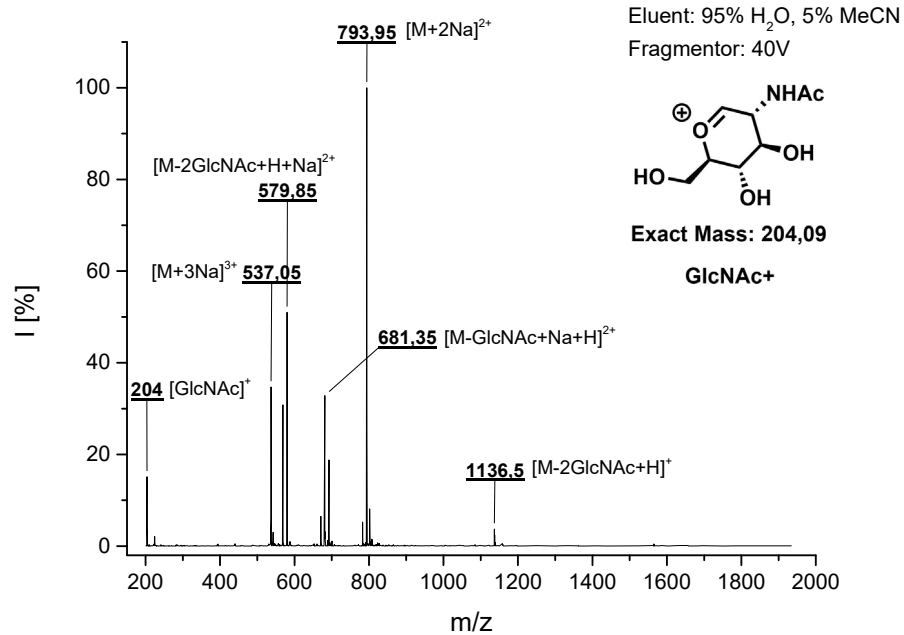


Abbildung 53: ESI-MS von Verbindung O9.

RP-HPLC

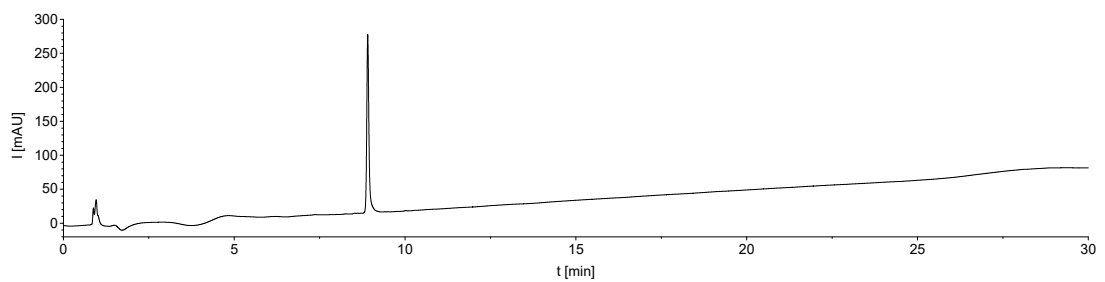


Abbildung 54: RP-HPLC von Verbindung O9. Bedingungen. MeCN (5% in Wasser) zu MeCN (50% in Wasser), 0,1% Ameisensäure in 30 Minuten. Variabler Wellenlängendetektor (VWD) 214 nm. Relative Reinheit >95 %.

V - Experimenteller Teil

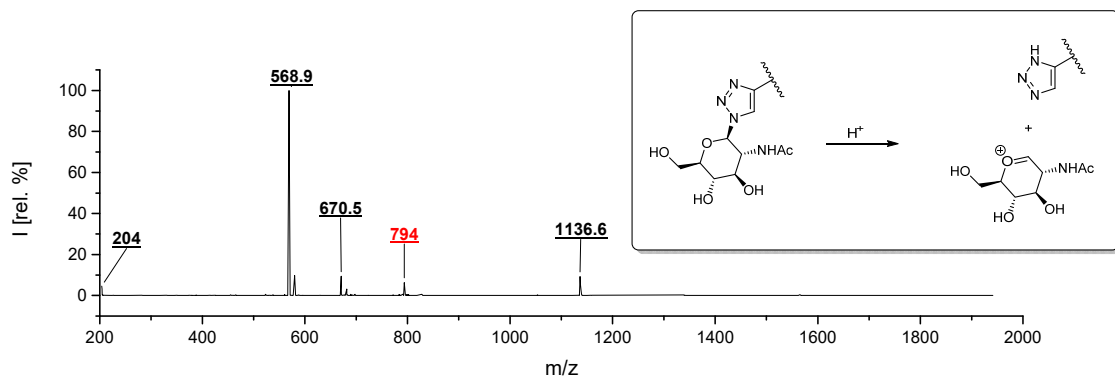
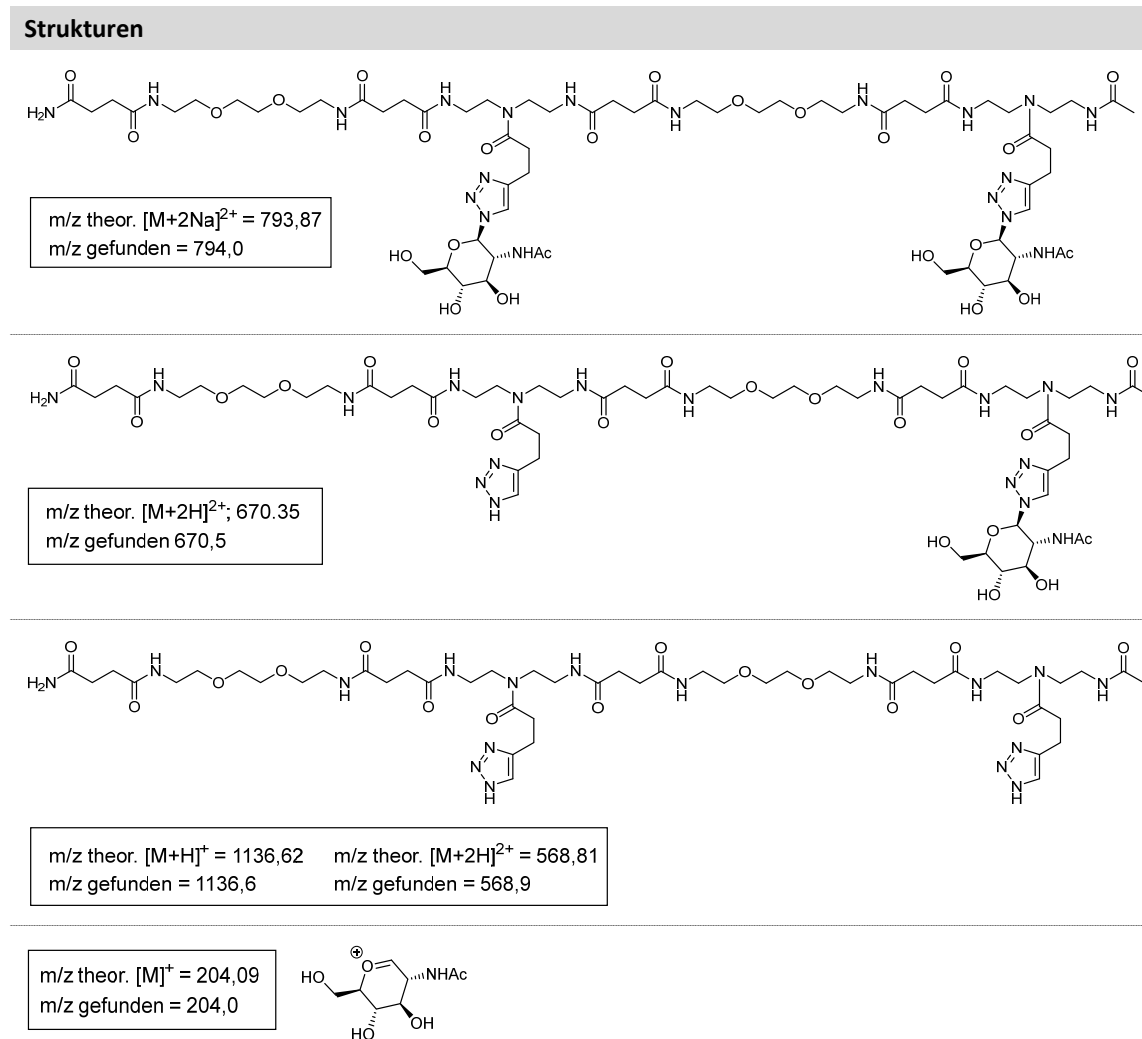
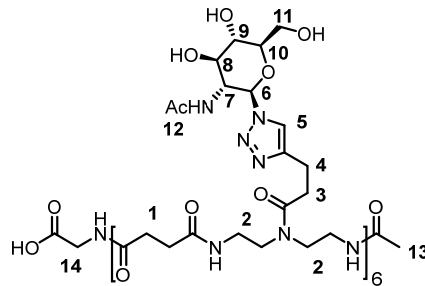


Abbildung 55: ESI-MS von Glycooligomer **O9**. Beispiel der protoneninduzierten Fragmentierung bei der Wahl einer 50:50 Acetonitril-Wasser-Mischung (Vol.) mit 0,1% Ameisensäure als Eluenten. Fragmentorspannung: 100 V. Rot dargestellt ist das unfragmentierte Oligomer.

Tabelle 9: Strukturelle Übersicht und Fragmente von **O9** bei den in Abbildung 55 beschriebenen Bedingungen.



5.2.2.10 (1-6)-GlcNAc-(6)-Carboxyethylamid (**O10**)

Bei Oligomer **O10** mit Glycinlinker wurde der Zucker **1** vor der Klickreaktion in Zucker **2** umgewandelt (siehe Protokoll für Verbindung **2**). Verbindung **O10** wurde durch präparative RP-HPLC aufgereinigt und nach Entfernung des RP-HPLC Eluenten (*in vacuo*) und Zugabe von 1 ml MilliQ-Wasser gefriergetrocknet. Die Gesamtausbeute betrug 22,3 mg (7%). Präparative RP-HPLC-Bedingungen: 10-12.5% MeCN (H₂O, 0.1% Ameisensäure) in 10 min.

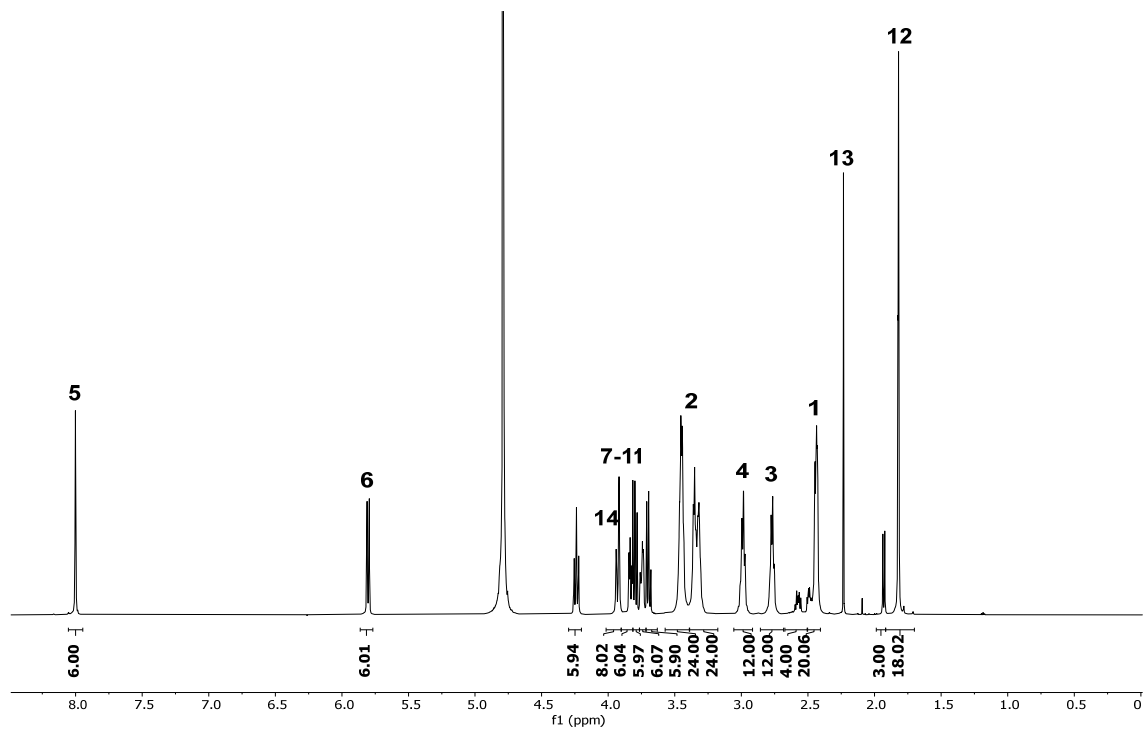


Abbildung 56: ¹H-NMR (600 MHz, D₂O) Von Glycoligomer **O10**.

¹H-NMR

¹H-NMR (600 MHz, D₂O): δ [ppm] = 1,82 (s, 18H, H-12); 1,92 & 1,94 (2x s, 3H, H-13); 2,44 (m, 20H, H-1); 2,53-2,54 (m, 4 H, H1 C-terminus); 2,76 (m, 12H, H-3); 2,98 (m, 12H, H-4); 3,25-3,52 (m, 48H, H-2); H-7/8/9: 3,70 (m, 2H), 3,80 (dd, ³J_{HH} = 8,9 & 10,0 Hz, 2H), & 4,24 (m, 2H); 3,75 (ddd, 2H, H-10, J [Hz]: H_{10-11a} = 2,2, H_{10-11b} = 4,8, H₉₋₁₀ = 9,5); 3,83 (dd, 2H, H-11a, J [Hz]: H_{11a-11b} = -12,5, H_{11a-10} = 4,8); 3,92 (s, 2H, H-14) 3,93 (dd, 2H, H-11b, J [Hz]: H_{11a-11b} = -12,5, H_{11b-10} = 2,2); 5,80 (d, ³J_{HH} = 9,7 Hz, 6H, H-6); 8,00 (s, 6H, H-5),

Anmerkung: Zuckerprotonen 7-9 konnten aufgrund nicht zuordenbarer J-Werte nicht klar differenziert bewertet werden.

HRMS

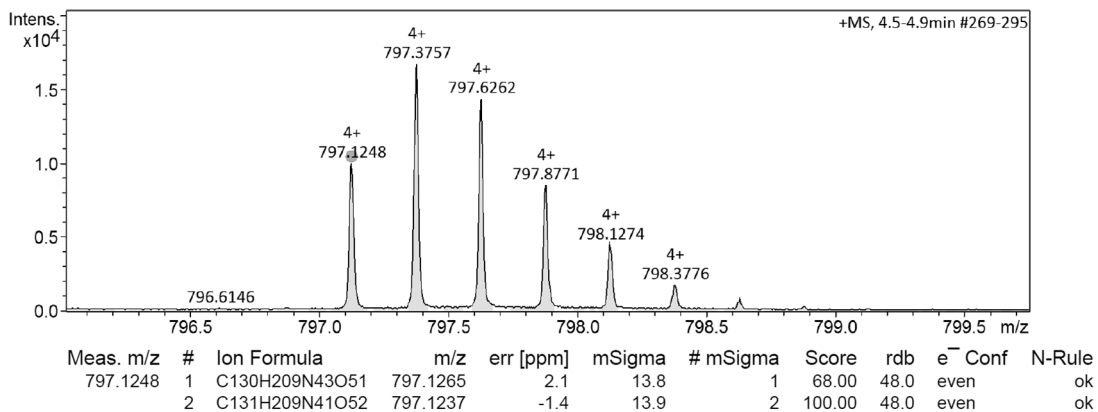


Abbildung 57: UHR-MS von Glycoligomer O10 [M+4H]⁴⁺.

ESI-MS

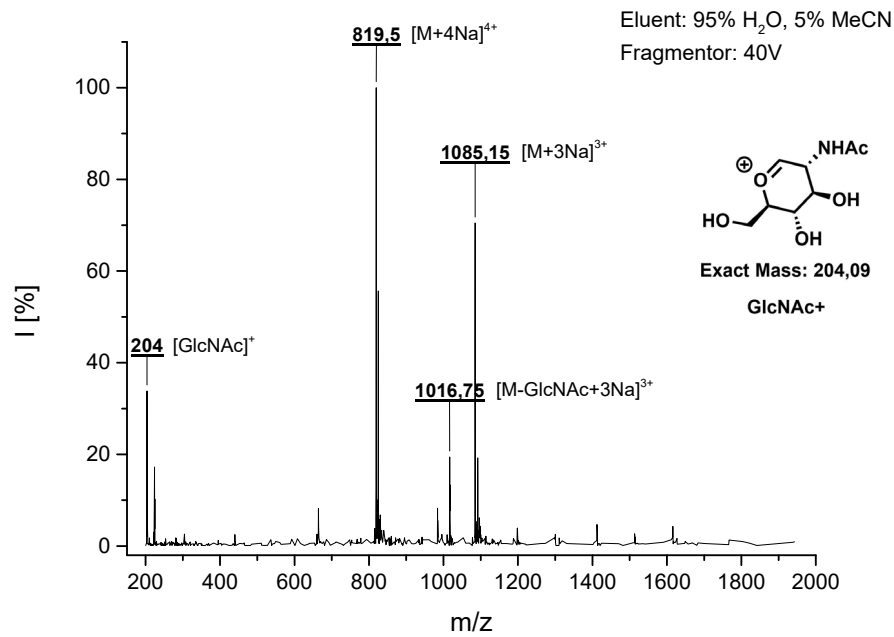


Abbildung 58: ESI-MS von Glycooligomer O10.

RP-HPLC

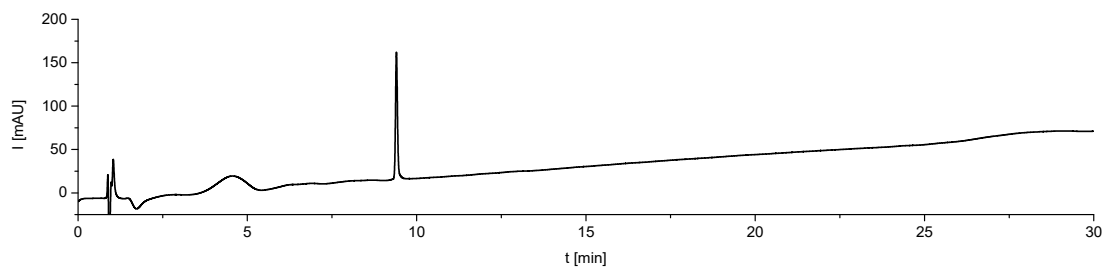
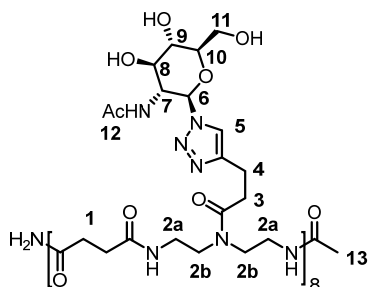


Abbildung 59: RP-HPLC von Verbindung O10. Bedingungen. MeCN (5% in Wasser) zu MeCN (50% in Wasser), 0,1% Ameisensäure in 30 Minuten. Variabler Wellenlängendetektor (VWD) 214 nm. Relative Reinheit >95 %.

5.2.2.11 (1-8)-GlcNAc-(8)-Amid (**O11**)

Verbindung **O11** wurde durch präparative RP-HPLC aufgereinigt und nach Entfernung des RP-HPLC Eluenten (*in vacuo*) und Zugabe von 1 ml MilliQ-Wasser gefriergetrocknet. Die Gesamtausbeute betrug 82 mg (39,5%). Präparative RP-HPLC-Bedingungen: 10-12.5% MeCN (H₂O, 0.1% Ameisensäure) in 10 min.

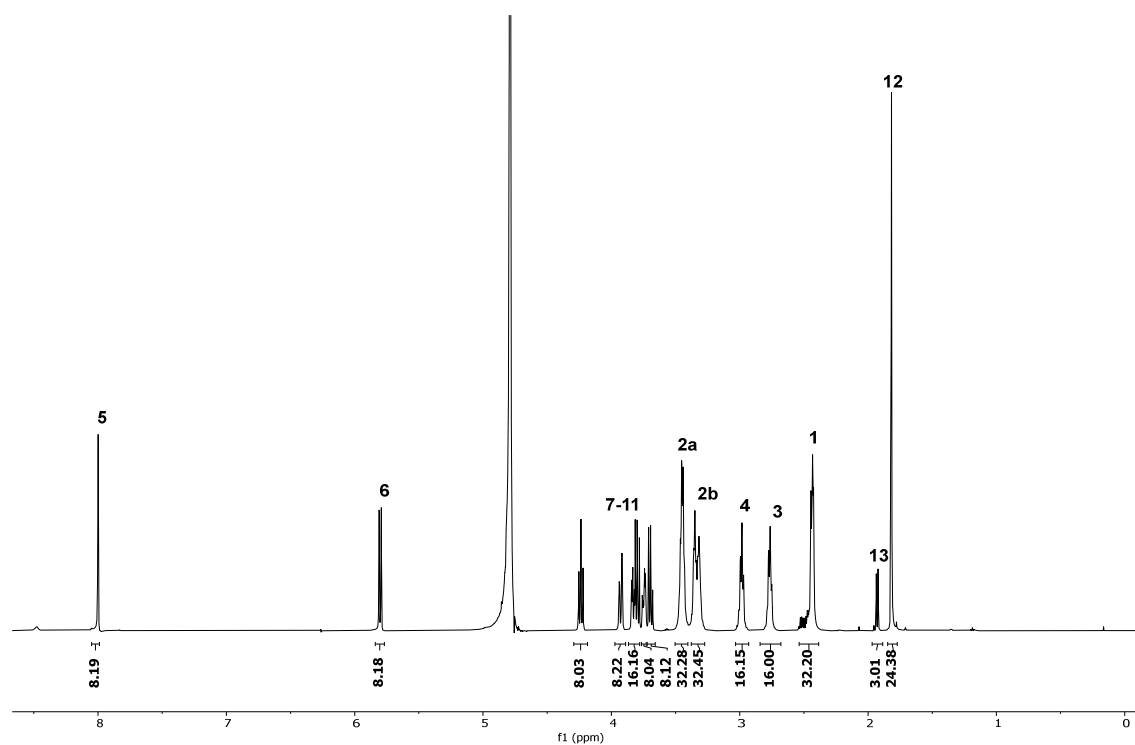


Abbildung 60: ¹H-NMR (600 MHz, D₂O) Von Verbindung **O11**.

¹H-NMR

¹H-NMR (600 MHz, D₂O): δ [ppm] = 1,82 (s, 24H, H-12); 1,92 & 1,94 (2x s, 3H, H-13); 2,43 (m, 32H, H-1); 2,76 (m, 16H, H-3); 2,98 (m, 16H, H-4); 3,27-3,40 (m, 32H, H-2b); 3,40-3,52 (m, 32H, H-2a); H-7/8/9: 3,69 (m, 2H), 3,80 (dd, ³J_{HH} = 8,9 & 10,0 Hz, 2H), & 4,24 (m, 2H); 3,74 (ddd, 2H, H-10, J [Hz]: H_{10-11a} = 2,2, H_{10-11b} = 5,0, H₉₋₁₀ = 9,6); 3,83 (dd, 2H, H-11a, J [Hz]: H_{11a-11b} = -12,5, H_{11a-10} = 5,0); 3,92 (s, 2H, H-14) 3,93 (dd, 2H, H-11b, J [Hz]: H_{11a-11b} = -12,5, H_{11b-10} = 2,2); 5,80 (d, ³J_{HH} = 9,7 Hz, 6H, H-6); 8,00 (s, 8H, H-5).

Anmerkung: Zuckerprotonen 7-9 konnten aufgrund nicht zuordenbarer J-Werte nicht klar differenziert bewertet werden.

HRMS

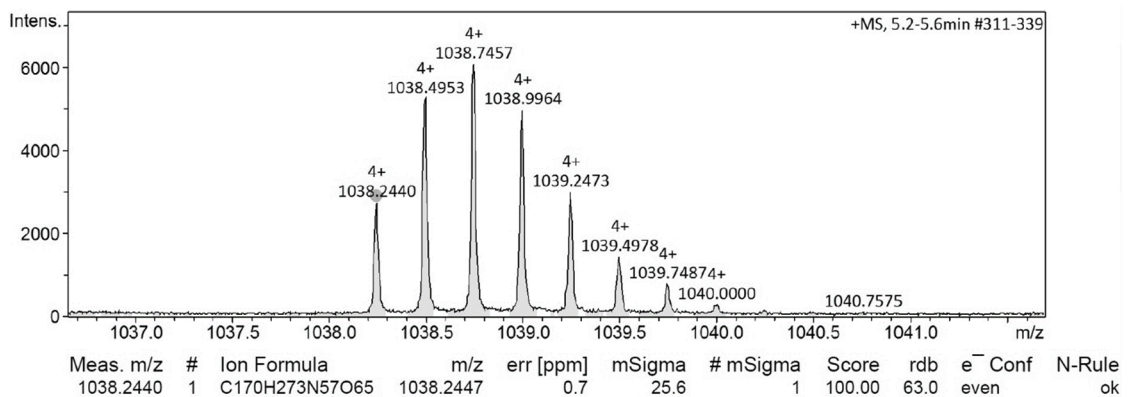


Abbildung 61: UHR-MS von Glycooligomer **O11** [M+4H]⁴⁺.

ESI-MS

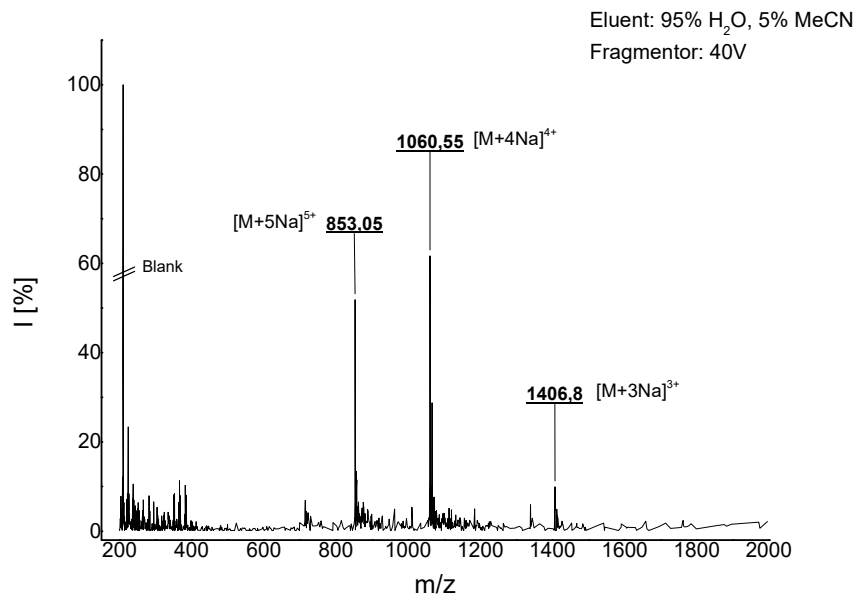


Abbildung 62: ESI-MS von Glycooligomer O11.

RP-HPLC

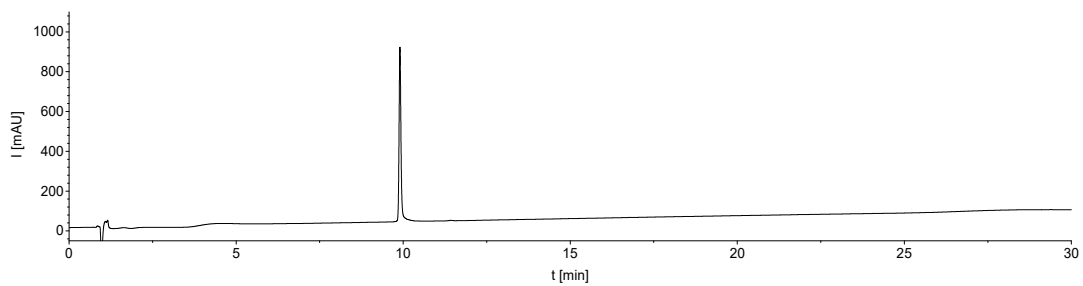
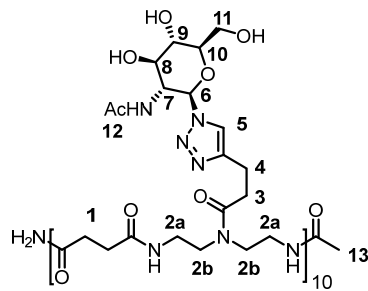


Abbildung 63: RP-HPLC von Verbindung O11. Bedingungen. MeCN (5% in Wasser) zu MeCN (50% in Wasser), 0,1% Ameisensäure in 30 Minuten. Variabler Wellenlängendetektor (VWD) 214 nm. Relative Reinheit >95 %.

5.2.2.12 (1-10)-GlcNAc-(10)-Amid (**O12**)

Verbindung **O12** wurde durch präparative RP-HPLC aufgereinigt und nach Entfernung des RP-HPLC Eluenten (*in vacuo*) und Zugabe von 1 ml MilliQ-Wasser gefriergetrocknet. Die Gesamtausbeute betrug 96 mg (32%). Präparative RP-HPLC-Bedingungen: 10-12.5% MeCN (H₂O, 0.1% Ameisensäure) in 10 min.

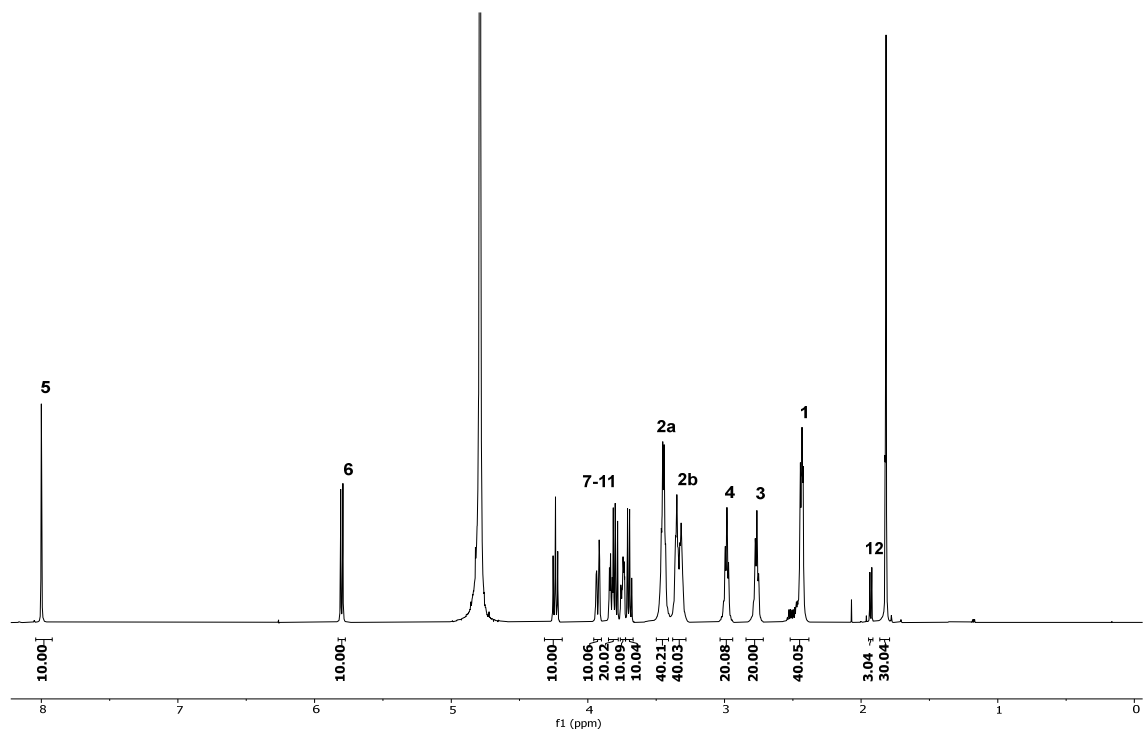


Abbildung 64: ¹H-NMR (600 MHz, D₂O) Von Verbindung **O12**.

¹H-NMR

¹H-NMR (600 MHz, D₂O): δ [ppm] = 1,82 (s, 30H, H-12); 1,92 & 1,94 (2x s, 3H, H-13); 2,43 (m, 40H, H-1); 2,76 (m, 20H, H-3); 2,98 (m, 20H, H-4); 3,27-3,40 (m, 40H, H-2b); 3,40-3,52 (m, 40H, H-2a); H-7/8/9: 3,69 (m, 2H), 3,80 (dd, ³J_{HH} = 9,0 & 10,1 Hz, 2H), & 4,24 (m, 2H); 3,74 (ddd, 2H, H-10, J [Hz]: H_{10-11a} = 2,3, H_{10-11b} = 5,0, H₉₋₁₀ = 9,7); 3,83 (dd, 2H, H-11a, J [Hz]: H_{11a-11b} = -12,8, H_{11a-10} = 5,0); 3,92 (s, 2H, H-14) 3,93 (dd, 2H, H-11b, J [Hz]: H_{11a-11b} = -12,8, H_{11b-10} = 2,3); 5,80 (d, ³J_{HH} = 9,5 Hz, 6H, H-6); 8,00 (s, 8H, H-5).

Anmerkung: Zuckerprotonen 7-9 konnten aufgrund nicht zuordenbarer J-Werte nicht klar differenziert bewertet werden.

HRMS

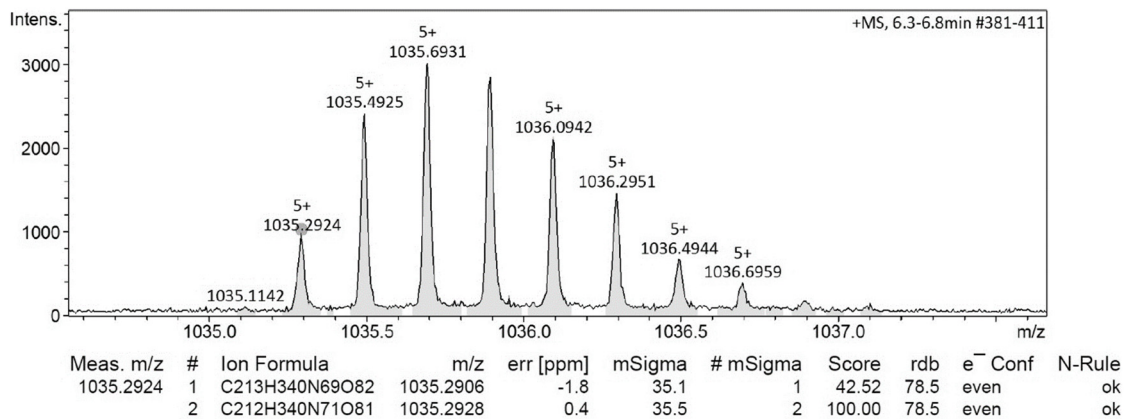


Abbildung 65: UHR-MS von Glycooligomer O12 [M+5H]⁵⁺.

ESI-MS

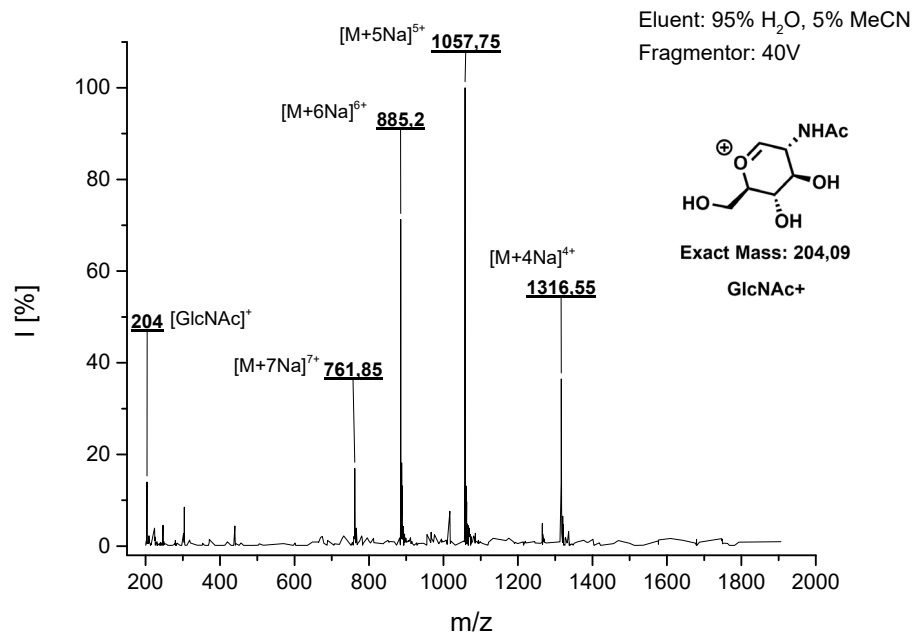


Abbildung 66: ESI-MS von Glycoligomer O12.

RP-HPLC

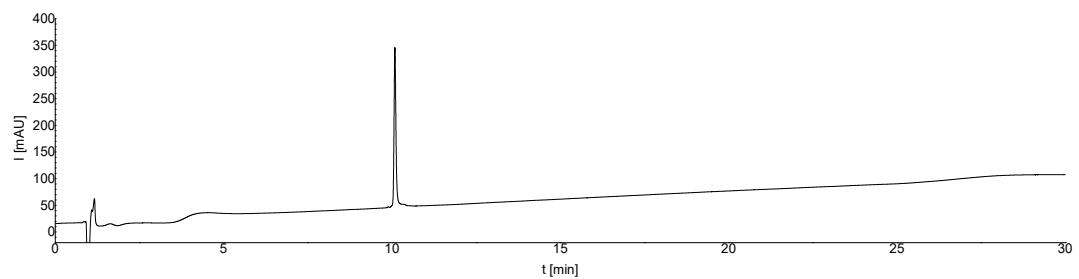
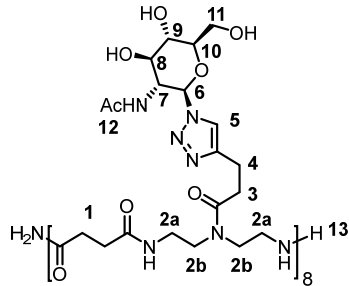


Abbildung 67: RP-HPLC von Verbindung O12. Bedingungen. MeCN (5% in Wasser) zu MeCN (50% in Wasser), 0,1% Ameisensäure in 30 Minuten. Variabler Wellenlängendetektor (VWD) 214 nm. Relative Reinheit >95 %.

5.2.2.13 NH₂-(1-8)-GlcNAc-(8)-Amid (**O13**)

Verbindung **O13** wurde nach der letzten Fmoc-Entschützung nicht mit Essigsäureanhydrit gekappt, wodurch sie ein freies Amin erhält. Verbindung **O13** wurde durch präparative RP-HPLC aufgereinigt und nach Entfernung des RP-HPLC Eluenten (*in vacuo*) und Zugabe von 1 ml MilliQ-Wasser gefriergetrocknet. Die Gesamtausbeute betrug 40 mg (38,5%). Präparative RP-HPLC-Bedingungen: 10-12.5% MeCN (H₂O, 0.1% Ameisensäure) in 10 min.

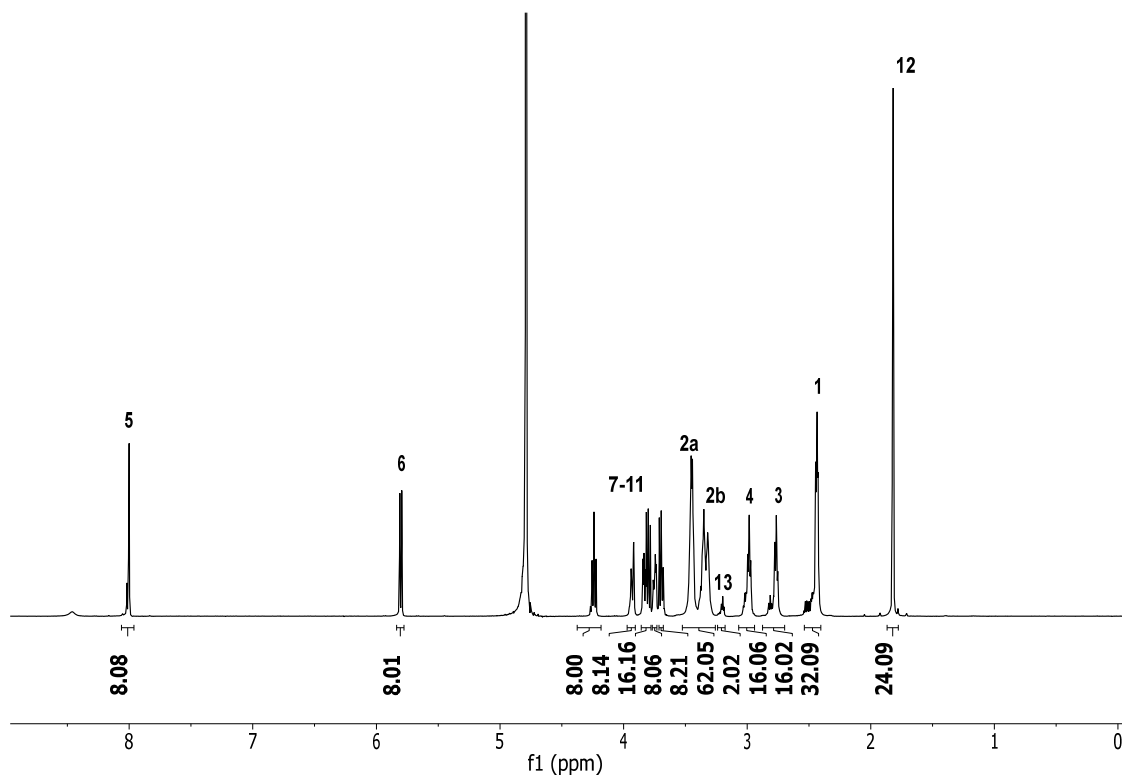


Abbildung 68: ¹H-NMR (600 MHz, D₂O) Von Verbindung **O13**.

¹H-NMR

¹H-NMR (600 MHz, D₂O): δ [ppm] = 1,82 (s, 24H, H-12); i2,43 (m, 32H, H-1); 2,76 (m, 16H, H-3); 2,98 (m, 16H, H-4); 3,20 (t, 2H, H-13); 3,27-3,40 (m, 32H, H-2b); 3,40-3,52 (m, 32H, H-2a); H-7/8/9: 3,69 (m, 2H), 3,80 (dd, ³J_{HH} = 8,9 & 10,0 Hz, 2H), & 4,24 (m, 2H); 3,74 (ddd, 2H, H-10, J [Hz]: H_{10-11a} = 2,2, H_{10-11b} = 5,0, H₉₋₁₀ = 9,6); 3,83 (dd, 2H, H-11a, J [Hz]: H_{11a-11b} = -12,5, H_{11a-10} = 5,0); 3,92 (s, 2H, H-14) 3,93 (dd, 2H, H-11b, J [Hz]: H_{11a-11b} = -12,5, H_{11b-10} = 2,2); 5,80 (d, ³J_{HH} = 9,7 Hz, 6H, H-6); 8,00 (s, 8H, H-5).

Anmerkung: Zuckerprotonen 7-9 konnten aufgrund nicht zuordenbarer J-Werte nicht klar differenziert bewertet werden.

ESI-MS

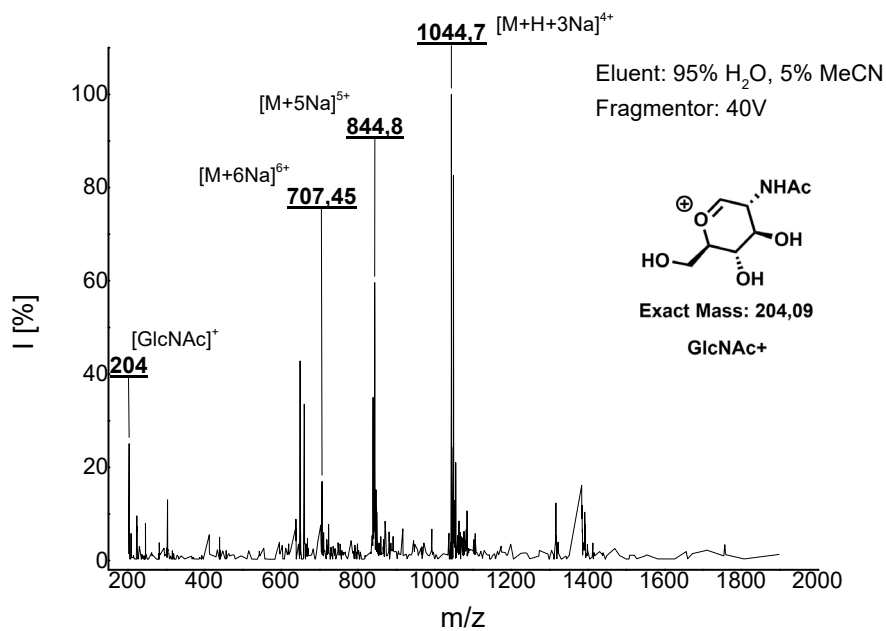


Abbildung 69: ESI-MS von Glycooligomer O13.

RP-HPLC

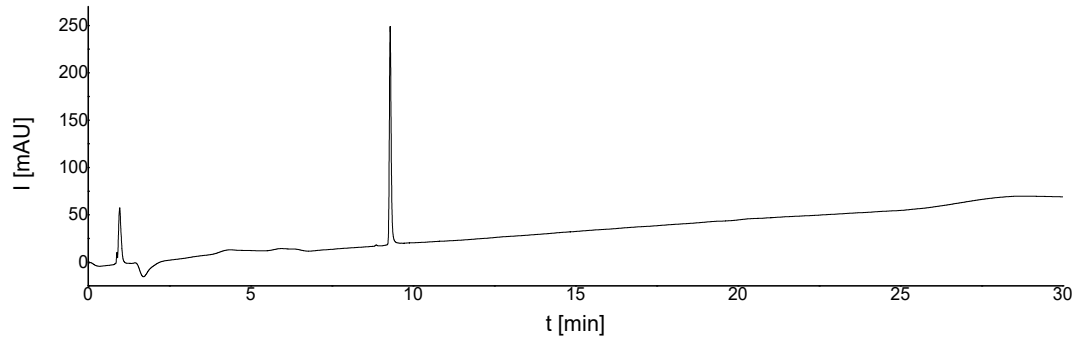


Abbildung 70. RP-HPLC von Verbindung **O13**. Bedingungen. MeCN (5% in Wasser) zu MeCN (50% in Wasser), 0,1% Ameisensäure in 30 Minuten. Variabler Wellenlängendetektor (VWD) 214 nm. Relative Reinheit >95 %.

5.2.3 Sulfatisierungen an der Festphase

Tabelle 10: Verschiedene Sulfatisierungs- und Abspaltbedingungen an der Festphase

#	Oligomer	Harz	Sulfatisierungsbedingungen	Abspaltbedingungen
1	O3	H-Gly-2CT	0,05 mmol O3-modifiziertes Harz, 3,5 g DMF*SO ₃ in 10 ml DMF	Rote Färbung während der Reaktion, kein Reaktionsprodukt ^b
2	O9	TG® S RAM	20 mg (5 µmol) O9-modifiziertes Harz, 126 mg TMA*SO ₃ in 1,1 ml DMF, 18h bei 70 °C, 10% NaOAc (aq.) 3x 5 ml 10% TBACl (aq.)	5% TiPS / 5% DCM / 90% TFA 30 min bei 0 °C Ausfällen in Diethylether (-20 °C)

(b) Nach dem Abspalten konnte im beschriebenen Medium kein Produkt ausgefällt werden.

Die in **Tabelle 10** gezeigten Ansätze wurden in BD-Filterspritzen durchgeführt. Das jeweilige Gemisch der Sulfatisierungsbedingungen wurde direkt auf das sich in der Spritze befindliche Oligomer-modifizierte Harz aufgezogen. Nach der Reaktion wurde das Harz mit DMF und DCM (#1), beziehungsweise Wasser, DMF und DCM (#2) gewaschen, bevor das Abspaltreagenz (#1: 2 ml; #2: < 0,5 ml) ebenfalls direkt aufgezogen wurde. Nach der Abspaltung wurde das Gemisch im beschriebenen Medium ausgefällt.

¹H-NMR

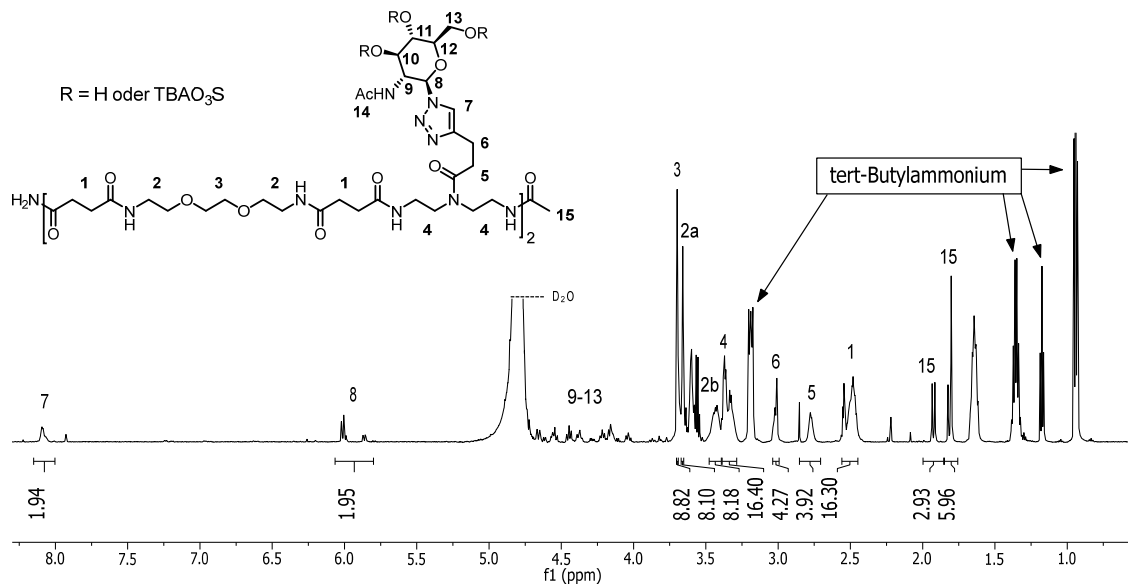


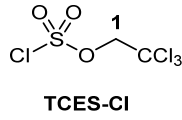
Abbildung 71: ¹H-NMR (600 MHz, D₂O) von Ansatz #2 der Festphasensulfatisierung von O9.

ESI-MS

Tabelle 11: ESI-MS-Werte aus Ansatz #2 der Festphasensulfatisierung von O9.

Sulfatisierungsgrad	m/z theoretisch	m/z gefunden
6x	[M-6TBA] ⁶⁻ = 335,9	336,2
5x	[M-5TBA] ⁵⁻ = 387,3	387,4
4x	[M-4TBA] ⁵⁻ = 464,4	464,6
3x	[M-3TBA] ³⁻ = 592,9	593,0
2x	[M-2TBA] ²⁻ = 849,8	850,6

5.2.3.1 Synthese von Trichloroethylchlorosulfat (TCES-Cl)



Trichloroethylchlorosulfat (TCES-Cl) wurde nach einem bekannten Verfahren von Warabi et al. synthetisiert.^[162]

NMR

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 4,92 (s, 2H, H-1).

¹³C-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 81,3 (s); 91,3 (s)

5.2.3.2 Experimente mit TCES-Cl an GlcNAc-modifizierten Oligomeren

Tabelle 12: Festphasen-Experimente mit TCES-Cl an Oligomer-modifizierten Harzen.

#	Oligomer	Harz	Sulfatisierungsbedingungen	Abspaltbedingungen
1	O1	TG® S RAM	227 mg (50 µmol) O1 -modifiziertes Harz, 1,5 Äq. DABCO und 1,5 Äq. TCES-Cl pro OH-Gruppe, RT, über Nacht	95% TFA / 2,5% TIPS / 2,5% DCM 60 min bei RT Ausfällen in Diethylether (-20 °C)
2	O4	TG® S RAM	Siehe Ansatz #1	Siehe Ansatz #1
3	O5	TG® S Trt-EDA	100 mg (25 µmol) O5 -modifiziertes Harz Weiter: siehe Ansatz #1	5% TFA / 5% TIPS / 95% DCM 60 min bei RT Ausfällen in Diethylether (-20 °C)
4	O6	H-Gly-2CT	Siehe Ansatz #1 Vorher: 3 Äq. GlcNAc-N3 (2) pro Alkin, 1,3 Äq. Na-Ascorbat pro Zucker, 1,3 Äq. Cu(II)SO ₄ pro Zucker in DMF/Wasser 50:50 (vgl. Abschnitt zur Klickreaktion an der Festphase 5.2.2)	1% TFA / 1% TIPS / 98% DCM 60 min bei RT Kein Ausfall in Diethylether (-20 °C) 50% AcOH / 50% Trifluoroethanol 60 min bei RT Kein Ausfall in Diethylether (-20 °C)

Die in **Tabelle 12** gezeigten Ansätze wurden in BD-Filterspritzen durchgeführt. Das jeweilige Gemisch der Sulfatisierungsbedingungen wurde direkt auf das sich in der Spritze befindliche Oligomer-modifizierte Harz aufgezogen. Nach der Reaktion wurde das Harz abwechselnd mit vollen Spritzenvolumina DCM, gesättigtes Bicarbonat, Wasser, Methanol, DCM gewaschen, bevor 4 ml Abspaltreagenz ebenfalls direkt aufgezogen wurden. Nach der Abspaltung wurde das Gemisch im beschriebenen Medium ausgefällt.

RP-HPLC

Die RP-HPLC Chromatogramme der Ansätze #1 und #2 zeigten eine Vielzahl nicht zuordenbarer Signale zwischen 4 und 7 Minuten, wie in **Abbildung 72** am Beispiel des Ansatzes #2 zu sehen. Bei der RP-HPLC von Ansatz #3 konnte lediglich das nicht umgesetzte Oligomer O5 detektiert werden.

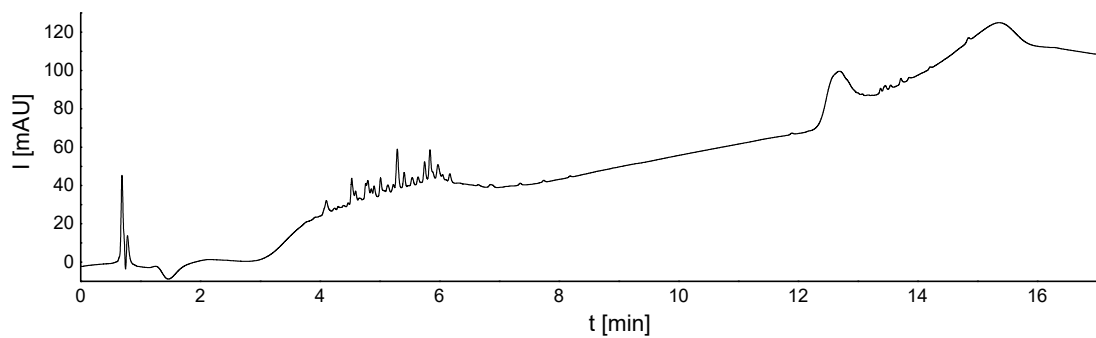


Abbildung 72: RP-HPLC (5-95% Acetonitril, 0,1% Ameisensäure in 10 min) von Ansatz #2 der **TCES-Cl**-Umsetzung mit Oligomer **O4**.

5.2.3.3 Versuch der Umsetzung von GlcNAc-N3 (**2**) mit TCES-Cl

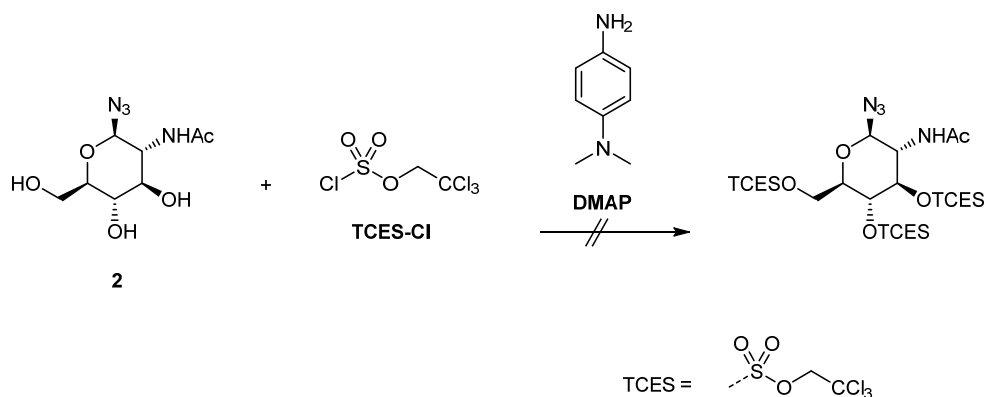


Abbildung 73: Geplante Umsetzung von **2** mit **TCES-Cl**.

Zur Einführung der Sulfatschutzgruppe TCES am azidierten GlcNAc wurden 50 mg **2** (0,2 mmol) und 700 mg DMAP (5,1 mmol) in 2 ml DCM unter Eiskühlung gelöst. Nach Zugabe von 0,5 ml TCES-Cl (5,1 mmol) wurde das Gemisch über Nacht gerührt. Es bildete sich ein weißer

Niederschlag, welcher sich durch $^1\text{H-NMR}$ - (Abbildung 74) und ESI-MS-Untersuchungen (Abbildung 75) als ein DMAP-TCES-Addukt herausstellte.

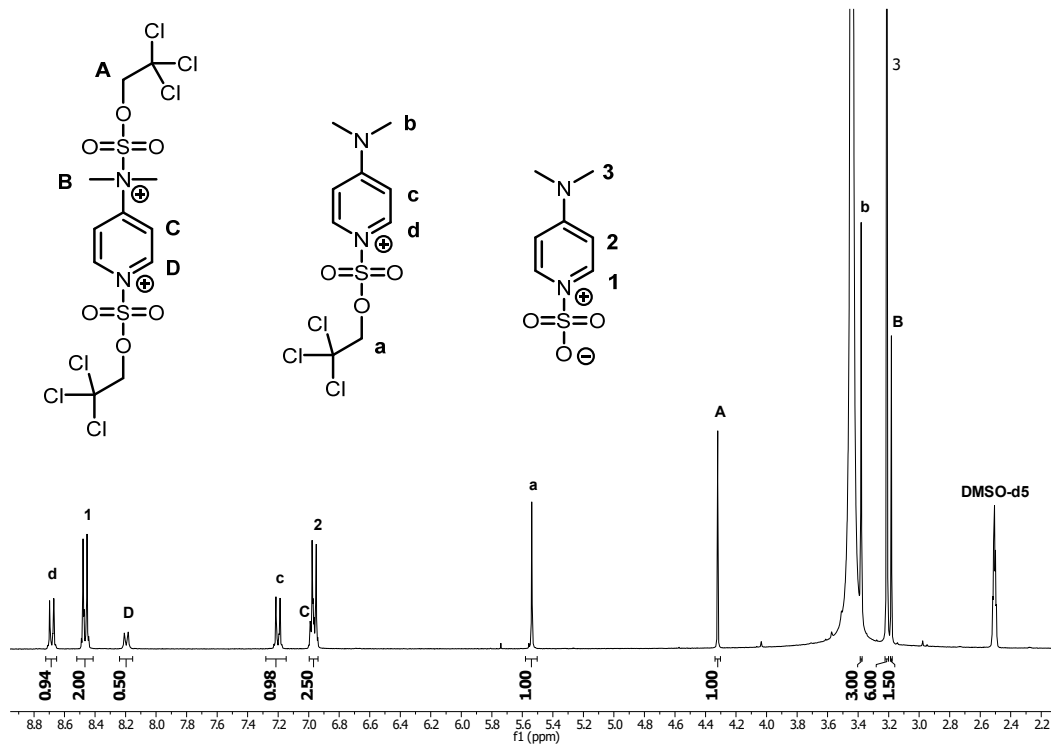


Abbildung 74: $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) der DMAP-TCES-Addukte aus der Umsetzung von **2** mit TCES-Cl.

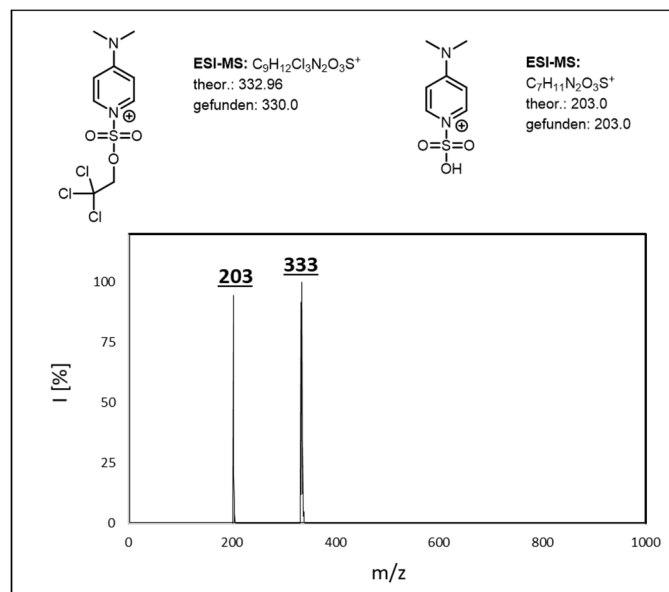


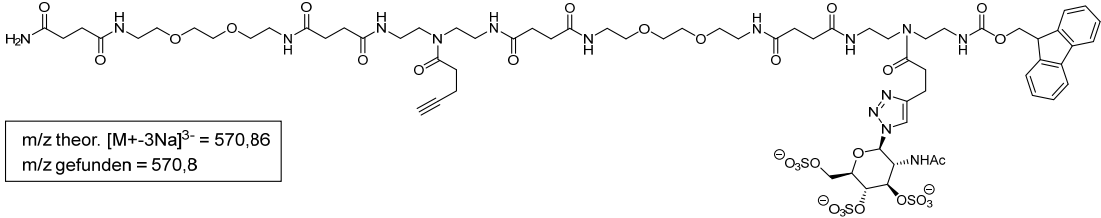
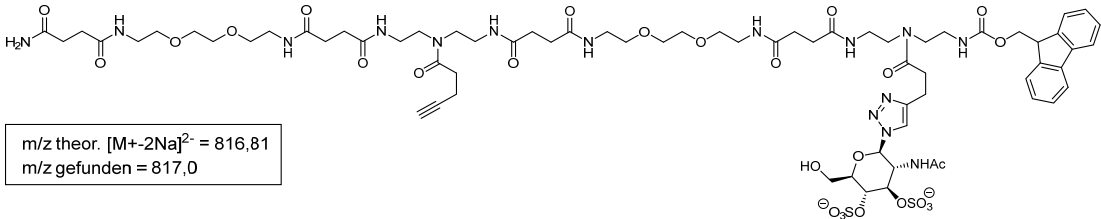
Abbildung 75: ESI-MS-Spektrum der DMAP-TCES-Addukte aus der Umsetzung von **2** mit TCES-Cl.

5.2.4 Sulfatisierungen in Lösung

5.2.4.1 Klickreaktion von **O7** mit sulfatisiertem GlcNAc-Azid (**3**)

6,9 mg **O7** (9,4 μmol) wurden in einem 10 ml Glasrohr mit Septum in 100 μl DMF gelöst. Unter Rühren und Stickstoffatmosphäre wurden 20 mg **3** (Stöchiometrie aufgrund von Salzgehalt nicht nachvollziehbar), gelöst in 500 μl DMF/Wasser (1:4) zugegeben, sodass sich eine klare Lösung ausbildete. 5 mg (31,3 μmol) Cu(II)SO_4 und 6 mg (31,3 μmol) Na-Ascorbat wurden, gelöst in 200 μl Wasser, zu dem Gemisch gegeben. Die orangene Suspension wurde 72h gerührt. Das Rohprodukt wurde direkt durch eine Spectrapor® float-a-lyzer 0,1-0,5 kDA Membran dialysiert. Dreimal wurde Wasser ausgetauscht. Das gefriergetrocknete Produkt (2,7 mg) wurde einer Elementaranalyse unterzogen.

Tabelle 13: Gefundene Massen aus der ESI-MS der Umsetzung von **O7** mit **3**.

Strukturen	
	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content;"> m/z theor. $[\text{M}+3\text{Na}]^{3-} = 570,86$ m/z gefunden = 570,8 </div>
	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content;"> m/z theor. $[\text{M}+2\text{Na}]^{2-} = 816,81$ m/z gefunden = 817,0 </div>

5.2.4.2 Klickreaktion von **O8** mit sulfatisertem GlcNAc-Azid (**3**)

In einem 10 ml Glasrohr mit Septum wurden 10 mg (5,9 μmol) **O8** und das Rohprodukt aus einer Synthese von **3** mit einem Ansatz von 100 mg (0,406 mmol) **2** nach Aufarbeitung mit 10-%iger Bicarbonatlösung (siehe Abschnitt 5.2.1.3) wurden in 0,5 ml DMF und 2,4 ml Wasser gelöst unter starkem Rühren wurden 42 mg (263 μmol) Cu(II)SO_4 und 52 mg (263 μmol) Na-Ascorbat in 0,8 ml Wasser zugegeben. Die orangene Dispersion wurde über Nacht gerührt. Anschließend wurden 594 mg (2,63 mmol) Natriumdiethyldithiocarbamat zugegeben. Die tiefbraune Lösung wurde für eine Stunde gerührt. Das Rohgemisch wurde durch 2 x 2 ml Spintubes (MWCO: 2000 Da) für 90 Minuten bei 4400 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Nach Gefriertrocknung blieb ein leicht braunes Pulver mit sehr geringer Ausbeute zurück (< 1 mg).

$^1\text{H-NMR}$

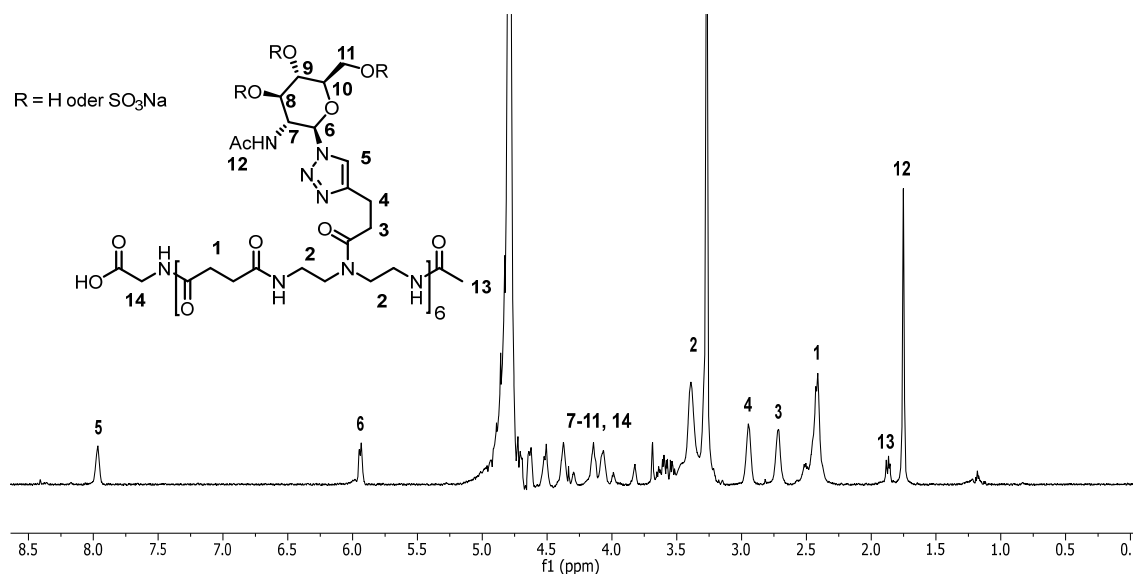
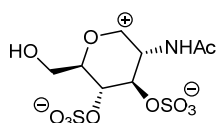
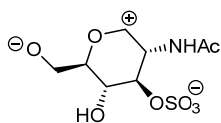


Abbildung 76: $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O) des Produktes aus der Umsetzung von **O8** mit **3** in Lösung.

ESI-MS



m/z theor. $[\text{M}+2\text{Na}]^{2-} = 361,99$
 m/z gefunden = 362,0



m/z theor. $[\text{M}+2\text{Na}]^{2-} = 282,03$
 m/z gefunden = 282,0

5.2.4.3 Sulfatisierungen mit Trimethylamin-Schwefeltrioxid

Die Reaktionsbedingungen der Sulfatisierungen sind in TAB zu sehen. Die Glycooligomere **O9**, **O10**, **O11** und **O12** wurden jeweils mit TMA*SO₃ in trockenem DMF gelöst (8,65 ml/g TMA*SO₃). Die jeweilige Mischung wurde unter verschiedenen Bedingungen unter Stickstoffatmosphäre gerührt (TAB). Im Anschluss an die Reaktion wurde die Mischung zu einer 10 %-igen Natriumacetatlösung in Wasser (10 Äq. zu TMA*SO₃) gegeben und konzentriert (60 °C, 15 mbar). Das Rohprodukt wurde durch Dialyse aufgereinigt und gefriergetrocknet.

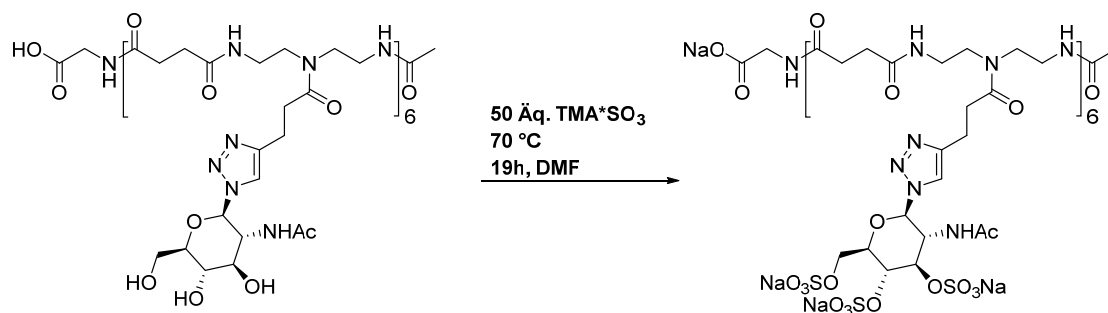


Abbildung 77: Sulfatisierungsbedingung am Beispiel der Sulfatisierung von **O10**.

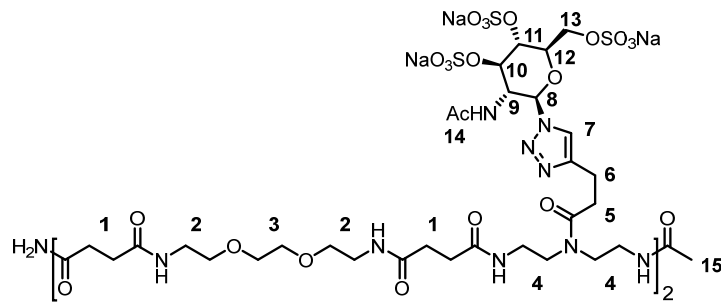
Tabelle 14: Sulfatisierungsbedingungen zur Synthese von sulfatisierten Glycooligomeren.

Struktur	Verwendetes GlcNAc-Oligomer	Äquivalente ^a TMA*SO ₃	Temperatur [°C]	Zeit [h]	d.S. ^b [%]
O9-S1	O9	40	60	115	> 99
O9-S2	O9	40	70	18	95.0
O9-S3	O9	40	70	18	98.5
O10-S	O10	50	70	19	98.7
O11-S	O11	40	70	18	89.9
O12-S	O12	40	70	18	85.2

(a) Äquivalente zu den OH-Gruppen des jeweiligen GlcNAc-Glycooligomers. (b) Der Sulfatisierungsgrad (degree of sulfation, ¹H-NMR, 600 MHz, D₂O) wurde durch das integrale Verhältnis des anomeren Signals der vollständig sulfatisierten GlcNAc-Oligomere (6,02 ppm) und der anomeren Signale durch unvollständig Sulfatisierung (< 6,02 ppm) bestimmt

5.2.4.4 EDS-(2,4)-GlcNAc(3-6S)-(4)-Amid (O9-S)

O9-S1



Verbindung **O9-S1** wurde aus **O9** (10 mg Ansatz) nach Dialyse und Gefriertrocknung mit einer Ausbeute von 2,0 mg (14,3 %) gewonnen.

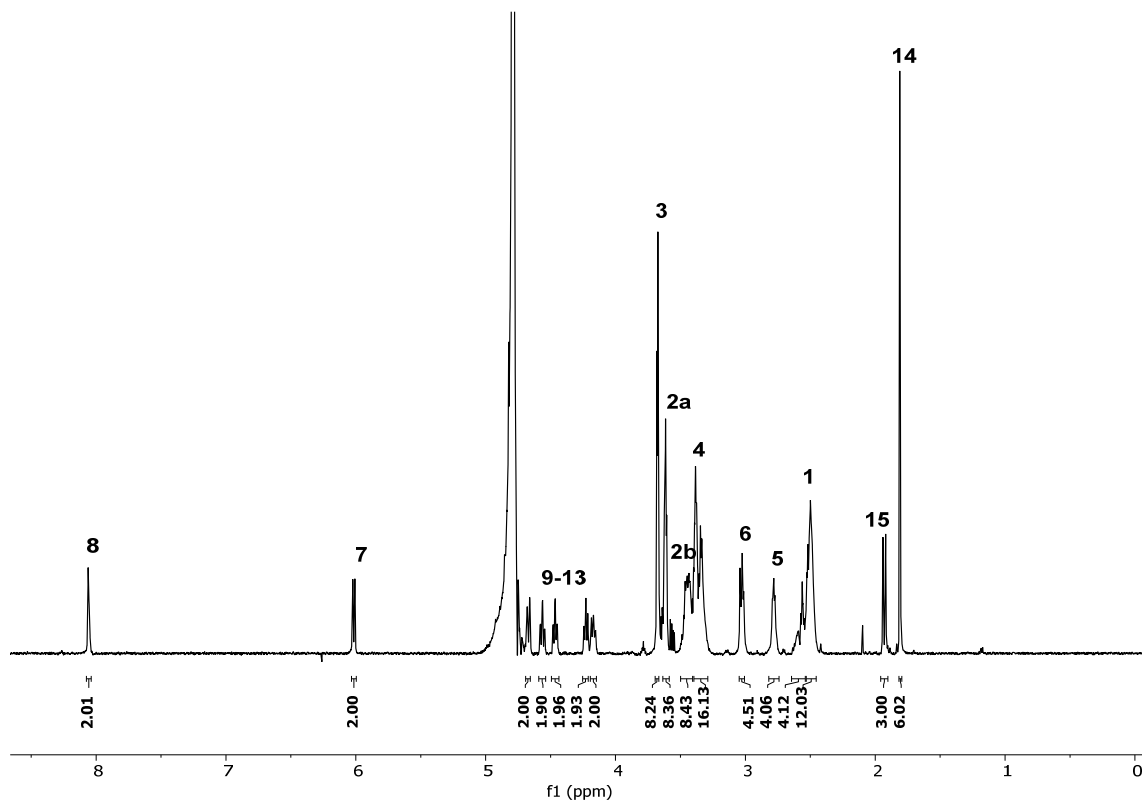


Abbildung 78: $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O) von **O9-S1**.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O): δ [ppm] = 1,81 (s, 6H, H-14); 1,92 & 1,94 (2x s, 3H, H-15); 2,40-2,53 (m, 12H, H-1); 2,52-2,66 (m, 4H, H-1 C-terminus); 2,78 (m, 4H, H-5); 3,03 (m, 4H, H-6); 3,26-3,40 (m, 16H, H-4); 3,40-3,52 (m, 8H, H-2b); 3,61 (m; 8H, H-2a); 3,67 (m, 8H, H-3); H-9-13: 4,17, 4,23, 4,47, 4,56 & 4,67 (5x m, 5x 2H); 6,02 (d, $^3J_{\text{HH}} = 9,8$ Hz, 2H, H-8); 8,06 (m, 2H, H-7).

Der Sulfatisierungsgrad wurde durch das Intensitätsverhältnisses der anomeren Signale bestimmt (H-8): >99% (keine weiteren anomeren Signale gefunden).

Anmerkung: Ein Signal der Zuckerringprotonen H-9 - H-11 wird unter dem von HDO verursachten Signal bei 4,79 ppm vermutet.

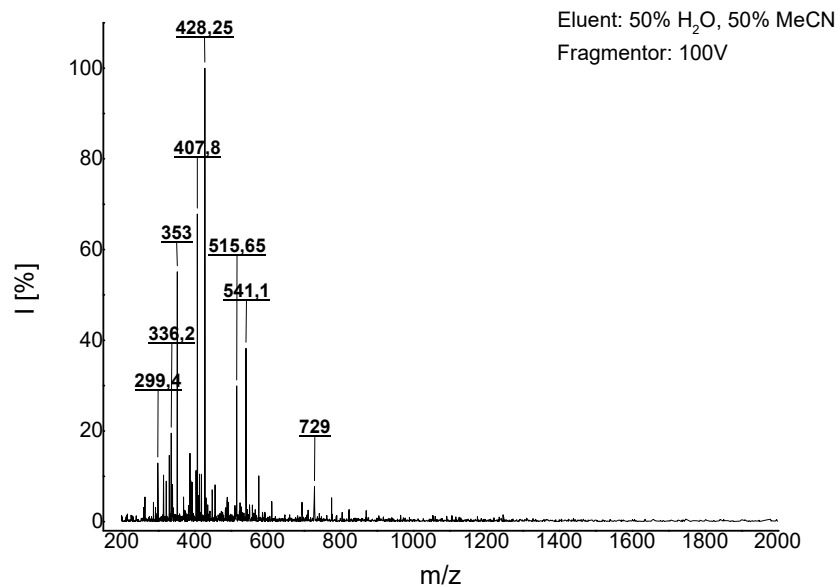


Abbildung 79: ESI-MS von O9-S1.

Tabelle 15: ESI-MS Signalzuordnung für O9-S1 aus Abbildung 79. Spuren von Sulfatisierungszahlen <6 können vereinzelt gefunden werden. Bei einer 7x Sulfatisierung wird womöglich das primäre Amid sulfatisiert.

7x sulfatisiert [C ₆₄ H ₁₀₀ N ₁₉ O ₄₆ S ₇ Na ₇]		6x sulfatisiert [C ₆₄ H ₁₀₁ N ₁₉ O ₄₃ S ₆ Na ₆]	
m/z theoretisch	m/z gefunden	m/z theoretisch	m/z gefunden
[M-7Na] ⁷⁻ = 299.2	299.4	[M-6Na] ⁶⁻ = 335.9	336.2
[M-6Na] ⁶⁻ = 352.9	353.0	[M-5Na] ⁵⁻ = 407.7	407.8
[M-5Na] ⁵⁻ = 428.1	428.3	[M-4Na] ⁴⁻ = 515.4	515.7
[M-4Na] ⁴⁻ = 540.8	541.1		
[M-3Na] ³⁻ = 728.8	729.0		

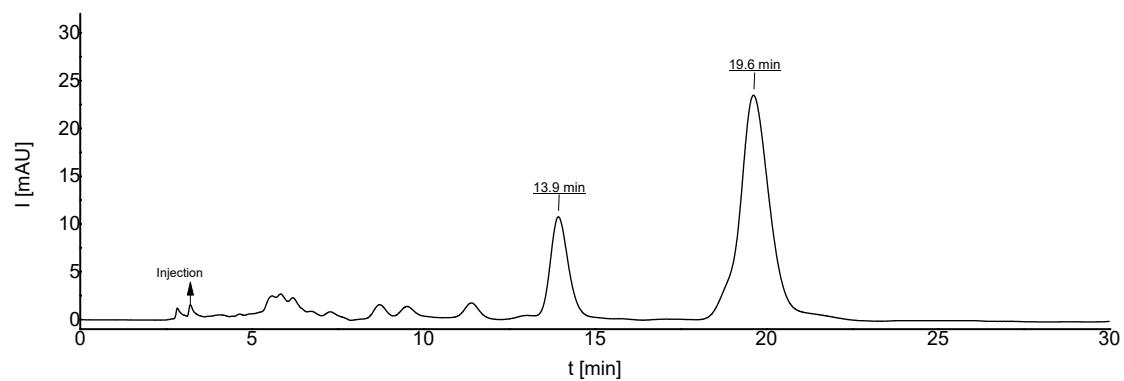


Abbildung 80: SAX-HPLC von **09-S1** (60 % MeCN, 40 % H₂O, Phosphatpuffer pH 7, isokratisch in 30 Minuten).

09-S2

Verbindung **09-S2** wurde aus **09** (20 mg Ansatz) nach Dialyse und Gefriertrocknung mit einer Ausbeute von 15,1 mg (51,5 %) gewonnen.

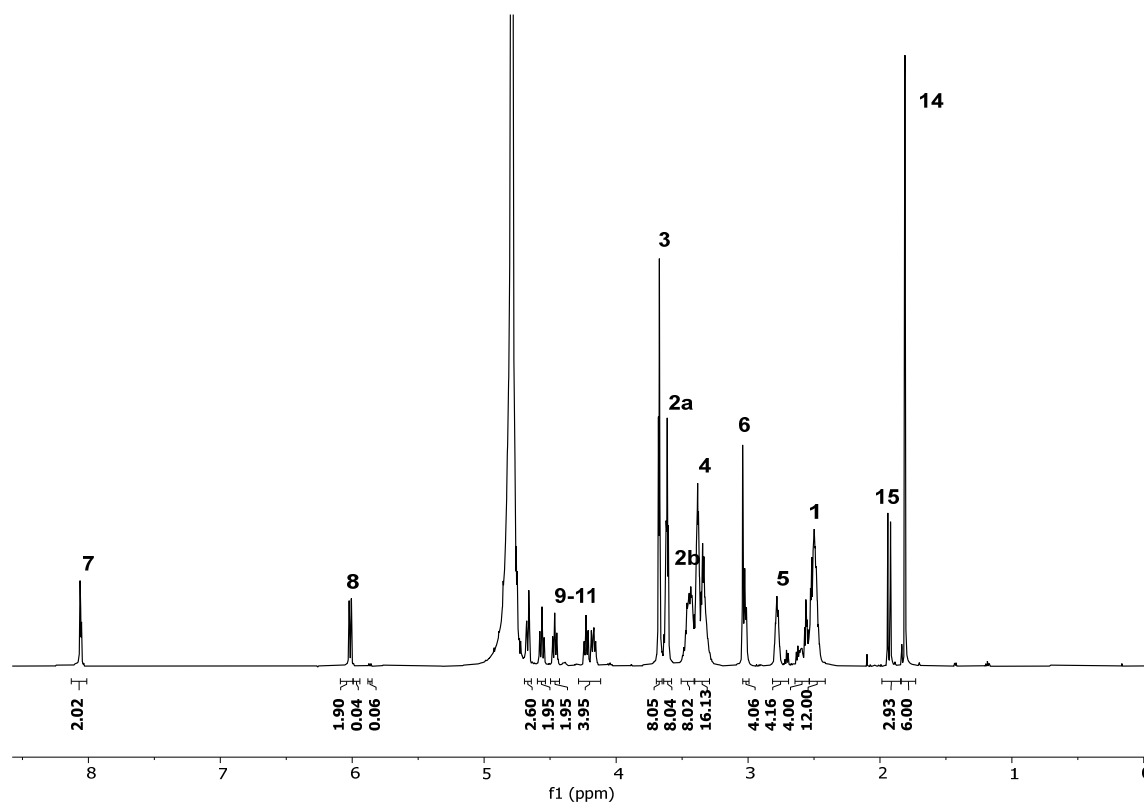


Abbildung 81: ¹H-NMR (600 MHz, D₂O) von **09-S2**.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O): δ [ppm] = 1,81 (s, 6H, H-14); 1,92 & 1,94 (2x s, 3H, H-15); 2,40-2,53 (m, 12H, H-1); 2,52-2,66 (m, 4H, H-1 *C-terminus*); 2,78 (m, 4H, H-5); 3,03 (m, 4H, H-6); 3,26-3,40 (m, 16H, H-4); 3,40-3,52 (m, 8H, H-2b); 3,61 (m; 8H, H-2a); 3,67 (m, 8H, H-3); H-9-13: 4,17, 4,23, 4,47, 4,56 & 4,67 (5x m, 5x 2H); 6,02 (d, $^3J_{\text{HH}} = 9,8$ Hz, 2H, H-8); 8,06 (m, 2H, H-7).

Der Sulfatisierungsgrad wurde durch das Intensitätsverhältnisses der anomeren Signale bestimmt (H-8): 95,0 %.

Anmerkung: Ein Signal der Zuckerringprotonen H-9 - H-11 wird unter dem von HDO verursachten Signal bei 4,79 ppm vermutet.

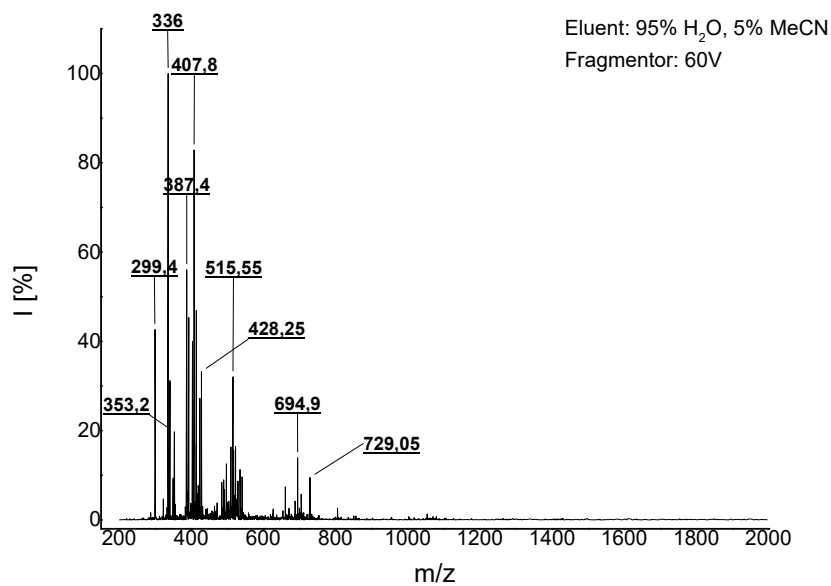


Abbildung 82: ESI-MS von O9-S2.

V - Experimenteller Teil

Table S4: ESI-MS assignment for structure O1-2 (Figure S22). 7x sulfation indicates the existence of an additional SO_3Na attachment.

Tabelle 16: ESI-MS Signalzuordnung für **O9-S2** aus Abbildung 82. Spuren von Sulfatisierungszahlen <5 können vereinzelt gefunden werden. Bei einer 7x Sulfatisierung wird womöglich das primäre Amid sulfatisiert.

7x sulfatisiert [C ₆₄ H ₁₀₀ N ₁₉ O ₄₆ S ₇ Na ₇]		6x sulfatisiert [C ₆₄ H ₁₀₁ N ₁₉ O ₄₃ S ₆ Na ₆]		5x sulfatisiert [C ₆₄ H ₁₀₂ N ₁₉ O ₄₀ S ₅ Na ₅]	
m/z theoretisch	m/z gefunden	m/z theoretisch	m/z gefunden	m/z theoretisch	m/z gefunden
[M-7Na] ⁷⁻ = 299.2	299.4	[M-6Na] ⁶⁻ = 335.9	336.0	[M-5Na] ⁵⁻ = 387.3	387.4
[M-6Na] ⁶⁻ = 352.9	353.2	[M-5Na] ⁵⁻ = 407.7	407.8		
[M-5Na] ⁵⁻ = 428.1	428.3	[M-4Na] ⁴⁻ = 515.4	515.6		
[M-4Na] ⁴⁻ = 540.8	541.1	[M-3Na] ³⁻ = 694.8	694.9		
[M-3Na] ³⁻ = 728.8	729.0				

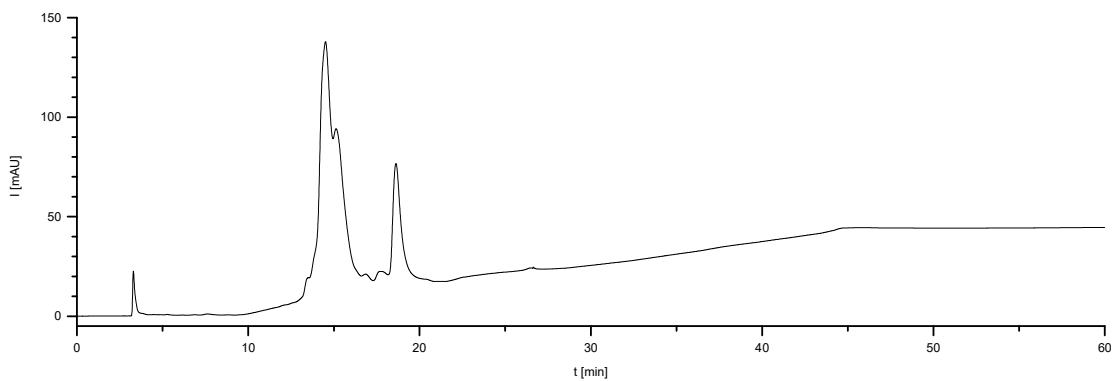


Abbildung 83: SAX-HPLC von **O9-S2** (0-5 min 40 mM NaCl, 1,5 % MeCN; 5-40 min linearer Gradient zu 30 % MeCN, 800 mM NaCl und 30 % MeCN; 40-60 min 800 mM NaCl und 30% MeCN um komplette Elution zu gewährleisten; Detektor: VWD 214 nm).

O1-3

Verbindung **O9-S3** wurde aus **O9** (40,9 mg Ansatz) nach Dialyse und Gefriertrocknung mit einer Ausbeute von 26,3 mg (46,0 %) gewonnen.

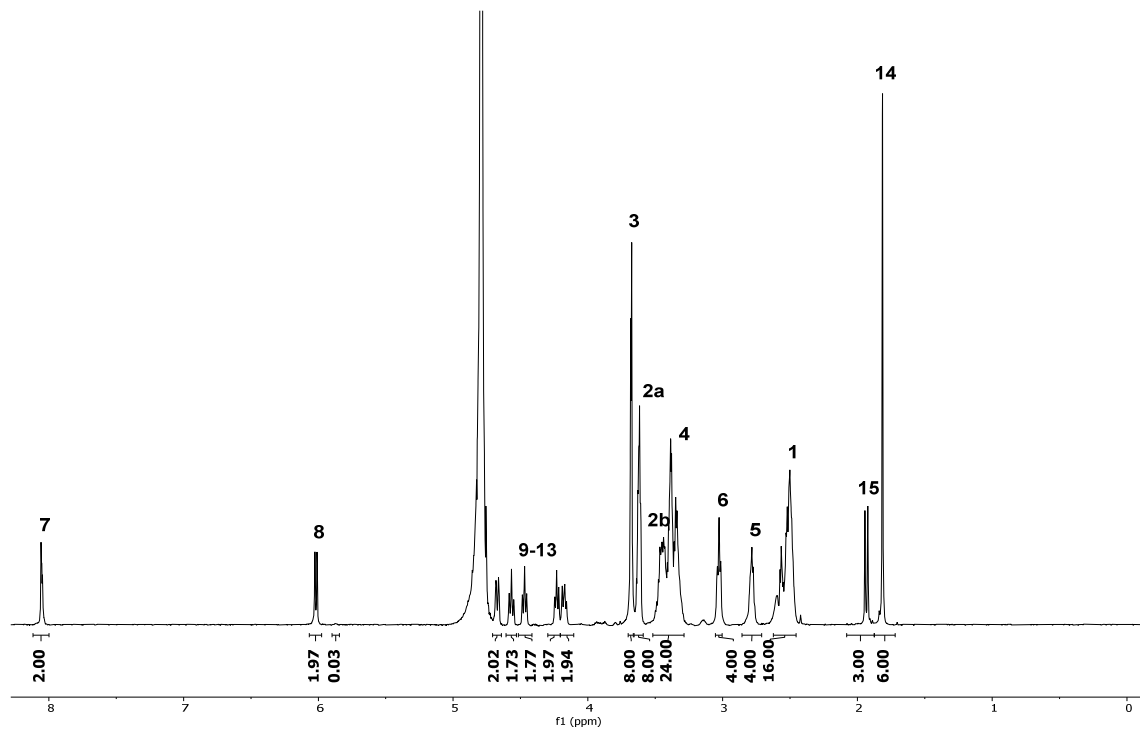


Abbildung 84: $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O) von **O9-S3**.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O): δ [ppm] = 1,81 (s, 6H, H-14); 1,92 & 1,94 (2x s, 3H, H-15); 2,40-2,53 (m, 12H, H-1); 2,52-2,66 (m, 4H, H-1 *C-terminus*); 2,78 (m, 4H, H-5); 3,03 (m, 4H, H-6); 3,26-3,40 (m, 16H, H-4); 3,40-3,52 (m, 8H, H-2b); 3,61 (m; 8H, H-2a); 3,67 (m, 8H, H-3); H-9-13: 4,17, 4,23, 4,47, 4,56 & 4,67 (5x m, 5x 2H); 6,02 (d, $^3J_{\text{HH}} = 9,8$ Hz, 2H, H-8); 8,06 (m, 2H, H-7).

Der Sulfatisierungsgrad wurde durch das Intensitätsverhältnisses der anomeren Signale bestimmt (H-8): 98,5 %.

Anmerkung: Ein Signal der Zuckerringprotonen H-9 - H-11 wird unter dem von HDO verursachten Signal bei 4,79 ppm vermutet.

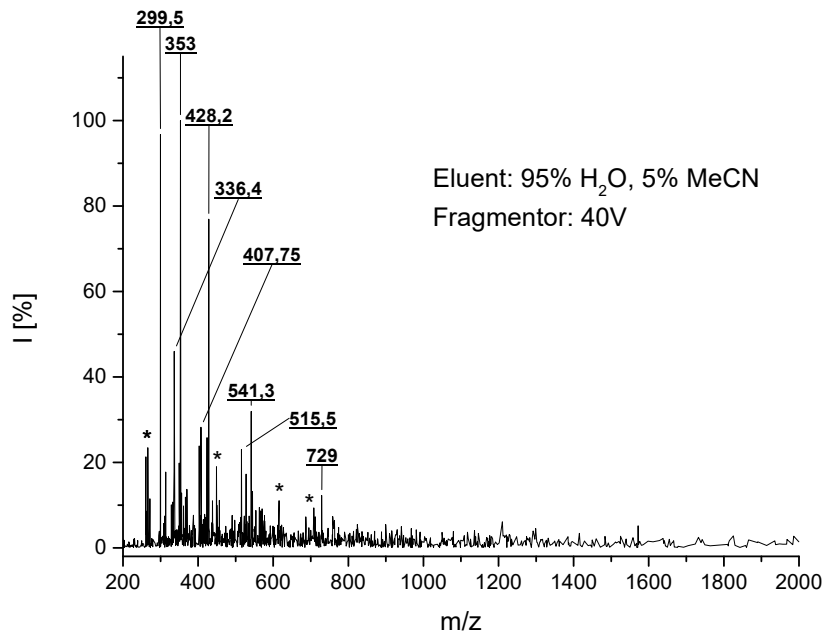


Abbildung 85: ESI-MS von 09-S3.

Tabelle 17: ESI-MS Signalzuordnung für 09-S3 aus Abbildung 85. Spuren von Sulfatisierungszahlen <6 können vereinzelt gefunden werden. Bei einer 7x Sulfatisierung wird womöglich das primäre Amid sulfatisert.

7x sulfatisiert [C ₆₄ H ₁₀₀ N ₁₉ O ₄₆ S ₇ Na ₇]		6x sulfatisiert [C ₆₄ H ₁₀₁ N ₁₉ O ₄₃ S ₆ Na ₆]	
m/z theoretisch	m/z gefunden	m/z theoretisch	m/z gefunden
[M-7Na] ⁷⁻ = 299.2	299.4	[M-6Na] ⁶⁻ = 335.9	336.2
[M-6Na] ⁶⁻ = 352.9	353.0	[M-5Na] ⁵⁻ = 407.7	407.8
[M-5Na] ⁵⁻ = 428.1	428.3	[M-4Na] ⁴⁻ = 515.4	515.7
[M-4Na] ⁴⁻ = 540.8	541.1		
[M-3Na] ³⁻ = 728.8	729.0		

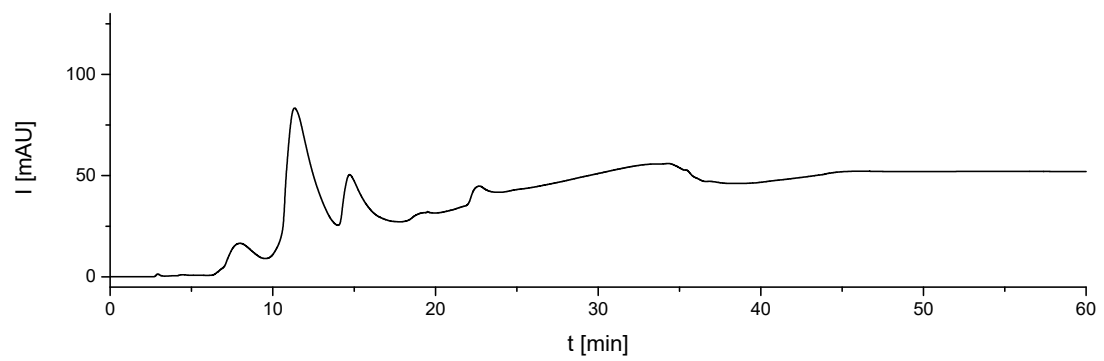
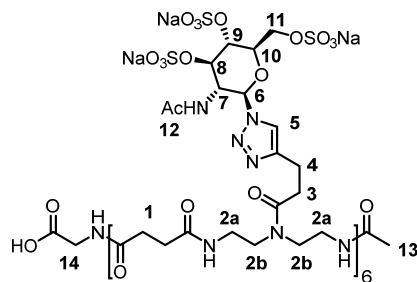


Abbildung 86: SAX-HPLC von O9-S3 (0-5 min 40 mM NaCl, 1,5 % MeCN; 5-40 min linearer Gradient zu 30 % MeCN, 800 mM NaCl und 30 % MeCN; 40-60 min 800 mM NaCl und 30% MeCN um komplette Eluation zu gewährleisten; Detektor: VWD 214 nm).

5.2.4.5 (1-6)-GlcNAc(3-6S)-(6)-Carboxyethylamid (**O10-S**)

Verbindung **O10-S** wurde aus **O10** (5 mg Ansatz) nach Dialyse und Gefriertrocknung mit einer quantitativen Ausbeute von 8 mg gewonnen.

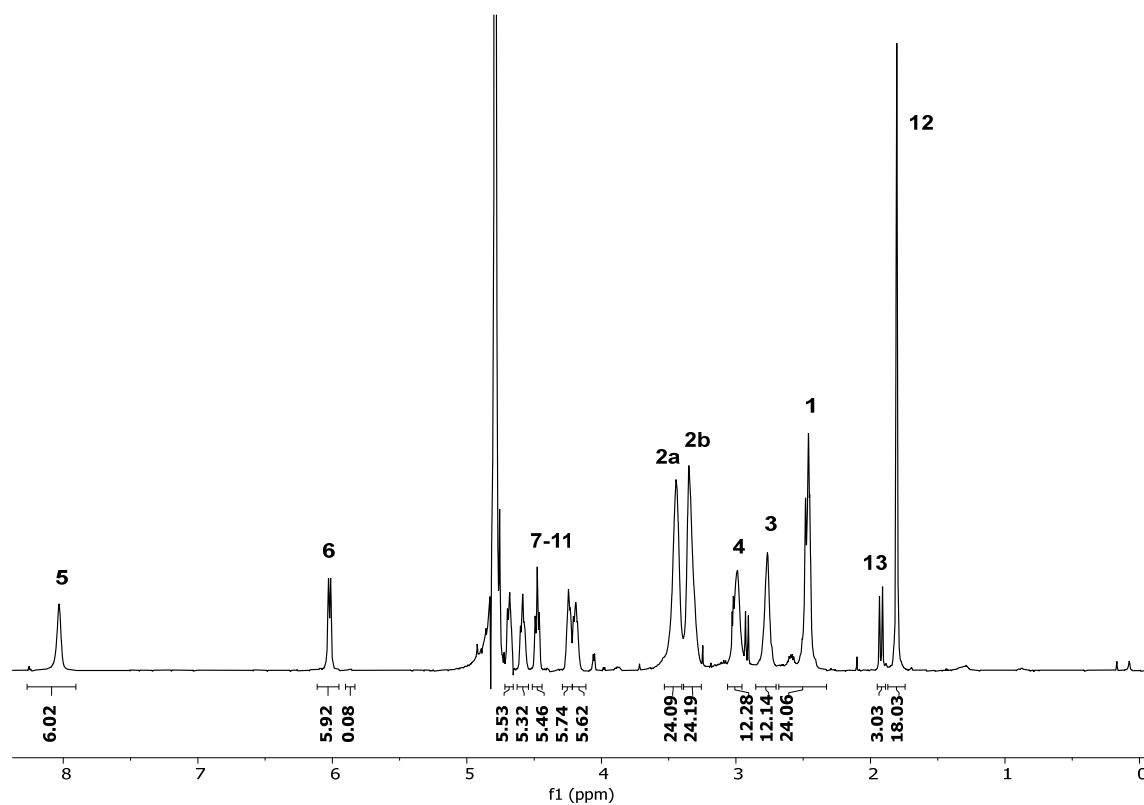


Abbildung 87: $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O) von **O10-S**.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O): δ [ppm] = 1,80 (s, 18H, H-12); 1,91 & 1,93 (2x s, 3H, H-13); 2,46 (m, 20H, H-1); 2,58 (m, 4 H, H1 C-terminus); 2,77 (m, 12H, H-3); 2,99 (m, 12H, H-4); 3,35 & 3,45 (2x br m,

48H, H-2); H-7-11: 4,19, 4,24, 4,48, 4,59, 4,68 (5x m, 5x 6H); 6,02 (d, $^3J_{\text{HH}} = 9,7$ Hz, 6H, H-6); 8,03 (br s, 6H, H-5),

Der Sulfatisierungsgrad wurde durch das Intensitätsverhältnisses der anomeren Signale bestimmt (H-6): 98,7 %.

Anmerkung: Die Intensität der Protonen 6-11 ist aufgrund unvollständiger Sulfatisierung verringert. Ein Signal der Zuckerringprotonen 7-11 wird unter dem von HDO verursachten Signal bei 4,79 ppm vermutet. Das Signal der Glycin-Protonen konnte nicht zugeordnet werden.

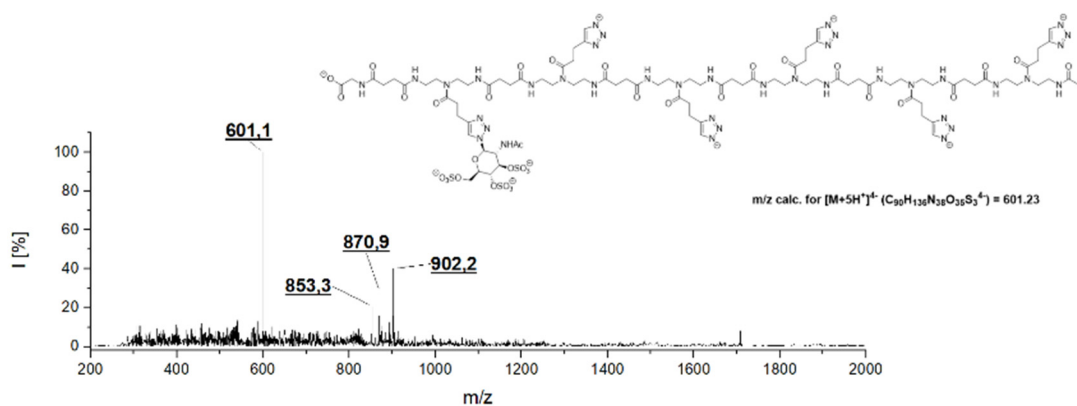


Abbildung 88: ESI-MS von O10-S. Die m/z-Signale 853,3, 870,9 und 902,2 konnten nicht zugeordnet werden.

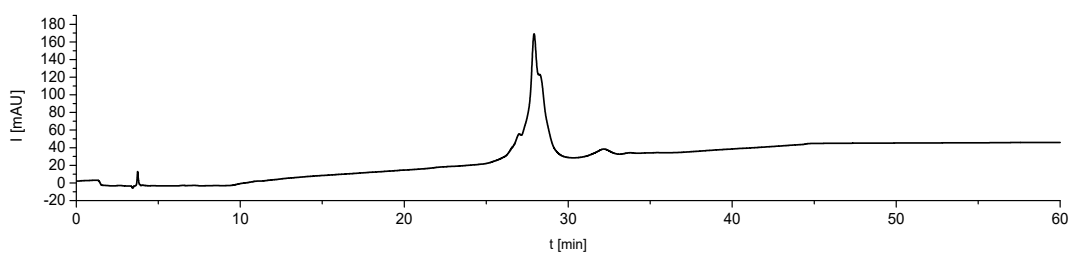
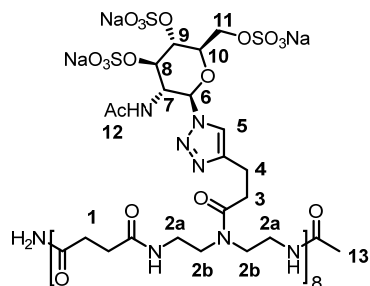


Abbildung 89: SAX-HPLC von O10-S (0-5 min 40 mM NaCl, 1,5 % MeCN; 5-40 min linearer Gradient zu 30 % MeCN, 800 mM NaCl und 30 % MeCN; 40-60 min 800 mM NaCl und 30% MeCN um komplette Eluation zu gewährleisten; Detektor: VWD 214 nm).

5.2.4.6 (1-8)-GlcNAc(3-6S)-(8)-Amid (**O11-S**)



Verbindung **O11-S** wurde aus **O11** (10 mg Ansatz) nach Dialyse und Gefriertrocknung mit einer Ausbeute von 12,8 mg (39,6%) gewonnen.

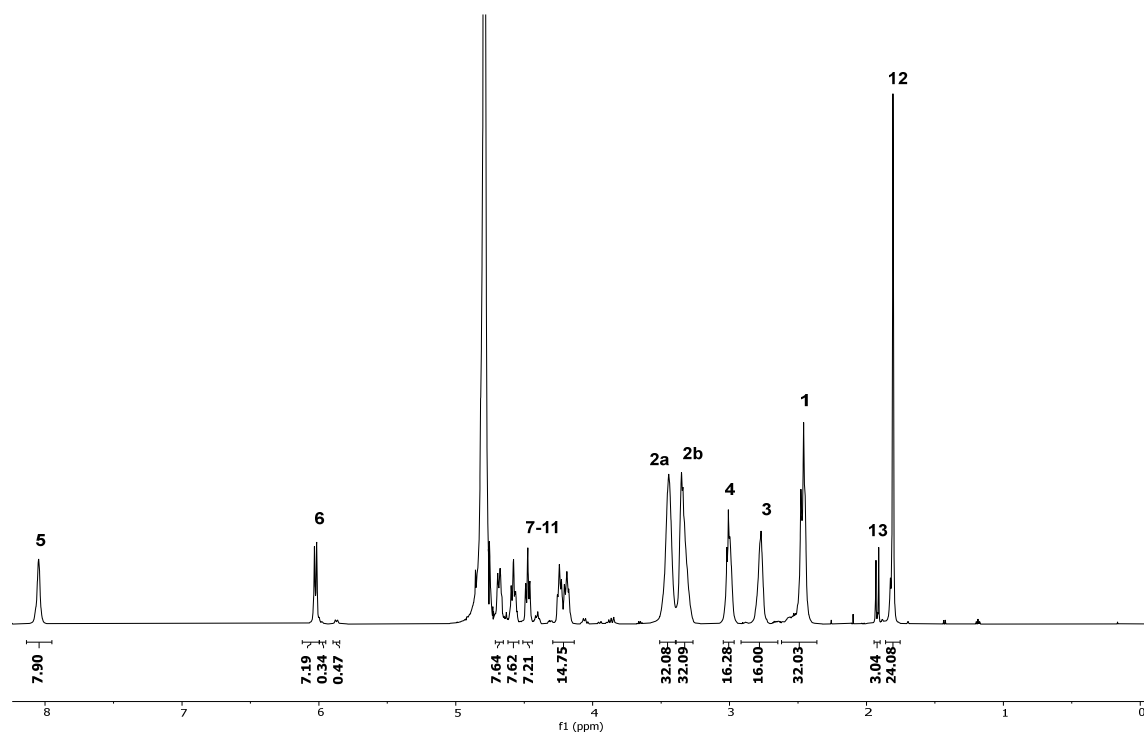


Abbildung 90: $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O) von **O11-S**.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O): δ [ppm] = 1,81 (s, 24H, H-12); 1,91 & 1,93 (2x s, 3H, H-13); 2,46 (m, 32H, H-1); 2,77 (br m, 16H, H-3); 3,01 (br m, 16H, H-4); 3,35 (br m, 32H, H-2b); 3,44 (br m, 32H, H-2a); H-7-11: 4,19, 4,24, 4,47, 4,58 & 4,69 (5x m, 5x 8H); 6,02 (d, $^3J_{\text{HH}} = 9,8$ Hz, 8H, H-6); 8,05 (br s, 8H, H-5).

Der Sulfatisierungsgrad wurde durch das Intensitätsverhältnisses der anomeren Signale bestimmt (H-6): 89,9 %.

Anmerkung: Die Intensität der Protonen 6-11 ist aufgrund unvollständiger Sulfatisierung verringert. Ein Signal der Zuckerringprotonen 7-11 wird unter dem von HDO verursachten Signal bei 4,79 ppm vermutet.

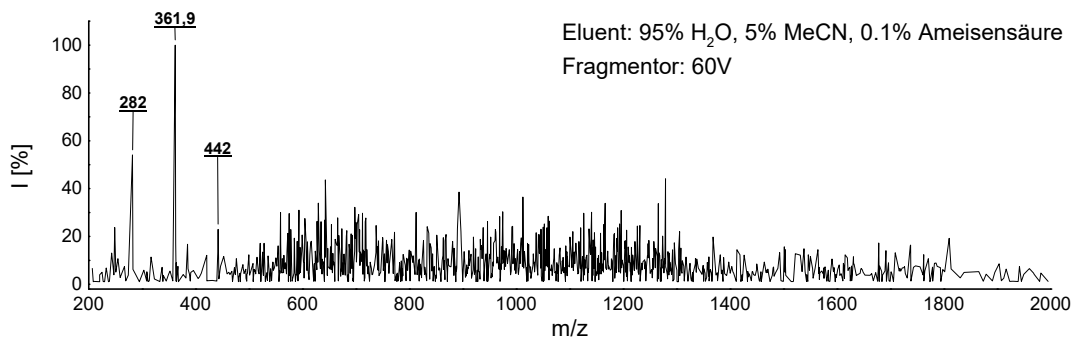


Abbildung 91: ESI-MS von O11-S.

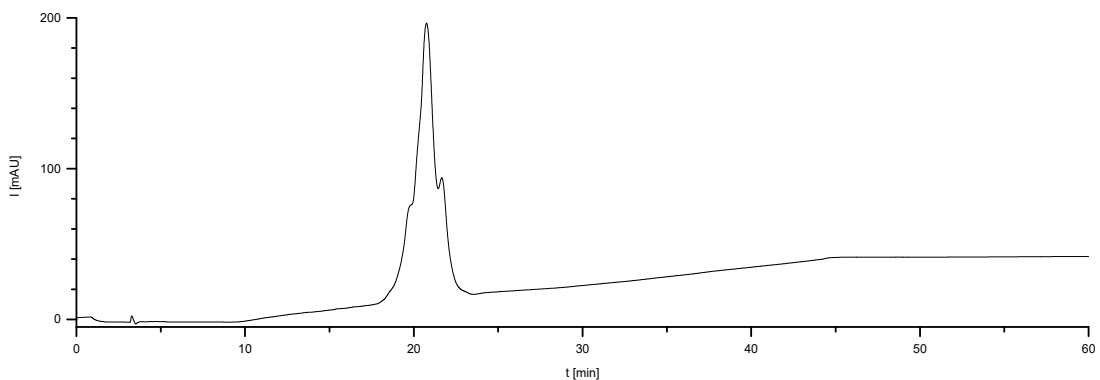
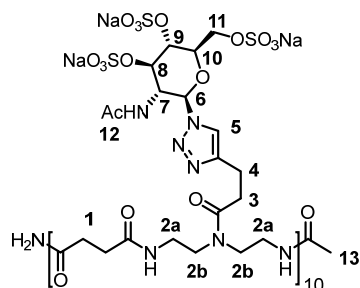


Abbildung 92: SAX-HPLC von O11-S (0-5 min 40 mM NaCl, 1,5 % MeCN; 5-40 min linearer Gradient zu 30 % MeCN, 800 mM NaCl und 30 % MeCN; 40-60 min 800 mM NaCl und 30% MeCN um komplette Eluation zu gewährleisten; Detektor: VWD 214 nm).

5.2.4.7 (1-10)-GlcNAc(3-6S)-(10)-Amid (**O12-S**)



Verbindung **O12-S** wurde aus **O12** (10 mg Ansatz) nach Dialyse und Gefriertrocknung mit einer Ausbeute von 27,2 mg (93,5%) gewonnen.

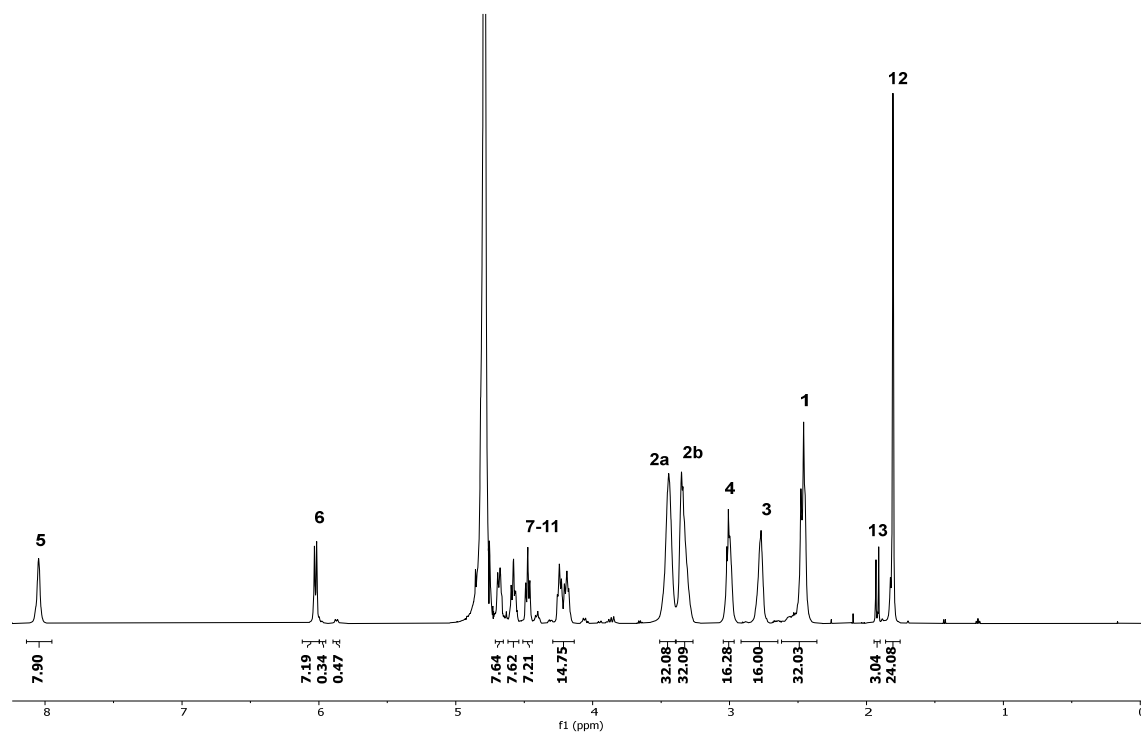


Abbildung 93: $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O) von **O12-S**.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O): δ [ppm] = 1,81 (s, 30H, H-12); 1,91 & 1,93 (2x s, 3H, H-13); 2,46 (m, 40H, H-1); 2,77 (br m, 20H, H-3); 3,01 (br m, 20H, H-4); 3,27-3,40 (br m, 40H, H-2b); 3,40-3,52 (br m, 40H, H-2a); H-7-11: 4,19, 4,24, 4,48, 4,58 & 4,68 (5x m, 5x 10H); 6,02 (d, $^3J_{\text{HH}} = 9,7$ Hz, 10H, H-6); 8,03 (br s, 10H, H-5).

Der Sulfatisierungsgrad wurde durch das Intensitätsverhältnisses der anomeren Signale bestimmt (H-6): 85,2 %.

Anmerkung: Die Intensität der Protonen 6-11 ist aufgrund unvollständiger Sulfatisierung verringert. Ein Signal der Zuckerringprotonen 7-11 wird unter dem von HDO verursachten Signal bei 4,79 ppm vermutet.

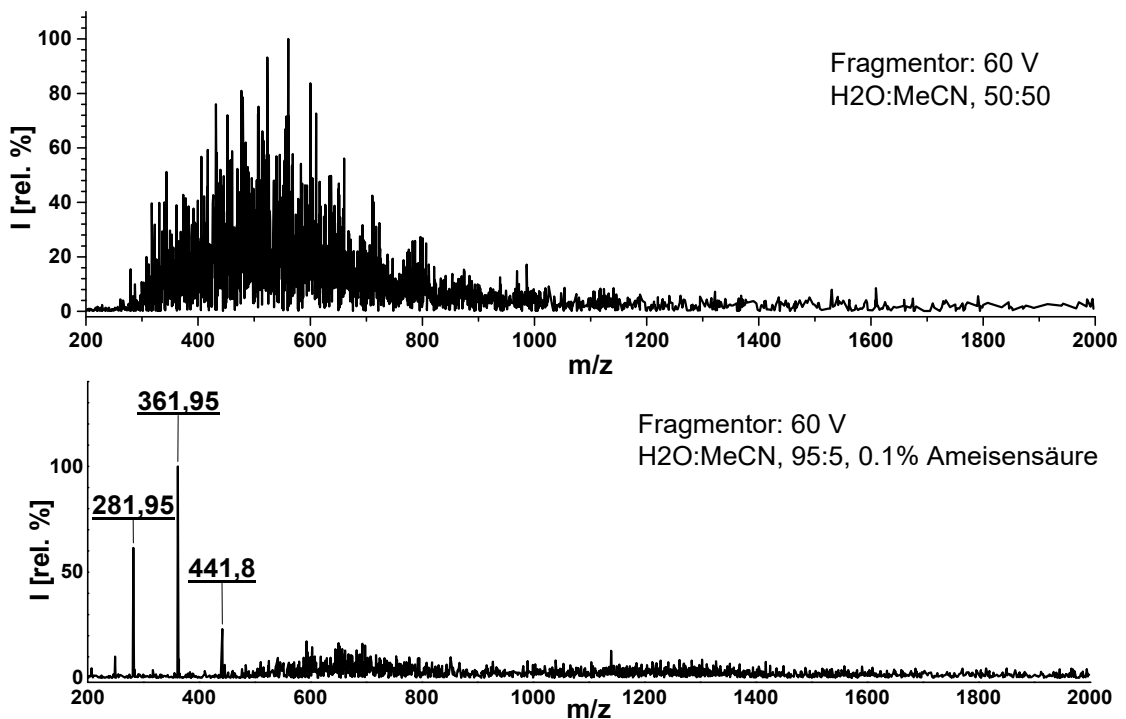


Abbildung 94: ESI-MS von O12-S unter verschiedenen Bedingungen zur Fragmentierung der sulfatisierten Zucker.

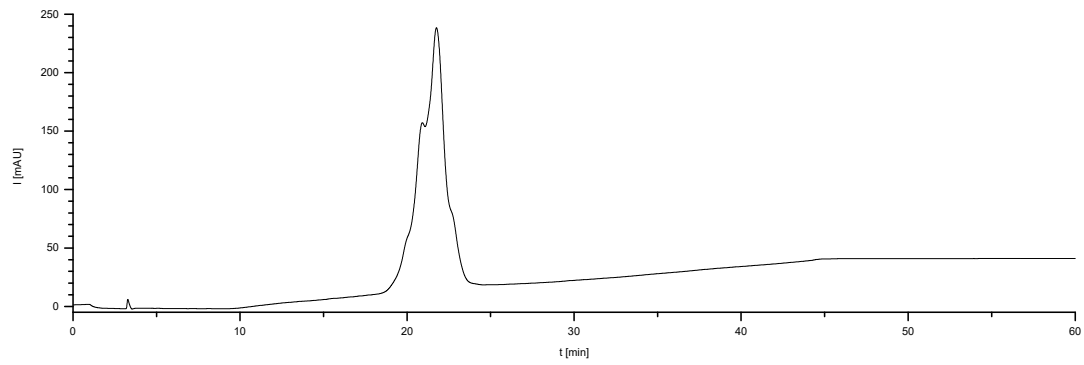
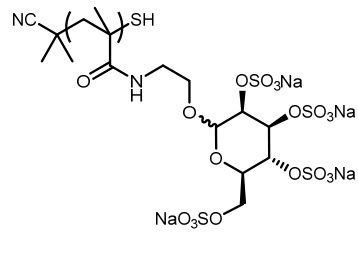
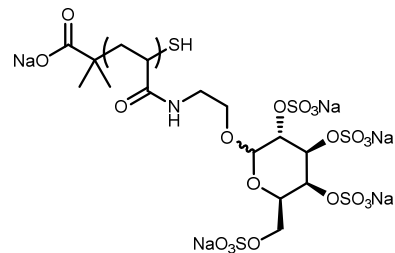


Abbildung 95: SAX-HPLC von **O12-S** (0-5 min 40 mM NaCl, 1,5 % MeCN; 5-40 min linearer Gradient zu 30 % MeCN, 800 mM NaCl und 30 % MeCN; 40-60 min 800 mM NaCl und 30% MeCN um komplette Eluation zu gewährleisten; Detektor: VWD 214 nm).

5.2.5 Sulfatisierung von Mannose- und Galactose-Polymeren



P1-S
Mannose



P2-S
Galactose

Die nicht sulfatisierten Polymere P1 (Mn: 29.200 Da, D: 1,25), P2-1 (Mn: 11.500 Da, D: 2,00) und P2-2 (Mn: 13.100 Da, D: 1,08) wurden von Markus Giesler am Lehrstuhl für makromolekulare Chemie (Prof. Laura Hartmann) der Heinrich-Heine-Universität (HHU) Düsseldorf im Rahmen seiner Doktorarbeit synthetisiert und im Rahmen dieser Arbeit sulfatisiert (**Tabelle 18**).

Tabelle 18: Sulfatisierungsbedingungen der Polymere **P1**, **P2-1** und **P2-2**.

Struktur	Einwaage Glycopoly- mer ^a [mg]	Einwaage TMA*SO ₃ [mg]	Volumen DMF [ml]	Tempera- tur [°C]	Reaktions- zeit [h]	Quencher ^b	Ausbeute ^c [mg]
P1-S	5 (P1)	400	3,5	70	19	10% NaOAc (10 Äq. zu TMA*SO ₃)	7,5 (62,5%)
P2-S1	14,5 (P2-1)	1386	6	70	18	10% NaOAc (10 Äq. zu TMA*SO ₃)	27,3 (76,2%)
P2-S2	34 (P2-2)	2727	24	70	18	20% NaOAc ^d (20 Äq. zu TMA*SO ₃)	32,6 (38,8%)

(a) Die jeweiligen unsulfatisierten Polymere sind in den Klammern gezeigt. (b) Das Rohprodukt wurde zu unterschiedlichen Mengen Natriumacetat-Lösung (NaOAc) gegeben, um die entsprechenden Äquivalente zu erreichen. (c) Prozentuelle Anteile wurden von den theoretischen Mengen bei kompletter Sulfatisierung abgeleitet. (d) Höhere Mengen NaOAc, da bei P1-S und P2-S1 TMA-Kontaminationen gefunden wurden. Bei der Dialyse wurde ein extra Ionenaustausch per halb-gesättigter NaCl-Lösung bewerkstelligt.

Die Sulfatisierung der Glycopolymere erfolgte nach den etablierten Protokollen zur Sulfatisierung der Oligomere O9-O12 mit TMA-SO₃ als Sulfatisierungsreagenz und NaOAc als Quencher. 40 Äquivalente TMA-SO₃ wurden jeweils zu den Glycopolymeren gegeben und in DMF gelöst. Das Gemisch wurde für 18-19 Stunden bei 70 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Gemisch zu 10-20% Natriumacetatlösung (10-20 Äquivalente zu TMA*SO₃) bei 0 °C gegeben. Das DMF/Wasser-Gemisch wurde unter vermindertem Druck abgezogen (60 °C, 15 mbar), bevor es per Dialyse (MWCO: 1000 oder 2000 Da) und anschließender Gefriertrocknung aufgereinigt wurde. Zur detaillierten Übersicht siehe Tabelle 18.

¹H-NMR

P1-S

¹H-NMR (600 MHz, D₂O): δ = 5,45 – 5,05 (m, H5, 1H, Überlagert mit DHO); 4,61 – 3,0 (m, H3,4,6-10, 10H) 2,05 – 0,64 (breites m, H1+2, 5H) ppm.

P2-S1

¹H-NMR (600 MHz, D₂O): δ = 5,25 – 5,05 (m, H5, 1H, Überlagert mit DHO); 4,46 – 3,12 (m, H3,4,6-10, 10H) 2,60 – 0,75 (breites m, H1+2, 4H) ppm.

P2-S2

¹H-NMR (600 MHz, D₂O): δ = 5,30 - 5,11 (m, H5, 1H, Überlagert mit DHO); 4,50 – 3,22 (m, H3,4,6-10, 10H) 2,51 – 1,10 (breites m, H1+2, 4H) ppm.

5.3 Biologische, biomedizinische und Inhibierungsstudien

5.3.1 Blutkoagulation, L-Selektininhibierung und Komplementaktivierung

Blutkoagulation

Partielle Thromboplastinzeiten der Strukturen **O9-S2**, **O11**, **O11-S** und **O12-S** wurden von Dr. Kim Silberreis am Institut für Laboratoriumsmedizin der Charité Universitätsmedizin Berlin bestimmt (Abbildung 96).

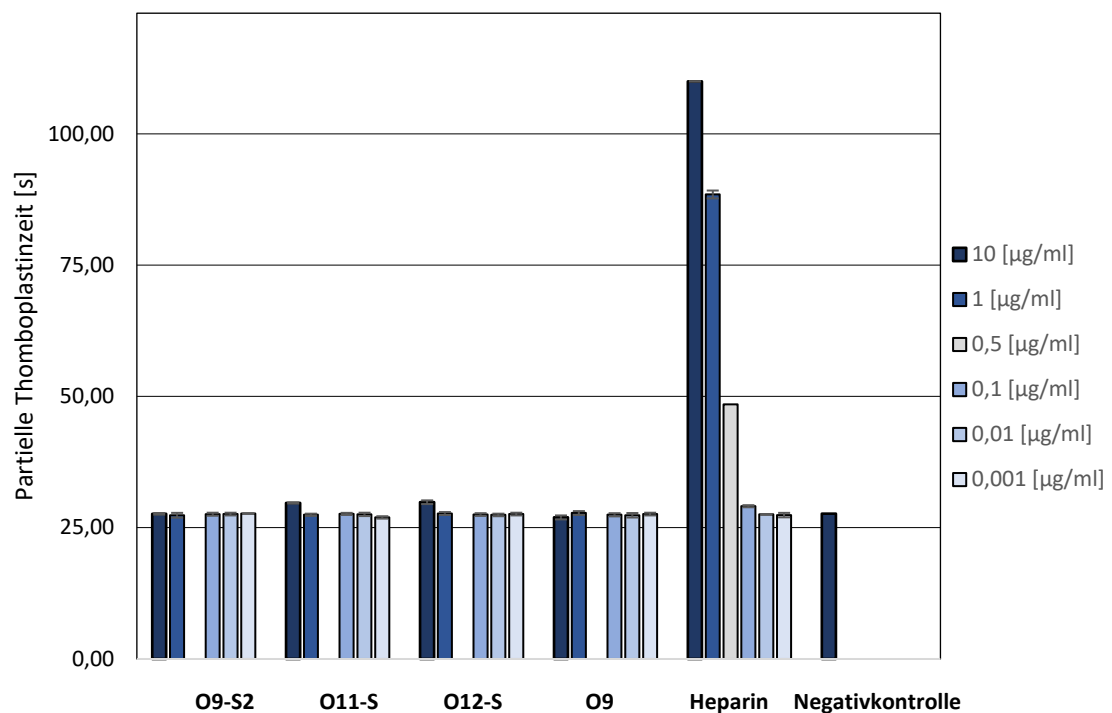


Abbildung 96: Partielle Thromboplastinzeiten der Strukturen **O9-S2**, **O11**, **O11-S** und **O-12** im Vergleich zu Heparin. Ausgewertet von Dr. Kim Silberreis.

L-Selektininhibierung

IC₅₀-Werte (L-Selektin) der Strukturen **O9-S2**, **O11**, **O11-S** und **O12-S** wurden von Dr. Kim Silberreis am Institut für Laboratoriumsmedizin der Charité Universitätsmedizin Berlin nach einem bekannten SPR-Verfahren^[124] bestimmt (**Abbildung 97**).

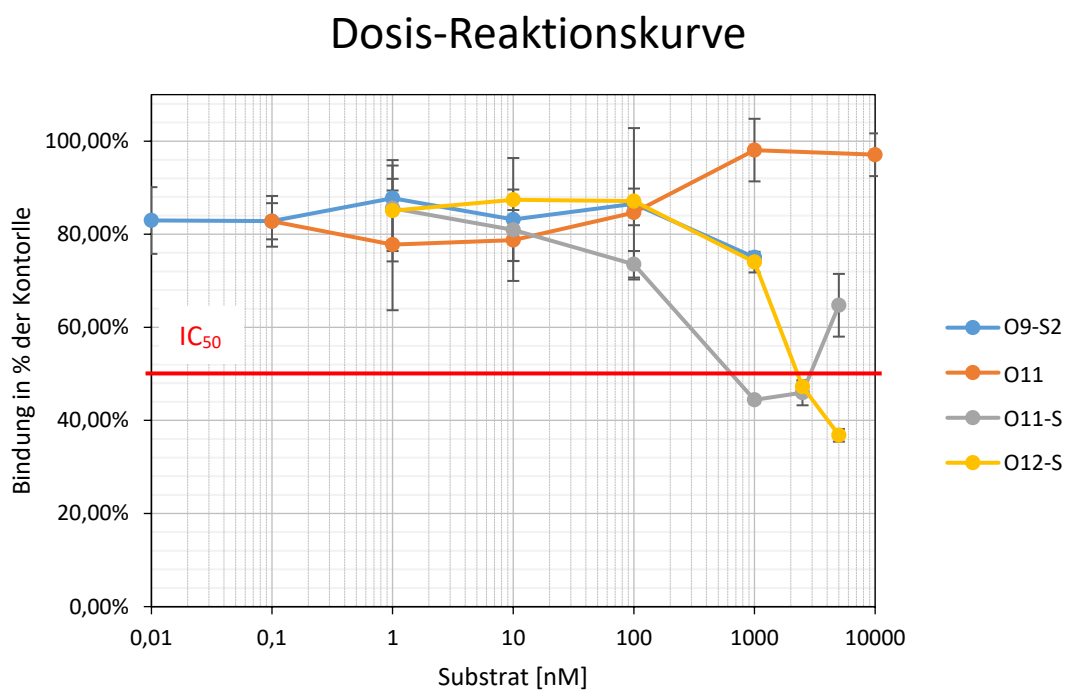


Abbildung 97: Dosis-Reaktionskurve aus dem SPR-L-Selektin Experiment mit den Strukturen **O9-S2**, **O11**, **O11-S** und **O12-S**. Ausgewertet von Dr. Kim Silberreis.

Komplementaktivierung

Die Inhibierung des Komplementsystems der Strukturen **O9-S2**, **O11**, **O11-S** und **O12-S** wurde von Dr. Kim Silberreis am Institut für Laboratoriumsmedizin der Charité Universitätsmedizin Berlin bestimmt (**Abbildung 98**). Hierzu wurde ein WIESLAB® Complement System (enzymatisches Immonoassay zur Bewertung der Komplementaktivität, SVAR Life Sciences) verwendet.

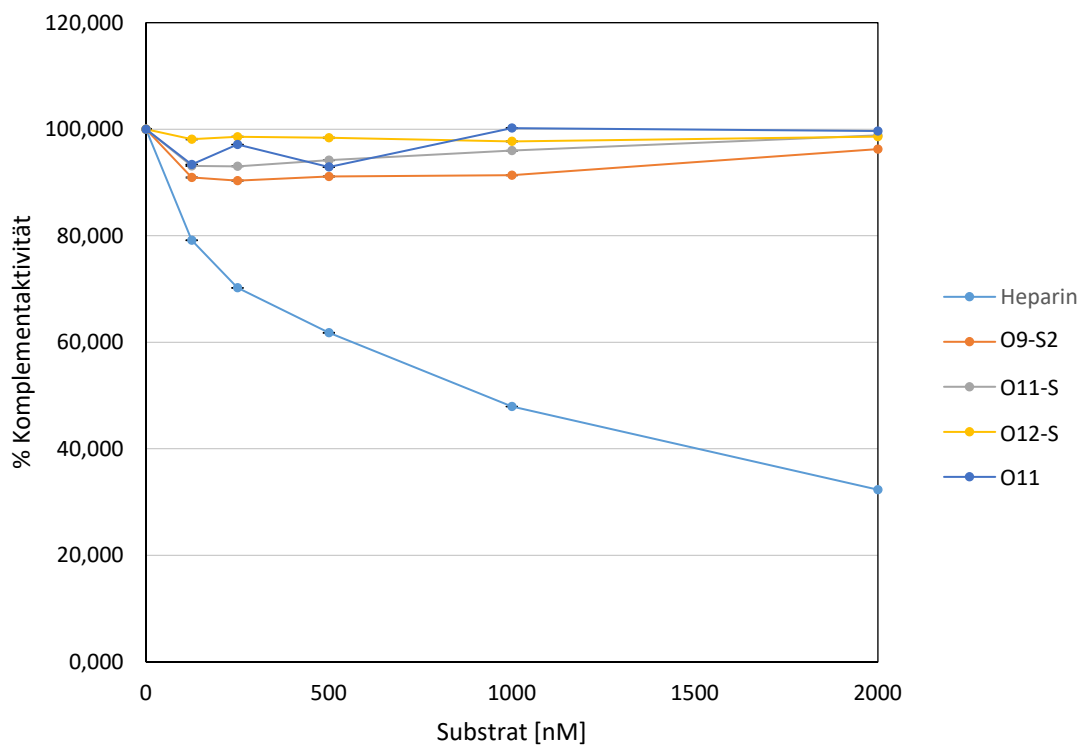


Abbildung 98: Inhibierung der Komplementaktivität in % der Strukturen **O9-S2**, **O11**, **O11-S** und **O-12-S** im Vergleich zu Heparin. Ausgewertet von Dr. Kim Silberreis.

5.3.2 HPV-Inhibierung und strukturelle Aktivierung

Die „Add-On“ Versuche zur HPV-16-Inhibierung wurden von Laura Soria Martinez am Institut für zelluläre Virologie (Prof. Dr. Mario Schelhaas) der westfälischen Wilhelms-Universität (WWU) Münster an den Strukturen **O9-S1**, **O9-S2**, **O10**, **O10-S**, **O11-S** und **O12-S**, sowie Heparin und Carrageen durchgeführt und, bis auf **O9-S1**, publiziert.^[180]

Untersuchungen zu **O9-S1** zeigten einen sehr unstetigen Verlauf. **O9-S1** gehörte zu den ersten Oligomeren, die einen hohen Sulfatisierungsgrad aufzeigten, wurde daher ausführlich und intensiv getestet und mehrfach aliquotiert. Möglicherweise kam es bei der vielfachen Behandlung der Probe zu ungewollten Kontaminationen, auch wenn mittels der erfolgten Analytik kein Nachweis darüber erbracht werden kann. Zudem konnte am Institut für zelluläre Virologie beobachtet werden, dass ein Einfrieren der sulfatisierten Glycooligomere zu den beschriebenen Effekten der **O9-S1** Inhibierung führen kann.

Mehrfache Wiederholungen der Messungen mit der Probe O9-S2 zeigten jedoch reproduzierbare Werte und ein reproduzierbares Verhalten in den verschiedenen Assays, so dass die erste Messung mit **O9-S1** als Ausreißer gesehen werden kann.

Die „Seed-Over“ Versuche mit **O10-S** wurden ebenfalls von Laura Soria Martinez nach einem bekannten Verfahren durchgeführt.^[182]

5.3.3 Cts1-, GST- und WGA-Interaktion mit Chitin- und O13-gecoateten Nickelbeads

Vorbereitung der O13-Nickelbeads

Die Herstellung der **O13**-modifizierten Nickelbeads erfolgte nach beigelegter Anleitung der Thermo Scientific Pierce™ NHS-Activated Magnetic Beads.

Hergestellte Lösungen:

Wasch-Puffer A: Eiskalte 1mM Salzsäure

Kupplungspuffer: 50mM Borat, pH 8,5

O13-Lösung: 2 mg/mL in Kupplungspuffer

Quenching-Puffer: 3M Ethanolamin, pH 9

Aufbewahrungspuffer: Kupplungspuffer mit 0,05% Natriumazid

Wasch-Puffer B: 0,1M Glycin, pH 2

300 µL NHS-aktivierte Beads wurden in einem 1,5 mL Eppendorf-Tube vorgelegt und durch einen magnetischen Stand sedimentiert. Der Überschuss wurde verworfen und die Beads ein Mal mit 1 mL Wasch-Puffer A gewaschen. Nachdem der Überstand erneut verworfen wurde, wurden zügig 300 µL O13-Lösung zu den Beads gegeben, stark vermischt (Vortex-Mischer) und das reaktive Gemisch für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur auf einer Drehscheibe inkubiert. In den ersten 15 Minuten wurde das Gemisch dabei alle 5 Minuten für 15 Sekunden erneut per Vortex-Mischer vermischt. Der Überstand wurde verworfen und die Beads zwei Mal mit 1 mL Wasch-Puffer B gewaschen (15 Sekunden Vortex-Mischer). Anschließend wurden die Beads zwei Stunden mit 1 mL Quenching-Puffer inkubiert. Zuletzt wurde ein Mal mit Wasser und ein Mal mit Aufbewahrungspuffer gewaschen, bevor die Beads in 300 µL Aufbewahrungspuffer gelagert wurden.

Vorbereitung der Ethanolamin-beladenen Nickelbeads

Die Herstellung der Ethanolamin-beladenen Nickelbeads erfolgte analog zur Vorbereitung der **O13**-Nickelbeads, allerdings wurde hier der Schritt mit der **O13**-Lösung weggelassen.

Vorbereitung der Proteine

Aufgereinigtes Cts1 und GST wurden mittels His-Tag Affinitätschromatographie aus *Escherichia coli* von Kai Hußnätter (AG Schipper, Institut für Mikrobiologie, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf) zu Verfügung gestellt.

Proteinbindungs-Assay (nach Thermo Scientific)

Die Vorgehensweisen der Proteinbindungsstudien wurden von Kai Hußnätter etabliert.

Bead-Vorbereitung

50 µL Chitin-Beads (New England BioLabs Inc.), beziehungsweise O13-modifizierte Beads wurden mit 500 µL Bindungs-Puffer in einem 1,5 mL Eppendorf-Tube vermischt. Der Überstand wurde mit Hilfe eines Magnetstands verworfen und der Waschvorgang ein Mal wiederholt.

Bindungs-/Waschpuffer: 500 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (1 M, pH 8), 0,05% Tween-20

Proteinbindung

500 µL Bindungs-Puffer wurden mit 10 µg Protein vermischt (Cts1, GST oder WGA). Das Gemisch wurde auf einer Drehscheibe für 3 Stunden inkubiert. Dabei wurde alle 15 Minuten (Kai Hußnätter) per Vortex-Mischer vorsichtig geschüttelt.

Waschvorgang

Per Magnetstand wurde der Überstand der Proteinbindung entfernt und durch Trichloroessigsäure(TCA)-Fällung (siehe TCA-Fällungsmethode) als Durchlauffraktion vorbereitet. Zwei Mal wurde mit 500 µL Bindungs-Puffer gewaschen und dieser Überstand per TCA-Fällung als Waschfraktion-1 vorbereitet. Ein weiteres Mal wurde mit 500 µL Bindungs-Puffer für die Waschfraktion-2 gewaschen.

Protein-Elution

Nach Thermo Scientific wurden 100 µL eines 0,1 M Glycin-Puffers (pH 2 mit HCl) zu den Beads gegeben und 5 Minuten auf einer Drehscheibe inkubiert. Der Überstand wurde zurückgehalten und die pH-2-Elution ein Mal wiederholt. Zu den 200 µL Überstand wurden 20 µL Neutralisationspuffer (1 M Tris-HCl pH 7,5-9) zu. Zu den Beads wurden 30 µL Laemmli/NaOH-Puffer gegeben und für 10 Minuten bei 95 °C restliches, ungebundenes Protein entfernt. Alternativ wurden die Beads direkt, ohne vorherige pH-2-Behandlung mit Laemmli-Puffer versetzt und ausgekocht.

Protein-Detektion

Die Proben wurden mit 50% TCA zur Ausfällung vermischt:

- Durchlauf (500 µL) + 50 µL TCA.
- Kombinierte Waschfraktionen (1500 µL) + 150 µL TCA.
- pH-2-Elution (200 µL) + 20 µL TCA.
- Restliche pH-2-Elution (20 µL) + 3x 10 µL Laemmli/NaOH und Kochen.
- Input-Kontrolle: 10 µg Protein je nach Konzentration der Proteinlösung auf 10-15% TCA vermischt, oder direkt zu Laemmli-Puffer gegeben und ausgekocht.

TCA-Fällungsmethode (Praveen Sarkari, modifiziert von Kai Hußnätter)

- Zugabe von 10-15% TCA (Trichloroessigsäure, 50% Stammlösung) zum Bead-Überstand oder der Proteinlösung.
- Gut vermischen und 1-2h (alternativ über Nacht) im 4 °C Raum auf eis inkubieren.
- Zentrifugieren bei 13000 rpm und 4 °C für 30 Minuten.
- Überstand entfernen und Niederschlag mit 1 mL Aceton (- 20 °C) waschen. 20 Minuten bei leichtem Zentrifugieren (spin) bei 4 °C sedimentieren. Diesen Schritt wiederholen.
- Niederschlag lufttrocknen.
- Den Niederschlag in so wenig wie möglich Laemmli/NaOH-Puffer suspendieren und 10 Minuten bei 95 °C kochen.
- Die Proben sind jetzt für die SDS-PAGE vorbereitet

Die im Proteinbindungs-Assay eingesetzten Chemikalien und Geräte wurden vom Institut für Mikrobiologie (AG Schipper) zu Verfügung gestellt.

SDS-PAGE und Quantifizierung

Die SDS-PAGE der Proteinelutionen, Einfärbungen mittels CBB-Lösung (Coomassie Brilliant Blue) und Quantifizierungen durch RGB-Abgleich wurden eigenständig von Kai Hußnätter durchgeführt.

Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

- [1] D. Ulmann, (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:William_Henry_Howell.jpg), „William Henry Howell“, als gemeinfrei gekennzeichnet, Details auf Wikimedia Commons: <https://commons.wikimedia.org/wiki/Template:PD-1923> **1882-1934**.
- [2] Brockbank, (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Jay_Mclean.jpg), „Jay Mclean“.
- [3] D. Ponader, F. Wojcik, F. Beceren-Braun, J. Dervedde, L. Hartmann, *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 1845-1852.
- [4] M. J. Bamford, J. C. Pichel, W. Husman, B. Patel, R. Storer, N. G. Weir, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1995**, 1181-1187.
- [5] J. Neumann, J. Thiem, *European Journal of Organic Chemistry* **2010**, *2010*, 900-908.
- [6] R. Koch, *Beitr Biol Pflanz* **1876**, *2*, 277-310.
- [7] C. J. Eberth, *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin* **1880**, *81*, 58-74.
- [8] A. Sakula, *Thorax* **1982**, *37*, 246-251.
- [9] S. Kitasato, *The Lancet* **1894**, *144*, 428-430.
- [10] A. Stengel, H. K. Pancoast, *Journal of the American Medical Association* **1908**, *50*, 1317-1323.
- [11] W. H. Howell, *American Journal of Physiology-Legacy Content* **1912**, *31*, 1-21.
- [12] I. Bang, *Ergebnisse der Physiologie* **1909**, *8*, 463-523.
- [13] P. Morawitz, *Beitrage zur Chemischen Physiologie und Pathologie* **1904**, *5*, 133.
- [14] P. Morawitz, *Ergebnisse der Physiologie* **1905**, *4*, 307-422.
- [15] M. Arthus, *J. de physiol. et de path. gén* **1902**, *4*, 455-461.
- [16] P. Nolf, *Arch Int Physiol Biochim* **1908**, *6*, 306-359.
- [17] J. McLean, *American Journal of Physiology--Legacy Content* **1916**, *41*, 250-257.
- [18] C. H. Best, *Circulation* **1959**, *19*, 79-86.
- [19] W. Howell, *Am J Physiol* **1922**, *63*, 3.
- [20] D. Wardrop, D. Keeling, *British journal of haematology* **2008**, *141*, 757-763.
- [21] A. Charles, D. Scott, *Journal of Biological Chemistry* **1933**, *102*, 425-429.
- [22] A. Charles, D. Scott, *Journal of Biological Chemistry* **1933**, *102*, 431-435.
- [23] D. Scott, A. Charles, *Journal of Biological Chemistry* **1933**, *102*, 437-448.
- [24] A. F. Charles, D. A. Scott, *Biochemical Journal* **1936**, *30*, 1927.
- [25] D. Murray, L. Jaques, T. Perrett, C. Best, *Surgery* **1937**, *2*, 163-187.
- [26] G. B. Lim, *Nature Reviews Cardiology* **2017**.
- [27] W. E. Gerabek, B. D. Haage, G. Keil, W. Wegner, *Enzyklopädie Medizingeschichte*, Walter de Gruyter, **2011**.
- [28] E. M. Taylor, P. J. Moloney, US2587924A, **1952**.
- [29] W. H. Howell, *Bull. Johns Hopkins Hosp* **1928**, *42*, 199.
- [30] E. Jorpes, *Biochemical Journal* **1935**, *29*, 1817.
- [31] J. A. Cifonelli, *Carbohydrate Research* **1968**, *8*, 233-242.
- [32] U. Lindahl, O. Axelsson, *Journal of Biological Chemistry* **1971**, *246*, 74-82.
- [33] A. Perlin, G. Sanderson, *Carbohydrate Research* **1970**, *12*, 183-192.
- [34] J. E. Shively, H. E. Conrad, *Biochemistry* **1970**, *9*, 33-43.
- [35] J. E. Shively, H. E. Conrad, *Biochemistry* **1976**, *15*, 3943-3950.

- [36] A. Perlin, M. Mazurek, L. Jaques, L. Kavanagh, *Carbohydrate Research* **1968**, *7*, 369-379.
- [37] A. Perlin, B. Casu, G. Sanderson, L. Johnson, *Canadian Journal of Chemistry* **1970**, *48*, 2260-2268.
- [38] A. Perlin, D. Mackie, C. Dietrich, *Carbohydrate research* **1971**, *18*, 185-194.
- [39] B. Casu, *Annals of the New York Academy of Sciences* **1989**, *556*, 1-17.
- [40] G. Gatti, B. Casu, G. Hamer, A. Perlin, *Macromolecules* **1979**, *12*, 1001-1007.
- [41] R. E. Hileman, J. R. Fromm, J. M. Weiler, R. J. Linhardt, *Bioessays* **1998**, *20*, 156-167.
- [42] J. Hirsh, T. E. Warkentin, S. G. Shaughnessy, S. S. Anand, J. L. Halperin, R. Raschke, C. Granger, E. M. Ohman, J. E. Dalen, *Chest* **2001**, *119*, 64S-94S.
- [43] I. Capila, R. J. Linhardt, *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, *41*, 390-412.
- [44] R. Sasisekharan, G. Venkataraman, *Current opinion in chemical biology* **2000**, *4*, 626-631.
- [45] M. Yanagishita, *Experientia* **1993**, *49*, 366-368.
- [46] Schmiedeberg, *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.* **1891**, 358.
- [47] P. Levene, F. La Forge, *Journal of Biological Chemistry* **1913**, *15*, 69-79.
- [48] K. Meyer, E. Chaffee, *Journal of biological chemistry* **1941**, *138*, 491-499.
- [49] K. Meyer, E. Davidson, A. Linker, P. Hoffman, *Biochimica et biophysica acta* **1956**, *21*, 506-518.
- [50] K. Meyer, R. Dubos, E. M. Smyth, *Journal of Biological Chemistry* **1937**, *118*, 71-78.
- [51] K. Meyer, A. Linker, E. A. Davidson, B. Weissmann, *J Biol Chem* **1953**, *205*, 611-616.
- [52] K. Meyer, J. W. Palmer, *Journal of Biological Chemistry* **1934**, *107*, 629-634.
- [53] M. Suzuki, *J. Biochem* **1939**, *30*, 185-191.
- [54] S.-i. Kobayashi, K.-i. Morimoto, T. Shimizu, M. Takahashi, H. Kurosawa, T. Shirasawa, *Biochemical and biophysical research communications* **2000**, *268*, 860-867.
- [55] C. McCormick, G. Duncan, K. T. Goutsos, F. Tufaro, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2000**, *97*, 668-673.
- [56] G. Wei, X. Bai, M. M. Gabb, K. J. Bame, T. I. Koshy, P. G. Spear, J. D. Esko, *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275*, 27733-27740.
- [57] U. Lindahl, M. Kusche-Gullberg, L. Kjellén, *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273*, 24979-24982.
- [58] R. D. Rosenberg, N. W. Shworak, J. Liu, J. J. Schwartz, L. Zhang, *The Journal of clinical investigation* **1997**, *99*, 2062-2070.
- [59] O. Habuchi, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **2000**, *1474*, 115-127.
- [60] J. E. Jorpes, *Circulation* **1959**, *19*, 87-91.
- [61] R. W. Colman, *Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice*, Lippincott Williams & Wilkins, **2006**.
- [62] D. A. Lane, I. Björk, U. Lindahl, *Heparin and related polysaccharides, Vol. 313*, Springer Science & Business Media, **2013**.
- [63] J. E. Silbert, G. Sugumaran, *IUBMB life* **2002**, *54*, 177-186.
- [64] J. E. Christner, J. J. Distler, G. W. Jourdan, *Archives of biochemistry and biophysics* **1979**, *192*, 548-558.
- [65] M. Amado, R. Almeida, T. Schwientek, H. Clausen, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **1999**, *1473*, 35-53.
- [66] J. L. Funderburgh, *Glycobiology* **2000**, *10*, 951-958.
- [67] A. Seko, K. Yamashita, *FEBS letters* **2004**, *556*, 216-220.
- [68] E. Rüter, H. Kresse, *Journal of Biological Chemistry* **1984**, *259*, 11771-11776.
- [69] O. Habuchi, Y. Hirahara, K. Uchimura, M. Fukuta, *Glycobiology* **1996**, *6*, 51-57.
- [70] M. Fukuta, J. Inazawa, T. Torii, K. Tsuzuki, E. Shimada, O. Habuchi, *Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272*, 32321-32328.
- [71] I. Björk, U. Lindahl, *Molecular and cellular biochemistry* **1982**, *48*, 161-182.

- [72] D. Vigetti, E. Karousou, M. Viola, S. Deleonibus, G. De Luca, A. Passi, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **2014**, 1840, 2452-2459.
- [73] D. Vigetti, M. Ori, M. Viola, A. Genasetti, E. Karousou, M. Rizzi, F. Pallotti, I. Nardi, V. C. Hascall, G. De Luca, *Journal of Biological Chemistry* **2006**, 281, 8254-8263.
- [74] C. Magee, M. Nurminskaya, T. F. Linsenmayer, *Biochemical Journal* **2001**, 360, 667.
- [75] U. Lindahl, G. Bäckström, L. Thunberg, I. G. Leder, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1980**, 77, 6551-6555.
- [76] J. Choay, J. Lormeau, M. Petitou, P. Sinay, B. Casu, P. Oreste, G. Torri, G. Gatti, *Thrombosis research* **1980**, 18, 573-578.
- [77] J. Choay, J. C. Lormeau, M. Petitou, P. Sinay, J. Fareed, *Annals of the New York Academy of Sciences* **1981**, 370, 644-649.
- [78] J. Choay, M. Petitou, J. Lormeau, P. Sinay, B. Casu, G. Gatti, *Biochemical and biophysical research communications* **1983**, 116, 492-499.
- [79] M. Petitou, P. Duchaussoy, I. Lederman, J. Choay, J.-C. Jacquinet, P. Sinaï, G. Torri, *Carbohydrate research* **1987**, 167, 67-75.
- [80] C. A. van Boeckel, M. Petitou, *Angewandte Chemie International Edition in English* **1993**, 32, 1671-1690.
- [81] J. Herbert, M. Petitou, J. Lormeau, R. Cariou, J. Necciari, H. Magnani, P. Zandberg, R. Van Amsterdam, C. Van Boeckel, D. Meuleman, *Cardiovascular drug reviews* **1997**, 15, 1-26.
- [82] S. Alban, *Pharmazie in unserer Zeit* **2004**, 33, 190-194.
- [83] J.-M. Hahn, *Checkliste Innere Medizin*, Georg Thieme Verlag, **2010**.
- [84] G. Herold, *Innere Medizin 2019*, Walter de Gruyter GmbH & Co KG, **2019**.
- [85] T. Karow, R. Lang-Roth, *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie: vorlesungsorientierte Darstellung und klinischer Leitfaden*, Karow, **2008**.
- [86] D. B. Blossom, A. J. Kallen, P. R. Patel, A. Elward, L. Robinson, G. Gao, R. Langer, K. M. Perkins, J. L. Jaeger, K. M. Kurkjian, *New England Journal of Medicine* **2008**, 359, 2674-2684.
- [87] M. Guerrini, D. Beccati, Z. Shriver, A. Naggi, K. Viswanathan, A. Bisio, I. Capila, J. C. Lansing, S. Guglieri, B. Fraser, *Nature biotechnology* **2008**, 26, 669.
- [88] J. Hirsh, W. Van Aken, A. Gallus, C. Dollery, J. Cade, W. Yung, *Circulation* **1976**, 53, 691-695.
- [89] C. Kroon, W. Ten Hove, A. De Boer, J. Kroon, J. Van Der Pol, E. Harthoorn-Lasthuizen, H. Schoemaker, F. Van Der Meer, A. Cohen, *Circulation* **1992**, 86, 1370-1375.
- [90] L. Manson, J. I. Weitz, T. J. Podor, J. Hirsh, E. Young, *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **1997**, 130, 649-655.
- [91] K. Sugahara, T. Mikami, T. Uyama, S. Mizuguchi, K. Nomura, H. Kitagawa, *Current opinion in structural biology* **2003**, 13, 612-620.
- [92] F. A. Bettelheim, B. Plessy, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **1975**, 381, 203-214.
- [93] B. O. Hedbys, *Experimental eye research* **1961**, 1, 81-91.
- [94] J. R. Hassell, D. A. Newsome, J. H. Krachmer, M. M. Rodrigues, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1980**, 77, 3705-3709.
- [95] N. S. Gandhi, R. L. Mancera, *Chemical biology & drug design* **2008**, 72, 455-482.
- [96] S. A. Back, T. M. Tuohy, H. Chen, N. Wallingford, A. Craig, J. Struve, N. L. Luo, F. Banine, Y. Liu, A. Chang, *Nature medicine* **2005**, 11, 966.
- [97] J.-K. F. Suh, H. W. Matthew, *Biomaterials* **2000**, 21, 2589-2598.
- [98] G. W. Yip, M. Smollich, M. Götte, *Molecular cancer therapeutics* **2006**, 5, 2139-2148.
- [99] T. Giroglou, L. Florin, F. Schäfer, R. E. Streeck, M. Sapp, *J Virol* **2001**, 75, 1565-1570.
- [100] R. M. Nelson, O. Cecconi, W. G. Roberts, A. Aruffo, R. J. Linhardt, M. P. Bevilacqua, *Blood* **1993**, 82, 3253-3258.

- [101] S. J. Paluck, T. H. Nguyen, H. D. Maynard, *Biomacromolecules* **2016**, *17*, 3417-3440.
- [102] S. Liekens, J. Neyts, B. Degrève, E. De Clercq, *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics* **1997**, *9*, 173-181.
- [103] S. Liekens, D. Leali, J. Neyts, R. Esnouf, M. Rusnati, P. Dell’Era, P. C. Maudgal, E. De Clercq, M. Presta, *Molecular Pharmacology* **1999**, *56*, 204-213.
- [104] N. Sangaj, P. Kyriakakis, D. Yang, C.-W. Chang, G. Arya, S. Varghese, *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 3294-3300.
- [105] T. H. Nguyen, S. J. Paluck, A. J. McGahran, H. D. Maynard, *Biomacromolecules* **2015**, *16*, 2684-2692.
- [106] J. Belleney, G. Hélarý, V. Migonney, *European Polymer Journal* **2002**, *38*, 439-444.
- [107] S. Berlot, Z. Aissaoui, G. Pavon-Djavid, J. Belleney, M. Jozefowicz, G. Hélarý, V. Migonney, *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 63-68.
- [108] F. El Khadali, G. Hélarý, G. Pavon-Djavid, V. Migonney, *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 51-56.
- [109] M. Matsusaki, T. Serizawa, A. Kishida, T. Endo, M. Akashi, *Bioconjugate Chemistry* **2002**, *13*, 23-28.
- [110] M. Matsusaki, T. Serizawa, A. Kishida, M. Akashi, *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 400-407.
- [111] M. Akashi, N. Sakamoto, K. Suzuki, A. Kishida, *Bioconjugate Chemistry* **1996**, *7*, 393-395.
- [112] R. Guan, X.-L. Sun, S. Hou, P. Wu, E. L. Chaikof, *Bioconjugate Chemistry* **2004**, *15*, 145-151.
- [113] Y. Huang, M. A. Shaw, E. S. Mullins, T. L. Kirley, N. Ayres, *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 4455-4466.
- [114] Y. Huang, L. Taylor, X. Chen, N. Ayres, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2013**, *51*, 5230-5238.
- [115] Y. Huang, M. A. Shaw, M. R. Warmin, E. S. Mullins, N. Ayres, *Polymer Chemistry* **2016**, *7*, 3897-3905.
- [116] Y. Miura, K. Yasuda, K. Yamamoto, M. Koike, Y. Nishida, K. Kobayashi, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 2129-2134.
- [117] Y. Nishimura, H. Shudo, H. Seto, Y. Hoshino, Y. Miura, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2013**, *23*, 6390-6395.
- [118] Y. I. Oh, G. J. Sheng, S.-K. Chang, L. C. Hsieh-Wilson, *Angewandte Chemie* **2013**, *125*, 12012-12015.
- [119] K. Sadaya, O. Masakazu, K. Keisuke, S. Toshiyuki, *Chemistry Letters* **1990**, *19*, 1733-1736.
- [120] G. J. Sheng, Y. I. Oh, S.-K. Chang, L. C. Hsieh-Wilson, *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135*, 10898-10901.
- [121] X.-L. Sun, D. Grande, S. Baskaran, S. R. Hanson, E. L. Chaikof, *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 1065-1070.
- [122] M. Wang, Z. Lyu, G. Chen, H. Wang, Y. Yuan, K. Ding, Q. Yu, L. Yuan, H. Chen, *Chemical Communications* **2015**, *51*, 15434-15437.
- [123] M. Yoshiko, M. Hikaru, *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **2010**, *83*, 1004-1009.
- [124] M. Weinhart, D. Gröger, S. Enders, J. Dervedde, R. Haag, *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 2502-2511.
- [125] J. Khandare, M. Calderón, N. M. Dagia, R. Haag, *Chemical Society Reviews* **2012**, *41*, 2824-2848.
- [126] H. D. Maynard, J. A. Hubbell, *Acta Biomaterialia* **2005**, *1*, 451-459.
- [127] M. Baier, M. Giesler, L. Hartmann, *Chemistry – A European Journal* **2018**, *24*, 1619-1630.
- [128] M. F. Ebbesen, D. Itskalov, M. Baier, L. Hartmann, *ACS Macro Letters* **2017**, *6*, 399-403.

- [129] T. Freichel, S. Eierhoff, N. L. Snyder, L. Hartmann, *The Journal of Organic Chemistry* **2017**, *82*, 9400-9409.
- [130] F. Wojcik, A. G. O'Brien, S. Götze, P. H. Seeberger, L. Hartmann, *Chemistry – A European Journal* **2013**, *19*, 3090-3098.
- [131] F. Broecker, J. Hanske, C. E. Martin, J. Y. Baek, A. Wahlbrink, F. Wojcik, L. Hartmann, C. Rademacher, C. Anish, P. H. Seeberger, *Nature Communications* **2016**, *7*, 11224.
- [132] S. Boden, K. Wagner, M. Karg, L. Hartmann, *Polymers* **2017**, *9*, 716.
- [133] D. Ponader, S. Igde, M. Wehle, K. Märker, M. Santer, D. Bléger, L. Hartmann, *Beilstein journal of organic chemistry* **2014**, *10*, 1603-1612.
- [134] R. B. Merrifield, *Journal of the American Chemical Society* **1963**, *85*, 2149-2154.
- [135] R. B. Merrifield, *Angewandte Chemie International Edition in English* **1985**, *24*, 799-810.
- [136] B. Gutte, R. B. Merrifield, *Journal of the American Chemical Society* **1969**, *91*, 501-502.
- [137] D. Ponader, P. Maffre, J. Aretz, D. Pussak, N. M. Ninnemann, S. Schmidt, P. H. Seeberger, C. Rademacher, G. U. Nienhaus, L. Hartmann, *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136*, 2008-2016.
- [138] K. S. Bücher, N. Babic, T. Freichel, F. Kovacic, L. Hartmann, *Macromolecular Bioscience* **2018**, *18*, 1800337.
- [139] H. C. Kolb, M. Finn, K. B. Sharpless, *Angewandte Chemie* **2001**, *113*, 2056-2075.
- [140] R. Huisgen, *Angewandte Chemie International Edition in English* **1963**, *2*, 565-598.
- [141] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, *41*, 2596-2599.
- [142] K. A. Jandik, D. Kruep, M. Cartier, R. J. Linhardt, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1996**, *85*, 45-51.
- [143] A. Liang, J. N. Thakkar, U. R. Desai, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2010**, *99*, 1207-1216.
- [144] R. A. Al-Horani, U. R. Desai, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 2907-2918.
- [145] M. Dantuluri, G. T. Gunnarsson, M. Riaz, H. Nguyen, U. R. Desai, *Analytical Biochemistry* **2005**, *336*, 316-322.
- [146] R. O. Mumma, *Lipids* **1966**, *1*, 221-223.
- [147] V. Nair, S. Bernstein, *Organic Preparations and Procedures International* **1987**, *19*, 466-467.
- [148] J. P. Dusza, J. P. Joseph, S. Bernstein, *Steroids* **1985**, *45*, 303-315.
- [149] K. Kitagawa, C. Aida, H. Fujiwara, T. Yagami, S. Futaki, M. Kogire, J. Ida, K. Inoue, *The Journal of organic chemistry* **2001**, *66*, 1-10.
- [150] J.-C. Lee, X.-A. Lu, S. S. Kulkarni, Y.-S. Wen, S.-C. Hung, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 476-477.
- [151] S. E. Tully, R. Mabon, C. I. Gama, S. M. Tsai, X. Liu, L. C. Hsieh-Wilson, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 7736-7737.
- [152] T. Young, L. L. Kiessling, *Angewandte Chemie* **2002**, *114*, 3599-3601.
- [153] H. P. Wessel, S. Bartsch, *Carbohydrate Research* **1995**, *274*, 1-9.
- [154] M. Baier, J. L. Ruppertz, M. M. Pfeleiderer, B. S. Blaum, L. Hartmann, *Chemical Communications* **2018**, *54*, 10487-10490.
- [155] C. Gerke, F. Jacobi, L. E. Goodwin, F. Pieper, S. Schmidt, L. Hartmann, *Macromolecules* **2018**, *51*, 5608-5619.
- [156] J. S. Materlik, *Bachelorarbeit* **2016**.
- [157] R. Liu, C. Chanthamontri, H. Han, J. M. Hernández-Torres, K. V. Wood, S. A. McLuckey, A. Wei, *The Journal of Organic Chemistry* **2008**, *73*, 6059-6072.
- [158] S. V. Campos, L. P. Miranda, M. Meldal, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **2002**, 682-686.
- [159] K. A. Janus, *Bachelorarbeit* **2016**.

- [160] J. L. Kice, J. M. Anderson, *Journal of the American Chemical Society* **1966**, *88*, 5242-5245.
- [161] Y. Liu, I.-F. F. Lien, S. Ruttgaizer, P. Dove, S. D. Taylor, *Organic letters* **2004**, *6*, 209-212.
- [162] K. Warabi, S. Matsunaga, R. W. M. van Soest, N. Fusetani, *The Journal of Organic Chemistry* **2003**, *68*, 2765-2770.
- [163] L. J. Ingram, S. D. Taylor, *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45*, 3503-3506.
- [164] D. Pla Queral, K. Mills, J. A. Joule, F. Albericio Palomera, M. Álvarez Domingo, *Arkivoc*, *2009*, vol. 2009, num. 6, p. 260-269 **2009**.
- [165] A. Fürstner, M. M. Domostoj, B. Scheiper, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 11620-11621.
- [166] A. Raghuraman, M. Riaz, M. Hindle, U. R. Desai, *Tetrahedron Letters* **2007**, *48*, 6754-6758.
- [167] V. B. Krylov, N. E. Ustyuzhanina, A. A. Grachev, N. E. Nifantiev, *Tetrahedron Letters* **2008**, *49*, 5877-5879.
- [168] W. Chai, J. Luo, C. K. Lim, A. M. Lawson, *Analytical Chemistry* **1998**, *70*, 2060-2066.
- [169] B. Kuberan, M. Lech, L. Zhang, Z. L. Wu, D. L. Beeler, R. D. Rosenberg, *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 8707-8718.
- [170] C. Thanawiroon, K. G. Rice, T. Toida, R. J. Linhardt, *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 2608-2615.
- [171] J. Zaia, C. E. Costello, *Analytical Chemistry* **2001**, *73*, 233-239.
- [172] M. L. Trehly, J. C. Reepmeyer, R. E. Kolinski, B. J. Westenberger, L. F. Buhse, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2009**, *49*, 670-673.
- [173] M. Sammalkorpi, M. Karttunen, M. Haataja, *The Journal of Physical Chemistry B* **2009**, *113*, 5863-5870.
- [174] H. Yan, S.-L. Yuan, G.-Y. Xu, C.-B. Liu, *Langmuir* **2010**, *26*, 10448-10459.
- [175] S. Enders, G. Bernhard, A. Zakrzewicz, R. Tauber, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2007**, *1770*, 1441-1449.
- [176] J. M. Weiler, R. E. Edens, R. J. Linhardt, D. P. Kapelanski, *The Journal of Immunology* **1992**, *148*, 3210-3215.
- [177] H. Türk, R. Haag, S. Alban, *Bioconjugate Chemistry* **2004**, *15*, 162-167.
- [178] J. Hirsh, T. E. Warkentin, R. Raschke, C. Granger, E. M. Ohman, J. E. Dalen, *CHEST* **1998**, *114*, 489S-510S.
- [179] I. Sinaida, R. Susanna, M. Anne, K. Katharina, B. Sophia, F. Claudia, L. T. K., W. Marcus, H. Laura, *Macromolecular Bioscience* **2017**, *17*, 1700198.
- [180] L. Soria-Martinez, S. Bauer, M. Giesler, S. Schelhaas, J. Materlik, K. A. Janus, P. Pierzyna, M. Becker, N. L. Snyder, L. Hartmann, *Journal of the American Chemical Society* **2020**.
- [181] T. R. Broutian, S. A. Brendle, N. D. Christensen, *J Gen Virol* **2010**, *91*, 531-540.
- [182] C. Cerqueira, Y. Liu, L. Kühling, W. Chai, W. Hafezi, T. H. van Kuppevelt, J. E. Kühn, T. Feizi, M. Schelhaas, *Cellular microbiology* **2013**, *15*, 1818-1836.
- [183] M. Feldbrügge, R. Kellner, K. Schipper, *Applied Microbiology and Biotechnology* **2013**, *97*, 3253-3265.
- [184] J. Aschenbroich, K. P. Hussnaetter, P. Stoffels, T. Langner, S. Zander, B. Sandrock, M. Bölker, M. Feldbrügge, K. Schipper, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* **2019**, *1867*, 140154.
- [185] M. Reindl, S. Hänsch, S. Weidtkamp-Peters, K. Schipper, *International journal of molecular sciences* **2019**, *20*, 460.
- [186] J. Stock, P. Sarkari, S. Kreibich, T. Brefort, M. Feldbrügge, K. Schipper, *Journal of biotechnology* **2012**, *161*, 80-91.

- [187] M. Terfrüchte, S. Wewetzer, P. Sarkari, D. Stollewerk, M. Franz-Wachtel, B. Macek, T. Schlepütz, M. Feldbrügge, J. Büchs, K. Schipper, *Journal of biotechnology* **2018**, *284*, 37-51.
- [188] M. Terfrüchte, M. Reindl, S. Jankowski, P. Sarkari, M. Feldbrügge, K. Schipper, *International Journal of Molecular Sciences* **2017**, *18*, 937.
- [189] C. S. Wright, *Journal of Molecular Biology* **1987**, *194*, 501-529.
- [190] C. S. Wright, *Journal of Biological Chemistry* **1992**, *267*, 14345-14352.

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: William Henry Howell (oben) ^[1] und Jay McLean (unten) ^[2]	1
Abbildung 2: Vier Hauptklassen der Glycosaminoglykane.	4
Abbildung 3: Nach Lindahl et al. randomisierte, posttranslationale Modifikation von Heparin-Proteoglykanen ^[71] . (a) N-Deacetylase (b) N-Sulfotransferase (c) Uronosyl-C5-Epimerase (d) O-Sulfotransferase.	6
Abbildung 4: Das hochaktive Pentasaccharid Fondaparinux. Hervorgehoben sind die Sulfatgruppen (rot), Stickstoffatome des Glucosamins (grün) und Carbonsäuren (blau).	7
Abbildung 5: Beispiele von GAG-Mimetika Polymeren. In Anlehnung an: Paluck et al. "Heparin-Mimicking Polymers: Synthesis and Biological Applications". ^[101]	10
Abbildung 6: Synthese von TDS. (a) Trt-Cl, TFAOEt (b) 4-Pentinsäure + PyBOP (c) KOH in MeOH, Fmoc-Cl (d) Trifluoroessigsäure (e) Bernsteinsäureanhydrid, Triethylamin. Analog EDS. ^[3]	13
Abbildung 7: Festphasensynthese von Glycooligomeren. Beschrieben anhand eines Mannoseglycooligomers nach Ponader et al. ^[3]	14
Abbildung 8: Beispiel der Reaktion eines unbestimmten Alkohols (R) mit Trimethylamin-Schwefeltrioxid (TMA*SO ₃).	16
Abbildung 9: Schematische Darstellung der optionalen Syntheserouten für das gewünschte sulfatisierte Oligomer.	21
Abbildung 10: Synthese von peracetyliertem N-Acetylglucosamin-β-azid (1), OAc-GlcNAc-N ₃ . ^[4-5]	23
Abbildung 11: OAc-Entschützung von peracetyliertem GlcNAc-Azid.	25
Abbildung 12: Sulfatisierung von GlcNAc-N ₃ nach Optimierung der Bedingungen.	27
Abbildung 13: FTIR-Spektrum von Verbindung 2 (oben) und 3 (unten).	30
Abbildung 14: ESI-MS von 3 (C ₈ H ₁₁ N ₄ Na ₃ O ₁₄ S ₃ , 551,91 g/mol) mit H ₂ O/MeCN (95/5 v/v) als Eluent. Gefundene Massereferenz 528. 8 für [M-Na ⁺]. *Einige Signale konnten nicht genau identifiziert werden.	32
Abbildung 15: Durch Ameisensäure bedingte Desulfatisierung bei der ESI-MS Analyse von 3	33
Abbildung 16: Vorgeschlagener Mechanismus der Abspaltung von Stickstoffwasserstoffsäure im ESI-MS.	33
Abbildung 17: ¹ H-NMR von Verbindung 3 (600 MHz, D ₂ O). Vergrößert sind die Signale, welche durch die Ringprotonen A-G verursacht werden. Die Kopplungskonstanten J [Hz] können für alle Protonen zugeordnet werden und deuten zum Teil konformative Auswirkungen an, die sich durch die Sulfatisierung ergeben.	35
Abbildung 18: SAX-HPLC von Verbindung 2 und 3 im Vergleich mit Uridinmonophosphat und Heparin dp2 ¹ und Phosphatpuffer (pH 7) als Laufmittel.	37
Abbildung 19: Synthese von GlcNAc-Oligomeren, beschrieben Anhand GlcNAc-Oligomer O9	39
Abbildung 20: ESI-MS-Spektrum von O9 . Fragmentor 100 Volt, 0,1 % Ameisensäure. Zur Erläuterung siehe Abbildung 21. (Tabellarische Darstellung der Fragmente: siehe experimentellen Teil).	43
Abbildung 21: Protoneninduzierte Fragmentierung von GlcNAc-Glycooligomeren im ESI-MS.	44
Abbildung 22: ESI-MS-Spektrum von O12 . Oben eine stark fragmentierende Aufnahme mit 100 Volt Fragmentorspannung und 0,1 % Ameisensäure. Unten eine stark verbesserte Messung mit 40 Volt Spannung, ohne Einsatz von Ameisensäure.	45
Abbildung 23: Darstellung der TBA-Stabilisierung nach Sulfatisierung von O9 an der festen Phase und anschließende Abspaltung mit 90 Vol.-%iger TFA-Lösung.	47
Abbildung 24: Bildung einer 2,2,2-Trichloroethylsulfat (TCES) Gruppe nach Liu et al. ^[161]	48
Abbildung 25: ESI-MS des bei der Reaktion von TCES-Cl mit GlcNAc-Azid (2) unter Einsatz von DMAP entstandenen Salzes. Dieses Salz führte nicht zur Entstehung von TCES-Schutzgruppen am Saccharid, wie ähnlich von Ingram et al. mit Imidazoliumsalzen beschrieben wird ^[163] . Die gefundenen Fragmente korrelieren mit ¹ H-NMR Ergebnissen.	49

Abbildung 26: Klickreaktion mit sulfatisiertem GlcNAc (3) und alkinhaltigem Oligomer (O8) in Lösung. (a) 20 mM NaOMe in Methanol (b) 5 äq. TMA*SO ₃ , DMF, 18h, 70 °C (c) 3 äq. GlcNAc-S, 1,3 äq Cu(II)SO ₄ , 1,3 äq Na-Ascorbat.	50
Abbildung 27: Vorgeschlagene Eliminierungsreaktion des per ESI-MS-Analyse detektierten Produkts aus der Mikrowellen-assistierten Sulfatisierung von O9	53
Abbildung 28: Sulfatisierung von O9 in DMF unter optimierten Bedingungen.	54
Abbildung 29: FT-IR-Spektrum von O9-S1	55
Abbildung 30: ¹ H-NMR-spektroskopischer Vergleich zwischen O9 und O9-S1 (600 MHz, D ₂ O).	56
Abbildung 31: Vorgeschlagene Sulfatisierung des C-terminalen Amids der Tentagel S [®] RAM synthetisierten GlcNAc-Oligomere.	57
Abbildung 32: ESI-MS-Spektren von O9-S1 (oben) und v on O12-S unter verschiedenen Bedingungen (mittig, unten).	60
Abbildung 33: ESI-MS detektierte Fragmente von O12-S (vgl. Abbildung 32). Die Position der nicht umgesetzten OH-Gruppen kann dabei variieren.	61
Abbildung 34: SAX-HPLC der sulfatisierten Oligomere O9-S1 , O11-S und O12-S . Elutionsgradient: 1,5-30 Vol.-% Acetonitril bei 40-800 mM NaCl.	63
Abbildung 35: Größe zu Volumen Verteilung aus der dynamischen Lichtstreuung von O12-S , gemessen in drei verschiedenen Puffern.	65
Abbildung 36: Schematische Darstellung der HPV-Inhibierungsstudien mit sulfatisierten GlcNAc-Glycooligomeren. Das jeweilige Oligomer wird mit HPV inkubiert und anschließend mit HeLa-Zellen kombiniert. Zum Schluss wird die Infektionsrate der Zellen überprüft.	71
Abbildung 37: Inkubation von HPV-16 mit den sulfatisierten Oligomeren und daraus untersuchte relative Infektion von HeLa-Zellen. (a) Grad der Sulfatisierung; relativer Anteil der vollständig OH-Gruppen umgesetzten Oligomere (¹ H-NMR). (b) Infektion der HeLa-Zellen mit HPV-16 bezogen auf die Rate ohne vorherige Inkubation mit Inhibitoren. Angegeben sind die Mittelwerte des Experiments.	72
Abbildung 38: Sulfatisierte Mannose- und Galactosepolymere ¹ , welche ebenfalls in den Inhibierungsstudien mit HPV-16 eingesetzt wurden. Die unsulfatisierten Polymerer wurden von Markus Giesler zu Verfügung (Institut für Makromolekulare Chemie, Prof. Hartmann, HHU Düsseldorf) gestellt. 73	
Abbildung 39: Seed-Over von O10-S -inkubiertem HPV-16 mit NaClO ₃ -behandelten HaCaT-Zellen bei verschiedenen Oligomerkonzentrationen.	74
Abbildung 40: Kupplung von GlcNAc-Octamer an NHS-aktivierte, magnetische Nickelbeads.	76
Abbildung 41: SDS PAGE Bindungsstudien der Interaktion zwischen Cts1 und kommerziellen Chitinbeads, sowie O13 -Nickelbeads, durchgeführt von Kai Hußnätter. (a) Inputkontrolle des eingesetzten Cts1. (b) Ungebundenes Protein nach Inkubation. (c) Waschfraktionen nach Inkubation. (d) 200 µl kombinierte und aufkonzentrierte pH 2 Eluierungsfraktionen. (e) Reine 20 µl pH 2 Eluierungsfraktion. (f) Fraktion der Beads nach Aufkochen mit Laemmli/NaOH-Puffer (95 °C).	78
Abbildung 42: SDS-PAGE Bindungsstudien der Interaktion zwischen A) GlcNAc-Oligomer-Nickelbeads (O13 -NB) und WGA, sowie zwischen B) Chitinbeads (Chitin-B) und Cts1, durchgeführt von Kai Hußnätter. (a) Inputkontrolle mit 10 µg Protein. (b) Durchlauf des nicht gebundenen Proteins. (c) Waschfraktionen nach Inkubation. (d) Letzte Waschfraktion als Nachweis über vollständige Entfernung des Überstandes. (e) Die Beads wurden sofort durch Auskochen mit Laemmli -Puffer bei 95 °C eluiert.	80
Abbildung 43: SDS-PAGE der kompetitiven Hemmung zwischen WGA, bzw. Cts1 und O13 , bzw. GlcNAc zu chitinmodifizierten, magnetischen Beads, durchgeführt von Kai Hußnätter. (a) Inputkontrolle mit 10 µg Protein. (b) Durchlauf des nicht gebundenen Proteins. (c) Waschfraktionen nach Inkubation. (d) Letzte Waschfraktion als Nachweis über vollständige Entfernung des Überstandes. (e) Die Beads wurden sofort durch Auskochen mit Laemmli/NaOH-Puffer bei 95 °C eluiert. (f) CBB-gefärbter Proteinstandard zur Konzentrationskalibrierung per RGB-Abgleich. Die Zahlen unter den Banden stehen für die berechneten Mengen in µg.	82
Abbildung 44: ¹ H-NMR (600 MHz, CDCl ₃) Von Verbindung 1	93
Abbildung 45: Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe an der Festphase.	97
Abbildung 46: Beispiel einer Bausteinkupplung anhand des TDS-Bausteins.	98
Abbildung 47: Beispiel einer Acetylierung anhand einer endständigen TDS-Einheit.	98

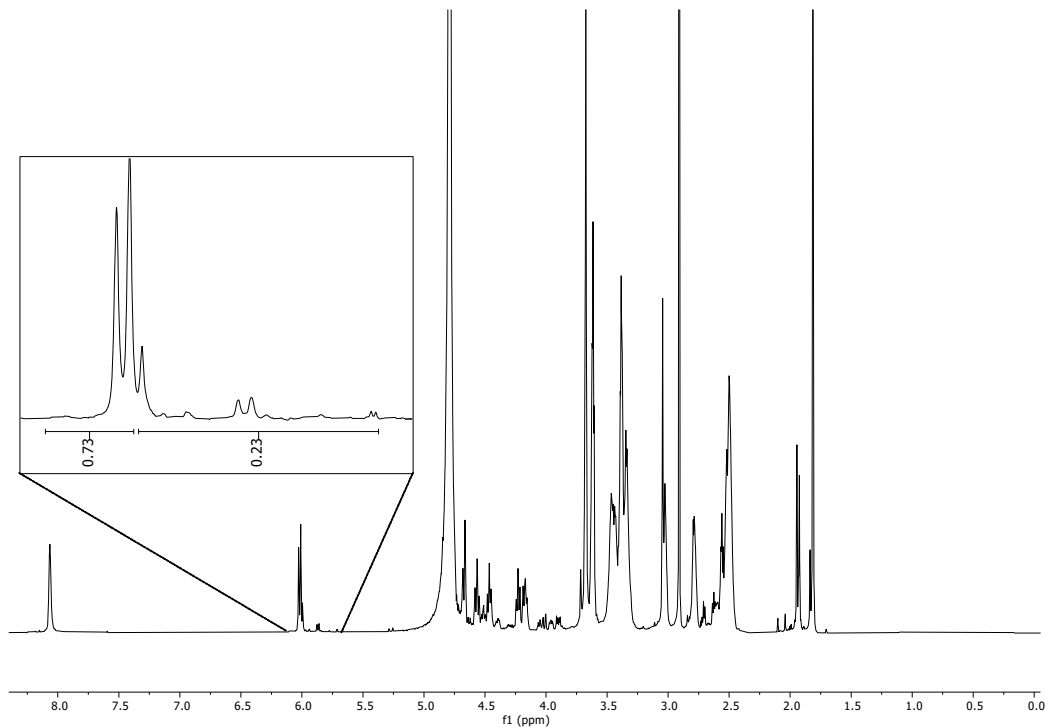
Abbildung 48: Beispiel einer Klickreaktion eines alkinhaltigen Oligomers mit OAc-GlcNAc-N ₃ (1)	99
Abbildung 49: Beispiel der OAc-Entschützung nach Kupfer-Klick-Reaktion	99
Abbildung 50: RP-HPLC von Verbindung O8 . Bedingungen. MeCN (5% in Wasser) zu MeCN (50% in Wasser), 0,1% Ameisensäure in 30 Minuten. Variabler Wellenlängendetektor (VWD) 214 nm. Relative Reinheit >95 %	106
Abbildung 51: ¹ H-NMR (600 MHz, D ₂ O) Von Verbindung O9	107
Abbildung 52: UHR-MS von Verbindung O9	108
Abbildung 53: ESI-MS von Verbindung O9	109
Abbildung 54: RP-HPLC von Verbindung O9 . Bedingungen. MeCN (5% in Wasser) zu MeCN (50% in Wasser), 0,1% Ameisensäure in 30 Minuten. Variabler Wellenlängendetektor (VWD) 214 nm. Relative Reinheit >95 %	109
Abbildung 55: ESI-MS von Glycooligomer O9 . Beispiel der protoneninduzierten Fragmentierung bei der Wahl einer 50:50 Acetonitril-Wasser-Mischung (Vol.) mit 0,1% Ameisensäure als Eluenten. Fragmentorspannung: 100 V. Rot dargestellt ist das unfragmentierte Oligomer	110
Abbildung 56: ¹ H-NMR (600 MHz, D ₂ O) Von Glycooligomer O10	111
Abbildung 57: UHR-MS von Glycooligomer O10 [M+4H] ⁴⁺	112
Abbildung 58: ESI-MS von Glycooligomer O10	113
Abbildung 59: RP-HPLC von Verbindung O10 . Bedingungen. MeCN (5% in Wasser) zu MeCN (50% in Wasser), 0,1% Ameisensäure in 30 Minuten. Variabler Wellenlängendetektor (VWD) 214 nm. Relative Reinheit >95 %	113
Abbildung 60: ¹ H-NMR (600 MHz, D ₂ O) Von Verbindung O11	114
Abbildung 61: UHR-MS von Glycooligomer O11 [M+4H] ⁴⁺	115
Abbildung 62: ESI-MS von Glycooligomer O11	116
Abbildung 63: RP-HPLC von Verbindung O11 . Bedingungen. MeCN (5% in Wasser) zu MeCN (50% in Wasser), 0,1% Ameisensäure in 30 Minuten. Variabler Wellenlängendetektor (VWD) 214 nm. Relative Reinheit >95 %	116
Abbildung 64: ¹ H-NMR (600 MHz, D ₂ O) Von Verbindung O12	117
Abbildung 65: UHR-MS von Glycooligomer O12 [M+5H] ⁵⁺	118
Abbildung 66: ESI-MS von Glycooligomer O12	119
Abbildung 67: RP-HPLC von Verbindung O12 . Bedingungen. MeCN (5% in Wasser) zu MeCN (50% in Wasser), 0,1% Ameisensäure in 30 Minuten. Variabler Wellenlängendetektor (VWD) 214 nm. Relative Reinheit >95 %	119
Abbildung 68: ¹ H-NMR (600 MHz, D ₂ O) Von Verbindung O13	120
Abbildung 69: ESI-MS von Glycooligomer O13	121
Abbildung 70: RP-HPLC von Verbindung O13 . Bedingungen. MeCN (5% in Wasser) zu MeCN (50% in Wasser), 0,1% Ameisensäure in 30 Minuten. Variabler Wellenlängendetektor (VWD) 214 nm. Relative Reinheit >95 %	122
Abbildung 71: ¹ H-NMR (600 MHz, D ₂ O) von Ansatz #2 der Festphasensulfatisierung von O9	124
Abbildung 72: RP-HPLC (5-95% Acetonitril, 0,1% Ameisensäure in 10 min) von Ansatz #2 der TCES-Cl-Umsetzung mit Oligomer O4	127
Abbildung 73: Geplante Umsetzung von 2 mit TCES-Cl.....	127
Abbildung 74: ¹ H-NMR (300 MHz, DMSO-d ₆) der DMAP-TCES-Addukte aus der Umsetzung von 2 mit TCES-Cl	128
Abbildung 75: ESI-MS-Spektrum der DMAP-TCES-Addukte aus der Umsetzung von 2 mit TCES-Cl	128
Abbildung 76: ¹ H-NMR (600 MHz, D ₂ O) des Produktes aus der Umsetzung von O8 mit 3 in Lösung.....	130
Abbildung 77: Sulfatisierungsbedingung am Beispiel der Sulfatisierung von O10	131
Abbildung 78: ¹ H-NMR (600 MHz, D ₂ O) von O9-S1	132
Abbildung 79: ESI-MS von O9-S1	133
Abbildung 80: SAX-HPLC von O9-S1 (60 % MeCN, 40 % H ₂ O, Phosphatpuffer pH 7, isokratisch in 30 Minuten)	134
Abbildung 81: ¹ H-NMR (600 MHz, D ₂ O) von O9-S2	134
Abbildung 82: ESI-MS von O9-S2	135

Abbildung 83: SAX-HPLC von O9-S2 (0-5 min 40 mM NaCl, 1,5 % MeCN; 5-40 min linearer Gradient zu 30 % MeCN, 800 mM NaCl und 30 % MeCN; 40-60 min 800 mM NaCl und 30% MeCN um komplette Eluation zu gewährleisten; Detektor: VWD 214 nm).....	136
Abbildung 84: ¹ H-NMR (600 MHz, D ₂ O) von O9-S3	137
Abbildung 85: ESI-MS von O9-S3	138
Abbildung 86: SAX-HPLC von O9-S3 (0-5 min 40 mM NaCl, 1,5 % MeCN; 5-40 min linearer Gradient zu 30 % MeCN, 800 mM NaCl und 30 % MeCN; 40-60 min 800 mM NaCl und 30% MeCN um komplette Eluation zu gewährleisten; Detektor: VWD 214 nm).	139
Abbildung 87: ¹ H-NMR (600 MHz, D ₂ O) von O10-S	140
Abbildung 88: ESI-MS von O10-S . Die m/z-Signale 853,3, 870,9 und 902,2 konnten nicht zugeordnet werden.	141
Abbildung 89: SAX-HPLC von O10-S (0-5 min 40 mM NaCl, 1,5 % MeCN; 5-40 min linearer Gradient zu 30 % MeCN, 800 mM NaCl und 30 % MeCN; 40-60 min 800 mM NaCl und 30% MeCN um komplette Eluation zu gewährleisten; Detektor: VWD 214 nm).....	141
Abbildung 90: ¹ H-NMR (600 MHz, D ₂ O) von O11-S	142
Abbildung 91: ESI-MS von O11-S	143
Abbildung 92: SAX-HPLC von O11-S (0-5 min 40 mM NaCl, 1,5 % MeCN; 5-40 min linearer Gradient zu 30 % MeCN, 800 mM NaCl und 30 % MeCN; 40-60 min 800 mM NaCl und 30% MeCN um komplette Eluation zu gewährleisten; Detektor: VWD 214 nm).....	143
Abbildung 93: ¹ H-NMR (600 MHz, D ₂ O) von O12-S	144
Abbildung 94: ESI-MS von O12-S unter verschiedenen Bedingungen zur Fragmentierung der sulfatisierten Zucker.....	145
Abbildung 95: SAX-HPLC von O12-S (0-5 min 40 mM NaCl, 1,5 % MeCN; 5-40 min linearer Gradient zu 30 % MeCN, 800 mM NaCl und 30 % MeCN; 40-60 min 800 mM NaCl und 30% MeCN um komplette Eluation zu gewährleisten; Detektor: VWD 214 nm).....	146
Abbildung 96: Partielle Thromboplastinzeiten der Strukturen O9-S2 , O11 , O11-S und O-12 im Vergleich zu Heparin. Ausgewertet von Dr. Kim Silberreis.....	149
Abbildung 97: Dosis-Reaktionskurve aus dem SPR-L-Selektin Experiment mit den Strukturen O9-S2 , O11 , O11-S und O12-S . Ausgewertet von Dr. Kim Silberreis.....	150
Abbildung 98: Inhibierung der Komplementaktivität in % der Strukturen O9-S2 , O11 , O11-S und O-12-S im Vergleich zu Heparin. Ausgewertet von Dr. Kim Silberreis.....	151

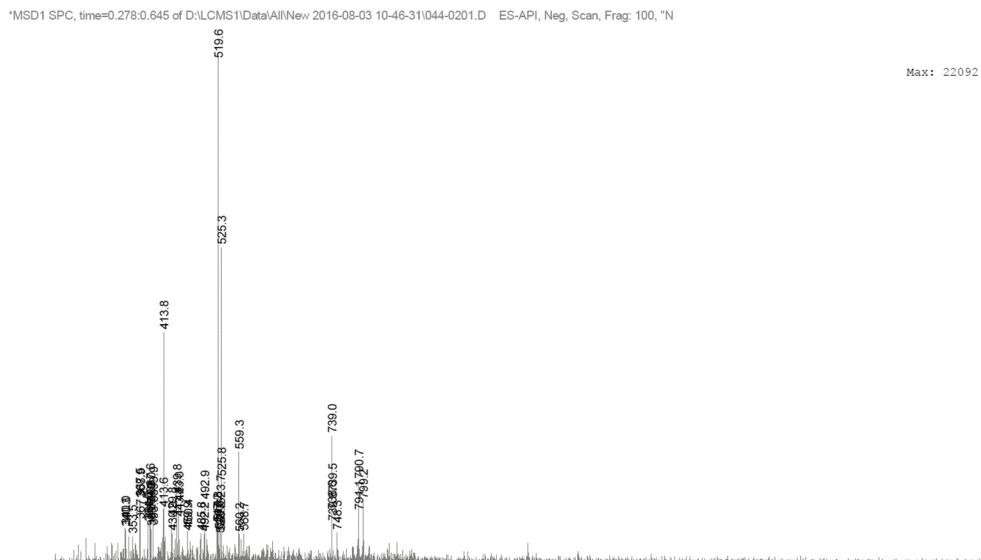
6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ansätze zur Optimierung der Sulfatisierung von GlcNAc-N ₃ (2).....	26
Tabelle 2: Kopplungskonstanten von nicht sulfatisiertem und sulfatisiertem N-Acetylglucosamin (GlcNAc) (300 MHz ¹ H-NMR, D ₂ O).	36
Tabelle 3: Synthetisierte (Glyco-)Oligomere. O2 wurde von Kevin Janus (Bachelorarbeit) synthetisiert. ^[159]	41
Tabelle 4: Reaktionsbedingungen der Sulfatisierung in DMF und dazugehöriger Anteil vollständig sulfatisierten Oligomers im finalen Produkt.	58
Tabelle 5: Berechnete und gefundene m/z Werte für 6- und 7-fach sulfatisiertes N-Acetylglucosaminoligomer O9 (vgl. Abbildung 32 , oben).....	61
Tabelle 6: Partielle Thromboplastinzeit und mittlere inhibitorische Konzentration (IC ₅₀) der L-Selektin-Inhibitionsstudien von sulfatisierten GlcNAc-Glycooligomeren.	68
Tabelle 7: Zur Oligomersynthese verwendete Harze.	97
Tabelle 8: Harze und deren Abspaltbedingungen.....	100
Tabelle 9: Strukturelle Übersicht und Fragmente von O9 bei den in Abbildung 55 beschriebenen Bedingungen.	110
Tabelle 10: Verschiedene Sulfatisierungs- und Abspaltbedingungen an der Festphase.....	123
Tabelle 11: ESI-MS-Werte aus Ansatz #2 der Festphasensulfatisierung von O9	124
Tabelle 12: Festphasen-Experimente mit TCES-Cl an Oligomer-modifizierten Harzen.	126
Tabelle 13: Gefundene Massen aus der ESI-MS der Umsetzung von O7 mit 3	129
Tabelle 14: Sulfatisierungsbedingungen zur Synthese von sulfatisierten Glycooligomeren.	131
Tabelle 15: ESI-MS Signalzuordnung für O9-S1 aus Abbildung 79 . Spuren von Sulfatisierungszahlen <6 können vereinzelt gefunden werden. Bei einer 7x Sulfatisierung wird womöglich das primäre Amid sulfatisiert.	133
Tabelle 16: ESI-MS Signalzuordnung für O9-S2 aus Abbildung 82 . Spuren von Sulfatisierungszahlen <5 können vereinzelt gefunden werden. Bei einer 7x Sulfatisierung wird womöglich das primäre Amid sulfatisiert.	136
Tabelle 17: ESI-MS Signalzuordnung für O9-S3 aus Abbildung 85 . Spuren von Sulfatisierungszahlen <6 können vereinzelt gefunden werden. Bei einer 7x Sulfatisierung wird womöglich das primäre Amid sulfatisiert.	138
Tabelle 18: Sulfatisierungsbedingungen der Polymere P1 , P2-1 und P2-2	147

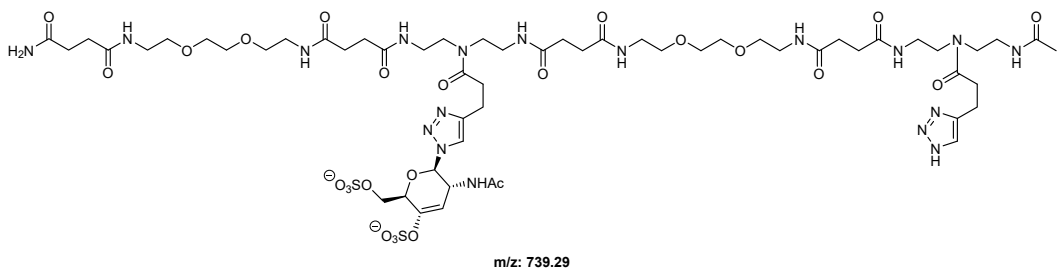
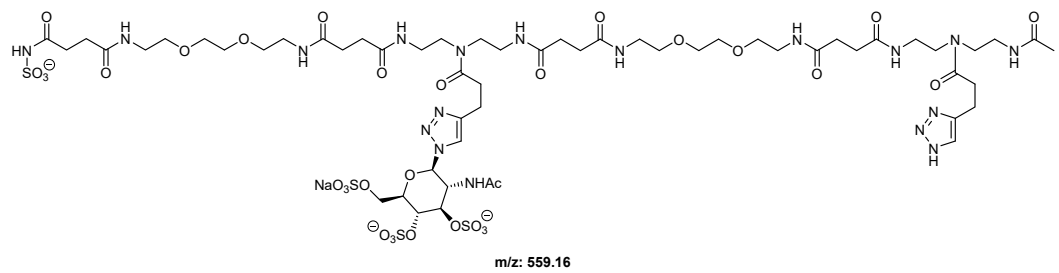
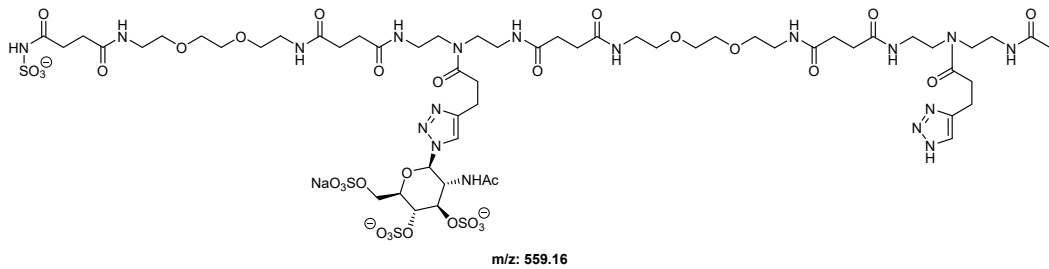
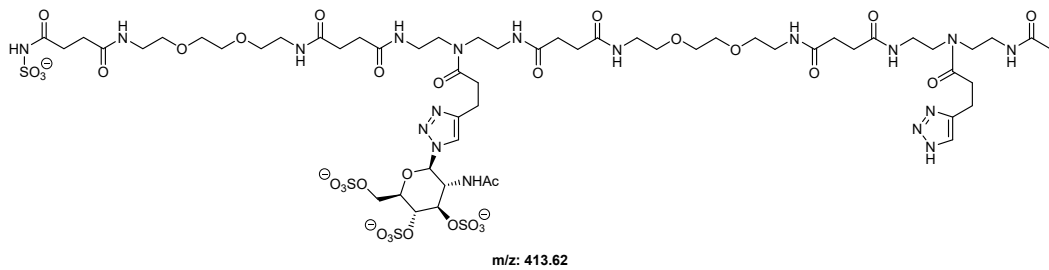
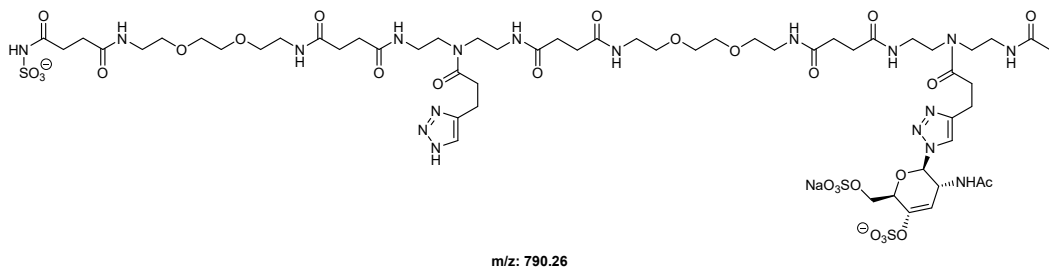
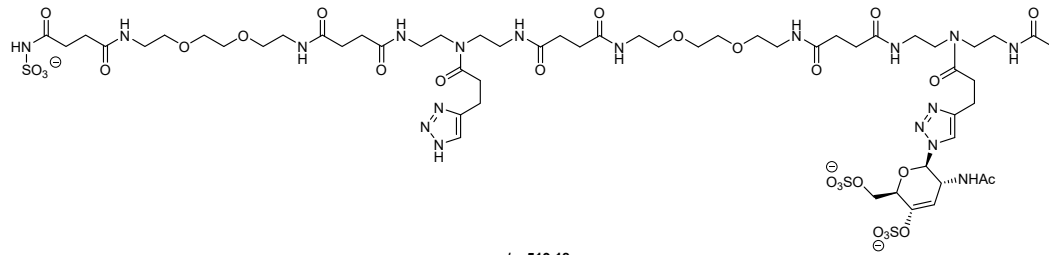
6.4. Graphen und Spektren



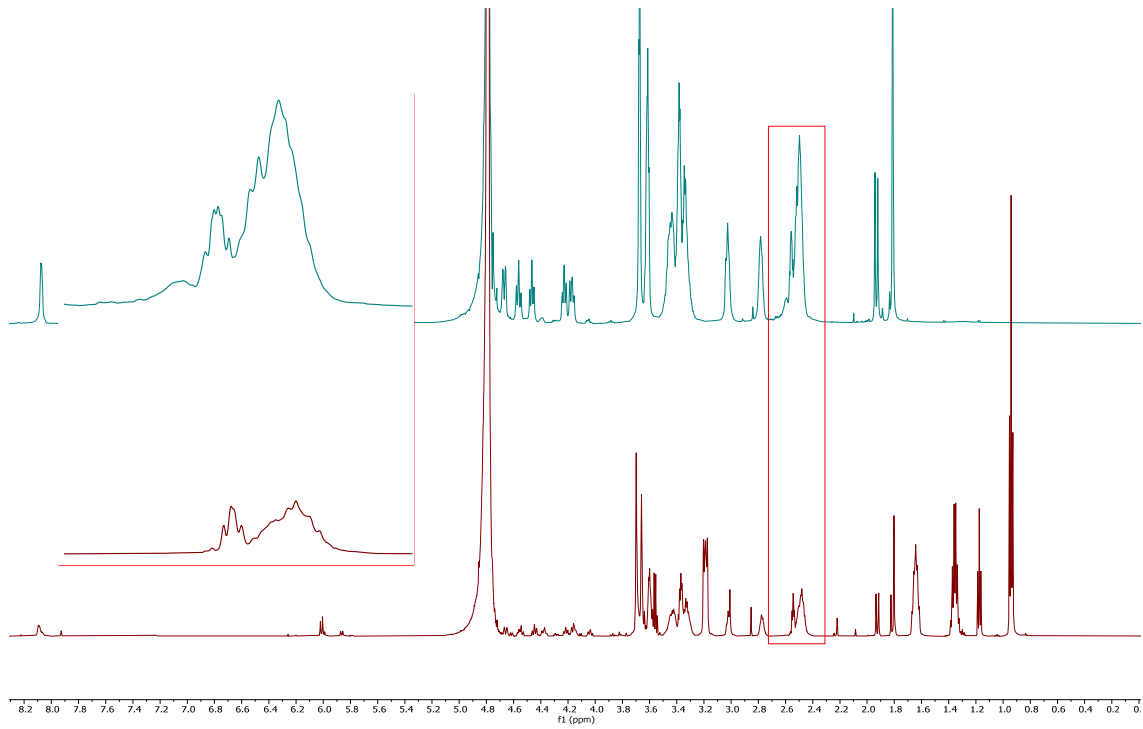
Anhang, Abbildung 1: Zugehöriges ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, D_2O) aus der in Kapitel 3.1.4.3 beschriebenen Umsetzung von **O9** mit einem 12,5-fachen Überschuss $\text{TMA}^+\text{SO}_3^-$ auf jede OH-Gruppe bei 60°C im Ofen für 72 Stunden. In der Vergrößerung der mindestens 23 %-ige Anteil nicht vollständig sulfatisierter Spezies per anomeren Proton zu sehen.



Anhang, Abbildung 2: ESI-MS-Spektrum aus der in Kapitel 3.1.4.3 beschriebenen Mikrowellensynthese nach Raghuraman et al.^[166]. **O9** mit einem 9-fachen Überschuss $\text{TMA}^+\text{SO}_3^-$ auf jede OH-Gruppe und einem 10,8-fachen Überschuss Pyridin als Pyridin/MeCN-Gemisch (1:10 V/V).



Anhang, Abbildung 3: Zu Anhang, Abbildung 2 zugehörige m/z-Interpretationen.

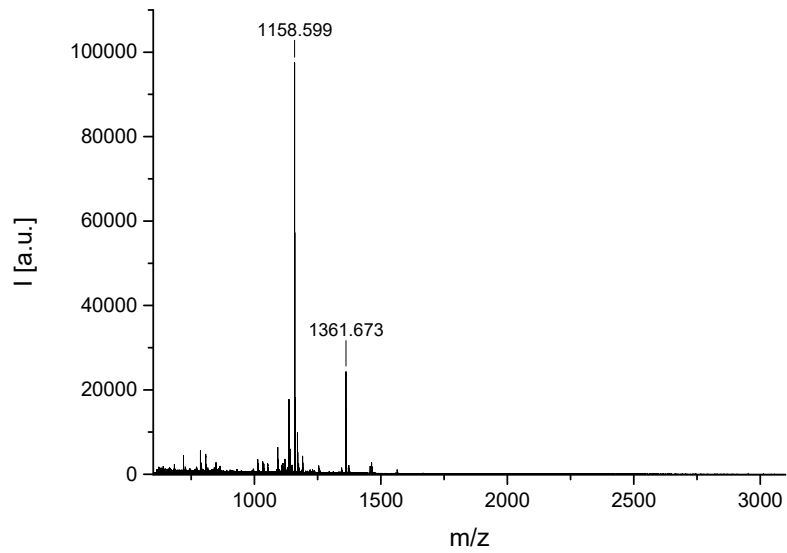


Anhang, Abbildung 4: Gestaffelte ¹H-NMR-Spektren (600 MHz, D₂O) des in Kapitel 3.1.5 beschriebenen Vergleichs zwischen **O9-S1** (olivgrün) und **O9-S1a** (rot).

MALDI-TOF Spektren der Verbindung O9-S unter diversen Bedingungen

#1

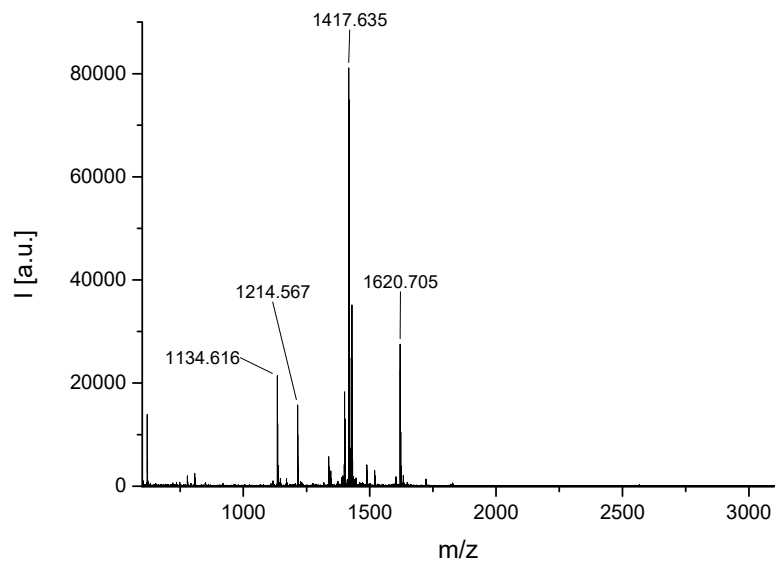
Matrix: 10 Äq. α -Cyano-4-hydroxycimtsäure - Positivmethode



Anhang, Abbildung 5: Maldi-TOF #1

#2

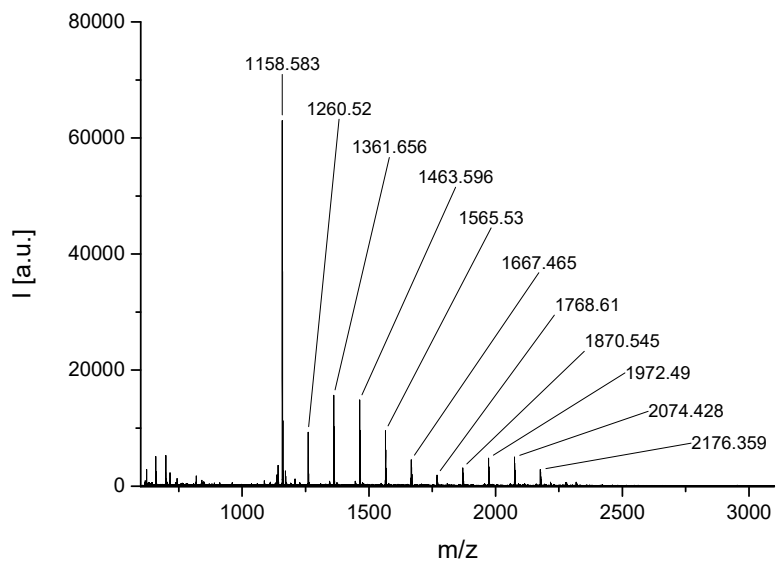
Matrix: 10 Äq. α -Cyano-4-hydroxycimtsäure - Negativmethode



Anhang, Abbildung 6: Maldi-TOF #2

#3

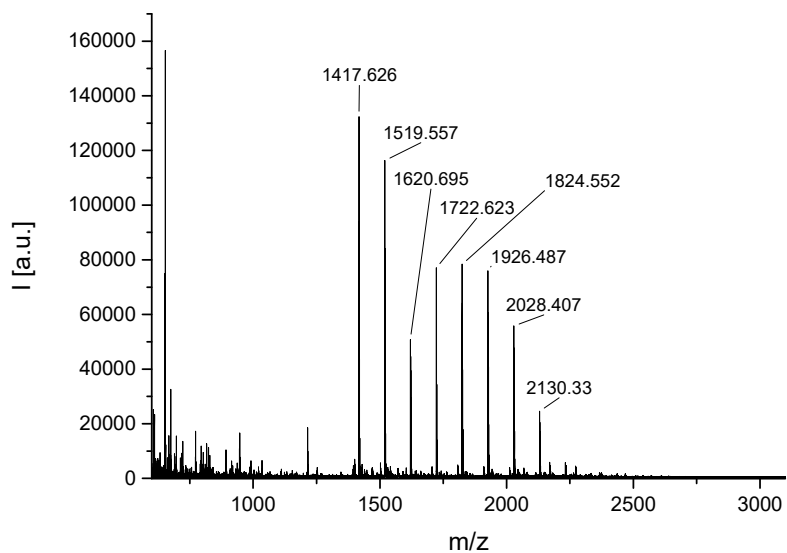
Matrix: 10 Äq. 2,5-Dihydroxybenzoesäure - Positivmethode



Anhang, Abbildung 7: Maldi-TOF #3

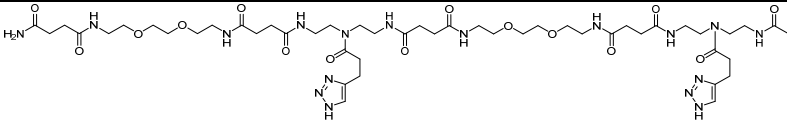
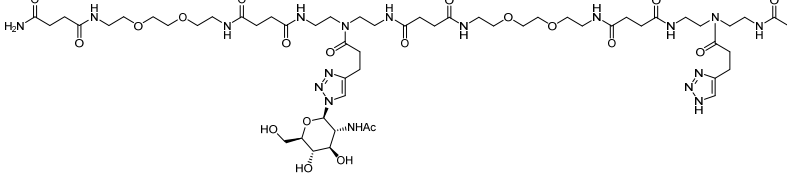
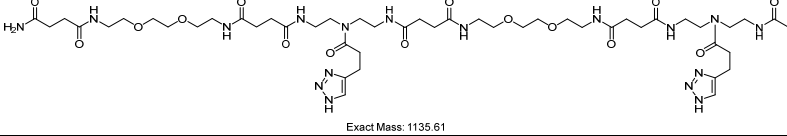
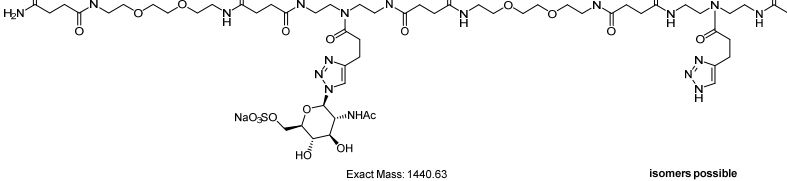
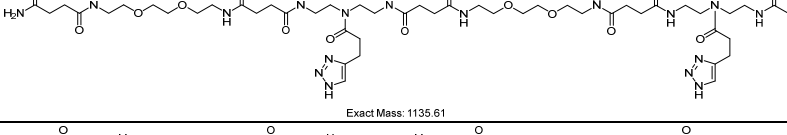
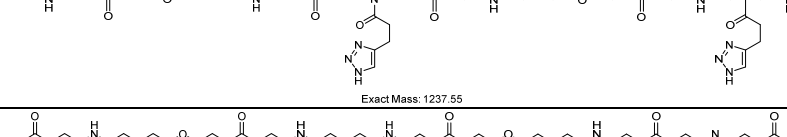
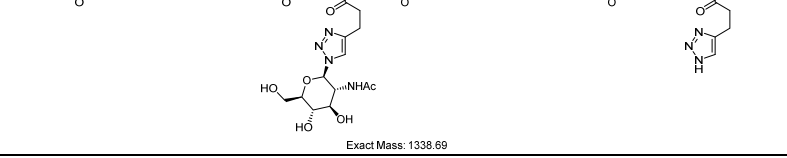
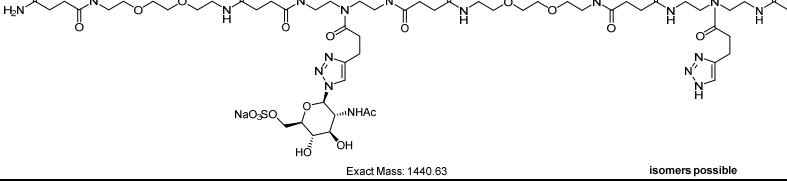
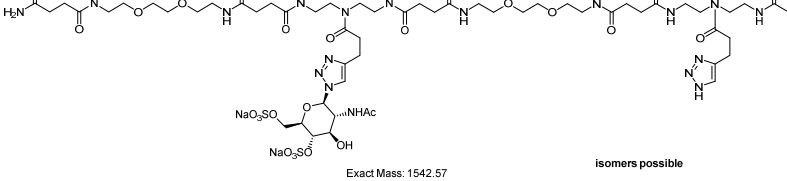
#4

Matrix: 10 Äq. 2,5-Dihydroxybenzoesäure - Negativmethode

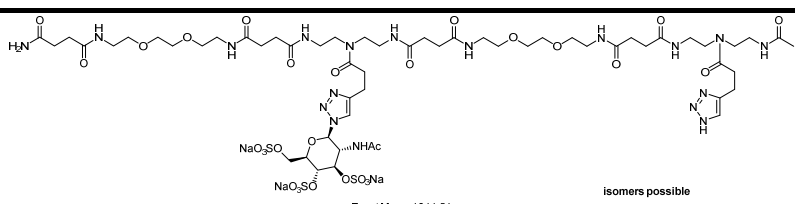
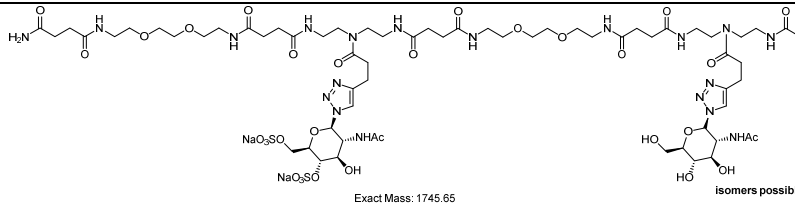
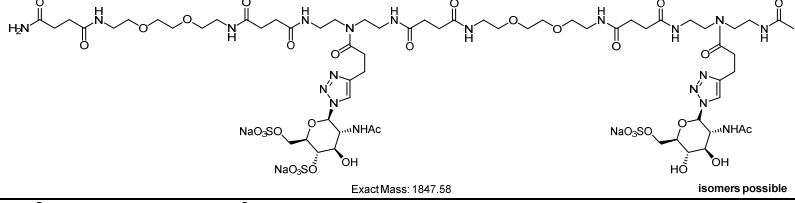
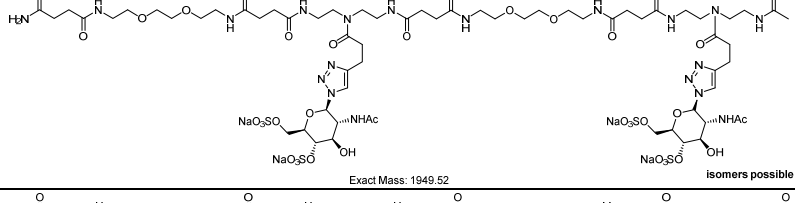
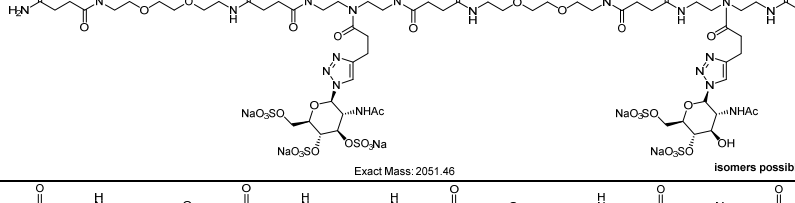
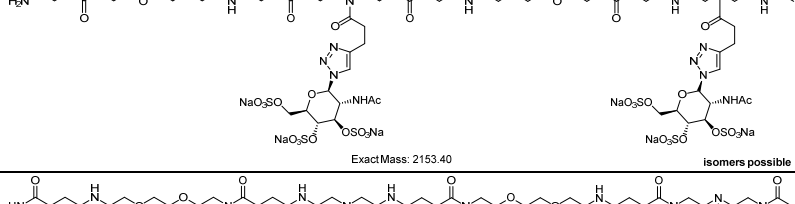
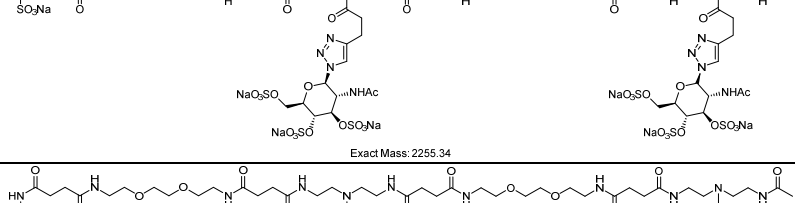
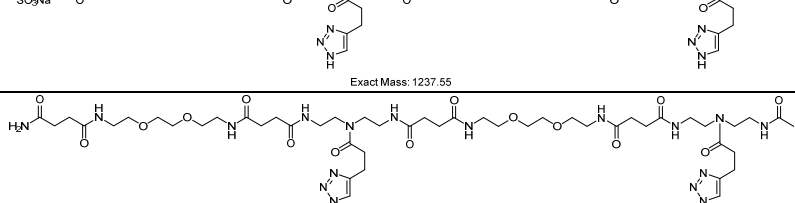
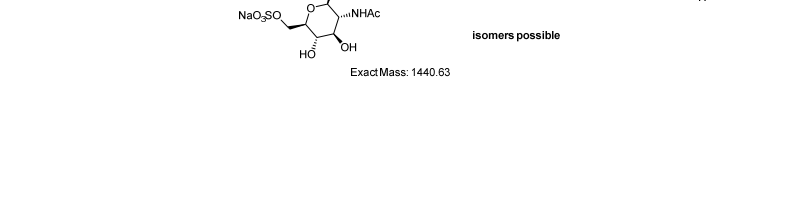


Anhang, Abbildung 8: Maldi-TOF #4

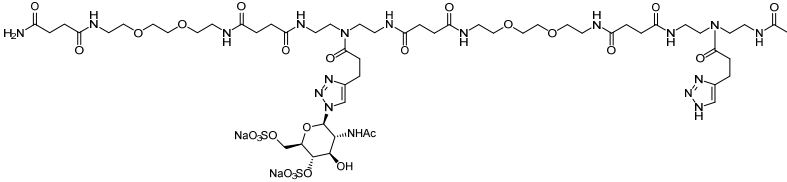
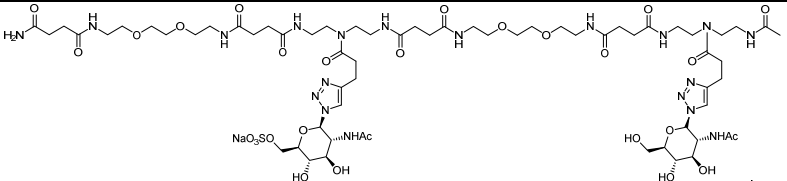
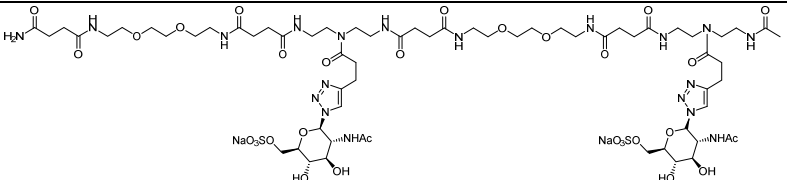
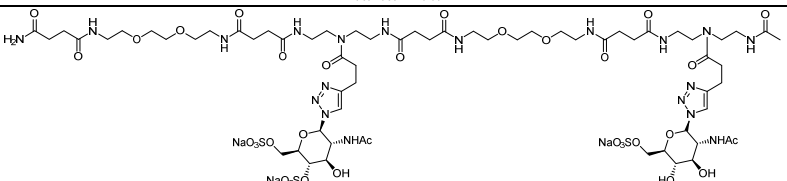
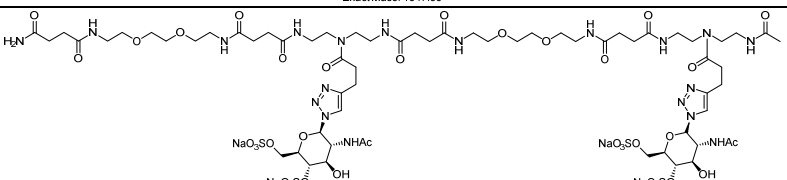
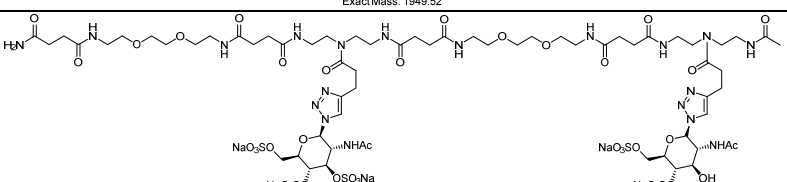
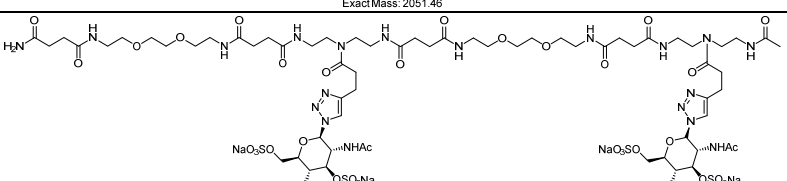
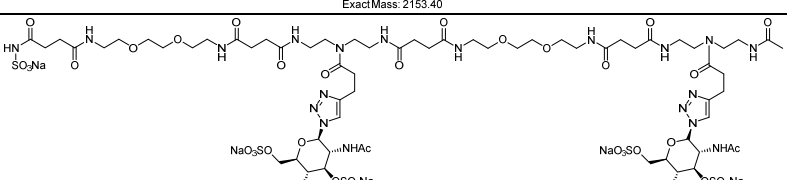
Anhang, Tabelle 1: m/z-Zuweisungen der in Anhang, Abbildung 5 bis Anhang, Abbildung 8 gezeigten MALDI-TOF Spektren von O9-S.

Fraktion [M]	Spektrum #	m/z theor.	m/z gefunden
 <p>Exact Mass: 1135.61</p>	1	[M+Na] ⁺ 1158.60	1158.60
 <p>Exact Mass: 1338.69</p>	1	[M+Na] ⁺ 1361.68	1361.68
 <p>Exact Mass: 1135.61</p>	2	[M-H] ⁻ 1134.61	1134.62
 <p>Exact Mass: 1440.63</p>	2	[M-Na] ⁻ 1417.64	1417.63
 <p>Exact Mass: 1135.61</p>	3	[M+Na] ⁺ 1158.60	1158.60
 <p>Exact Mass: 1237.55</p>	3	[M+Na] ⁺ 1260.54	1260.52
 <p>Exact Mass: 1338.69</p>	3	[M+Na] ⁺ 1361.68	1361.68
 <p>Exact Mass: 1440.63</p>	3	[M+Na] ⁺ 1463.62	1463.60
 <p>Exact Mass: 1542.57</p>	3	[M+Na] ⁺ 1565.56	1565.53

VI - Anhang

Fraktion [M]	Spektrum #	m/z theor.	m/z gefunden
 <p>Exact Mass: 1644.51</p>	3	[M+Na] ⁺ 1667.50	1667.47
isomers possible			
 <p>Exact Mass: 1745.65</p>	3	[M+Na] ⁺ 1768.64	1768.61
isomers possible			
 <p>Exact Mass: 1847.58</p>	3	[M+Na] ⁺ 1870.57	1870.55
isomers possible			
 <p>Exact Mass: 1949.52</p>	3	[M+Na] ⁺ 1972.51	1972.49
isomers possible			
 <p>Exact Mass: 2051.46</p>	3	[M+Na] ⁺ 2074.45	2074.42
isomers possible			
 <p>Exact Mass: 2153.40</p>	3	[M+Na] ⁺ 2176.39	2176.36
isomers possible			
 <p>Exact Mass: 2255.34</p>	3	[M+Na] ⁺ 2278.33	2278.29
isomers possible			
 <p>Exact Mass: 1237.55</p>	4	[M-Na] ⁻ 1214.56	1214.56
isomers possible			
 <p>Exact Mass: 1440.63</p>	4	[M-Na] ⁻ 1417.63	1417.63
isomers possible			

VI - Anhang

Fraktion [M]	Spektrum #	m/z theor.	m/z gef.
 <p>Exact Mass: 1542.57</p>	4	[M-Na] ⁻ 1519.57	1519.56
isomers possible			
 <p>Exact Mass: 1643.71</p>	4	[M-Na] ⁺ 1620.71	1620.70
isomers possible			
 <p>Exact Mass: 1745.65</p>	4	[M-Na] ⁻ 1722.65	1722.62
isomers possible			
 <p>Exact Mass: 1847.58</p>	4	[M-Na] ⁻ 1824.58	1824.56
isomers possible			
 <p>Exact Mass: 1949.52</p>	4	[M-Na] ⁻ 1926.52	1926.49
isomers possible			
 <p>Exact Mass: 2051.46</p>	4	[M-Na] ⁻ 2028.46	2028.41
isomers possible			
 <p>Exact Mass: 2153.40</p>	4	[M-Na] ⁻ 2130.40	2130.33
isomers possible			
 <p>Exact Mass: 2255.34</p>	4	[M-Na] ⁻ 2232.34	2232.25
isomers possible			