

**Synthese von Glykopolymeren zur
Immobilisierung und Untersuchung der
Bindung von Lektinen und Bakterien**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Markus Giesler
aus Düsseldorf

Düsseldorf, November 2021

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: 06.05.2022

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Markus Giesler, 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, den

Markus Giesler

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Laura Hartmann, nicht zuletzt für die umfassende Betreuung in meiner gesamten Promotionszeit und für die Bereitstellung aller Mittel und Möglichkeiten zur Durchführung meines äußerst spannenden Forschungsthemas. Sie hatte für mich immer ein offenes Ohr und konnte mich auch dann motivieren, wenn sich bei meinem Thema die ein oder andere scheinbare Sackgasse auftat. Das mir über die Jahre entgegengebrachte Vertrauen hat mich gestärkt, sowohl bei meiner Forschung als auch bei der Arbeit mit den Studierenden. Vielen Dank, dass ich an Deinem Lehrstuhl persönlich und professionell lernen und wachsen durfte.

Bei PD Dr. Schaper möchte ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit bedanken. Eine Freude waren mir auch unsere immer wiederkehrenden „kleinen“ Begegnungen im Laufe meiner nun mehr als 10 Jahre an der HHU: sei als Dozent in Vorlesungen in meinen früheren Semestern oder zwischen Labor und Pausenraum in meiner Promotionszeit. Du hattest immer ein Lachen im Gesicht und warst vielen Studierenden eine wichtige Ansprechperson.

Further, I would like to express my gratitude towards Prof. Dr. Nicole L. Snyder who also shaped, besides Prof. Hartmann, a huge part of my academic development. She did not only support me professionally by pushing me through a bottleneck during my sugar synthesis, Nicole also showed me other perspectives on academia: not only as *“just a kind of working place”* but as well as a place of personal development. I deeply appreciate that your role in my eyes changed over the years persistently: from role model over mentor to friend. Thank you!

Bei PD Dr. Alla Synytska möchte ich mich herzlich für die Zeit am IPF Dresden und Ihre Unterstützung hinsichtlich meines Projekts mit den Januspartikeln bedanken. Ich konnte auf diese Weise nicht nur neue Einblicke und Eindrücke in einem für mich fachfremden Forschungsbereich gewinnen, sondern auch – trotz meiner vergleichsweise kurzen Zeit vor Ort – viel lernen. Seit meinem Besuch in Dresden kann ich endlich (Dresdner!) Christstollen genießen – dort schmecken sie tatsächlich hervorragend.

Jun.-Prof. Dr. Stephan Schmidt danke ich für seine Unterstützung vor allem in technischen Fragen, ohne die ich deutlich länger und mit weniger *Output* dagestanden hätte. Er hatte immer ein offenes Ohr für Fragen jeglicher Art, auch wenn diese einmal „zwischen Tür und Angel“ gestellt wurden.

Mein weiterer Dank gilt Dr. Monir Tabatabai, die mich nicht nur im Rahmen meiner Doktorarbeit unterstützte, sondern auch im Rahmen meiner Bachelor – und Masterarbeit durchgehend eine Ansprechpartnerin für alle Belange war. Durch ihre Organisation und Führung des Makropraktikums vor nun ca. 8 Jahren habe ich mein Interesse an makromolekularer Chemie im Allgemeinen und an Laborsynthesen im Speziellen entdeckt. Ihre ehrlichen Rückmeldungen (*„das ist das schlechteste Protokoll, was ich je gesehen habe“*) haben mich dabei geformt und herausgefordert, an mir zu arbeiten. Ohne dich wäre ich nicht in der makromolekularen Chemie gelandet, Mina! Dafür danke ich dir sehr.

Ich möchte mich auch bei meinen Kooperationspartnern Dr. Claudia Marschelke und Dr. Laura Soria-Martinez bedanken. Dank Dr. Soria-Martinez haben wir herausfinden können, dass sulfatisierte Glykopolymere ein interessantes Potenzial zur Inhibierung von Papillomaviren aufweisen. Dr. Marschelke wiederum hat mich sehr bei meinem Januspartikelprojekt unterstützt. Außerdem möchte ich mich bei dir für die Zeit in Dresden bedanken, in der ich mich stets sehr willkommen gefühlt habe und diese schöne Stadt mit den Augen eines Wissenschaftlers kennenlernen durfte.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Stephanie Scheelen, Michaela Kitza, Maria Breuer, Viola Schürmanns, Sonja Coors und Birgit Ohler für Ihre Unterstützung in den vielen Fragen des bürokratischen Laboralltags. Insbesondere möchte ich hierbei Michaela und Stephanie danken, welche – jede auf ihre eigene Weise – mir an vielen Stellen geholfen und mir so mein Leben am Lehrstuhl erleichtert haben. Dass dabei der Humor nicht fehlte, liegt nicht nur an der Natur der Sache, sondern auch an euch beiden!

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Bachelorstudenten Patrick Pierzyna und Nick Jetzki sowie bei meiner Masterstudentin Michelle Illmann. Die Zeit im und neben dem Labor hat mir mit und auch dank euch sehr viel Freude bereitet.

An dieser Stelle möchte ich Konfuzius zitieren: „*Wenn du die klügste Person im Raum bist, dann bist du im falschen Raum.*“ In den folgenden Zeilen möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die in den letzten Jahren dafür gesorgt haben, dass ich immer im richtigen Raum war: meinen ehemaligen Kollegen und aktuellen Freunden.

Ich möchte bei den Menschen beginnen, die mir rein physisch sehr nahe waren. Zu Beginn waren das Dr. Christoph Gerke und Dr. Sophia Boden, mit denen ich in den Anfangsjahren ein Labor und ein Büro teilen durfte. Abgesehen davon, dass menschlich alles bei uns gestimmt hat, habt ihr mich auf eure jeweils eigene Arbeitsweise inspiriert. Du, Sophia, mit deiner unfassbaren Effizienz und Zielstrebigkeit und du, Christoph, mit deinem Ehrgeiz und deinem Eifer. Ihr wart immer zur Stelle, wenn es Probleme gab – ich bin Christoph immer noch sehr dankbar für seine Anwesenheit in der Notaufnahme beim Augenarzt.

Im weiteren Verlauf meiner Zeit am Lehrstuhl war ich dann – rein physisch betrachtet – anderen Menschen näher. Speziell zu nennen sind hier Dana Itskalov, mit der ich einen Arbeitsplatz im Büro und im Labor teilen durfte, sowie Philipp Reuther und Patrick Konietzny, die mit mir im Büro saßen. Besonders Dana hat mir mit ihrer humorvollen und ruhigen Art sehr durch eine besonders stressige Zeit geholfen. Ich bin dir sehr dankbar und bewundere sehr, dass du im Laufe der Zeit immer wieder motivierende Worte finden konntest. Auch Philipp und Patrick haben dabei ihren Teil geleistet. Ihr beiden habt es auf eure jeweils eigene Art und Weise verstanden, mir gut zuzureden und Verständnis zu zeigen. Ihr seid jedoch auch gleichzeitig das Problem angegangen und habt mich auf diese Weise sehr unterstützt. Patrick, mit seiner ruhigen und analytischen Art, die mich manches mal wieder auf den Boden gebracht hat. Philipp mit einer guten Kombination aus Sachlichkeit, Verständnis und motivierender Ansprache. Es war schön, euch im Team zu haben.

Besonderer Dank geht auch an das SPR-Team mit Dr. Sophia Boden und Dr. Tanja Freichel. Der Begriff „kaltes Wasser“ beschreibt nur unzureichend unsere ersten Schritte mit dem Biacore X100. Dennoch haben wir uns gemeinsam reingearbeitet und wir konnten doch so einiges bewegen. Dabei konnte ich auch viel von Tanja lernen, die ihre ganz eigene Herangehensweise an die Probleme hatte und die aus eben diesen Problemen höchstens noch „Problemchen“ werden ließ. Es ist schön zu wissen, dass Tanja auch außerhalb des Labors genau diese Eigenschaft mitbringt. Danke, dass du dir für deine KollegInnen und Freunde Zeit nimmst und einem mit einer guten Portion Humor, Direktheit und Pragmatismus weiterhilfst – egal in welcher Lebenslage.

Mit Philipp Reuther, Dr. Tanja Paul, Dr. Mischa Baier sowie Dr. Alexander Strzelczyk durfte ich gemeinsam das Makropraktikum betreuen, wofür ich sehr dankbar bin. Ich glaube, dass wir eine gute Truppe waren und einigen Studierenden nicht nur wissenschaftlich, sondern auch menschlich weiterhelfen konnten. Bei Alexander lag dies nicht nur an seinem ausgefeilten Humor, sondern auch an seinem extremen Pragmatismus und seiner Bodenständigkeit. Wären alle Menschen, die etwas auf dem Kasten haben, so bodenständig wie du, wäre das Leben um einiges leichter. Leider musst du aber noch lernen, dass es im Makropraktikum nicht auf die Anzahl der verteilten Kuchenstriche ankommt, sondern auf die Qualität der Kuchen, die von der jeweiligen Gruppe zu erwarten sind. Mischa hat es immer wieder geschafft mich in Verlegenheit zu bringen – sei es durch den Versuch, vor Studenten witzig zu sein (sorry Mischa, das war vor allem mein Job), aber auch durch markige Sprüche. Aber hinter diesen Sprüchen steht ein Mensch, der mit jedem Wort sagt, was er meint. Das ist selten geworden und das weiß ich sehr an ihm zu schätzen. Mischa, bleib so wie du bist! Bei Tanja hat mich von Anfang an ihre offene und proaktive Art sowie ihre Hilfsbereitschaft sehr beeindruckt. Sie teilt nicht nur ihr Wissen, sondern sie versucht auch Probleme zu erkennen, bevor sie entstehen – und dies nicht nur im Makropraktikum, sondern auch im beruflichen sowie privaten Umfeld. Auf dich kann man sich verlassen – danke dafür!

Ein großer Dank geht auch an alle weiteren Kollegen und Kolleginnen aus den Kreisen der Doktoranden bzw. Post-Doktoranden am Institut. Zu nennen sind hier: Alexander Banger, Dr. Sebastian Bauer,

Dr. Katharina Bücher, Dr. Alberto Camaleño de la Calle, Dr. Morten Frendø F Ebbesen, Dr. Lukas Fischer, Dr. Stephen Hill, Miriam Hoffmann, Michelle Illmann, Fawad Jacobi, Dr. Kira Neuhaus, Peter Pasch, Fabian Schroer, Theresa Seiler, Serap Üclü, Dr. Hanqing Wang und Dimitri Wils.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Freunden und meiner Familie bedanken. All die Jahre durfte ich in dem Wissen um eure bedingungslose Unterstützung den nicht risikofreien Weg der akademischen Ausbildung gehen. Ohne euch hätte ich die ganze Strecke allein fliegen müssen - dabei fliegt es sich viel angenehmer mit einem „Fallschirm“, den man nicht braucht, aber hat, als ohne irgendeinen Fallschirm. Ich möchte für euch ebenfalls genau dieser Fallschirm sein, der ihr für mich all die Jahre, bzw. Jahrzehnte wart.

Zum Schluss möchte ich mich bei der Person bedanken, die mit mir zusammen den größten Teil des Weges gegangen ist: Caroline Schwarz. Du warst für mich immer eine Stütze, auch wenn es mal schwierig war, und ich habe dir so viel zu verdanken, dass es nur schwer in Worte gefasst werden kann. Durch dich und mit dir gemeinsam bin ich größtenteils der Mensch geworden, der ich heute bin.

„It is an important and popular fact that things are not always what they seem. For instance, on the planet Earth, man had always assumed that he was more intelligent than dolphins because he had achieved so much – the wheel, New York, wars and so on – whilst all the dolphins had ever done was muck about in the water having a good time. But conversely, the dolphins had always believed that they were far more intelligent than man – for precisely the same reasons.”

The Hitch Hiker's Guide to the Galaxy, Douglas Adams

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Glykopolymere synthetisiert, die sich zur Immobilisierung auf Oberflächen wie Goldchips und Silikapartikeln eignen. Die so erhaltenen glykofunktionalisierten Materialien wurden charakterisiert und hinsichtlich ihrer Bindung mit Lektinen und Bakterien untersucht.

Hierzu erfolgte zunächst die Synthese von Glykomonomeren ausgehend von Mannose und Galaktose mit Acrylamid und Methacrylamid als polymerisierbare Einheiten. Anschließend wurden die erhaltenen Monomere mittels reversibler Additions-Fragmentierungs Kettenübertragungs-Polymerisation (RAFT-Polymerisation) umgesetzt und auf diese Weise eine Reihe von Glykopolymeren unterschiedlicher Kettenlänge synthetisiert. Durch diese Polymerisationstechnik wurden Glykopolymere erhalten, die an einem Kettenende eine Thiolgruppe und am anderen Ende eine Carboxylgruppe trugen. Mit Hilfe dieser funktionellen Gruppen konnten Glykopolymere auf unterschiedlichen Oberflächen immobilisiert werden.

Die terminalen Thiole ermöglichten die Ausbildung selbstassemblierender Monoschichten auf Goldoberflächen, die für Oberflächenplasmonenresonanzstudien herangezogen wurden. Die durch Auftragung von Glykopolymeren erzeugten Glyko-Goldchips wurden auf ihre Affinität zu dem Modelllektin *Concanavalin A* (ConA) in Direktbindungs- und Inhibitions-Kompetitionsstudien untersucht. Besonderes Augenmerk lag dabei auf dem Vergleich unterschiedlicher Kettenlängen sowie der gezielten Kombination lang- und kurzkettiger Glykopolymere mit entweder bindenden oder nicht-bindenden Zuckern. Zunächst wurden Direktbindungsstudien durchgeführt, in denen sich eine unterschiedliche Affinität von ConA abhängig von der Kettenlänge des auf der Goldoberfläche immobilisierten Glykopolymers zeigte. Auf der Goldoberfläche mit kurzkettigem Glykopolymer konnte ein apparenter K_d -Wert von 1.02 μ molar ermittelt werden und auf der mit langkettigem Glykopolymer ein K_d -Wert von 0.15 μ molar. ConA zeigte somit eine höhere Affinität gegen das langkettige Glykopolymer mit mehr Zuckereinheiten pro Polymerkette. Im Inhibierungs-Kompetitionsassay

wurden die unterschiedlich langen Glykopolymere und α -Methylmannose als Inhibitoren gegen die zuvor dargestellten Glyko-Gold-Oberflächen eingesetzt. Dabei zeigte sich, dass die Glykopolymere ConA besser gegen beide immobilisierten Oberflächen inhibieren als α -Methylmannose. Dabei ist das kürzere Glykopolymer mit 26 Wiederholungseinheiten sowohl pro Molekül als auch pro Zuckereinheit ein besserer Inhibitor als das längere Glykopolymer mit 40 Wiederholungseinheiten. Das längere Glykopolymer zeigte jedoch als einziger Inhibitor eine vollständige Inhibierung von ConA gegen die mit längerem Glykopolymer funktionalisierte Goldoberfläche.

Da es sich bei Goldoberflächen um stationäre feste Phasen handelt, ist eine Untersuchung funktionalisierter mobiler Phasen als Vergleichssystem interessant. In einem zweiten Teil der Arbeit wurden daher unterschiedliche Partikel mit Glykopolymeren funktionalisiert, welche von Kooperationspartnern am IPF Dresden zur Verfügung gestellt wurden. Bei diesen Partikeln handelte es sich im Speziellen um Silikapartikel, die teils vollständig Amine präsentierten und teils auf lediglich einer Seite Aminfunktionalitäten aufwiesen. Die Funktionalisierung der Partikel erfolgte durch die terminale Carboxylgruppe der Glykopolymere, sodass zwei Partikeltypen erhalten wurden: vollständig Glykopolymere-präsentierende Partikel und sogenannte Januspartikel mit halbseitiger Präsentation von Glykopolymeren auf der Partikeloberfläche. Anschließend wurden diese Glykopartikel mit Hilfe von Trübungsassays und Fluoreszenzmikroskopie auf ihre zuckervermittelte Bindung am Bakterium *Escherichia Coli* (*E. Coli*) untersucht. Durch Beobachtung und Vergleich der Aggregatbildung zwischen Partikeln und Bakterien zeigte sich, dass die generierten Januspartikel mit *E. Coli* abhängig von den auf den Partikeln präsentierten Glykopolymeren wechselwirken. Dabei bildeten Januspartikel mit Mannoseglykopolymeren größere Aggregate innerhalb kürzerer Zeitspannen aus als die Referenzpartikel, die ausschließlich freie Amine aufwiesen. Auch Januspartikel mit Galaktoseglykopolymeren zeigten eine deutlich reduzierte Aggregatbildungsgeschwindigkeit in Anwesenheit der Bakterien, sodass die beobachtete Interaktion der Partikel mit *E. Coli* auf spezifische Wechselwirkungen mit den Mannoseeinheiten zurückzuführen ist. Aufgrund einer inhomogenen Funktionalisierungsdichte der Glykopolymere auf den jeweiligen Partikeln müssen weiterführende

Studien diese beobachteten Trends noch bestätigen, im Idealfall mit einer komplett glykosylierten Partikeloberfläche auf den untersuchten Partikeln.

Insgesamt leistet die Arbeit einen Beitrag für das Verständnis von Glykopolymeren als Werkzeug zur Untersuchung der Wechselwirkungen von immobilisierten Glykopolymeren mit biologischen Systemen. Hierzu wurde eine leicht-modifizierbare Syntheseroute von Glykomonomeren entwickelt, mit deren Hilfe geringdisperse Glykopolymere synthetisiert werden können. Diese Glykopolymere können wiederum zur Funktionalisierung unterschiedlicher Oberflächen herangezogen werden. Die Untersuchungen mit Hilfe von Oberflächenplasmonenresonanz lassen einen komplexen Zusammenhang zwischen Inhibitoren und inhibierten Makromolekülen in Anwesenheit von Lektinen vermuten, welchem mit dem in dieser Arbeit entwickelten Versuchsaufbau weiter nachgegangen werden kann. Des Weiteren wurden in dieser Arbeit erstmalig Glykopolymere auf APS-basierte Januspartikel aufgetragen und ein Versuchsaufbau entwickelt, mit dessen Hilfe sich die Wechselwirkungen dieser Partikel mit Bakterien untersuchen lassen.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	vii
Zusammenfassung.....	xiv
Inhaltsverzeichnis.....	xvii
Abkürzungsverzeichnis	xx
Verzeichnis der Chemikalien	xxiii
Publikationen.....	xxiv
Publikationen als Teil dieser Arbeit	xxiv
Publikationen, die nicht Teil dieser Arbeit sind	xxiv
1. Einleitung	1
1.1 Glykopolymere – eine kurze Einführung.....	7
1.2 Synthese von Glykopolymeren	8
1.2.1 Synthese von Glykomonomeren.....	9
1.2.2 Polymerisation von Glykomonomeren	13
1.3 Anwendungen von Glykopolymeren	16
1.3.1 Glykopolymere als Inhibitoren.....	17
1.3.2 Glykopolymere in der Bioanalytik.....	18
1.4 Glykofunktionalisierte Nanopartikel.....	21
1.4.1 Kurze Einführung zur Herstellung und Anwendungen von glykosylierten Partikeln	22
1.4.2 Januspartikel und -strukturen.....	24
2. Motivation und Zielsetzung.....	29
3. Ergebnisse und Diskussion	31
3.1 Synthese der Glykopolymere	31
3.1.1 Syntheseentwicklung der Monomere.....	32
3.1.2 RAFT-Polymerisation der Glykomonomere	37

3.2 Oberflächenplasmonenresonanz-Studien	44
3.2.1 Grundlagen zur Funktionalisierung der Goldoberflächen	45
3.2.2 Funktionalisierung und Charakterisierung der Goldoberflächen	47
3.2.3 Affinitätsstudien mit ConA.....	69
3.2.4 Direktbindungsstudien von ConA auf glykosylierten Goldoberflächen.....	75
3.2.5 Inhibitions-Kompetitions-Assay	79
3.2.6 Studien zur Inhibierung von ConA durch verschiedene Mannosestrukturen	85
3.2.7 Zusammenfassung der Inhibitions-Kompetitionsstudien	99
3.3 Glykopolymer-funktionalisierte Partikel und Bakterienassays	104
3.3.1 Vortests zur Bestimmung der Funktionalisierungsstrategie.....	105
3.3.2 Funktionalisierung und Charakterisierung der Partikel	110
3.3.3 Interaktionsstudien mit <i>E. Coli</i>	113
3.4 Sulfatisierte Glykopolymere.....	136
4. Fazit und Ausblick.....	137
5. Experimententeil	140
5.1 Chemikalien und Analytische Methoden	140
5.1.1 Chemikalien	140
5.1.2 Geräte und Methoden	142
5.2 Monomersynthesen	148
5.2.1 Synthese von <i>N</i> -[2-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-mannopyra- nosyloxy)ethyl]acrylamid (4)	148
5.2.2 Synthese von <i>N</i> -[2-(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-galacto-pyranosyloxy)ethyl]acrylamid (7)	154
5.2.3 Synthese von <i>N</i> -[2-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-galactopyranosyloxy)hydroxyethoxy)- ethyl]methacrylamid (9)	158
5.2.4 Synthese von <i>N</i> -[2-(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-mannopyra-nosyloxy)ethyl]meth- acrylamid (11)	160
5.2.5 Synthese von <i>N</i> -[2-(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyra-nosyloxy)ethyl]meth- acrylamid (12)	164

5.3 Polymerisation und Charakterisierung der Polymere.....	166
5.3.1 Allgemeine Reaktionsvorschrift zur RAFT-Polymerisation	166
5.3.2 Charakterisierung der Polymere	168
5.3.3 Übersicht der synthetisierten Glykopolymere.....	173
5.4 Funktionalisierung von Januspartikeln	175
5.4.1 Funktionalisierung der Partikel mit pMan2CA ₁₈	175
5.4.2 Funktionalisierung der Partikel mit pMan2CA ₃₇ und pGal2CA ₃₇	176
5.4.3 Stabilitätstest der Partikel in MilliQ-Wasser.....	177
5.5 Sulfatisierung der Glykopolymere.....	179
5.5.1 Sulfatisierung von pMan2CM ₈₆	179
5.5.2 Übersicht der sulfatisierten Glykopolymere.....	180
6. Anhang.....	181
6.1 Abbildungsverzeichnis	181
6.2 Verzeichnis der Tabellen	185
6.3 Verzeichnis der Schemata	187
6.4 Literaturverzeichnis.....	188
6.5 NMR-Spektren der Experimente.....	198
6.6 GPC- und MALDI-TOF-Spektren	218
6.7 Grafiken, Daten und Spektren der SPR-Messungen	221
6.7.1 Daten zu GC _{Kurz}	221
6.7.2 Daten zu GC _{Lang}	223
6.8 Partikelanalytik.....	226
6.9 Mikroskopieaufnahmen.....	230

Abkürzungsverzeichnis

$^1\text{H-NMR}$	Kernspinresonanz-Spektroskopie von Wasserstoffkernen (abgeleitet aus dem Englischen: <i>nuclear magnetic resonance</i>)
APS	3-Aminopropyltriethoxysilan
AIBN	Azobisisobutyronitril
ATRP	<i>Atom Transfer Radical Polymerization</i>
Bspw.	Beispielsweise
c	Konzentration
CDCl_3	Deutiertes Chloroform
ConA	Concanavalin A
DMTMM	4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methyl-morpholiniumchlorid
DIPEA	Diisopropylethylamin
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDS	Ethylenedioxy-bis(ethylamin)succinid
ESI	Elektrosprayionisation
et al.	et alii (und andere)
engl.	englisch, Synonym für „aus dem Englischen für...“
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarotspektrometer
GFP	engl., <i>green fluorescent protein</i>

GPC	Gelpermationschromatographie
kg	Kilogramm
LBB	engl., <i>Lectin Binding Buffer</i>
M_n^{theo}	Theoretisches Zahlenmittel der Molmasse
$M_n^{\text{calc.}}$	Berechnetes Zahlenmittel der Molmasse
M_w^{theo}	Theoretisches Massenmittel der Molmasse
$M_w^{\text{calc.}}$	Berechnetes Massenmittel der Molmasse
MALDI-TOF	Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung mit der Flugzeitanalyse (engl. <i>time of flight</i>)
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MHz	Megahertz
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMP	Nitroxid-vermittelte Polymerisation (engl. <i>nitroxide-mediated radical polymerization</i>)
PEG	Polyethylenglycol
pH	negative-dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Ionenkonzentration
ppm	engl., <i>parts per million</i>
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
RAFT	Reversible Additions-Fragmentierungs Kettenübertragungs-Polymerisation (engl. <i>reversible addition-fragmentation chain transfer</i>)

$R_{\max}$	Maximal-messbare Responseunit (in Oberflächenplasmonenresonanz-Messungen)
ROMP	Ringöffnende Methathesepolymerisation (engl. <i>ring-opening metathesis polymerization</i>)
RT	Raumtemperatur
SCK	engl., <i>Single-Cycle-Kinetics</i>
SCK-MZ	<i>Single-Cycle-Kinetic</i> -Messzyklus
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz (engl. <i>surface plasmon resonance</i>)
TEA	Triethylamin
THF	Tetrahydrofuran
WGA	engl., <i>Wheat germ agglutinin</i> , ein Weizenprotein

Verzeichnis der Chemikalien

- 1** Penta-O-acetyl- α -D-mannopyranose
- 2** 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranose
- 3** 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranosyl-trichloroacetimidat
- 4** *N*-[2-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranosyloxy)ethyl]acrylamid
- 5** 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α/β -D-galactopyranose
- 6** 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl-trichloroacetimidat
- 7** *N*-[2-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-galactopyranosyloxy)ethyl]acrylamid
- 8** *N*-[2-(2-hydroxyethoxy)ethyl]methacrylamid
- 9** *N*-[2-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-galactopyranosyloxy)hydroxyethoxy)ethyl]methacrylamid
- 10** *N*-Hydroxymethylacrylamid
- 11** *N*-[2-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranosyloxy)ethyl]methacrylamid
- 12** *N*-[2-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosyloxy)ethyl]methacrylamid

Publikationen

Publikationen als Teil dieser Arbeit

1. Laura Soria-Martinez, Sebastian Bauer, **Markus Giesler**, Sonja Schelhaas, Jennifer Materlik, Kevin Janus, Patrick Pierzyna, Miriam Becker, Nicole L. Snyder, Laura Hartmann, und Mario Schelhaas

Prophylactic Antiviral Activity of Sulfated Glycomimetic Oligomers and Polymers

Erwähnt in den folgenden Kapiteln (Seitenzahl): Kapitel 3 (S.31), Kapitel 3.4 (S.136-137) und Kapitel 5.5 (S.179-180).

Publikationen, die nicht Teil dieser Arbeit sind

1. Marvin Mantel, **Markus Giesler**, Marian Guder, Elisabeth Rütthlein, Laura Hartmann, Jörg Pietruszka

Lewis Base–Brønsted Acid–Enzyme Catalysis in Enantioselective Multistep One-Pot Syntheses

2. Mischa Baier, **Markus Giesler**, Laura Hartmann

Split-and-Combine Approach Towards Branched Precision Glycomacromolecules and Their Lectin Binding Behavior

1. Einleitung

In biologischen Systemen werden vier Klassen von Makromolekülen unterschieden: Desoxyribonukleinsäure, Proteine, Fette und Kohlenhydrate.^[1] Seit den Arbeiten von Emil Fischer, welcher im späten neunzehnten Jahrhundert die Struktur von Kohlenhydraten untersucht und aufgeklärt hat, wurde die Rolle der Kohlenhydrate als ausschließliche Energielieferanten fortlaufend um- und reinterpretiert: Die Entdeckung der biologischen Relevanz komplexer Oligosaccharide in Glykokonjugaten und auf Zelloberflächen als Teil der Glykokalyx führten zu einem verstärkten Forschungsinteresse hinsichtlich der biologischen Rolle verschiedener Kohlenhydrat-Derivate.^[2] Zunächst wurde die Rolle der Glykokalyx als „physische Barriere“ interpretiert, die auf allen Zelltypen (von Prokaryoten bis Eukaryoten) gefunden werden kann.^[3-5] Sie setzt sich, wie in Abbildung 1 schematisch dargestellt, zusammen aus verschiedenen Kohlenhydratstrukturen unterschiedlicher Länge und Konstitution und reicht von glykosylierten Proteinen über komplexe Kohlenhydrate bis hin zu Glykolipiden.^[3]

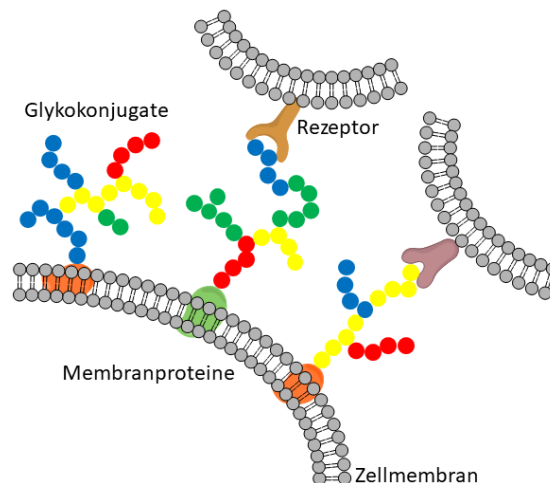


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Glykokalyx angelehnt an Bertozzi und Kiessling.^[6]

Im Laufe der Zeit veränderte sich der Blick auf die Glykokalyx als rein mechanische Schutzhülle aufgrund neuer Entdeckungen, welche die „Geburt der Glykobiologie einläuteten“.^[1, 7] Zu diesen Entdeckungen gehörte die Beteiligung von Kohlenhydraten an den unterschiedlichsten biologischen Ereignissen, angefangen von reinen Erkennungsprozessen^[8, 9], Befruchtung^[10, 11], Zellmigration^[12],

Immunabwehr^[13, 14], Entzündungsprozessen^[9, 15] bis hin zur Invasion durch Pathogene.^[1, 3, 16-20] Raymond A. Dwek fasste diesen neuen Blickwinkel auf diese komplexen Zusammenhänge mit der folgenden Aussage treffend zusammen: „*What is quite clear, is that there is no single function for oligosaccharides*“.^[1] Im Vergleich zu den anderen biologisch-relevanten Makromolekülen können Kohlenhydrate auf beliebige Weise und außerdem mehrfach, theoretisch einmal je freier Alkoholgruppe, miteinander verknüpft werden - bei einer Vielzahl verschiedener Kohlenhydrate als potenzielle Bausteine. Diese chemischen Besonderheiten ermöglichen eine deutlich höhere theoretische Anzahl an „struktureller Vielseitigkeit“ als dies bspw. für Proteine oder Nucleinsäuren der Fall ist.^[6] So vergleichen Ladmiral et al. den potenziellen Informationsgehalt von vier unterschiedlichen Aminosäurederivaten mit dem von vier verschiedenen Sacchariden. Während bei vier unterschiedlichen Aminosäuren 24 Möglichkeiten zur Anordnung zur Verfügung stehen, können die vier Kohlenhydrate aufgrund möglicher α -/ β -Anomerisierung, unterschiedlicher Konfiguration und variabler Verknüpfung der Hydroxyfunktion theoretisch 25.560 verschiedene Tetrasaccharide ausbilden. Eine etwaige Funktionalisierung der Kohlenhydratstrukturen durch beispielsweise Sulfonierung ermöglicht zusätzliche Erhöhung dieser potenziellen Informationsdichte.^[7]

Dieses - in der Biologie durchaus realisierte - Potenzial zur Speicherung von Informationen wird in der Literatur als „*Glycocode*“, also als „Zuckercode“, bezeichnet, was eine eigene Art von Sprache impliziert, ausgedrückt durch die gezielte Anordnung von Zuckermolekülen. Diese Sprache kann durch Proteine ausgelesen werden, den sogenannten Lektinen. Bei Lektinen (lateinisch von *legere*, „auswählen“)^[21] handelt es sich um Proteine, die reversibel, also nicht-kovalent, und spezifisch an Kohlenhydrate binden.^[22] Sie sind Schlüsselmoleküle in verschiedenen biologischen Prozessen, beispielsweise der Zell-Agglutination^[23] oder Erkennungsschritten^[24] - auch von Pathogenen^[25] - und werden daher von Ambrosi et al. auch als „Werkzeug für das molekulare Verständnis des *Glycocodes*“ bezeichnet.^[26, 27] Lektine unterscheiden sich in Struktur, Größe und bevorzugtem Bindungspartner voneinander. Sie können hinsichtlich verschiedener Aspekte klassifiziert und charakterisiert werden: Herkunft, funktionale Parameter oder der Notwendigkeit von Ionen zum Eingehen von Bindungen. So

werden beispielsweise Tier- und Pflanzenlektine, C-Typ-Lektine oder Lektine vom Typ I bzw. II voneinander unterschieden. Bei C-Typ-Lektinen handelt es sich um Lektine, die Calcium (Ca^{2+})-Ionen in der physiologischen Umgebung benötigen, um mit Kohlenhydratstrukturen zu wechselwirken. Die Einteilung nach Typ I bzw. Typ II charakterisiert die Ausgestaltung der Bindungstaschen. Lektine vom Typ I weisen tiefe Bindungstaschen auf, welche den gebundenen Kohlenhydratliganden vollständig umschließen. Lektine vom Typ II weisen flache Bindungsregionen auf, die mit der Proteintopologie verwechselt werden können, und die Kohlenhydrate dementsprechend in ihrer Wechselwirkung mit diesen nicht umschließen.^[26, 28, 29] Bei dem literaturbekannten Lektin Concanavalin A (ConA) handelt es sich beispielsweise um ein C-Typ Pflanzenlektin vom Typ I, welches stark an α -Mannose bindet, während es deutlich schwächer mit Glukose und nicht mit Galaktose wechselwirkt. Diese Eigenschaft wird durch die Anordnung der Aminosäuren des Lektins im Zusammenspiel mit Mangan²⁺- und Calcium²⁺-Ionen erhalten, wie in Abbildung 2 dargestellt.

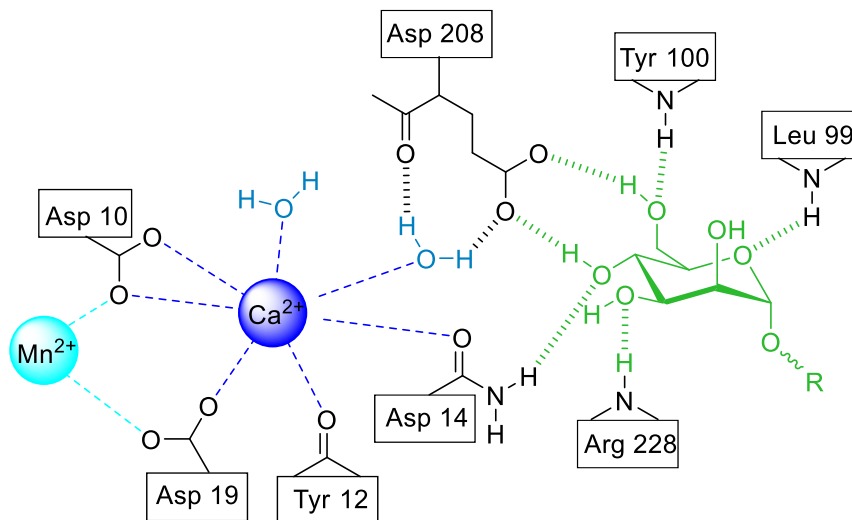


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Komplexbildung von Concanavalin A mit α -Mannose in Anwesenheit von Ca^{2+} und Mn^{2+} , angelehnt an die Arbeiten von Loris et al. sowie Lis und Sharon.^[20, 30]

Die schematische Darstellung einer Bindungstasche von ConA in Anwesenheit von α -Mannose, Ca^{2+} und Mn^{2+} verdeutlicht die Relevanz der beteiligten Ionen. Mangan- und Calcium-Ionen sorgen durch für die richtige Positionierung der Aminosäuren Asparagin (Asp) 14 und 208, die wiederum mit den Hydroxylgruppen der α -Mannose in C4- bzw. C6-Position Wasserstoffbrücken ausbilden. Die

Ausrichtung der Hydroxygruppen in C4-Position weicht bei Galaktosiden von denen der Glucose und Mannose ab, daher „erkennt“ das Lektin dieses Kohlenhydratmolekül nicht und es können keine direkten Wechselwirkungen mit Systemen eingegangen werden, die ausschließlich Galaktose als Kohlenhydrat präsentieren.

In der Regel sind die Wechselwirkungen einzelner Saccharide mit Lektinen schwach und bewegen sich in der Größenordnung um 10^{-6}M^{-1} . Mit derart schwachen Bindungen könnte in der Natur kein Prozess kontrolliert ablaufen.^[7] Tatsächlich erschließt sich mit dieser Erkenntnis die Präsentation vieler Kohlenhydrate auf der Glykokalyx: die räumliche Nähe mehrerer Kohlenhydratstrukturen verstärkt die Bindung der Kohlenhydrate zu Lektinen durch eine Vielzahl möglicher Einzelbindungen. Dieses Prinzip wird als „*cluster glycoside effect*“ bezeichnet und beschreibt das multivalente Zusammenwirken mehrerer Rezeptoren.^[7, 26, 31, 32] Dieser Effekt wird durch das Konzept der Multivalenz näher definiert, welches erstmals in den 90er Jahren diskutiert wurde.^[29, 33-36] Der Aspekt der Multivalenz geht weit über das bloße Vorhandensein vieler schwacher Bindungsmotive und der daraus resultierenden höheren Bindungswahrscheinlichkeit hinaus. Durch Multivalenz verstärkte Bindungseffekte setzen sich aus verschiedenen Einzelfaktoren zusammen und begünstigen auf verschiedene Weisen die beobachtete stärkere und spezifische Wechselwirkung.^[37] Dabei wird die Stärke einer Bindung als funktionale Affinität oder auch Avidität bezeichnet, während die Präferenz für ein bestimmtes Kohlenhydratsystem als Spezifität definiert ist. Die beobachtete Avidität und Spezifität setzen sich dabei aus einem Wechselspiel verschiedener Einzeleffekte zusammen. Zu diesen gehören beispielsweise sterische Abschirmung, Chelateffekt, Rezeptorclustering, statistische Rückbindung sowie Abstand und Flexibilität zwischen den Kohlenhydrateinheiten.^[7, 17, 37-43]

Die in Abbildung 3 dargestellten Beiträge zur Multivalenz verdeutlichen, dass natürliche Prozesse, denen Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkungen zugrunde liegen, nicht ausschließlich von den Lektinen abhängen, sondern auch von den Kohlenhydratstrukturen selbst. Das Ziel vieler Forschergruppen, die Funktion der Glykane und die den biologischen Prozessen zugrundeliegenden Einflussgrößen zu

entschlüsseln, kann auf zwei Wegen erreicht werden; der Isolation und Charakterisierung natürlicher Liganden und der chemischen Synthese künstlicher Liganden.^[3]

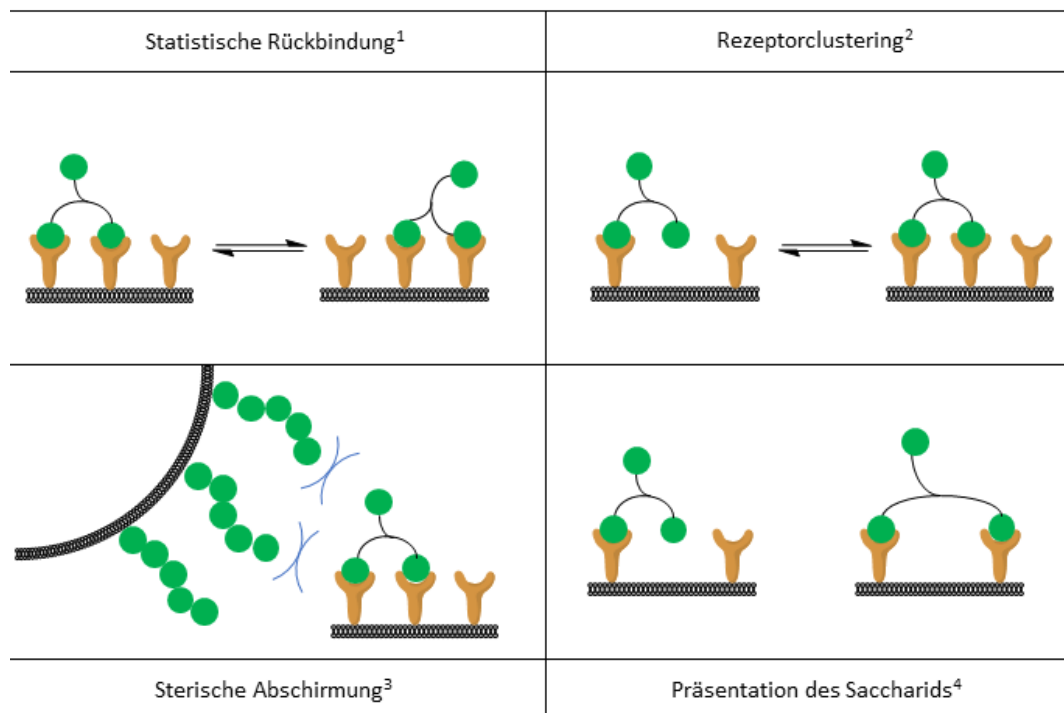


Abbildung 3: Beiträge zur Affinität und Avidität von kohlenhydrat-präsentierenden Strukturen [¹angelehnt an Pieters^[38], ²angelehnt an Ponader et al.^[39], ³angelehnt an Mammen et al. und Ponader et al. ^[17, 39], ⁴angelehnt an Pertici und Pieters^[43], sowie insgesamt angelehnt an Gestwicki et al.^[44]].

Vorteil der Isolation von natürlichen Liganden ist, dass das direkte Vorbild aus der Natur beobachtet werden kann und daraus wichtige Eigenschaften für die „chemische Kopie“ gewonnen werden können. Dennoch ist es schwierig, biologisch-relevante Eigenschaften der Glykane ausschließlich aus der ermittelten Struktur abzuleiten. Im Vergleich dazu bietet die chemische Synthese die Möglichkeit, durch gezielte Variation der Molekülstruktur relevante Eigenschaften der Kohlenhydratstrukturen zu identifizieren. Hierzu wurden in der Literatur bereits verschiedene Systeme hinsichtlich ihrer Bindungsaffinität zu verschiedenen Lektinen miteinander verglichen. Bei den Kohlenhydratstrukturen werden unter anderem Monosaccharide, Oligosaccharide, Polysaccharide, Glykodendrimere und Glykopolymere voneinander unterschieden.^[3, 26, 38, 45] Neben dieser groben Einteilung können viele weitere Eigenschaften kohlenhydratpräsentierender Moleküle voneinander unterschieden werden, welche einen wesentlichen Einfluss auf ihre resultierenden Wechselwirkungen mit Lektinen haben.

Hierzu zählen unter anderem Valenz der Kohlenhydratmoleküle, Art und Länge der Verbindung des Zuckers mit den anderen Zuckereinheiten, Molekülgröße und – form, Symmetrie und, falls vorhanden, Oligomer- bzw. Polymerrückgrat.^[3, 6, 26, 42, 46, 47] Substanzklassen, die gezielt zum Studium von Wechselwirkungen in biologischen Systemen durch Nachahmung spezifischer Eigenschaften von Biomolekülen synthetisiert werden, werden als Biomimetika bezeichnet. Ihr Zweck ist die Erforschung komplexer biologischer Zusammenhänge und ein tieferes Verständnis eben dieser, ermöglicht durch gezielte Variation in bestimmten Strukturelementen des Biomimetikums. Eine Molekülklasse, die sich leicht variieren und hinsichtlich ihrer Avidität bei gleichzeitigem Erhalt der Spezifität untersuchen lässt, stellen die sogenannten Glykopolymere dar.^[3]

1.1 Glykopolymere – eine kurze Einführung

Glykopolymere sind künstliche Makromoleküle mit Kohlenhydrat-Strukturen in der Seitenkette oder als Endgruppe.^[3, 48] Sie grenzen sich von den natürlichen Polysacchariden vor allem durch die Art der Verknüpfung ab, da Polysaccharide aus linearen oder verzweigten Monosaccharid-Einheiten bestehen.^[2] Es können Glykopolymere im engeren Sinne und Glykopolymeren im weiteren Sinne voneinander unterschieden werden. So umfasst der Begriff Glykopolymere je nach Literaturstelle zusätzlich zu der oben genannten Definition auch Glykodendrimere und sphärische Glykoarchitekturen wie glykosylierte Mizellen, Vesikel, oder Micro- bzw. Nanopartikel.^[26, 38] Im Rahmen dieser Arbeit wird die Definition im engeren Sinne verwendet. Glykopolymere zeichnen sich aufgrund der multivalenten Präsentation von Sacchariden durch eine in der Regel hohe Affinität unter Beibehalt der Spezifität aus. Daher werden Glykopolymere gezielt mit den Kohlenhydratseitenketten hergestellt, die in der untersuchten biologischen Anwendung wahrscheinlich eine Schlüsselrolle spielen.^[48] Die ersten Glykopolymere wurden Anfang der 90er Jahre als Inhibitoren entwickelt, da diese den Gruppen um Matrosovich et al. sowie Spaltenstein und Whitesides eine leichte Möglichkeit zur multivalenten Präsentation von Sialinsäurederivaten für Inhibierungsstudien von Influenzaviren darboten.^[49, 50] Seither hat sich das Potenzial zur Anwendung von Glykopolymeren stark erhöht. Glykopolymere werden als potentielle Wirkstofftransporter^[51], biomimetische Wirkstoffe^[52, 53], Signaltransduktoren^[3] sowie in analytischen Anwendungen^[54, 55] verwendet. Diese Anwendungsvielfalt liegt nicht zuletzt in der hohen Anzahl unterschiedlicher Strukturen begründet, die aufgrund vielfältiger Synthesemöglichkeiten von Glykopolymeren zugänglich sind. Diese Strukturvielfalt erlaubt eine zielgerichtete Untersuchung von Interaktionen zwischen Kohlenhydratarchitekturen und biologischem Rezeptor. Beispielsweise lassen sich gezielt diejenigen Parameter des zu synthetisierenden Polymers variieren, die einen Einfluss auf die Wechselwirkung mit Lektinen ausüben. In unterschiedlichen Studien hat sich gezeigt, dass vor allem Variation von Molekulargewicht, Kohlenhydratdichte, Flexibilität des Polymerrückgrats sowie Struktur und Architektur des Glykopolymers einen wesentlichen Einfluss auf Interaktionen mit Lektinen ausüben können.^[3, 26, 37, 46, 56] Aufgrund dieser

hohen architektonischen Vielfalt ist es in einigen Fällen gelungen, die Affinität von Glykopolymeren denen von natürlichen Kohlenhydratstrukturen zu erreichen oder gar zu übertreffen.^[48] Diese Eigenschaften und die damit verbundene Anwendung der Glykopolymere hängen daher wesentlich von der Syntheseroute ab, auf welche im Folgenden eingegangen werden soll.

1.2 Synthese von Glykopolymeren

Glykopolymere können grundsätzlich auf zwei verschiedene Weisen synthetisiert werden: entweder durch direkte Polymerisation oder durch Postmodifikation von Polymeren.^[2, 48] Beide Möglichkeiten bieten jeweilige Vor- und Nachteile. Die Variante der Postfunktionalisierung ermöglicht beispielsweise eine zuverlässige Synthese äußerst homogener Polymere, in denen die Seitenketten mit beliebigen Kohlenhydratstrukturen substituiert werden können. Dies erlaubt eine variierbare Synthese verschiedener Glykopolymere aus ein und derselben Vorstufe, während Polymerparameter wie Dispersität, Kettenlänge und Polymerrückgrat konstant und die Glykopolymere miteinander vergleichbar bleiben.^[54] Die Synthese von Glykopolymeren läuft dabei in zwei Schritten ab. Im ersten Schritt wird ein Monomer synthetisiert, welches eine zum Polymerisationsmechanismus orthogonal reaktive Gruppen aufweist. Dies können beispielsweise Amine, Carbonsäuren, Mehrfachbindungen, Halogene oder Azide sein.^[57-60] Der wesentliche Vorteil dieser funktionellen Einheiten ist, dass diese in der Regel über einen schnellen Reaktionsmechanismus ablaufen können und mit den meisten Kettenwachstumspolymerisationen keine Nebenreaktionen eingehen. Ein wesentlicher Nachteil der Synthese von Glykopolymeren über Postpolymerisationsfunktionalisierung liegt in der Homogenität der Polymere, die vor allem bei geringen Umsätzen im Post-Funktionalisierungsschritt verschieden ausfallen und die Frage nach einer möglichen Vergleichbarkeit verschiedener Polymere aufwerfen kann. Derartige Probleme können vor allem durch intrinsische Limitationen der gewählten Funktionalisierungsmethode auftreten, welche selten bei 100 % Umsatz liegt. Aber auch sterische Effekte im Laufe der Reaktion können eine uneinheitliche Funktionalisierung der Glykopolymere zu Folge haben. In Glykopolymeren mit inhomogen-verteilten und nachträglich eingefügten Monosacchariden können die Abstände der Zucker voneinander variieren, wodurch auch andere

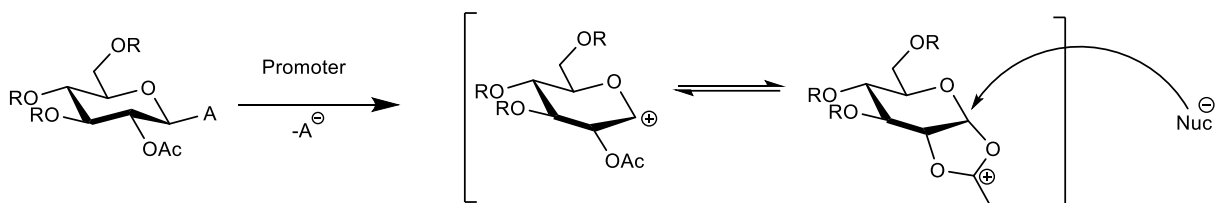
Eigenschaften der Polymerketten, zum Beispiel der Kohlenhydratdichte oder der Flexibilität, möglicherweise beeinträchtigt werden. Außerdem sind nach unvollständiger Funktionalisierung potenziell reaktive und daher potenziell störende Funktionen im Polymer enthalten.

Je nach untersuchtem System und der jeweiligen Fragestellung kann es daher erforderlich sein, Glykopolymere direkt aus Glykomonomeren zu synthetisieren. Oftmals sind die Synthesen von Glykomonomeren langwieriger und aufwendiger als die Synthese der Kohlenhydratkomponente in der Postpolymerisationsvariante und diese müssen für jedes Glykomonomer einzeln durchgeführt werden.^[48] Dennoch kann bei dieser Syntheseroute davon ausgegangen werden, dass die Abstände der Kohlenhydratseitenketten homogen verteilt sind und nicht von dem jeweiligen Kohlenhydratsystem abhängen. Da sich Einbauverhältnisse von Copolymeren bestimmen lassen, eignet sich diese Syntheseroute auch zur Synthese von unterschiedlichen Copolymeren mit variierenden Einbauverhältnissen. Die Synthese verschiedener Homoglykopolymere sowie Copolymere ist in der Literatur verbreitet und es werden verschiedene Polymerisationstechniken durchgeführt, um diese zu erhalten. Die verwendete Polymersynthese ist abhängig von den jeweiligen Monomeren und wird an die gewählte Fragestellung hinsichtlich der Zielapplikation des anvisierten Glykopolymers angepasst.

1.2.1 Synthese von Glykomonomeren

Heutzutage sind viele verschiedene Monomersynthesen bekannt, die zur Synthese von Glykopolymeren eingesetzt werden. Die dabei synthetisierte funktionelle Einheit hängt stark von der anvisierten Polymerisationsart ab, welche wiederum abhängig von den Zielanwendungen des Glykopolymers ist. Wichtig ist dabei die Verknüpfung der Kohlenhydrateinheit so zu wählen, dass die biologische Aktivität der Einheit hinsichtlich des gewählten Zielsystems erhalten bleibt. Eine essenzielle Rolle bei der gezielten Funktionalisierung von Kohlenhydratstrukturen spielt dabei die Schutzgruppenchemie, welche Funktionalisierung von Hydroxygruppen an definierten Positionen des Kohlenhydratgerüsts und somit die Einführung polymerisierbarer Einheiten ermöglicht. Hierbei hat

sich eine Vielzahl verschiedener Schutzgruppen etabliert, die aufgrund der unterschiedlichen Reaktivitäten primärer, sekundärer, anomerer und äquatorial sowie axial orientierter Hydroxygruppen verschiedene Funktionalisierungen zugänglich machen.^[2] Schutzgruppen werden in partizipierende Schutzgruppen mit Nachbargruppeneffekt und nicht-partizipierende Schutzgruppen eingeteilt. Diese Schutzgruppen unterscheiden sich in der Eigenschaft, die Isomerisierung der Hydroxygruppe zu beeinflussen, beispielsweise durch sterische Begünstigung der Bildung eines Anomeres. Zu den partizipierenden Schutzgruppen zählen Acetyl- und Benzylschutzgruppen sowie zu diesen orthogonalen Chloroacetylgruppen.^[2, 61] Bei diesen Schutzgruppen wechselwirken die freien Elektronenpaare des Carbonylsauerstoffs mit den Carbokationen der gebildeten Zwischenstufen vicinaler Übergangszustände, sodass sie den nucleophilen Angriff auf dieses benachbarte Carbokation abhängig von der jeweiligen räumlichen Orientierung dirigieren. Vor allem die räumliche Orientierung von Anomeren kann mit Hilfe dirigierender Nachbargruppeneffekte der vicinalen Schutzgruppen kontrolliert werden, wie beispielhaft in Schema 1 dargestellt.



Schema 1: Nachbargruppeneffekt einer Acetylschutzgruppe auf das gebildete Anomer nach erfolgter Abspaltung der Austrittsgruppe und nucleophilem Angriff.

Mit Hilfe von Acetylschutzgruppen kann kontrolliert werden, welche Anomere sich bevorzugt bilden, nachdem eine am anomeren Zentrum befindliche Abgangsgruppe durch einen Promoter unter Bildung eines Carbokations abgesondert wird. Es kommt durch den elektronenschiebenden Effekt der Carbonylgruppe zur Bildung eines fünfgliedrigen Übergangszustandes, welcher den anschließenden nucleophilen Angriff nur aus der Ringebeine ermöglicht. Dadurch wird in diesem Beispiel bevorzugt das α -Anomer gebildet.

Nicht-partizipierende Schutzgruppen dagegen nehmen keinen Einfluss auf die bevorzugten Produkte vicinaler Substitutionsreaktionen. Zu ihnen zählen Silylether, Acetale, Benzylether oder Allylether.^[2] Einige Schutzgruppen eignen sich spezifisch für das Schützen anomerer Hydroxygruppen. Dies kann erforderlich sein, wenn die Stereoinformationen des Anomers erhalten werden oder wenn eine der anderen Hydroxygruppen gezielt funktionalisiert werden soll. Hierfür können Methylether oder Allylether verwendet werden. Die Synthese von Biomimetika erfordert oftmals die Funktionalisierung von Kohlenhydratstrukturen über die anomere Position des Zuckerrings, da hierbei in vielen Fällen die biologische Aktivität erhalten bleibt. Bertozzi und Kiessling stellen schon im Jahre 2001 fest, dass ein chemischer „Nachbau“ eines natürlichen Glykans idealerweise über die gleichen Stereoinformationen an anomerer Position verfügt.^[6] Dies kann entweder über enzymatische Reaktionen oder über die Verwendung künstlicher Kohlenhydratdonoren erreicht werden.

Aufgrund der breiten Anwendbarkeit haben sich viele Methoden zur Synthese von sogenannten Kohlenhydratdonoren, auch Glykosyldonoren genannt, etabliert. Dabei handelt es sich um Kohlenhydrate mit einer guten Abgangsgruppe in anomerer Position, die durch ein nucleophil substituiert werden kann. Häufig werden Thioether, Halogenide, Oxazoline oder Trichloroacetimide eingesetzt, in der Literatur findet sich jedoch eine Vielzahl weiterer Glykosyldonoren.^[2] Thioether-substituierte Glykane bilden hierbei oftmals eine Vorstufe zur Synthese von anderen Glykosyldonoren und werden bevorzugt zur Synthese von Oligosacchariden verwendet.^[2] Sie werden vielseitig zur anomeren Funktionalisierung verwendet, aufgrund ihrer Orthogonalität zu verschiedenen Schutzgruppen werden diese auch gezielt als Schutzgruppen des Anomeren Zentrums verwendet.^[62] Tanaka et al. zeigen eine auf Thioglycosyl basierte Eintopfsynthese aus freien Sacchariden, die ohne Schutzgruppen auskommt.^[63] Sinay wiederum verwendete bereits 1991 Thioether, um gezielte Glykanstrukturen zu erzeugen.^[64] Halogenierte Glykane bilden die frühesten bekannten Glykosyldonoren und wurden erstmals 1901 von Wilhelm Koenigs und Eduard Knorr in München durchgeführt.^[2, 65] Der Mechanismus dieser Koenigs-Knorr-Methode entspricht dabei in der Regel einem S_N^2 -Mechanismus, welcher zu einer Umkehr des Stereozentrums in anomerer Position führt.

Durch Hinzugabe von Halogenid-Salzen, die das Halogenid komplexieren können, ist auch eine S_N^1 -Typ-Reaktion durchführbar, wie beispielsweise von Lemieux et al. gezeigt.^[66] Eine vielseitig verwendete Methode zur Generierung eines Glykosyldonors, der für die Synthese vieler Kohlenhydratgrundbausteine eingesetzt wird, ist die Trichloroacetimidat-Synthese. Sie wurde erstmals von Schmidt und Kinzy im Jahre 1994 vorgestellt und wird durch die Reaktion einer freien Hydroxygruppe in anomerer Position mit Trichloroacetonitril synthetisiert.^[67] Neben den hohen Ausbeuten ist der S_N^1 -Mechanismus ein Vorteil dieser Variante, da mit Hilfe von dirigierenden Nachbargruppen eine Kontrolle über die gewünschten Anomeren erhalten werden kann.^[10] In einigen Fällen kann der gezielte Einsatz von Katalysatoren oder Lösungsmitteln auch ohne Verwendung von Kohlenhydratdonoren zu einer Anomerenkontrolle führen. Roy und Mukhopadhyay zeigen beispielsweise eine Fischerglykosylierung verschiedener Kohlenhydrate (u.a. Mannose, Galaktose, Glukose und *N*-Acetylglucosamin) mit Hilfe eines Silika-Katalysators, auf dem Schwefelsäure immobilisiert wird.^[68] Unter Umsetzung von Propargylalkohol und anschließender Acetylierung können mit Hilfe säulenchromatographischer Aufreinigung Kohlenhydrate wie Galaktose und Glucose in hoher Anomerenreinheit und *N*-Acetylglucosamin sowie Mannose sogar in anomerenreiner Form isoliert werden.

Die bisher beschriebenen Syntheserouten zeigen Beispiele wichtiger Intermediate, aus denen Monomere erhalten werden können. Verschiedene Gruppen bedienen sich einer Direktsynthese von Glykomonomeren aus den entsprechenden Glykanen, zumeist ohne Einsatz von Schutzgruppenchemie. Vorteilhaft ist die unkomplizierte Monomersynthese unter Vermeidung von mindestens zwei Syntheseschritten (Schützen und Entschützen) sowie die Verwendung einer geringeren Ressourcenmenge. Allerdings sind nur wenige Glykomonomere auf diese Weise zugänglich, vor allen in Hinblick auf die zumeist notwendige Kontrolle des Anomerenverhältnisses. Tanaka et al. zeigen eines der wenigen Beispiele einer Direktsynthese, indem sie β -Sialyllactose-präsentierende Homo- und Copolymere aus freier 3'-Sialyllactose unter Verwendung von 2-Chloro-1,3-dimethylimidazoliniumchlorid zur Azidierung und anschließender Kupfer-Click-Reaktion

synthetisieren.^[69] Die hier dargestellten Beispiele zeigen lediglich einen Ausschnitt und einen Einblick in mögliche Glykomonomersynthesen. Ebenso vielseitig sind die Möglichkeiten zur Polymerisation eben dieser.

1.2.2 Polymerisation von Glykomonomeren

Die Synthese von Polymeren ist auf zwei verschiedene Arten möglich: Stufenwachstumsreaktionen und Kettenwachstumsreaktionen. Zur Stufenwachstumsreaktion zählen Polyaddition und Polykondensation, während die Kettenwachstumsreaktionen weiter unterteilt werden können. Die Synthese von Glykopolymeren aus Glykomonomeren findet beinahe ausschließlich mittels Kettenwachstumsreaktionen statt, da diese eine höhere Kontrolle über das anvisierte Molekulargewicht geben und eine einheitlichere Molekulargewichtsverteilung aufweisen.

Aus diesen Gründen sind nur wenige Beispiele für Polykondensationen und Polyadditionen zur Glykopolymersynthese in der Literatur zu finden. Pana et al. stellen beispielsweise mittels Polykondensation ein Glykooligomer her, welches Mannofuranose und freie Doppelbindungen präsentiert und anschließend mittels Hydroxypropylacrylat und 2-Hydroxypropylmethacrylat quervernetzt wird.^[70] Ein Glykopolymer im weiteren Sinne generieren Gerke et al. aus der Polyaddition von sequenzdefinierten glykosylierten Oligomeren.^[71] Hierzu werden Thiol-terminierte Oligomere mit Alken-terminierten Oligomeren mittels Thiolen-Click-Reaktion umgesetzt und deren Wechselwirkungen mit ConA untersucht. Deutlich weiter verbreitet ist allerdings die Synthese von Homopolymeren mittels Kettenwachstumsreaktion, welche im Folgenden näher dargestellt werden.

Kettenwachstumspolymerisation werden unter anderem anhand des zugrundeliegenden Polymerisationsmechanismus voneinander unterschieden. In der Literatur können Beispiele für eine große Bandbreite unterschiedlicher Kettenwachstumspolymerisationen von Glykopolymeren gefunden werden, wie beispielweise anionischer^[72, 73], kationischer^[74] oder radikalischer^[48, 75] Polymerisationen. Auch innerhalb der Kettenwachstumspolymerisationen gibt es Polymerisationstechniken, die sich eher für die Synthese von Glykopolymeren eignen. Die gewählte

Polymerisationstechnik hängt dabei vom Monomer, den anvisierten Zielstrukturen und von den gewünschten Polymereigenschaften, wie zum Beispiel Molekulargewicht, dessen Verteilung und gewünschter Endgruppen, ab.

Eine Polymerisationstechnik, die für eine große Bandbreite nicht nur von Glykomonomeren zugänglich ist, stellt die freie radikalische Polymerisation. Seit der ersten freien radikalischen Polymerisation eines Glykopolymers von Horejsi et al. im Jahre 1978 hat sich diese Polymerisationstechnik als robust und vielseitig einsetzbar gezeigt, denn Vorteile der freien radikalischen Polymerisation sind nicht zuletzt eine Vielzahl polymerisierbarer Gruppen sowie eine hohe Toleranz gegenüber verschiedenen Polymerisationsbedingungen und leichten Verunreinigungen.^[7, 76] Zusätzlich sind verschiedene reaktive Gruppen über die freie radikalische Polymerisation zugänglich, zumeist über kostengünstige Initiatoren. Nicht zuletzt aus diesen Gründen bietet die freie radikalische Polymerisation ein hohes Potenzial zur industriellen Erzeugung, welches bei unterschiedlichen großtechnischen Anwendungen bereits realisiert wird. Hinsichtlich biologischer Fragestellungen bietet die freie radikalische Polymerisation jedoch einige wesentliche Limitationen. So lassen sich mit dieser Polymerisationstechnik die erhaltenen Molekulargewichte schlecht kontrollieren und die Verteilung der erhaltenen Molmassen ist meist relativ uneinheitlich. Außerdem sind mittels freier radikalischer Polymerisation nicht-lineare Architekturen schwieriger gezielt synthetisierbar und eine systematische Einführung von Endgruppen ist aufgrund der Abbruchsreaktionen durch Rekombination und Disproportionierung aufwendig.^[7] Eine wesentliche Fragestellung der Glykobiologie ist jedoch die Suche nach für biologische Prozesse relevanten Polymereigenschaften. Für Untersuchungen, die die Polymereigenschaften in biologische Wechselwirkungsstudien einbeziehen, ist jedoch eine Kontrolle der synthetisierten Polymere und deren Eigenschaften notwendig.

Zur zielgerichteten Synthese von definierten Polymerarchitekturen oder zur Kontrolle des Molekulargewichts und der Dispersität eignen sich in der Regel ionische Polymerisationstechniken. Grund dafür ist die Unmöglichkeit von Abbruchsreaktionen, da die ionischen Kettenenden sich gegenseitig abstoßen. Takasu et al. bedienen sich beispielweise eines kationischen Mechanismus bei

der ringöffnenden Polymerisation von Oxazolin-terminierten Glykomonomeren zur Synthese von Homo- und Block-Copolymeren.^[74] Weitere Beispiele für anionische Polymerisationen finden sich bei der Polymerisation von disubstituierten Styrolderivaten mit acetalgeschützten Monosacchariden durchgeführt durch Lokyulant et al. im wässrigen Medium.^[73] Die Anzahl der Publikationen zu ionischen, vor allem zu anionischen, Polymerisationen ist jedoch insgesamt äußerst gering. Dies ist höchstwahrscheinlich intrinsisch begründet, da diese Polymerisationstechniken aufgrund der terminal-propagierenden Ionen aprotische Lösungsmittel und Monomere benötigen. Außerdem müssen die Polymerisationsansätze frei von Verunreinigungen sein – Acide Moleküle, elektrophile funktionelle Einheiten oder Sauerstoff stören die anionische Polymerisation insbesondere, da sie mit dem reaktiven Kettenende eine Terminierung herbeiführen können.

Wesentlich weniger anspruchsvoll an die Polymerisationsbedingungen bei gleichzeitiger Kontrolle über die Polymerisationsparameter sind beispielsweise ringöffnende Methathesepolymerisationen (ROMP), da hierbei lediglich auf die Abwesenheit von Sauerstoff und Stickstoff geachtet werden muss. Je nach Katalysator kann das Glykomonomer ohne Schutzgruppen und im wässrigen Medium polymerisiert werden. Außerdem ist die Einführung einer Endgruppe im direkten Vergleich zur freien radikalischen Polymerisation leicht möglich, da die Polymere auch nach Ablauf der Polymerisation reaktiv bleiben. Mit Hilfe von Grubbs-Katalysatoren lassen sich besonders gut die Polymerparameter und -architekturen kontrollieren, wie in der Arbeit von Fraser und Grubbs gezeigt.^[77] Polymerisationen via ROMP benötigen zur Katalyse Übergangsmetallkomplexe, die auf biologische Systeme toxisch wirken können. Daher muss unter hohem Aufwand der Katalysator entfernt werden, falls das Polymer zum Zwecke von Wechselwirkungsstudien mit Zellen oder sonstigen lebenden Organismen synthetisiert wird.

Zu den Polymerisationstechniken, die ohne giftige Katalysatoren auskommen bei gleichzeitiger relativer Robustheit und hoher Kontrolle über die Polymerisationsparameter, zählen lebend-radikalische Polymerisationen. Diese unterteilen sich in verschiedene Untergruppen, zu denen unter anderem die nitroxid-vermittelte Polymerisation (NMP, aus dem Englischen von *nitroxide mediated*

polymerisation), Atomtransfer radikalische Polymerisation (ATRP, aus dem Englischen von *atomic transfer radical polymerisation*) und reversible Additions-Fragmentierungs-Kettenübertragungspolymerisation (RAFT) zählen. Verschiedene Gruppen zeigen die Möglichkeit zur Synthese von Glykopolymeren mit Hilfe der lebend-radikalischen Polymerisationstechniken mit einheitlichen Molekulargewichtsverteilungen. Die erste erfolgreiche lebend-radikalische Polymerisation von Glykomonomeren wurde von Ohno et al. im Jahre 1998 mit Hilfe der nitroxid-vermittelten Polymerisation durchgeführt.^[7] Die Gruppe konnte eng verteilte Glykopolymere eines Disaccharids aus ungeschützter 1-4-verknüpfter Galaktosyl-Gluconamide bei Umsätzen von ca. 90 % erhalten. Bei NMP wird hauptsächlich in Substanz polymerisiert und nicht jede Art Monomer kann mittels NMP polymerisiert werden.^[75] Aus diesem Grund sind in der jüngeren Vergangenheit vor allem ATRP und RAFT-Polymerisation als lebend-radikalische Polymerisationstechniken verwendet worden.

1.3 Anwendungen von Glykopolymeren

Die in Kapitel 1.2.2 dargestellten Polymerisationstechniken geben einen Eindruck der verschiedenen Synthesemöglichkeiten von Glykopolymeren und verdeutlichen, dass diese Substanzklasse auf verschiedene Weisen zugänglich ist. Je nach Forschungsfrage können synthetisierte Glykopolymere mit unterschiedlichem Fokus variiert werden. In der Regel weisen Glykopolymere aufgrund ihrer multivalenten Präsentation von Sacchariden eine hohe Affinität und eine erhöhte Spezifität zu den korrespondierenden natürlichen Bindungspartnern auf.^[3] Wesentlich beeinflusst werden diese Eigenschaften durch polymerspezifische Parameter wie Polymerkettenlänge, Kohlenhydratdichte, Flexibilität des Polymerbackbones sowie Struktur und Architektur des Polymers, welche wiederum durch die Wahl der Polymerisationstechnik und -bedingungen beeinflusst bzw. gesteuert werden können.^[26, 37, 46] Diese Parameter ermöglichen eine vielseitige Verwendung von Glykopolymeren vor allem in den Bereichen Wirkstoffentwicklung und Bioanalytik, da auf diese Weise eine große Anzahl an Molekülen mit leicht-variierten Eigenschaften bei ähnlichem Grundaufbau synthetisiert werden können. Im Folgenden soll auf beide potenzielle Zielanwendungen im Detail eingegangen werden.

1.3.1 Glykopolymere als Inhibitoren

Historisch betrachtet stellt die Analyse des Inhibierungspotenzials von Glykopolymeren die erste konkrete Zielanwendung dieser Substanzklasse dar.^[3] Bereits im Jahre 1991 synthetisierten Spaltenstein und Whitesides mit α -Sialinsäure funktionalisierte Polyacrylamide zur Inhibierung von Membranproteinen, die von Influenzaviren zur Hemagglutininierung von Erythrocyten auf der Virusaußenhülle präsentiert werden.^[50] Hierzu wurden verschiedene Copolymere mittels freier radikalischer Polymerisation synthetisiert, die sich jeweils in dem Einbauverhältnis von mit Sialinsäure funktionalisierten und nicht-funktionalisierten Acrylamiden unterschieden. Dabei konnten Spaltenstein und Whitesides ein vom Einbauverhältnis abhängiges Inhibierungspotenzial nachweisen und außerdem zeigen, dass polyvalente Sialinsäurederivate ein höheres Inhibierungspotenzial aufweisen als monovalente α -Methylsialinsäure. Dabei konnte die höchste sialinsäurebezogene Inhibierung bei Molenbrüchen von 0.2 – 0.7 nachgewiesen werden, wohingegen höhere bzw. niedrigere Einbauverhältnisse das Inhibierungspotenzial herabsenken. Spaltenstein und Whitesides führen dies auf die größere durchschnittliche Entfernung bei zu geringer Anzahl eingebauter Sialinsäure zurück und argumentieren bei höheren Molenbrüchen mit einer damit einhergehenden Herabsenkung der Effektivität der Sialinsäure. Somit sei die „glockenförmige Abhängigkeit des Inhibierungspotenzials basierend auf einem Wettbewerb zwischen Entropie und Effektivität der Funktionalisierung“.^[50]

Andere Gruppen betrachten das Inhibierungspotenzial verschiedener Homo-Glykopolymere abhängig von deren Kettenlänge und Kohlenhydrateinheiten. Mortell et al. untersuchten das Bindungsverhalten verschiedener via ROMP synthetisierter Glykopolymere und variieren die Art der präsentierten Kohlenhydrate.^[78] Auf diese Weise verglich die Gruppe die absolute und relative Inhibierung von ConA durch die untersuchten Glykopolymere. Dabei zeigt sich eine bis zu 50.000-fache Erhöhung der inhibitorischen Wirkung von mannosylierten Glykopolymeren im Vergleich zu monovalenter α -Methylmannose. Auch glukose-basierte Glykopolymere weisen eine 500-fach höhere Inhibierung auf als ihr monovalentes Gegenstück. Dieses Inhibierungsverhalten konnte seitdem in weiteren

Inhibitoren-Lektin-Paaren ebenfalls gezeigt werden.^[39, 44, 49] Allerdings gibt es auch Studien, die eine umgekehrte Beziehung zwischen Einbau der inhibierenden Spezies und der effektiven Inhibierung beobachten. Polizzotti und Kiick beobachten bei der Inhibierung von pentavalentem Choleratoxin durch Aminogalaktoside auf einem Polyglutarsäure-Polymergrundgerüst, dass ein geringerer Galaktoseanteil im Polymer eine höhere Inhibierung bewirkt.^[79] Aufgrund der ermittelten durchschnittlichen Bindungsabstände schlussfolgern die Autoren eine höhere Zugänglichkeit der Bindungstaschen des Toxins, wenn der durchschnittliche Mindestabstand der Saccharideinheiten mit dem relativen Abstand der Bindungstaschen zueinander übereinstimmt. Dieses Beispiel verdeutlicht, dass die jeweiligen Parameter zur Erhöhung der potenziellen Inhibierungsfähigkeit der Glykopolymere vom jeweils betrachteten System abhängen. Gleichzeitig können bei der Synthese von Glykopolymeren viele Parameter leicht variiert werden, sodass mit deren Hilfe bioanalytische Messungen durchgeführt werden können.

1.3.2 Glykopolymere in der Bioanalytik

Neben dem Potenzial von Glykopolymeren als mögliche Therapeutika können diese auch verwendet werden, um biologische Prozesse zu untersuchen und diese besser zu verstehen. Auch in diesem Anwendungsfeld der Glykopolymere, der Bioanalytik, stellt die mögliche Synthese vieler unterschiedlicher Polymere aus den gleichen Grundbausteinen einen wesentlichen Vorteil der Glykopolymere dar. Ein intuitives Beispiel ist dabei die Verwendung von Glykopolymeren als „Messstäbe“ oder „Zollstöcke“ zwischen Rezeptoren.^[3] Verschiedene Gruppen, darunter die Arbeitskreise um Grubbs und Kiessling, synthetisieren Glykopolymere mit unterschiedlichen durchschnittlichen Kettenlängen. Mittels ringöffnender Methathesepolymerisationstechniken synthetisierte Glykopolymere werden für diesen Zweck miteinander verglichen und die Bindungsaffinität zu den korrespondierenden Rezeptoren determiniert.^[78, 80] Ein erheblicher Anstieg in der beobachteten Bindungsaffinität in Abhängigkeit von der Kettenlänge ermöglicht dabei Rückschlüsse auf den mittleren Abstand der Bindungstaschen der Lektine zueinander. Dieses Prinzip nutzt die Gruppe um Ponader et al., die mittels sequenz-definierter Glykopolymere die Abstände

zwischen Mannose-Seitenketten gezielt variiert. Die verschiedenen Abstände der Kohlenhydrat-Liganden orientiert sich dabei am Abstand des betrachteten Lektins ConA. Bei genügend Abstand zwischen diesen Kohlenhydratliganden kann eine signifikante Zunahme der Bindung zu ConA gezeigt werden.^[81]

Glykopolymer-basierte Systeme erlauben – zusätzlich zur Analytik von Wechselwirkungen von solvatisierten Systemen mit Lektinen – Untersuchungen zum Bindungsverhalten von Lektinen mit zellähnlichen Strukturen, beispielsweise Mikrogelen. Hoshino et al. synthetisieren auf Polyacrylamid basierte Mikrogele verschiedener Flexibilität, die mit Lektinen wechselwirken, und vergleichen deren Avidität zu verschiedenen Mikrogelen. Dabei wird auf Goldoberflächen immobilisiertes ConA mit den betrachteten Glykopolymersystemen inkubiert und mittels AFM das Aggregationsverhalten beobachtet. Die höchste Bindungsaffinität weisen dabei Partikel mittlerer Flexibilität auf, da im Vergleich zu flexiblen Systemen die Assoziation benachteiligt ist, während die Dissoziation bei rigiden Hydrogelen langsamer stattfinden kann.^[82]

Eine sensitive Methode zur dynamischen Analytik von schwachen intermolekularen Wechselwirkungen bietet die Oberflächenplasmonenresonanz. Hierzu wird einer der untersuchten Bindungspartner auf einer Goldoberfläche immobilisiert und durch Hinzugabe des entsprechenden (potenziellen) Bindungspartners die daraus resultierende Bindungsstärke zum an der Oberfläche immobilisierten Liganden in Echtzeit ermittelt. Die Bindung des immobilisierten Liganden an die Goldoberfläche kann dabei kovalent direkt an die Goldoberfläche erfolgen oder (quasi-)kovalent an Zwischenmoleküle, sodass dieses Assay auf verschiedene Weisen zugänglich ist. Die Firma General Healthcare vertreibt standardisierte Goldoberflächen zur Verwendung für Oberflächenplasmonenresonanz-Assays, auf denen bereits eine Dextranmatrix immobilisiert ist. Diese Dextranmatrix weist unter anderem Carboxygruppen auf, die mit freien Aminen von Proteinen reagieren können. Ein weiteres System stellen mit Streptavidin-funktionalisierte Chips dar, welche ein quasi-kovalentes Aufbringen von Biotin-präsentierenden Molekülen ermöglichen. Derartige Oberflächenplasmonenresonanzassays ermöglichen labelfreie Echtzeitmessungen von Interaktionen

zwischen Glykopolymeren und Lektinen. Neben diesen SPR-spezifischen Vorteilen bietet die Immobilisierung auf einer festen Goldoberfläche weitere Vorteile.^[83] Gestwicki et al. zeigen in einem Vergleich monovalenter und polyvalenter Saccharid-Systeme, dass Effekte wie Multivalenz und Avidität durch Präsentation auf einer rigiden Oberfläche verstärkt werden und beobachtete Bindungsaffinitäten deutlicher hervortreten.^[84] Dies kann durch Crosslinkingeffekte mit benachbarten Glykanen verstärkt werden, wie Gordula und Bertozzi anhand von Acetylgalaktosamin-Derivaten und ihren korrespondierenden Lektinen zeigen konnten.^[85] Eine Verringerung der Glykopolymerdichte resultiert in einer deutlich stärkeren Abnahme der Affinität der Lektine zur Oberfläche als dies alleine auf den Konzentrationseffekt der Glykanarchitekturen zurückzuführen ist. Gordula und Bertozzi schließen daraus, dass die Oberflächendichte der Glykane eine wesentliche Rolle bei den Erkennungsprozessen der Lektine spielt. Systeme, bei denen ähnliche Effekte beobachtet werden können, stellen Nanopartikel dar, die Glykopolymere präsentieren. Auf diese wird im folgenden Kapitel weiter eingegangen.

1.4 Glykofunktionalisierte Nanopartikel

Neben Glykopolymeren werden Nanopartikel ebenfalls als multivalent-glykosylierte Systeme in verschiedenen Anwendungsfeldern untersucht. Unter Nanopartikeln werden Strukturen verschiedener Morphologie verstanden, die eine Partikelgröße zwischen 10 und 1000 nm aufweisen.^[86-88] Strukturen im Nanometerbereich weisen als potenzielle Wirkstoffe oder Wirkstofftransporter signifikante Vorteile gegenüber anderen Strukturen wie Liposomen oder Mikropartikeln auf.^[88-90] So können Nanopartikel aufgrund ihrer Größe parental verabreicht werden, kleinste Blutgefäße durchlaufen und Phagozyten, auch als Fresszellen bekannt, umgehen. Außerdem können sie Zellmembranen penetrieren und so zu „Zielorganen“ wie Leber, Milz, Lunge, Rückenmark und Lymphknoten gelangen.^[86, 87] Mittels oraler oder nasaler Anwendung können Nanopartikel von Schleimhäuten absorbiert werden und diese durchwandern.^[91, 92] Nicht zuletzt ermöglichen Nanopartikel als potenzielle Wirkstofftransporter eine breite Einsetzbarkeit mancher Wirkstoffe bei gleichzeitiger Reduktion toxischer Nebeneffekte, da die transportierten Wirkstoffe kontrolliert am Zielort freigesetzt werden können.^[86, 87, 93, 94] Eine solche Freisetzung kann beispielsweise durch Veränderungen des pH-Wertes oder erhöhter-oxidativer Umgebung getriggert werden.^[95, 96] Diese Eigenschaften werden erhalten und beeinflusst, indem Nanopartikel mit Polymeren funktionalisiert werden. Außerdem weisen viele Nanopartikelmaterialien im Körper ungewünschte Nebeneffekte wie unspezifische Wechselwirkungen mit Zellen und Proteinen auf, die zu „Wirkstoffanreicherungen in Nicht-Zielgewebe“ führen können.^[94, 97] Neben Polyethylenglycol^[98-100], Poly-N-Isopropylacrylamid^[101], Polymilchsäure^[102] und Polyacrylsäure^[100, 103] werden daher vor allem Polysaccharide als biokompatible und biologisch-abbaubare Komponente von Nanopartikeln zum Zwecke des Wirkstofftransports untersucht.^[86] Außerdem können oligo- und polysaccharid-funktionalisierte Partikel eine Rolle als aktiven Wirkstoff übernehmen, da es für einige Oligo- oder Polysaccharide korrespondierende natürliche Rezeptoren gibt.^[94] So zeigen Stahn und Reisig, dass lactosylierte Liposome, die eine mit Partikeln vergleichbare Struktur aufweisen, aufgrund ihrer Multivalenz gezielt KG-1 Leukämiezellen inhibieren.^[104]

Neben natürlichen Oligo- und Polysacchariden lassen sich bioresponsive Partikel auch durch Funktionalisierung der Partikel mit Proteinen^[105], einzelnen Zuckern oder künstlichen Kohlenhydratstrukturen^[106] synthetisieren. Im Folgenden soll speziell auf die Synthese von Nanopartikeln und die angestrebten Anwendungsfelder eingegangen werden.

1.4.1 Kurze Einführung zur Herstellung und Anwendungen von glykosylierten Partikeln

So vielfältig die möglichen Nanostrukturen sein können, so verschieden können die Methoden zur Glykosylierung von Nanopartikeln sein. Grundsätzlich können mehrere Aspekte voneinander unterschieden werden. So wird vor allem bei monovalenten Sacchariden unterschieden, ob der Einbau der Kohlenhydrateinheit während der Partikelsynthese oder ob die Funktionalisierung der Struktur erst nachträglich erfolgt. Neben monovalenten Kohlenhydrateinheiten können Glykooligomere und Glykopolymere gezielt auf Nanostrukturen präsentiert werden. Hierzu werden die Prinzipien *grafting to*, *grafting from* und *grafting through* voneinander unterschieden. *Grafting to* beschreibt dabei die kovalente Anbringung von bereits synthetisierten Glykopolymeren auf Partikel, während bei *grafting from* ein Polymer auf dem Partikel gebildet wird.^[107-110] Hierfür eignen sich vor allem lebend-radikalische Polymerisationen wie RAFT-Polymerisation oder ATRP (siehe Kapitel 1.2.2). *Grafting through* als Funktionalisierungsmöglichkeit für glykosylierte Nanostrukturen ist in der Literatur seltener zu finden. Hier erfolgt die Funktionalisierung mit dem Oligo- bzw. Polysaccharid bei der Synthese der Struktur selbst. Im Folgenden soll auf die Synthese der wichtigsten Arten von Nanopartikeln eingegangen und deren Anwendungsgebiete dargestellt werden. Nanopartikel können hinsichtlich verschiedener Eigenschaften unterschieden werden, beispielsweise ihrer Form, Verformbarkeit oder ihrer Härte. Zu den häufig verwendeten harten Nanopartikel zählen Gold-, Eisenoxid- und Silika-Partikel.

Eine in der Literatur vielseitig untersuchte Art Nanopartikel stellen Goldnanopartikel dar. Sie sind einfach und gut-reproduzierbar herzustellen und können leicht über Thiol-Goldwechselwirkungen

funktionalisiert werden. Außerdem können Gold-Nanostrukturen vielseitige Formen annehmen. So sind neben den runden Sphären auch *Nanorods* (Stäbchen) und *Nanocages* (Kuben) bekannt.^[111, 112] Aufgrund der einfachen Synthese sind vielfältige glykosylierte Gold-Nanostrukturen bekannt und hinsichtlich verschiedenster Anwendungen untersucht. Neben der Untersuchung von Wechselwirkungen mit Lektinen, Bakterien und Toxinen^[107, 113] werden glykosylierte Goldnanopartikel auch als Marker in Entzündungsprozessen^[114] sowie Krebstherapeutika^[115] eingesetzt. So funktionalisieren beispielsweise van Kasteren et al. Goldpartikel mit Tetrasacchariden, um endotheliale Marker bei akuter Gehirnentzündung zu detektieren.^[114] Toyoshima und Miura hingegen präsentieren gezielt Glykopolymere auf Goldnanopartikeln.^[107] Sie weisen dabei eine unterschiedliche Aggregation ihrer Strukturen abhängig von der Zuckerdichte mittels RAFT-Polymerisation synthetisierter Glykopolymere nach. Außerdem verdeutlichen die Resultate dieser Gruppe, dass die Funktionalisierung von Partikeln über den *grafting-to*-Ansatz mit gut-definierten Glykopolymeren den Vorteil der besseren Vergleichbarkeit aufweisen. Dies zeigt sich auch in den Auftragungen monovalenter Saccharide auf Goldnanopartikeln. Garcia et al. zeigen beispielsweise mit der Funktionalisierung von Goldnanostäbchen mit monovalenten *N*-Acetylglucosamin-Einheiten, dass diese unter physiologischen Bedingungen stabil sind und auch in proteinreichen Umgebungen ein selektives Bindungsverhalten aufweisen.^[108]

Neben Goldnanopartikeln können auch glykosylierte Eisenoxidpartikel synthetisiert und hinsichtlich ihrer Aufnahme in Zellen untersucht werden. Moros et al. vergleichen beispielsweise die Zellaufnahme Monosaccharid-präsentierender Eisenoxidpartikel mit Polyethylenglycol substituierten Derivaten.^[116] Die Gruppe kann auf diese Weise zeigen, dass die Erkennungsprozesse der Zelloberflächenproteine die Aufnahme glykosylierter Eisenoxidnanopartikel über die Zellmembran begünstigt. Basuki et al. hingegen präsentieren Glykopolymere auf Eisenoxidnanopartikeln.^[109] Hierfür wurden mittels Kupfer-mediierter lebend-radikalischer Polymerisation und anschließender Klickreaktion mannose-, glucose- und galaktosehaltige Copolymere synthetisiert. Es wurden Wechselwirkungen mit Lektinen und

Lungenkrebszellen untersucht, wobei eine erhöhte Aufnahme mannosylierter Strukturen durch Lungenkrebszellen der Zelllinie A549 beobachtet werden konnte.

Neben diesen harten auf Metall basierten Nanopartikeln gibt es weichere, flexiblere Sorten. Ein wichtiges Beispiel hierfür sind Nanopartikel, die aus Polyethylenglycol bestehen. Schmidt et al. stellen mannosylierte und galaktosylierte PEG-Partikel her, indem sie zunächst Polyethylenglycol-basierte Partikel nachträglich mittels benzophenonvermittelter Photoreaktion mit Crotonsäure funktionalisieren und somit eine Säurefunktionalität einführen.^[110] Auf diese Weise können monovalente Galaktose- und Mannosederivate mit freien Aminen an Partikel gebunden werden. Derartige Partikel sind sehr elastisch und ermöglichen daher den Zugang zu einer besonderen Messmethode der Bindungsstärke: *Soft colloidal probes - reflection interference contrast microscopy*. Die glykosylierten Partikel werden hierfür über eine mit ConA funktionalisierte Glasoberfläche geleitet, wodurch diese mit der Oberfläche wechselwirken und an diese adsorbieren. Mannosylierte Partikel verformen sich, da die Ausbildung einer nicht-kovalenten Bindung zwischen den Sacchariden und dem ConA ein Energieminimum darstellt. Hierfür muss sich der Kontaktwinkel des Partikels zur Glasoberfläche hin vergrößern, sodass die Stärke der Affinität der Partikel an die Oberfläche durch die Bestimmung dieses Kontaktwinkels eingeschätzt werden kann.

1.4.2 Januspartikel und -strukturen

Wie bereits beschrieben sind in der Literatur eine Vielzahl verschiedener Partikelsorten bekannt, welche sich anhand diverser Parameter unterscheiden können. In der Regel handelt es sich bei derartigen Partikeln um Systeme mit homogener Verteilung der funktionellen Gruppen auf der Oberfläche. Eine Ausnahme bilden janusartige Strukturen. Januspartikel bzw. -strukturen weisen verschiedenartig-funktionalisierte Seiten oder Oberflächen auf, die sich jeweils gegenüberliegen und entweder „unterschiedliche chemische Eigenschaften oder Polaritäten aufweisen“.^[117, 118] Der Wortbestandteil „Janus“ wurde erstmals im Jahre 1988 von Casagrande et al. in Zusammenhang mit amphiphilen Glaspartikeln verwendet und ist der römischen Mythologie entnommen: Janus ist der

römische Gott des Anfangs und des Endes und weist in antiken Darstellungen über zwei gegenüberliegende Gesichter auf.^[117, 119] An dieses Bild angelehnt sind verschiedene janusartige Strukturen beschrieben, wie in Abbildung 4 dargestellt.

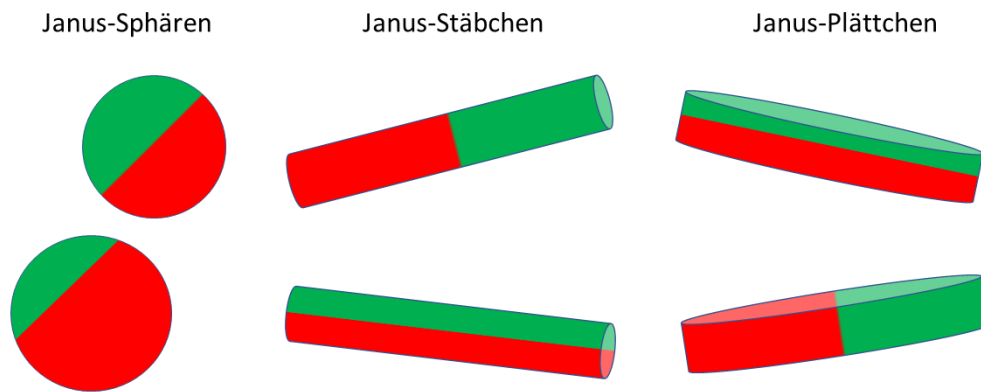


Abbildung 4: Janusstrukturen in schematischer Darstellung angelehnt an Walter und Müller.^[118]

Bisher wurden Janussphären, Janusstäbchen und Janusplättchen hergestellt, wobei Stab- und Plättchenform hinsichtlich der Verteilung der jeweiligen Seiten zwei verschiedene Untervarianten aufweisen.^[118] Neben der Form werden Januspartikel auch aufgrund ihrer Härte klassifiziert. Kirillova, Marschelke und Synytska unterscheiden beispielsweise „weiche (organisch, Polymer-basiert), harte (anorganisch, metallisch) und hybride (organisch/anorganisch) Januspartikel“.^[117] Unabhängig von dieser Klassifizierung weisen Januspartikel grundlegend andere physikalische Eigenschaften auf als die entsprechenden Partikel der jeweiligen Janushälften. Kirillova et al. vergleichen das Aggregations- und Assemblierungsverhalten von Silikapartikeln, die mit verschiedenen Polymeren (PDMAEMA, Polyacrylsäure, PEG, Polyacrylmethacrylat und Polystyrol) funktionalisiert wurden. Dabei erfolgt die Anordnung der Polymere auf den Silikapartikeln sowohl janusartig als auch homogen (statistisch) verteilt. Ein Vergleich dieser Systeme zeigt, dass sich abhängig von der Art der Funktionalisierung, pH-Wert und Konzentration andere Suprastrukturen ausbilden.^[120] Glaser et al. konnten anhand von Gold-Eisenoxidpartikeln zeigen, dass Januspartikel in Wasser-Hexan-Emulsionen eine höhere Oberflächenaktivität als die jeweils isolierten Partikel aufweisen.^[121, 122]

So vielfältig die literaturbekannten Janusstrukturen sind, so vielfältig sind auch die Synthesemöglichkeiten. Die potenziellen Syntheserouten sind dabei vor allem durch die anvisierten Produktmengen limitiert.^[123, 124] Eine verbreitete Methode zur Synthese von Janusstrukturen ist ein Ansatz, der auf einem partiellen Schutz einer Seite basiert, während die andere Seite modifiziert wird. Anschließend wird die geschützte Seite wieder zugänglich gemacht, weshalb dieser Ansatz auch „*protect-and-release*“-Prozess genannt wird.^[124] Ein großer Teil dieser Synthesevariante erfolgt durch Immobilisierung von Ausgangspartikeln auf planaren Oberflächen, die eine Monoschicht auf diesen ausbilden. Die zur Oberfläche gewandte Seite ist dabei geschützt, während die andere chemisch modifiziert wird. Hierzu zählen sogenanntes „*stamp coating*“, Sputtern und das Ausbilden von Langmuir–Blodgett-Schichten.^[124-127] Da diese Ansätze auf der Ausbildung von Monoschichten basieren, beträgt die Ausbeute oftmals wenige Milligramm.^[124] Ein Ansatz, der „größere Produktmengen im Gramm-Bereich“ liefert, basiert auf der Clusterbildung an der Grenzfläche von wässrigen Emulsionen.^[124] In einer bestimmten Variante – der *Pickering-Emulsion* – können beispielsweise silikabasierte Hybrid-Januspartikel hergestellt werden. Die Gruppe um Alla Synytska zeigt die Synthese von Januspartikeln mit Hilfe einer wässrigen Emulsion von Silikapartikeln in Wachs.^[121, 128] Je nach pH-Wert kann außerdem der Anteil der Janusseiten zueinander kontrolliert werden. So wird gezeigt, dass je nach pH-Wert der Umgebung Januspartikel mit PDMAEMA auf der einen und freien Aminen auf der anderen Seite kontrolliert im Verhältnis 1:3, 1:1 und 3:1 synthetisiert werden können.

Die verschiedenen Varianten der Januspartikel weisen aufgrund der vielfältigen Modifikationsmöglichkeiten eine Vielzahl potenzieller Anwendungsfelder auf. In der Literatur wurden Januspartikel als Stabilisatoren für Emulsionen^[129-131], Antigefriermittel^[132, 133], Träger von Katalysatoren^[134] und in biologischen Anwendungen^[112, 135] untersucht. Vor allem in letzteren bieten sie vielfältiges Anwendungspotenzial, da auf Januspartikeln mehrere für biologische Anwendungen interessante Eigenschaften miteinander kombiniert werden können. Zhang et al. zeigen die Synthese von Janustropfen mittels eines Mikrofluidik-Systems und anschließende Bindungsstudien mit ConA

und *E. Coli*.^[135] Hierfür werden jeweils eine Seite mit monovalentem ManC14, also Mannose, die mit einem 14-kettigen Kohlenwasserstoffrest am Anomeren Zentrum substituiert ist, und Zonyl FS300, einem Blockcopolymer, funktionalisiert. Aufgrund der Brechungseigenschaften dieser Tropfen lässt sich die Aggregation durch die multivalenten Wechselwirkungen der Mannose sowohl mit ConA als auch mit *E. Coli* beobachten. Sokolovskaya et al. weisen mit Hilfe der Wechselwirkungen zwischen Mannose und FITC-gelabeltem ConA nach, dass die Funktionalisierung von Janusnanorods mit Poly-Mannose erfolgreich war.^[112] Neben glykosylierten Januspartikeln sind auch Janusstrukturen ohne präsentierte Kohlenhydrate für biologische Zwecke interessant. Zhang et al. zeigen mit Hilfe einfacher FTIR-Untersuchungen das Potenzial von Januspartikeln als Wirkstofftransportsysteme mit kontrollierter Freisetzung des Medikaments auf.^[136] Kirillova et al. untersuchen wiederum die Anti-Haftwirkung („Anti-Biofouling“) von Mikroorganismen auf mit Januspartikeln funktionalisierten Oberflächen.^[137] Hierfür synthetisieren sie Januspartikel mit einer hydrophilen PEGMA- und einer hydrophoben PDMSMA-Seite sowie verschiedene Vergleichspartikel mit homogenen Oberflächen und tragen diese auf Silizium-Wafer auf. Mit Hilfe von Rasterelektronenmikroskopie wird anschließend die Biofilmbildung des Bakteriums *Cobetia Marina* sowohl unter statischen als auch dynamischen Bedingungen verfolgt. Vor allem unter statischen Bedingungen zeigt sich, dass Januspartikel eine Biofilmbildung im Vergleich zu hydrophoben und unfunktionalisierten Oberflächen verhindern.

Obwohl in der Literatur einige Janusstrukturen mit monovalenten Kohlenhydraten funktionalisiert wurden, gibt es wenige Beispiele für die Synthese von Janussystemen, die höhervale Kohlenhydratstrukturen aufweisen. Zhang et al. synthetisieren glykosylierte Janus-Dendrimere, die Lactose-Einheiten multivalent präsentieren.^[138] Wechselwirkungsstudien mit Lektinen, die im menschlichen Körper auftreten, zeigen einen Einfluss der Zuckerdichte und Topologie der einzelnen Dendrimer-Strukturen auf das Bindungsverhalten abhängig von den gewählten Lektinen. Andere Ansätze nutzen selbst-assemblierende Block-Copolymere zur Synthese von Januspartikeln. Dag et al. synthetisieren hierzu mannosylierte Triblock-Terpolymere, die bei unterschiedlichen pH-Werten verschiedene Suprastrukturen ausbilden.^[139] Diese Strukturen bilden Mizellen mit blütenförmiger,

zylindrischer, himbeerartiger oder raupenähnlicher Morphologie und werden hinsichtlich ihrer Wechselwirkungen mit dem Mannoserezeptor RAW264.7 untersucht, bei welchem es sich um eine Makrophagen-Zelllinie handelt, die ein Modell für Virus-Eintritte in Zellen darstellt.

Unter Betrachtung dieser Gesamtheit an Studien ist es nur folgerichtig, dass ein Fokus auf die Untersuchung von glykosylierten Janusstrukturen gesetzt wird. Neben der Vielzahl an Eigenschaften und Formen, die sich durch die Janusstruktur ergeben, kann eine gezielte Synthese von kohlenhydratbasierten Systemen Forschungsfragen aus dem speziellen Forschungsfeld der Januspartikel mit der Welt der Lektine, Bakterien und Viren vereinigen. Ein Zugang zu neuartigen Wirkungsmechanismen erscheint daher plausibel und stellt somit einen interessanten Bereich potenziell neuartiger Wirkstoffsysteme dar. Vor allem die kontrollierte Synthese von Glykopolymeren bietet hierfür ein besonderes Potenzial, da neben der möglichen strukturellen Vielfalt eine Vielzahl verschiedener Kohlenhydratsysteme an unterschiedlichen biologischen Targets untersucht werden können (vergleiche Kapitel 1.3).

2. Motivation und Zielsetzung

Das Verständnis der Interdependenzen unterschiedlicher biologischer Systeme wächst mit den vielfältigen Möglichkeiten, Wechselwirkungen zwischen Kohlenhydraten und natürlichen Liganden zu untersuchen. So werden Glykopolymere als Mimetika natürlicher Glykane eingesetzt und zeigen vielversprechende Eigenschaften, bspw. in der Analytik als Werkzeug zur Erkennung von Lektinen sowie Pathogenen oder als Wirkstoff zur Inhibition der pathogenen Adhäsion.^[140-143] Die Bindung von Glykopolymeren zu Lektinen, Bakterien oder Viren wird dabei stark von der Struktur des Glykopolymers beeinflusst, z.B. von dessen Länge, Architektur oder Valenz. [3, 6, 26, 42, 46, 47]

Diese Struktur-Bindungseigenschaften wurden bereits vertiefend für Glykopolymere in Lösung untersucht, während sie für immobilisierte Glykopolymere, z.B. auf Chipoberflächen oder Nanopartikeln, weniger bekannt sind. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, einen Satz von Glykopolymeren zu erzeugen, die a) gezielt in der Kettenlänge variieren, b) entweder einen bindenden oder einen nicht-bindenden Zucker präsentieren und c) definierte Endgruppen zur Immobilisierung auf verschiedenen Oberflächen tragen. Mit diesen Glykopolymeren sollen anschließend zwei unterschiedliche Systeme erzeugt werden. Zum einen ist das Ziel die Durchführung von Oberflächenplasmonenresonanzstudien mittels glykosylierter Goldchips, zum anderen sollen Glykopolymer-funktionalisierte Januspartikel zum Studium ihrer Wechselwirkungen mit *E. Coli*-Bakterien erzeugt werden.

Ein wichtiger Fokus der Arbeit liegt somit zunächst auf der Etablierung einer Syntheseroute für Mannose- und Galaktose-Monomere und deren Polymerisation mittels RAFT-Polymerisation, da sich diese Polymerisationstechnik hervorragend dafür eignet, gering-disperse Polymere zu synthetisieren und gleichzeitig Anfangs- und Endgruppen zur weiteren Funktionalisierung der Glykopolymere festzulegen. Anschließend können die erhaltenen Polymere in den beschriebenen Teilprojekten der Arbeit eingesetzt werden.

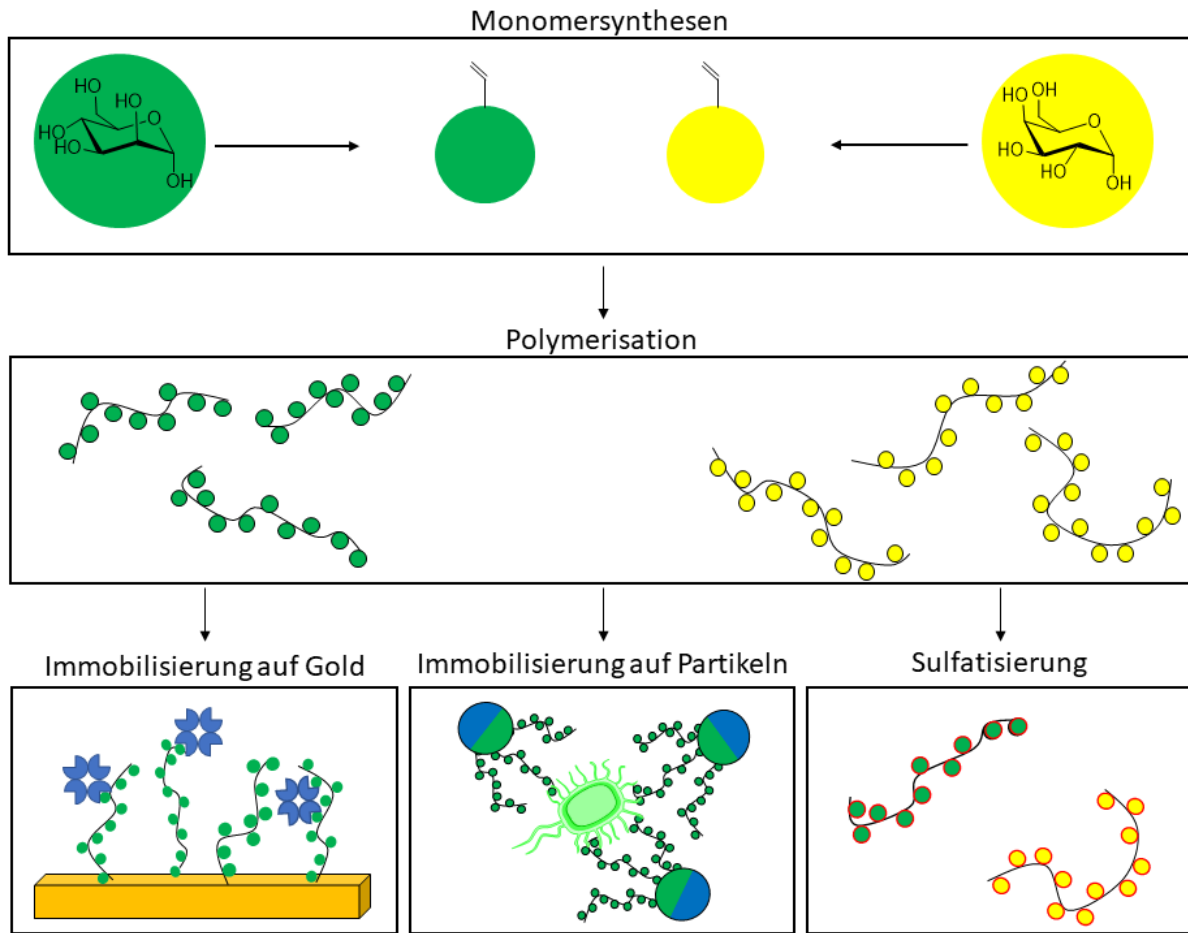


Abbildung 5: Übersicht der Arbeitsschritte, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden.

Die einzelnen Prozessschritte werden in den folgenden Kapiteln im Einzelnen erläutert und detailliert dargestellt.

3. Ergebnisse und Diskussion

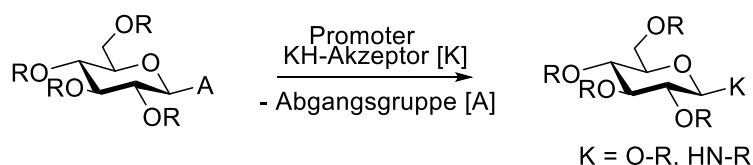
Ziel dieser Arbeit ist die Synthese von Glykopolymeren verschiedener Kettenlängen zur Immobilisierung und anschließende Bindungsstudien mit Lektinen und Bakterien. Die Polymerisationstechnik der Wahl ist die RAFT-Polymerisation, da diese die Möglichkeit gibt Thiole am Kettenende der Polymere zu erhalten bei gleichzeitiger Kontrolle über die Dispersität sowie das Molekulargewicht. Außerdem kann, je nach RAFT-Reagenz, das andere Ende des Glykopolymers mit einer zusätzlichen funktionellen Einheit versehen werden. Im Folgenden soll die Syntheseentwicklung der Monomere und deren Polymerisation beschrieben werden. Es werden dafür verschiedene Glykomonomere hergestellt, die eine polymerisierbare Einheit aufweisen. Anschließend werden diese mittels RAFT-Polymerisation umgesetzt und eine Bibliothek verschiedener Glykopolymere wird erhalten. Die Glykopolymere werden für Messungen mittels Oberflächenplasmonenresonanz und Immobilisierung auf Partikeln weiterverwendet. Außerdem werden einige der synthetisierten Glykopolymere sulfatisiert und für weiterführende Studien mit Viren eingesetzt.

3.1 Synthese der Glykopolymere

Die Synthese von Glykopolymeren mittels lebend-radikalischen Polymerisationsverfahren wie der RAFT-Polymerisation erfordert die Synthese von Glykomonomeren, also Kohlenhydrat-Liganden, die eine polymerisierbare Einheit – etwa eine Acryl-Funktion - tragen. Da die Zielsysteme, das Modell-Lektin Concanavalin A (ConA) und das Bakterium *Escherichia Coli* (*E. Coli*), anomerenselektiv mit α -D-Mannosiden binden, erfolgt die Syntheseoptimierung zunächst für das α -D-Mannosid-Monomer.^[144-148] Dabei spielen neben Aspekten wie Ausbeute und Reinheit vor allem die Anomerenreinheit der Saccharide eine übergeordnete Rolle, da diese die Stärke der Wechselwirkungen mit biologischen Systemen direkt beeinflusst. So wechselwirken β -D-Mannoside weniger stark mit ConA, sodass die Synthese des reinen α -Anomers angestrebt wird. Die Ergebnisse der Optimierung werden anschließend auf die Syntheseroute für die weiteren Monomere übertragen.

3.1.1 Syntheseentwicklung der Monomere

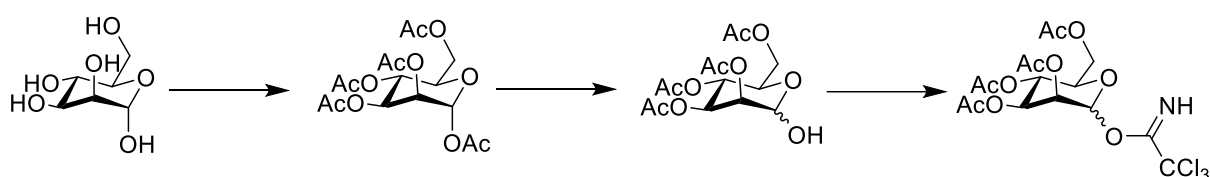
Die Synthese glykosidisch-verknüpfter Monomere kann grundsätzlich auf verschiedene Arten erfolgen: enzymatisch über Zuckernukleotide, chemisch über die Verwendung von Glykosyldonoren und über Fischerglykosylierung.^[2] Enzymatische Monomersynthesen zeichnen sich häufig durch hohe Ausbeuten und Anomerenselektivität aus, allerdings sind diese meist nur spezifisch für bestimmte Saccharide zugänglich. Produkte der Fischerglykosylierung weisen meist Mischungen verschiedener Anomere des synthetisierten Saccharids auf, da die Synthese aufgrund der notwendigerweise ungeschützten Hydroxygruppe am anomeren Kohlenstoffatom in Abwesenheit dirigierender Gruppen erfolgen muss. Ziel dieser Arbeit ist jedoch die Synthese mehrerer Saccharide mit identischer polymerisierbarer Einheit bei gleichzeitiger Kontrolle über das Anomerenverhältnis. Daher eignet sich vor allem die chemische Synthese der Glykomonomere mit Hilfe von Glykosyldonoren in Anwesenheit eines Promotors bzw. Katalysators sowie eines Kohlenhydrat-Akzeptors [K]. Glykosyldonoren sind Kohlenhydrate mit einer Abgangsgruppe [A] in der zu substituierenden Ringposition. Dies wird in Schema 2 verbildlicht.



Schema 2: Glykosyl-Donor in Anwesenheit eines geeigneten Akzeptorsystems angelehnt an Lindhorst.^[2]

Als potenzielle Glykosyldonoren kommen mehrere Möglichkeiten in Betracht. Die Gemeinsamkeit von Glykosyldonoren liegt in einer, wie in Schema 2 dargestellt, guten Abgangsgruppe [A]. Diese Abgangsgruppen reichen über Acetate, Sulfoxide, Oxazoline, Trichloroacetimide, Halogene, Thioglykoside und vielen weiteren potenziellen Abgangsgruppen. Von diesen verschiedenen Möglichkeiten haben sich die Koenigs-Knorr-, die Trichloroacetimidat- und die Thioglykosid-basierten Varianten hauptsächlich durchgesetzt.^[2, 65, 67] Vor allem die Trichloroacetimidat-Variante eignet sich für die Synthese von glykosidisch-verknüpften Mono- und Oligosacchariden mit verschiedenen

Kohlenhydraten.^[10] Sie wurde erstmals von Kinzy und Schmidt im Jahre 1994 beschrieben.^[67] Durch Verwendung von Acetylschutzgruppen erlaubt diese Syntheseroute bei Mannose eine regioselektive Synthese des α -Anomers. Grund dafür ist die Position der Hydroxygruppe bzw. Acetyl-Schutzgruppe in C2-Position, da diese nach Abspaltung des Trichloroacetimidates im Übergangszustand das Carbokation durch Koordination der freien Elektronenpaare des Sauerstoffs stabilisiert. Die Syntheseroute ist in Schema 3 dargestellt.



Schema 3: Syntheseroute eines Kohlenhydratdonors mit Trichloroacetimidat als Abgangsgruppe.

Schema 3 zeigt die Literaturbekannte Synthese eines Trichloroacetimidat-Mannosids, welches in einer nachfolgenden Reaktion mit geeigneten Akzeptormolekülen anomerenrein umgesetzt werden kann.^[10] Dabei ermöglicht ein fünfgliedriger Übergangszustand die bevorzugt Ausbildung des α -Anomers, an welchem sich die freien Elektronenpaare des Sauerstoffatoms der Acetylschutzgruppe und das aus dem Austritt der Abgangsgruppe resultierende Carbokation beteiligen. Abbildung 6 zeigt diesen fünfgliedrigen Übergangszustand, welcher den Angriff lediglich von der α -Position ermöglicht, sodass sich im Rahmen dieser Substitutionsreaktion ausschließlich das α -Anomer bilden kann. Im Falle der Galaktose wird das β -Anomer begünstigt, da – wie ebenfalls in Abbildung 6 dargestellt – die Anordnung der Acetylschutzgruppe in C2-Position den Angriff von der β -Anomer ausbildenden Seite begünstigt.

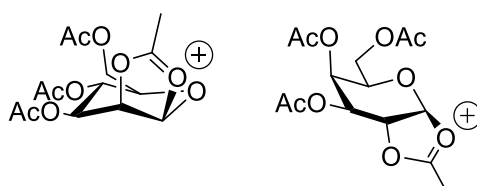


Abbildung 6: Fünfgliedriger Übergangszustand mit Penta-O-Acetyl-Mannose (links) und Penta-O-Acetyl-Galaktose (rechts).

Die Synthesen der Trichloroacetimidat-Derivate von Mannose und Galaktose sind literaturbekannt und können einfach durchgeführt werden.^[10] Der letzte Schritt – die Hinzugabe eines Alkohols zur direkten Synthese von Glykomonomeren – wurde für die angestrebten Verbindungen jedoch noch nicht beschrieben. Im Rahmen der Bachelorarbeit von Patrick Pierzyna wurde dieser Schritt unter Verwendung von *N*-Hydroxyethylmethacrylamid sowie *N*-[2-(2-hydroxyethoxy)ethyl]methacrylamid erstmalig durchgeführt und es konnte gezeigt werden, dass die anvisierten Monomere auf diese Weise zugänglich sind.^[149] Allerdings stellen die geringen Ausbeuten eine Limitation dar, die im Rahmen dieser Arbeit behoben werden soll. Anhand der Synthese von *N*-[2-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranosyloxy)ethyl]acrylamid wurden die Synthesebedingungen optimiert und auf die anderen Monomersynthesen übertragen. Die optimierten Bedingungen wurden in der gemeinsamen Publikation mit Soria-Martinez et al. zusammen mit der optimierten Syntheseroute des Galaktosehomologen publiziert.^[53]

Zur Optimierung der Monomersynthese wurden jeweils etwa 5.0 g Trichloroacetimidat eingesetzt und die jeweiligen Mengen an Nucleophil und Katalysator sowie der Katalysatortyp variiert. Das Trichloroacetimidat-Derivat wurde vorgelegt, für eine Stunde unter Eiskühlung gerührt und der Katalysator anschließend hinzugegeben. Nach weiteren 15 Minuten Kühlung färbte sich das Reaktionsgemisch gelb und der Alkohol wurde hinzutropft. Nach Aufreinigung wurden die Ausbeuten bestimmt und miteinander verglichen. In ihrer Publikation zeigen Dubber und Lindhorst, dass die Vorlage des Glykosylakzeptors und anschließender Hinzugabe des Glykosyldonors einen positiven Einfluss auf die Ausbeuten haben kann.^[150] Daher wurde auch eine Reaktion unter Vorlage des Alkohols und anschließender Hinzugabe des Trichloroacetimidat-Zuckers durchgeführt. Diese verschiedenen Bedingungen zur Syntheseentwicklung werden in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Syntheseentwicklung von *N*-[2-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranosyloxy)ethyl]-acrylamid.

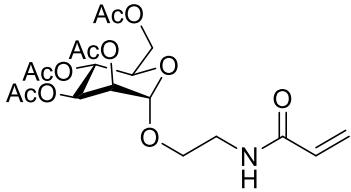
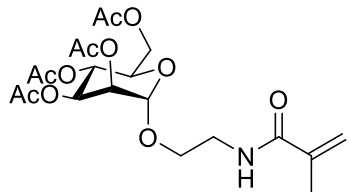
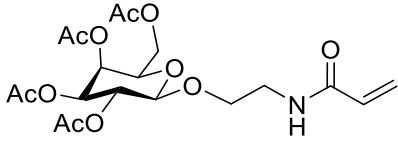
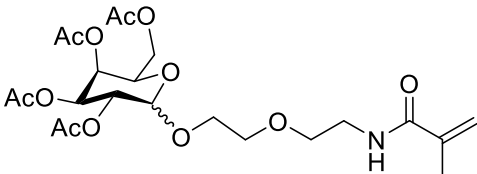
Variation von	Katalysator-konzentration	Überschuss des Nukleophils	Art des Katalysators	Ausbeute ^a
Konzentration des Katalysators	10 %	3-fach	Bortrifluoriddiethyl-etherat	-
	20 %	3-fach	Bortrifluoriddiethyl-etherat	-
	30 %	3-fach	Bortrifluoriddiethyl-etherat	15.5 %
Überschuss des Nukleophils	30 %	4-fach	Bortrifluoriddiethyl-etherat	10 %
	30 %	5-fach	Bortrifluoriddiethyl-etherat	11 %
Art des Katalysators	30 %	3-fach	Trifluormethansulfon-säure	-
	30 %	3-fach	Indiumbromid	-
Reihenfolge der Addition	100 %	3-fach	Bortrifluoriddiethyl-etherat	-

^anach säulenchromatographischer Aufreinigung

In Tabelle 1 ist eine Übersicht zu den verschiedenen Reaktionsbedingungen dargestellt. Neben einer Variation der Konzentration des Nukleophils und des Katalysators wurden außerdem verschiedene Katalysatoren verwendet. Außerdem wurde die Reihenfolge der Addition der Edukte variiert. Laut Literatur wird eine optimale Ausbeute durch Vorlage des Alkohols und des Katalysators und anschließender Hinzugabe des Trichloroacetimidates ermöglicht.^[2] Daher wurde die Variation der Hinzugabe erst nach einigen alternativen Variationen verändert, nachdem bei diesen Ansätzen keine zufriedenstellende Ausbeute erhalten wurde. So konnte gezeigt werden, dass in diesem Fall eine höhere Ausbeute durch Vorlage des Trichloroacetimidat-Derivats und anschließender Hinzugabe von Äquimolaren Mengen Bortrifluoriddiethyletherat erreicht wird. Dadurch wird der Zucker präaktiviert und die nucleophile Substitution nach dem S_N^1 -Mechanismus kann besser ablaufen. Auf diese Weise erfolgte die Synthese aller in Tabelle 2 dargestellten Monomere mit den jeweiligen Ausbeuten im

finalen Schritt. Die Synthesevorschriften werden detailliert im Experimentalteil dargestellt. Auf diese Weise wurden die folgenden Monomere mit den angegebenen Ausbeuten synthetisiert:

Tabelle 2: Übersicht der synthetisierten Glykomonomere.

Monomere	Kurzbezeichnung	Ausbeute
	Man2CA	15 %
	Man2CM	30 %
	Gal2CA	48 %
	Gal4CM	26 %

Die in Tabelle 2 dargestellten Monomere werden in einer RAFT-Polymerisation umgesetzt, wie im folgenden Kapitel beschrieben.

3.1.2 RAFT-Polymerisation der Glykomonomere

Die Reversible Additions-Fragmentierungs-Kettenübertragungs-(RAFT) Polymerisation ist eine lebend radikalische Polymerisationstechnik, mit deren Hilfe unter den richtigen Bedingungen definierte und homogen-verteilte Polymere erhalten werden können.^[151] Die in Kapitel 3.1.1 synthetisierten Monomere eignen sich für diese Art der lebend-radikalischen Polymerisation, da sie über eine polymerisierbare Doppelbindung aufweisen. Allerdings ist zu erwarten, dass sich die Kontrolle über die Molekulargewichte und deren Verteilung zwischen den Acrylamiden und Methacrylamiden abhängig vom verwendeten RAFT-Reagenz unterscheidet. Daher ist eine Optimierung der Polymerisation hinsichtlich des verwendeten RAFT-Reagenz in Kombination mit den jeweiligen Monomereinheiten unerlässlich. Hierzu wurden *N*-[2-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranosyloxy)ethyl]acrylamid (**4**) und *N*-[2-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranosyloxy)-ethyl]methacrylamid (**11**) unter vergleichbaren Bedingungen mit zwei verschiedenen RAFT-Reagenzien, auch Kettenübertragungsreagenzien genannt, umgesetzt. Dabei handelte es sich um in die Abbildung 7 dargestellten 2-Cyano-2-propyldodecyltrithiocarbonat (links) und 2-(Dodecylthio-carbonothioylthio)-2-methylpropionsäure (rechts).



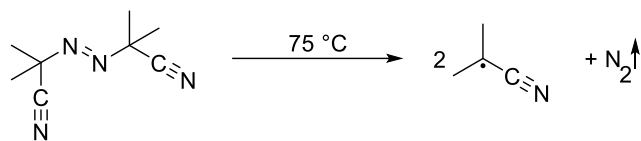
Abbildung 7: RAFT-Reagenzien zur Synthese von Glykopolymeren.

Die untersuchten Kettenübertragungsreagenzien unterschieden sich im Rahmen dieser Arbeit in der R-Gruppe, also derjenigen Gruppe, die am sogenannten α -Terminus des Polymers erhalten bleibt.^[152, 153] Das ω -Ende hingegen, welches die aus dem Trithiocarbonat gebildet wird, ist bei beiden RAFT-Reagenzien identisch. Bei der Auswahl geeignete Kombinationen aus RAFT-Reagenz und Monomer kommt es sowohl auf den Grad der Aktivierung der Monomere als auch auf Struktur des RAFT-Reagenz an. Acrylamide und Methacrylamide zählen zu den aktivierten Monomeren, daher sind sie vergleichsweise gering reaktiv in einer radikalischen Addition. Aus diesem Grund ist ein RAFT-

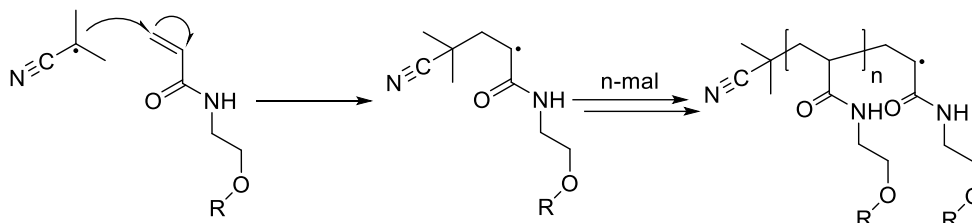
Reagenz zu wählen, welches reaktive Radikale ausbildet. Hierzu eignen sich die in Abbildung 7 dargestellten Moleküle, da beide über eine reaktive Thiocarbonat-Gruppe verfügen.^[154] Unterschiedliche Gruppen zeigen dies empirisch, indem Sie RAFT-Reagenzien und Monomere polymerisieren und diese miteinander variieren.^[155, 156] Aus den Ergebnissen kann der Schluss gezogen werden, dass 2-(Dodecylthiocarbonothioylthio)-2-methylpropionsäure besser für Acrylamide und das 2-Cyano-2-propyldodecyltrithiocarbonat besser für Methacrylamide geeignet ist. Um dies zu überprüfen, wurden im Rahmen dieser Arbeit beide Arten Monomere mit beiden RAFT-Reagenzien umgesetzt. Schema 54 zeigt den erwarteten Polymerisationsmechanismus der RAFT-Polymerisation von **4** mit 2-(Dodecylthiocarbonothioylthio)-2-methylpropionsäure als RAFT-Reagenz und Azobis(isobutyronitril) (AIBN) als Radikalinitiator.

Der Initiatorzerfall, in diesem Beispiel AIBN, wird thermisch initiiert unter Bildung zweier Radikale und unter Freisetzung von Stickstoff (I). Die freien Radikale reagieren mit in der Lösung befindlichen Monomeren unter Ausbildung weiterer reaktiver Radikale bei gleichzeitigem Einsetzen eines Kettenwachstums (II). Dieser Schritt wird als Präequilibrium bezeichnet. Nach einigen Additionsschritten weiterer Monomere wächst die Wahrscheinlichkeit, dass ein freies Radikal der wachsenden Kette mit der Trithiocarbonat-Gruppe des RAFT-Reagenz reagiert und somit ein weiteres Radikal emittiert (III). Das Wachstum der ersten Kette wird zunächst unterbunden, dafür kann das gebildete Radikal erneut das Kettenwachstum initiieren (IV). Die in den Schritten II) bzw. IV) initiierten Ketten bilden ein Gleichgewicht zwischen der jeweils „aktiven“ und der sogenannten „schlafenden“ Form. Dieses RAFT-Hauptgleichgewicht wird in Schema 5 anhand der wachsenden Kette aus IV) dargestellt.

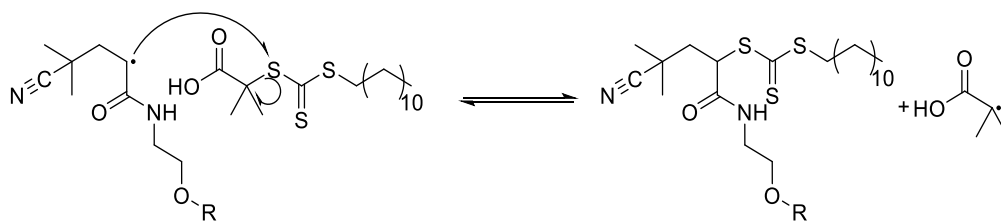
I) Initiatorzerfall



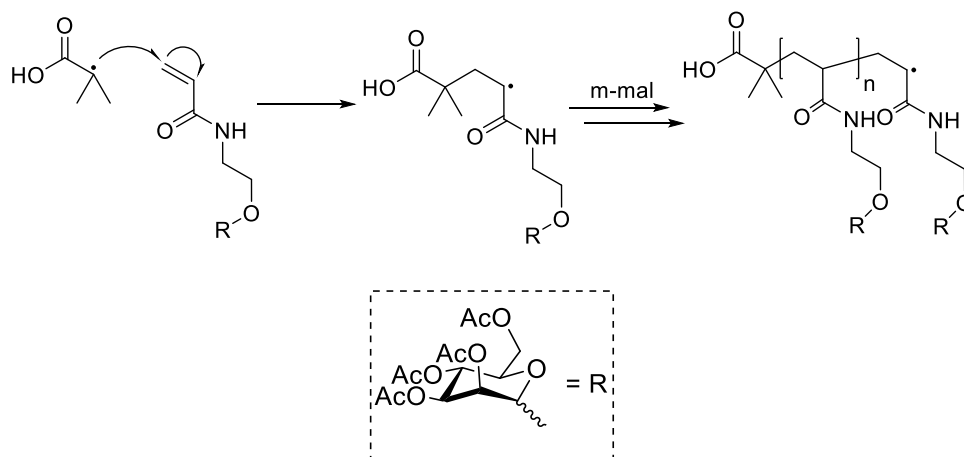
II) Kettenstart



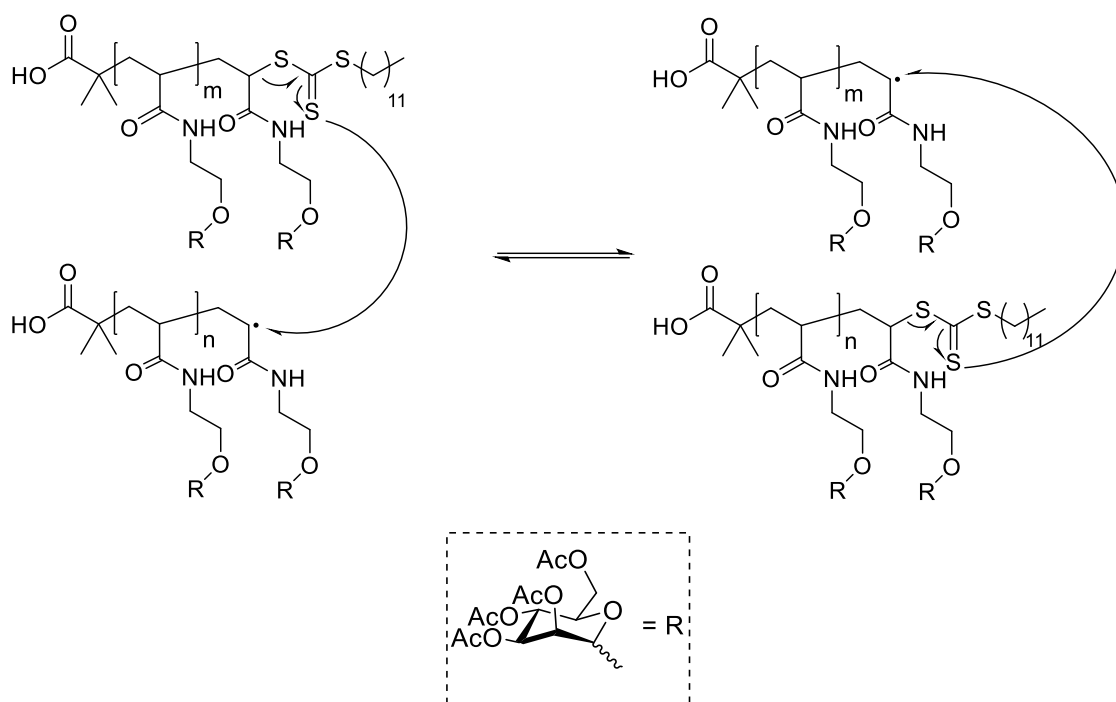
III) Präequilibrium



IV) Kettenwachstum



Schema 4: Präequilibrium anhand des Beispiels von 4.



Schema 5: RAFT-Hauptgleichgewicht.

Die Zerfallsgeschwindigkeit von AIBN ist bei 75 °C ausreichend hoch, um die Polymerisation gleichmäßig zu initiieren.^[157] In den weiteren Schritten sind viele radikalische Übergangszustände zu erwarten, deren hohe Reaktivität mit weiteren Radikalen unter Umständen problematisch werden kann. Weist die Atmosphäre im Reaktionsgefäß daher zusätzliche Radikale, beispielsweise Sauerstoff, auf, kann dies das Polymerisationsgleichgewicht empfindlich stören.^[158] Auch Wasser kann einen negativen Einfluss auf die Polymerisationsparameter haben. Aus diesem Grund ist auszuschließen, dass eine potenziell störende Substanz im Reaktionsgefäß enthalten ist und die Atmosphäre muss daher durch eine Schutzgasatmosphäre ausgetauscht werden. Hierzu wird das Polymerisationsgemisch in einem Mikrowellengefäß luftdicht verschlossen und mit Argon durchspült. Anschließend wird das Gefäß mittels flüssigen Stickstoffs eingefroren, die Atmosphäre unter vermindertem Druck entfernt und nach Auftauen wieder mit Argon durchgespült. Dieser Prozess wird auch *Freeze&Pump*-Prozess genannt und insgesamt dreimal vor jeder Polymerisation ausgeführt. Mit Hilfe dieser Techniken wurden vergleichbare und reproduzierbare RAFT-Polymerisationen durchgeführt. Aufgrund der Ergebnisse aus der Arbeit von Patrick Pierzyna wird Ethylacetat als Lösungsmittel verwendet, da gute Ergebnisse für die RAFT-Polymerisation von Methacrylamiden

gezeigt werden konnten.^[149] In Tabelle 3 werden die Ergebnisse der Optimierung der Polymerisationsansätze des Acrylamid-Monomers auf Galaktosebasis *N*-[2-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-galactopyranosyloxy)ethyl]acrylamid (**7**) zusammengefasst:

Tabelle 3: Übersicht der Polymerisationsansätze von **7** zur Polymerisationsoptimierung.

Polymer	Anteil AIBN [%]	Art und Anteil RAFT-Reagenz	Umsatz ^c [%]	$\overline{M}_w^d$	$\frac{\overline{M}_w}{\overline{M}_n}^d$
pGal _A	3.0	10.0 % CPDC ^a	96	39,800	1.02
pGal _B	2.0	10.0 % CPDC ^a	92	23,800	1.13
pGal _C	1.5	7.5 % CPDC ^a	98	45,000	1.02
pGal _D	1.0	5.0 % CPDC ^a	95	31,200	1.29
pGal _E	0.5	5.0 % CPDC ^a	94	43,000	1.23
pGal _F	2.0	5.0 % DMPS ^b	87	6,700	1.07
pGal _G	1.0	2.5 % DMPS ^b	92	13,110	1.08

^a2-Cyano-2-propyldodecyltrithiocarbonat, ^b2-(Dodecylthiocarbonothioylthio)-2-methylpropionsäure, ^cErmittelt über ¹H-NMR durch Integration der Signale der Doppelbindungsprotonen im Verhältnis zu den Signalen der im Polymer eingebauten Protonen, ^dMittels Wasser-GPC bestimmt.

Durch Variation der Verhältnisse der Monomerkonzentration zur RAFT-Reagenzien zu AIBN erfolgen verschiedene Polymerisationen des Acrylamid-Monomers. Bei allen Polymerisationen wird ein hoher Umsatz bei gleichzeitiger Kontrolle über die Molekulargewichtsverteilung erreicht. Die mit 2-Cyano-2-propyldodecyltrithiocarbonat synthetisierten Glykopolymere weisen in der Tendenz ein höheres Molekulargewicht auf, während die mit 2-(Dodecylthiocarbonothioylthio)-2-methylpropionsäure hergestellten Polymere ein geringeres Molekulargewicht aufweisen. Mit Hilfe dieser Beobachtungen und den Ergebnissen aus vorherigen Arbeiten^[149, 159] lassen sich nun gezielt Glykopolymere herstellen, die über die gewünschte Kettenlänge, Dispersität und Endgruppen verfügen zur weiteren Anwendungen in verschiedenen Bioassays. Tabelle 4 zeigt eine Übersicht zu den synthetisierten Glykopolymeren und deren Anwendung im weiteren Verlauf dieser Arbeit.

Tabelle 4: Übersicht der synthetisierten Glykopolymere und deren Anwendung im Verlauf dieser Arbeit.

Polymer	Einwaagen in mg [mol.-%]					Polymer-parameter		Projekt
	Monomer (Typ)	CTA (Typ)	AIBN	Umsatz [%]	Ausbeute in mg [%]	$\bar{M}_n$ [Valenz]	$\bar{D}$	
pMan ₂₆	350 (4)	14.4 [5] (DMPS)	2.6 [2]	< 93	64.7 [35 %]	7,690 [26.5]	1.03	SPR
pMan ₄₀	294.1 (4)	6.0 [2.5] (DMPS)	1.1 [1]	< 92	61.4 [26 %]	11,490 [40.2]	1.03	SPR
pGal ₂₂	416 (7)	17.0 [5] (DMPS)	3.07 [2]	< 92	127.0 [49 %]	5,600 [22]	1.02	SPR
pGal ₃₇	400 (7)	8.5 [2.5] (DMPS)	1.5 [1]	< 91	38.9 [26 %]	10,730 [37.5]	1.06	SPR
pMan-2CM ₉₇	177.1 (11)	1.33 [1] (CPDC)	0.3 [0.5]	n.b. ¹	13 [12.5 %]	28,540 [96.7]	1.27	SPR
pGal-4CM ₅₅	243.4 (9)	1.6 [1] (CPDC)	0.2 [0.3]	n.b. ¹	24 [15.9 %]	18,740 [54.9]	1.80	SPR
pMan ₄₃	200.4 (4)	4.1 [2.5] (DTMP)	0.74 [1]	n.e. ²	82.4 [66.1 %]	11,870 [41.6]	1.03	Janus
pGal ₂₄	126.2 (7)	5.2 [5] (DTMP)	0.93 [2]	< 93	60.2 [76.6 %]	6,900 [23.6]	1.04	Janus
pMan ₃₇	350.9 (4)	14.4 [5] (DTMP)	2.6 [2]	< 85	144.4 [66.1 %]	10,520 [36.7]	1.03	Janus
pGal ₁₀₁	130.0 (7)	0.0 [0]	2.4 [5]	< 90	34.0 [42.0 %]	28,400 [101.2]	1.25	Janus
pGal ₃₇	400 (7)	8.2 [2.5] (DTMP)	1.5 [1]	< 95	82.5 [33.1 %]	10,600 [36.9]	1.07	Janus
pMan ₁₈	185.8 (4)	7.6 [5] (DTMP)	1.4 [2]	< 72	26.2 [25.5 %]	5,289 [17.8]	1.08	Janus

Die Übersicht der Glykopolymere zeigt, dass mit Hilfe der RAFT-Polymerisation eine Auswahl an Glykopolymeren synthetisiert werden konnte. Die Methacrylamide weisen dabei eine geringfügig

breitere Verteilung auf als die Acrylamide – die Methylgruppe an der Doppelbindung übt offenbar einen Einfluss auf das RAFT-Hauptgleichgewicht aus. Darüber hinaus zeigt sich auch in diesen Polymerisationsansätzen, dass die Methacrylamide Polymere mit höheren Molmassen ausbilden. Insgesamt konnten unterschiedlich lange Glykopolymere mit enger Molmassenverteilung erhalten werden. Eine Ausnahme bildet das Polymer pGal4CM₅₅, welches mit einer DI = 1.80 eine breite Verteilung aufweist. Die Umsätze der Glykopolymere wurden mittels ¹H-NMR bestimmt und liegen bei mindestens 70 %, in der Regel jedoch über 90 %. Bei den Methacrylamiden ist eine Bestimmung des Umsatzes nicht möglich, da die Methylgruppen im Polymer mit denen des Backbones überlagern. Insgesamt fielen die Ausbeuten gering aus, voraussichtlich aufgrund der gewählten Aufreinigungsmethode: Zunächst wurden die Polymerisationsansätze zum Entschützen zu Natriummethanolat in kaltem Methanol gegeben, sodass sich ein Niederschlag ausbildete. Der Überstand wurde entfernt und das entschützte Glykopolymer in wässrige Natriumtetraborhydrid-Lösung resolvatisiert. Anschließend erfolgte die Dialyse für mehrere Tage. Bei dem Fällungsschritt kann es dazu kommen, dass nicht alles Glykopolymer aus der Lösung ausfällt, sodass die tatsächliche Ausbeute deutlich unter der theoretischen liegt. Dennoch wird von den Glykopolymeren genügend Material erhalten, um die nachfolgend beschriebenen Studien mit biologischen Systemen durchzuführen.

3.2 Oberflächenplasmonenresonanz-Studien

Die mit Hilfe der RAFT-Polymerisation erhaltenen Endgruppen der in Kapitel 3.1 synthetisierten Glykopolymere ermöglichen eine Funktionalisierung von Goldoberflächen durch die Bildung einer kovalenten Bindung zwischen der Thiol-Gruppe der Glykopolymere und Gold. Derartig präparierte Goldoberflächen können eingesetzt werden, um mit Hilfe von Messungen der Oberflächenplasmonenresonanz (SPR, aus dem Englischen für „*Surface Plasmon Resonance*“) u.a. Wechselwirkungen zwischen Kohlenhydraten und Lektinen zu untersuchen.

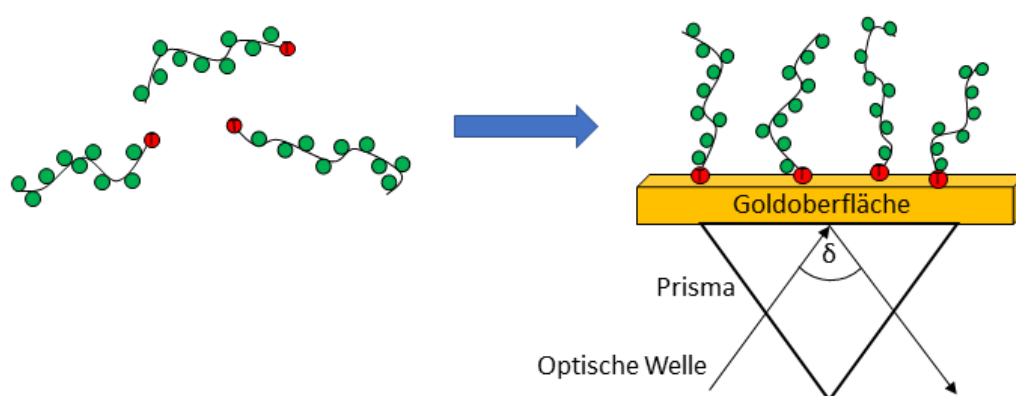


Abbildung 8: Vorbereitung von Goldoberflächen zur Bestimmung der Oberflächenplasmonenresonanz, angelehnt an Homola et al..^[160]

Abbildung 8: Vorbereitung von Goldoberflächen zur Bestimmung der Oberflächenplasmonenresonanz stellt das Prinzip der Goldoberflächenpräparation und der nachfolgenden Messung mittels SPR dar. Aufgrund der experimentellen Anordnung erfolgt die Präparation der Goldoberfläche in Lösung, indem die Thiol-terminierten Glykopolymere über eine saubere Goldoberfläche geleitet werden. Die Thiolgruppen – in Abbildung 8 in rot und mit einem „T“ markiert – fungieren als eine Art kovalenter Anker, mit dessen Hilfe die Glykopolymere kovalent an die Goldoberfläche binden. Auf der Rückseite der dünnen Goldoberfläche ist ein Prisma aus Glas angebracht, welches eine Grenzfläche zwischen Gold- und Glasoberfläche ausbildet. An dieser Grenzfläche oszillieren Oberflächenplasmonen, die in Abhängigkeit vom Reaktionsgeschehen auf der Goldoberfläche das durch das Prisma eingestrahlte Licht in einem unterschiedlichen Winkel (δ) beugen. Mit der Detektion dieses Winkels können schwache Wechselwirkungen auf der Goldoberfläche beobachtet werden. Im

Folgendes wird zunächst die Funktionalisierung der Goldoberflächen mit Glykopolymeren und dann die darauf aufbauenden Studien beschrieben.

3.2.1 Grundlagen zur Funktionalisierung der Goldoberflächen

Die Immobilisierung der Glykopolymere auf einer Goldoberfläche und die daran anschließenden Messungen der Oberflächenplasmonenresonanz wurden in einem Biacore X100 durchgeführt. Die Wahl der Funktionalisierungsbedingungen der Goldoberflächen mit Glykopolymeren ist durch die Chemikalienbeständigkeit des Messgeräts und der Verfügbarkeit von erwerblichen, unfunktionalisierten Chips des Herstellers mit einer freien Goldoberfläche („Sensor Chip Au“) limitiert. Zur Funktionalisierung dieses Chips wird das Prinzip der selbstassemblierenden Monoschicht (engl. „*self-assembling monolayer*“, SAM) herangezogen.

In der Literatur werden verschiedene Parameter beschrieben, die bei der Ausbildung von SAMs eine Rolle spielen. Die Gruppe um Dannenberger et al. zeigt anhand der SAM-Formation von Alkanthiolen in unterschiedlichen Lösungsmitteln, dass Faktoren wie Konzentration, Lösungsmittel oder Kontaktzeit einen Einfluss auf die Ausbildung von SAMs haben. Außerdem zeigt sich, dass die höchste Funktionalisierungsrate innerhalb der ersten 400 - 600 Sekunden beobachtet werden kann.^[161] Himmelhaus et al. zeigen jedoch anhand vergleichbarer Systeme, dass eine homogene Oberfläche bei einer möglichst langen Kontaktzeit erhalten wird.^[162] Daraus lässt sich ableiten, dass eine möglichst hohe Konzentration bei möglichst langer Kontaktzeit der Glykopolymere zur optimalen Funktionalisierung der Oberfläche erforderlich ist. Bei diesen untersuchten Systemen handelt es sich jedoch um monovalente Systeme, die schwer mit den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Glykopolymeren verglichen werden können. Zwar kann angenommen werden, dass bei der Ausbildung von SAMs auf einer Oberfläche unabhängig vom System ähnliche physikalische Effekte eine Rolle spielen. Dennoch ist eine direkte Übertragung nicht möglich, sodass zusätzlich auf empirische Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen zurückgegriffen wird.

In den Publikationen von Toyoshima et al und Terada et al., beide aus der Arbeitsgruppe um Yoshiko Miura, wurde die Ausbildung von SAMs von Glykopolymeren auf Gold beschrieben zur Untersuchung von Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkungen mittels SPR. Beide Gruppen immobilisieren Polyacrylamide mit einem aromatischen Linker und Mannose als präsentierte Kohlenhydrat-Einheit.^[107, 163] Terada et al. immobilisierten das Glykopolymer im wässrigen Medium bei einer Konzentration von 10 mg/mL und einer Kontaktzeit von 2 h auf der Goldoberfläche. Anschließend wird die Goldoberfläche mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln gespült.^[163] Da im Biacore X100 ausschließlich mit Wasser gearbeitet werden kann und die Glykopolymere bei einer Konzentration von 10 mg/mL nicht gut löslich sind, können die Immobilisierungsschritte von diesen Gruppen nicht übernommen werden. Stattdessen soll sich an der SAM-Generierung von Toyoshima et al. orientiert werden. Sie verwenden eine Polymerkonzentration von 1.0 mg/mL bei einer Kontaktzeit von 24 h.^[107] Das angewendete Verfahren wird im Folgenden beschrieben.

3.2.2 Funktionalisierung und Charakterisierung der Goldoberflächen

Aufgrund der Gegebenheiten des Geräts, zur Bestimmung der Immobilisierungsdichte und um einen zu hohen Materialverbrauch zu verhindern, erfolgt die Funktionalisierung in mehreren Schritten.

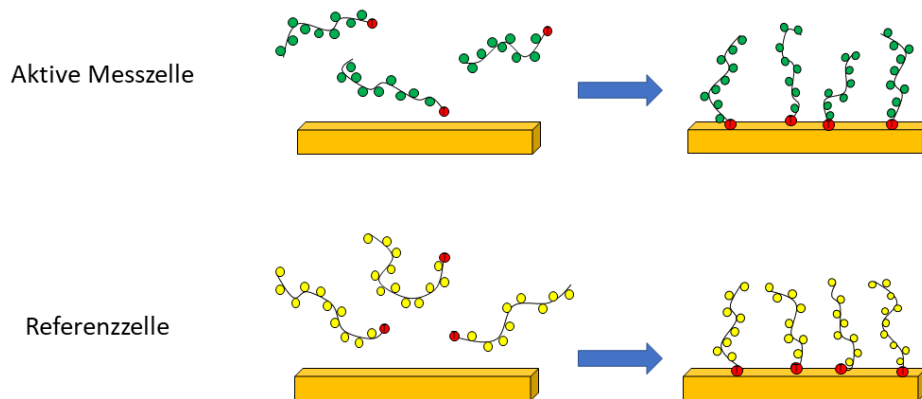


Abbildung 9: Funktionalisierungsprinzip der Goldoberflächen eines SPR-Chips.

Zur Funktionalisierung des Sensorchips wird angelehnt an Toyoshima et al. die Goldoberfläche mit MilliQ-Wasser als Laufmittel gespült und anschließend wird eine Glykopolymerlösung über die zu funktionalisierende Messzelle geleitet. Aufgrund der Geräteeinstellungen ist die Kontaktzeit auf 1000 s limitiert, sodass diese als höchstmögliche Kontaktzeit zur Immobilisierung der Oberflächen eingestellt wurde.^[107] Da die Funktionalisierung beider Flusszellen gerätebedingt nicht gleichzeitig erfolgen kann, wird die Immobilisierung in zwei Unterschritte unterteilt. Im ersten Schritt werden Mannose-haltige Glykopolymere über die aktive Messzelle (Flusszelle 2, FC2) geleitet und die Zunahme des Signals, der sogenannten *Response Units* (RU), detektiert. Anschließend wird die Zunahme des Signals nach Abbruch der Hinzugabe des Glykopolymers determiniert und somit auf das erhaltene Immobilisierungslevel zurückgeschlossen. Im zweiten Schritt wird diese Prozedur für die Referenzzelle mit den Galaktoseglykopolymeren wiederholt. Dieses Verfahren und dessen Optimierungsschritte werden genauer in den folgenden Kapiteln beschrieben.

3.2.2.1 Funktionalisierung der Goldoberflächen mit den Polymeren

pMan2CM₈₆ und pGal4CM₅₅

Die erste Funktionalisierung nach oben beschriebenem Prinzip erfolgt mit den Methacrylamidpolymeren pManM₉₇ auf der aktiven Zelle und pGal4CM₅₅ auf der Referenzzelle. Die Synthese der beider Polymere wird in den Kapiteln 5.2.3 und 5.2.4 und deren Polymerisation in Kapitel 5.3 beschrieben. Zur Funktionalisierung der Goldoberflächen mit den Polymeren wurden beide Polymere zu 1.0 mg/mL (vgl. Terada et al.)^[163] in MilliQ-Wasser gelöst und für 1000 Sekunden über die Flusszellen geleitet. Abbildung 10 zeigt das resultierende Sensorgramm.

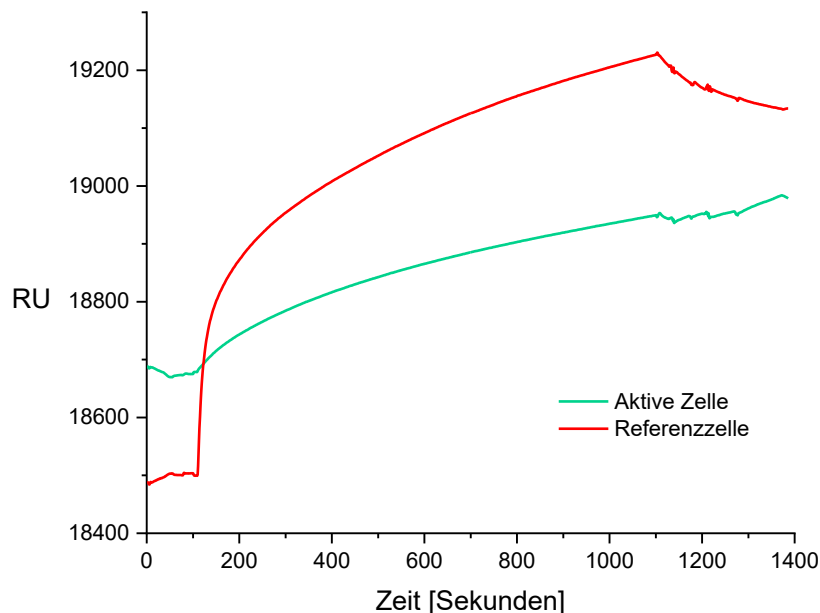


Abbildung 10: Sensorgramm der Immobilisierung von pMan2CM₈₆ und pGal4CM₅₅.

Das Sensorgramm der Immobilisierungen zeigt die Adsorption des jeweiligen Polymers an die Oberfläche im zeitlichen Verlauf. Die Immobilisierungen erfolgen nacheinander, beginnend mit der Immobilisierung des Polymers pMan2CM₈₆ auf der aktiven Messzelle. Wie in Abbildung 10 dargestellt erfolgt die Immobilisierung der Polymere nach etwa 100 s und dauert 1000 s an. In dieser Zeit kann eine Zunahme der Masse an der Oberfläche detektiert werden, indem die entsprechenden sogenannten *Response Units* detektiert und gegen die Zeit aufgetragen werden. Nach etwa 1000 s erfolgte kein wesentlicher Anstieg im Falle der aktiven Zelle und sogar eine Abnahme der

Referenzzelle, da die Oberfläche gesättigt zu sein scheint. Außerdem kann eine Sättigung im Verlaufe der Immobilisierung beobachtet werden, da die Geschwindigkeit der Zunahme der RU im Laufe der Zeit abnimmt. Nachdem die Oberfläche mit MilliQ-Wasser gespült wurde, wird im sogenannten „Manual Run“-Modus erneut ein Leerlauf durchgeführt und die in diesem Lauf gemessene RU bestimmt. Der auf diese Weise ermittelte Wert für die *Response Unit* wird zur Ermittlung des Immobilisierungslevels der Oberfläche verwendet, indem von diesem der RU-Wert der Oberflächen vor der Immobilisierung der jeweiligen Polymere (Siehe Abb. 10 im Zeitbereich 0 - 100s) subtrahiert werden. In Tabelle 5 werden die jeweiligen Werte der RU gegenübergestellt.

Tabelle 5: Immobilisierungslevel nach der Funktionalisierung mit pMan2CM₈₆ und pGal4CM₅₅.

	Aktive Zelle: pMan2CM ₈₆	Referenzzelle: pGal4CM ₅₅
ΔRU	733	901
Immobilisierungsdichte	0.73 ng/mm ²	0.90 ng/mm ²

Tabelle 5 zeigt die berechneten *Response Units* der jeweiligen Flusszelle. Die auf der aktiven Messzelle detektierten RU betragen 733 und die der Referenzzelle 901. Daraus folgt, dass nach Waschen mit Wasser mehr Polymer pGal4CM₅₅ auf der Oberfläche haften bleibt als bei pMan₉₇. Da es sich um zwei unterschiedliche Polymere handelt, ist ein voneinander abweichendes Immobilisierungslevel erwartbar. pGal4CM₅₅ ist mit ca. 55 Wiederholungseinheiten kürzer und mit 18,750 g/mol leichter als pMan2CM₈₆, welches im Schnitt über 86 Wiederholungseinheiten verfügt und eine Masse von 29,200 g/mol aufweist.

Nach erfolgter Immobilisierung werden verschiedene Konzentrationen ConA zeitgleich über beide Flusszellen geleitet. Es werden zunächst Konzentrationen von 1.0 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.1 g/mL, 0.01 mg/mL und 0 mg/mL gemessen und miteinander verglichen.

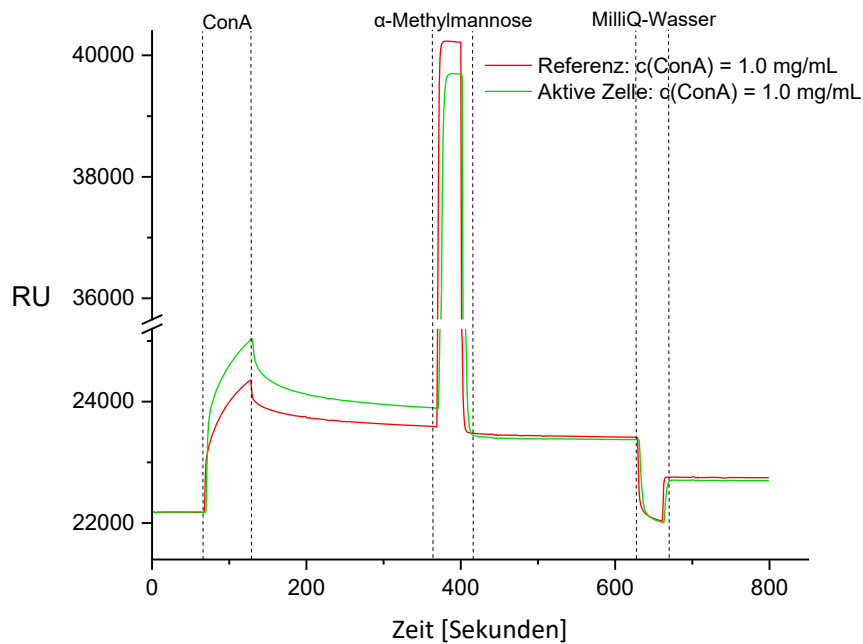


Abbildung 11: Sensorgramm der Flusszellen mit $c(\text{ConA}) = 1.0 \text{ mg/mL}$.

Abbildung 11 stellt das resultierende Sensorgramm eines Zyklus zu der jeweiligen Messzelle (aktive Flusszelle in grün, Referenzzelle in roter Farbe) dar, bei dem 1.0 mg/mL ConA simultan über beide Flusszellen gleitet wird. Zusätzlich sind in dem Sensorgramm die Bereiche markiert, innerhalb derer ConA bzw. Regenerierungslösungen (α -Methylmannose in *Lectin Bindung Buffer* (LBB) und MilliQ-Wasser) über die Oberflächen geleitet wurde. Dabei gehen beide Flusszellen von einer ähnlichen Ausgangsintensität aus (bis 71 s). Nach 71 Sekunden wird das ConA für ca. 50 s über die Flusszellen geleitet, sodass das Signal der RU zunimmt. Der zu beobachtende Anstieg der Kurven ist zu Beginn des Kontakts zwischen ConA und Goldoberfläche stärker als im späteren Kurvenverlauf. Nach Beendigung der Zugabe von ConA bei 120 Sekunden fällt das Signal langsam ab. Dies ist so zu interpretieren, dass sich während der Zugabe des ConA an der Oberfläche anreichert. Da zu Beginn viel freier Platz verfügbar ist bindet ConA schneller an die noch freie Oberfläche. Dies ändert sich bei längerer Kontaktzeit, wodurch der langsamere Anstieg der RU-Kurve resultiert. Der resultierende Anstieg hängt von der Affinität des ConA zur Oberfläche ab. Wäre die Kontaktzeit länger, so ließe sich ein Gleichgewichtszustand in Form eines Plateaus beobachten. Dieser Gleichgewichtszustand wird hier jedoch nicht erreicht, da ein Erreichen des Gleichgewichtszustands an dieser Stelle nicht erforderlich ist. Nach erfolgter Hinzugabe wird die Oberfläche mit LBB gespült und es kann eine Abnahme der

detektierten RU beobachtet werden. Die Geschwindigkeit der Abnahme ist direkt nach Beendigung der Hinzugabe des ConA am höchsten und nähert sich im Zeitverlauf einem Grenzwert an, der ebenfalls von der Affinität des ConA zur Oberfläche abhängt.

Nach beendeter Zugabe von ConA wird die Oberfläche nach 370 s für 50 Sekunden mit einer 1 M α -Methylmannose Lösung in LBB gewaschen. Dies führt zu dem charakteristischen Anstieg der detektierten RU im Bereich um 400 s, da der Brechungsindex durch die hohe Konzentration der α -Methylmannose stark beeinflusst wird. Bei einer vollständigen Regenerierung wäre ein Rückgang der RU-Werte auf die Basislinie wie im Zeitpunkt $t = 0$ zu beobachten. Stattdessen pendelt sich die Basislinie auf einem höheren Niveau ein.

Aufgrund der Probleme bei der Regenerierung der Flusszellen wird in einem zweiten Regenerierungsschritt MilliQ-Wasser verwendet, um die vom ConA für die Bindung zu Mannose benötigten Ca^{2+} - und Mn^{2+} -Ionen zu entfernen. Hierdurch sinkt die *Baseline* deutlicher ab als bei Regenerierungszyklen, die ausschließlich mit α -Methylmannose-Lösung inhibieren. Mit beiden Regenerierungsprozessen ist es jedoch nicht möglich eine vollständige Regenerierung der *Baseline* zu erreichen. Positiv zu bewerten ist die Beobachtung, dass ConA stärker an die Oberfläche der aktiven Zelle bindet als an die Referenzzelle. Besonders deutlich wird diese Beobachtung, indem die Referenzzelle von der aktiven abgezogen und die resultierenden RU miteinander in Relation gesetzt werden.

Eine Subtraktion der detektierten *Response Units* der Referenzzelle von der aktiven Messzelle zeigt, dass ConA mit bis zu 600 RU deutlich stärker an die aktive Zelle bindet als an die Referenzzelle – obwohl die aktive Zelle bei der Immobilisierung ein geringeres Immobilisierungslevel erreichte. Aus dieser Beobachtung kann der Schluss gezogen werden, dass das anvisierte Assay grundsätzlich funktioniert. Die aktive Messzelle verzeichnet demnach eine größere Affinität von ConA an die Oberfläche, während die von ConA gegen die Referenzzelle geringer ist. Im Verlauf weiterer Messungen kann jedoch beobachtet werden, dass die Regenerierungslösungen nach Direktbindungsexperimenten mit ConA

von der Referenzzelle deutlich mehr Material entfernen als von der aktiven Zelle. In Verbindung mit der Erkenntnis aus Abbildung 11, dass die Flusszellen nicht vollständig auf das Grundniveau der Baselines nach der Regenerierung zurückgehen, lassen sich unterschiedliche mögliche Fehlerquellen identifizieren. Entweder sind die Regenerierungsbedingungen nicht ausreichend stark genug, um eine vollständige Regeneration der *Baseline* herbeizuführen, oder die detektierte Bindung des ConA an die funktionalisierten Goldoberflächen ist nicht ausschließlich auf Protein-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen zurückzuführen. Diese Hypothese kann durch eine Betrachtung der gesamten Konzentrationsreihe bestätigt werden.

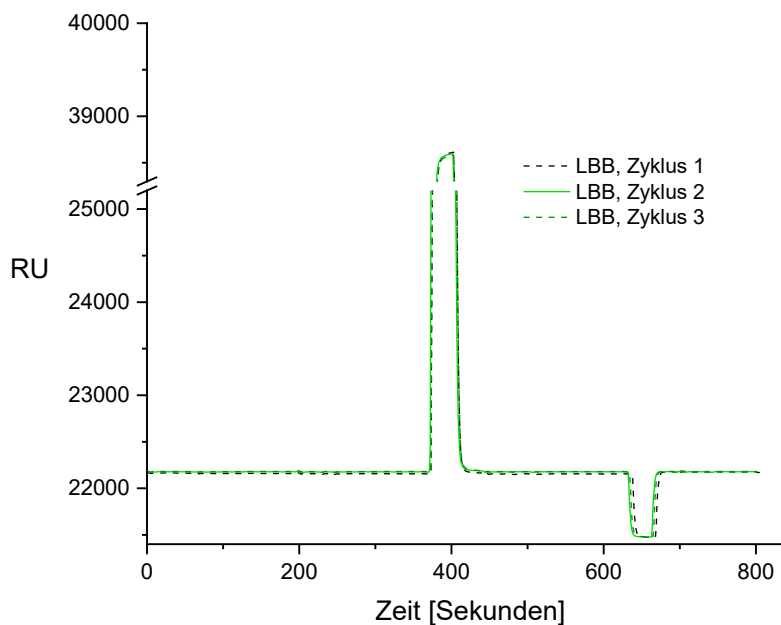


Abbildung 12: Hinzugabe von LBB auf die aktive Messzelle.

In Abbildung 12 wird das Sensorgramm der aktiven Messzelle dargestellt, die ausschließlich den Regenerierungsbedingungen ausgesetzt ist. Diese beinhalten das Spülen der Zelle mit α -Methylmannose im ersten und MilliQ-Wasser im zweiten Schritt. Nach drei dieser Zyklen erfolgt keine messbare Veränderung der RU auf dieser Zelle dargestellt für drei verschiedene, aufeinanderfolgende Messzyklen. Auch auf der Referenzzelle konnte diese Beobachtung getätigt werden. Somit ist auszuschließen, dass die Regenerierungsbedingungen die detektierten *Response Units* beeinflussen. Die Ursache muss folglich in dem Kontakt mit ConA liegen. Abbildung 13

unterstützt diese Hypothese. Sie zeigt verschiedene Konzentrationen von ConA in Kontakt mit der aktiven Messzelle. Vor allem die höchste Konzentration des ConA bedingt den höchsten Anstieg in der RU im nachfolgenden Zyklus.

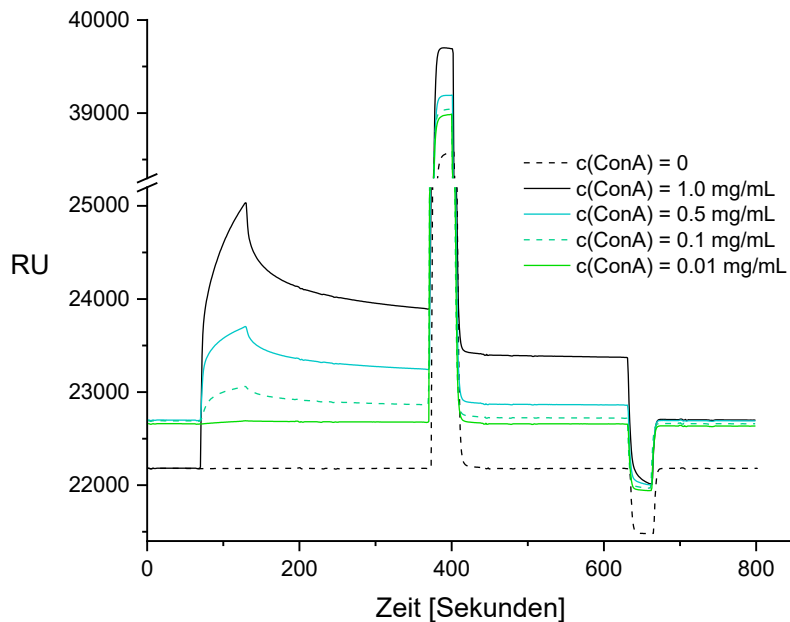


Abbildung 13: Verschiedene Konzentrationen von ConA auf der aktiven Messzelle.

In Abbildung 13 werden die verschiedenen Zyklen unterschiedlicher ConA-Konzentration miteinander verglichen. Die Anordnung der Konzentrationen ist dabei chronologisch: im ersten Zyklus wird ausschließlich LBB ohne ConA über die Flusszelle geleitet und im letzten Zyklus ConA mit einer Konzentration von 0.01 mg/mL. Dabei kann schon nach dem 2. Zyklus ein Anstieg der *Baseline* nach Hinzugabe der geringen Konzentrationen ConA beobachtet werden. Auch in den nachfolgenden Zyklen sinkt die *Baseline*, die sich nach den Regenerierungen einstellt, nicht auf das Ursprungsniveau des vorherigen Messzyklus hinab. Der Versuchsaufbau eignet sich daher in dieser Form nicht für die anvisierten Studien. Wichtig für einen reproduzierbaren Versuchsaufbau ist, dass gleiche Konzentrationen eines Lektins nach mehreren Messzyklen und unterschiedlichen Bedingungen die gleiche Differenz zur Basislinie aufweisen. Mit Hilfe der gewählten experimentellen Anordnung lässt sich diese Reproduzierbarkeit nicht einstellen, da unterschiedliche Konzentrationen an ConA verschiedene Effekte auf die Messzelle ausüben, die nachfolgende Messungen beeinträchtigen

können. Es ist unklar, ob es sich dabei um eine Anreicherung von ConA auf der Oberfläche handelt. In der Literatur konnte gezeigt werden, dass Proteine ebenfalls SAMs an Goldoberflächen ausbilden können.^[164-167] Aus diesem Grund kann hier ebenfalls davon ausgegangen werden, dass der beobachtete Anstieg der RU auf Protein-Gold-Wechselwirkungen zurückzuführen ist. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich im Laufe mehrerer Messzyklen die Oberfläche verändert, sodass Oberflächen bei Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten unterschiedliche Zusammensetzung aufweisen und somit eine Vergleichbarkeit nicht sichergestellt werden kann. In den nachfolgenden Kapiteln soll untersucht werden, ob sich die mögliche Adsorption von Proteinen durch die Wahl anderer Glykopolymere – in diesem Fall der Wechsel von Polymethacrylamiden zu Polyacrylamiden – vermieden werden kann.

3.2.2.2 Funktionalisierung der Goldoberflächen mit den Polymeren

pMan2CA₄₀ und pGal2CA₂₂ mit anschließender Co-SAM-Ausbildung

Aufgrund instabiler Bedingungen nach Anwendung der ersten Immobilisierungsmethode in Kapitel 3.2.2.1 werden weitere Methoden zur Funktionalisierung herangezogen. Bei den zuvor verwendeten Polymeren handelt es sich um Methacrylamide. Neben der Problematik der stabilen *Baseline* deuten die unterschiedlichen Verläufe der Sensorgramme von aktiver Messzelle und Referenzzelle auch auf unspezifische Wechselwirkungen der Oberflächen mit dem Lektin ConA hin. Zhao et al. konnten zeigen, dass unspezifische Wechselwirkungen stärker bei Methacrylamiden als bei Acrylamiden auftreten.^[168] Aus diesem Grund werden die Methacrylamide durch Glykopolymere auf Acrylamidbasis ersetzt. Außerdem ist die Instabilität der *Baseline* in aufeinanderfolgenden Messungen wahrscheinlich auf eine inhomogene Oberfläche zurückzuführen. Die Hinzugabe von ConA bewirkt einen Anstieg der detektierten RU, welcher nicht auf den Ausgangswert absinkt. Eine Erklärung für diese Beobachtung ist, dass ConA an „defekten“ Oberflächenstellen in Kontakt mit der Goldoberfläche gelangt und sich dort nicht mehr mit den herkömmlichen Regenerierungslösungen entfernen lässt, da die Wechselwirkungen von Proteinen und Goldoberflächen auf physikalischen Bindungsmechanismen beruhen, die nicht mit Hilfe von α -Methylmannose rückgängig gemacht werden können. Di Pietro et

al. nutzen beispielsweise das Prinzip der direkten Adsorption von Neurotrophin auf Goldnanopartikel, um stabile Nanopartikel mit mehrfacher Präsentation des Proteins zu generieren.^[167] Die Gruppe um Li et al. detektiert in einem SPR-Versuchsaufbau den Zuwachs, den die Hinzugabe von ConA zu einer Goldoberfläche verursacht. Dabei kann ein Anstieg der *Baseline* beobachtet werden, der nur auf die Hinzugabe des ConA zurückzuführen ist. Außerdem bleibt die *Baseline* auf hohem Niveau nach Beendigung der Hinzugabe von ConA.^[169] Diese Beobachtung verdeutlicht, dass ConA mit ungesättigten Goldoberflächen zu den geschilderten Zuwächsen der RU führen kann.

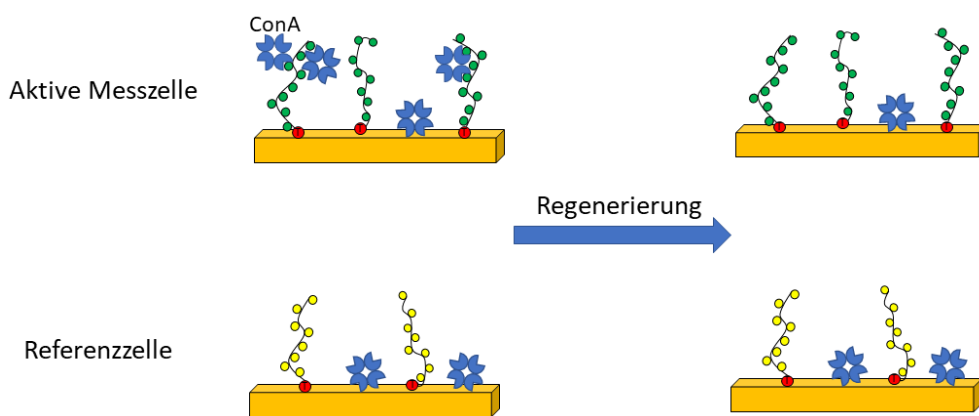


Abbildung 14: Vermutete Oberflächenadsorption von ConA trotz Regenerierungsschritt.

Das in Abbildung 14 dargestellte Immobilisierungsschema verdeutlicht, dass durch Fehlstellen in der Glykopolymerschicht ConA an die Goldoberfläche durchdringen kann und auch nach Anwendung erprobter Regenerierungsbedingungen an der Oberfläche gebunden bleibt. Daraus können zweierlei Verzerrungen der Messungen resultieren. Zum einen wird in der Kontaktphase zwischen ConA und der Oberfläche nicht nur die Bindung zwischen ConA und Glykopolymer gemessen, sondern auch die von ConA und der Goldoberfläche. Zum anderen kann durch Anreichern von Protein an der Oberfläche die Beschaffenheit der Oberfläche im Zeitverlauf von dem Ursprungszustand deutlich abweichen, wodurch die Messungen nicht mehr miteinander vergleichbar sind.

Aus diesem Grund wird bei der Funktionalisierung darauf geachtet, dass eine möglichst hohe und stabile Funktionalisierung der Oberfläche erfolgt. Auf der aktiven Messzelle wird pMan2CA₄₀ und auf

der Referenzzelle pGal2CA₂₂ aufgetragen. Zusätzlich zum ersten Immobilisierungsschritt wird nun ein zweiter, identischer Immobilisierungsvorgang durchgeführt. Dies wird in Abbildung 15 dargestellt.

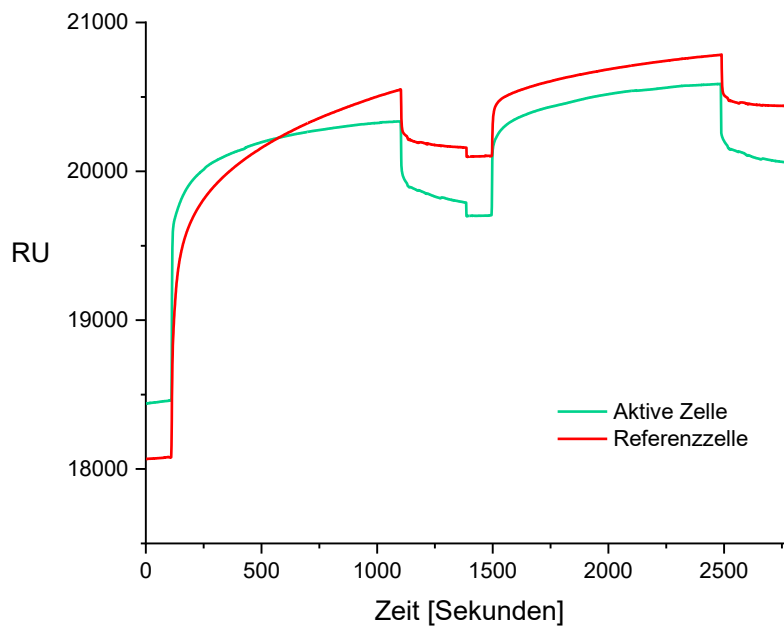


Abbildung 15: Zwei aufeinanderfolgende Immobilisierungen der Aktiven Zelle und der Referenzzelle mit pMan2CA₄₀ und pGal2CA₂₂.

Abbildung 15 stellt die Sensorgramme der zwei aufeinanderfolgenden Funktionalisierungen durchgeführt auf beiden Flusszellen dar. Die nacheinander erfolgenden Immobilisierungen zeigen jeweils eine hohe Zunahme der finalen RU nach der ersten und eine geringere Zunahme der RU nach der zweiten Funktionalisierung. Die Zunahme der aktiven Messzelle beispielsweise beträgt nach der ersten Funktionalisierung ca. 1340 RU, nach der zweiten beträgt die Zunahme knapp 350 RU. Da eine deutlich stärkere Zunahme der *Baseline* durch Kontakt mit ConA in Kapitel 3.2.2.1 beobachtet werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass die Oberfläche im Verlauf der Immobilisierungsphase nicht vollständig mit Glykopolymeren besetzt wurde.

Aus diesem Grund wird die Immobilisierung des Sensorchips um einen zusätzlichen Schritt erweitert. Nach der Funktionalisierung der individuellen Flusszellen wird der Goldchip aus dem Gerät ausgebaut und auf die Goldoberfläche wird ein Tropfen mit pGal2CA₂₂ gegeben. Die Konzentration dieses Glykopolymeres beträgt ebenfalls 1.0 mg/mL und der Tropfen wird für 24 h so auf die Goldoberfläche

aufgetragen, dass beide Flusskanäle vollständig mit der Glykopolymerlösung benetzt werden. Dieses Prinzip wird in Abbildung 16 dargestellt.

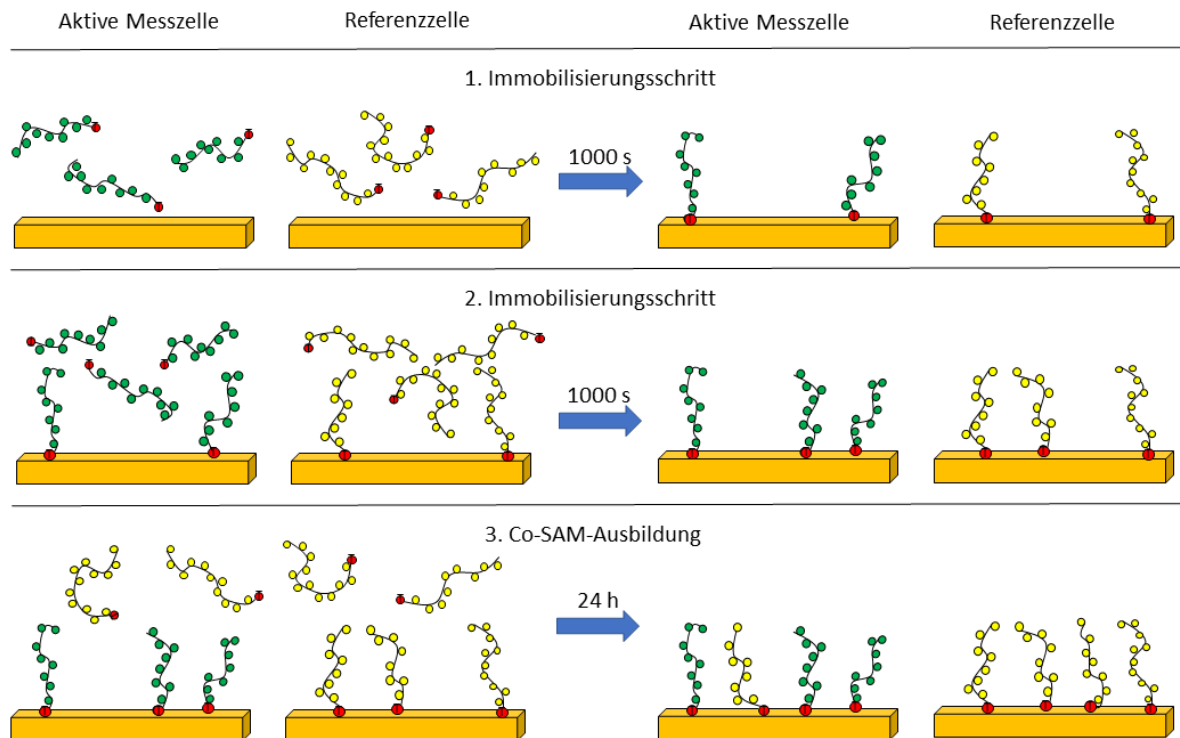


Abbildung 16: Mehrstufige Funktionalisierung beider Flusszellen.

Abbildung 156 stellt die verschiedenen Funktionalisierungsschritte dar. Die ersten beiden Schritte dienen dazu, entsprechende Glykopolymere auf der jeweiligen Messzelle zu immobilisieren. Über die aktive Messzelle wird das mannose-präsentierende Glykopolymer pMan2CA₄₀ geleitet und über die Referenz die galaktosehaltige pGal2CA₂₂. Die dadurch entstehenden Glykopolymer-SAMs weisen höchstwahrscheinlich Lücken auf, die durch die Funktionalisierung außerhalb des Chips und über Nacht mittels pGal2CA₂₂ auf beiden Oberflächen geschlossen werden sollten. Auf diese Weise kann nur eine Art Polymer als Co-SAM eingeführt werden, da die Flusskanäle auf der Goldoberfläche sehr nahe beieinander liegen. Außerdem ist es äußerst schwierig die Flusszellen optisch zu erfassen. Es wurde sich für pGal2CA₂₂ als Glykopolymer zur Co-SAM-Ausbildung auf beiden Flusszellen entschieden, da dieses nicht mit dem untersuchten Lektin ConA wechselwirkt.

Anschließend wird der Goldchip mehrfach mit MilliQ-Wasser gespült und erneut in das Gerät eingelegt, um die RU zu messen. Die detektierten RU der Referenzzelle sind dadurch um 200 RU gestiegen, während die RU auf der aktiven Messzelle um 890 RU-Einheiten erhöht wurden. Anschließend wird der Puffer gewechselt und es werden Direktbindungsmessungen in LBB mit ConA ($c = 1.0 \text{ mg/mL}$) zur Überprüfung der unspezifischen Wechselwirkungen durchgeführt.

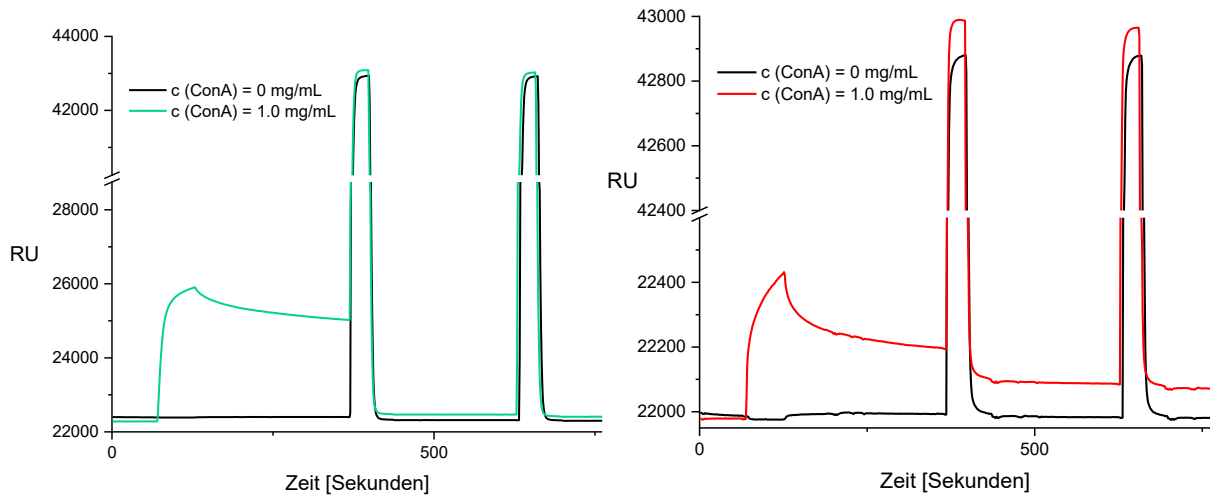


Abbildung 17: Sensorgramm bei Kontakt zwischen ConA und der aktiven Messzelle (links) und der Referenzzelle (rechts) nach Co-SAM-Ausbildung.

In Abbildung 17 werden die Messzellen hinsichtlich ihrer *Baseline*-Stabilität gegen ConA untersucht und den vorherigen Messungen aus Kapitel 3.2.2.1 gegenübergestellt. Innerhalb der ersten 70 s erfolgt die Messung der *Baseline*, welche als Referenzpunkt fungiert. Anschließend erfolgt für weitere 50 s die Kontaktzeit mit ConA simultan auf beiden Flusszellen. Bei der aktiven Messzelle ist ein deutlich höherer Anstieg der Response Units (ca. 3500 RU) zu beobachten im Vergleich zu der Referenzzelle (ca. 450 RU). Nach erfolgter Hinzugabe des ConA wird ein Absinken der RU auf beiden Flusszellen beobachtet, indem für 200 s ausschließlich Puffer über die Messzelle geleitet wird. Dies ist auf die Dissoziation des an der Oberfläche gebundenen ConA zurückzuführen. Absolut ist der Rückgang in dieser Dissoziationsphase auf der aktiven Messzelle mit ca. 1000 RU höher als der auf der Referenzzelle mit 200 RU. In Relation betrachtet sinkt das Signal der Referenzzelle jedoch um 50 %, während das der aktiven Messzelle um ca. 30 % in der gleichen Zeit sinkt. Nach zweifacher Regenerierung der Flusszellen mit 1 molarer α -Methylmannose sinkt die beobachtete Response der aktiven Messzelle auf das

Ursprungsniveau der *Baseline* zu Beginn des Messzyklus ab. Hier können nach Beendigung des Zyklus eine Zunahme von ca. 10 RU beobachtet werden. Auf der Referenzzelle gelangt die Response nicht vollständig wieder auf ihr Ursprungsniveau zurück und liegt etwa 100 RU über dem ursprünglichen Niveau zu Beginn des Messzyklus.

Das bedeutet, die Wechselwirkungen des ConA sind auf der aktiven Messzelle sowohl in der Assoziation als auch in der Dissoziation deutlich stärker als auf der Referenzzelle. Auf der aktiven Messzelle mit dem längeren Glykopolymer mit Mannoseeinheiten in der Seitenkette und dem kürzeren Galaktosepolymer als Co-SAM wird darüber hinaus keine übermäßig starke Veränderung der *Baseline* nach einem Messzyklus beobachtet. Auf der Referenzzelle mit ausschließlich dem kürzeren Galaktosepolymer kann im Vergleich zu einer Funktionalisierung ohne Co-SAM-Ausbildung über Nacht ebenfalls eine Stabilisierung beobachtet werden. Dennoch ist die absolute Zunahme der RU nach der Lektinhinzugabe auf der Referenzmesszelle stärker als auf der aktiven Messzelle. Daraus lässt sich ableiten, dass der zusätzliche Funktionalisierungsschritt über Nacht zu einer Verbesserung der Stabilität beider Oberflächen gegen Adsorption von Lektinen führt. Diese Stabilität erscheint jedoch auf der aktiven Messzelle im Vergleich zur Referenzzelle stärker ausgeprägt zu sein. Eine Ursache könnte in der Verwendung unterschiedlich-langer Glykopolymere liegen. Längere Glykopolymere könnten unfunktionalisierte Bereiche auf den Goldoberflächen besser vor ConA abschirmen, als dies kürzere Polymere können. Dieses Phänomen ist literaturbekannt und wurde von mehreren Gruppen an unterschiedlichen Oberflächen und Polymeren beschrieben. Die Gruppe um Wang et al. zeigte beispielsweise eine Abschirmung von Eisenoxidnanopartikeln gegen Humanes Serum Albumin mit Hilfe von Polymeren auf Phosphorylcholin- und Polyethylenglykol-Basis, die auf die Partikeloberfläche gegrattet wurden.^[170]

Die reduzierte Zunahme der RU nach Hinzugabe von ConA und Regenerierung mit α -Methylmannose zeigt, dass mindestens die Funktionalisierung der Referenzzelle nicht vollständig erfolgte. Zusammengefasst bedeuten diese Beobachtungen dennoch eine Verbesserung des Versuchsaufbaus mit Co-SAM im Vergleich zum Versuchsaufbau ohne Co-SAM. Die Co-SAM-Ausbildung ermöglicht

bereits auf der Messzelle mit einem größeren Co-SAM-Polymer einen stabilen Messzyklus. Im folgenden Kapitel soll abschließend überprüft werden, ob eine weitere Optimierung der Co-SAM-Ausbildungsbedingungen möglich ist. Hierzu soll eine Optimierung der Immobilisierungsbedingungen der Funktionalisierung einer Flusszelle mit dem kürzeren Galaktosepolymer erfolgen.

3.2.2.3 Funktionalisierung der Goldoberflächen mit den Polymeren pMan₂₆ und pGal₂₂ mit anschließender Co-SAM-Ausbildung

Zur weiteren Optimierung der Immobilisierungsbedingungen erfolgt die Funktionalisierung der Goldoberfläche mit zwei in etwa gleichlangen Glykopolymeren. Auf der aktiven Messzelle wird das Glykopolymer auf Mannosebasis pMan₂CA₂₆ mit 26 Wiederholungseinheiten immobilisiert und auf der Referenzzelle ein Galaktosepolymer, pGal₂CA₂₂, mit 22 Wiederholungseinheiten. Die Kontaktzeit beträgt erneut 2 x 1000 s (vgl. Abbildung 18).

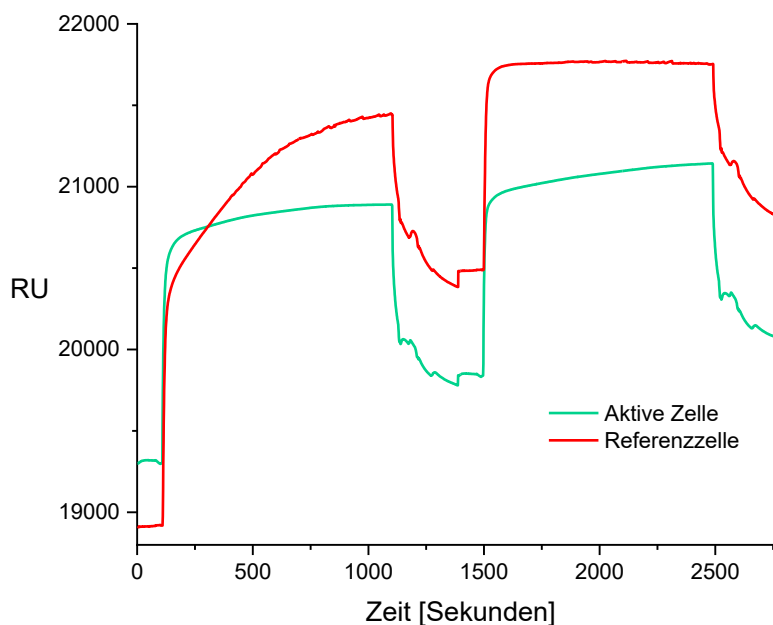


Abbildung 18: Immobilisierung beider Flusszellen mit pMan₂CA₂₆ und pGal₂CA₂₂.

Die in Abbildung 18 dargestellte Immobilisierung beider Polymere erfolgt nacheinander und verläuft ähnlich den Immobilisierungen in Kapitel 3.2.2.2. Auch in dieser Funktionalisierung nimmt die Flusszelle, auf die pGal₂CA₂₄ aufgetragen wird, stärker zu als die Oberfläche in Kontakt mit pMan₂CA₄₀. Anschließend wird, wie bereits zuvor, der Sensorchip aus dem Gerät montiert, mit MilliQ-Wasser

gewaschen und mit 1.0 mg/mL pGal2CA₂₂ für 24 h benetzt. Der Kontakt für 24 h wird insgesamt zwei Mal vorgenommen, da so eine bessere Funktionalisierung erwartet wird. Die verschiedenen Schritte werden in Abbildung 19 zusammengefasst.

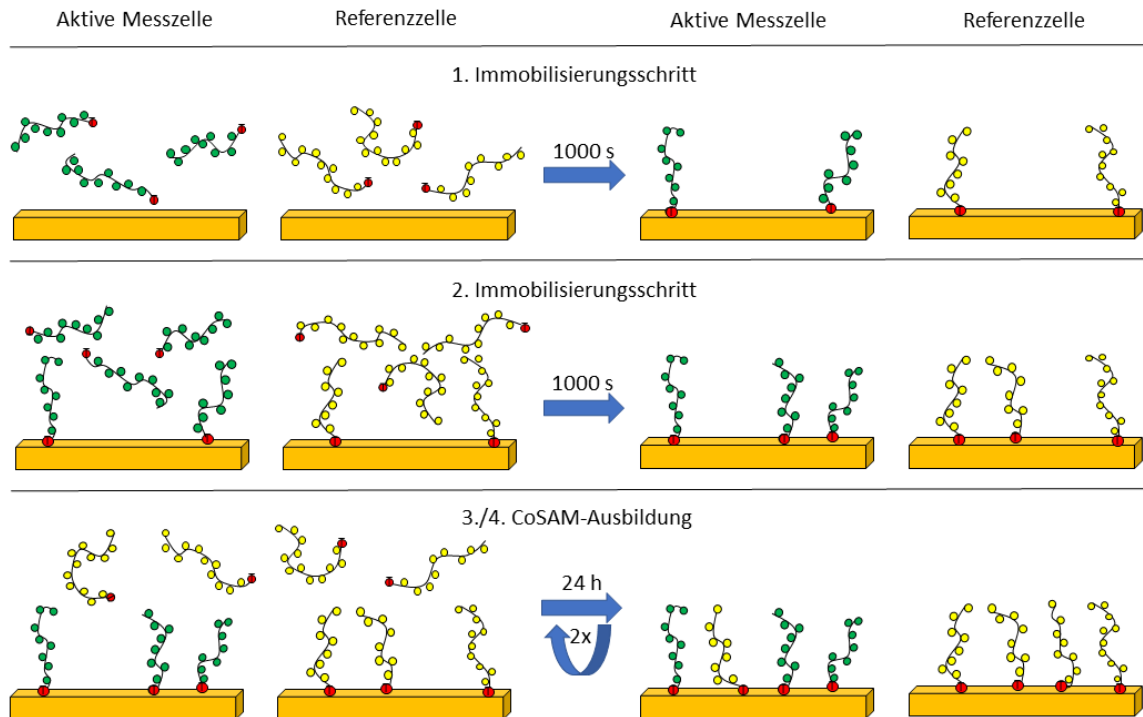


Abbildung 19: Mehrstufige Funktionalisierung beider Flusszellen mit doppelter Wiederholung des Funktionalisierungsschritts bei 24 h Kontaktzeit zu pGal2CA₂₂.

Da in Kapitel 3.2.2.2 eine Tendenz des Anstiegs der *Baseline* im langfristigen Verlauf beobachtet werden konnte und außerdem gezeigt wurde, dass die aktive Messzelle stabil gegen die bisherigen Bedingungen war, wird zur besseren Beobachtung der Stabilität der Messzellen ein längerer Messzyklus gewählt und die Häufigkeit der ConA-Kontakte vor der Regenerierung erhöht. Dieser Messzyklus wird im Gerät als „Single Cycle Kinetics“ aufgeführt und beinhaltet die Hinzugabe von fünf verschiedenen Konzentrationen ConA in ansteigender Folge. Die geringste Konzentration beträgt in diesem Fall 0.0123 mg/mL und die höchste 1.0 mg/mL. Abbildung 20 und Abbildung 21 zeigen diese Stabilitätstestungen auf der aktiven Messzelle (Abbildung 20) und der Referenzzelle (Abbildung 21).

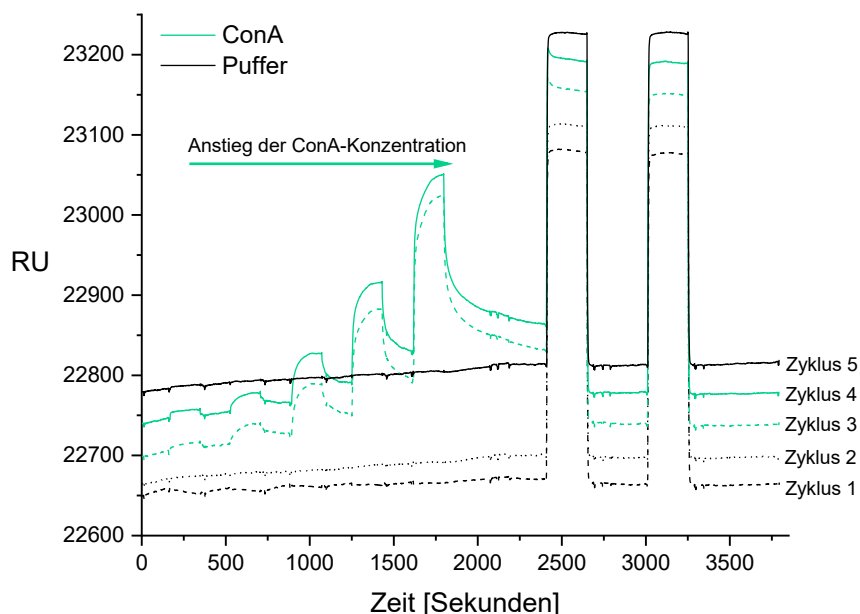


Abbildung 20: Single-Cycle-Messungen zur Stabilitätstestung auf der aktiven Messzelle gegen ConA [1.0 mg/mL in der höchsten Konzentration].

Die Messung der *Single Cycle Kinetics* mit verschiedenen Konzentrationen ConA gegen die aktive Messzelle zeigt Zyklen mit ConA (grün) und Zyklen nur mit LBB (schwarz). Die Unterschiedlichen Linienkonturen sind zur Verdeutlichung gewählt worden, dass es sich um verschiedene Messzyklen handelt. Zunächst werden zwei Messungen ohne ConA durchgeführt, anschließend werden zwei gleiche Messungen mit den unterschiedlichen Konzentrationen ConA aufgenommen und abschließend erfolgt eine finale Messung erneut ohne ConA (ausschließlicher Kontakt mit Puffer).

Zunächst fällt die stetige Zunahme der *Baseline* im Zeitverlauf auf, welche bereits in vorherigen Messungen (siehe bspw. Kapitel 3.2.2.2) beobachtet wurde. Da es sich hier um deutlich längere Messzyklen handelt, ist ein Anstieg der *Baseline* im Zeitverlauf nun deutlicher sichtbar. Grundsätzlich kann jedoch ausgeschlossen werden, dass es sich um eine Kontamination der Oberfläche mit Lektinen handelt, da die Zunahme der gemessenen RU sowohl in Zyklen mit Kontakt von ConA zur Goldoberfläche aber auch in Zyklen ohne ConA beobachtet werden kann. Außerdem ist die Zunahme der beobachteten RU konstant und im zeitverlauf gleichmäßig, was auf eine natürliche Veränderung der Oberfläche im Zeitverlauf hindeutet. Der Messzyklus an sich verläuft wie erwartet. Die Injektionen mit geringer Konzentration ConA resultieren in einem deutlich geringeren Anstieg der detektierten RU

im Vergleich zu den hohen Konzentrationen. Schließlich gelangt die *Baseline* am Ende eines einzelnen Zyklus wieder auf ein geringeres Ausgangsniveau zurück, welches dem natürlichen Anstieg der *Baseline* entspricht.

Diese Beobachtungen sind grundsätzlich als erfolgreich zu bewerten, da die Oberfläche der aktiven Messzelle auch in diesem Versuchsaufbau stabil gegen Einflüsse von ConA ist. Somit kann ausgeschlossen werden, dass die gegen ConA instabile Referenzzelle in Kapitel 3.2.2.2 aufgrund der Polymerlänge instabil war. Eine Betrachtung der Referenzzelle in diesem Assay in Abbildung 21 zeigt außerdem, dass unter den gegebenen Immobilisierungsbedingungen ebenfalls eine gegen ConA stabile Referenzzelle erzeugt werden kann.

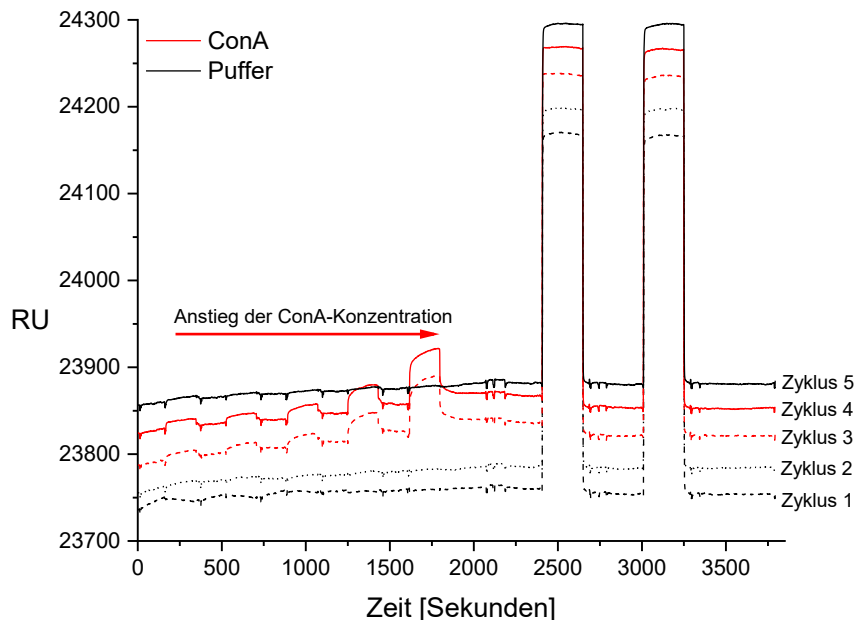


Abbildung 21: Single-Cycle-Messungen zur Stabilitätstestung auf der Referenzzelle gegen ConA [1.0 mg/mL in der höchsten Konzentration].

Die *Single Cycle Kinetics*-Messungen auf der Referenzzelle verlaufen ähnlich denen der aktiven Messzelle. Auch hier kann ein Anstieg des Basisniveaus der Response Units im längeren Zeitverlauf beobachtet werden, welches unabhängig von der Hinzugabe von ConA ist. Außerdem liegen die Anstiege der detektieren RU bei Hinzugabe von ConA deutlich unter denen, die auf der aktiven Messzelle simultan beobachtet werden können. Dies bedeutet, dass ConA auch in diesem Versuchsaufbau eine höhere Affinität zur aktiven Messzelle aufweist als zur Referenzzelle. Darüber

hinaus zeigen die in Abbildung 21 dargestellten Zyklen, dass unter den gewählten Immobilisierungsbedingungen die Referenzzelle mit pGal2CA₂₂ stabil gegen das als Quelle des starken Anstiegs der *Baseline* vermutete unspezifische Adsorbieren von ConA ist. Das Immobilisierungsprotokoll generiert folglich glykosylierte Oberflächen, die für weitergehende Messungen verwendet werden können. Bei der höchsten ConA-Konzentration (1.0 mg/mL) auf der aktiven Messzelle beträgt der Zuwachs ca. 600 RU, während der Zuwachs auf der Referenzzelle ca. 150 RU beträgt. Dies entspricht etwa 25 %.

Vergleichbare Effekte lassen sich bei Li et al. beobachten, die einen ähnlichen Versuchsaufbau mit mannosylierten und galaktosylierten Glykopolymeren gewählt haben, die jedoch über kein System mit Referenzzelle verfügen.^[169] Die dort abgebildeten Sensorgramme zeigen die absoluten Abweichungen der detektierten RU (ausgedrückt in Änderung des gemessenen Kontaktwinkels) von immobilisierten Mannose- und Galaktosepolymeren nach Hinzugabe verschiedener Lektine, u.a. ConA (1.0 mg/mL). Wird die bei der mannosylierten Oberfläche durch ConA ausgelöste Kontaktwinkeländerung auf 100 % gesetzt, beträgt die Änderung auf der Oberfläche mit Galaktosepolymer ca. 40 %. Die im Rahmen dieser Arbeit detektierten Unterschiede der RU sind im Vergleich dazu geringer. Nichtsdestotrotz wird das so erhaltenen Setup für die Durchführung konzentrationsabhängiger Bindungsstudien herangezogen. Abbildung 22 zeigt das resultierende Sensorgramm, welches bei der Subtraktion der Referenzzelle von der aktiven Messzelle erhalten wird.

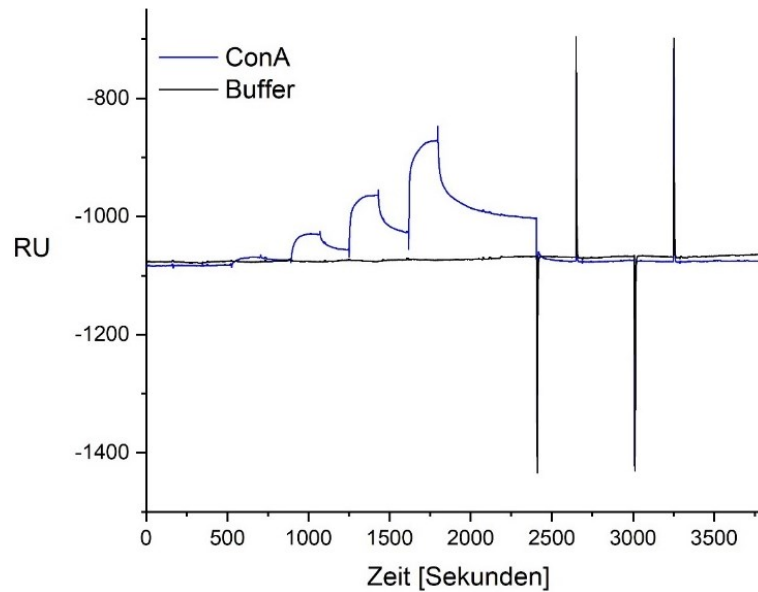


Abbildung 22: Single-Cycle-Messungen gegen ConA (1.0 mg/mL in der höchsten Konzentration).

Auch wenn es sich noch nicht um das idealisierte System mit keiner Bindung auf der Referenzzelle handelt, sind die Unterschiede zwischen Mess- und Referenzzelle groß genug, um einen relativen Anstieg der Bindung mit steigender Proteinkonzentration auszuwerten. Der Einfachheit und Vergleichbarkeit halber werden die *Baselines*, genauer der RU-Wert bei $t = 0$, aller nachfolgender Sensorgramme auf „0“ gesetzt und die relativen Änderungen dazu angegeben. Im Folgenden wird der Informationsgehalt der so erhaltenen Sensorgramme diskutiert.

In Abbildung 22 werden zwei Messzyklen dargestellt, die sich aus der Subtraktion der RU der Referenzzelle von der aktiven Messzelle ergeben. Der Zyklus mit der schwarzen Linie beinhaltet die Zugabe von ausschließlich Puffer und der Zyklus mit der blauen Linie zeigt einen typischen Verlauf einer *Single Cycle Kinetic* mit den verschiedenen Konzentrationen ConA. Der Zyklus ohne ConA zeigt im Verlauf keinen Anstieg und die zwei Regenerierungen nach 2400 s zeigen keinen Rückgang der RU. Im Vergleich dazu zeigt ein Anstieg des in blau dargestellten Zyklus einen Anstieg der RU während der Hinzugabe der unterschiedlichen Konzentrationen des ConA. Das verdeutlicht die Beobachtung aus Abbildung 20 und 21, dass der Anstieg der RU auf der Referenzzelle deutlich geringer ausfällt als auf der aktiven Messzelle, und dieser beobachtbare Anstieg der RU sehr wahrscheinlich auf Konzentrationseffekte zurückzuführen ist. Dies zeigt, dass dieser Versuchsaufbau für kinetische

Messungen geeignet ist. Die Regenerierung mit α -Methylmannose resultiert in beiden Zyklen gleichermaßen in einem Rückgang auf das Ausgangsniveau der RU zu Beginn des jeweiligen Zyklus.

Im Vergleich zu den vorherigen Funktionalisierungen können mit Hilfe der in diesem Kapitel beschriebenen Immobilisierungsbedingungen glykosylierte Goldoberflächen erzeugt werden, deren *Baseline* nach Hinzugabe von ConA nicht auf einem erhöhten Niveau bleibt. Die *Baselines* der Messzyklen steigen allerdings auf beiden Flusszellen in geringem Maße kontinuierlich im Zeitverlauf an. Dieser Effekt kann in und nach jedem Messzyklus beobachtet werden, auch in solchen ohne Hinzugabe von ConA. Daher kann ausgeschlossen werden, dass der kontinuierliche Anstieg der detektierten RU im Verlaufe mehrerer Messungen auf die Adsorption von ConA (oder weiterem Glykopolymer) zurückzuführen ist. Da für das finale Sensorgramm die Referenzzelle von der aktiven Messzelle subtrahiert wird, ist dieser Anstieg dort nicht mehr sichtbar und wird somit in der Auswertung nicht berücksichtigt.

3.2.2.4 Zusammenfassung der Funktionalisierungskonditionen

In den Kapiteln 3.2.2.1 bis 3.2.2.3 wurden verschiedene Strategien miteinander verglichen, um stabile glykosylierte Oberflächen zu generieren, die für weitergehende Studien geeignet sind. Als wichtigstes Kriterium wird dabei die Stabilität der *Baseline* beider Flusszellen (aktiver Zelle sowie der Referenz) gegen ConA gewählt. Diese Stabilität wird ermittelt, indem das Niveau der *Baseline* vor Beginn des Kontakts der Oberfläche mit ConA mit dem Niveau der detektierten RU nach den Messungen und nach Regeneration mit α -Methylmannose verglichen wird. Ein reproduzierbares Erreichen des Niveaus bedeutet, dass der Chip vollständig regeneriert werden kann und dieser somit stabil gegen Adsorption von Proteinen wie ConA ist. Auch nach mehreren Messzyklen werden die gleichen relativen Änderungen der RU detektiert. Es zeigen sich jedoch auch unspezifische Wechselwirkungen bei Hinzugabe von ConA, welche jedoch durch Subtraktion der RU der Referenz von der aktiven Messzelle für das finale Sensorgramm entfernt werden. Könnte hingegen ein Anstieg der detektierten RU in der gleichen Größenordnung auf beiden Zellen beobachtet werden, so wäre der Versuchsaufbau ungeeignet.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Methacrylamidglykopolymere (pMan2CM₈₆ und pGal4CM₅₅) haben sich für das Oberflächenplasmonenresonanzassay in dieser Form als ungeeignet erwiesen, da Zuwächse der RU in Anwesenheit von ConA beim Galaktosepolymer in einer ähnlichen Größenordnung wie beim Mannosepolymer zu sehen sind. Diese Beobachtungen werden unterstützt durch die Ergebnisse von Zhao et al.: diese Gruppe verglich Methacrylamide und Acrylamide hinsichtlich ihrer unspezifischen Wechselwirkungen gegen Lektine und stellte fest, dass die unspezifischen Interaktionen bei Acrylamiden deutlich geringer sind als die bei Methacrylamiden.^[168] Auch die Gruppe um Silin et al. beobachteten unspezifische Wechselwirkungen bei steigender Hydrophobizität in SPR-Assays. Sie erzeugten verschiedene SAMs mit variierender Hydrophobizität und untersuchten die unspezifischen Wechselwirkungen mit verschiedenen Proteinen. Sie konnten auf diese Weise zeigen, dass SAMs mit Methylgruppen ein bis zu 10³-fach höhere Oberflächenkonzentration an Proteinen aufweisen als die hydrophileren SAMs.^[171]

Erste Messungen mit den Glykopolymeren pMan2CA₂₆ und pGal2CA₂₂ zeigten deutlich geringere unspezifische Wechselwirkungen auf der Referenzmesszelle. Es konnte jedoch weiterhin ein direkter Anstieg der *Baseline* nach Kontakt mit ConA beobachtet werden, welcher unter den verwendeten Regenerierungsbedingungen nicht reversibel war. Dieser Anstieg wurde hingegen nicht mehr beobachtet, nachdem die Goldoberflächen einer längeren Kontaktzeit mit Glykopolymeren ausgesetzt waren. Es konnte somit gezeigt werden, dass die Kontaktzeit der Glykopolymere auf den Goldoberflächen über einen wesentlichen Einfluss auf die Langzeitstabilität der Oberfläche gegen ConA verfügt. Dies trifft sowohl für mannosylierte als auch für galaktosylierte Polyacrylamide zu. Smith et al. fanden ebenfalls in SPR-Studien heraus, dass eine Adsorption von Proteinen an Goldoberflächen zu einem unspezifischen Wachstum der *Baseline* führen kann, sodass erst durch eine möglichst vollständige (Co-)SAM-Ausbildung diese Physisorption verhindert werden sollte.^[172] Diese homogenen SAMs können mit einer deutlich längeren Kontaktzeit erhalten werden, jedoch geht aufgrund des Geräteaufbaus eine längere Kontaktzeit im Gerät mit einem hohen Verbrauch der Glykopolymere

einher. Daher erfolgt die Immobilisierung beider Goldoberflächen in insgesamt vier Schritten (vgl. Abbildung 19).

In den ersten beiden Schritten erfolgt die Funktionalisierung der (aktiven) Messzelle durch 2-mal wiederholtes Spülen der Oberfläche mit 1.0 mg/mL Glykopolymerlösung in MilliQ-Wasser. Die Zunahmen der RU werden dabei detektiert ebenso wie im anschließenden Prozessschritt. Zur Ausbildung des Co-SAMS mit dem Galaktoseglykopolymer wird der Goldchip aus dem Gerät entfernt und für 24 h mit 1.0 mg/mL Glykopolymerlösung in Kontakt gebracht. Dieser Schritt wird nach gründlichem Spülen mit MilliQ-Wasser wiederholt, sodass sich eine möglichst dichte Glykopolymeroberfläche auf den Goldchips ausbilden kann. Die längere Einwirkzeit erzeugt Messzellen, die eine ausreichende Stabilität gegen ConA zeigen und keine signifikanten unspezifischen Wechselwirkungen aufweisen. Ein limitierender Faktor ist der minimierte und dennoch vorhandene geringe Anstieg der *Baseline* im Verlauf der verschiedenen Messzyklen. Da dieser nach der richtigen Oberflächenpräparation unabhängig von der Lektinzugabe zu beobachten und gleich stark auf beiden Messzellen auftritt, ist davon auszugehen, dass dies keinen Einfluss auf das Messergebnis hat. Außerdem war es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, die funktionalisierten Goldoberflächen hinsichtlich der molekularen Anordnung näher zu untersuchen. Andere Arbeiten deuten jedoch darauf hin, dass nicht nur die Art und Eigenschaften der immobilisierten Glykopolymere eine Rolle bei Interaktionen mit Lektinen spielen, sondern auch die Anordnung auf der Oberfläche.^[173]

In Zukunft könnten daher weitere Optimierungen der Immobilisierungsbedingungen vorgenommen werden und zusätzlich weitere Möglichkeiten der Oberflächenanalytik in Erwägung gezogen werden. Es könnte eine andere polymerisierbare Einheit, bspw. Acrylat, eine geringere unspezifische Wechselwirkung mit ConA im Polymerrückgrat hervorrufen. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Optimierung der vollständigen Funktionalisierung der Goldoberfläche, z.B. mit kleineren Molekülen. Es könnten noch kleinere Glykopolymere synthetisiert werden, die ein Co-SAM über Nacht in einem dritten oder vierten Funktionalisierungsschritt ausbilden können. Auch monovalente Saccharide könnten sich für eine vollständige Bedeckung der Goldoberfläche eignen, wenn sie über eine Thio-

Gruppe verfügen. So ließen sich mit β -D-Thiogalaktose ggf. noch letzte freie Stellen auf der Goldoberfläche besetzen und sollten somit zu einer weiteren Reduktion unspezifischer Wechselwirkungen des Proteins mit dem Chip führen.

3.2.3 Affinitätsstudien mit ConA

Das optimierte Verfahren zur Generierung glykolsylierter Goldoberflächen wird verwendet, um zwei verschiedene Sensorchips mit unterschiedlich-langen Glykopolymeren zu funktionalisieren mit einem möglichst ähnlichem Funktionalisierungsgrad. Auf einem Chip, fortan als „GC_{Kurz}“ bezeichnet, wird die aktive Messzelle mit pMan2CA₂₆ funktionalisiert und die Referenzzelle mit pGal₂₂. Auf dem anderen Chip „GC_{Lang}“ werden die Polymere pMan2CA₄₀ und pGal2CA₃₇ jeweils auf der aktiven Messzelle bzw. auf der Referenzzelle immobilisiert. Anschließend erfolgt die Ausbildung eines Co-SAMs auf beiden Sensorchips mit pGal2CA₂₂. Die jeweiligen Zunahmen der RU werden in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Immobilisierungslevel der unterschiedlichen Goldoberflächen nach jedem Funktionalisierungsschritt.

	GC _{Kurz}		GC _{Lang}	
	Aktive Zelle (pMan2CA ₂₆)	Referenz (pGal2CA ₂₂)	Aktive Zelle (pMan2CA ₄₀)	Referenz (pGal2CA ₃₇)
Δ RU [1. Immobilisierung]	530	1566	628	829
Berechnete Dichte	0.53 ng/mm ²	1.57 ng/mm ²	0.63 ng/mm ²	0.83 ng/mm ²
Δ RU [2. Immobilisierung]	1087	2707	678	1260
Berechnete Dichte	1.09 ng/mm ²	2.71 ng/mm ²	0.68 ng/mm ²	1.26 ng/mm ²
Gesamtes <i>Responselevel</i>	1617	4226	1306	2089
Berechnete Dichte	1.62 ng/mm ²	4.23 ng/mm ²	1.31 ng/mm ²	2.1 ng/mm ²
Δ RU nach Ausbildung von Co-SAMs mit pGal ₂₂	1643	4226	1544	2744
Kumulierte Dichte	1.64 ng/mm ²	4.23 ng/mm ²	1.54 ng/mm ²	2.74 ng/mm ²

Die Funktionalisierungen erfolgen, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben und in Abbildung 19 dargestellt, auf die gleiche Weise: es werden jeweils Polymerlösungen mit 1.0 mg/mL Glykopolymer in MilliQ-Wasser erstellt. Diese werden im Gerät für 1000 s mit der jeweiligen Messzelle in Kontakt gebracht. Im Anschluss an einen Immobilisierungszyklus erfolgt die Bestimmung der Zunahme der *Response Unit*

ausgedrückt als ΔRU durch Starten eines weiteren Zyklus. Nach zwei Immobilisierungszyklen auf beiden Flusszellen wird der Chip mit MilliQ-Wasser gewaschen und zweimal über Nacht mit 1.0 mg/mL pGal2CA₂₂ in MilliQ-Wasser in Kontakt gebracht. Es folgt eine finale Bestimmung der RU-Zunahme. Tabelle 6 stellt dabei die jeweiligen Zunahmen der RU gegenüber und deren Wert ausgedrückt in der Einheit ng/mm² dar. Hierbei können verschiedene Trends beobachtet werden:

Einerseits zeigt sich erneut, dass die Flusszellen, auf denen Galaktoseglykopolymere immobilisiert wird, eine höhere Funktionalisierungsdichte als die dementsprechenden Mannoseglykopolymere aufweisen. So erreicht die Schicht aus pMan2CA₂₆ auf GC_{Kurz} ein *Responselevel* von 1.620 RU, während die Schicht mit pGal2CA₂₂ ein *Responselevel* von 4.230 RU erreicht. Auf dem GC_{Lang} beträgt das *Responselevel* des pMan2CA₄₀ 1.310 RU und das der Zelle mit pGal2CA₃₇ 2.100 RU. Nach Ausbildung des Co-SAMS mit pGal2CA₂₂ nimmt das *Responselevel* von GC_{Kurz} in beiden Zellen unwesentlich zu. Ein deutlicher Anstieg ist hingegen auf beiden Zellen von GC_{Lang} zu beobachten. Die finale Response steigt auf der aktiven Messzelle um 230 RU und auf der Referenzzelle um 640 RU. Die Immobilisierung der längeren Glykopolymere erfolgt im Gegensatz dazu jedoch in geringerem Umfang. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass die Ausbildung einer homogenen Glykopolymerschicht mit kürzeren Glykopolymeren einfacher umzusetzen ist als mit längeren Glykopolymeren. Aus diesem Grund liegen die finalen *Responselevel* der längeren unter denen der kürzeren Polymere. Durch Co-SAM-Ausbildung steigen die Oberflächenbeladungen im Vergleich zu GC_{Kurz} an. Die Gruppe um Li et al. konnte ebenfalls beobachten, dass Galaktosepolymere eine höhere Funktionalisierung der Goldoberfläche ermöglichen als die korrespondierenden Mannosepolymere. Dennoch bleibt die dort detektierte Beladung der Oberfläche mit 0.39 ng/mm² für Galaktosepolymere und 0.32 ng/mm² für Mannosepolymere deutlich geringer, als im Rahmen dieser Arbeit erhalten wurde.^[169]

Die mehrfache Wiederholung von Zyklen mit und ohne ConA zeigt im weiteren Verlauf, dass die Goldoberflächen ein stabiles Niveau erreicht haben und gesättigt sind. Die *Baselines* der jeweiligen Messzellen erhöhen sich nach Hinzugabe von ConA nicht dauerhaft und es kann somit keine Physisorption des Lektins an die Goldoberfläche nachgewiesen werden. Zur Überprüfung der Stabilität

wird mit jedem Chip eine *Single-Cycle*-Messung mit ConA und *Wheat germ agglutinin* (WGA) durchgeführt. Während ConA spezifisch mit Mannose wechselwirkt, bindet WGA bevorzugt mit *N*-Acetylglukosamin-Derivaten und weder mit Galaktose noch mit Mannose, sodass durch den Einsatz von WGA keine spezifischen Wechselwirkungen beobachtet werden sollten.^[174]

Mit Hilfe dieser Lektine können die Goldoberflächen hinsichtlich ihrer unspezifischen Wechselwirkungen verglichen werden. Anhand des Beispiels Chip GC_{Kurz} kann mittels einer *Single-Cycle*-Messung nachvollzogen werden, inwiefern die Immobilisierung der Glykopolymere auf den Oberflächen erfolgreich war. Die in Abbildung 23 und 24 dargestellten Sensorgramme sind im *Single-Cycle-Kinetic*-Modus durchgeführt worden und zeigen jeweils zwei Messzyklen mit dem jeweiligen Lektin und einen mit ausschließlich Puffer (LBB). In einem *Single-Cycle-Kinetic*-Messzyklus (SCK-MZ) werden fünf verschiedene Konzentrationen des Lektins in ansteigender Reihenfolge über den Chip geleitet, ohne die Goldoberfläche zwischen den Konzentrationserhöhungen zu regenerieren. Bei beiden Lektinen beträgt die höchste Konzentration 3.0 mg/mL und die niedrigste Konzentration beläuft sich jeweils auf 0.0367 mg/mL. Die mittleren Konzentrationen unterscheiden sich stufenweise um den Faktor 3 und sind demnach 1.0 mg/mL, 0.33 mg/mL und 0.11 mg/mL.

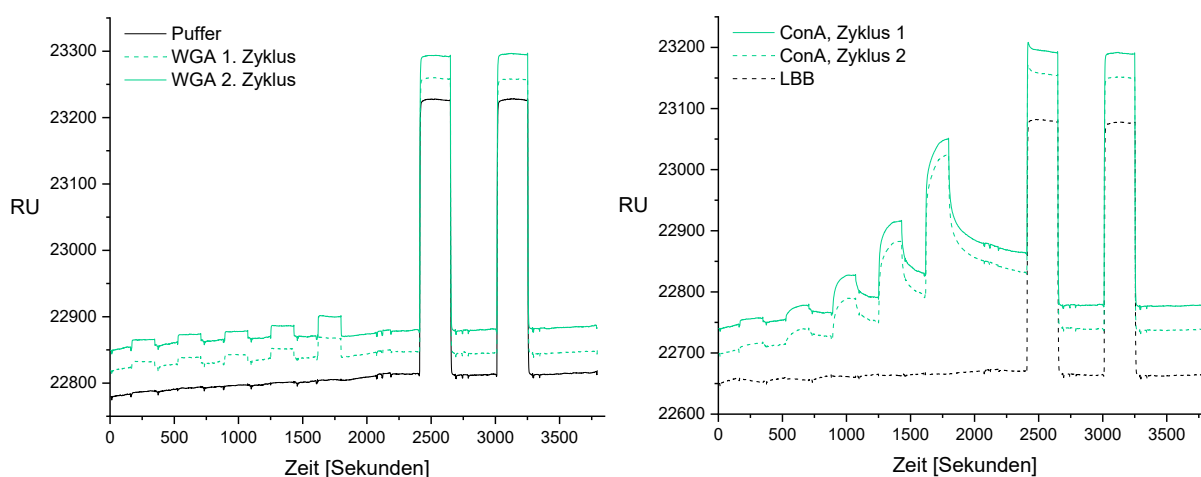


Abbildung 23: Sensorgramme von WGA (links) und ConA (rechts) gegen die aktive Messzelle von GC_{Kurz}.

In Abbildung 23 wird das Sensorgramm von WGA (links) gegen eine mannosylierte Goldoberfläche mit dem von ConA (rechts) gegen dieselbe Oberfläche verglichen. Wie zu erwarten war, ist der

beobachtbare Anstieg der *Response* über alle Konzentrationen hinweg bei Kontakt des WGA mit der Zelle deutlich geringer als bei Kontakt mit ConA. Auch die Höhe des Anstiegs der RU unterscheidet sich bei beiden Lektinen voneinander. Im Messzyklus 2 mit ConA steigt das *Responselevel* bspw. um 300 RU an während bei dem zweiten WGA-Messzyklus ein Anstieg von 49 RU erfolgt. Anhand der RU am Ende der jeweiligen Hinzugabe von WGA und ConA kann ein unterschiedliches Dissoziationsverhalten abgeleitet werden. Während ConA eine steigende Kurve zu Beginn und eine langsam absinkende Kurve am Ende der Hinzugabe einer Konzentration aufweist, steigt die RU bei Hinzugabe von WGA schlagartig an und sie fällt beim Stoppen der Hinzugabe ebenso schlagartig ab. Daraus folgt, dass bei WGA lediglich Konzentrationseffekte beobachtet werden, während ConA zusätzlich zum Konzentrationseffekt eine längere Verweildauer auf der Oberfläche aufweist.

Außerdem steigt die *Baseline* am Ende der Zyklen über alle Messungen hinweg stetig um 35 - 40 RU an – inklusive der Zyklen mit ausschließlich Puffer. Aus diesem Grund ist von einer stabilen mannosylierten Goldoberfläche und einer erfolgreichen Regenerierung auszugehen, da der kontinuierliche Anstieg nicht auf unspezifische Wechselwirkungen der Lektine oder deren Adsorption an die Oberfläche zurückzuführen ist. Eine Betrachtung der Referenzzelle kommt zu einem ähnlichen Ergebnis (vgl. Abbildung 24).

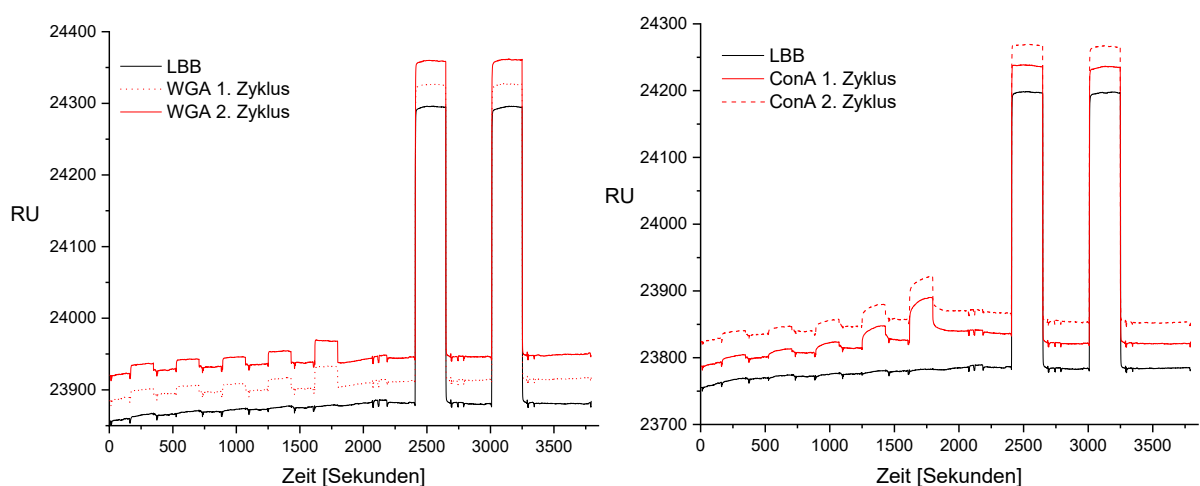


Abbildung 24: Sensorgramme von WGA (links) und ConA (rechts) gegen die Referenzzelle von GC_{Kurz}.

Die in Abbildung 24 dargestellten Sensorgramme erlauben einen Rückschluss auf die Stabilität der glykosylierten Goldoberfläche. Auch durch den Kontakt der Lektine mit der Referenzzelle steigen die *Responselevel* über die gesamten Zyklen inklusive Pufferzyklen stabil um 35 - 40 RU.

Da eine erfolgreiche Funktionalisierung beider Messzellen gezeigt werden kann, inklusive einer stabilen Oberfläche, werden im Folgenden die Sensorgramme betrachtet, die sich aus der Subtraktion der Referenzzelle von der aktiven Messzelle ergeben. Abbildung 25 zeigt dieses Sensorgramm für GC_{Kurz} für Zyklen mit ConA, WGA und ausschließlich in LBB.

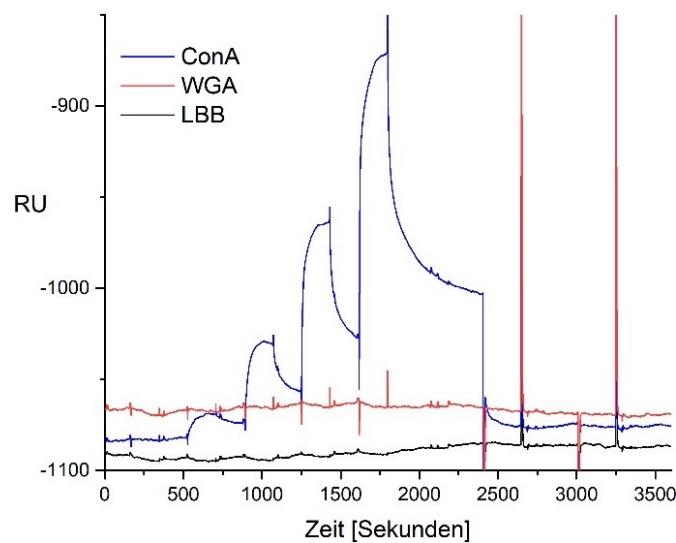


Abbildung 25: Resultierendes Sensorgramm der Subtraktion der Referenzzelle von der aktiven Messzelle (nicht normiert).

Abbildung 25 zeigt die Verläufe der detektierten Responseunits bereinigt um die Effekte von unspezifischen Wechselwirkungen und Konzentrationsveränderungen, indem die Referenzzellensignale von denen der aktiven subtrahiert werden. Der Signalbereich der RU befindet sich im negativen Bereich, da – wie bei der Immobilisierung bereits beschrieben – das Grundniveau der Referenz höher sein kann als das der aktiven Messzelle. Dennoch erlaubt diese Darstellungsweise einen Vergleich der relativen Änderungen der Flusszellen zueinander. In dem dargestellten Sensorgramm werden die SCK-Messungen von ConA, WGA und LBB miteinander verglichen. Dabei verlaufen die Sensorgramme des LBB-Zyklus und des WGA-Zyklus parallel zueinander. Das bedeutet, dass der Anstieg der RU des WGA auf der Referenzzelle gleichstark ist wie diejenigen auf der aktiven Messzelle. Das ist auch zu erwarten,

da WGA weder mit Mannose noch mit Galaktose wechselwirkt. Im Vergleich dazu sind die attraktiven Wechselwirkungen von ConA auf der aktiven Messzelle deutlich stärker als die auf der Referenzzelle gemessenen, sodass in dem Subtraktionssensorgramm ein stärkerer Anstieg der RU durch Hinzugabe einer höheren ConA-Konzentration beobachtet werden kann. Daraus folgt, dass der gewählte Versuchsaufbau dafür geeignet ist, die Konzentrationseffekte der Lektine herauszurechnen, sodass ausschließlich die spezifischen Wechselwirkungen der Lektine – falls vorhanden – in dem finalen Subtraktionssensorgramm dargestellt werden.

3.2.4 Direktbindungsstudien von ConA auf glykosylierten

Goldoberflächen

Die Generierung von glykosylierten Goldoberflächen ermöglicht die Untersuchung von Wechselwirkungen der auf der Oberfläche präsentierten Glykopolymere mit Lektinen. Dabei kann die Affinität von ConA zu beiden unterschiedlich-langen Mannoseglykopolymeren verglichen werden. Bisher wurden in der Literatur Zusammenhänge zwischen Glykopolymeren in Lösung und deren Affinität zu ConA abhängig von ihrer Größe und Valenz beschrieben.^[3, 44] Glykopolymere, die an feste Oberflächen gebunden sind, wurden jedoch kaum hinsichtlich dieser Parameter untersucht. Terada et al. vergleichen beispielsweise die Affinität von ConA an zwei oberflächen-gebundene Glykopolymere mit unterschiedlichem Mannoseanteil in Homo- und Copolymeren.^[163]

Mit Hilfe des Experiments lässt sich durch einen direkten Vergleich der RU bestimmen, an welche der glykosylierten Oberflächen mehr ConA bindet. Je höher die beobachteten RU auf einer Oberfläche, desto mehr ConA bindet im Verlauf der Kontaktzeit an die jeweilige Oberfläche. Außerdem kann durch Variation der Konzentrationen des ConA die Bindungsstärke gegen die jeweilige Oberfläche abgeleitet werden, indem aus den RU der verschiedenen Konzentrationen der k_d -Wert von ConA gegen die jeweilige Oberfläche ermittelt wird. Dabei gilt: Je kleiner der k_d -Wert, desto höher ist die Affinität von ConA zur betrachteten Oberfläche. Der k_d -Wert ist außerdem ein wichtiger Referenzwert, der für die Inhibierungs-Kompetitionsstudien als Referenzkonzentration herangezogen werden kann.

Zur Bestimmung der Affinität des ConA zu den Oberflächen werden fünf unterschiedliche Konzentrationen ConA im *Single-Cycle-Kinetik*-Modus jeweils gegen GC_{Kurz} und GC_{Lang} gemessen. Anschließend erfolgt eine Auswertung der Daten mit Hilfe des Analysetools der Biacore X100-Software unter Bestimmung des k_d -Wertes. Der jeweilige k_d -Wert berechnet sich dabei aus den detektierten *Responseleveln*, die nach Injektion der verschiedenen ConA-Konzentrationen detektiert werden, und einem *Fit* dieser Daten. In Abbildung 26 werden zunächst die resultierenden Sensorgramme abgebildet.

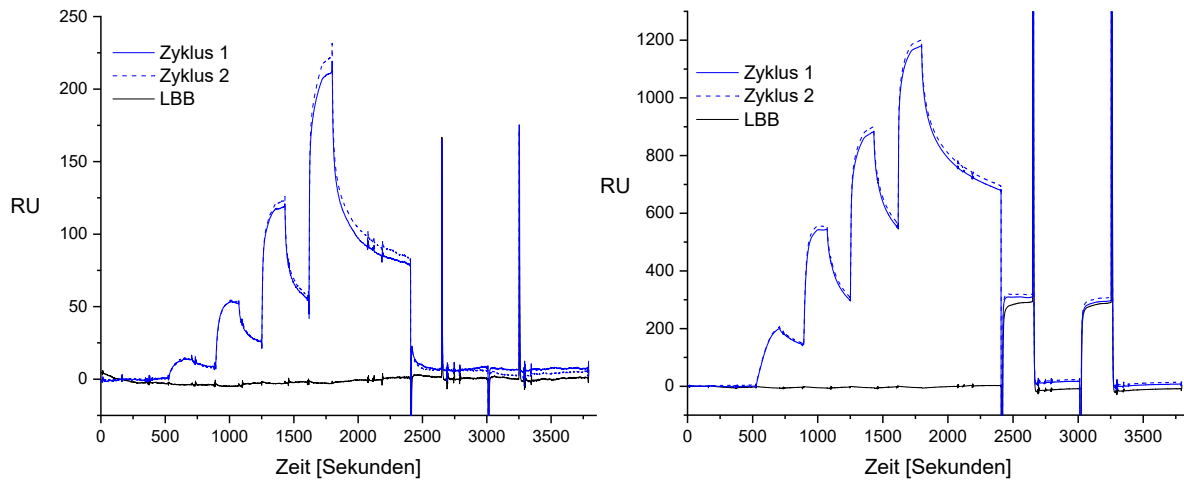


Abbildung 26: Direktbindungsstudien mit ConA auf GC_{Kurz} (links) und GC_{Lang} (rechts).

Die aufgenommenen Sensorgramme in Abbildung 26 zeigen die unterschiedlichen *Singe-Cycle-Kinetics*-Messzyklen auf GC_{Kurz} (links) und GC_{Lang} (rechts) sowohl mit ConA (blau) als auch mit ausschließlich injizierter Pufferlösung (schwarz). Zunächst werden fünf Konzentrationen ConA beginnend mit der niedrigsten Konzentration nacheinander über die Goldoberflächen geleitet. Dadurch resultiert der sägeblattartige Anstieg innerhalb der ersten 2400 s. Die erste Konzentration ist dabei die niedrigste, wodurch das erste Signal jeweils nur minimal detektiert wird. Die höchste Konzentration ist in den Sensorgrammen beider Oberflächen jedoch deutlich sichtbar. Nach der Zugabe dieser Konzentration kann zunächst die Dissoziation des ConA beobachtet werden, bevor die Oberfläche zweimal mit α -Methylmannose regeneriert wird.

Auffällig ist, dass das Level der detektierten RU auf GC_{Kurz} in Kontakt mit ConA deutlich niedriger ist als auf GC_{Lang}. Das bedeutet, dass eine größere Menge ConA an die Oberfläche mit dem längeren Glykopolymer bindet als gegen die mit dem kürzerem Glykopolymer. Daraus folgt, dass bei GC_{Lang} eine höhere Kapazität für Bindungen mit ConA vorhanden ist, obwohl weniger Glykopolymer auf der Oberfläche immobilisiert wurde (vergleiche Tabelle 7). Die Bestimmung der Affinität in Form des apparenten k_d -Werts erfolgt im Anschluss an die *Single Cycle Kinetic*-Messungen mit Hilfe eines *Fits*, für welchen die Messamplituden der einzelnen Konzentrationen gegen die entsprechenden Konzentrationen ConA aufgetragen werden (vgl. Abbildung 27).

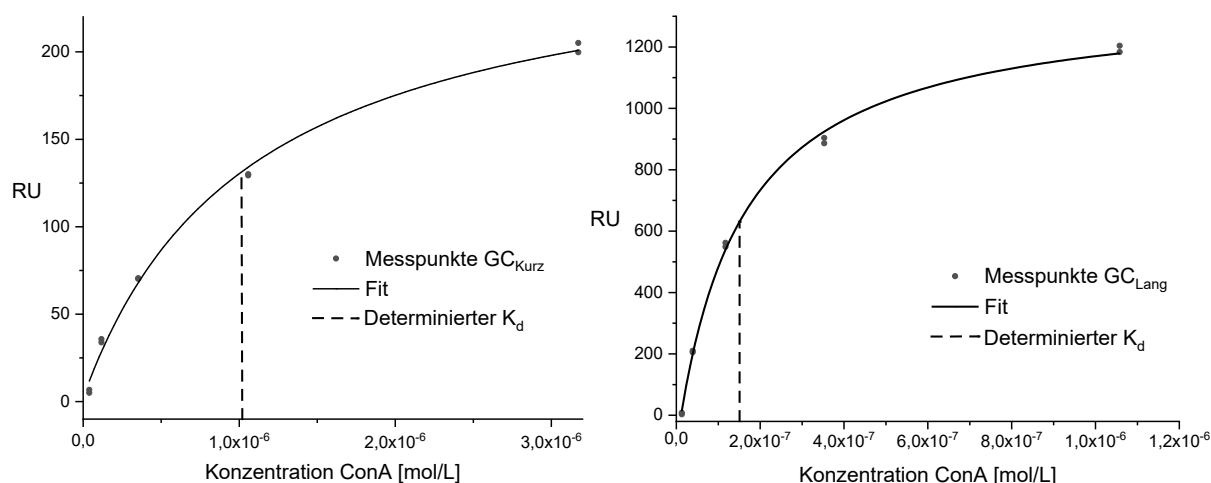


Abbildung 27: K_d-Fits von ConA gegen GC_{Kurz} (Links) und GC_{Lang} (rechts).

Mit Hilfe der Biacore X100 Software wird eine Kurve berechnet, die den hypothetischen Kurvenverlauf aller möglicher Konzentrationen abbildet, die zwischen den tatsächlich vermessenen Konzentrationen liegen. In Abbildung 27 werden diese Verläufe mit den jeweiligen zugrundeliegenden Daten dargestellt. Dabei bewegt sich die Kurve von ConA gegen GC_{Lang} in einem niedrigeren Konzentrationsbereich als im Fall von GC_{Kurz}. Außerdem verläuft die berechnete Kurve im Falle von GC_{Kurz} deutlich flacher im Verlaufe des Konzentrationsanstiegs. Dementsprechend wird auf dem GC_{Kurz} ein geringerer K_d-Wert ermittelt als auf GC_{Lang} (vgl. Tabelle 7).

Tabelle 7: Determinierte apparente K_d-Werte gegen ConA auf den jeweiligen Goldchips.

	K _d -Wert [μM]	Immobilisierungslevel
GC _{Kurz}	1.02 (± 9.4 %)	1.62 ng/mm ²
GC _{Lang}	0.15 (± 2.2 %)	1.31 ng/mm ²

In Tabelle 7 werden die determinierten K_d-Werte des ConA gegen die Goldoberflächen inklusive zuvor bestimmter Immobilisierungslevel dargestellt. Ein geringerer K_d-Wert bedeutet dabei eine höhere Affinität zur Oberfläche. Der K_d-Wert gemessen auf GC_{Kurz} ist mit 1.02 μM um den Faktor 7 größer als der auf GC_{Lang} gemessene Wert mit 0.15 μM. Das bedeutet, ConA weist eine höhere relative Affinität gegenüber der mannosylierten Oberfläche mit dem längeren Glykopolymer auf, obwohl diese aufgrund des höheren Molekulargewichts von pMan2CA₄₀ geringer funktionalisiert werden konnte. Im

Vergleich zur Literatur liegen diese Werte in einer ähnlichen Größenordnung wie vergleichbare Experimente:

In einem SPR-Assay mit monovalenter Mannose und Galaktose auf Goldoberflächen konnten Smith et al. einen K_d -Wert von $200 (\pm 50) \mu\text{M}$ ermitteln.^[172] Dieser Wert ist um ein Vielfaches höher als der K_d -Wert aus dem oben beschriebenen Assay. Bei Glykopolymeren werden im Vergleich zu multivalenten Systemen deutlich höhere Affinitäten erwartet als dies bei monovalenten Systemen der Fall ist. Die gleiche Gruppe um Smith et al. untersucht und vergleicht ebenfalls Co-SAMs mit unterschiedlichem Mannose-Anteil durch kontrollierte Substitution der Mannose durch Galaktose.^[172] Ein Anstieg des Mannoseanteils von 10 % auf 50 % weist dabei einen deutlicheren Anstieg in der Affinität auf, als dies bei einem Anstieg von 50 % auf 100 % Mannose der Fall ist. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass neben der Valenz des Moleküls auch die relative Häufigkeit der auf der Oberfläche präsentierten Mannose einen signifikanten Einfluss auf die detektierte Affinität des ConA ausübt. Diese Beobachtung deckt sich mit den oben beschriebenen Resultaten. In beiden Fällen steigt die Affinität von ConA zu Oberflächen, auf denen mehr Mannoseeinheiten präsentiert werden. Huang et al. untersuchten mittels eines Quarzkristall-Mikrowagen-Versuchsaufbaus die Affinität von ConA gegen eine Goldoberfläche, die mit mannosylierten Glykopolymeren bzw. mit monovalenter Mannose funktionalisiert wurde.^[175] Diese Untersuchungen zeigten demnach ebenfalls eine erhöhte Affinität des Lektins zu Oberflächen mit Glykopolymeren.

3.2.5 Inhibitions-Kompetitions-Assay

Viele Wechselwirkungen in biologischen Systemen finden entweder in Lösung oder in Interaktion mit auf Oberflächen präsentierten Strukturen statt. In den Direktbindungsstudien erfolgt ein Vergleich der Affinität von ConA zu einer unterschiedlich glykosylierten Oberfläche. In Inhibitions-Kompetitions-Assays wird der Aspekt der direkten Bindung an eine Oberfläche um den Faktor einer Inhibierung erweitert. Dazu wird ein Ligand fixer Konzentration über eine Oberfläche geleitet, an die der Ligand binden kann. Die Bindungsaffinität des Liganden gegen die Oberfläche muss zuvor mit Hilfe eines Direktbindungsassays nachgewiesen werden, um die Ligandenkonzentration auswählen zu können. Diese Konzentration sollte in etwa dem K_d -Wert des Liganden gegen die Oberfläche entsprechen. Nach Ermitteln der effektiven Ligandenkonzentration können verschiedene Inhibitoren zum Liganden hinzugegeben werden. Abhängig von der Inhibitorkonzentration werden die nicht-inhibierten und somit verbliebenen Wechselwirkungen des freien Liganden mit der Oberfläche durch ein Oberflächenplasmonenresonanz-Assay untersucht. Die Stärke der gemessenen Wechselwirkung des Liganden (gemessen in RU) mit der Oberfläche entspricht dabei dem Reziproken der inhibitorischen Effizienz des Inhibitors. Denn es gilt: je besser der inhibierende Effekt des Inhibitors, desto weniger wechselwirken Ligand und Oberfläche miteinander. Abbildung 28 stellt das Grundprinzip eines Inhibitions-Kompetitions-Assays schematisch dar.

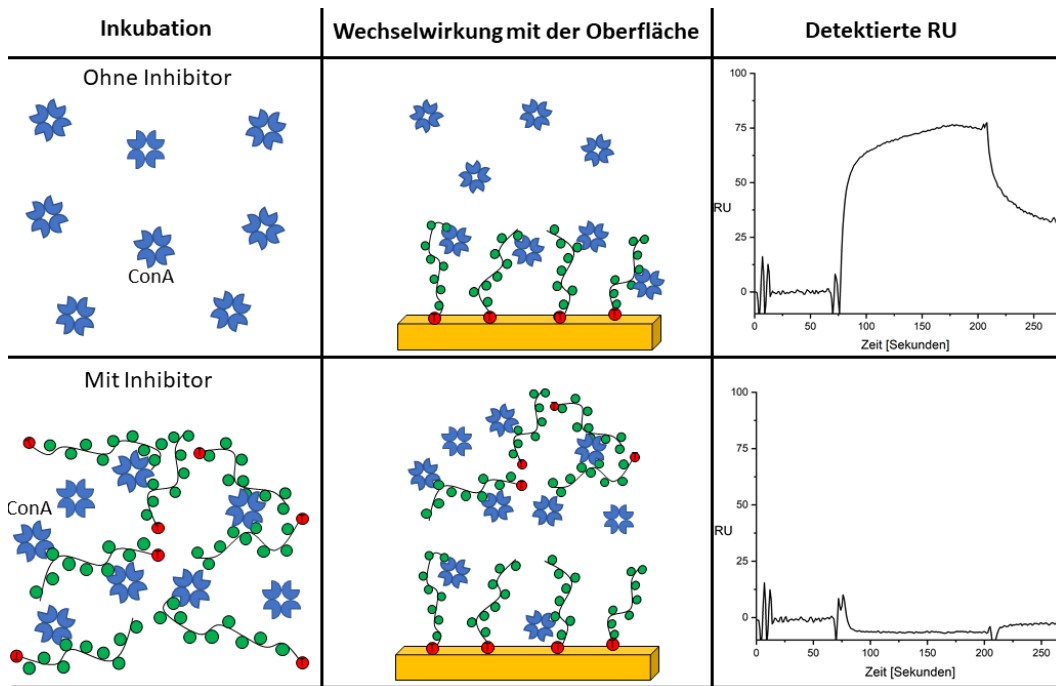


Abbildung 28: Verdeutlichung des Grundprinzips des Inhibitions-Kompetitions-Assays.

In einem Inhibitions-Kompetitions-Assay, das mittels SPR-Assay durchgeführt wird, werden drei Zustände in einem Zyklus durchlaufen. Zu Beginn liegt eine glykosylierte Goldoberfläche vor. Auch in diesem Assay ist es wichtig, eine Referenzzelle zu verwenden, die nicht mit dem betrachteten System wechselwirkt. Denn in einem Inhibitions-Kompetitions-Assay werden zwei verschiedene Substanzen gleichzeitig über die Oberfläche geleitet, sodass der Brechungsindex in den Flusskanälen stärker als bei der Anwesenheit nur einer Substanz in Lösung schwanken kann. Im zweiten Schritt wird ConA über die Goldoberfläche geleitet, welches vorher mit Inhibitoren unterschiedlicher Konzentrationen inkubiert wurde. Dabei wird ein Zeitraum gewählt, der lang genug ist, um dem System das Erreichen eines Gleichgewichtszustands zu ermöglichen. In diesem Gleichgewichtszustand wird die Stärke der Bindung zur Oberfläche ausgedrückt in RU erfasst. Schließlich wird im dritten Schritt eventuell noch an der Oberfläche gebundener Ligand durch einen starken Überschuss eines Inhibitors entfernt, um die Oberfläche wieder in ihren Ausgangszustand zu versetzen.

Nach diesen beschriebenen Zyklen wird die Inhibitorkonzentration variiert – idealerweise werden mehrere äquidistante Konzentrationsschritte gewählt, die insgesamt drei verschiedene Bereiche abdecken können: den Bereich der vollständigen Inhibierung, den Bereich keiner effektiven

Inhibierung und den Bereich, in welchem weder eine vollständige noch keine Inhibierung vorliegen. Bei einer vollständigen Inhibierung des Liganden wäre das detektierte Signal der RU in dem Inhibitions-Kompetitions-Assay minimal, während in den anderen Fällen eine höhere RU detektiert werden kann. Ein Plateau sollte im Bereich der geringsten Inhibierung erreicht werden und die dort detektierten RU sollten idealerweise denen des reinen Liganden in Abwesenheit von Inhibitoren entsprechen.

Ziel der Inhibitions-Kompetitions-Assays ist die Bestimmung des IC_{50} -Werts eines Inhibitors. Dieser Wert stellt die Konzentration dar, bei der 50 % Inhibierung im Vergleich zu reinem ConA ohne Anwesenheit eines Inhibitors erfolgt. Hierzu werden die maximalen RU (R_{max}) in Anwesenheit unterschiedlicher Inhibitorkonzentrationen in einem *Multi-Cycle*-Assay gemessen und in einem *Hill1-Fit* auf einer Kurve dargestellt. Der IC_{50} -Wert kann darauf abgelesen werden, sodass ein Vergleich verschiedener Inhibitoren miteinander ermöglicht wird.

Im Gegensatz zu *Single-Cycle*-Messungen werden in *Multi-Cycle*-Assays die Injektionslösungen länger über die Messzellen geleitet und es erfolgt nach Messung jeder Konzentration ein Regenerationsschritt. Insgesamt können mehrere Konzentrationen als im *Single-Cycle*-Prinzip gemessen werden, sodass sich Genauigkeit und Messzeit einer Messreihe erhöhen. Zur Bestimmung des IC_{50} -Wertes werden verschiedene Konzentrationen des betrachteten Inhibitors möglichst kleinschrittig ausgewählt, mit der gleichen Menge ConA versetzt und gut durchmischt. Anschließend werden drei verschiedene Arten von Messzyklen durchgeführt an deren Ende immer zwei Regenerationsschritte vorgenommen werden.

Ein Messzyklus pro *Multi-Cycle*-Messreihe wird nur mit ConA – folglich ohne Inhibitor - vermessen, damit das Signal der maximalen Bindungsintensität ermittelt wird. In mehreren Messzyklen werden anschließend verschiedene Konzentrationen des Inhibitors in Anwesenheit der gleichen Konzentration von ConA vermessen. Dabei wird die Inhibitorkonzentration in absteigender Reihenfolge gewählt, sodass das im Verlaufe der verschiedenen Messzyklen das ermittelte Referenzspektrum immer weiter ansteigt. Schließlich erfolgt eine Validierung der gesamten Messreihe, indem einer der Messzyklen mit

der Inhibitorkonzentration, die möglichst nahe am zu ermittelnden IC_{50} -Wert liegt, erneut gemessen wird. Verläuft dieser letzte Messzyklus genau wie der Messzyklus innerhalb der Messreihe, kann von einer validen Messung ausgegangen werden. Abbildung 29 zeigt diese Messzyklen für eine Messreihe, in der α -Methylmannose als Inhibitor verwendet wird.

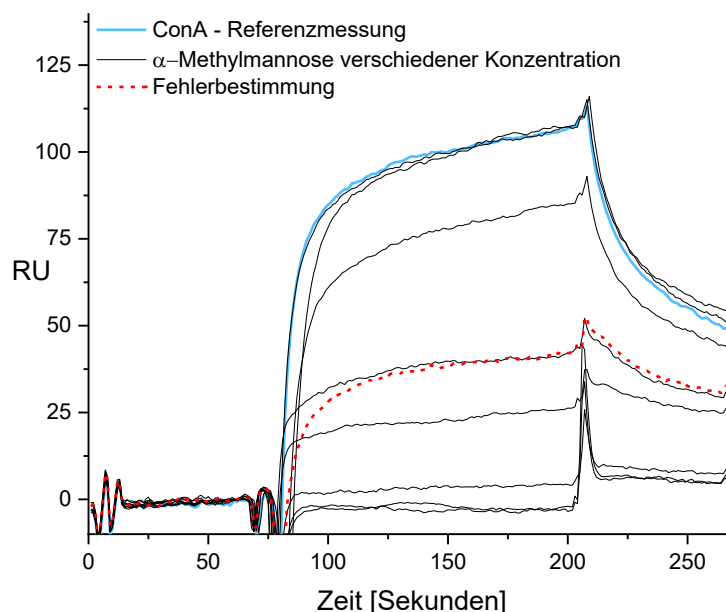


Abbildung 29: Multi-Cycle-Messungen anhand des Beispielspektrums für α -Methylmannose auf GC_{Kurz} .

Abbildung 29 zeigt die drei beschriebenen Arten von Messzyklen. In blauer Farbe ist der Messzyklus für ConA abgebildet, während die Messreihen mit unterschiedlicher Inhibitorkonzentration schwarz und die Fehlerbestimmungskurve in rot-gepunktet dargestellt werden. Die blaue Kurve liegt sichtbar auf dem Niveau der Messzyklen mit der geringsten Inhibitorkonzentration. Die Messzyklen mit steigender Inhibitorkonzentration erreichen geringere Werte der detektierten RU, je höher die Inhibitorkonzentration ist. Die höchsten Inhibitorkonzentrationen zeigen keine detektierbare Bindung von ConA an die glykosylierte Oberfläche bzw. sogar ein leicht negatives Maximum. Ein Absinken der detektierten RU in den negativen Bereich ist jedoch ausschließlich bei den höchsten Inhibitorkonzentrationen sichtbar, sodass es sich dabei sehr wahrscheinlich um einen Konzentrationseffekt handelt, der stärker auf der Referenzzelle zum Tragen kommt. Der Grund für ein negatives Signal im Sensorgramm ist eine höhere detektierte Wechselwirkung auf der Referenzzelle

im Vergleich zur aktiven Messzelle. In der Literatur lassen sich allerdings keine Beispiele für ähnliche Beobachtungen finden.

Die rote Messkurve der doppelten Messung überlagert in dem Sensorgramm die korrespondierende Linie derselben Konzentration - in diesem Beispiel bei einer Inhibitorkonzentration von $3 \cdot 10^5$ nM. Dies bedeutet, dass die Messung für diese spezifische Konzentration innerhalb einer Konzentrationsreihe reproduzierbar ist. Da es sich um ein empfindliches Messverfahren handelt und die Schwankungen von den betrachteten Konzentrationen in dem Bereich um den IC_{50} -Wert am größten ausfallen können, ist diese Validierung ein wichtiger Schritt zur Überprüfung der Robustheit der einzelnen Messzyklen.

Zusätzlich der in jedem Zyklus wiederholten Normierung auf einen Wert für ConA und der Reproduktion eines Messwerts nahe dem erwarteten IC_{50} -Wert wird jede Multi-Cycle-Messreihe insgesamt zwei Mal für jeden Inhibitor auf jedem Chip durchgeführt. Anschließend werden die Signalwerte bei 191 s ermittelt und die jeweils dort gemessenen RU in Relation zu den RU gesetzt, die für die Messung mit ConA bestimmt wurden. Daraus ergeben sich relative Bindungswerte für jede gemessene Inhibitorkonzentration, die grafisch aufgetragen werden können. Ein Hill1-Fit erlaubt anschließend eine Bestimmung des IC_{50} -Werts eines jeden Inhibitors wie in Abbildung 30 abgebildet.

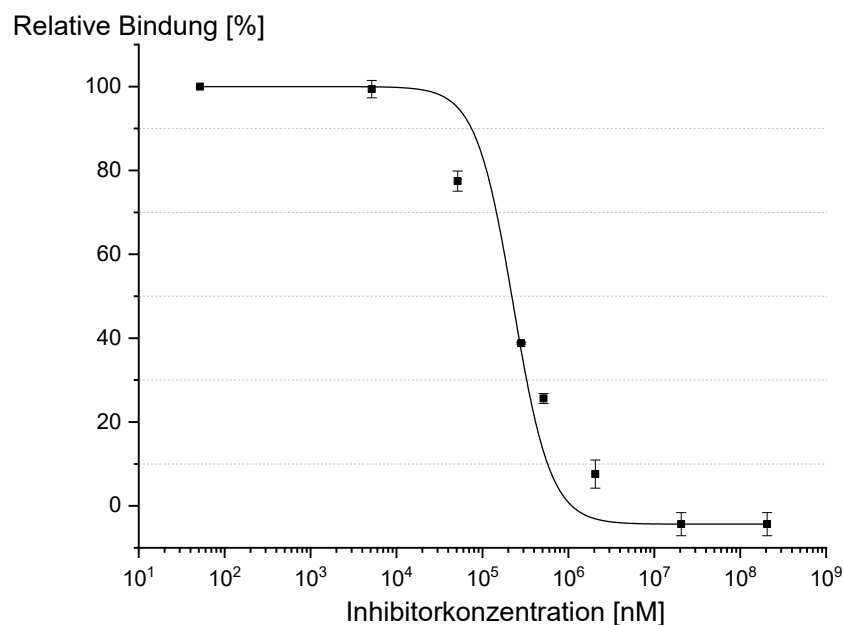


Abbildung 30: Relative Bindung von ConA auf GC_{Kurz} bei verschiedenen Konzentrationen α -Methylmannose und Hill1-Fit.

In Abbildung 30 wird die relative Bindung von ConA in % an GC_{Kurz} bei unterschiedlichen InhibitorKonzentrationen in der Einheit nanomolar [nM] grafisch dargestellt, die aus den Sensorgrammen von Abbildung 29 entnommen werden können. Zusätzlich zu diesen Konzentrationen ist ein Hill1-*Fit* in die Grafik eingezeichnet, der mit Hilfe der eingezeichneten Werte berechnet wird. Der Hill1-*Fit* ermöglicht eine vergleichbare Bestimmung des IC₅₀-Wertes hinaus über alle Messungen durch einfaches Ablesen an dem berechneten Wert, der auf der Kurve des Hill1-*Fits* bei 50 % relativer Bindung liegt. Derartige Bestimmungen des IC₅₀-Wertes werden auch von anderen Gruppen durchgeführt. Zhang et al. ermitteln mit Hilfe dieser Methode beispielsweise die Konzentration für 50 % Inhibierung einer Bibliothek verschiedener Glykokonjugate.^[176] Im Folgenden werden die Messergebnisse verschiedener Inhibitoren dargestellt und miteinander verglichen.

3.2.6 Studien zur Inhibierung von ConA durch verschiedene Mannosestrukturen

Die Präsentation verschieden-langer Glykopolymere auf unterschiedlichen Goldoberflächen ermöglicht neben einem Vergleich der Affinität von ConA zu den immobilisierten Glykopolymeren zusätzlich eine Untersuchung des Einflusses von Inhibitoren auf diese Lektin-Glykopolymer-Wechselwirkungen. Hierzu soll ConA vor Kontakt zur Oberfläche mit Inhibitoren unterschiedlicher Valenz und Größe inkubiert werden, um anschließend Bindung des inhibierten ConA an die Oberfläche zu detektieren. Durch eine Variation der Inhibitorkonzentration soll verglichen werden, wie sich Größe und Valenz der Inhibitoren auf dessen Inhibitionsverhalten auswirken. Durch den Versuchsaufbau kann außerdem untersucht werden, wie die Inhibierung der einzelnen Liganden von dem immobilisierten Glykopolymer auf der Oberfläche abhängt. Eine Übersicht der untersuchten Systeme wird in Abbildung 31 dargestellt.

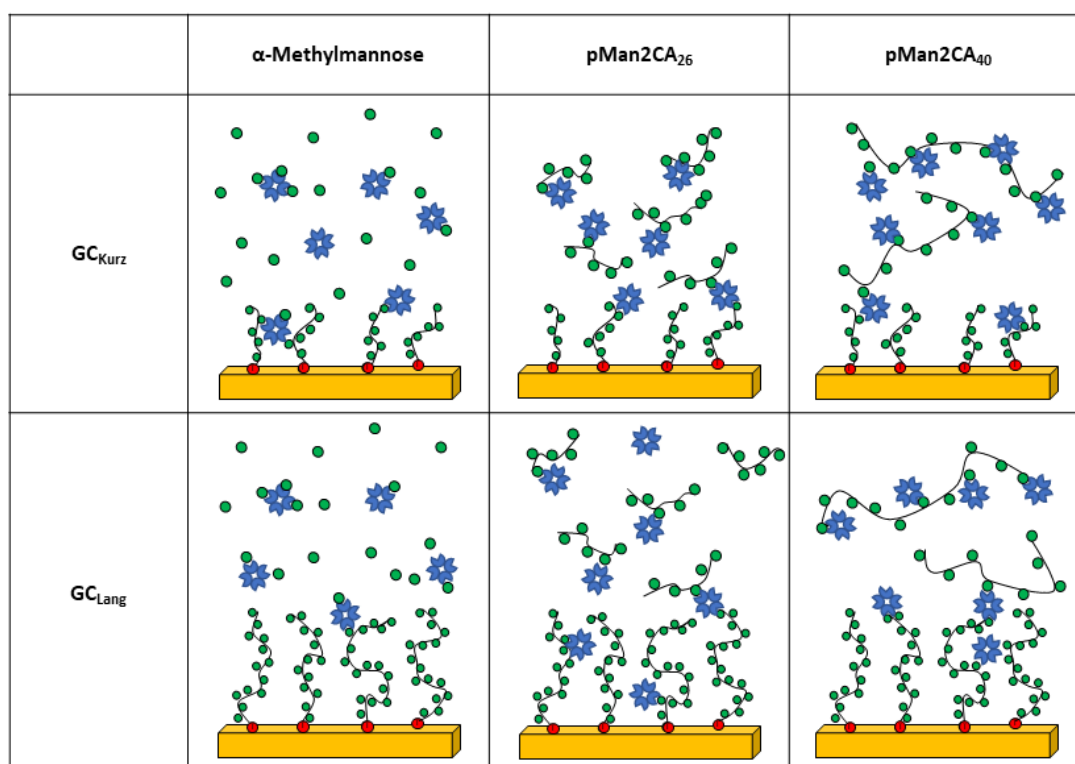


Abbildung 31: Übersicht der Inhibitions-Kompetitions-Messungen.

Auf beiden Goldoberflächen werden die Glykopolymere pMan2CA₂₆ und pMan2CA₄₀ als Inhibitoren eingesetzt. Monovalente α -Methylmannose wird als niedermolekulare Referenz ebenfalls auf beiden Oberflächen vermessen. Die Konzentration von ConA beträgt in jeder Messreihe konstant $1.17 \cdot 10^{-7}$ mmol/mL ($\cong 0.117$ μ M). Diese Konzentration wird gewählt, da sie der Konzentration entspricht, die in Kapitel 3.2.4 als K_d -Wert für ConA gegen GC_{Kurz} bestimmt wurde. Es zeigt sich, dass reproduzierbare Resultate in zwei Zyklen mit etwa sechs oder sieben verschiedenen Inhibitorkonzentrationen erhalten werden können. Dabei werden die Konzentrationen des Inhibitors um den Faktor drei variiert. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit wird zusätzlich eine der Konzentrationen wiederholt, die nahe am erwarteten IC₅₀-Wert liegt. Die genauen Parameter werden noch einmal ausführlich im Experimententeil aufgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit werden verschiedene Inhibitoren miteinander verglichen, die sich vor allem in Valenz, Molekülmasse und Molmassenverteilung unterscheiden. Es handelt sich um monovalente α -Methylmannose, die Mannosepolymere pMan2CA₂₆ und pMan2CA₄₀ mit jeweils 26 bzw. 40 Wiederholungseinheiten, lineare Glykooligomere und verzweigt Glykooligomere. Die Glykopolymere wurden wie im vorangegangenen Kapitel dieser Arbeit beschrieben synthetisiert und in Tabelle 8 werden die Inhibitoren zusammenfassend aufgelistet.

Tabelle 8: Übersicht der in den Inhibitions-Kompetitions-Studien eingesetzten Inhibitoren.

Substanz	Molekulargewicht	Valenz
α -Methylmannose	194.2 g/mol	1
pMan ₂₆	$\overline{M}_n = 7678$ g/mol	26.5 ^a
pMan ₄₀	$\overline{M}_n = 11490$ g/mol	40.2 ^a

^aBei den Glykopolymeren wird die mittlere Valenz angegeben. Sie wird berechnet, indem das jeweilige zahlenmittlere Molekulargewicht (ermittelt mittels Wasser-GPC) abzüglich der molaren Masse des CTA durch die Molmasse einer Wiederholungseinheit dividiert wurde.

In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse der jeweiligen Inhibitoren auf den beiden erzeugten Goldoberflächen GC_{Kurz} und GC_{Lang} dargestellt und anschließend miteinander verglichen.

3.2.6.1 Negativkontrolle mit pGal2CA₂₂ und pGal2CA₃₇

Vor der Durchführung der Inhibitions-Kompetitions-Assays mit verschiedenen Inhibitoren soll zunächst eine Negativkontrolle durchgeführt werden. Hierzu wird ConA mit einer Konzentration von 0.117 μM über die Flusszellen von GC_{Kurz} geleitet und die resultierenden RU werden detektiert. Anschließend erfolgt die Messung in derselben Konzentration in Anwesenheit der galaktosebasierten Glykopolymere mit pGal2CA₂₂ und pGal2CA₃₇. Diese Messungen werden in Abbildung 32 zusammengefasst.

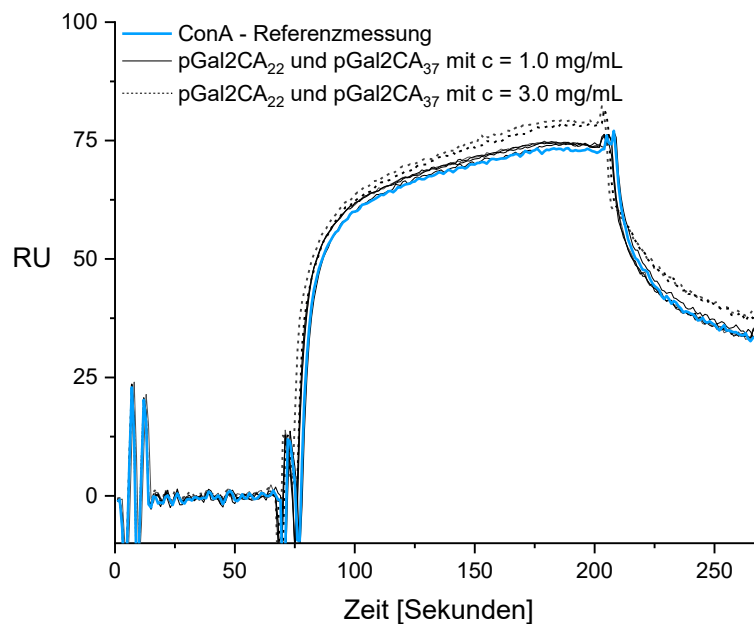


Abbildung 32: Sensorgramm von ConA in Anwesenheit von pGal2CA₂₂ und pGal2CA₃₇ gegen GC_{Kurz}.

In Abbildung 32 werden die Sensorgramme der Negativkontrollen dargestellt. Die blaue Kurve bildet dabei den Messzyklus ab, der nur mit ConA durchgeführt wurde. Die schwarze, durchgezogene Linie zeigt die Sensorgramme von pGal2CA₂₂ und pGal2CA₃₇ mit der Konzentration = 1.0 mg/mL, die schwarze, gestrichelte Linie bildet die Messungen von pGal2CA₂₂ und pGal2CA₄₀ mit einer Konzentration = 3.0 mg/mL ab.

Alle fünf Zyklen verlaufen ähnlich und erreichen annähernd dasselbe R_{max} im gleichen zeitlichen Verlauf. Die Tatsache, dass das detektierte R_{max} durch die Anwesenheit der hohen Konzentrationen an Glykopolymeren nicht unter dem R_{max} des Zyklus mit reinem ConA liegt, zeigt, dass potenziell gemessene Inhibierungen ausschließlich aufgrund des im Glykopolymer eingebauten Saccharids erfolgen. Es wird auch bei höheren Konzentrationen beider Galaktosepolymer lediglich die spezifische

Wechselwirkung von ConA in der Größenordnung detektiert, die auch bei reinem ConA zu beobachten ist.

Eine einzelne Art der Abweichung zwischen den einzelnen Messzyklen kann jedoch beobachtet werden. Die $R_{\max}$ der einzelnen Kurvenverläufe liegen bei reinem ConA und den Zyklen mit der Konzentration von $c = 1.0 \text{ mg/mL}$ auf demselben Niveau, während beide Messzyklen von pGal2CA₂₂ und pGal2CA₄₀ mit $c = 3.0 \text{ mg/mL}$ leicht über dem Niveau der anderen Zyklen liegen. Der Anstieg der detektierten RU ist wahrscheinlich auf die hohe Konzentration der Glykopolymere zurückzuführen. Der Brechungsindex einer Lösung ist von der Konzentration der darin gelösten Verbindungen abhängig. Ab einer gewissen Konzentration scheint in diesem Assay nicht nur der Brechungsindex detektiert zu werden, der durch Wechselwirkungen der Liganden mit den Oberflächen beeinflusst wird, sondern auch der Brechungsindex der in Lösung befindlichen Glykopolymere. Aus diesem Grund wird im Inhibitions-Kompetitionsassays mit den verschiedenen Liganden darauf geachtet, dass derartig hohe Konzentrationsbereiche bei der Inhibierung durch Glykopolymere möglichst vermieden werden.

3.2.6.2 Inhibierung von ConA durch α -Methylmannose

Vor der Durchführung von Inhibitions-Kompetitionsassays mit Glykopolymeren wird zur Referenz als monovalentes System α -Methylmannose als Inhibitor von ConA gegen GC_{Kurz} und GC_{Lang} gemessen (vgl. Abbildung 31, 1. Spalte). Insgesamt werden hierzu acht verschiedene Konzentrationen α -Methylmannose auf GC_{Kurz} angesetzt und sieben auf GC_{Lang}. Die Konzentrationsreihe auf GC_{Kurz} ging von 1.37 $\mu\text{g/mL}$ in Schritten mit Faktor drei bis hin zu 3.0 mg/mL, auf GC_{Lang} von 4.12 $\mu\text{g/mL}$ auf 3.0 mg/mL ebenfalls in Konzentrationsschritten mit Faktor drei. Die dazugehörigen Sensorgramme sind in Abbildung 33 dargestellt.

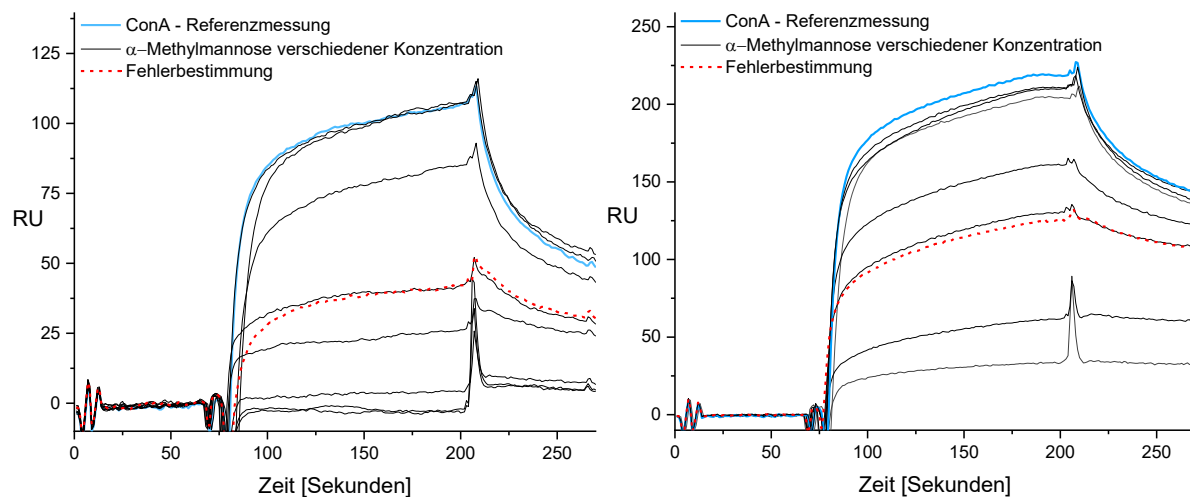


Abbildung 33: Sensorgramme von α -Methylmannose gegen GC_{Kurz} (links) und GC_{Lang} (rechts).

Die Sensorgramme in Abbildung 33 für die Inhibierung von ConA durch α -Methylmannose zeigen, anders als in der Negativkontrolle zu sehen (vgl. Abbildung 32), unterschiedliche Kurvenverläufe in Abhängigkeit von der jeweiligen Konzentration der α -Methylmannose. Die Zyklen, in denen eine geringe Konzentration des Inhibitors hinzugegeben wurde, weisen ein höheres R_{max} auf im Vergleich zu Zyklen mit hohen Inhibitorkonzentrationen. Dies zeigt eine erfolgreiche Inhibierung von ConA durch die hinzugefügte α -Methylmannose.

Auf GC_{Kurz} kann beobachtet werden, dass bei geringen Konzentrationen α -Methylmannose (1.37 $\mu\text{g/mL}$ und 4.12 $\mu\text{g/mL}$) die Bindung von ConA gegen die mannosylierte Oberfläche genauso stark ist, als wären keine Inhibitoren in der Lösung präsent. Ab einer Konzentration von 12.36 $\mu\text{g/mL}$ kann

eine einsetzende inhibierende Wirkung beobachtet werden bis zu einer Konzentration von 1,000.00 $\mu\text{g/mL}$. Ab einschließlich dieser Konzentration ist der gemessene $R_{\text{max}} = 0$, sodass dem Sensorgramm nach kein ConA an die Oberfläche bindet. Die Konzentration von 111.11 $\mu\text{g/mL}$ wird doppelt bestimmt, um den Fehler innerhalb eines Messzyklus einschätzen zu können.

Der Kurvenverlauf der Messungen auf GC_{Lang} ist vergleichbar mit dem, der auf GC_{Kurz} beobachtet werden kann. Auch bei dieser Messreihe erfolgt eine stärkere Inhibierung der Bindung von ConA gegen die Oberfläche je höher die Konzentration der hinzugegebenen α -Methylmannose ist. Das R_{max} der Zyklen mit geringer Konzentration ConA (4.12 $\mu\text{g/mL}$ – 37.03 $\mu\text{g/mL}$) erreichte in dem Beispielmesszyklus nicht dasselbe R_{max} wie es ConA ohne Inhibitor erreicht. Außerdem zeigen die Kurvenverläufe der Sensorgramme, dass durch Hinzugabe von α -Methylmannose keine vollständige Inhibierung bei einer α -Methylmannose-Konzentration = 1.0 mg/mL bzw. 3 mg/mL beobachtet werden kann. Die Inhibierungszyklen weisen im Fall mit $c = 1.0 \text{ mg/mL}$ ein $R_{\text{max}} = 61$ und im Zyklus mit $c = 3.0 \text{ mg/mL}$ ein $R_{\text{max}} = 33 \text{ RU}$ auf. Bei höheren Konzentrationen α -Methylmannose werden ähnliche Effekte wie bei zu hohen Glykopolymerkonzentrationen beobachtet (vergleiche Kapitel 3.2.6.1). Die detektierten RU nehmen zu, obwohl mehr Inhibitor die Wechselwirkung mit den pMan2CA₂₆ bzw. pMan2CA₄₀ auf der Oberfläche verhindern sollte. Aus diesem Grund müssen die Werte höherer Konzentration als 3.0 mg/mL verworfen werden. Stattdessen werden aus den Resultaten extrapolierte Werte im hohen Inhibitorkonzentrationsbereich eingesetzt, damit die resultierenden Hill1-Fits durchgeführt werden können.

Die Glykopolymere auf GC_{Lang} sind länger und weisen stärkere Wechselwirkungen mit ConA auf als die kürzeren Glykopolymere auf GC_{Kurz} . In Kapitel 3.2.4 wurde bei Direktbindungsstudien ein apparenter K_d -Wert von 1.02 μM für GC_{Kurz} und von 0.15 μM für GC_{Lang} bestimmt (vgl. Tabelle 7). Diese höhere Affinität von ConA gegen GC_{Lang} kann beobachtet werden, da bei ähnlichem Immobilisierungslevel ein deutlich höherer R_{max} bei Messzyklen mit ConA identischer Konzentration auf GC_{Lang} als auf GC_{Kurz} detektiert wird. Auf GC_{Lang} beträgt der R_{max} 217 RU und auf GC_{Kurz} 106 RU. Dies verdeutlicht, dass ConA eine höhere Affinität zu multivalenten Liganden aufweist, getrieben durch die damit verbundenen

multivalenten Effekte. Im Inhibitions-Kompetitionsassay spielen mehrere Effekte eine Rolle. Zum einen die bereits beschriebene Affinität von ConA zur jeweiligen Oberfläche, zum anderen die Affinität von ConA zum zuvor hinzugegebenen Inhibitor. Da die Hinzugabe des Inhibitors vor Kontakt mit der Oberfläche erfolgt und sich somit ein Gleichgewichtszustand ausbilden kann, spielt verstärkt die Dissoziation des Inhibitors von ConA eine Rolle. Im Fall von α -Methylmannose handelt es sich um ein monovalentes Molekül, daher wird die Inhibierung maßgeblich durch die Dissoziation einer Zuckereinheit von ConA und dessen Konzentration bestimmt. Im Falle der Glykopolymere beeinflussen weitere Faktoren, wie beispielsweise die Valenz oder die Molekülgröße, das inhibitorische Potenzial. Für α -Methylmannose kann daher davon ausgegangen werden, dass auf GC_{Kurz} die Hinzugabe von α -Methylmannose zu einer stärkeren Inhibierung führt, während auf GC_{Lang} eine vollständige Inhibierung schwieriger erreicht werden kann. Ein weiterer Vergleich kann mit der Bestimmung des IC₅₀-Werts mit Hilfe eines Hill1-Fits wie in *Extrapolierte Werte, da Konzentration der α -Methylmannose zu hoch.

Abbildung 34 dargestellt vollzogen werden.

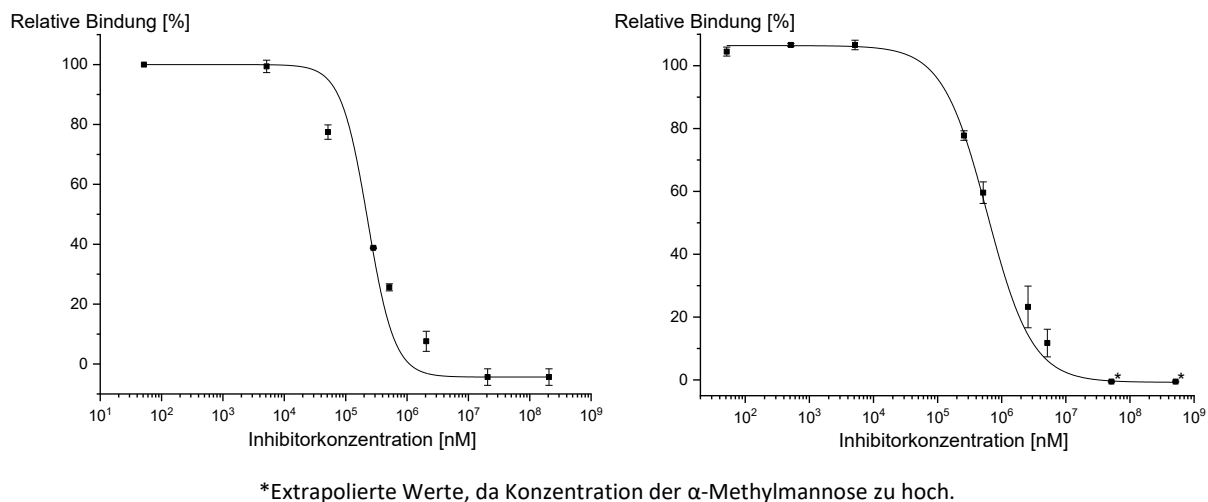


Abbildung 34: Auftragung der $R_{\max}$ von α -Methylmannose gegen die Konzentration des Inhibitors (logarithmisch skaliert), abgeleitet aus Abbildung 33 und IC₅₀-Fit der Messungen auf GC_{Kurz} (links) und GC_{Lang} (rechts).

In Abbildung 34 werden die $R_{\max}$ -Werte, die aus Abbildung 33 entnommen werden können, in Relation zum $R_{\max}$ des jeweiligen Messzyklus mit reinem ConA gesetzt („relative Bindung“) und gegen die entsprechende Konzentration α -Methylmannose aufgetragen. Der linke Graph zeigt die Werte, die auf

GC_{kurz} determiniert wurden, und rechts werden die Werte auf GC_{lang} abgebildet. Die in den jeweiligen Graphen abgebildete schwarze Linie ist der dazugehörige *Hill1-Fit*. Die Messreihe, die auf GC_{lang} gemessen wurden, wird um zwei extrapolierte Werte ergänzt. Diese theoretisch eingesetzten Messpunkte ersetzen die Konzentrationen, bei denen eine vollständigen Inhibierung zu erwarten gewesen wäre, welche jedoch aufgrund der zuvor geschilderten Konzentrationsproblematik nicht bestimmt werden konnten. Sie sind mit einem Stern markiert und repräsentieren 9 mg/mL bzw. 27 mg/mL bei einer erwarteten relativen Inhibierung von 100 %.

Für beide Goldchips kann nun durch Ablesen ein IC_{50} -Wert bestimmt werden. Der determinierte IC_{50} -Wert auf GC_{kurz} beträgt $219 (\pm 19) \mu M$ und der auf GC_{lang} $650 (\pm 21)$. Das bedeutet, dass zur 50 %-igen Inhibierung von ConA auf dem Goldchip mit den längeren immobilisierten Glykopolymeren eine fast 3-fach höhere Konzentration α -Methylmannose benötigt wird als auf GC_{kurz} . Die berechneten IC_{50} -Werte stützen die Hypothese, dass eine Inhibierung von ConA gegen längere immobilisierte Glykopolymere mit Hilfe von α -Methylmannose schwieriger erfolgt. In der Literatur lassen sich nur schwer ähnliche Versuchsanordnungen finden, die verschieden-funktionalisierte Oberflächen miteinander vergleichen. Ponader et al. bestimmen zum Beispiel mittels SPR einen ähnlichen IC_{50} -Wert von $750 \mu M$ für α -Methylmannose mit einer vergleichbaren Konzentration ConA [100 nM] und einem ähnlichen mannosylierten Glykopolymer auf der Chipoberfläche.^[81]

Aus den Ergebnissen der Inhibierungs-Kompetitionsstudien von α -Methylmannose leitet sich die Frage ab, inwiefern größere und sterisch anspruchsvollere Strukturen ähnliche Tendenzen zur Inhibierung aufweisen. Im Folgenden werden pMan2CA₂₆ und pMan2CA₄₀ als Inhibitoren im gleichen Versuchsaufbau eingesetzt.

3.2.6.3 Inhibierung von ConA durch pMan2CA₂₆

In diesem Kapitel wird das Inhibitions-Kompetitionsassay mit pMan₂₆ als Inhibitor gegen GC_{Kurz} und GC_{Lang} durchgeführt (vgl. Abbildung 31, 2. Spalte). In diesen Messzyklen wird die Konzentration in Schritten des Faktors drei variiert, angefangen von 3 mg/mL bis hin zu 1.37 µg/mL. Abbildung 35 zeigt die Sensorgramme dieser Zyklen auf GC_{Kurz} und GC_{Lang}.

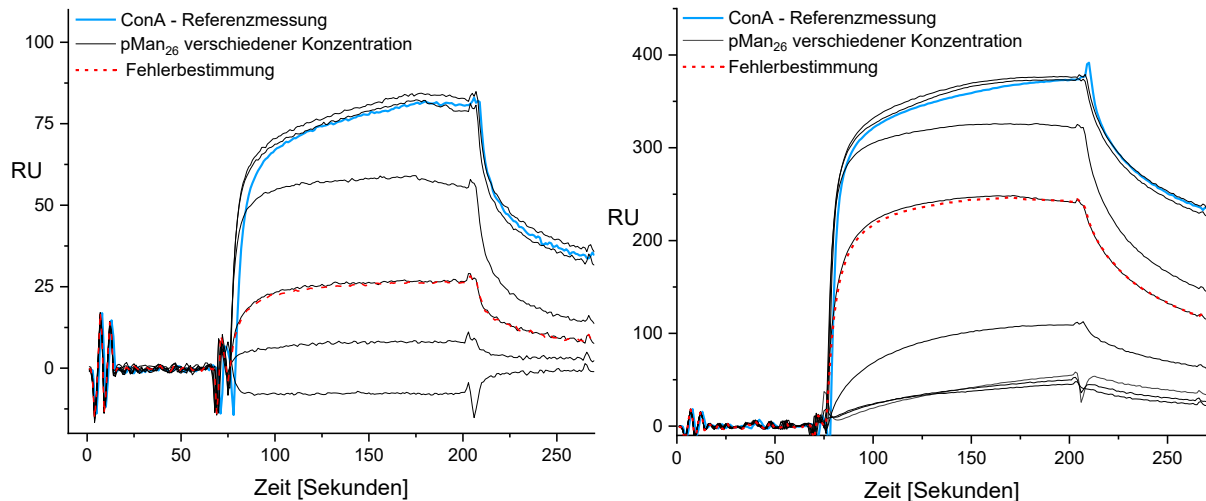
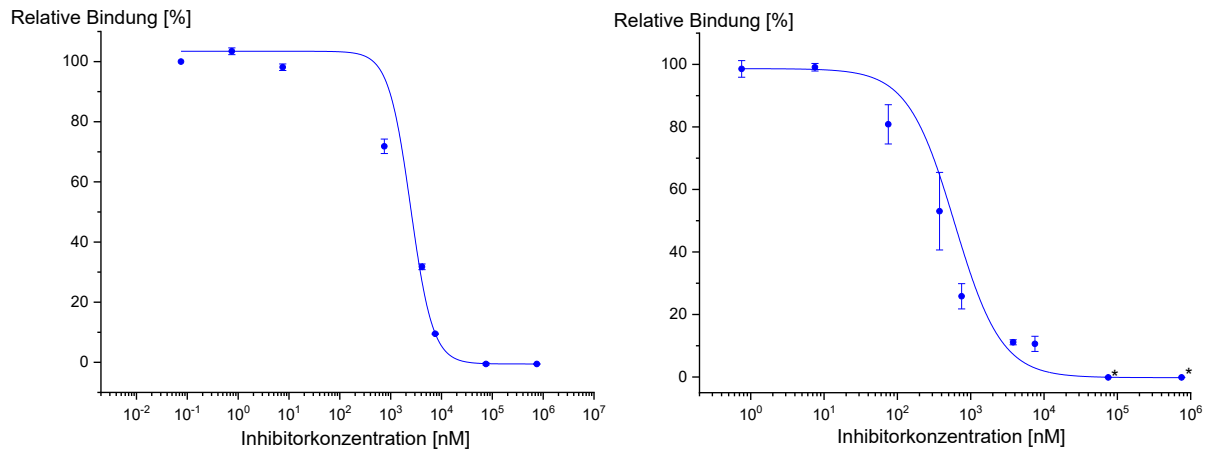


Abbildung 35: Sensorgramme der Inhibierung von ConA durch pMan₂₆ gegen GC_{Kurz} (links) und GC_{Lang} (rechts).

Das Sensorgramm der Inhibierung von GC_{Kurz} dargestellt in Abbildung 35 verläuft ähnlich dem von α -Methylmannose (vgl. Abbildung 33). Die Messzyklen mit der geringeren Konzentration pMan2CA₂₆ zeigen keine Inhibierung, während höhere Konzentrationen zu einem flacheren Kurvenverlauf führen und diese somit einen niedrigeren $R_{\max}$ aufweisen. Auffällig ist, dass die höchste Konzentration von pMan2CA₂₆ einen negativen $R_{\max}$ aufweist. Diese Beobachtung wurde bereits im vorherigen Kapitel beschrieben und sie beruht höchstwahrscheinlich auf Konzentrationseffekte ausgehend von den Glykopolymeren.

Bei dem Inhibierungssensorgramm auf GC_{Lang} kann ein ähnlicher Verlauf beobachtet werden. Die Messzyklen mit geringer Konzentration pMan2CA₂₆ zeigen kaum bis keine inhibierende Wirkung, während höhere Konzentrationen zu einer Reduktion des $R_{\max}$ führen. Die Reduktion des $R_{\max}$ erreicht jedoch – ebenfalls wie bei der Inhibierung von GC_{Lang} durch α -Methylmannose – keine vollständige Inhibierung, es wird lediglich ein $R_{\max} = 45$ erreicht.



*Extrapolierte Werte, da Konzentration von pMan2CA₂₆ zu hoch.

Abbildung 36: Auftragung der $R_{\max}$ von pMan₂₆ gegen die Konzentration des Inhibitors (logarithmisch skaliert) abgeleitet aus Abbildung 35 und IC_{50} -Fit der Messungen auf GC_{Kurz} (links) und GC_{Lang} (rechts).

Die in Abbildung 36 dargestellten IC_{50} -Kurven werden mit einem Hill1-Fit aus den $R_{\max}$ berechnet, die in den Sensorgrammen aus Abbildung 35 determiniert werden können. Dabei wird der jeweilige $R_{\max}$ gegen die Konzentration pMan2CA₂₆ gemessen, die als Inhibitor dem jeweiligen Messzyklus hinzugefügt wird. Der ermittelte IC_{50} -Wert für GC_{Lang} beträgt $0.59 (\pm 0.05) \mu\text{M}$ pro Molekül und $15.6 (\pm 1.2) \mu\text{M}$ pro Zuckereinheit.

Die IC_{50} -Werte pro Zucker wurden berechnet, indem der ermittelte molare IC_{50} -Wert mit der zuvor berechneten durchschnittlichen Wiederholungseinheit des Polymers multipliziert wird. Dies erlaubt einen Vergleich der Inhibierungsstärke verschiedener Inhibitoren, da die relative Zuckerdichte im Vergleich der Inhibitoren berücksichtigt wird. Erfolgt keine Berücksichtigung der relativen Zuckeranteile, können die IC_{50} -Werte nicht miteinander verglichen werden, da ansonsten die Inhibierende Wirkung von Liganden mit mehreren Zuckern pro Molekül relativ gesehen überbewertet wird.

Ein Vergleich der inhibierenden Wirkung von pMan2CA₂₆ auf GC_{Kurz} mit $67.4 (\pm 5.2) \mu\text{M}$ pro Zuckereinheit gegen GC_{Lang} mit $15.6 (\pm 1.2) \mu\text{M}$ zeigt, dass pMan2CA₂₆ ConA auf GC_{Lang} eine vierfach niedrigere Konzentration zur 50 %-igen Inhibierung benötigt als auf GC_{Kurz}. Verglichen mit α -Methylmannose - mit einem IC_{50} -Wert von $219 (\pm 19) \mu\text{M}$ auf GC_{Kurz} und $650 (\pm 21) \mu\text{M}$ auf GC_{Lang} - zeigt sich bei diesem Glykopolymer mit 26 Wiederholungseinheiten, dass dessen inhibierende Wirkung

deutlich erhöht ist. Dieses Resultat entspricht den Erwartungen, da ein Glykopolymer mit durchschnittlich 26 Wiederholungseinheiten multivalente Wechselwirkungen mit dem tetravalenten Lektin ConA eingehen kann. So kann eine Polymerkette gleichzeitig an mehrere ConA-Tetramere binden und so dessen Bindung an die glykosylierte Oberfläche leichter inhibieren als dies ein monovalenter Ligand kann. Neben der Valenz spielt die Molekülgröße ebenfalls eine Rolle, da ein höheres Molekulargewicht eine höhere sterische Abschirmung der Lektine von anderen Bindungspartnern wie den oberflächengebundenen Glykopolymeren zur Folge haben kann. Gestwicki et al. vergleichen in ihrer Publikation verschiedene Liganden, die sich in Valenz, Molekulargewicht und Struktur voneinander unterscheiden.^[44] Neben monovalenten Liganden verglich die Gruppe mannosylierte Dendrimere, sequenzdefinierte Oligomere und sowohl gering-disperse Glykopolymere als auch Glykopolymere mit einer breiten Molmassenverteilung hinsichtlich der Affinität zu ConA. Die Glykostrukturen wurden in verschiedenen Assays miteinander verglichen, die Aufschluss über ihr Aggregationsverhalten mit ConA geben können. Es wurden jeweils ein quantitatives Fällungsassay, ein Trübungsassay und ein Fluoreszenzauslöschungsassay durchgeführt. Die Beobachtungen der Inhibitions-Kompetitionsstudie im Rahmen dieser Arbeit decken sich mit den Ergebnissen der Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe, da Gestwicki et al. bei größeren Glykostrukturen eine bessere Inhibierung von ConA beobachten können als bei kleineren mannosylierten Strukturen. Dort ist darüber hinaus eine Abnahme der Inhibierung pro Mannoseeinheit bei den größten Strukturen zu beobachten.

Eine unerwartete Beobachtung ist der niedrigere IC_{50} -Wert von pMan2CA₂₆ gegen GC_{Lang} als der gegen GC_{Kurz} ermittelte. Das bedeutet, dass die von pMan2CA₂₆ gemessene Inhibierung der Bindung von ConA gegen die glykosylierten Goldoberfläche mit kurzem Glykopolymer weniger effektiv ist als die gegen die GC_{Lang}. Diese Beobachtung ist vor allem aus zwei Gründen bemerkenswert. Einerseits wird im vorherigen Kapitel 3.2.6.2 beobachtet, dass dieser Trend der IC_{50} -Werte bei monovalenter α -Methylmannose genau umgekehrt ist: die Inhibierung von ConA durch α -Methylmannose erfolgt effektiver gegen GC_{Kurz} als gegen GC_{Lang}. Andererseits zeigt ein Vergleich der Affinitäten von ConA gegen

die Goldoberflächen in Kapitel 3.2.4, dass ConA in etwa um den Faktor 7 stärker an GC_{Lang} bindet als an GC_{Kurz} (vgl. Tabelle 7). Dadurch sollte eine Inhibierung von ConA, unabhängig vom jeweiligen Inhibitor, auf GC_{Kurz} leichter erfolgen als auf GC_{Lang} . Im folgenden Kapitel soll daher die Inhibierung von ConA durch $pMan2CA_{40}$ gegen GC_{Kurz} und GC_{Lang} miteinander verglichen werden, um zu untersuchen, ob dort ein ähnlicher Trend beobachtet werden kann.

3.2.6.4 Inhibierung von ConA durch $pMan2CA_{40}$

In diesem Kapitel wird der Inhibitions-Kompetitionsassay von $pMan2CA_{40}$ gegen GC_{Kurz} und GC_{Lang} beschrieben. Die höchste gemessene Konzentration beträgt in diesem Versuchsaufbau 3.0 mg/mL während die geringste Konzentration 1.37 $\mu\text{g/mL}$ beträgt. Abbildung 37 zeigt das jeweilige Sensorgramm von $pMan2CA_{40}$ auf GC_{Kurz} (links) und GC_{Lang} (rechts).

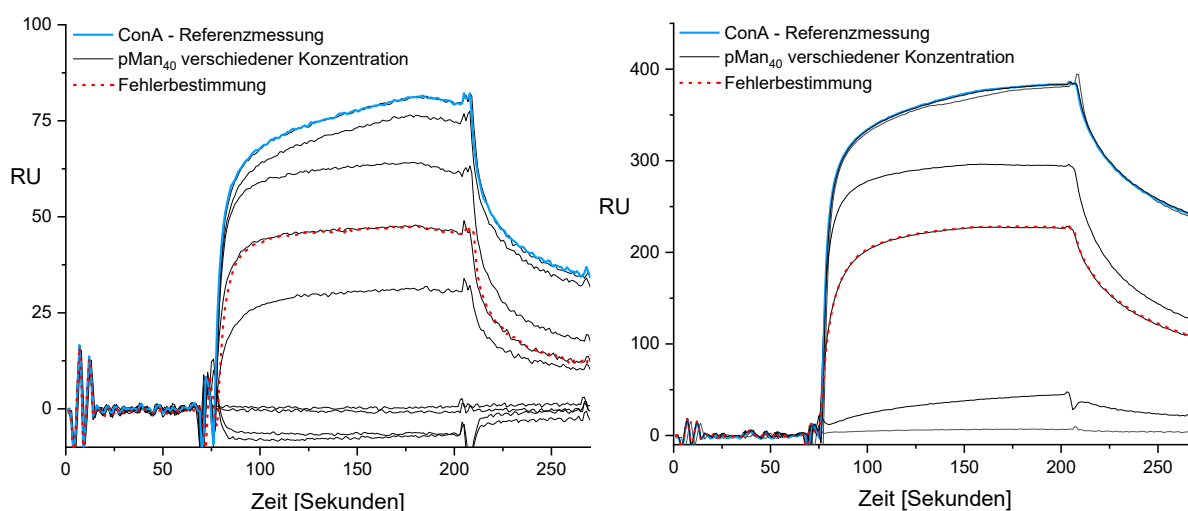


Abbildung 37: Sensorgramme der Inhibierung von ConA durch $pMan2CA_{40}$ gegen GC_{Kurz} (links) und GC_{Lang} (rechts).

In Abbildung 37 werden die jeweiligen Sensorgramme der Inhibierung von GC_{Kurz} (links) und GC_{Lang} (rechts) einander gegenübergestellt. Die Inhibierung von ConA durch $pMan2CA_{40}$ gegen GC_{Kurz} verläuft ähnlich zu den bisherigen Inhibierungen durch α -Methylmannose und $pMan2CA_{26}$. Bei geringen Konzentrationen von $pMan2CA_{40}$ (1.37 – 12.36 $\mu\text{g/mL}$) ist eine äußerst geringe Abnahme der detektierten RU am R_{max} zu beobachten. Bei den höheren Konzentrationen des Glykopolymers kann eine hohe (111.11 $\mu\text{g/mL}$) bzw. eine vollständige Abnahme (333 $\mu\text{g/mL}$) der RU beobachtet werden.

Wie bereits beschrieben können bei hohen Konzentrationen (1.0 mg/mL bzw. 3.0 mg/mL) gegen GC_{Kurz} Messzyklen mit negativen Verläufen und somit einem negativen $R_{\max}$ beobachtet werden.

Das observierbare inhibitorische Verhalten von pMan₄₀ gegen GC_{Lang} verläuft ähnlich. Auch in diesen Messzyklen weisen die geringen Konzentrationen von pMan2CA₄₀ keine bis kaum sichtbare Reduktionen der detektieren RU auf, während bei steigenden Konzentrationen die $R_{\max}$ abnehmen. Zu erwähnen ist, dass gegen GC_{Lang} lediglich pMan₄₀ eine vollständige Inhibierung von ConA erreicht. Das Glykopolymer mit 40 Wiederholungseinheiten inhibiert folglich in diesem Konzentrationsbereich und auf dieser Oberfläche effektiver als pMan2CA₂₆ und α -Methylmannose. Daraus folgt, dass in diesem Assay und unter diesen Bedingungen Valenz bzw. Länge einen Einfluss auf die Inhibierungsfähigkeit der untersuchten Glykopolymere haben. Interessanterweise zeigt sich bei Betrachtung der IC₅₀-Kurven in Abbildung 38 ein differenzierteres Bild.

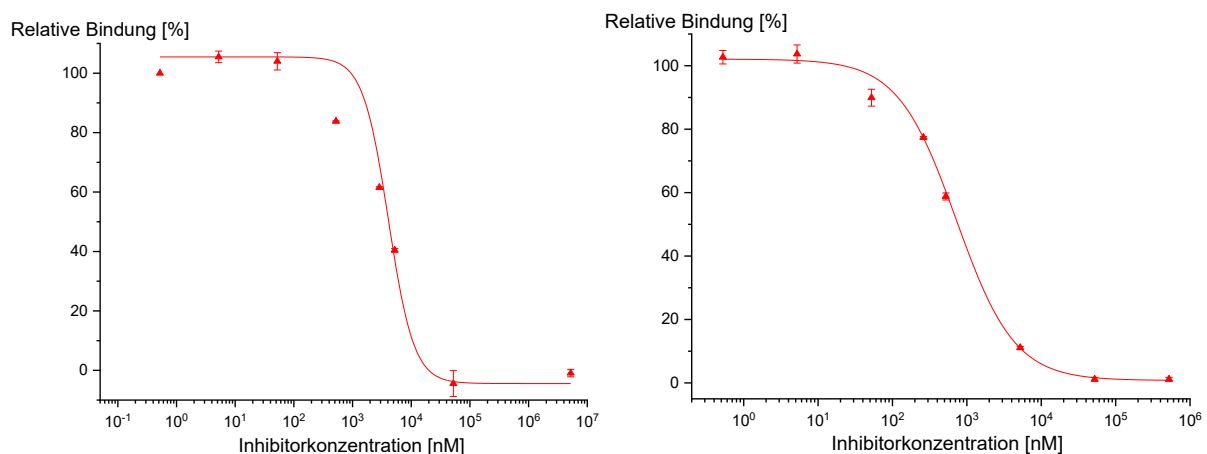


Abbildung 38: Auftragung der $R_{\max}$ von pMan2CA₄₀ gegen die Inhibitorkonzentration (logarithmisch skaliert) abgeleitet aus Abbildung 37 und IC₅₀-Fit der Messungen auf GC_{Kurz} (links) und GC_{Lang} (rechts).

In Abbildung 38 werden die IC₅₀-Kurven von pMan₄₀ gegen GC_{Kurz} und GC_{Lang} abgebildet. Im Gegensatz zu den bisherigen Inhibierungsstudien inhibiert pMan2CA₄₀ auf beiden präparierten Oberflächen die Bindung von ConA vollständig. Der Kurvenverlauf auf GC_{Kurz} ist steiler und der IC₅₀-Wert liegt bei 4.1 (± 0.29) μ M, während auf GC_{Lang} ein Wert von 0.76 (± 0.02) μ M ermittelt werden konnte. Multipliziert mit der Valenz ergibt sich ein IC₅₀-Wert von 166 (± 12) μ M pro Mannoseeinheit auf GC_{Kurz} und ein IC₅₀-Wert von 30.5 (± 1.8) μ M auf GC_{Lang}. Daraus folgt, dass pMan2CA₄₀ auf dem Goldchip mit dem längeren

Glykopolymer effektiver ConA inhibiert als auf dem Goldchip mit kürzerem Glykopolymer. Eine ähnliche Beobachtung wird bei der Inhibierung der Goldoberflächen mit dem kürzeren Glykopolymer pMan₂CA₂₆ getätigt, auch dieses Polymer inhibiert ConA besser gegen GC_{Lang} als gegen GC_{Kurz} (vgl. Kapitel 2.3.6.3). Dies ist besonders interessant, da in Direktbindungsassays ohne Inhibitor die Affinität von ConA gegenüber GC_{Lang} größer ist als gegen GC_{Kurz}. Dies deutet darauf hin, dass bei Wechselwirkungen zwischen immobilisierten Glykopolymeren und Glykopolymeren in Lösung mit Lektinen andere Parameter eine Rolle spielen könnten. Die auf der Goldoberfläche immobilisierten Glykopolymere sind auf einer Seite verankert. Dadurch könnte die Zugänglichkeit einiger Saccharideinheiten für ConA beeinträchtigt sein, da ConA mit 104 – 117 kDa ein großes Molekül ist. Je größer das Glykopolymer und je dicker die Schicht, desto mehr Saccharideinheiten könnten für derartig große Moleküle zugänglich sein. Ohne Anwesenheit von Inhibitoren in der Lösung könnten diese unzugänglichen Saccharide durch statistische Rückbindungen zugänglich werden, was eine höhere Affinität von ConA gegenüber GC_{Lang} im Vergleich zu GC_{Kurz} erklären könnte. Diese Rückbindung wird möglicherweise durch die Anwesenheit multivalenter Inhibitoren gestört, denn die solvatisierten Glykopolymere sind möglicherweise für ConA leichter zugänglich. Kanai et al. konnten in Hemmagglutinierungsassays einen ähnlichen Effekt beobachten. Sie zeigten mit Hilfe von Glykopolymeren unterschiedlicher Kettenlänge, dass die Inhibierung zunächst überproportional zu der Valenz der Glykopolymere steigt.^[47] Ab einer sehr hohen Valenz wird jedoch ein Plateau erreicht, bei dem zusätzliche Wiederholungseinheiten die Inhibierung nicht verstärken.

3.2.7 Zusammenfassung der Inhibitions-Kompetitionsstudien

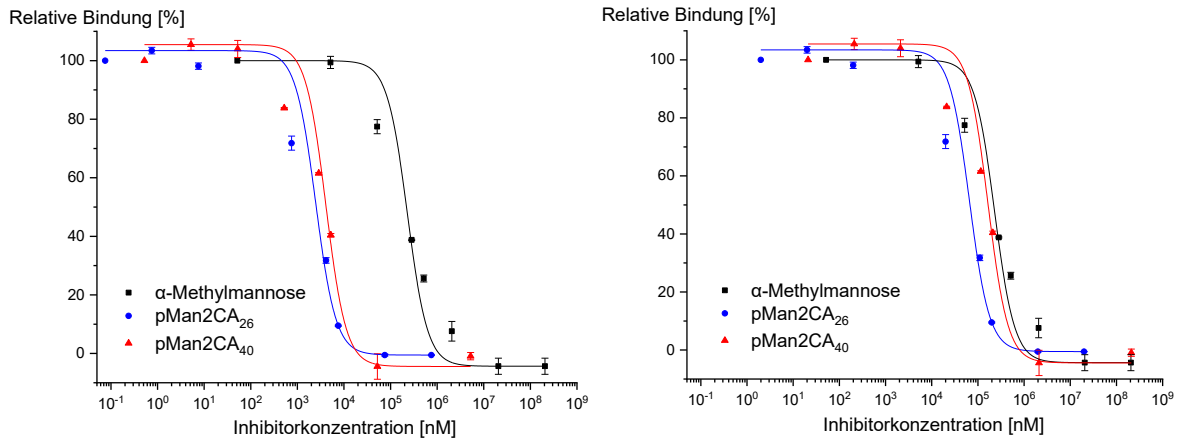
In den Kapiteln 3.2.6.2 – 3.2.6.4 wurden verschiedene Inhibitoren mit einer identischen Konzentration über zwei Goldchips mit unterschiedlich-langen Glykopolymeren geleitet. Auf GC_{Kurz} wurde zuvor ein mannosyliertes Glykopolymer mit ca. 26 Wiederholungseinheiten und auf GC_{Lang} eines mit etwa 40 Wiederholungseinheiten immobilisiert. Als Inhibitoren wurden zwei monovalente Moleküle, α -Methylmannose sowie zwei mannosehaltige Glykopolymere mit 26 bzw. 40 Wiederholungseinheiten miteinander verglichen. Tabelle 9 zeigt die Zusammenfassung der gesamten erhobenen IC₅₀-Werte.

Tabelle 9: Übersicht der ermittelten IC₅₀-Werte.

	IC ₅₀ -Werte auf GC _{Kurz}		IC ₅₀ -Werte auf GC _{Lang}	
	μmolar	Pro Zuckereinheit [μM]	μmolar^a	Pro Zuckereinheit [μM]
α -Methylmannose	219 (± 19) ^a	219 (± 19) ^a	650 (± 21) ^a	650 (± 21) ^a
pMan ₂₆	2.5 (± 0.20) ^a	67.4 (± 5.2) ^a	0.59 (± 0.05) ^a	15.6 (± 1.2) ^a
pMan ₄₀	4.1 (± 0.29) ^a	166 (± 12) ^a	0.76 (± 0.02) ^a	30.5 (± 1.8) ^a

^aStandardabweichung, berechnet aus den Residuen der gefitteten Werte zum Hill1-Fit

In Tabelle 9 ist zu sehen, dass die Glykopolymere ConA effektiver gegen das längere immobilisierte Glykopolymer auf GC_{Lang} inhibieren als gegen das kürzere auf GC_{Kurz}. So kann bei pMan₂₆ ein IC₅₀-Wert von 2.5 (± 0.20) μM gegen GC_{Kurz} und gegen GC_{Lang} einer von 0.59 (± 0.05) μM beobachtet werden. pMan₄₀ hingegen weist IC₅₀-Werte von 4.1 (± 0.29) μM gegen GC_{Kurz} und 0.76 (± 0.02) μM gegen GC_{Lang} auf. Damit inhibieren beide Glykopolymere auf beiden Goldchips besser als α -Methylmannose. Dieser Inhibitor verfügt über einen IC₅₀ = 219 (± 19) μM auf GC_{Kurz} und einen IC₅₀-Wert auf GC_{Lang} von 650 (± 21) μM . Da es sich bei pMan₂₆ und pMan₄₀ um höhervalente Moleküle handelt, kann ebenfalls ein IC₅₀-Wert pro Zucker angegeben werden, indem der ermittelte Wert mit der Valenz multipliziert wird. Auf diese Weise können Moleküle mit unterschiedlicher Valenz hinsichtlich der Effektivität der einzelnen Zuckerliganden verglichen werden.

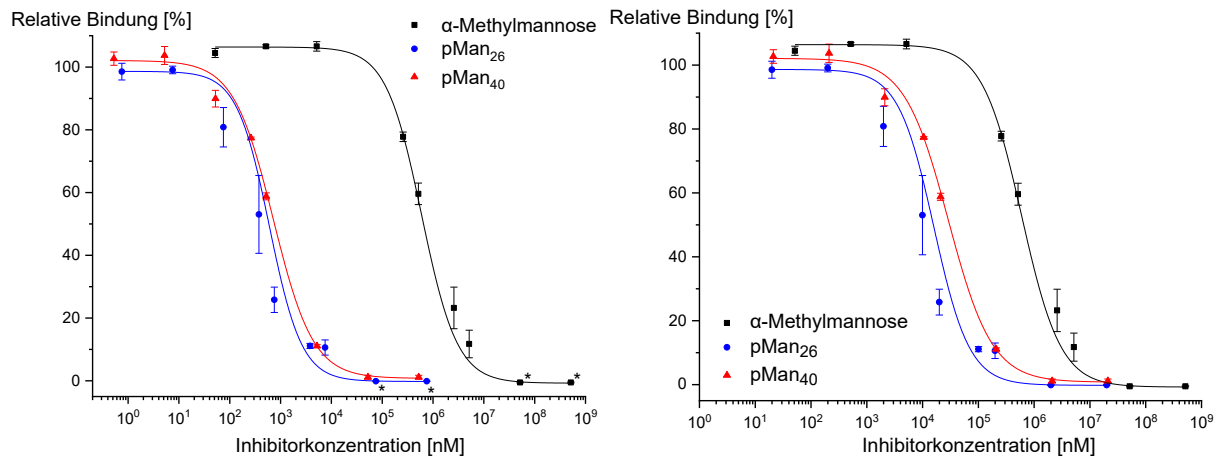


*Extrapolierte Werte, da Konzentration der α -Methylmannose zu hoch.

Abbildung 39: Hill1-Fits der verschiedenen Inhibitoren der Messungen auf GC_{Kurz} - molar (links) und pro Zuckereinheit (rechts) (aufgetragen gegen die jeweilige logarithmische Konzentration).

In Abbildung 39 werden die molaren IC₅₀-Werte (links) den IC₅₀-Werten pro Zuckerwiederholungseinheit bzw. Valenz (rechts) gegenübergestellt. Durch Normierung auf die Kohlenhydrat-Wiederholungseinheiten verschieben sich die Hill1-Kurven in Richtung des Fits der α -Methylmannose. Dabei nähert sich die rote Kurve von pMan2CA₄₀ stärker an als die blaue Kurve des Polymers pMan2CA₂₆. Die relative Inhibition pro Zucker ist gegen GC_{Kurz} bei pMan2CA₂₆ am ausgeprägtesten, während pMan2CA₄₀ ähnlich gut inhibiert wie das monovalente Molekül. Ein ähnlicher Effekt kann ebenfalls auf GC_{Lang} beobachtet werden (vergleiche *Extrapolierte Werte, da Konzentration der pMan26 zu hoch).

Abbildung 40). Im Vergleich der molaren Konzentration inhibieren pMan2CA₂₆ und pMan2CA₄₀ in der gleichen Größenordnung und damit deutlich stärker als α -Methylmannose. Werden die Kurven um die tatsächlich präsentierten Zuckerliganden bereinigt, inhibieren beide Glykopolymere dennoch deutlich stärker ConA gegen GC_{Lang} als α -Methylmannose.



*Extrapolierte Werte, da Konzentration der pMan₂₆ zu hoch.

Abbildung 40: Hill1-Fits der verschiedenen Inhibitoren gegen GC_{Lang} - molar (links) und pro Zuckereinheit (rechts) (aufgetragen gegen die jeweilige logarithmische Konzentration).

Im Vergleich der Glykopolymere kann in *Extrapolierte Werte, da Konzentration der pMan₂₆ zu hoch.

Abbildung 40 ein ähnlicher Trend auf GC_{Lang} beobachtet werden wie auf GC_{Kurz}. Das Glykopolymer pMan₂₆ inhibiert normiert auf die Anzahl der Zucker besser als das Polymer mit 40 Wiederholungseinheiten.

Bezogen auf die Frage, inwiefern sich das Inhibitionsverhalten der verschieden-langen Glykopolymere gegen die gleichen Glykopolymere auf den Goldoberflächen in Anwesenheit von ConA verhält, ergibt sich das folgende Gesamtbild: Während im Direktbindungsassay ConA eine höhere Affinität gegen die Oberfläche mit längerem Glykopolymer pMan2CA₄₀ als gegen die Oberfläche mit pMan2CA₂₆ aufweist, gibt es bei den Inhibitoren keinen eindeutigen Trend. Monovalente α-Methylmannose inhibiert ConA mit einem IC₅₀-Wert von 219 (±19) μM besser als gegen GC_{Kurz} mit IC₅₀ = 650 (±21) μM. Es wird auf GC_{Kurz} also ca. dreimal weniger α-Methylmannose benötigt, um die gleiche Konzentration ConA zu inhibieren als dies auf GC_{Lang} der Fall ist. In den Inhibitions-Kompetitionsstudien mit den Glykopolymeren ist dies genau andersherum. Die Inhibitoren pMan2CA₂₆ und pMan2CA₄₀ weisen mit 2.5 (±0.20) μM (pMan2CA₂₆) bzw. 4.1 (±0.29) μM (pMan2CA₄₀) geringere IC₅₀-Werte gegen GC_{Lang} auf als gegen GC_{Kurz}. Mit IC₅₀-Werten von 0.59 (±0.05) μM (pMan2CA₂₆) und 0.76 (±0.02) μM (pMan2CA₄₀) sind diese gegen GC_{Lang} ca. um den Faktor 5 kleiner. Dies bedeutet, dass auf GC_{Lang} eine um diesen

Faktor geringere Glykopolymerkonzentration zur 50 %-igen Inhibierung des ConA ausreicht als zur Inhibierung des ConA gegen GC_{kurz}.

Zusätzlich wurde der IC₅₀-Wert pro Zuckereinheit berechnet, da so ein Vergleich der Effektivität einer Zuckereinheit möglich ist. Dies ist in Tabelle 9 dargestellt. Aus diesen Werten kann der Schluss gezogen werden, dass die Inhibitoren auf unterschiedliche Weise mit ConA wechselwirken – je nachdem, ob sie mono- oder multivalent sind. In allen Inhibitions-Kompetitionsstudien wird der Inhibitor einige Zeit vor Kontakt mit der Oberfläche zum ConA hinzugegeben. In dieser Zeit kann der Inhibitor mit ConA nichtkovalente Bindungen ausbilden. Im Vergleich zu den Glykopolymeren ist α -Methylmannose ein kleines und monovalentes Molekül. Daher ist die Bindung mit ConA schwächer ausgeprägt und ebenfalls nicht sterisch abgeschirmt. Die Glykopolymere hingegen können mehrfach mit einem oder mehreren ConA-Tetrameren wechselwirken und schirmen das gebundene ConA von möglichen anderen Wechselwirkungspartnern ab. Dies erklärt die Beobachtung, dass höhere Konzentrationen der α -Methylmannose verwendet werden müssen, um ConA gegen die Glykopolymere auf den Goldoberflächen abzuschirmen. Im Vergleich der Inhibierung von ConA durch die Glykopolymere auf beiden Oberflächen fällt auf, dass die ermittelten IC₅₀-Werte auf GC_{Lang} geringer sind als die von GC_{kurz}. Das bedeutet, dass ConA von den Glykopolymeren besser gegen die langen Mannosepolymere auf der Goldoberfläche abgeschirmt werden kann als gegen die kurzen. Die gleichzeitig beobachtete unvollständige Inhibierung gegen GC_{Lang} erscheint zunächst widersprüchlich, jedoch finden sich in der Literatur Erklärungsansätze.

Die Gruppe und Lazar et al. untersucht ebenfalls die Bindung zweier Pflanzenlektine (*Griffonia simplicifolia* und *Erythrina cristagalli*) an zwei oberflächengebundene Glykopolymere verschiedener Länge, basierend auf den mit diesen Lektinen bindenden Zuckern *N*-Acetylglucosamine bzw. *N*-Acetyllactosamin, mittels elektrochemischer Impedanzspektroskopie.^[173] Die Gruppe beobachtet ein unterschiedliches Bindungsverhalten der Lektine abhängig von der Länge der immobilisierten Glykopolymere und führt dieses auf die sich aus der Länge der Glykopolymere unterscheidende Topologie zurück. Dabei wird eine unterschiedliche Zugänglichkeit der Lektine an exponierte bzw.

äußere Kohlenhydrateinheiten beobachtet, während die inneren Kohlenhydrateinheiten für die Lektine weniger zugänglich sind. Dies erfolgt durch Bestimmung der K_d -Werte der Bindung der Lektine an der jeweiligen Art der Kohlenhydrateinheiten („Innere Zone“ im Vergleich zur „äußeren Zone“).^[173] Lazar et al. zeigen, dass die Zugänglichkeit der inneren Kohlenhydrateinheiten der längeren Glykopolymeren geringer ist als die der kürzeren Glykopolymeren, welche sie mit einer aufgrund der Polymergröße reduzierten Zugänglichkeit begründen.

Unterschiedliche Bindungszonen liefern eine mögliche Erklärung für das zuvor beschriebene und anscheinend widersprüchliche Inhibierungsverhalten der Glykopolymeren. Während die geringeren IC_{50} -Werte der Glykopolymeren gegen GC_{Lang} im Vergleich zu GC_{Kurz} eine bessere „Gesamtinhibierung“ vermuten lassen, könnte die unvollständige Inhibierbarkeit auf GC_{Lang} durch die Glykopolymeren auf eine ebenfalls unterscheidbare Zugänglichkeit der Mannoseeinheiten auf dieser Oberfläche für ConA hindeuten. Eine nicht-vollständige Inhibierung könnte in diesem Fall bedeuten, dass Glykopolymeren zwar eine Bindung an alle Zuckereinheiten gegen GC_{Lang} besser inhibieren. Kommt es jedoch zu einer Bindung weniger exponierter Kohlenhydrateinheiten, so könnte die reduzierte Zugänglichkeit auch für den Inhibitor bedeuten, dass die im Inneren gebundenen Lektine schwerer inhibiert werden können.

Da der mittels SPR determinierte k_d -Wert nicht zwischen verschiedenen Zonen unterscheiden kann, ist es leider nicht möglich, diese Hypothese im Rahmen dieser Arbeit zu untersuchen. Weiterführende Arbeiten könnten mit Hilfe anderer analytischer Methoden, bspw. der elektrochemischen Impedanzspektroskopie, diese Hypothese untersuchen.

3.3 Glykopolymer-funktionalisierte Partikel und Bakterienassays

In Kapitel 1.4.1 dieser Arbeit werden verschiedene Arten glykosylierter Nanopartikel vorgestellt. Ein besonders breites potenzielles Anwendungsspektrum weisen vor allem mannosylierte Nanostrukturen auf. In der Literatur konnten einige Typen Nanostrukturen bereits zur photodynamischen Therapie^[177-180], in der Gentherapie^[181, 182], Immuntherapie^[183, 184] und Tumortargeting^[185, 186] eingesetzt werden, nur um einige Beispiele zu benennen. In wenigen Studien wurden bisher Verbindungen mit Janusstruktur hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität verglichen, also solche Strukturen, die zwei unterschiedlich funktionalisierte Seiten besitzen. Percec et al. untersuchten z.B. das Bindungsverhalten von janusartigen Dendrimeren, die aufgrund der Molekülsyntheseroute zwei Dendrimerzweige unterschiedlicher Polarität aufweisen und so selbstassemblierende Glykodendrimeren ausbilden. Die auf diese Weise erzeugten Dendrimere enthielten Lactoseeinheiten und Lactose, die mit Methoxytriethoxyleinheiten geschützt wurde.^[187] Unterschiedliche Dendrimere mit variierenden Einbauverhältnissen dieser Bausteine wurden auf ihre Affinität hin zu Lektinen untersucht. Dabei konnte die Gruppe zeigen, dass die Affinität der Dendrimere zu den untersuchten Lektinen von diesen Einbauverhältnissen abhing und die Stärke der Bindung der Dendrimere mit Lektinen kontrolliert werden konnte.

Eine direkte Anwendung anderer Janusstrukturen konnte bisher nicht gezeigt werden. Die Synthese glykosylierter Januspartikel wurde bisher von Kaufmann et al. gezeigt.^[188] Mittels eines Mikrokontaktdruckverfahrens können poröse Partikel mit Kohlenhydraten funktionalisiert werden, eine Anwendung wird in den Arbeiten dieser Gruppe jedoch nicht beschrieben. Die in Kapitel 1.4.2 vorgestellten Januspartikel auf Silikabasis sind bisher nicht mit mannosylierten Strukturen funktionalisiert und untersucht worden und stellen aufgrund ihrer einzigartigen physikalischen Eigenschaften ein interessantes Trägermedium dar. Daher sollen im Rahmen dieser Arbeit mannosylierte Januspartikel synthetisiert und charakterisiert sowie hinsichtlich ihrer biologischen Relevanz untersucht werden. Es wird erwartet, dass Januspartikel andere Eigenschaften bei der

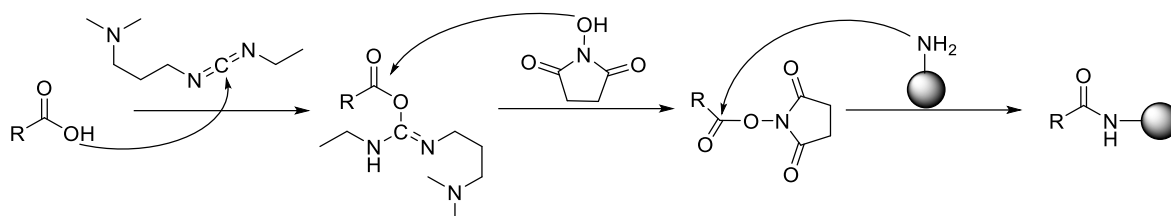
Inhibierung biologischer Systeme aufweisen als korrespondierende Partikel mit einer vollständigen Funktionalisierung.

3.3.1 Vortests zur Bestimmung der Funktionalisierungsstrategie

Die Funktionalisierung der Amin-präsentierenden Partikel orientiert sich an der Literatur und erfolgt in Kooperation mit Claudia Marschelke aus der Gruppe von Alla Synytska am Leibniz-Institut für Polymerforschung in Dresden.^[120, 128, 189, 190] Die Januspartikel wurden von Claudia Marschelke ausgehend aus 3-Aminopropyltriethoxysilan (APS) synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Sie präsentieren auf der einen Seite freie Amine und auf der anderen Seite Poly-*N*-Isopropylacrylamid (Poly(NIPAm)) bzw. Poly-Ethylenglycol (PEG). Die Glykopolymere dargestellt in Tabelle 4 in Kapitel 3.1.2 [pMan2CA₁₈, pMan2CA₃₇, pMan2CA₄₃, pGal2CA₂₄, pGal2CA₃₇ und pGal2CA₁₀₁] sollen durch Reaktion terminaler Carboxygruppen mit den freien Aminen des APS an die Partikel angebunden werden. Es soll daher zunächst ein optimiertes Kupplungsprotokoll mit Hilfe von vollständig funktionalisierten APS-Partikeln etabliert werden. Diese Partikel dienen in späteren Bindungsstudien als Vergleichsstrukturen.

Neben den anvisierten Glykopolymeren stellen auch glykosylierte Oligoamidoamine eine interessante Struktur zur Funktionalisierung von Januspartikeln dar. Aus diesem Grund erfolgte zunächst eine erste Untersuchung der Kupplung des Modellmoleküls EDS (Ethylenedioxy-bis(ethylamin)succinid) als Modellmolekül für eventuelle Funktionalisierungen mit Glykooligoaminen neben Kupplungen mit Mannosepolymeren. Bei EDS handelt es sich um einen etablierten Baustein der Gruppe von Prof. Dr. Hartmann, welcher über eine terminale Carboxygruppe verfügt und einen wichtigen Bestandteil vieler Oligomere darstellt.^[81, 191] Es wurden drei verschiedene Kupplungsmethoden miteinander verglichen: 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) unter nachfolgender Hinzugabe von *N*-Hydroxysuccinimid (NHS), 4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methyl-morpholiniumchlorid (DMTMM) sowie Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat (PyBOP) unter nachfolgender Hinzugabe von Diisopropylethylamin (DIPEA). Die Verschiedenen Kupplungsreagenzien sollen hinsichtlich ihres Funktionalisierungserfolges der Amin-präsentierenden Partikel untersucht und

miteinander verglichen werden. Dabei funktionieren sie nach dem gleichen Prinzip. Die jeweiligen Kupplungsreagenzien aktivieren die Carbonsäure, indem diese in einem oder mehreren Schritten eine gute Abgangsgruppe bilden und das Amin leichter einen nucleophilen Angriff unter Ausbildung eines Amids durchführt. Dies ist exemplarisch für EDC/NHS in Schema 6 dargestellt.



Schema 6: Kupplungsmechanismus mit Hilfe von EDC und NHS.

Zur Vergleichbarkeit des Kupplungserfolgs wurden identische Mengen APS-Partikel, EDS bzw. Glykopolymer und Kupplungsreagenzien verwendet. Anschließend wurden die jeweiligen Zetapotentiale der erhaltenen Partikel gemessen und mit den unfunktionalisierten Partikeln verglichen.

Die thermale Umsetzung erfolgt gemäß dem Protokoll der Gruppe um Kirillova.^[117, 133, 137, 192] Die Glykopolymere werden mit jeweils 20 mg APS-Partikeln, in MilliQ-Wasser gelöst und das Wasser wird unter vermindertem Druck entfernt. Die Partikel werden daraufhin über Nacht im Vakuumtrockenschrank getrocknet und anschließend analog zur EDC/NHS-Umsetzung aufgereinigt (vgl. Kapitel 5.4.1).

In Tabelle 10 werden Zetapotential und pH-Wert des isoelektrischen Punktes der verschiedenen Funktionalisierungsmethoden miteinander verglichen und in Relation zu den APS-Partikeln ohne Funktionalisierungsschritt gesetzt. Zur Einschätzung des Kupplungserfolgs ist das Zetapotential eine wichtige Größe, denn die Reaktion von Aminen zu Amiden sorgt für eine Verringerung der positiven Ladung in der äußersten Partikelschicht und somit für ein kleineres bzw. negatives Zetapotential. Daher kann davon ausgegangen werden, dass alle drei Kupplungsmethoden zum gewünschten

Ergebnis führen. Alle Kupplungen wurden in MilliQ-Wasser vorgenommen unter den gleichen Bedingungen umgesetzt, wie sie in Kapitel 5.4.1 für EDC/NHS beschrieben werden.

Tabelle 10: Vergleich der verschiedenen Kupplungsmethoden auf APS-Partikeln mittels Bestimmung des Zetapotentials und des isoelektrischen Punkts zur Einschätzung des Funktionalisierungserfolgs.

Substanz	Kupplungs- methode	Zetapotential [mV] ^b	Zetapotential pH 7 [mV] ^b	pHIEP ^c
– ^a	–	24.4 ± 0.2	28.7	8.16
EDC	EDC/NHS	-5.4 ± 0.1	–	5.74
EDC	DMTMM	-6.5 ± 0.2	–	5.56
EDC	PyBOP/DIPEA	5.2 ± 0.3	–	5.63
pMan2CA ₄₃	EDC/NHS	31.9 ± 0.3	1.7	7.06
pGal2CA ₂₄	EDC/NHS	17.8 ± 0.6	-1.6	6.90
pMan2CA ₁₆	EDC/NHS	12.9 ± 0.5	-7.8	6.66
pMan2CA ₄₃	DMTMM	27.0 ± 0.7	4.8	7.26
pMan2CA ₂₅	PyBOP/DIPEA	24.2 ± 0.8	3.0	7.17
pMan2CA ₃₈	Thermisch	14.8 ± 0.2	-4.8	6.81
pMan2CA ₂₆	Thermisch	16.0 ± 0.8	-2.3	6.95

^aAPS-Partikel ohne Kupplungsreaktion zur Referenz, ^bGemessen in 1 mM KCl, ^cBestimmt durch pH-Titration

Bei den Funktionalisierungen von EDS zeigen sich in den Zetapotentialen bei EDC/NHS und DMTMM geringfügige Unterschiede, während PyBOP/DIPEA ein um ca. 10 mV höheres Zetapotential als die anderen beiden Funktionalisierungsvarianten aufweist. Die Ansatzreihe der mannosylierten Glykopolymere zeigt eine ähnliche Tendenz, jedoch ist die Funktionalisierung mit DMTMM ebenfalls weniger effektiv als eine EDC/NHS-Funktionalisierung oder die thermische Variante. Die höchste Differenz zu den unfunktionalisierten Referenzpartikeln mit einem Zetapotential von 28 mV weist beispielsweise der Ansatz von pGal2CA₁₆ mittels EDC/NHS-Funktionalisierung mit einem Zetapontenzial von -7.8 mV auf. Die Funktionalisierung von pMan2CA₄₃ mit DMTMM war hingegen mit

4.3 mV um fast 12 mV höher. Da sowohl die thermische Umsetzung als auch die EDC/NHS-Funktionalisierung die höchste Reduktion des Zetapotentials herbeiführen, wird im Folgenden untersucht, welche Funktionalisierungsbedingung zur Partikelfunktionalisierung mit Glykopolymeren besser geeignet ist.

In einem zweiten Schritt wird daher die EDC/NHS-Kupplung mit der thermisch-initiierten *grafting-to* Variante verglichen. Anschließend werden die Zetapotentiale der funktionalisierten Partikel gemessen.

Tabelle 11 fasst die Ergebnisse zusammen.

Tabelle 11: Optimierung der APS-Partikelfunktionalisierung.

Partikel	Glykopolymer	$\bar{M}_w$ [g/mol]	Menge Glykopolymer [mg]	Kupplungs- methode	Δ Zetapotentiale [mV] ^a
APS	-	-	0.0	-	46.7
APS	pGal2CA ₂₄	6,900	43.6	Thermisch	-18.3
APS	pMan2CA ₃₇	10,520	25.1	Thermisch	-23.8
APS	pGal2CA ₂₄	6,900	40.0	EDC/NHS	-8.0
APS	pGal2CA ₁₇	4,870	42.6	EDC/NHS	-49.2
APS	pGal2CA ₄₅	12,900	25.3	EDC/NHS	-10.6
APS	pGal2CA ₁₀₁	28,400	27.3	EDC/NHS	-13.1

^aGemessen in wässriger 1 mM KCl-Lösung

In

Tabelle 11 werden die verschiedenen Funktionalisierungsvarianten verschieden-langer Glykopolymere der Differenz zum Zetapotentiale der unfunktionalisierten APS-Partikel gegenübergestellt. Zusätzlich wurde als Referenz ein Batch pGal2CA₁₀₁ unter den Kupplungsbedingungen eingesetzt, welcher frei-radikalisch, also ohne RAFT-Reagenz, umgesetzt wurde und somit über keine terminalen Carboxygruppen verfügt.

Insgesamt kann der Trend beobachtet werden, dass die EDC/NHS-Funktionalisierung erfolgreicher ist, je kürzer die verwendeten Glykopolymere sind. So ist das Zeta-Potenzial von pGal2CA₁₇ mit

4,870 g/mol um 49.2 mV verringert im Vergleich zu pGal2CA₄₆ mit einer Masse von 12,880 g/mol und einer Differenz von 10.6 mV. Bei den thermisch funktionalisierten Glykopolymeren ist der Trend umgekehrt. So ist das Zetapotential des längeren pMan2CA₃₆ mit 10,500 g/mol bei einem $\Delta mV = -23.8$ stärker reduziert worden als das kürzere Glykopolymer pMan2CA₂₅ mit 6,900 g/mol und einem $\Delta mV = 18.3$. Aufgrund dieser Vorstudien werden verschiedene Partikel für Wechselwirkungsstudien mit Bakterien synthetisiert und analysiert. Die Referenzprobe mit pGal2CA₁₀₁ zeigt jedoch, dass neben dem Zetapotential ein weiteres Kriterium zum Messen des Funktionalisierungserfolgs heranzuziehen ist. Denn auch ohne Glykopolymere mit terminalen Carboxygruppen wird durch die Funktionalisierungsreaktion ein Zetapotential von -13.1 mV erreicht. Aus diesem Grund werden in nachfolgenden Funktionalisierungsbestimmungen auch die Mengen an Zucker sowie Amine determiniert, die auf den Partikeln ermittelt werden können, um einen Vergleich des Funktionalisierungserfolgs zu ermöglichen.

3.3.2 Funktionalisierung und Charakterisierung der Partikel

Ziel der Bakterienstudien ist ein Vergleich der Aggregate, die sich als Resultat der Wechselwirkungen zwischen glykosylierten Partikeln *E. Coli* Bakterien ausbilden, welche spezifisch an Mannose binden. Dafür werden zwei Typen von Partikeln synthetisiert und miteinander verglichen: vollständig glykosylierte APS-Partikel und halbseitig glykosylierte Januspartikel. Die jeweils anderen Kugelhälften der Januspartikel sind mit Poly(PEGMA) bzw. Poly(NIPAm) funktionalisiert. Die Glykosylierung der Partikel erfolgt entsprechend der Resultate aus Kapitel 3.3.1: Partikel, die mit längeren Glykopolymeren funktionalisiert werden sollen, werden über die thermische Variante funktionalisiert. Kürzere Glykopolymere werden hingegen mittels EDC/NHS-Chemie funktionalisiert. Die Ausgangspartikel werden von Claudia Marschelke gemäß den literaturbekannten Syntheserouten synthetisiert und zur Verfügung gestellt.^[120, 190, 193]

Zur Synthese der Partikel erfolgt zunächst wie in der Literatur beschrieben eine Physisorption der Silika-Partikel mit APS.^[120, 190, 193] Die erhaltenen APS-Partikel werden anschließend mittels dem von Hong et al. beschriebenen „*Pickering-Emulsion*-Verfahren“ halbseitig mit einem Wachs benetzt, sodass eine Kugelhälfte für chemische Reaktionen zugänglich ist.^[124] Auf diese Weise werden mittels eines *Grafting-to*-Ansatzes Poly(NIPAm) bzw. Poly(PEGMA) auf die mit dem Wachs unbenetzte Seite der APS-Partikel aufgebracht unter Ausbildung von Amidbindungen. Nach Entfernen des Wachses können die verbliebenen Amine mit Carboxy-terminierten Glykopolymeren umgesetzt werden. Zur Überprüfung des Syntheseerfolgs werden die auf diese Weise erzeugten Partikel mit Hilfe eines Rasterelektronenmikroskop (REM) betrachtet (die Abbildungen sind in Kapitel 6.8 im Anhang dargestellt). Aufgrund der halbseitigen Funktionalisierung der Partikel bilden diese teilweise kleine Aggregate, deren Polymermatrizen ineinander verzahnt sind. Dies kann vor allem in der Aufnahme der mit Poly(PEGMA) beobachtet werden (Anhang, Abbildung 32) – die beobachtbaren Unebenheiten auf den Partikeln bilden kleine Brücken zu den anderen vizinalen Partikeln.

Die so erhaltenen Partikel werden anschließend mit den zuvor synthetisierten Glykopolymeren funktionalisiert, welche in Tabelle 12 dargestellt werden. Die Umsetzung der erfolgt mit den zuvor ermittelten effektiven Funktionalisierungsbedingungen, also thermisch für die längeren Glykopolymere pGal2CA₃₇ und pMan2CA₃₇ und via EDC/NHS beim kürzeren pMan2CA₁₈ Glykopolymer wie in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 12: Verwendete Glykopolymere zur Partikelfunktionalisierung.

Polymer	$\bar{M}_n^a$	Wiederholungseinheiten	$\bar{M}_w/\bar{M}_n^a$
pGal2CA ₃₇	10,600	36.9	1.07
pMan2CA ₃₇	10,500	36.7	1.03
pMan2CA ₁₈	5,300	17.8	1.09

^aMit Hilfe von Gelpermeationschromatographie ermittelt.

Zur Bestimmung des Erfolgs der Synthese wird das Zetapotential der Partikel bestimmt. Zur kolorimetrischen Quantifizierung des Funktionalisierungsgrads werden die Partikel zusätzlich einem Kaisertest zur Bestimmung der Rest-Amine sowie einem Zuckernachweis mittels Phenol-Schwefelsäuremethode unterzogen. Eine Übersicht der Ergebnisse ist in Tabelle 13 dargestellt. Dies erlaubt einen Vergleich des Funktionalisierungserfolgs der unterschiedlichen Ansätze. Die Messungen des Zetapotentials der Partikel deuten darauf hin, dass eine Funktionalisierung in jedem Fall stattgefunden hat. Im Vergleich zeigt sich eine erhöhte Restaminkonzentration auf den APS-Partikeln [Man₁₈-APS, Man₃₇-APS und Gal₃₇-APS] von 11 - 34 %. Im Zuckernachweis zeigt sich jedoch eine unterschiedliche und inhomogene Qualität der Funktionalisierung. Die Zuckerkonzentration schwankt stark von 5.2 % bei Man₁₈-APS bis zu 24.6 % bei Man₃₇-APS. Außerdem ist die ermittelte Zuckerkonzentration der halbseitig mit NIPAm funktionalisierten APS-Partikel im negativen Bereich.

Tabelle 13: Übersicht der synthetisierten Partikel unter Angabe der jeweils funktionalisierten Glykopolymere und den Indikatoren für den Erfolg dieser Funktionalisierungen: Zetapotential, Zuckerkonzentration und Restamingehalt.

Bezeichnung	Funktionalisierter Partikeltyp	Immobilisiertes Polymer	Methode	Zetapotential [mV] ^a	Zuckerkonzentration [μM] ^b	Restamingehalt [%] ^c
APS (Blank)	APS	-	-	46.7	0 (± 14.14 %)	100 (± 0.38 %)
Man ₁₈ -APS	APS	pMan2CA ₁₈	EDC/NHS	19.9	5.2 (± 5.4 %)	34 (± 0.27 %)
Man ₁₈ -JPEG	Janus-PEG	pMan2CA ₁₈	EDC/NHS	3.2	11.9 (± 2.9 %)	13 (± 0.41 %)
Man ₁₈ -JNIPAm	Janus-NIPAm	pMan2CA ₁₈	EDC/NHS	14.4	- ^c	9 (± 0.77 %)
Man ₃₇ -APS	APS	pMan2CA ₃₇	Thermisch	11.9	24.6 (± 0.2 %)	26 (± 5.6 %)
Man ₃₇ -JPEG	Janus-PEG	pMan2CA ₃₇	Thermisch	-3.5	6.8 (± 7.2 %)	2 (± 40.9 %)
Man ₃₇ -JNIPAm	Janus-NIPAm	pMan2CA ₃₇	Thermisch	-7.1	- ^c	Zu wenig Umsatz
Gal ₃₇ -APS	APS	pGal2CA ₃₇	Thermisch	14.0	11.3 (± 9 %)	30 (± 0.46 %)
Gal ₃₇ -JPEG	Janus-PEG	pGal2CA ₃₇	Thermisch	-9.1	2.3 (± 5.18 %)	8 (± 1.22 %)
Gal ₃₇ -JNIPAm	Janus-NIPAm	pGal2CA ₃₇	Thermisch	-5.5	- ^c	8 (± 1.66 %)
NIPAm only	APS	pNIPAm			-13.43 (± 5.3 %)	-

^aGemessen bei pH = 7.0, ^bMittels Phenol-Schwefelsäuremethode determiniert, ^cErmittelt via Kaisertest

Diese Beobachtungen lassen sich durch die unterschiedliche Länge der Glykopolymere erklären, da sich auf der gleichen Partikeloberfläche mehrere Zucker bei einem längeren Glykopolymer befinden können. Dies ist auf die Messmethode zurückzuführen, denn bei der Bestimmung der Zuckerkonzentration via Phenol-Schwefelsäuremethode wird mittels UV/VIS-Spektroskopie von der gemessenen Intensität eine Referenzprobe abgezogen, die unfunktionalisierte APS-Partikel enthält. Im Vergleich zu dieser Referenz absorbieren die NIPAm-präsentierenden Partikel weniger Licht der

detektierten Wellenlänge und liefern daher ein negatives Ergebnis. Dies liegt wahrscheinlich an der Absorption des Poly-NIPAm, welches im Bereich um 500 nm ein lokales Maximum in der Absorption aufweist, wie beispielsweise von Li et al. gezeigt.^[194] Die Phenol-Schwefelsäure-Methode untersucht die Absorption eines gebildeten Moleküls bei 490 nm, sodass die Anwesenheit des Poly-NIPAm an dieser Stelle zu verzerrten Ergebnissen führt. Da von diesem Effekt auch bei Januspartikeln auszugehen ist, werden die Ergebnisse der Zuckerbestimmung von diesen Partikeln verworfen und lediglich Zetapotentialbestimmung bzw. Kaisertest zur Einschätzung des Syntheserfolgs herangezogen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse aus Tabelle 13, dass die jeweiligen Funktionalisierungen erfolgreich waren, auch wenn nicht bei allen Partikelansätzen eine vollständige Umsetzung aller Amine erfolgte. Die Auswirkungen der restlichen Amine müssen daher in der Interpretation nachfolgender Ergebnisse berücksichtigt werden, falls es zu unerwarteten Abweichungen kommt.

3.3.3 Interaktionsstudien mit *E. Coli*

Die synthetisierten Partikel eignen sich aufgrund der Präsentation von Kohlenhydraten für Interaktionsstudien mit Bakterien. Als Bakterium eignet sich *Escherichia Coli* (*E. Coli*), das mit Hilfe seiner haarähnlichen Proteinanhänge auf der äußeren Zellmembran, Fimbrien oder Pili genannt, Lektine präsentiert, die selektiv an α -D-Mannopyranosideinheiten binden und keine Wechselwirkungen mit Galaktose zeigen.^[148, 195]

Im Rahmen dieser Arbeit wird ein Stamm *Escherichia Coli* (pKL1162) eingesetzt, welcher *green fluorescent protein* (GFP) im Inneren der Zellen exprimiert und somit in Fluoreszenzanwendungen detektiert werden kann. Aufgrund der multivalenten Präsentation der α -D-Mannopyranosideinheiten auf den (Janus-)Partikeln wird eine hohe Affinität von *E. Coli* zu diesen Partikeln erwartet. Da auf den Januspartikeln lediglich eine halbseitige Präsentation der Glykopolymere erfolgt, wird ein anderes Aggregationsverhalten im Vergleich zu vollständig-funktionalisierten Partikeln vermutet.

Interaktionen zwischen *E. Coli* und Januspartikeln sind unter Umständen durch das Aggregationsverhalten der Partikel in verschiedenen wässrigen Medien limitiert. Zur Untersuchung der

kolloidalen Stabilität werden die unterschiedlichen Partikel in MilliQ-Wasser und in LBB-Puffer dispergiert. Eine Detektion der Partikelgröße zeigt, dass die funktionalisierten Partikel und die APS-Partikel in LBB bereits nach wenigen Sekunden zu starken Aggregationen neigen. In MilliQ-Wasser zeigt sich jedoch eine kolloidale Stabilität, die über drei Tage anhält (vergleiche Kapitel 5.4.3). Somit können Inhibitionsstudien von Partikeln in diesem Medium mit *E. Coli* durchgeführt werden, welche diesen kurzen Zeitraum ohne Nährmedium bei konstanter Affinität zu mannosylierten Strukturen überstehen können. Ziel ist es, Wechselwirkungen der „klassischen“ glykosylierten APS-Partikel mit neuartigen glykosylierten Januspartikeln zu vergleichen. Zum Nachweis und zur Quantifizierung der Wechselwirkungen der Bakterien mit den Partikeln wird ein quantitatives Fällungsassay gewählt. Hierzu werden, wie in Abbildung 41 schematisch dargestellt, die Partikel zusammen mit Bakterien in einem Gefäß vorgelegt. Die Trübung der Bakterien-Partikel-Lösung wird über Zeit nachverfolgt, wodurch auf Sedimentation geschlossen werden kann. Je stärker die Wechselwirkung der Bakterien mit den Partikeln, desto schneller wird aufgrund der erwarteten Größe der gebildeten Cluster eine Abnahme der Trübung erwartet.

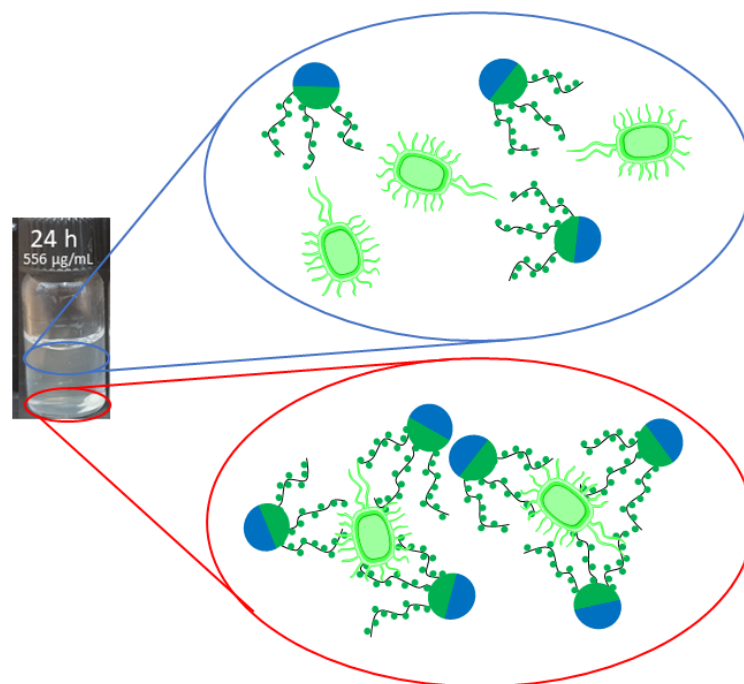


Abbildung 41: Schematische Darstellung des Trübungsassays.

In diesem Versuchsaufbau müssen von dem Partikel-Bakterien-Gemisch zusätzlich zwei unterschiedliche Negativkontrollen vermessen werden. Eine Negativkontrolle wird mit Partikeln durchgeführt, die ausschließlich mit Poly(NIPAm) funktionalisiert sind, um ein eventuell beobachtbares Aggregationsverhalten der Januspartikel durch Poly(NIPAm) hervorgerufenen Wechselwirkungen der Partikel auszuschließen. Eine weitere Negativkontrolle wird durch Verwendung von galaktosylierten Partikeln eingesetzt, da *E. Coli* nicht mit Galaktose wechselwirkt. Beide Negativkontrollen dienen somit der Verifizierung der Detektion von spezifischen Wechselwirkungen. Insgesamt werden fünf verschiedene Partikeltypen vermessen, davon zwei Januspartikel und drei vollständig funktionalisierte APS-Partikel. Die Januspartikel sind, wie in Abbildung 42 schematisch dargestellt, jeweils halbseitig mit Galaktose bzw. Mannose funktionalisierte Partikel, deren andere Hälften Poly(NIPAm) präsentieren. Zur Gegenprobe werden ebenfalls Partikel vermessen, die diese Polymere auf der gesamten Partikeloberfläche präsentieren. Für das vollständig mannosylierte System Man₃₇-APS wird demnach die stärkste Aggregatbildung erwartet, während das halbseitig-mannosylierte System Man₃₇-JNIPAm eine kontrollierte Aggregatbildung aufweisen sollten.

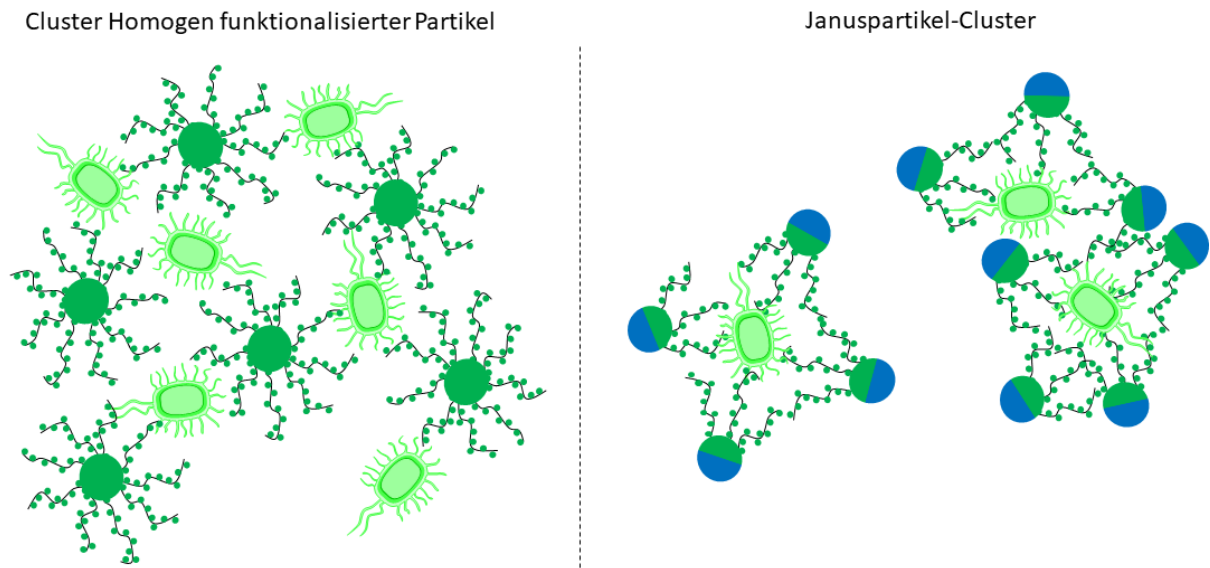


Abbildung 42: Erwartete Ausbildung der Partikel verschiedener Ausprägung.

Abbildung 42 zeigt zwei unterschiedliche Bindungsszenarien, die für Janus- bzw. homogen funktionalisierte Partikel angenommen werden können. Während die homogen-funktionalisierten Partikel besser Cluster mit weiteren *E. Coli* ausbilden sollten und somit größere Überstrukturen entstehen können, wird bei den Januspartikel die Ausbildung deutlich kleinerer Cluster erwartet. Aufgrund der halbseitigen Funktionalisierung mit dem Glykopolymer sollte eine Bindung mehrere *E. Coli* an einen Partikel gleichzeitig erschwert werden. In den folgenden Unterkapiteln soll diese Hypothese untersucht werden.

3.3.3.1 Aggregatbildung – Konzeptstudie

Vor der Umsetzung detaillierter Studien zur Erfassung des Einflusses der Konzentrationsabhängigkeit bei der Aggregatbildung zwischen Partikeln und Bakterien erfolgt zunächst die Durchführung einer Konzeptstudie. Hierzu werden Partikel, die gut mit *E. Coli* wechselwirken sollten, sowohl ohne Bakterien als auch in Anwesenheit verschieden hoher Konzentrationen GFP-gelabelter *E. Coli* Bakterien unter dem Fluoreszenzmikroskop in Kombination mit Durchlicht untersucht. Hierzu wird Man₁₈-APS verwendet und es werden 2.0 mg/mL einer Dispersion von dieser Partikelsorte erzeugt. Anschließend wird diese zusammen mit einer Bakterienlösung mit jeweils 2.0 mg/mL bzw. 1.0 mg/mL im Verhältnis 1:1 vermengt. Als Kontrolle diente ein dritter Ansatz dieser Partikel, der nur mit MilliQ-Wasser versetzt wurde. Das Fluoreszenzmikroskop erlaubt eine Betrachtung der gebildeten Aggregate, da in die Bakterien das grün fluoreszierende Protein eingebaut wurde. Dadurch können diese zum Fluoreszieren angeregt und somit besser unter einem optischen Mikroskop beobachtet werden. Insgesamt werden drei Dispersionen angesetzt mit identischer Partikelkonzentration (2.0 mg/mL) und unterschiedlicher Bakterienendkonzentration (2.0, 1.0 und 0 mg/mL). Die Aufnahmen des Fluoreszenzmikroskops im zeitlichen Abstand von 10 Minuten, 3 h, 6 h und 24 h zeigen, dass sich bei den Partikeln in Anwesenheit von *E. Coli* Aggregate ausbilden (alle Abbildungen im Anhang dargestellt). Exemplarisch kann die Aufnahme von 2.0 mg Man₁₈-APS in Anwesenheit von 1.0 mg *E. Coli* nach 10 Minuten Kontaktzeit betrachtet werden (Abbildung 43).

Die in Abbildung 43 dargestellten Fluoreszenzmikroskopaufnahmen zeigen hell-weiße und oftmals stäbchenförmige Objekte, welche die *E. Coli*-Bakterien sind. Die grauen, meist rundlichen Objekte, sind die Partikel. Beispielhaft wird ein kleines Aggregat, welches hauptsächlich aus Partikeln besteht, in einem roten Kreis hervorgehoben. Ein weiterer Bereich, in dem hauptsächlich Bakterien vorhanden sind, ist grün eingekreist. Bereiche, in denen Aggregate bestehend aus sowohl Bakterien als auch aus Partikeln zu sehen sind, sind mit einem schwarzen Kreis markiert.

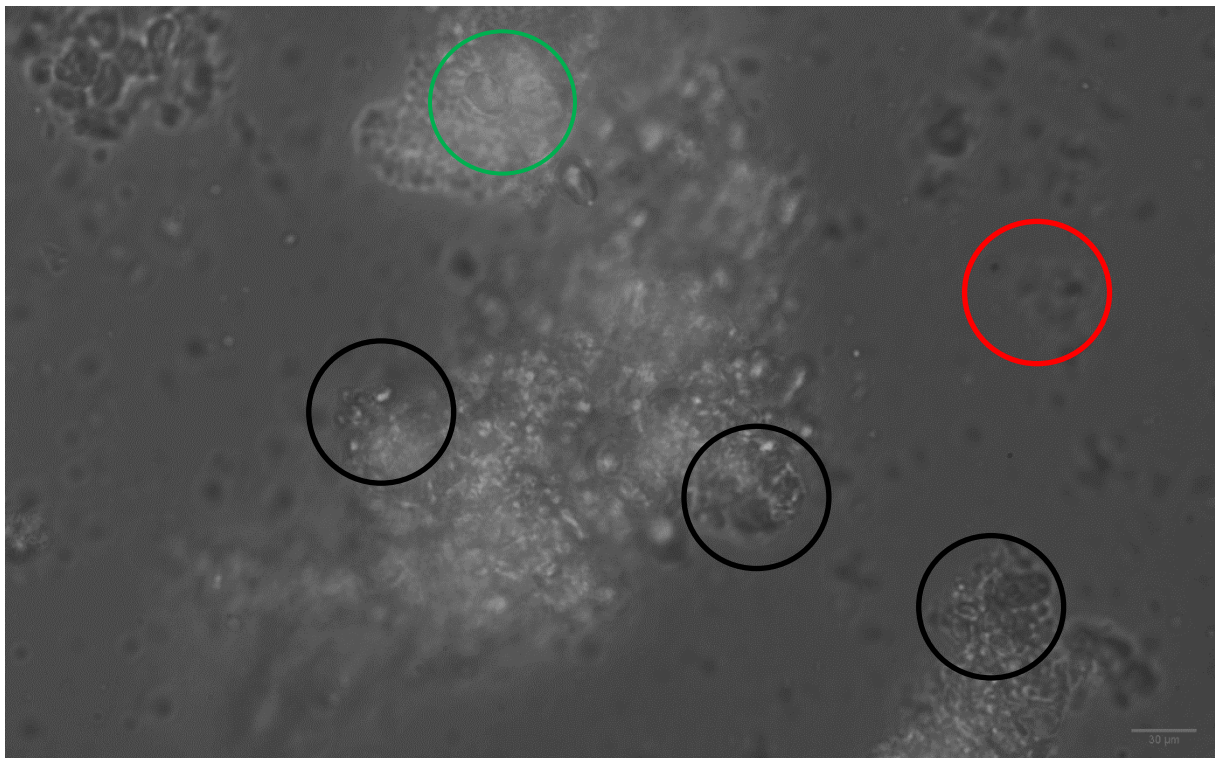


Abbildung 43: Man₁₈-APS zu 2 mg/mL in Anwesenheit von *E. Coli* mit einer Konzentration von 1 mg/mL nach 3 h. Roter Kreis: Hauptsächlich Partikel im Aggregat. Grüner Kreis: Bakterien dominieren diesen Abschnitt. Schwarze Kreise: Sowohl Bakterien als auch Partikel im Aggregat vorhanden.

Die Aggregate beider Aufnahmen zeigen die hell-leuchtenden Bakterien mit Partikeln, die sich zwischen diesen Bakterien befinden. Daraus folgt, dass die beobachteten Aggregate sowohl aus Bakterien als auch aus Partikeln bestehen. Auch im Vergleich zur Negativkontrolle (siehe Anhang) können deutlich größere Aggregate beobachtet werden. Die Ausbildung der Aggregate entspricht den Erwartungen für vollständig-funktionalisierte Partikel. Die Wechselwirkung zwischen dem Partikeltypus Man₁₈-APS findet in alle Richtungen gleich statt, sodass sich Bakterien von allen Seiten

anlagern können. Diese Bakterien können nun auf der von Partikel abgewandten Seite wiederum mit weiteren Partikeln wechselwirken, sodass sich größere Cluster ausbilden.

Ähnliche Mechanismen können beispielsweise in den Arbeiten von Elgiddawy et al. und Romero-Ben et al. beobachtet werden. Die Gruppe um Elgiddawy erzeugt Core-Shell-Nanopartikel mit Mannose in der äußersten Schicht, die an Oberflächen Aggregieren und durch Wechselwirkungen mit *E. Coli* die Anwesenheit dieses Bakteriums nachweisen können.^[196] Romero-Ben et al. synthetisieren Nanoröhrchen mit monovalenter Mannose an der Außenwand und untersuchen das Aggregationsverhalten in Anwesenheit von *E. Coli*. Dabei beobachten Sie eine „Koloniebildung“ durch mehrfaches Clustern der Bakterien an den Nanoröhrchen.^[197]

Zusammen mit den Vorstudien zur Partikelstabilität kann auf eine stabile Dispersion geschlossen werden. Aufgrund dieser Beobachtung und der Tatsache, dass größere Aggregate nur in Zusammenhang mit *E. Coli* entstehen, werden in den folgenden Kapiteln weitere Aggregationsassays verschiedener Partikel durchgeführt. Zusätzlich zur Fluoreszenzmikroskopie erfolgt außerdem eine Betrachtung der Trübung der Dispersion im zeitlichen Verlauf.

3.3.3.2 Aggregationsassay mit mikroskopischer Auswertung

Das Aggregationsassay wird angelehnt an die Veröffentlichung um die Gruppe von Hartmann et al. durchgeführt.^[198] Ziel dieser Studie ist es, unterschiedliche Aggregatbildungen zwischen homogen funktionalisierten Partikeln und Januspartikeln im MilliQ-Wasser zu beobachten und die Interaktionen vergleichbar zu erfassen. Hierzu werden verschiedene Partikelkonzentration auf eine konstante Bakterienkonzentration gegeben. Für die Partikel wird jeweils eine Stammlösung mit 10.0 mg/mL angesetzt und diese wird für einige Minuten in ein eisgekühltes Ultraschallbad gegeben. Anschließend wird von jeder Partikelsorte die folgende Konzentrationsreihe angesetzt: 5.0 mg/mL, 1.0 mg/mL, 0.1 mg/mL und 0.01 mg/mL und auf eine gleichbleibende Bakterienkonzentration gegeben (für die Bakterienkultivierung siehe Kapitel 5.1 – Methoden). Für die Studien werden zunächst exemplarisch die Partikel APS und Gal₃₇JNIPAm als Negativkontrollen und Man₁₈APS sowie Man₁₈JNIPAm verwendet. Von jeder Dispersion der Konzentrationsreihe werden 0.1 mL auf 0.8 mL der Bakterienlösung gegeben. Daraus ergeben sich die in Tabelle 14 dargestellten Konzentrationsreihen.

Tabelle 14: Übersicht der jeweiligen Endkonzentrationen der Partikelproben für das Aggregationsassay.

Substanz	C1 [µg/mL]	C2 [µg/mL]	C3 [µg/mL]	C4 [µg/mL]
APS	556	111	11	1
Man ₁₈ APS	556	111	11	1
Man ₁₈ JNIPAm	556	111	11	1
Gal ₃₇ JNIPAm	556	111	11	1

Neben den Partikeln, bei denen keine Aggregatbildung zu erwarten ist, wird eine weitere Blindprobe gemessen, die lediglich Bakterien und MilliQ-Wasser enthält. Diese zusätzlichen Messungen werden durchgeführt, um sicherzustellen, dass die beobachteten Effekte auf die Partikel zurückzuführen sind und nicht auf das Verhalten der Bakterien. Die Proben wurden alle konstant bei 200 rpm bei 25-27 °C geschüttelt und auf zwei verschiedene Weisen untersucht. Zunächst erfolgt eine rein optische Auswertung durch Abfotografieren der Lösungen und im zweiten Schritt werden die Systeme unter

einem optischen Mikroskop betrachtet. Die Proben werden zu unterschiedlichen Zeitpunkten fotografiert und anschließend erfolgt die Entnahme von 15 μL aus dem unteren Bereich der Gefäße zur Betrachtung der Aggregate unter dem Mikroskop. Im Folgenden werden die jeweiligen Photographien der Trübungen und die Mikroskopaufnahmen dargestellt.

3.3.3.3 APS-Partikel ohne Polymerfunktionalisierung in Anwesenheit von *E. Coli*

Wie in Kapitel 3.3.5.1 beschrieben, werden unfunktionalisierte APS-Partikel, die auf ihrer äußeren Hülle keine Glykopolymere, sondern freie Amine präsentieren, zunächst als Vergleichsprobe vermessen. Da es sich um die Ausgangspartikel zur Synthese der anderen Partikel handelt, können durch Betrachtung der APS-Partikel eventuell bereits erste Erkenntnisse über die zu erwartenden Resultate erhalten werden. Hierzu werden verschiedene Konzentrationen dieser Partikel mit einer fixen Bakterienkonzentration zusammengegeben und im zeitlichen Verlauf betrachtet. Die Resultate werden sowohl photographisch (Abbildung 44) als auch mikroskopisch (

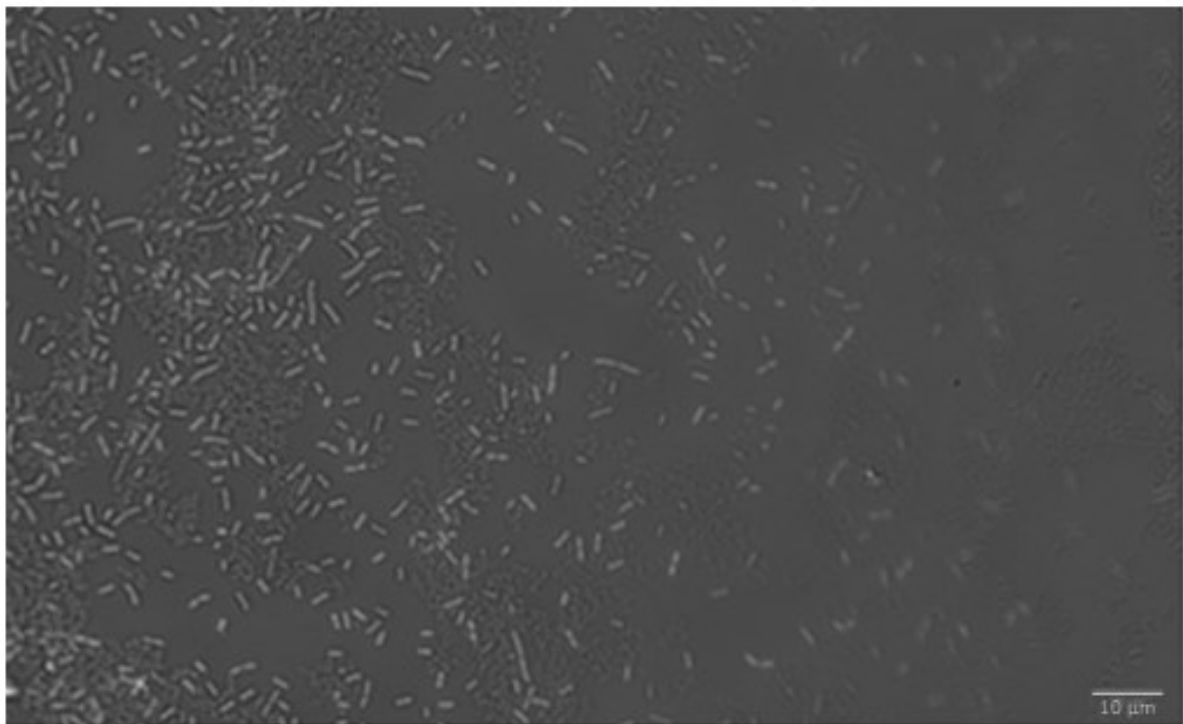


Abbildung 45) festgehalten und gegenübergestellt. Während der Vergleich der Trübung der Dispersionen einen Gesamteindruck der Sedimentation durch einen Aufbau von Überstrukturen

erlaubt, ermöglicht die Betrachtung der Mikroskopaufnahmen eine Einschätzung über die Art der Aggregatbildung. In Abbildung 44 werden die verschiedenen Dispersionen unterschiedlicher APS-Partikelkonzentration in Anwesenheit von *E. Coli* im zeitlichen Verlauf dargestellt. Bei allen Konzentrationen kann eine Abnahme der Trübung beobachtet werden, wobei der stärkste Effekt bei der höchsten Konzentration von $c = 556 \mu\text{g/mL}$ eintritt. Bereits nach 3 Stunden können bei dieser Partikelkonzentration auf dem Boden erste Aggregate ausgemacht werden, die sich bei den anderen Konzentrationen später zeigen.



Abbildung 44: Photographien der Bildung der Aggregate der APS-Probe mit *E. Coli* zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

So können bei einer Konzentration von $111 \mu\text{g/mL}$ nach 6 Stunden Aggregate beobachtet werden und bei $11 \mu\text{g/mL}$ sowie $1 \mu\text{g/mL}$ nach 24 Stunden. Neben den gebildeten Aggregaten ermöglicht auch die Betrachtung der Trübung der Proben einen Rückschluss auf die Wechselwirkungen der Partikel mit den Bakterien. Nach 10 min ist die Trübung am stärksten, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Partikel und Bakterien weitestgehend nicht-aggregiert vorliegen. Nach 3, 6 und 24 Stunden kann bei allen Proben eine Abnahme der Trübung beobachtet werden. Daher kann davon ausgegangen werden, dass eine Aggregatbildung bei allen Partikelansätzen einsetzt. Unter dem

Fluoreszenzmikroskop können diese Aggregate untersucht werden. Die deutlichsten Effekte können bei der höchsten Konzentration von 556 µg/mL beobachtet werden, sodass ausschließlich diese Aufnahmen hier im zeitlichen Verlauf dargestellt werden.

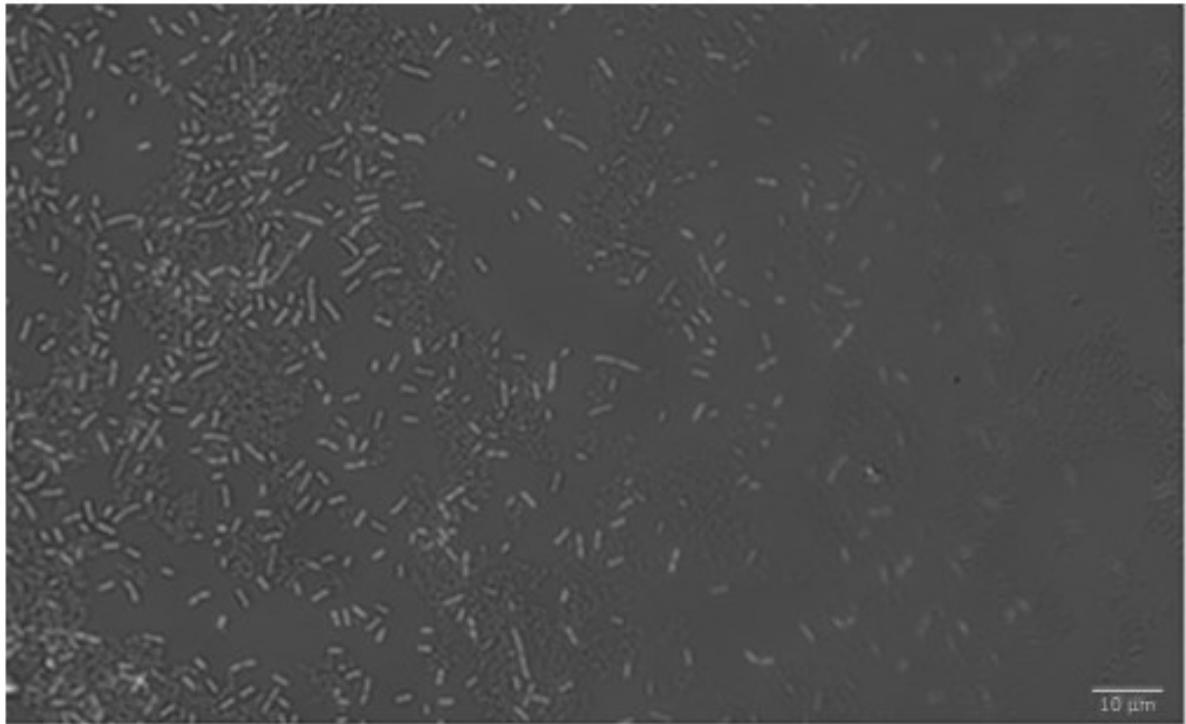


Abbildung 45: Mikroskopaufnahmen APS (556 µg/mL) in Anwesenheit fluoreszenzmarkierter *E. Coli* nach 6 h Kontakt.

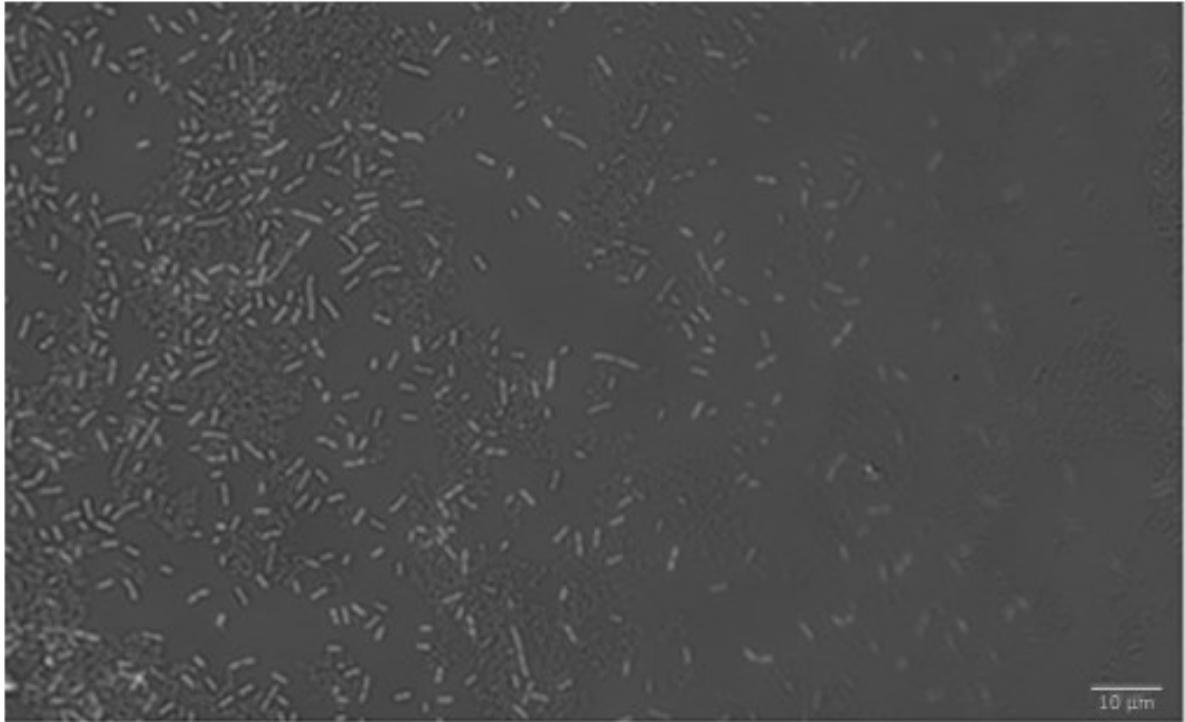


Abbildung 45 zeigt Fluoreszenzaufnahmen der APS-Probe mit einer Partikelkonzentration von 556 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in Anwesenheit von fluoreszenzmarkierten *E. Coli* nach 6 Stunden (weitere Aufnahmen zu anderen Zeitpunkten sind im Anhang zu finden). Die Bakterien sind die fluoreszierenden, stäbchenförmigen Objekte, während die Partikel als dunkle, sphärische Objekte ausgemacht werden können. Bereits nach 10 min können einzelne Ansammlungen von Bakterien ausgemacht werden, deren Lokalisierung auf einem einzelnen Fleck auf kleinere Aggregate zurückschließen lässt. Im weiteren Zeitverlauf werden diese Aggregate langsam größer und nehmen zahlenmäßig langsam zu. Nach 3 h sind erste kleinere Aggregate zu beobachtbaren und nach 24 h sind sie deutlich größer geworden. Das bedeutet, dass eine Aggregation von *E. Coli* auch mit Partikeln eintreten kann, die keine Mannose präsentieren und die noch über freie Amine verfügen. Es ist aus anderen Studien bekannt, dass Amine mit den gramnegativen Bakterien wechselwirken können.^[199] Diese Wechselwirkungen bilden sich zwischen den positiv-geladenen Aminen und der negativ geladenen Bakterienoberfläche aus, bei welcher es sich bei *E. Coli* um eine doppelte Lipidschicht handelt.

3.3.3.4 pMan₁₈-APS in Anwesenheit von *E. Coli*

Nachdem eine Bildung von Aggregaten zwischen nicht-glykosylierten Partikeln mit *E. Coli* beobachtet wird, soll untersucht werden, ob vollständig glykosylierte Partikel eine andere Form der Interaktion mit dem *E. Coli* aufweisen. Hierzu werden mit dem Glykopolymer pMan_{2CA18} funktionalisierte Partikel in Kontakt mit dem Bakterium gebracht. Bei pMan_{2CA18} handelt es sich um ein mannosyliertes Glykopolymer mit 18 Wiederholungs- und somit Mannoseeinheiten.

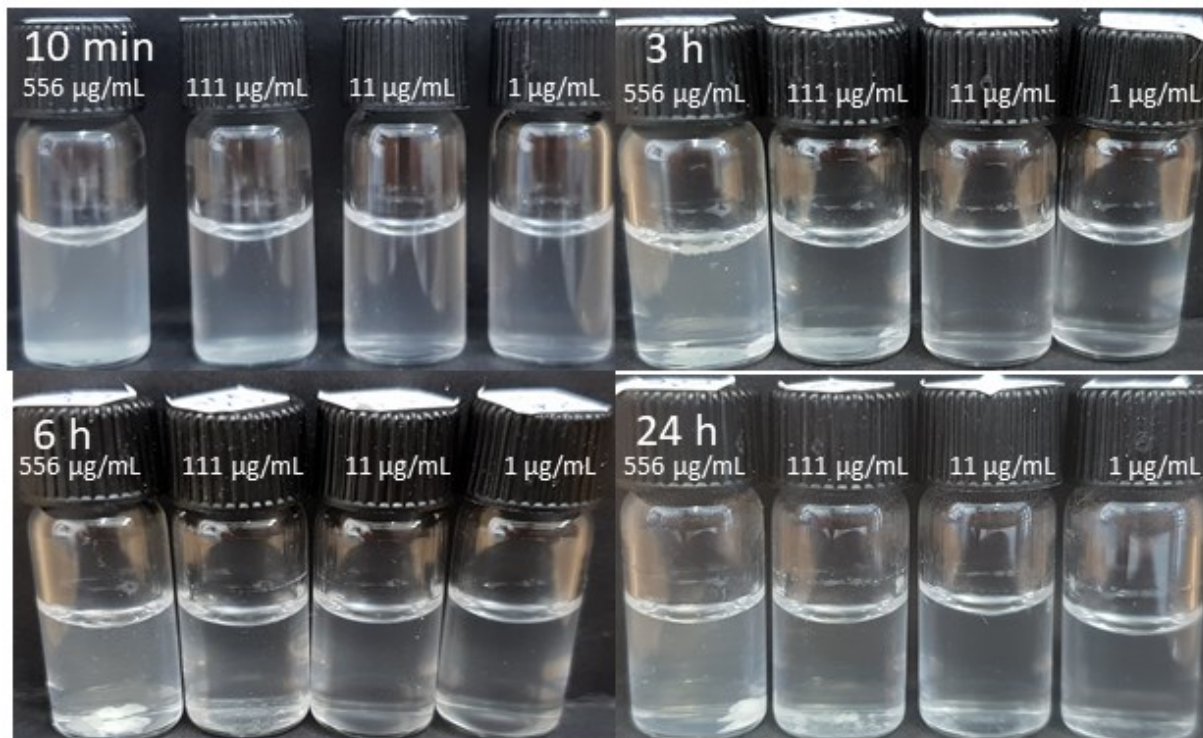


Abbildung 46: Fotografien der Bildung der Aggregate der Man₁₈-APS-Probe mit *E. Coli* zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

Abbildung 46 stellt die fotografischen Aufnahmen der verschiedenen Partikelkonzentrationen im Zeitverlauf dar. Im Fall der mit Glykopolymer funktionalisierten APS-Partikel ist eine deutlichere Abnahme der Trübung zu beobachten als dies bei den APS-Partikeln ohne Glykopolymer der Fall ist. Bereits nach 3 h ist die Abnahme der Trübung fortgeschritten und es bilden sich größere Ablagerungen auf dem Gefäßboden. Auch bei den anderen Konzentrationen können Sedimente beobachtet werden: bei der Konzentration von 111 µg/mL ebenfalls nach 3 Stunden und bei den übrigen Konzentrationen nach 24 h. Im Vergleich zu den APS-Partikeln ohne präsentierte Glykopolymere sind die beobachteten Aggregate insgesamt größer und ausgeprägter. Die Mikroskopaufnahmen in Abbildung 47

unterstützen diese Beobachtung, da sie zu jedem Zeitpunkt eine stärkere Clusterbildung der Man₁₈-APS-Partikel aufzeigen.

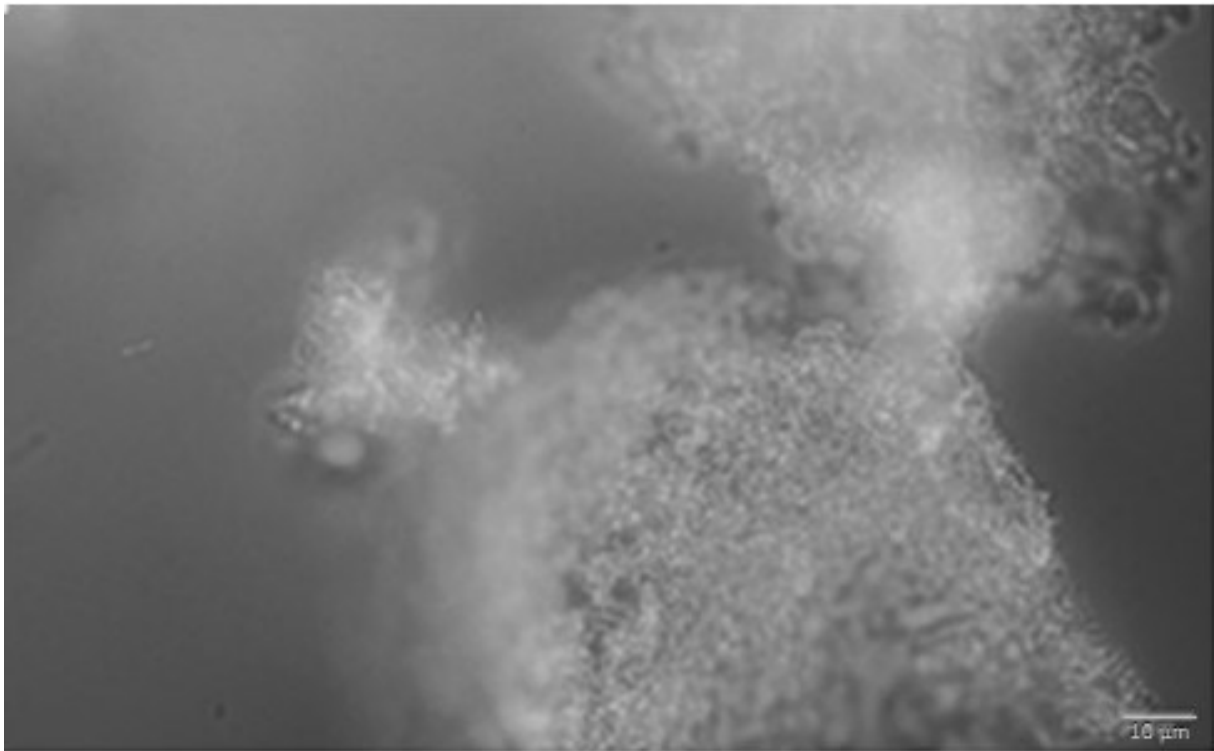


Abbildung 47: Mikroskopaufnahmen der Man₁₈-APS-Partikel in Anwesenheit von *E. Coli* nach 3 h.

Die Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen in Abbildung 47 zeigt exemplarisch die Bildung von Überstrukturen zwischen *E. Coli*-Bakterien und Man₁₈-APS-Partikeln nach 3 Stunden. Bereits nach 10 Minuten bilden sich größere Aggregate aus als bei den APS-Partikeln mit lediglich freien Aminen. So können in der ersten Aufnahme kleinere Aggregate beobachtet werden, die sich nach 3 h deutlich vergrößern und nach 6 h um ein Vielfaches anwachsen (vergleiche Anhang). Die nach 24 h untersuchten Proben bilden derartig große Cluster aus, dass keine aussagekräftigen Bilder aufgenommen werden können. Ob die gebildeten Aggregate lediglich auf die Wechselwirkungen zwischen Glykopolymeren und Bakterien zurückzuführen sind, ist durch die Mikroskopiebilder nicht belegbar. Da nach der Partikelfunktionalisierung mittels Kaisertest (vgl. Tabelle 13) noch ca. 34 % freie Amine auf Man₁₈-APS festgestellt wurden, ist es möglich, dass diese freien Amine an der Aggregation partizipieren. Die deutlich erhöhte Größe der gebildeten Aggregate der mit pMan2CA₁₈

funktionalisierten Partikel und der erhöhten Geschwindigkeit der Aggregatbildung deuten darauf hin, dass die Mannosepolymere auf den Partikeln einen wesentlichen Beitrag zur Aggregatbildung leisten, da die APS-Partikel mit ausschließlich freien Aminen deutlich kleinere Aggregate im gleichen Zeitverlauf ausbilden. Wahrscheinlich spielen bei den beobachteten Wechselwirkungen der Man₁₈-APS-Partikel mit *E. Coli* beide Arten der Wechselwirkung eine Rolle, deren individuelle Beiträge sich in der stärkeren Bindung zu *E. Coli* zeigen: Zum einen die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den protonierten Aminen und den gram-negativen Bakterien. Zum anderen die Affinität von FimH zu Mannose.

In weiterführenden Arbeiten könnte diese Beziehung näher untersucht werden. Hierzu könnten unterschiedliche Partikel mit variierenden Verhältnissen von mannosylierten Glykopolymeren zu freien Aminen hinsichtlich ihrer mit *E. Coli* ausgebildeten Aggregate verglichen werden, idealerweise in einem noch engeren zeitlichen Verlauf. Spannend wäre auch der Vergleich der Aggregation in Anwesenheit von Inhibitoren, wie Glykopolymeren oder Glykooligoamiden.

3.3.3.5 pMan₁₈-JNIPAm in Anwesenheit von *E. Coli*

Nach Interaktionsstudien der Negativkontrolle und einer Partikelsorte mit homogener Glykopolymerverteilung auf der Partikeloberfläche erfolgt die Betrachtung von mannosylierten Januspartikeln. Hierzu wird ein Partikel in Anwesenheit von *E. Coli* untersucht, der halbseitig jeweils Poly(NIPAm) und pMan₁₈, also ein mannosyliertes Glykopolymer mit 18 Wiederholungseinheiten, präsentiert. Es werden jeweils 4 verschiedene Konzentrationen dieses Partikeltyps mit der Standardmenge *E. Coli* zusammengegeben. Abbildung 48 zeigt die Trübung der Dispersion im Zeitverlauf.

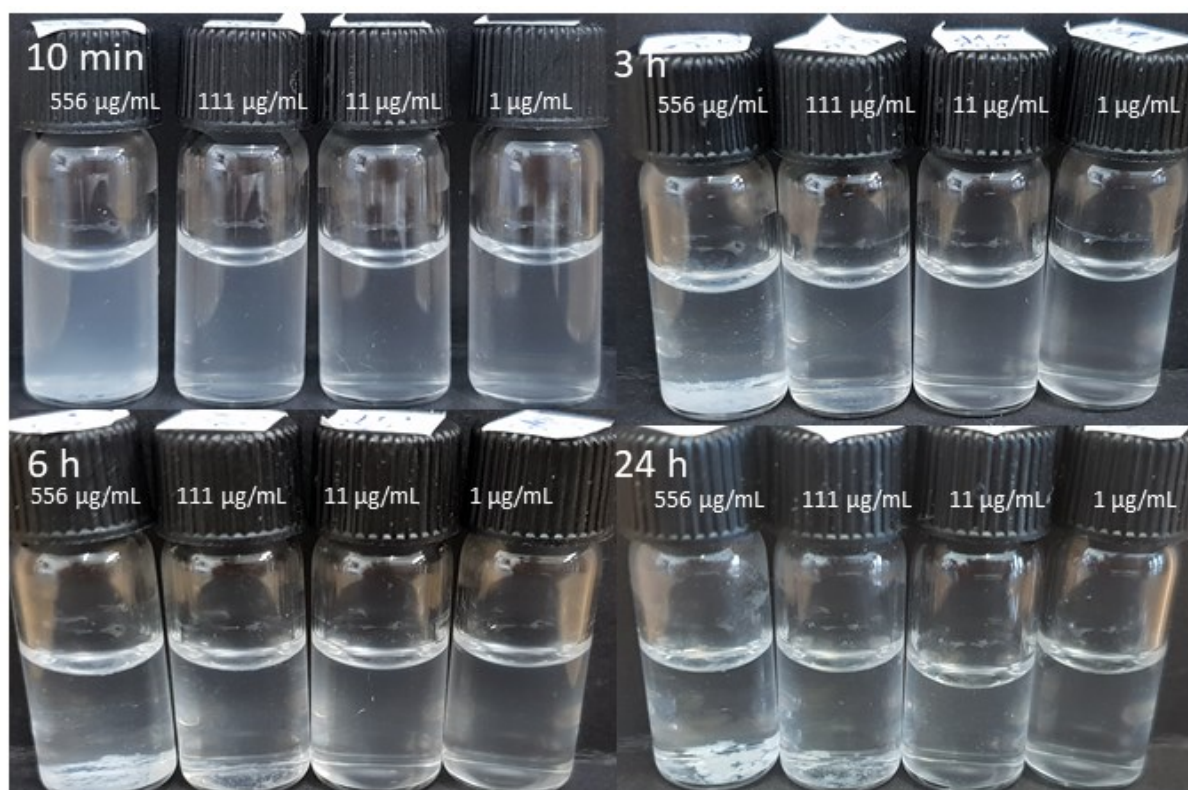


Abbildung 48: Photographien der Bildung der Aggregate der Man₁₈-JNIPAm-Probe mit *E. Coli* zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

Genau wie beim vollständig-glykosylierten Partikel zeigt sich in Abbildung 48 eine schnellere Abnahme der Trübung, als im Versuchsaufbau mit APS-Partikeln, also ausschließlich Amin-präsentierende Partikel, beobachtet werden kann. Nach 3 h kann in der höchsten Konzentration von 556 µg/mL eine deutliche Abnahme der Trübung und eine Bildung von Aggregaten auf dem Gefäßboden beobachtet werden. Bei einer Konzentration von 111 µg/mL zeigen sich erste Aggregate in den Aufnahmen

ebenfalls nach 3 h während bei den übrigen Konzentrationen nach 24 h lediglich sehr kleine Aggregate ausgemacht werden können. Die Bildung von Aggregaten kann auch in den in Abbildung 49 dargestellten Mikroskopaufnahmen beobachtet werden.

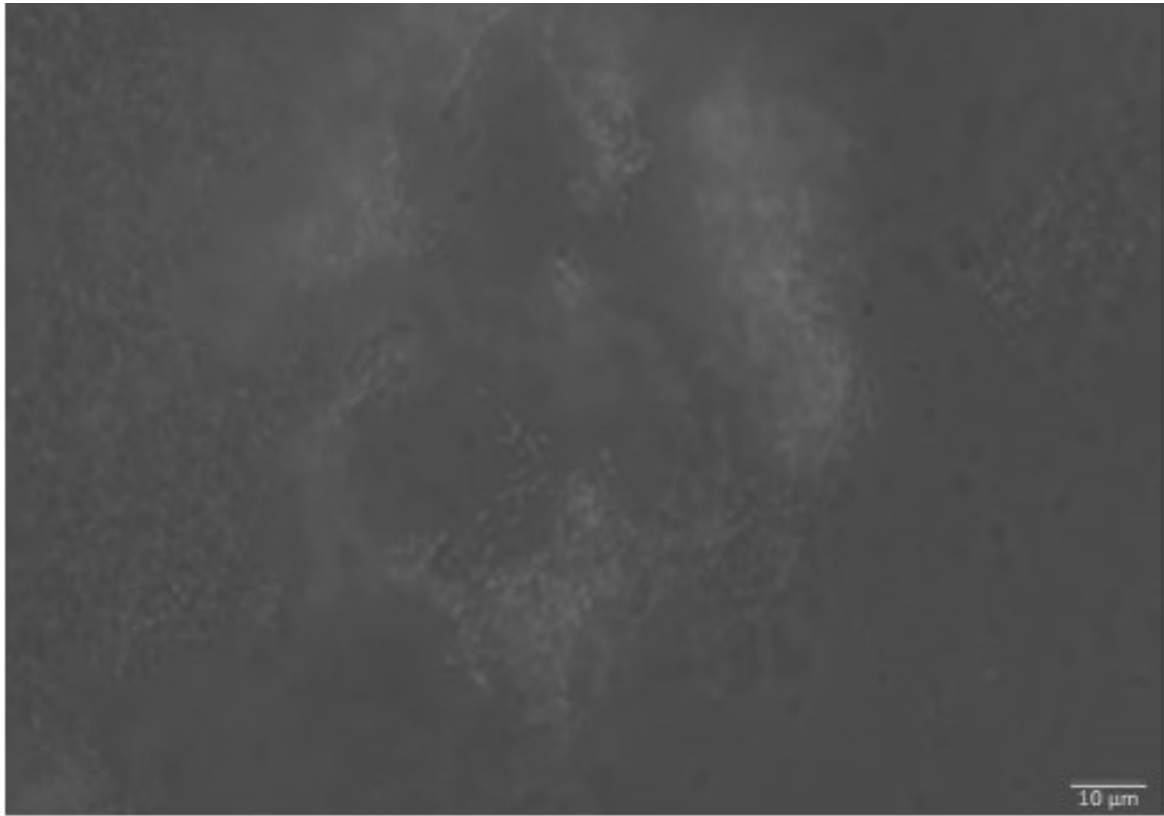


Abbildung 49: Mikroskopaufnahme der Man₁₈-JNIPAm-Partikel nach 3 Stunden in Anwesenheit von *E. Coli*.

In den Mikroskopaufnahmen zeigt sich bereits nach 10 min eine Interaktion zwischen Partikeln und Bakterien. Die Größe der nach 10 min zu beobachteten Aggregate nimmt im zeitlichen Verlauf weiter zu, sodass bereits nach 3 h, wie in Abbildung 49 exemplarisch dargestellt, deutlich ausgeprägte Aggregate zu beobachten sind. Im Vergleich zu den APS-Partikeln erscheinen die Aggregate größer und im Gegensatz zu den vollständig mannosylierten Partikeln erscheinen diese kleiner. Hier eignet sich ebenfalls die genauere Betrachtung der Aggregate nach 6 h Kontaktzeit der Partikel mit *E- Coli*. Die in Abbildung 49 aufgenommenen Bakterien-Partikel-Aggregate sind größer als die APS-Partikel mit ausschließlich Amininen (

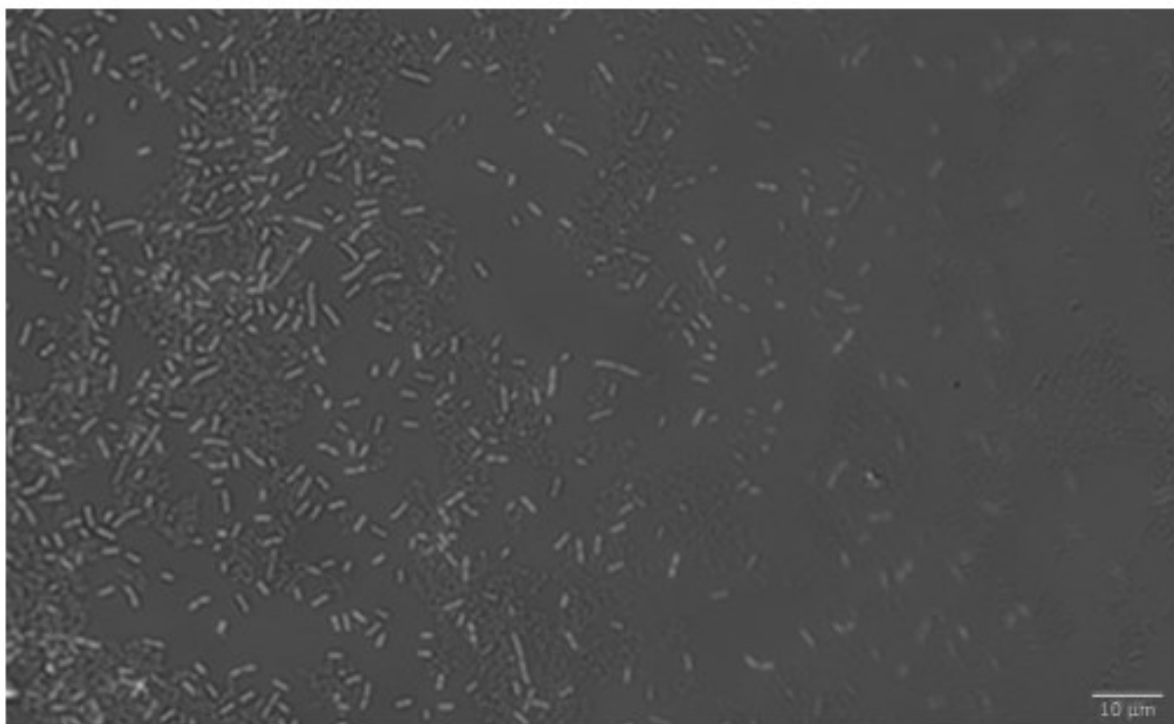


Abbildung 45). Dies deutet darauf hin, dass hier ebenfalls Interaktionen mit Mannose einen wesentlichen Beitrag zur Bildung der Aggregate liefern. Der Restamingehalt (vgl. Tabelle 13) ist bspw. im Vergleich zu den Man_{18} -APS-Partikeln mit 9 % deutlich geringer, sodass die hier betrachteten Januspartikel einen geringeren Beitrag der elektrostatischen Wechselwirkungen der Amine in ihrer Affinität zu *E. Coli* aufweisen.^[199] Stattdessen könnte das Poly(NIPAm), welches auf der anderen Seite der Januspartikel präsentiert wird, einen Bindungsbeitrag leisten. Dieser Aspekt wird im anschließenden Kapitel 3.3.3.6 untersucht, indem das Mannosepolymer durch ein Galaktosepolymer ersetzt wird.

Im Vergleich zu den Aggregaten der vollständig funktionalisierten Partikel Man_{18} -APS (vgl. Abbildung 47) sind die in Abbildung 49 zu beobachtenden Partikel-Bakterien-Cluster kleiner. Dies weist auf eine reduzierte Aggregatbildung hin. Deutlich wird dies auch im direkten Vergleich der Aggregate, die sich nach 24 h zeigen. Die Aggregate der vollständig-funktionalisierten Partikel sind im Vergleich zu den pMan_{18} -NIPAm-Januspartikeln stark vergrößert, während sich bei den Januspartikeln eine höhere Anzahl einzelner Cluster beobachten lässt. Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass die Januspartikel andere Makrostrukturen ausbilden als dies bei homogenen Partikeln der Fall ist. Auch hier ist das

Problem der Quantifizierbarkeit des Versuchsaufbaus zu erwähnen, denn eine genaue Größe der Partikeln und deren Größenverteilung ist nicht umzusetzen.

3.3.3.6 pGal₃₇-JNIPAm in Anwesenheit von *E. Coli*

Die Januspartikel pGal₃₇-JNIPAm mit dem Galaktosepolymer pGal2CA₃₇ auf der einen und Poly(NIPAm) auf der anderen Hälfte soll als Negativkontrolle in Anwesenheit von *E. Coli* untersucht werden. Im Idealfall sollten keine Aggregate beobachtet werden, da sowohl Galaktose als auch Poly(NIPAm) keine spezifischen Interaktionen mit den Bakterien eingehen. In Abbildung 50 wird zunächst das Trübungsverhalten der Partikel zu unterschiedlichen Zeitpunkten dargestellt.



Abbildung 50: Photographien der Bildung der Aggregate der Gal₃₇-JNIPAm-Probe mit *E. Coli* zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

Auch die Januspartikel pGal₃₇-NIPAm weisen eine Bildung von Aggregaten auf. Bereits nach 3 h zeigen sich erste Aggregate in der höchsten Konzentration (556 µg/mL) und nach 24 h können weitere Niederschläge in den Konzentrationen von 111 µg/mL bzw. 11 µg/mL beobachtet werden. Auch wenn sich bei den Gal₃₇-JNIPAm-Partikeln ähnlich schnell Aggregate ausbilden wie bei anderen

mannosylierten Partikeln bzw. den APS-Partikeln, ist der Niederschlag deutlich geringer als es in den anderen Proben beobachtet werden kann. Außerdem ist die Abnahme der Trübung über alle Konzentrationen hinweg im Vergleich deutlich langsamer als für die anderen Partikelsorten, auch im Vergleich zu den nicht-funktionalisierten APS-Partikeln mit freien Aminen.

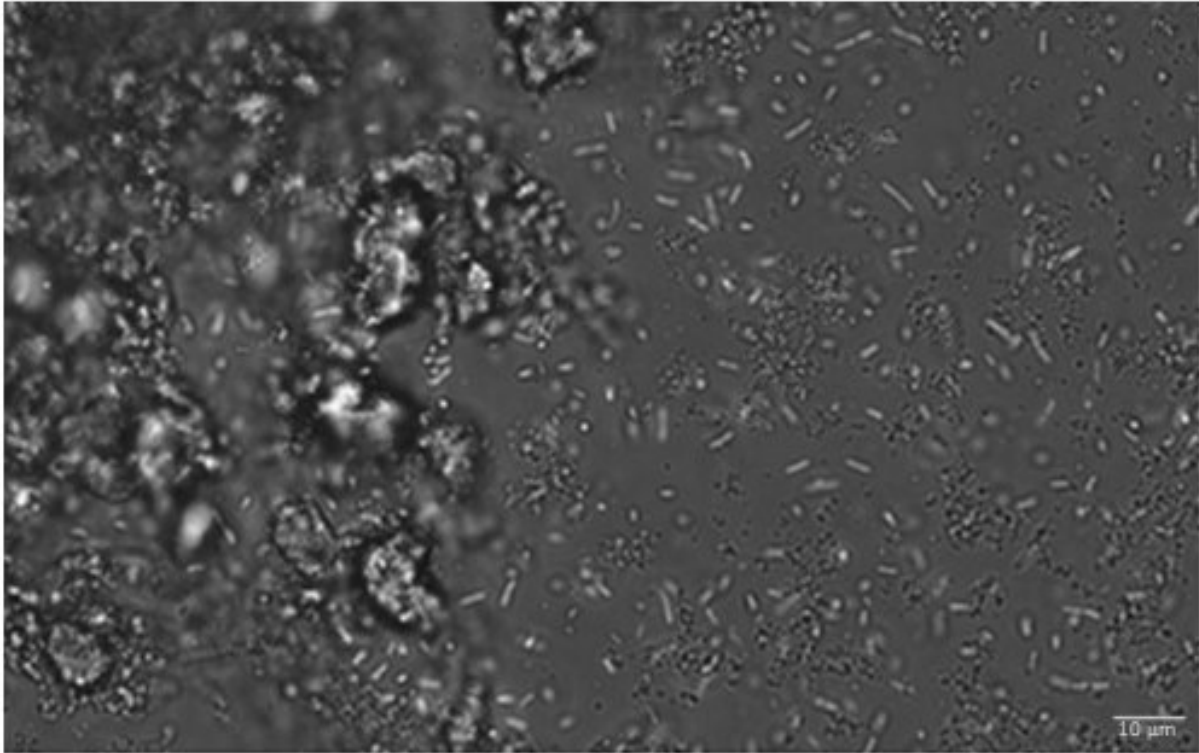


Abbildung 51: Mikroskopaufnahmen der Gal₃₇-JNIPAm Partikel zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

In den Aufnahmen unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigt sich ebenfalls ein differenziertes Bild. Die Aggregate, die nach 10 min beobachtet werden können, sind deutlich kleiner und gleichmäßiger verteilt als in den Interaktionsstudien der übrigen Partikel. Nach 3 bzw. 6 h zeigen sich größere Aggregate, die im Vergleich zu den übrigen Partikeln dennoch deutlich kleiner ausfallen. In Abbildung 51 können diese kleineren Aggregate im linken Bildbereich ausgemacht werden. Erst nach 24 Stunden erreichen die beobachteten Aggregate eine mit den anderen Partikelarten vergleichbare Größenordnung. Dennoch sind die Cluster nach dieser langen Kontaktzeit kleiner als die der anderen Partikel bereits nach kürzeren Zeiten (bspw. 6 Stunden). Da die Partikel halbseitig jeweils pGal2CA₃₇ und Poly(NIPAm) präsentieren, sind die beobachteten Wechselwirkungen wahrscheinlich auf die geringe Konzentration der Amine auf den Galaktose-Januspartikeln zurückzuführen. Gemäß Tabelle 13

sind in etwa 8 % Amine auf der Oberfläche vorhanden. Auch die geringere Ausprägung des Aggregationsverhaltens im Zeitverlauf zeigt, dass die halbseitige Funktionalisierung der Partikel mit Galaktose eine Reduzierung der Affinität zu *E. Coli* zur Folge hat. Dass sich dennoch Aggregate bilden zeigt, wie wichtig in zukünftigen Untersuchungen die Kenntnis über den Einfluss der verbleibenden Amingruppen ist. Aus dem Ergebnis der Aufnahmen dieser Blindprobe ist zu entnehmen, dass die in den vorherigen Experimenten observierbare verstärkte Aggregatbildung aufgrund der Präsentation von Mannosepolymeren auf der Partikeloberfläche zurückzuführen ist. Allerdings haben die verbliebenen Amine ebenfalls einen Einfluss auf die Aggregatbildung, welcher noch zu untersuchen ist, um weitere Einflüsse auf die Wechselwirkung mit *E Coli* besser zu verstehen. Daher lässt sich keine quantitative Aussage zum Einfluss der Partikelarchitektur auf die Aggregatbildung mit *E. Coli* treffen. Durch den Zusatz von Inhibitoren oder auch von einem Glykopolymeren könnte in Zukunft mittels weiterer Inhibitionsstudien eine weiterreichende Aussage darüber getroffen werden. Die bisher vorliegenden Ergebnisse bilden aber eine gute Grundlage für weitere Studien.

3.3.3.7 Zusammenfassung der Interaktionsstudien verschiedener Partikel

In den Kapiteln 3.3.3.2 – 3.3.3.6 wurden verschiedene Partikel in Anwesenheit von *E. Coli* hinsichtlich ihres Aggregationsverhaltens untersucht. Es werden für jeden Partikeltyp jeweils ein Trübungsassay durchgeführt und Aufnahmen mit einem Fluoreszenzmikroskop erstellt, um die Interaktion der Partikel mit GFP-gelabelten *E. Coli* Bakterien zu beobachten. Es wurde erwartet, dass die Aggregatbildung mit der Anwesenheit von Mannose auf der Partikeloberfläche korreliert und dass eine Aggregatbildung ausschließlich mit mannose-präsentierenden Partikeln einsetzt. Aufgrund der Konzeptstudie in Kapitel 3.3.5.1 kann davon ausgegangen werden, dass die beobachtbare Aggregation von Partikeln ausschließlich auf Interaktionen mit den Bakterien zurückzuführen sind und nicht in einer Selbstassemblierung der Partikel untereinander. Diese Feststellung erlaubt den Vergleich der observierten Aggregate. Hierzu sollen die Beobachtungen der Trübungen in Tabelle 15 und Tabelle 16 verglichen werden.

Tabelle 15: Übersicht der Trübungsstudien der verschiedenen Partikeltypen.

Beobachtung von Niederschlag nach angegebenem Zeitraum				
Konzentration:	556 [$\mu\text{g/mL}$]	111 [$\mu\text{g/mL}$]	11 [$\mu\text{g/mL}$]	1 [$\mu\text{g/mL}$]
APS	Nach 3 h	Nach 6 h	Nach 24 h	Nach 24 h
Man ₁₈ APS	Nach 3 h	Nach 3 h	Nach 24 h	Nach 24 h
Man ₁₈ JNIPAm	Nach 3 h	Nach 3 h	Nach 24 h	Nach 24 h
Gal ₃₇ JNIPAm	Nach 3 h	Nach 6 h	Nach 24 h	Nach 24 h

Wie in dieser Übersicht zu sehen kann ist die beobachtete Trübung der Partikel in Anwesenheit von *E. Coli* insgesamt sehr ähnlich. In allen Dispersionen in mit Bakterien zeigen sich Niederschläge nach 3 Stunden für die höchste Konzentration von 556 $\mu\text{g/mL}$ und nach 24 h für beide niedrigen Konzentrationen 11 und 1 $\mu\text{g/mL}$. Lediglich für die Konzentration von 111 $\mu\text{g/mL}$ kann ein abweichendes Aggregationsverhalten abhängig vom untersuchten Partikeltyp beobachtet werden, da bei den Januspartikeln Man₁₈-JNIPAm und bei den vollständig funktionalisierten Partikeln Man₁₈-APS bereits nach 3 h die Bildung von Niederschlag einsetzt und bei den anderen Ansätzen nach 6 h. Mit Hilfe dieser Betrachtung kann auf eine schnellere Aggregatbildung dieser Partikel im Vergleich zu den Negativkontrollen geschlossen werden, allerdings ist diese Betrachtung auf die gewählte Intervalldauer limitiert. Unter Umständen kann bei kürzeren Betrachtungsintervallen ein deutlicher Unterschied herausgearbeitet werden, allerdings sind kürzere Intervalle in Verbindung mit dem Fluoreszenzmikroskop technisch schwierig zu realisieren. Die untersuchten Partikel müssen mit derselben Generation *E. Coli* untersucht werden, die zum selben Zeitpunkt mit den zu untersuchenden Partikeln in Kontakt gebracht werden muss. Eine simultane Untersuchung der Trübung bzw. Aggregatbildung und dem Mikroskop kann daher nicht in kürzeren Intervallen reproduzierbar durchgeführt werden. Dennoch erlaubt ein relativer Vergleich Trübung der *E. Coli*-Partikel-Dispersion eine Einschätzung über die Geschwindigkeit der Interaktion wie in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16: Zusammenfassung der Abnahme der Trübungen.

Abnahme der Trübung¹	
APS	mittelmäßig
Man ₁₈ APS	stark
Man ₁₈ JNIPAm	stark
Gal ₃₇ JNIPAm	gering

¹Bezogen auf die Konzentration von 556 µg/mL

Die relativen Abnahmen der Trübungen vermitteln einen Eindruck der Interaktionsgeschwindigkeit der mannosylierten Partikel im relativen Vergleich. Die Trübung des vollständig mannosylierten Partikels Man₁₈-APS und des mannosylierten Januspartikels Man₁₈JNIPAm nimmt im Vergleich zu den Negativkontrollen deutlich stärker ab. Dennoch kann auch in diesen beiden Negativkontrollen in Anwesenheit von *E. Coli* eine Abnahme der Trübung beobachtet werden, wobei die Abnahme der Trübung bei den APS-Partikeln deutlich stärker verläuft als bei den galaktosylierten Januspartikeln pGal₃₇-NIPAm. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die Anwesenheit von Mannose-Glykopolymeren auf der Partikeloberfläche einen Einfluss auf die Wechselwirkungen zwischen den jeweiligen Partikeln und dem verwendeten Stamm *E. Coli* hat.

Unter dem Fluoreszenzmikroskop treten die Unterschiede deutlicher hervor. Die Aggregate der mannosylierten Partikel pMan₁₈APS und pMan₁₈NIPAm sind über alle Zeitpunkte hinweg größer als die der korrespondierenden Partikel ohne Mannose (APS und pGal₃₇NIPAm). Dennoch ist bei diesen Partikeln ebenfalls eine Bildung von Aggregaten in Anwesenheit von *E. Coli* zu sehen. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass die beobachteten Wechselwirkungen zwischen den Partikeln und Bakterien zu einem unbekannten Anteil unspezifischer Natur sind. Diese Wechselwirkungen sind voraussichtlich auf die nicht vollständig umgesetzten Amine zurückzuführen, der Anteil der Amine variiert jedoch von Partikeltyp zu Partikeltyp. Während bei pMan₁₈APS ca. 34 % der Amine nicht reagiert haben, sind bei pGal₃₇NIPAm und pMan₁₈NIPAm lediglich 8 bzw. 9 % der Amine nicht

umgesetzt. Dass diese Partikel dennoch unterschiedlich stark mit *E. Coli* aggregieren zeigt, dass hierbei die Art des Kohlenhydrats den Unterschied ausmachen muss. pMan₁₈-NIPAm bildet im direkten Vergleich größere Aggregate in kürzerer Zeit. Gleichzeitig ist die Aggregatbildung der APS-Partikel ohne präsentiertes Glykopolymer geringer ausgeprägt als beide Partikeltypen mit Mannosepolymer. Daraus ergibt sich, dass das Aggregationsverhalten beider Partikelsorten mit pMan2CA₁₈ hauptsächlich in der Anwesenheit dieser Glykopolymere begründet ist.

In weiterführenden Studien ist es jedoch erforderlich, den Einfluss der Amine auf die Aggregatbildung nachvollziehen zu können oder die Synthese der Partikel dahingehend zu optimieren, dass keine freien Amine nachgewiesen werden können. Die könnte beispielsweise im Rahmen einer zweistufigen Funktionalisierung erfolgen, indem nach dem *Grafting-to*-Schritt des entsprechenden Glykopolymers ein weitaus kleineres, säurefunktionalisiertes Molekül zum Abreagieren der Amine in das Reaktionsgemisch gegeben wird. Mit monovalenter Mannose funktionalisierte Partikel könnten ebenfalls hinsichtlich ihres Aggregationsverhaltens den im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen (Janus-)Partikeln verglichen werden.

3.4 Sulfatisierte Glykopolymere

Neben Studien mit Lektinen und Bakterien werden Glykopolymere auch hinsichtlich ihres Inhibierungsverhaltens von Viren untersucht. Frühe potenzielle Anwendungsziele von Glykopolymeren war die Inhibierung von Influenzaviren, die mit Hilfe von Polysialylsäurederivaten deaktiviert werden sollten.^[36, 49, 50, 200] Hierbei besetzen die Zuckerliganden der Glykopolymere die Bindungsstellen des Virus, die dieser für die Adhäsion an der Zelloberflächen nutzt. Durch diese Blockierung wird die Adhäsion und somit auch die Infektion verhindert. Eine wichtige Klasse natürlicher Polysaccharide, die zur Inhibition verschiedener Viren genutzt werden kann, sind die Glycosaminoglycane. Hierbei handelt es sich typischerweise um hochsulfatisierte Polysaccharide wie das Carrageen oder Heparin.^[201, 202] Auch für diese natürlichen Strukturen ist es daher von Interesse, synthetische Mimetika, z.B. auf Basis von Glykopolymeren, zu erzeugen und auf ihre biologischen Eigenschaften, hier die Inhibition der viralen Adhäsion, zu testen. Sebastian Bauer aus der Arbeitsgruppe Hartmann konnte im Rahmen seiner Arbeiten ein Protokoll zur globalen Sulfatisierung von synthetischen Glykooligomeren entwickeln.^[203] Die erhaltenen sulfatisierten Glykooligomere wurde dann durch die Kooperationspartner in Münster auf ihr Inhibitions Potenzial gegen verschiedene Viren getestet. Im Rahmen dieser Arbeiten sollten zum Vergleich insbesondere des Effekts der Kettenlänge und Valenz auch langkettige Glykopolymere zum Einsatz kommen. Hierzu wurden insgesamt drei verschiedene Glykopolymere unterschiedlicher Kettenlänge und Saccharideinheit synthetisiert und anschließend sulfatisiert, wie in Tabelle 17 dargestellt: pMan2CM₈₆, pGal2CA₄₀ und pGal2CA₄₆.

Tabelle 17: Übersicht der sulfatisierten Glykopolymere.

Polymer	Einwaage [mg]	Ausbeute [mg]
pMan2CA ₈₆ S	5.0	7.5 (62.5 %)
pGal2CA ₄₀	14.5	27.3 (76.2 %)
pGal2CA ₄₆	34.0	32.6 (38.8 %)

In den Untersuchungen der Kooperationspartner zeigten diese sulfatisierten Glykopolymeren erfolgreiche Inhibierung von Papillomaviren, sowie Herpes - und Influenzaviren.^[53]

4. Fazit und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war die Konzeption zweier unterschiedlicher Bioassays, die mit Hilfe von Glykopolymeren zugänglich sind. Zunächst wurden hierzu erfolgreich Monomere auf Mannose- und Galaktosebasis auf zuvor nicht beschriebenem Wege synthetisiert, die mittels RAFT-Polymerisation umgesetzt wurden. Auf diese Weise wurden geringdisperse Glykopolymere erhalten, die Carboxy-Gruppen an dem einen und Thiol-Gruppen an dem anderen Kettenende der Polymere präsentieren.

Die Thiole erlaubten die Beschichtung von Goldoberflächen durch Selbstassemblierung, sodass die Glykopolymere im Rahmen von Oberflächenplasmonenresonanzmessungen hinsichtlich ihrer Wechselwirkung mit dem Modelllektin ConA (Concanavalin A) untersucht werden konnten. Hierzu erfolgte zunächst eine Optimierung der Immobilisierungsbedingungen, um die Interaktionsstudien mit ConA reproduzierbar durchführen zu können. Die Wechselwirkungen mit ConA wurden wiederum in zwei verschiedenen Versuchsanordnungen betrachtet – einem Direktbindungsassay und einem Inhibitions-Kompetitionsassay. Im Direktbindungsassay zeigt sich, dass ConA stärker an längere Glykopolymere bindet. Aus diesem Grund waren die Ergebnisse der Inhibitions-Kompetitionsstudien überraschend. Während mit monovalenter α -Methylmannose ConA besser gegen die Oberfläche mit dem kürzeren Glykopolymer abgeschirmt werden konnte, inhibierten die Glykopolymere das Lektin besser gegen das längere Glykopolymer. Dieses Ergebnis bietet einen Ansatzpunkt für weiterführende Arbeiten. Es zeigte sich, dass nicht nur der Inhibitor oder das zu inhibierende Glykopolymer auf der Oberfläche, sondern ein Wechselspiel beider Komponenten die Inhibierung von ConA beeinflusst. In der Literatur wird in der Regel aus Komplexitätsgründen lediglich eine der beiden Komponenten auf einmal variiert. Die im Rahmen dieser Arbeit erfolgte Betrachtung unterschiedlicher Inhibitoren-Oberflächenglykopolymer-Paare lässt jedoch eine komplexere Interaktion vermuten. Aus den gewonnenen Ergebnissen bleibt offen, in welcher Art diese gegenseitigen Wechselwirkungen

voneinander beeinflusst werden. Insbesondere bei der der Bindung von ConA an längere oberflächengebundene Glykopolymere deuten die Resultate dieser Arbeit an, dass die Inhibierung mit längeren Glykopolymeren leichter zu einer vollständigen Inhibierung von ConA führt, als dies bei kürzeren Glykopolymeren der Fall ist. Im Gegensatz zu den längeren Glykopolymeren erfolgt die Inhibierung pro Mannoseeinheit effektiver. Durch weitere Variation der oberflächengebundenen Glykopolymere könnte dieser Frage im Detail nachgegangen werden. Auch die Inhibitoren könnten genauer betrachtet und stärker variiert werden. Neben einer größeren Breite unterschiedlich-langer Glykopolymere könnten auch Moleküle mit deutlich geringerer Kohlenhydratvalenz von Interesse sein. Hierbei sind die vielseitigen Oligoamidoamine in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Laura Hartmann zu erwähnen, die eine interessante Bibliothek vergleichbarer Inhibitoren darstellen.

Im zweiten Teil der Arbeit ermöglichten die Carboxy-Endgruppen der Glykopolymere deren Auftragung auf Partikel, die über freie Amine verfügen. Hierbei wurden sowohl Partikel erhalten, die rundherum Glykopolymere präsentierten, als auch halbseitig glykosylierte Januspartikel. Im Rahmen von Fluoreszenzmikroskopie- und Trübungsstudien wurden die unterschiedlichen Partikel in Anwesenheit des Bakteriums *Escherichia Coli* miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, dass alle Partikel – sowohl die mannosylierten als auch die Negativkontrollen - im längeren Zeitverlauf Aggregate ausbildeten. Es wird vermutet, dass die nicht-vollständig umgesetzten Amine zu einer unspezifischen Aggregation beitragen. Dennoch konnten deutliche Unterschiede zwischen Positiv- und Negativkontrollen beobachtet werden, denn mannosylierte Partikel bildeten schneller und größere Aggregate aus als die Referenzpartikel. Auch zwischen Janus- und Nicht-Januspartikel konnten Unterschiede beobachtet werden. Die Januspartikel bildeten genauso schnell Aggregate wie die vollständig-funktionalisierten Partikel, allerdings waren diese Aggregate im Zeitverlauf weniger stark ausgeprägt. Diese Ergebnisse zeigen, dass die erhaltenen Partikel in der Tendenz das erwartete Bindungsverhalten aufweisen. Allerdings verzerren die nicht-umgesetzten Amine den Vergleich. Aus diesem Grund sollte in weiterführenden Arbeiten auf einen vollständigen Umsatz der Amine geachtet werden - unter Umständen mittels nachträglicher Reaktion mit niedermolekularen Edukten. Eine weitere Möglichkeit

bietet der Vergleich verschieden-valenter Verbindungen auf den Partikeln. Es bieten sich auch hier monovalente Mannosestrukturen, aber auch Oligomere und Glykopolymere unterschiedlichster Molekülarchitektur an.

5. Experimentalteil

5.1 Chemikalien und Analytische Methoden

5.1.1 Chemikalien

Acetonitril (99.9 %, HPLC-grade), Amberlite IR-120, Bortrifluorid-Diethyletherat (Reinheitsgrad: für Synthese geeignet), konzentrierte Salzsäure (p.a.), deuteriertes Chloroform, Diethylether (p.a.), 2-(Dodecylthiocarbonothioylthio)-2-methylpropionsäure, Dichlormethan (p.a.), D-(+)-Mannose (99 %), *N*-Hydroxyethylacrylamid, *N*-Hydroxysuccinimid (98 %), Ethylacetat (p.a.), auf Aktivkohle-immobilisiertes Palladium (10 wt. % Palladium), Natriumtetraborhydrid, Natriumchlorid (98 %), Schwefelsäure (purum), Trimethylsilyltrifluormethansulfonat (99 %) und Tetrahydrofuran (p.a.) wurden von *Sigma-Aldrich* erworben.

Chloroform (Analysenrein), Magnesiumsulfat (trocken) und Natriumhydrogencarbonat wurden von *Fisher Scientific* bereitgestellt.

Azobis(isobutyronitril) (AIBN) (98 %), Dimethylformamid (DMF) (für Peptidsynthesen geeignet) und Sulfurtrioxidtrimethylamin wurden von *ACROS Organics* erworben.

2-Bromoethanol (97 %), 2-(2-Aminoethoxyethanol) (98 %), Ethyltrifluoracetat (99 %), para-Toluolsulfonsäure (98 %) und Natriumhydroxid (98 %) wurden bei *Alfa Aesar* erworben.

Diisopropylamin (>99 %), Ethanolamin, Ethylenediamin (99.5 %), 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid (99.9 %), Indiumbromid und *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) (> 99 %) wurden von *Carl Roth* gekauft.

Methanol (p.a.), Essigsäureanhydrid (99.7 %) and Natriumdithionit wurden von *VWR BDH Prolabo Chemicals* erworben.

1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene, β -D-Galactosepentaacetat und Trichloroacetonitril wurden von *fluorochem* erworben.

Natrium-L(+)-ascorbat, Ninhydrin und Phenol wurden von *Panreac AppliChem* erworben.

4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholiniumchlorid Hydrat (DMTMM) (95 %) und Benzotriazol-1-yloxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat (PyBOP) wurden von *Carbolution* erworben.

Natriumsulfat (wasserfrei) wurde bei *Caelo* erworben.

Triethylamin (99.5 %) wurde bei *AppliChem* gekauft.

Ameisensäure wurde von *Riedel de Hean* erworben.

Essigsäure (purum) wurde von *Honeywell* erworben.

Kupfer(II)-sulfat wurde von *Fluca(coelfen)* erworben.

2-Cyano-2-propyldodecyltrithiocarbonat wurde bei *abcr* gekauft.

Kaliumcyanid wurde von *Merck* erworben.

Wasser wurde mittels eines Milli-Q-systems von Merck Millipore mit einer finalen Leitfähigkeit von 18 MΩcm erhalten.

Der Baustein EDS sowie das Oligomer TDS-EDS-EDS mit terminaler Carboxygruppe wurde von Dana Itskalov bereitgestellt.

5.1.2 Geräte und Methoden

Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR): ^1H -NMR-Spektren wurden bei Raumtemperatur (RT) mit einem AVANCE III 300 (bei 300 MHz) und 600 (bei 600 MHz) aufgenommen. Als interne Standards wurden die chemischen Verschiebungen in Relation zum Signal des nicht-deuterierten Anteils des verwendeten Lösungsmittels gesetzt. Die Angaben werden in δ als in parts per million (ppm) angegeben und die Multiplizitäten werden abgekürzt als s für Singulett, d für Douplett, t für Triplett und m für Multiplett.

Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS): ESI-MS-Spektren wurden mit einem Massenspektrometer mit Ionenfalle des Typs API von Finningan LCQ Deca aufgenommen.

Ultra-High-Resolution Mass Spectrometry (UHR-MS): UHR-MS-Spektren wurden mit einem Bruker UHR-QTOF maXis 4G mit Direkteinlass via Spritzenpumpe und ESI-Quelle gefolgt von einem Quadrupol-Flugzeit (quadrupole Time Of Flight, QTOF) Massenanalysator aufgenommen.

Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time Of Flight (MALDI-TOF): MALDI-TOF-Spektren wurden mit einem MALDI-TOF Ultraflex I von Bruker Daltonics aufgenommen. Als Matrix diente trans-3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure gelöst in einer Mischung aus Wasser und Acetonitril im Verhältnis 2:1 v/v.

Elementaranalyse: Der Anteil von Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff und Schwefel konnte mit einem Vario Micro Cube von der Analysensysteme GmbH bestimmt werden. Durchgeführt wurde die Elementaranalyse am Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Gefriertrocknung: Lyophilisation wurde mit einem Gefriertrockner mit der Bezeichnung Alpha 1-4 LD und einer Vakuumpumpe von Martin Christ Freeze Dryers GmbH durchgeführt. Die Arbeitstemperatur betrug $-42\text{ }^{\circ}\text{C}$ bei einem Druck von 0.1 mbar während der gesamten Prozedur der Gefriertrocknung.

Zeta-Potenzial: Die Bestimmungen des Zeta-Potenzials erfolgten mit Hilfe des Nano-Z Zetasizers der Firma *Malvern Pananalytical Ltd.* und die untersuchten Proben wurden hier zu in eine DTS1070 Kapillarzelle gefüllt. Die Messungen erfolgten bei 20 °C unter Verwendung der Zetasizer-Software mit der Versionsnummer 7.11 (ebenfalls von *Malvern Pananalytical Ltd.* bereitgestellt).

Dynamic Light Scattering (DLS): Messungen der dynamischen Lichtstreuung (engl. dynamic light scattering) zur Bestimmung der Partikeldurchmesser und dessen Verteilung wurden mit Hilfe eines Nicomp 3000 der Firma *Particle Sizing Systems* durchgeführt.

UV/VIS: Spektroskopie mit UV-Licht bzw. sichtbarem Licht wurde mit Hilfe eines Specord® 2010 Plus Spektrometers der Firma Analytik Jena AG bei 25 °C durchgeführt. Zur Analyse der Messungen wurde die Software Win ASPECT PLUS herangezogen. Neben Polystyroleinwegküvetten der Firma Sarstedt mit den Maßen 10x4x45 mm wurden auch QX Quartz-Küvetten verwendet.

Gelpermeationschromatographie (GPC): Gelpermeationschromatographie wurde mit einem Agilent 1200 series HPLC System und drei wässrigen GPC-Säulen von Polymer Standards Service (PSS) durchgeführt. Von den drei verwendeten Säulen waren zwei vom Typ Suprema Lux analytical columns (8 mm im Durchmesser und 5 µm Partikelgröße) und eine Vorsäule (50 mm, 2x 160 Å mit 300 mm und 1000 Å mit 300 mm). Als Eluent fungiert ein Puffersystem bestehend aus MilliQ-Wasser und 30 % Acetonitril mit 50 mM NaH_2PO_4 , 150 mM NaCl und 250 ppm NaN_3 mit einem pH-Wert = 7.0 (erreicht durch Hinzugabe von 50 mL 3-molarer Natronlauge überprüft mit einer pH-Elektrode). Das Puffersystem wurde mit einem im Gerät integrierten Membranfilter (0.1 µm Porengröße) bei 0.8 mL pro Minute über die GPC-Säulen gegeben. Als Detektoren dienten ein Lichtstreuendetektor (MALS) des Typs mimDAWN TREOS und ein Brechungsindexdetektor des Typs Optilab rEX von Wyatt Technologies EU. Die Daten wurden mit einer Astra 5 Software ausgewertet und ein Brechungsindex von 0.156 wurde für jedes Glykopolymer zugrunde gelegt.

Oberflächenplasmonenresonanzmessungen (SPR): Immobilisierung der Glykopolymere und Messungen der Oberflächenplasmonenresonanz wurden auf einem Biacore X100 mit Biacore X100 Kontrollsoftware von GE Healthcare durchgeführt. Zur Evaluation der Sensorgramme wurde die Biacore X100 Evaluationssoftware verwendet.

Immobilisierungsprotokoll: Zur Durchführung von Direktbindungsstudien von Concanavalin A (ConA) gegen eine Oberfläche, die mit Glykopolymeren funktionalisiert ist, und daran anschließende Inhibitions-Kompetitions-Studien mit verschiedenen Inhibitoren wurde ein „Sensor Chip Au“ von GE Healthcare verwendet. Dieser Sensorchip weist auf der dem Flusskanal zugewendeten Seite eine unfunktionalisierte Goldoberfläche auf. Zur Funktionalisierung dieser Goldoberfläche werden grundsätzlich 2 verschiedene Varianten unterschieden: Die Immobilisierung mit vorgegebenem Ziellevel und die Immobilisierung über eine festgelegte Kontaktzeit. In beiden Fällen bildet das thiofunktionalisierte Ende des Glykopolymers mit dem Gold eine kovalente Schwefel-Gold-Bindung aus. Auf diese Weise funktionalisierte Goldoberflächen werden als selbstassemblierende Monoschicht (engl. „*self-assembling monolayer*“, SAM) bezeichnet. Außerdem muss zwischen einer homogenen (SAM) und einer heterogenen (Co-SAM) Funktionalisierung unterschieden werden. Letztere werden im Anschluss an die Immobilisierungsschritte näher erläutert und werden durch einen weiteren Schritt der SAM-Erzeugung, wie unten beschrieben, erhalten.

Zur Vorbereitung der Immobilisierung wird das Biacore X100 mit MilliQ-Wasser durchgespült und der Sensorchip wie vorgesehen in das Gerät eingelegt. Die zu immobilisierenden Polymere werden angelehnt an Toyoshima et al. ^[107] zu jeweils 1.0 mg/mL in MilliQ-Wasser gelöst und entsprechend der vom Gerät angegebenen Menge in die vorgelegten Behältnisse gegeben. Die benötigte Menge hängt von der gewählten Methode zur Immobilisierung ab. Bei einer SAM-Ausbildung mit vorgegebener Kontaktzeit werden bei einer Flussrate von 5 µL/min 1000 s als Zeit vorgegeben und somit liegt der Bedarf bei 123 µL. Da eine Funktionalisierung beider Flusszellen nacheinander in einer Funktionalisierungssequenz erfolgt, werden sowohl Mannose- als auch Galaktose-haltiges Glykopolymere zeitgleich vorgelegt (pMan2CA₂₆, pMan2CA₄₀ und pMan2CM₈₆ sowie pGal2CA₂₂,

pGal2CA₃₇ und pGal4CM₅₅). Nach erfolgter Funktionalisierung der Flusszellen wird das vom System angegebene *Responselevel* vermerkt und bei Bedarf wird erneut immobilisiert. Bei erwünschter Erzeugung eines Co-SAMs wird der Chip im Anschluss an die Funktionalisierung aus dem Gerät entfernt und kurz mit MilliQ-Wasser abgespült. Anschließend wird ein Tropfen des gewünschten Polymers mit 1 mg/mL auf den gesamten Sensorchip gegeben, sodass beide Flusszellen benetzt sind. Der Chip wird für 24 Stunden bei Raumtemperatur gelagert und erneut in das Biacore-System eingelegt. Durch einen sogenannten „Manual Run“ mit MilliQ-Wasser als Eluent wird das *Responselevel* erneut bestimmt und somit die funktionalisierte Menge Polymer abgeschätzt.

Direktbindungsstudien: Zur Bestimmung der Affinität von ConA gegen die funktionalisierten Oberflächen wird das System zunächst mit *Lectin Binding Buffer* (MilliQ-Wasser mit 50 mM Natriumchlorid, 10 mM Hepes, 1 mM Manganchlorid und 1 mM Calciumchlorid, mit 3 M Natronlauge auf einen pH-Wert = 7.40 gebracht) gespült und für mehrere Tage equilibrieren lassen, mindestens jedoch acht Stunden. Danach werden die Messungen wie nachfolgend beschrieben durchgeführt, bis sich reproduzierbare Werte ergeben: Bei einem Fluss von 10 µl/min und einer Regeneration mit 0.8 M α-Methylmannose werden in einem sogenannten „*Single Cycle Kinetics*“-Modus 5 verschiedene Konzentrationen ConA nacheinander über beide Flusszellen gegeben. Die Konzentrationen reichen von $3.17 \cdot 10^{-6}$ bis $3.91 \cdot 10^{-8}$ mmol/mL bei einem Verdünnungsfaktor von 3 und werden angepasst, falls der berechnete k_d -Wert nicht nahe der mittleren Konzentration liegt.

Inhibitions-Kompetitions-Messungen: Zur Quantifizierung der Inhibitionsfähigkeit der synthetisierten Glykopolymere und α-Methylmannose von ConA in LBB gegen die erzeugten Goldoberflächen erfolgt die Bestimmung von IC₅₀-Werten im Rahmen eines Inhibitions-Kompetitions-Assays. Hierzu werden in einem „Multi Cycle“-Modus verschiedene Konzentrationen der Inhibitoren gegen eine fixe Konzentration ConA ($0.11 \text{ mg/mL} \pm 0.117 \text{ µM}$) gemessen. Folgende Bedingungen werden verwendet: Die Flussrate beträgt 10 µl/min, die Kontaktzeit beträgt 180 s, die Dissoziationszeit liegt bei 270 s und die Regeneration erfolgt zwei Mal mit 0.8 M α-Methylmannose für 90 s, gefolgt von einer Stabilisierungsphase von 150 s am Ende jeder Messung. Die Responseunits für eine Bindung werden

nach 191 s nach Zyklusbeginn genommen. Es werden zwei Messreihen pro Inhibitor gemessen und die mittlere Konzentration nahe der kalkulierten IC_{50} -Konzentration wird nochmals am Ende einer jeden Messreihe erneut vermessen, um den Fehler zu bestimmen und eventuelle Messungenauigkeiten erklären zu können. Außerdem wird in jeder Messreihe eine Messung nur mit ConA ohne Anwesenheit von Inhibitor durchgeführt, dessen Signal auf 100 % gesetzt wird. Messungen mit ausschließlich LBB bilden die 0 %-Inhibierung ab. Die Messungen mit Inhibitor werden nun in Relation zu den Messungen mit ConA gesetzt und in einem Graphen aufgetragen. Mittels eines Hill1-Fits werden die IC_{50} -Werte bei 50 % Inhibierung abgeschätzt und miteinander verglichen. Gegebenenfalls werden „synthetische Werte“ generiert, falls die 100 %-ige Inhibition durch so hohe Konzentrationen erfolgen muss, dass die detektierte *Responseunit* vom Brechungsindex des Inhibitors beeinträchtigt wird.

Kaisertest: Zur Quantitativen Bestimmung freier α -Aminogruppen werden diese gemäß eines modifizierten Protokolls von Dieter Müting und Eberhard Kaiser mit Ninhydrin zum blauvioletten Farbstoff „Ruhemanns Purpur“ umgesetzt.^[204] Der gebildete Farbstoff kann anschließend quantitativ mittels UV/VIS-Spektroskopie nachgewiesen werden, wodurch die Konzentration der Aminogruppen pro Masse Partikel berechnet werden kann. Hierfür werden drei verschiedene Reagenzien benötigt: 0.01 M wässrige Kaliumcyanid-Lösung in Pyridin, 50 g/L Ninhydrin in Ethanol und 2 g/L Phenol in Ethanol. Jeweils 1.0 mg der Partikel werden in 100 μ L MilliQ-Wasser gelöst und mit 1,567 μ L Ethanol verdünnt. Anschließend werden jeweils 111 μ L jeder der drei Lösungen hinzugegeben und das Reaktionsgemisch auf 100 °C für 5 Minuten erhitzt. Die Extinktion wird mittels UV/VIS-Spektroskopie bei 570 nm gemessen und die Werte mit einer Kalibriergeraden verglichen.

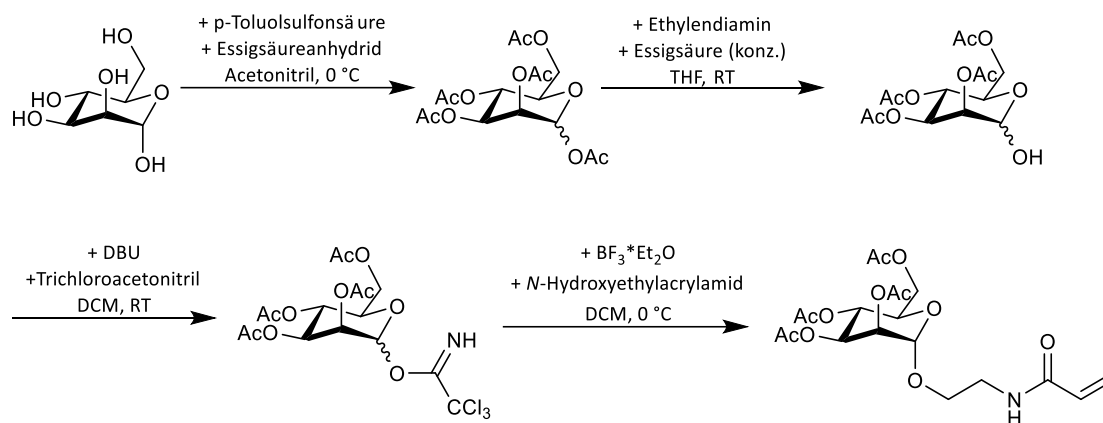
Phenol-Schwefelsäure-Methode: Diese Methode folgt der Durchführung von Boden et al., welche wiederum an den Arbeiten von Dubois et al. sowie Gerchakov und Hatcher angelehnt ist, und dient der Bestimmung der Zuckerkonzentration auf den synthetisierten Partikeln.^[205-207] Zunächst wird eine Konzentrationsreihe verschiedener Konzentrationen α -Methylmannose angesetzt. Die Konzentrationen betragen 0.025, 0.05, 0.1, 0.225, 0.45 und 0.90 mmol/mL α -Methylmannose in MilliQ-Wasser. Von jeder Konzentration sowie einer Blindprobe MilliQ-Wasser wurden 250 μ L in ein

5 mL Eppendorf-Gefäß gefüllt und anschließend mit 250 µL 5 %-iger wässriger Phenollösung vermischt. Anschließend wurden 1250 µL konzentrierte Schwefelsäure hinzugegeben und das Eppendorf-Gefäß wurde nach der einsetzenden exothermen Reaktion stark geschüttelt, um eine vollständige Durchmischung zu erzielen. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 30 °C im Wasserbad wurden die Zuckerkonzentrationen mit Hilfe des SPECORD® 210 Plus dual-trace Spektrometers der Analytik Jena AG analysiert (für weitere Details siehe oben). Hierzu wurde ein Intervall von 450 -550 nm gescannt und die Intensität bei 490 nm wurde detektiert. Die Messtemperatur betrug 25 °C und als Referenz wurde MilliQ-Wasser verwendet. Als Probengefäß dienten einmalig verwendbare Polystyrol-Küvetten von Sarstedt mit den Maßen 10x4x45 mm. Die Intensität der Blindprobe wurde von jeder Konzentration subtrahiert. Jede Konzentration wurde insgesamt drei Mal angesetzt und gemessen, anschließend wurden Durchschnittswerte berechnet und aus diesen Werten lineare Funktionsgleichung abgeleitet. Mit Hilfe dieser Standardkurve wurden verschiedenen gemessenen Intensitäten eine Zuckerkonzentration zugeordnet, die nach der Aufbringung von Glykopolymeren auf die Partikel detektiert wurden. Als Blindprobe wurden hierfür die jeweiligen Partikel herangezogen.

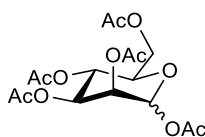
Bakterienkultivierung: Der Stamm PKL1162 der Bakterie *Escherichia Coli* (*E. Coli*) wird über Nacht bei 37 °C und 100 rpm in einem sterilisierten Reagenzglas gefüllt mit ca. 15 mL LB-Medium kultiviert. Für das Kultivierungsmedium werden 12.5 g LB Broth (Miller) (*powder microbial growth medium*) in 500 mL ultrareinem Wasser gegeben und dieses unter Rühren gelöst. 500 mL des Mediums enthalten 5.0 g Tryptone, 5.0 g NaCl und 2.5 g Hefeextrakt. Das Medium wird anschließend für 30 min bei 121 °C sterilisiert, auf RT abgekühlt und anschließend mit 50.0 mg Ampizilin und 25.0 mg Chloramphenicol versetzt. Die Bakterienlösung wird am Folgetag bei 2000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und das Pellet mit ultrareinem Wasser gewaschen. Dieser Prozess wird noch einmal wiederholt und die Bakterien werden wiederrum in ultrareinem Wasser gelöst, bis eine optische Dichte von 0.4 eingestellt ist, welche in etwa einer Bakterienkonzentration von 2.0 mg/mL entspricht.

5.2 Monomersynthesen

5.2.1 Synthese von *N*-[2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyloxy)ethyl]acrylamid (4)

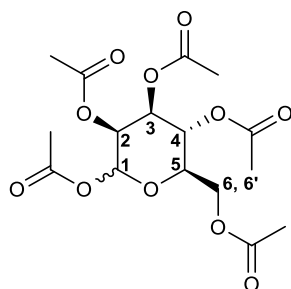


5.2.1.1 Synthese von Penta-*O*-acetyl- α -D-mannopyranose (1)



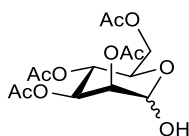
Die Peracetylierung von α -D-Mannose wird, wie bereits in meiner Masterthesis beschrieben^[159], angelehnt an Watt und Williams sowie an Ponader et al. durchgeführt.^[81, 208] In 250 mL Acetonitril werden 20 g α -D-Mannose [11 mmol] und 2.4 g para-Toluolsulfonsäure vorgelegt und im Eisbad für eine Stunde unter Rühren gekühlt. Anschließend werden tropfenweise 70 mL [740 mmol] Essigsäureanhydrid zur weißen Suspension hinzugegeben. Innerhalb der nächsten vier Stunden wird das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur erwärmt und das Edukt geht in Lösung über. Der Reaktionsfortschritt wird mittels Dünnschichtchromatographie (DC) überprüft (Verhältnis Ethylacetat:n-Hexan = 1:1 v/v, R_f = 0.7). Nach Umsatz des gesamten Edukts wird das Lösungsmittel entfernt bis eine braune, hochviskose Flüssigkeit zurückbleibt. Diese wird in Ethylacetat gelöst und die somit erhaltene organische Phase wird mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen, bis kein Entgasen zu beobachten ist. Die organische Phase wird daraufhin mit destilliertem Wasser und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen und schließlich über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach

Entfernen des Ethylacetats wird ein leicht-gelbliches Öl erhalten, welches über längere Zeit zu weißen Kristallen auskristallisiert [40.3 g, 103.33 mmol, 94 % Ausbeute].

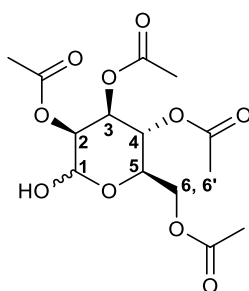


¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 6.07 (d, ³J_{H1 α -H2} = 1,85 Hz, 1H, H1 α), 5.85 (d, ³J_{H1 β -H2} = 1.09 Hz, 0.6H, H1 β), 5.48 (dd, ³J_{H2-H3} = 3.28 Hz, 0.6H, H2 β), 5.36 – 5.31 (m, 2H, H2 α , H4 α), 5.28 (t, ³J_{H3-H4/H4-H5} = 4.7 Hz, 0.6H, H3 β), 5.25 (t, ³J_{H1-H3} = 2.2 Hz, 1H, H3 α), 5.13 (dd, ³J_{H5-H4} = 10.0 Hz, ²J_{H4-H3} = 3.3 Hz, 0.6H, H4 β), 4.32 – 4.25 (m, 1.6H, H5 α , H5 β), 4.16 – 4.08 (m, 3H, H6 α , H6 β , Ethylacetat enthalten), 4.07 – 4.03 (m, 1H, H6' α), 3.80 (ddd, ⁴J_{H6'-H4} = 9.90 Hz, ³J_{H6'-H5} = 5.83 Hz, ²J_{H6'-H6} = 2.31 Hz, 0.6H, H6' β), 2.19 – 2.01 (m, 28H, -CH₃, Ethylacetat enthalten) ppm.

5.2.1.2 Synthese von 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranose (2)

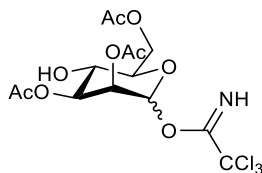


Die Deacetylierung der anomeren Hydroxygruppe von 1,2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranose (**1**) wird gemäß dem Protokoll von Zhang und Kováč durchgeführt.^[209] Hierzu werden 2.15 mL [34.14 mmol] Ethylendiamin und 500 mL Tetrahydrofuran vorgelegt und bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden 2.15 mL [39.8 mmol] Eisessig tropfenweise unter Ausbildung eines weißen Niederschlags hinzugegeben. 11.1 g [28.45 mmol] **1** werden in weiteren 200 mL Tetrahydrofuran solvatisiert und tropfenweise zur weißen Suspension hinzutropft. Der Umsatz wird mittels TLC verfolgt (Verhältnis Ethylacetat:n-Hexan = 1:1 v/v, R_f = 0.5) und nach 12 h ist das Edukt vollständig umgesetzt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und in 300 mL Wasser resolvatisiert. Aus dieser wässrigen Lösung wird nun mittels 3 x 300 mL Dichlormethan das Produkt extrahiert und die erhaltene organische Phase wird wiederum drei Mal mit jeweils 300 mL 1 M Salzsäure und mit drei Mal mit je 300 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Eventuelles Restwasser wird mit gesättigter Kochsalzlösung und anschließender Trocknung über Magnesiumsulfat entfernt. Final wird das Lösungsmittel entfernt und 8.36 g eines transparenten und hochviskosen Öls erhalten [24.0 mmol, 84 % Ausbeute].

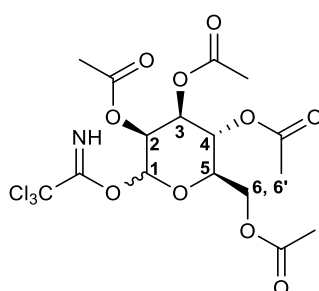


$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 5.46 – 5.39 (dd, 1H), 5.36 – 5.21 (m, 3H), 4.31 – 4.09 (m, 3H), 3.30 (s, 1H, -OH), 2.21 (s, 0.1H, -CH₃, Anomer), 2.16 (s, 3H, -CH₃), 2.11 (s, 3H, -CH₃), 2.05 (s, 3H, -CH₃), 2.00 (s, 3H, -CH₃) ppm.

5.2.1.3 Synthese von 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyltrichloroacetimidat (**3**)

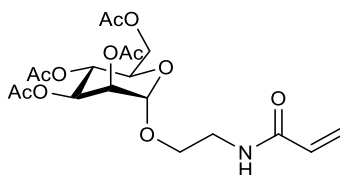


Die Synthese von 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyltrichloroacetimidat (**3**) wurde nach den Reaktionsprotokollen der Gruppen Fekete et al. und Wu und Sampson durchgeführt.^[10, 210] Unter Argongegenstrom und mit Hinzugabe von Molekularsieb (2 Å) werden 8.36 g **2** in 150 mL Dichlormethan vorlegt. Unter Rühren erfolgt die Zugabe von 350 μ L [2.4 mmol] 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU), wodurch die Lösung eine gelbliche Farbe annimmt. Nach 30 Minuten werden 2.65 mL [26.4 mmol] Trichloroacetonitril tropfenweise hinzugegeben, welches eine weitere Änderung der Farbigkeit der Lösung in Richtung orange auslöst. Nach sechs Stunden nimmt die Lösung eine bräunliche Farbe an und es kann mittels DC kein Edukt mehr nachgewiesen werden (Verhältnis Ethylacetat : n-Hexan = 3:7, R_f = 0.8). Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und es werden 5.17 g einer hochviskosen und leicht gelben Substanz erhalten [10.8 mmol, 45 % Ausbeute].

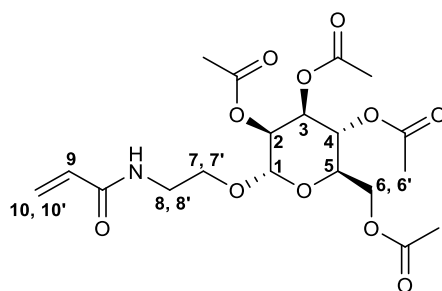


$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 8.78 (s, 1H, =NH), 6.27 (d, 1H, H1), 5.00 – 5.44 (m, 1H), 5.44 – 5.34 (m, 2H), 4.34 – 4.06 (m, 4H, Ethylacetat), 2.19 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.07 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.06 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.00 (s, 3H, $-\text{CH}_3$) ppm.

5.2.1.4 Synthese von *N*-[2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyloxy)ethyl]acrylamid (**4**)



Die Synthese von *N*-[2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyloxy)ethyl]acrylamid (**4**) wird angelehnt an die Protokolle beider Gruppen Wu und Sampson sowie Gu et al. durchgeführt.^[10, 211] Unter Argonatmosphäre werden 5.17 g [10.8 mmol] **3** in 70 mL Dichlormethan solvatisiert und in einem Eisbad mit 1 °C Wassertemperatur gekühlt. Es werden 1.3 mL [10.8 mmol] Bortriflouriddiethyletherat hinzugegeben und für 45 Minuten gerührt. In diesem Zeitraum nimmt die Suspension eine hell-gelbe Farbe an. Anschließend werden 4.2 mL [36.8 mmol] *N*-Hydroxyethylacrylamid solvatisiert in 30 mL Dichlormethan tropfenweise hinzugegeben. Nach 30 bzw. 60 Minuten wird der Umsatz mittels DC überprüft (Verhältnis Ethylacetat:n-Hexan = 1:1 v/v, R_f = 0 bzw. in Ethylacetat: R_f = 0.5) und es kann keine weitere Veränderung beobachtet werden. Das Reaktionsgemisch wird zwei Mal mit jeweils 100 mL Eiswasser und zwei Mal mit jeweils 100 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen und anschließend mit Natriumsulfat getrocknet. Das Dichlormethan wird unter vermindertem Druck entfernt und das Produktgemisch wird in zwei Schritten mit Hilfe einer Kombiflash aufgereinigt. Zunächst wird das Produktgemisch in Ethylacetat gelöst und auf die Silikageleinsäule aufgetragen. Im ersten Schritt werden nun die Edukte und eventuelle Nebenprodukte mit einem Laufmittel bestehend aus n-Hexan und Ethylacetat (im Verhältnis 1:1, v/v) entfernt. Im zweiten Schritt wird mit Ethylacetat als Laufmittel das Produkt von der Säule gespült und in mehreren Fraktionen aufgefangen. Diese Fraktionen werden vereinigt und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck vorsichtig unter milden Bedingungen entfernt (Temperatur < 40 °C, Druck > 100 mbar), da ansonsten eine unkontrollierte Polymerisation des Produkts hervorgerufen werden könnte. Nach Entfernen des Lösungsmittels werden 0.75 g eines farblosen und äußerst klebrigen Gels erhalten [1.68 mmol, 15.5 % Ausbeute, 100 % α -Anomer].

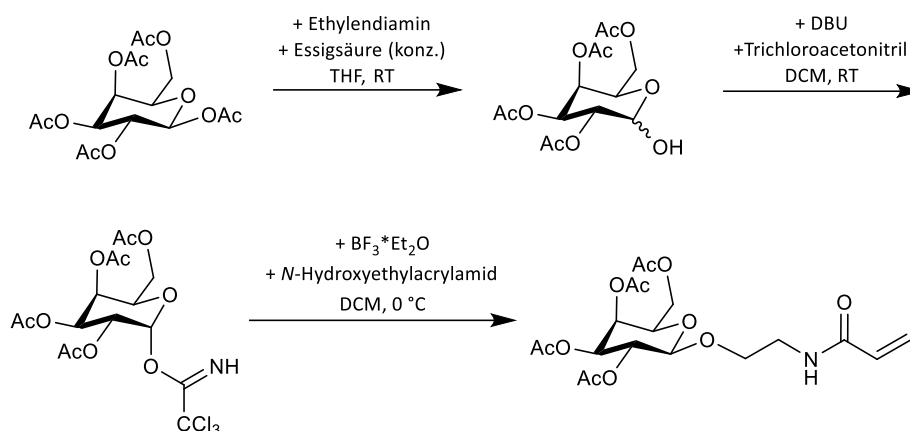


$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 6.32 (dd, $^3J_{\text{H10-H10}'} = 16.98$ Hz, $^2J_{\text{H10-H10}'} = 1.67$ Hz, 1H, **H10**), 6.16 (dd, $^3J_{\text{H9-H10}} = 16.9$ Hz, $^3J_{\text{H9-H10}'} = 10.0$ Hz, 1H, **H9**), 6.10 – 6.00 (m, 1H, -NH-), 5.65 (dd, $^3J_{\text{H10'-H9}} = 10.10$ Hz, $^3J_{\text{H10'-H10}} = 1.63$ Hz, 1H, **H10'**), 5.37 – 5.20 (m, 3H), 4.82 (d, $^3J_{\text{H1-H2}} = 1.44$ Hz, 1H), **H1 α**), 4.25 (dd, $^3J_{\text{H4-H3}} = 12.32$ Hz, $^3J_{\text{H4-H5}} = 5.81$ Hz, 1H, **H4**), 4.12 (dd, $^3J_{\text{H3-H4}} = 12.21$ Hz, $^3J_{\text{H3-H2}} = 2.45$ Hz, 1H, **H3**), 3.98 (ddd, $^3J_{\text{H5-H6}} = 9.57$ Hz, $^3J_{\text{H5-H4}} = 5.63$ Hz, $^3J_{\text{H5-H6}'} = 2.42$ Hz, 1H, **H5**), 3.86 – 3.75 (m, 1H), 3.75 – 3.45 (m, 3H), 2.15 (s, 3H, -**CH₃**), 2.09 (s, 3H, -**CH₃**), 2.05 (s, 3H, -**CH₃**), 2.00 (s, 3H, -**CH₃**) ppm. HR-ESI:

m/z berechnet für **4** + H^+ : 446.16; gefunden: 446.1658

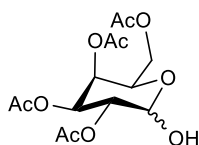
m/z berechnet für **4** + D^+ : 447.16; gefunden 447.1689

5.2.2 Synthese von *N*-[2-(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-galactopyranosyloxy)ethyl]acrylamid (**7**)

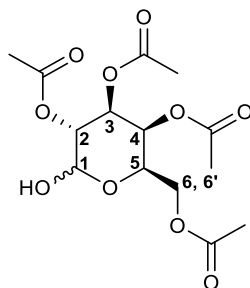


Die Synthese von **7** erfolgt analog zu der Synthese wie in der Veröffentlichung von Soria-Martinez et al. beschrieben.^[53] Die Syntheseroute bis zur 2. Stufe (Verbindung **6**) wurde in der Bachelorarbeit von Nick Jetzki zur Synthese eines ähnlichen Monomers erprobt.^[212]

5.2.2.1 Synthese von 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α / β -D-galactopyranose (**5**)

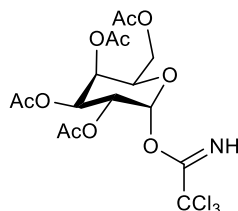


Die Synthese und Aufarbeitung von 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α / β -D-galactopyranose (**5**) erfolgt analog zu der Synthese von **2** und orientiert sich ebenfalls an den Publikationen von Zhang und Kováč sowie der Publikation von Soria-Martinez und Kollegen.^[53, 209] Es werden zu 2 mL [34.9 mmol] Ethylendiamin in 500 mL Tetrahydrofuran 2.2 mL [40.73 mmol] Eisessig unter Bildung eines weißen Niederschlags zugetropft. 11.35 g [29.1 mmol] 1,2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranose werden in weiteren 200 mL Tetrahydrofuran solvatisiert, langsam zu der Ethylendiamin-Eisessig-Suspension getropft und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Aufreinigung erfolgt wie in Kapitel 5.2.1.2 beschrieben. Es werden 9.11 g eines transparenten und hochviskosen Öls erhalten [24.0 mmol, 89.9 % Ausbeute].



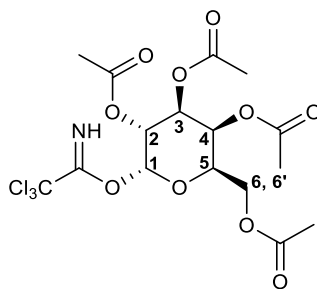
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 5.52 (d, $^3J_{\text{H1-H2}}$ = 3.63 Hz, 1H, **H1 α**), 4.47 (dd, $^3J_{\text{H4-H3}}$ = 3.40 Hz, $^3J_{\text{H4-H5}}$ = 1.30 Hz, 1H, **H4 α**), 5.44 – 5.37 (m, 1.3H, **H3 α** , **H β**), 5.16 (dd, $^3J_{\text{H2-H3}}$ = 10.72 Hz, $^3J_{\text{H2-H1}}$ = 3.64 Hz, 1H, **H2 α**), 5.09 – 5.04 (m, 0.6H, 2**H β**), 4.72 – 4.65 (m, 0.3H, **H β**), 4.47 (dt, $^3J_{\text{H5-H6/H6'}}$ = 10.72 Hz, $^3J_{\text{H5-H4}}$ = 1.26 Hz, 1H, **H5 α**), 4.19 – 4.02 (m, 3.6H, **H6**, **H6'**, 2**H β** , Ethylacetat), 4.00 – 3.91 (m, 0.3H, 1**H β**), 3.00 (s, 1H, **-OH α**), 2.15 (s, 1H, **-CH $_3\beta$**), 2.14 (s, 3H, **-CH $_3\alpha$**), 2.11 (s, 1H, **-CH $_3\beta$**), 2.10 (s, 3H, **-CH $_3\alpha$**), 2.05 (s, 3H, **-CH $_3\alpha$**), 2.04 (s, 1H, **-CH $_3\beta$**), 2.00 (s, 1H, **-CH $_3\beta$**), 1.99 (s, 3H, **-CH $_3\alpha$**) ppm.

5.2.2.2 Synthese von 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyltrichloroacetimidat (6)



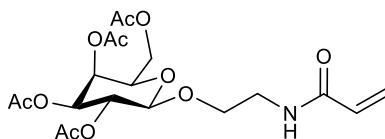
Die Synthese und Aufarbeitung von 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-galactopyranosyltrichloroacetimide (6) erfolgt analog zu der Synthese von **3** und ist ebenfalls angelehnt an Syntheseprotokolle der Gruppen Fekete et al. und Wu und Sampson.^[10, 210] Außerdem wurde dieser Syntheseschritt in der Publikation von Soria-Martinez et al. durchgeführt.^[53]

Unter Argonatmosphäre und in Anwesenheit von Molekularsieb (2 Å) werden 9.3 g von **5** in 250 mL Chloroform vorgelegt und es werden 500 μ L [3.3 mmol] DBU tropfenweise hinzugegeben. Nach 30 Minuten nimmt die Mischung eine gelbe Farbe an. Danach werden 2.8 mL [28 mmol] Trichloroacetonitril hinzugegeben, wodurch das Reaktionsgemisch eine braune Farbe annimmt. Die Aufreinigung erfolgt gemäß dem Protokoll in Kapitel 5.2.1.3. Es werden 5.0 g des α -Anomers in der ersten Fraktion (R_f = 0.7) der Flash-Chromatographie (Ethylacetat:n-Hexan im Verhältnis 1:1 v/v) erhalten [10.4 mmol, 40 % Ausbeute]. Für die Synthese eines nicht-anomerenreinen Produkts in der nachfolgenden Synthesestufe kann die 2. Fraktion der Flash-Chromatographie herangezogen werden.

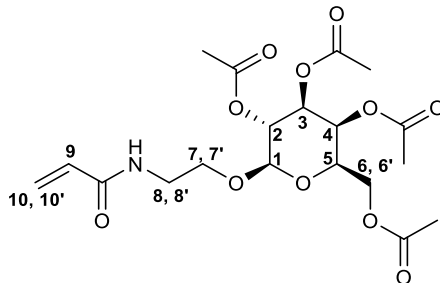


$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 8.66 (s, 1H, =NH), 6.60 (d, $^3J_{\text{H1-H2}}$ = 3.33 Hz, 1H, H1), 5.56 (dd, $^3J_{\text{H4-H3}}$ = 3.04, $^3J_{\text{H4-H5}}$ = 1.30 Hz, 1H, H4), 5.43 (dd, $^3J_{\text{H3-H2}}$ = 10.81 Hz, $^3J_{\text{H3-H4}}$ = 3.08 Hz, 1H, H3), 5.35 (dd, $^3J_{\text{H2-H3}}$ = 10.81 Hz, $^3J_{\text{H2-H1}}$ = 3.34 Hz, 1H, H2), 4.43 (dt, $^3J_{\text{H5-H6/H6'}}$ = 6.48 Hz, $^3J_{\text{H5-H4}}$ = 0.95 Hz, 1H, H5), 4.22 – 4.02 (m, 5H, H6, H6', Ethylacetat), 2.16 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.03 – 1.99 (3 s, 9H, $-\text{CH}_3$) ppm.

5.2.2.3 Synthese von *N*-[2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-galactopyranosyloxy)ethyl]acrylamid (**7**)



Die Synthese von **7** erfolgt analog zu der Synthesevorschrift von **4** in Kapitel 5.2.1.4 und wird ebenfalls angelehnt an den Arbeiten der Gruppen Wu und Sampson sowie Gu et al. durchgeführt.^[10, 211] Unter Argonatmosphäre werden 3.6 g [7.3 mmol] **7** in 120 mL Dichlormethan solvatisiert und mit Hilfe eines Eisbads auf 1 °C gekühlt. Nach 45 Minuten werden 1.4 mL [11.6 mmol] Bortrifluoriddiethyletherat hinzugegeben, wodurch die Lösung eine hell-gelbe Farbe annimmt. Nach weiteren 30 Minuten werden 3.6 mL [31.5 mmol] *N*-Hydroxyethylacrylamid vorgelegt in 30 mL Dichlormethan zum aktivierten Edukt langsam hinzutropft. Die Aufreinigung erfolgt ebenfalls analog zu **4** und es werden 1.5 g eines farblosen, hochviskosen Öls erhalten [3.5 mmol, 48 %]. Mit Hilfe der ¹H-NMR-Daten (siehe Anhang) kann abgeleitet werden, dass es sich um das reine β -Anomer handelt.



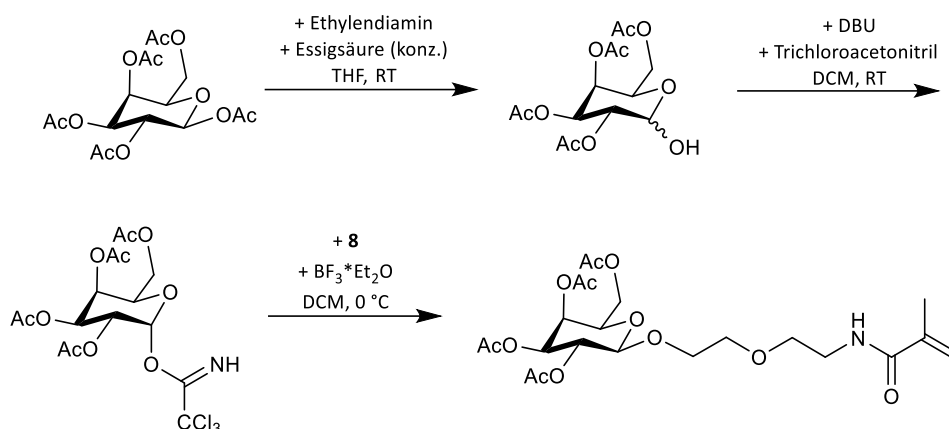
¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 6.28 (dd, ³J_{H10-H9} = 17.04 Hz, ²J_{H10-H10'} = 1.40 Hz, 1H, H10), 6.27 – 6.22 (m, 2H, -NH-, H9), 5.64 (dd, ³J_{H10'-H9} = 10.34 Hz, ²J_{H10'-H10} = 1.50 Hz, 1H, H10'), 5.38 (dd, ³J_{H4-H3} = 3.51 Hz, ³J_{H4-H5} = 0.94 Hz, 1H, H4), 5.17 (dd, ³J_{H2-H3} = 10.41 Hz, ²J_{H2-H1} = 7.91 Hz, 1H, H2), 5.00 (dd, ³J_{H3-H2} = 10.55 Hz, ²J_{H3-H4} = 3.54 Hz, 1H, H3), 4.46 (d, ³J_{H1-H2} = 7.99 Hz, 1H, H1 β), 4.21 – 4.04 (m, 3H, H6, H6', Ethylacetat), 3.94 – 3.86 (m, 2H), 3.73 (m, 1H), 3.63 – 3.55 (m, 1H), 3.51 – 3.44 (m, 1H), 2.14 (s, 3H, -CH₃), 2.04 – 2.01 (m, 6.7H, -CH₃, Ethylacetat), 1.97 (s, 3H, -CH₃) ppm.

HR-ESI:

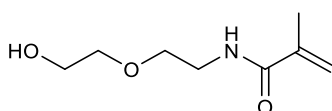
m/z berechnet für **7** + H⁺: 446.16 – detektiert: 446.1656

m/z berechnet für **7** + Na⁺: 468.16 – detektiert: 468.1477

5.2.3 Synthese von *N*-[2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-galactopyranosyloxy)hydroxyethoxy)ethyl]methacrylamid (9)



5.2.3.1 Synthese von *N*-[2-(2-Hydroxyethoxy)ethyl]methacrylamid (8)

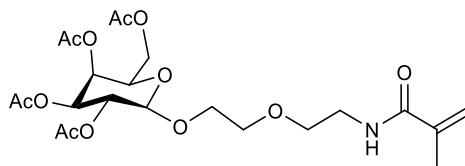


Die Synthese von Verbindung **8** erfolgt angelehnt an die Arbeiten von Pokharel et al., Gomez et al. und Pierzyna.^[149, 213, 214]

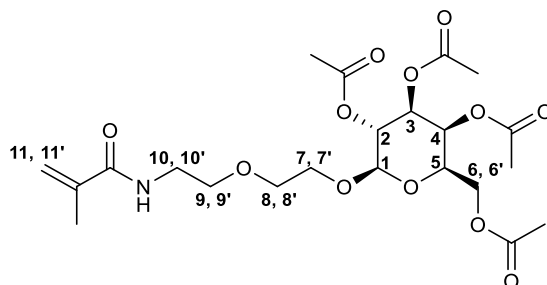
8.3 mL [59.8 mmol] Triethylamin werden zusammen mit 6 mL [59.8 mmol] (2-(2-Aminoethoxy)ethanol in 50 mL Tetrahydrofuran vorgelegt und im Eisbad für 60 Minuten auf 1 °C gekühlt. Anschließend werden 6.3 mL Methacryloylchlorid tropfenweise hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wird für ca. 12 Stunden gerührt und auf Raumtemperatur erwärmt. Der weiße Niederschlag wird abfiltriert und das Tetrahydrofuran unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene viskose Öl wird mittels Combi-Flash aufgereinigt (Ethylacetat : n-Hexan im Verhältnis 7:3 v/v) und es werden 2.4 g [13.8 mmol] eines viskosen und farblosen Öls isoliert [46 % Ausbeute].

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): 6.55 – 6.15 (s, 1H, -NH-), 5.72 – 5.67 (p, 1H, H1), 5.35 – 5.30 (m, 1H, H1'), 3.78 – 3.71 (m, 2H, -CH₂-), 3.64 – 3.48 (m, 6H, -CH₂-), 1.98 – 1.93 (m, 3H, -CH₃) ppm.

5.2.3.2 Synthese von *N*-[2-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-galactopyranosyloxy)hydroxyethoxy)ethyl]methacrylamid (**9**)



Die Synthese von **9** erfolgt analog zu der Synthesevorschrift von **4** in Kapitel 5.2.1.4 und wird ebenfalls angelehnt an den Arbeiten der Gruppen Wu und Sampson, Gu et al. sowie Soria-Martinez et al. durchgeführt.^[10, 53, 211] Unter Argonatmosphäre werden 1.7 g [3 mmol] **7** in 50 mL Dichlormethan solvatisiert und mit Hilfe eines Eisbads auf 1 °C gekühlt. Nach 45 Minuten werden 0.6 mL [5 mmol] Bortrifluoriddiethyletherat hinzugegeben, wodurch die Lösung eine hell-gelbe Farbe annimmt. Nach weiteren 30 Minuten werden 1.8 g [11.3 mmol] **8** solvatisiert in 30 mL Dichlormethan zum aktivierten Edukt langsam hinzuge tropft. Die Aufreinigung erfolgt ebenfalls analog zu **4**. Es werden 0.4 g eines farblosen, hochviskosen Öls erhalten [0.8 mmol, 26 %]. Mit Hilfe der ¹H-NMR-Daten kann das Anomerenverhältnis determiniert werden, welches zu 100 % auf Seite des β -Anomers liegt.



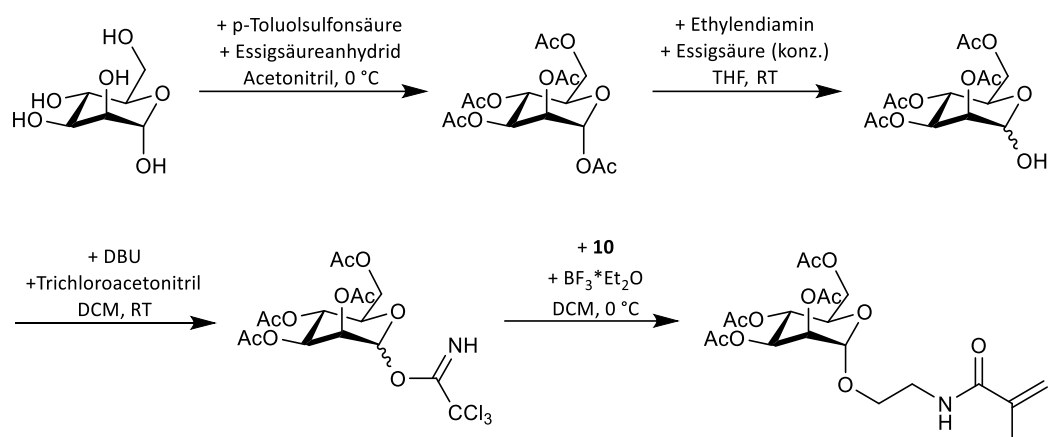
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 6.35 (s, 1H, -NH-), 5.75 – 5.71 (m, 1H, H₁₁), 5.39 (dd, ³J_{H2-H3} = 3.41 Hz, ³J_{H2-H3} = 1.05 Hz, 1H, H₄), 5.36 – 5.32 (m, 1H, H_{11'}), 5.20 (dd, 1H, ³J_{H2-H3} = 10.51 Hz, ³J_{H2-H1} = 7.91 Hz, 1H, H₂), 5.01 (dd, ³J_{H3-H2} = 10.47 Hz, ³J_{H3-H4} = 3.44 Hz, 1H, H₃), 4.52 (d, ³J_{H1-H2} = 7.93 Hz, 1H, H_{1 β}), 4.22 – 4.07 (m, 2H, -CH₂), 4.02 – 3.87 (m, 2H, -CH₂), 3.78 – 3.34 (m, 10H, -CH₂, Ethylacetat), 2.14 (s, 3H, -CH₃), 2.07 – 2.03 (m, 6H, -CH₃). 2.00 – 1.95 (m, 6H, -CH₃) ppm.

HR-ESI:

m/z berechnet für **9** + H⁺: 504.20 – detektiert: 504.2080

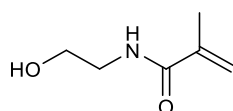
m/z berechnet für **9** + D⁺: 505.20 – detektiert: 505.2111

5.2.4 Synthese von *N*-[2-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyloxy)ethyl]methacrylamid (**11**)



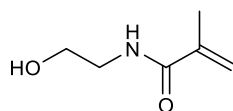
Die Synthese des Methacrylamids **11** erfolgt analog zur Synthese von **4**, indem das käuflich erworbene *N*-Hydroxyethylacrylamid durch das eigenständig synthetisierte *N*-Hydroxyethylmethacrylamid (**10**) substituiert wird. In der zuvor verfassten Masterarbeit sowie in einer gemeinsamen Publikation mit Soria-Martinez et al. wurde die Synthese von **11** auf einem alternativen Syntheseweg beschrieben, welcher ohne die vorherige Synthese von **2** und **3** sowie des *N*-Hydroxymethylmethacrylamids auskommt.^[53, 159]

5.2.4.1 Synthese von *N*-Hydroxymethylacrylamid (**10**)



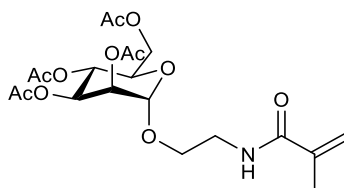
Die Synthese des *N*-Hydroxymethylacrylamids **10** wurde in der Bachelorarbeit von Nick Jetzki thematisiert und im Rahmen dieser Arbeit weiterentwickelt.^[212] Die Synthese erfolgt analog zur Synthese von **8** wie in Kapitel 5.2.3.1 beschrieben und demensprechend basierend auf den Arbeiten von Pokharel et al., Gomez et al. und Pierzyna.^[149, 213, 214]

10.0 mL [72.14 mmol] Triethylamin werden gemeinsam mit 4.0 mL [61.08 mmol] Aminoethanol in 25 mL Tetrahydrofuran(THF) solvatisiert und im Eisbad für 60 Minuten auf 1 °C gekühlt. Anschließend werden 5.5 mL [53.9 mmol] Methacryloylchlorid in weiteren 25 mL THF vorgelegt und tropfenweise hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht gerührt und langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Der sich absetzende weiße Niederschlag wird mit weiterem kalten THF abfiltriert und das Lösungsmittel wird anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Das resultierende viskose Öl wird mittels Combi-Flash aufgereinigt (Ethylacetat:Methanol im Verhältnis 2:1, v/v) und liefert 4.5 g [25.9 mmol] eines viskosen und farblosen Öls [48 % Ausbeute].



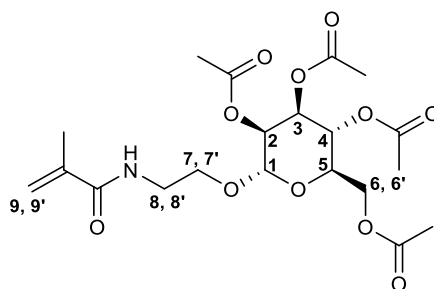
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 6.48 (s, 1H, -NH-), 5.75 -5.70 (m, 1H, R-MeC=CH₂), 5.37 – 5.31 (m, 1H, R-MeC=CH₂), 3.77 – 3.70 (m, 2H, -CH₂-), 3.51 – 3.42 (m, 2H, -CH₂-), 3.12 (s, 1H, -OH), 1.98 – 1.93 (m, 3H, -CH₃)ppm.

5.2.4.2 Synthese von *N*-[2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl-oxy)ethyl]methacrylamid (**11**)



Die Synthese von **11** erfolgt analog zur Synthese von **4** in Kapitel 5.2.1.4, indem das dort verwendete *N*-Hydroxyethylacrylamid durch das synthetisierte Methacrylamid **10** substituiert wird. Diese Synthese ist ebenfalls angelehnt an die Publikationen von Wu und Sampson und Gu et al. und das Molekül wurde bereits auf anderer Syntheseroute in der Masterarbeit beschrieben.^[10, 159, 211]

Es werden 4.24 g **3** [8.85 mmol] in 50 mL Dichlormethan gelöst und in einem Eisbad gekühlt. Nach 1 Stunde werden 1.2 mL Bortrifluoriddiethyletherat [9.74 mmol] hinzugegeben, sodass die Lösung hellgelblich wird. Nach 30 Minuten unter Rühren werden 4.02 g des Methacrylamids **10** [30.1 mmol] vorsichtig hinzugegeben, welche zuvor in ca. 30 mL Dichlormethan solvatisiert wurden. Nach der Aufreinigung mittels Kombi-Flash in Ethylacetat:nHexan (1:1, v/v) werden 2.37 g eines hochviskosen Produkte erhalten [5.15 mmol, 58 %].



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 6.27 (s, 1H, -NH-), 5.69 (p, 1H, H₉), 5.34 (dt, 1H, H_{9'}), 5.31 (dd, 1H, H₃), 5.27 – 5.19 (m, 2H, H₂, H_{6'}), 4.83 (d, 1H, H₁), 4.23 (dd, 1H, H₄), 4.15 – 4.03 (m, 1H, H₆ Ethylacetat), 3.94 (ddd, 1H, H₅) 3.85 – 3.75 (m, 1H, -CH₂-), 3.64 – 3.42 (m, 3H, -CH₂-), 2.13 (s, 3H, -CH₃), 2.07 (s, 3H, -CH₃), 2.04 – 2.00 (m, 4H, -CH₃, Ethylacetat), 1.98 (s, 3H, -CH₃), 1.955 (dt, 3H, H₂C=RC-CH₃) ppm.

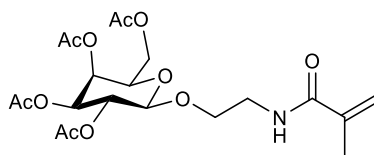
ESI-MS:

m/z berechnet für das Fragment von **11** unter Abspaltung von **10**: 331.1 – detektiert: 331.0

m/z berechnet für **11** + H⁺: 460.17 – detektiert: 460.2

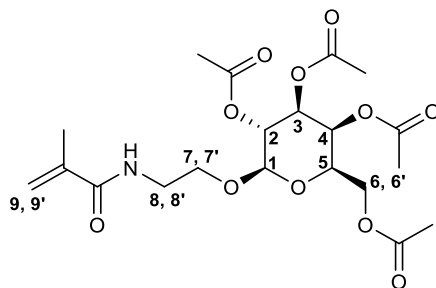
m/z berechnet für **11** + Na⁺: 482.17 – detektiert: 482.2

5.2.5 Synthese von *N*-[2-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyloxy)ethyl]methacrylamid (**12**)



Die Synthese von **12** erfolgt analog zu der bereits beschriebenen Synthese von **4** in Kapitel 5.2.1.4 wiederum angelehnt an die Arbeiten der Gruppen Gu et al. sowie Wu und Sampson.^[10, 211]

Unter Argongegenstrom werden 2.9 g **7** [6.05 mmol] in 40 mL Dichlormethan vorgelegt und mittels eines Eisbads für 46 Minuten auf 1 °C gekühlt. Nach Hinzugabe von 0.8 mL Bortrifluoriddiethyletherat [6.65 mmol] wird das Reaktionsgemisch weitere 30 Minuten gerührt. Während dieser Zeit nimmt die Lösung eine hell-gelbe Farbe an. Anschließend werden 3.5 mg **10** [30.1 mmol] in 10 mL Dichlormethan gelöst und langsam zum kalten Reaktionsgemisch zugetropft. Analog zur Synthese von **4** erfolgt die Aufreinigung des Produktgemischs in einem Gemisch aus Ethylacetat und n-Hexan (im Verhältnis 1:1, v/v). Es werden 1.1 g [3.3 mmol, 55 %] eines hochviskosen und farblosen Öls erhalten.



$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 6.21 (s, 1H, -NH-), 5.73 – 5.67 (m, 1H, H₉), 5.38 (dd, $^3J_{\text{H4-H3}}$ = 3.41 Hz, $^3J_{\text{H4-H5}}$ = 1.04 Hz, 1H, H₄), 5.36 – 5.32 (m, 1H, H_{9'}), 5.19 (dd, $^3J_{\text{H2-H3}}$ = 10.45 Hz, $^3J_{\text{H2-H1}}$ = 7.88 Hz, 1H, H₂), 5.00 (dd, $^3J_{\text{H3-H2}}$ = 10.48 Hz, $^3J_{\text{H3-H4}}$ = 3.40 Hz, 1H, H₃), 4.48 (d, $^3J_{\text{H1-H2}}$ = 7.80 Hz, 1H, H₁), 4.17 – 4.06 (m, 2H, Ethylacetat), 3.95 – 3.85 (m, 2H), 3.78 – 3.68 (m, 1H, H₅), 3.64 – 3.39 (m, 2H), 2.15 (s, 3H, -CH₃), 2.16 – 2.06 (m, 6H, -CH₃, Ethylacetat), 1.98 (s, 3H, -CH₃), 1.97 – 1.95 (m, 1H, CH₃) ppm.

ESI-MS:

Kalkuliertes m/z für das Fragment von **12** unter Abspaltung von **10**: 331.1 – detektiert: 331.0

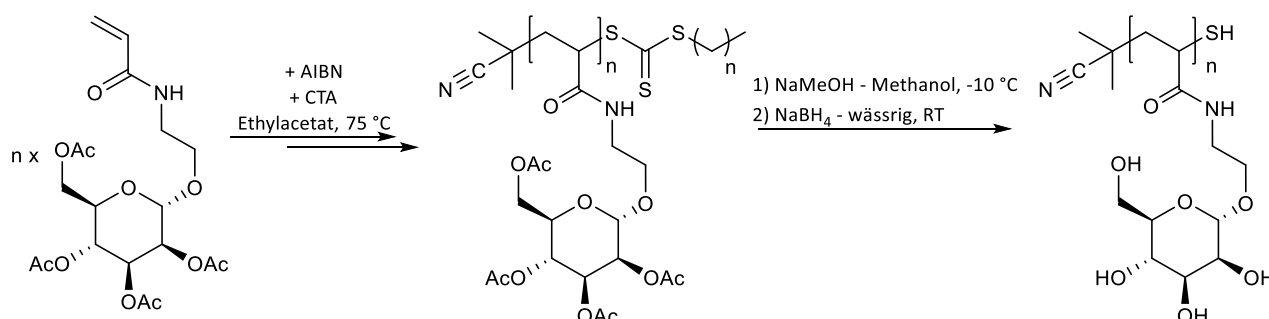
Kalkuliertes m/z für **12** + H⁺: 460.17 – detektiert: 460.2

Kalkuliertes m/z für **12** + Na⁺: 482.17 – detektiert: 482.2

5.3 Polymerisation und Charakterisierung der Polymere

5.3.1 Allgemeine Reaktionsvorschrift zur RAFT-Polymerisation

Die RAFT-Polymerisation der Glykomonomere erfolgt anhand eines optimierten Standardprotokolls. Hierzu wird das jeweilige Monomer mit der entsprechenden Initiatormenge sowie den korrespondierenden Mengen RAFT-Reagenz - angepasst an die polymerisierbare Einheit - 15 Massen-% in Ethylacetat solvatisiert. Zur Reproduzierbarkeit erfolgt die Einwaage mit Hilfe von Stammlösungen, mit deren Hilfe alle Komponenten zuverlässig und einfach eingewogen werden können, da die Monomere aufgrund ihrer sehr hohen Viskosität äußerst klebrig und somit schwierig exakt einzuwiegen sind. Die eingewogenen Polymerisationsgemische werden anschließend in einem Mikrowellenröhrchen verschlossen und es erfolgen mindestens drei Zyklen, in welchen das Polymerisationsgemisch eingefroren und wieder aufgetaut wird. Hierzu wird das Polymerisationsgemisch zunächst 15 Minuten mit Argongas durchgespült, sodass ein Gasaustausch erfolgen kann. Anschließend wird das Gemisch mittels flüssigen Stickstoffs eingefroren, sodass das Lösungsmittel gefriert. Es wird daraufhin für ca. 10 – 15 Minuten ein Vakuum angelegt, welches im Bereich von 10^{-3} bis 10^{-2} mbar liegt. Nach Entfernen des Vakuums wird das Reaktionsgemisch bei Raumtemperatur aufgetaut und es erfolgen mindestens zwei weitere „Freeze-and-Pump“-Zyklen, bevor die Polymerisation initiiert wird. Schema 7 stellt den Reaktionsablauf der Polymerisation anhand des Beispiels des von Molekül **4** dar.



Schema 7: Exemplarische Darstellung der RAFT-Polymerisation und anschließenden Aufarbeitung von **4**.

Die Polymerisation wird unter Rühren in einem auf 75 °C beheizten Ölbad durchgeführt. Für Acrylamide bewährte sich eine Polymerisationsdauer von 5 h und eine Dauer von 24 h zeigt sich als ideal für Methacrylamide. Nach der angegebenen Zeit wird das Polymerisationsgemisch mit flüssigem Stickstoff gekühlt und die Polymerisation somit gezielt abgebrochen. Der Umsatz der Polymerisation wird mit Hilfe von ^1H -NMR in deuteriertem Chloroform bestimmt, indem das Verhältnis der verbliebenen Vinylprotonen zu den breiten Signalen der im Polymer eingebauten Protonen gesetzt wird.

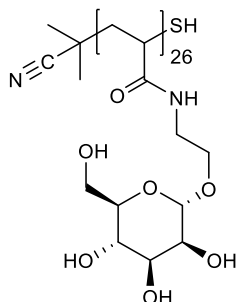
Anschließend wird das Polymer entschützt, angelehnt an die Arbeit von Toyoshima und Miura.^[107] Hierzu wird das Polymerisationsgemisch in 0.2 M Natriummethanolat in Methanol gegeben, nachdem Ethylacetat unter vermindertem Druck entfernt worden ist und das Gemisch in wenigen μL Methanol redissoziiert wurde. Das Natriummethanolat sollte in mindestens 10-fachem Überschuss bezogen auf die Acetylschutzgruppen der eingesetzten Edukte liegen. Das entschützte Polymer fällt in Methanol aus und wird in einer Dialyse (Porengröße > 500 Da) gegen destilliertes Wasser über mindestens 3 Tage aufgereinigt und nachfolgend gefriertrocknet. Anschließend wird das terminale Trithiocarbonat entfernt. Hierzu wird eine 20-fache Menge bezogen auf die eingesetzte Menge RAFT-Reagenz an Natriumtetraborhydrid in MilliQ-Wasser vorgelegt und das entschützte Glykopolymer wird darin gelöst, wodurch eine Blasenbildung beobachtet werden kann. Nach einer Stunde wird das Polymer erneut für mindestens 3 Tage gegen destilliertes Wasser dialysiert und gefriertrocknet.

5.3.2 Charakterisierung der Polymere

Die Polymere werden mittels ^1H -NMR, Gel-Permeationschromatographie und MALDI-TOF charakterisiert. Wie in Kapitel 5.3.1 bereits beschrieben, erfolgt die Bestimmung des Umsatzes durch den Vergleich des im ^1H -NMR determinierten Verhältnisses von nicht-umgesetzten Vinyl-Protonen zu den im Polymer eingebauten Protonen des Zuckers. Als zusätzlicher Nachweis des Einbaus des synthetisierten Monomers erfolgt die Analytik des erhaltenen Glykopolymers via MALDI-TOF. Ein Nachweis der Wiederholungseinheit ist jedoch nur mit dem geschützten Glykopolymer möglich, da keine ausreichend zufriedenstellenden Spektren des entschützten Glykopolymers aufgenommen werden konnten. Limitierungen von Messungen mittels MALDI-TOF bei der Untersuchung von Glykopolymeren beobachtet ebenfalls die Gruppe um Becer et al. bei der Analyse von Glykopolymeren mit Tetrafluorobenzyl linker und Thioglukose als Kohlenhydrat.^[215] Mit Acetyl-Gruppen geschützte Glykopolymere konnten jedoch von dieser Gruppe mittels MALDI-TOF analysiert werden, auch wenn die Molmassenverteilung von der in der GPC ermittelten abwich.^[216] Auch im Rahmen dieser Arbeit konnten acetylierte Glykopolymere zur Analyse ausreichend gute Spektren aufweisen, die zumindest einen Nachweis für den Einbau des Monomers aufweisen konnten. Erwähnenswert ist, dass die Massenverteilung im MALDI-TOF-Spektrum und die daraus resultierende Dispersität bei jedem untersuchten Glykopolymer ähnlich war, obwohl die Verteilungen und Molekulargewichte in alternativen Messmethoden, bspw. Wasser-GPC, voneinander abwichen. Daraus ist zu schließen, dass die verwendeten Bedingungen zur genaueren Charakterisierung durch MALDI-TOF auch für das acetylierte Glykopolymer nicht ausreichend sind, um genaue Angaben zu den Molekulargewichten sowie zur Massenverteilung abzuleiten. Zur eindeutigen Charakterisierung wurde daher auf die Wasser-GPC zurückgegriffen. Die verwendete Wasser-GPC ist an einen MALS-Detektor gekoppelt und stellt somit eine Absolutmethode dar, mit deren Hilfe Molekulargewicht und Dispersität ermittelt werden können. Die Robustheit der Methode wurde anhand von gekauften Standards geprüft und nachgewiesen. Im folgenden Kapitel sollen exemplarisch die Auswertungen der relevanten

Glykopolymere pMan2CA₂₆, pMan2CA₄₀, pGal2CA₂₂ und pGal2CA₃₇ dargestellt werden. Anschließend wird eine Übersicht über alle für diese Arbeit relevanten Glykopolymere gegeben.

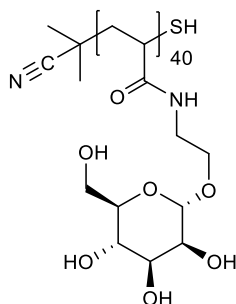
5.3.2.1 Synthese und Charakterisierung von pMan2CA₂₆



Die Synthese von pMan2CA₂₆ erfolgt wie in Kapitel 5.3.1 beschrieben. 350 mg **4** werden gemeinsam mit 14.4 mg [5 mol-%] Dodecylthiocarbonothioylthio)-2-methylpropionsäure (RAFT-Reagenz) und 2.58 mg [2 mol-%] AIBN in insgesamt 2224 μ L Ethylacetat gegeben. RAFT-Reagenz und AIBN werden hierzu in Stammlösungen vorgelegt und die dementsprechende Menge Lösungsmittel wird nach Hinzugabe zum Monomer auf das Zielvolumen aufgefüllt, damit der Monomermassenanteil ca. 15 % beträgt. Anschließend wird die Polymerisationslösung in drei Zyklen eingefroren, entgast und unter Argonstrom aufgetaut. Die Polymerisation wird bei 75 °C initiiert und unter Rühren für 5 h umgesetzt. Anschließend wird die Reaktion in flüssigem Stickstoff gestoppt und es werden jeweils 100 μ L Reaktionsgemisch zur Umsatzbestimmung (entspricht ca. 15 mg des Feststoffes) sowie zur Analyse via MALDI-TOF (siehe Anhang, Abbildung 1) entnommen. Es wird ein Umsatz von 93.4 % ermittelt (vgl. Anhang, Abbildung 13). Das crude Polymerisationsgemisch wird anschließend analog zur Beschreibung in Kapitel 5.3.1 aufgereinigt. Nach 3-tägiger Dialyse und anschließender Gefriertrocknung werden 64.7 mg [35 % Ausbeute] eines weißen, fluffigen Produkts erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 4.99 – 4.82 (m, 1H, H₁), 4.90 – 3.20 (m, 11H, H₂-H_{8'}), 2.42 – 1.40 (m, 3H, H₉, H₁₀, H_{10'}), 1.38 – 1.20 (s, 0.36H), 1.14 – 1.10 (d, 0.36H, -CH₃) ppm.

5.3.2.2 Synthese und Charakterisierung von pMan2CA₄₀

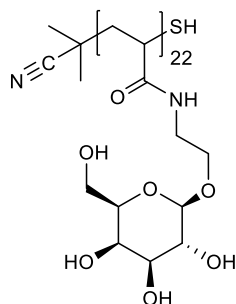


Die Synthese von pMan2CA₄₀ erfolgt wie in Kapitel 5.3.1 beschrieben und analog zur Synthese von pMan₂₆ im vorherigen Kapitel. 294.1 mg **4** werden gemeinsam mit 6.0 mg [2.5 mol-%] Dodecylthiocarbonothioylthio)-2-methylpropionsäure (RAFT-Reagenz) und 1.1 mg [1 mol-%] AIBN in insgesamt 1865 μ L Ethylacetat gegeben und wie zuvor beschrieben umgesetzt.

Mittels dem Protonen-NMR dargestellt im Anhang, Abbildung 15 kann analog zu pMan2CA₂₆ der Polymerisationsumsatz ermittelt werden, welcher auf 91.6 % geschätzt wird. Nach Aufreinigung werden 61.4 mg [25.7 % Ausbeute] eines weißen, flauschigen Produkts erhalten. Das ¹H-NMR wird in im Anhang in Abbildung 16 dargestellt.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 4.91 (s, 1H, H₁), 4.14 – 3.12 (m, 11H, H₂-H_{8'}), 2.36 – 1.40 (m, 3H, H₉, H₁₀, H_{10'}), 1.34 – 1.23 (s, 0.28H), 1.12 – 0.99 (d, 0.25H, -CH₃) ppm.

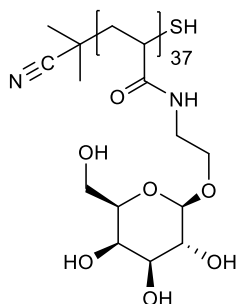
5.3.2.3 Synthese und Charakterisierung von pGal2CA₂₂



Die Synthese von pGal2CA₂₂ erfolgt wie in Kapitel 5.3.1 beschrieben und analog den vorherigen Polymerisationen. 416.0 mg **7** werden gemeinsam mit 17.04 mg [5 mol-%] (Dodecylthiocarbonothioylthio)-2-methylpropionsäure) und 3.07 mg [2 mol-%] AIBN in insgesamt 2636 μ L Ethylacetat gegeben und wie zuvor beschrieben umgesetzt (Umsatz: 92.5 %, vergleiche Abbildung 17 im Anhang). Nach Aufreinigung werden 127 mg [49 % Ausbeute] eines weißen, watteartigen Produkts erhalten. Das ¹H-NMR wird im Anhang in Abbildung 18 abgebildet.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 5.05 (s, 0.5H, H1 α), 4.50 – 4.39 (m, 0.5H, H1 β), 4.15 – 4.06 (m, 1H), 4.04 – 3.24 (m, 9H, H2-H8'), 2.39 – 1.41 (m, 3H, H9, H10, H10'), 1.39 – 1.23 (s, 0.6H), 1.12 – 1.00 (d, 0.38H, -CH₃) ppm.

5.3.2.4 Synthese und Charakterisierung von pGal2CA₃₇



Die Synthese von pGal2CA₃₇ erfolgt wie in Kapitel 5.3.1 beschrieben und analog den vorherigen Polymerisationen. 400.0 mg **7** werden gemeinsam mit 8.2 mg [2.5 mol-%] Dodecylthiocarbonothioylthio)-2-methylpropionsäure und 1.5 mg [1 mol-%] AIBN in insgesamt 2535 μ L Ethylacetat gegeben und wie zuvor beschrieben umgesetzt. Mittels Protonen-NMR kann ein Umsatz von 92.7 % ermittelt werden. Nach Aufreinigung werden 38.9 mg [26.2 % Ausbeute] eines weißen, watteartigen Produkts erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 5.1 (m, 0.1H, H1 α), 4.54 – 4.34 (m, 0.9H, H1 β), 4.29 – 4.10 (m, 10H, H2-H8'), 2.39 – 1.40 (m, 3H, H9, H10, H10'), 1.39 – 1.21 (s, 0.4H), 1.12 – 0.98 (d, 0.23H, -CH₃) ppm.

5.3.3 Übersicht der synthetisierten Glykopolymere

Neben den in Kapitel 5.3.2 dargestellten Glykopolymeren wurden im Rahmen dieser Arbeit weitere Glykopolymere hergestellt. Die Synthese erfolgt wie in Kapitel 5.3.1 beschrieben. In diesem Kapitel werden in Tabelle 18 alle synthetisierten Glykopolymere gezeigt.

Tabelle 18: Übersicht aller im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Glykopolymere.

Polymer	Einwaagen in mg / [mol.-%]			Polymerparameter				Projekt
	Monomer (Typ)	CTA (Typ)	AIBN	Umsatz [%]	Ausbeute in mg [%]	$\bar{M}_n$ [Valenz]	$\bar{D}$	
pGal_A	108.8 (7)	8.4 [10] (CPDC)	1.2 [3]	< 96	7.7 [11.4 %]	39,800 [142.4]	1.02	Synthese
pGal_B	89.0 (7)	6.9 [10] (CPDC)	0.66 [2]	< 92	25 [45.1 %]	23,800 [84.7]	1.13	Synthese
pGal_C	76.6 (7)	4.5 [7.5] (CPDC)	0.4 [1.5]	< 98	7.2 [35 %]	45,000 [161.2]	1.02	Synthese
pGal_D	97.6 (7)	3.8 [5] (CPDC)	0.4 [1]	< 95	30 [49.5 %]	31,200 [111.4]	1.29	Synthese
pGal_E	221.8 (7)	8.5 [5] (CPDC)	0.4 [0.5]	< 94	30 [22 %]	43,000 [154.0]	1.23	Synthese
pGal_F	107 (7)	4.4 [5] (DMPS)	0.8 [2]	< 87	14 [21 %]	6,700 [22.9]	1.07	Synthese
pGal_G	143.8 (7)	2.9 [2.5] (DMPS)	0.5 [1]	< 92	37.2 [41.6 %]	13,110 [41.6]	1.08	Synthese
pMan2CA₂₆	350 (4)	14.4 [5] (DMPS)	2.6 [2]	< 93	64.7 [35 %]	7,690 [26.5]	1.03	SPR
pMan2CA₄₀	294.1 (4)	6.0 [2.5] (DMPS)	1.1 [1]	< 92	61.4 [26 %]	11,490 [40.2]	1.03	SPR
pGal2CA₂₂	416 (7)	17.0 [5] (DMPS)	3.07 [2]	< 92	127.0 [49 %]	5,600 [22]	1.02	SPR
pGal2CA₃₇	400 (7)	8.5 [2.5] (DMPS)	1.5 [1]	< 91	38.9 [26 %]	10,730 [37.5]	1.06	SPR

Polymer	Einwaagen in mg / [mol.-%]			Polymerparameter				Projekt
	Monom er (Typ)	CTA (Typ)	AIBN	Umsatz [%]	Ausbeute in mg [%]	$\bar{M}_n$ [Valenz]	$\bar{D}$	
pMan-2CM₈₆	177.1 (11)	1.33 [1] (CPDC)	0.3 [0.5]	n.b. ¹	13 [12.5 %]	29,200 [96.7]	1.25	SPR & Sulfati- sierung
pGal4CM₅₅	243.4 (9)	1.6 [1] (CPDC)	0.2 [0.3]	n.b. ¹	24 [15.9 %]	18,740 [54.9]	1.80	SPR
pMan2CA₄₃	200.4 (4)	4.1 [2.5] (DTMP)	0.74 [1]	n.e. ²	82.4 [66.1 %]	11,870 [41.6]	1.03	Janus
pGal2CA₂₄	126.2 (7)	5.2 [5] (DTMP)	0.93 [2]	< 93	60.2 [76.6 %]	6,900 [23.6]	1.04	Janus
pMan2CA₃₉	185.8 (4)	4.6 [3] (DTMP)	0.8 [1.2]	n.e. ²	51.2 [44.3 %]	11,130 [38.9]	1.02	Janus
pMan2CA₂₆	196.9 (4)	8.0 [5] (DTMP)	0.72 [1]	n.e. ²	70.9 [57.9 %]	7,480 [25.7]	1.02	Janus
pMan2CA₃₇	350.9 (4)	14.4 [5] (DTMP)	2.6 [2]	< 85	144.4 [66.1 %]	10,520 [36.7]	1.03	Janus
pGal2CA₁₇	145 (7)	8.9 [7.5] (DTMP)	1.6 [3]	< 95	61.2 [67.8 %]	4,870 [16.3]	1.04	Janus
pGal2CA₄₅	101.2 (7)	2.1 [2.5] (DTMP)	0.4 [1]	< 98	47.1 [74.8 %]	12,900 [45.2]	1.05	Janus
pGal2CA₁₀₁	130.0 (7)	0.0 [0]	2.4 [5]	< 90	34.0 [42.0 %]	28,400 [101.2]	1.25	Janus
pGal2CA₃₇	400 (7)	8.2 [2.5]	1.5 [1]	< 95	82.5 [33.1 %]	10,600 [36.9]	1.07	Janus
pMan2CA₁₈	185.8 (4)	7.6 [5]	1.4 [2]	< 72	26.2 [25.5 %]	5,289 [17.8]	1.08	Janus
pGal2CA₄₀	89.3 (7)	0.69 [2]	0.65 [0.5]	n.e. ¹	30.0 [54.0 %]	11,500 [40.0]	2.0	Sulfati- sierung
pGal2CA₄₆	144.2 (7)	0.53 [5]	0.53 [1]	n.e. ¹	37.0 [41.6]	13,100 [46.0]	1.08	Sulfati- sierung

¹Umsatz nicht zuverlässig zu bestimmen (n.b.), ²Aufgrund des Aufkommens des β -Anomers nicht ermittelt (n.e.)

5.4 Funktionalisierung von Januspartikeln

Im Ergebnisteil wurde gezeigt, dass die Wahl der Bedingungen zur Anbringung von Glykopolymeren auf APTES-Partikel abhängig von der Molekülmasse ist. Leichtere und damit kürzere Glykopolymere lassen sich mit EDC/NHS-Kupplungschemie auf die Partikel grafted, wohingegen längere Glykopolymere besser über die thermische Funktionalisierung grafted werden können. Im Folgenden werden die beide Varianten beschrieben.

Die funktionalisierten Partikel wurden von Claudia Marschelke aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Alla Synytska am Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden e.V. bereitgestellt. Es handelt sich um drei verschiedene Partikelvarianten, die jeweils abhängig von dem verwendeten Glykopolymer auf die gleiche Weise funktionalisiert wurden. Eine dieser Varianten stellen die APS-Partikel, welche von Claudia Marschelke synthetisiert und bereitgestellt wurde. Die Synthesen lehnen sich dabei an die Arbeiten von Kirillova et al., Hong et al. sowie Berger et al. und Luzinov et al. an.^[120, 124, 190, 193]

5.4.1 Funktionalisierung der Partikel mit pMan2CA₁₈

Die Funktionalisierung der Partikel mit pMan2CA₁₈ Glykopolymeren erfolgt in einem *grafting-to*-Prozess unter Verwendung von EDC und NHS als Kupplungsreagenzien. Es wird sich an dem Protokoll von Kirillova et al. orientiert.^[120] 16.6 mg Partikel werden in 1 mL MilliQ-Wasser gelöst und auf ca. 1 °C gekühlt. Außerdem werden 27.7 mg pMan₁₈, 141 mg EDC und 4.2 mg NHS jeweils in 0.333 mL MilliQ-Wasser gelöst und ebenfalls auf 1 °C gekühlt. EDC- und NHS-Lösung werden vereinigt und einige Minuten gerührt, bevor sie zur Polymerlösung gegeben werden. Nach 5 weiteren Minuten wird die Partikellösung zum Reaktionsgemisch geben und über Nacht bei 1 °C gerührt. Die Aufreinigung erfolgt durch dreimaliges Zentrifugieren und Resuspendieren in Wasser und Methanol. Die Partikel werden anschließend gefriergetrocknet und charakterisiert.

5.4.2 Funktionalisierung der Partikel mit pMan2CA₃₇ und pGal2CA₃₇

Die Funktionalisierung der Partikel mit längeren Glykopolymeren erfolgt mit dem thermalen *grafting-to*-Ansatz wie von Kirillova et al. beschrieben.^[120] Exemplarisch wird die Funktionalisierung von pMan2CA₃₇ beschrieben: 40 mg pMan₃₇ und 50 mg Partikel werden zusammen in 4.5 mL Wasser gelöst und für 2 h gerührt. Anschließend wird das Wasser des Reaktionsgemischs in einem Vakuum-Trockenschrank bei 110 °C und 100 mbar entfernt und über Nacht unter diesen Bedingungen die Reaktion durchgeführt. Die Aufreinigung erfolgt nach Resuspendieren der Partikel wie unter 5.4.1 beschrieben.

Tabelle 19: Übersicht der erhaltenen Partikel.

Bezeichnung	Funktionalisierter Partikeltyp	Immobilisiertes Polymer	Methode	Zeta potential [mV] ^a	Zuckerkonzentration [μM] ^b	Rest-Amin-Gehalt [%] ^c
Man ₁₈ -APS	APS	pMan2CA ₁₈	EDC/NHS	19.9	5.2 (± 5.4 %)	34 (± 0.27 %)
Man ₁₈ -JPEG	Janus-PEG	pMan2CA ₁₈	EDC/NHS	3.2	11.9 (± 2.9 %)	13 (± 0.41 %)
Man ₁₈ -JNIPAm	Janus-NIPAm	pMan2CA ₁₈	EDC/NHS	14.4	- ^c	9 (± 0.77 %)
Man ₃₇ -APS	APS	pMan2CA ₃₇	Thermisch	11.9	24.6 (± 0.2 %)	26 (± 5.6 %)
Man ₃₇ -JPEG	Janus-PEG	pMan2CA ₃₇	Thermisch	-3.5	6.8 (± 7.2 %)	2 (± 40.9 %)
Man ₃₇ -JNIPAm	Janus-NIPAm	pMan2CA ₃₇	Thermisch	-7.1	- ^c	Zu wenig Umsatz
Gal ₃₇ -APS	APS	pGal2CA ₃₇	Thermisch	14.0	11.3 (± 9 %)	30 (± 0.46 %)
Gal ₃₇ -JPEG	Janus-PEG	pGal2CA ₃₇	Thermisch	-9.1	2.31 (± 5.18 %)	8 (± 1.22 %)
Gal ₃₇ -JNIPAm	Janus-NIPAm	pGal2CA ₃₇	Thermisch	-5.5	- ^c	8 (± 1.66 %)

^aGemessen bei pH = 7.0, ^bMittels Phenol-Schwefelsäuremethode determiniert, ^cErmittelt via Kaisertest

5.4.3 Stabilitätstest der Partikel in MilliQ-Wasser

Bevor die Partikel in Interaktionsstudien mit Bakterien eingesetzt werden, ist deren Stabilität hinsichtlich ihrer Selbstaggregation zu untersuchen. Ziel hiervon ist der Ausschluss von Fehlinterpretationen der detektierten Aggregate. Hierzu werden die Partikel in MilliQ-Wasser dispergiert und im zeitlichen Verlauf beobachtet. Die Messungen erfolgen zunächst im Zeitpunkt der Dispergierung (0 Minuten) sowie nach 10 Minuten, 60 Minuten, 180 Minuten, 640 Minuten und 24 Stunden. Der durchschnittliche Durchmesser ϕ der Partikel sowie die Polydispersität ermöglichen einen Rückschluss auf das Aggregationsverhalten. In Tabelle 20 werden diese beiden Parameter im zeitlichen Verlauf bei den jeweiligen Partikeln dargestellt.

Tabelle 20: Übersicht der Partikelstabilitätsmessungen in MilliQ-Wasser.

	Zeit [min]	0	10	60	180	640	24 h
Man ₃₇ -APS	ϕ [nm] ¹	272,8	270,5	259,5	256,5	268,8	266
	DI ¹	0,017	0,073	0,049	0,010	0,011	0,048
Man ₃₇ -JNIPAm	ϕ [nm] ¹	210	216,8	214,7	216,0	209,6	214,7
	DI ¹	0,30	0,084	0,116	0,035	0,034	0,020
PNIPAm	ϕ [nm] ¹	331	350	338,2	334,5	344,6	344,8
	DI ¹	0,007	0,021	0,034	0,040	0,021	0,015
Gal ₃₇ APS	ϕ [nm] ¹	391	365	360,2	363	351,7	328,9
	DI ¹	0,301	0,158	0,152	0,158	0,181	0,026
Gal ₃₇ -JNIPAm	ϕ [nm] ¹	210,5	214,9	217,1	212,6	215,4	213,7
	DI ¹	0,029	0,056	0,070	0,02	0,092	0,0544

¹Ermittel durch dynamische Lichtstreuung

In Tabelle 20 werden die gemessenen Partikeldurchmesser und die jeweiligen Polydispersitäten zu verschiedenen Messzeitpunkten dargestellt. Die Dispersion wird die gesamte Erhebungsdauer über auf einer Schüttelplatte in Bewegung versetzt und kurz vor der Messung gewendet, sodass eventuelle Sedimente bei der Messung via DLS mitberücksichtigt werden. Dies ist erforderlich, da größere

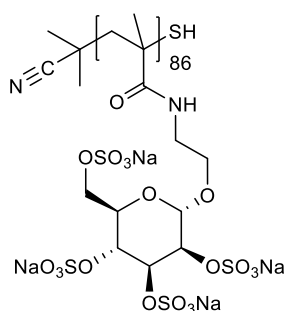
Aggregate schwerer sind und somit auf den Gefäßboden absinken. Da die dynamische Lichtstreuung jedoch nicht die am Gefäßboden abgesetzten Partikel oder Sedimente miterfassen kann, müssen diese für die Detektion der Gesamten Dispersion wieder in Dispersion gebracht werden. Vor den Messungen der Partikel im Zeitpunkt $t = 0$ Minuten werden diese einige Minuten in einem Ultraschallbad behandelt, in den weiteren Messungen erfolgt diese Behandlung jedoch nicht.

Auf diese Weise zeigt sich, dass die Partikel weitestgehend stabil vorliegen und sich keine bis kaum größere Cluster ausbilden. Im Fall von Gal₃₇-JNIPAm wird im Zeitverlauf sogar eine Abnahme des durchschnittlichen Partikeldurchmessers und gleichzeitig der Polydispersität detektiert. Vermutlich lösen sich in diesem Fall sogar kleinere Aggregate lediglich durch die kontinuierliche Bewegung der Gefäße auf der Schüttelplatte voneinander. Die anderen Partikel bleiben weitestgehend stabil und zeigen eine homogene Verteilung, die sich auch im Zeitverlauf kaum verändert. Aus diesem Grund können Aggregationsstudien mit *E. Coli* durchgeführt werden.

5.5 Sulfatisierung der Glykopolymere

Die Sulfatisierung der Glykopolymere erfolgt gemäß den Protokollen von Soria-Martinez et al. und Bauer.^[53, 203] Als Sulfatisierungsreagenz wird ein Sulfurtrioxid-Pyridin-Komplex (TMA*SO₃) in 40-fachem Überschuss pro Hydroxygruppe verwendet. Die Reaktion läuft bei 70 °C ab und wird mit einem 10-fachen Überschuss Natriumacetat bezogen auf TMA*SO₃ terminiert. Exemplarisch wird hierzu die Umsetzung von pMan2CM₈₆ beschrieben.

5.5.1 Sulfatisierung von pMan2CM₈₆



Zur Sulfatisierung von pMan2CM₈₆ werden, wie bereits in den Arbeiten von Soria-Martinez et al. und Bauer publiziert, 5.0 mg Glykopolymer in 3.5 mL trockenem DMF zusammen mit 400 mg TMA*SO₃ vorgelegt.^[53, 203] Das Reaktionsgemisch wird für 19 Stunden bei 70 °C umgesetzt und anschließend auf Raumtemperatur gekühlt. Daraufhin werden 20.5 mg [0.25 mmol] Natriumacetat gelöst in 185 µL Wasser zum Reaktionsgemisch hinzugegeben und das Gemisch wird für 2 Stunden auf 0 °C gekühlt. Anschließend wird das DMF/Wasser-Gemisch unter vermindertem Druck entfernt und das Polymer wird mittels Dialyse (1000 Da Porengröße) eine Woche lang bei mindestens zwei Wasserwechseln täglich aufgereinigt. Nach Gefriertrocknung werden 7.5 mg [62.5 %] eines weißen Pulvers erhalten.

¹H-NMR (600 MHz, D₂O): δ = 5.45 – 5.05 (m, H₅, 1H, überlappend mit D₂O); 4.61 – 3.0 (m, H_{3,4,6-10}, 10H) 2.05 – 0.64 (m, H_{1,2}, 5H) ppm

5.5.2 Übersicht der sulfatisierten Glykopolymere

Auf die in Kapitel 5.4.1 beschriebene Weise werden die in Tabelle 21 dargestellten Glykopolymere sulfatisiert.

Tabelle 21: Übersicht der sulfatisierten Glykopolymere

Polymer	Einwaage [mg]	Ausbeute [mg]
pMan2CA ₈₆ S	5.0	7.5 (62.5 %)
pGal2CA ₄₀	14.5	27.3 (76.2 %)
pGal2CA ₄₆	34.0	32.6 (38.8 %)

Die hier dargestellten sulfatisierten Glykopolymere werden in der gemeinsamen Publikation mit Soria-Martinez et al. hinsichtlich ihres Inhibierungsverhaltens von Papillomaviren untersucht.^[53]

6. Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Glykokalyx angelehnt an Bertozzi und Kiessling. ^[6]	1
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Komplexbildung von Concanavalin A mit α -Mannose in Anwesenheit von Ca^{2+} und Mn^{2+} , angelehnt an die Arbeiten von Loris et al. sowie Lis und Sharon. ^[20, 30]	3
Abbildung 3: Beiträge zur Affinität und Avidität von kohlenhydrat-präsentierenden Strukturen.	5
Abbildung 4: Janusstrukturen in schematischer Darstellung angelehnt an Walter und Müller. ^[118]	25
Abbildung 5: Übersicht der Arbeitsschritte, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden.	30
Abbildung 6: Fünfgliedriger Übergangszustand mit Penta-O-Acetyl-Mannose (links) und Penta-O-Acetyl-Galaktose (rechts).	33
Abbildung 7: RAFT-Reagenzien zur Synthese von Glykopolymeren.	37
Abbildung 8: Vorbereitung von Goldoberflächen zur Bestimmung der Oberflächenplasmonenresonanz, angelehnt an Homola et al.. ^[160]	44
Abbildung 9: Funktionalisierungsprinzip der Goldoberflächen eines SPR-Chips.	47
Abbildung 10: Sensorgramm der Immobilisierung von pMan2CM ₈₆ und pGal4CM ₅₅	48
Abbildung 11: Sensorgramm der Flusszellen mit $c(\text{ConA}) = 1.0 \text{ mg/mL}$	50
Abbildung 12: Hinzugabe von LBB auf die aktive Messzelle.	52
Abbildung 13: Verschiedene Konzentrationen von ConA auf der aktiven Messzelle.	53
Abbildung 14: Vermutete Oberflächenadsorption von ConA trotz Regenerierungsschritt.	55
Abbildung 15: Zwei aufeinanderfolgende Immobilisierungen der Aktiven Zelle und der Referenzzelle mit pMan2CA ₄₀ und pGal2CA ₂₂	56
Abbildung 16: Mehrstufige Funktionalisierung beider Flusszellen.	57
Abbildung 17: Sensorgramm bei Kontakt zwischen ConA und der aktiven Messzelle (links) und der Referenzzelle (rechts) nach Co-SAM-Ausbildung.	58

Abbildung 18: Immobilisierung beider Flusszellen mit pMan2CA ₂₆ und pGal2CA ₂₂	60
Abbildung 19: Mehrstufige Funktionalisierung beider Flusszellen mit doppelter Wiederholung des Funktionalisierungsschritts bei 24 h Kontaktzeit zu pGal2CA ₂₂	61
Abbildung 20: Single-Cycle-Messungen zur Stabilitätstestung auf der aktiven Messzelle gegen ConA [1.0 mg/mL in der höchsten Konzentration].	62
Abbildung 21: Single-Cycle-Messungen zur Stabilitätstestung auf der Referenzzelle gegen ConA [1.0 mg/mL in der höchsten Konzentration].	63
Abbildung 22: Single-Cycle-Messungen gegen ConA (1.0 mg/mL in der höchsten Konzentration).	65
Abbildung 23: Sensorgramme von WGA (links) und ConA (rechts) gegen die aktive Messzelle von GC _{Kurz}	71
Abbildung 24: Sensorgramme von WGA (links) und ConA (rechts) gegen die Referenzzelle von GC _{Kurz}	72
Abbildung 25: Resultierendes Sensorgramm der Subtraktion der Referenzzelle von der aktiven Messzelle (nicht normiert).	73
Abbildung 26: Direktbindungsstudien mit ConA auf GC _{Kurz} (links) und GC _{Lang} (rechts).	76
Abbildung 27: K _d -Fits von ConA gegen GC _{Kurz} (Links) und GC _{Lang} (rechts).	77
Abbildung 28: Verdeutlichung des Grundprinzips des Inhibitions-Kompetitions-Assays.	80
Abbildung 29: Multi-Cycle-Messungen anhand des Beispielspektrums für α -Methylmannose auf GC _{Kurz}	82
Abbildung 30: Relative Bindung von ConA auf GC _{Kurz} bei verschiedenen Konzentrationen α -Methylmannose und Hill1-Fit.	83
Abbildung 31: Übersicht der Inhibitions-Kompetitions-Messungen.	85
Abbildung 32: Sensorgramm von ConA in Anwesenheit von pGal2CA ₂₂ und pGal2CA ₃₇ gegen GC _{Kurz}	87
Abbildung 33: Sensorgramme von α -Methylmannose gegen GC _{Kurz} (links) und GC _{Lang} (rechts).	89

Abbildung 34: Auftragung der $R_{\max}$ von α -Methylmannose gegen die Konzentration des Inhibitors (logarithmisch skaliert), abgeleitet aus Abbildung 33 und IC_{50} -Fit der Messungen auf GC_{Kurz} (links) und GC_{Lang} (rechts).	91
Abbildung 35: Sensorgramme der Inhibierung von ConA durch pMan ₂₆ gegen GC_{Kurz} (links) und GC_{Lang} (rechts).	93
Abbildung 36: Auftragung der $R_{\max}$ von pMan ₂₆ gegen die Konzentration des Inhibitors (logarithmisch skaliert) abgeleitet aus Abbildung 35 und IC_{50} -Fit der Messungen auf GC_{Kurz} (links) und GC_{Lang} (rechts).	94
Abbildung 37: Sensorgramme der Inhibierung von ConA durch pMan2CA ₄₀ gegen GC_{Kurz} (links) und GC_{Lang} (rechts).	96
Abbildung 38: Auftragung der $R_{\max}$ von pMan2CA ₄₀ gegen die Inhibitorkonzentration (logarithmisch skaliert) abgeleitet aus Abbildung 37 und IC_{50} -Fit der Messungen auf GC_{Kurz} (links) und GC_{Lang} (rechts).	97
Abbildung 39: Hill1-Fits der verschiedenen Inhibitoren der Messungen auf GC_{Kurz} - molar (links) und pro Zuckereinheit (rechts) (aufgetragen gegen die jeweilige logarithmische Konzentration).	100
Abbildung 40: Hill1-Fits der verschiedenen Inhibitoren gegen GC_{Lang} - molar (links) und pro Zuckereinheit (rechts) (aufgetragen gegen die jeweilige logarithmische Konzentration).	101
Abbildung 41: Schematische Darstellung des Trübungsassays.	114
Abbildung 42: Erwartete Ausbildung der Partikel verschiedener Ausprägung.	115
Abbildung 43: Man ₁₈ -APS zu 2 mg/mL in Anwesenheit von <i>E. Coli</i> mit einer Konzentration von 1 mg/mL nach 3 h.	117
Abbildung 44: Photographien der Bildung der Aggregate der APS-Probe mit <i>E. Coli</i> zu unterschiedlichen Zeitpunkten.	121
Abbildung 45: Mikroskopaufnahmen APS (556 $\mu\text{g/mL}$) in Anwesenheit fluoreszenzmarkierter <i>E. Coli</i> nach 6 h Kontakt.	122

Abbildung 46: Photographien der Bildung der Aggregate der Man ₁₈ -APS-Probe mit <i>E. Coli</i> zu unterschiedlichen Zeitpunkten.	124
Abbildung 47: Mikroskopaufnahmen der Man ₁₈ -APS-Partikel in Anwesenheit von <i>E. Coli</i> nach 3 h.	125
Abbildung 48: Photographien der Bildung der Aggregate der Man ₁₈ -JNIMAm-Probe mit <i>E. Coli</i> zu unterschiedlichen Zeitpunkten.	127
Abbildung 49: Mikroskopaufnahme der Man ₁₈ -JNIPAm-Partikel nach 3 Stunden in Anwesenheit von <i>E. Coli</i>	128
Abbildung 50: Photographien der Bildung der Aggregate der Gal ₃₇ -JNIMAm-Probe mit <i>E. Coli</i> zu unterschiedlichen Zeitpunkten.	130
Abbildung 51: Mikroskopaufnahmen der Gal ₃₇ -JNIPAm Partikel zu unterschiedlichen Zeitpunkten.	131

6.2 Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Syntheseentwicklung von <i>N</i> -[2-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranosyloxy)ethyl]-acrylamid.....	35
Tabelle 2: Übersicht der synthetisierten Glykomonomere.....	36
Tabelle 3: Übersicht der Polymerisationsansätze von 7 zur Polymerisationsoptimierung.....	41
Tabelle 4: Übersicht der synthetisierten Glykopolymere und deren Anwendung im Verlauf dieser Arbeit.....	42
Tabelle 5: Immobilisierungslevel nach der Funktionalisierung mit pMan2CM ₈₆ und pGal4CM ₅₅	49
Tabelle 6: Immobilisierungslevel der unterschiedlichen Goldoberflächen nach jedem Funktionalisierungsschritt.....	69
Tabelle 7: Determinierte apparente K_d -Werte gegen ConA auf den jeweiligen Goldchips.	77
Tabelle 8: Übersicht der in den Inhibitions-Kompetitions-Studien eingesetzten Inhibitoren.	86
Tabelle 9: Übersicht der ermittelten IC ₅₀ -Werte.....	99
Tabelle 10: Vergleich der verschiedenen Kupplungsmethoden auf APS-Partikeln mittels Bestimmung des Zetapotentials und des isoelektrischen Punkts zur Einschätzung des Funktionalisierungserfolgs.	107
Tabelle 11: Optimierung der APS-Partikelfunktionalisierung.	108
Tabelle 12: Verwendete Glykopolymere zur Partikelfunktionalisierung.	111
Tabelle 13: Übersicht der synthetisierten Partikel unter Angabe der jeweils funktionalisierten Glykopolymere und den Indikatoren für den Erfolg dieser Funktionalisierungen: Zetapotential, Zuckerkonzentration und Restamingehalt.....	112
Tabelle 14: Übersicht der jeweiligen Endkonzentrationen der Partikelproben für das Aggregationsassay.....	119
Tabelle 15: Übersicht der Trübungsstudien der verschiedenen Partikeltypen.....	133
Tabelle 16: Zusammenfassung der Abnahme der Trübungen.	134
Tabelle 17: Übersicht der sulfatisierten Glykopolymere.....	136

Tabelle 18: Übersicht aller im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Glykopolymere.....	173
Tabelle 19: Übersicht der erhaltenen Partikel.	176
Tabelle 20: Übersicht der Partikelstabilitätsmessungen in MilliQ-Wasser.	177
Tabelle 21: Übersicht der sulfatisierten Glykopolymere.....	180

6.3 Verzeichnis der Schemata

Schema 1: Nachbargruppeneffekt einer Acetylschutzgruppe auf das gebildete Anomer nach erfolgter Abspaltung der Austrittsgruppe und nucleophilem Angriff.....	10
Schema 2: Glykosyl-Donor in Anwesenheit eines geeigneten Akzeptorsystems angelehnt an Lindhorst. ^[2]	32
Schema 3: Syntheseroute eines Kohlenhydratdonors mit Trichloroacetimidat als-Abgangsgruppe. ..	33
Schema 4: Präequilibrium anhand des Beispiels von 4.....	39
Schema 5: RAFT-Hauptequilibrium.	40
Schema 6: Kupplungsmechanismus mit Hilfe von EDC und NHS.	106
Schema 7: Exemplarische Darstellung der RAFT-Polymerisation und anschließenden Aufarbeitung von 4.....	166

6.4 Literaturverzeichnis

- [1] R. A. Dwek, *Chemical Reviews* **1996**, 96, 683-720.
- [2] T. K. Lindhorst, *Essentials of carbohydrate chemistry and biochemistry*, Wiley-Vch Weinheim, **2007**.
- [3] L. L. Kiessling, J. C. Grim, *Chemical Society Reviews* **2013**, 42, 4476-4491.
- [4] S. Ito, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences* **1974**, 268, 55-66.
- [5] J. W. Costerton, R. T. Irvin, K. J. Cheng, *Annu Rev Microbiol* **1981**, 35, 299-324.
- [6] C. R. Bertozzi, L. L. Kiessling, *Science* **2001**, 291, 2357-2364.
- [7] V. Ladmiral, E. Melia, D. M. Haddleton, *European Polymer Journal* **2004**, 40, 431-449.
- [8] S. R. Sá, A. G. S. Junior, R. G. Lima-Neto, C. A. Andrade, M. D. Oliveira, *Talanta* **2020**, 220, 121375.
- [9] M. L. Phillips, E. Nudelman, F. Gaeta, M. Perez, A. K. Singhal, S.-i. Hakomori, J. C. Paulson, *Science* **1990**, 250, 1130-1132.
- [10] N. S. Sampson and L. Wu, *ACS Chemical Biology* **2013**, 9, 468.
- [11] P.-C. Pang, P. C. Chiu, C.-L. Lee, L.-Y. Chang, M. Panico, H. R. Morris, S. M. Haslam, K.-H. Khoo, G. F. Clark, W. S. Yeung, *Science* **2011**, 333, 1761-1764.
- [12] R. C. Casey, T. R. Oegema, K. M. Skubitz, S. E. Pambuccian, S. M. Grindle, A. P. Skubitz, *Clinical experimental metastasis* **2003**, 20, 143-152.
- [13] C. A. Wells, J. A. Salvage-Jones, X. Li, K. Hitchens, S. Butcher, R. Z. Murray, A. G. Beckhouse, S. Manzanero, C. Cobbold, K. Schroder, *The Journal of Immunology* **2008**, 180, 7404-7413.
- [14] K. L. Hartshorn, E. C. Crouch, M. R. White, P. Eggleton, A. I. Tauber, D. Chang, K. Sastry, *The Journal of clinical investigation* **1994**, 94, 311-319.
- [15] G. Rabinovich, A. Ariel, R. HersHKoviz, J. Hirabayashi, K. Kasai, O. Lider, *Immunology* **1999**, 97, 100.
- [16] B. J. Appelmelk, I. van Die, S. J. van Vliet, C. M. Vandenbroucke-Grauls, T. B. Geijtenbeek, Y. van Kooyk, *The Journal of Immunology* **2003**, 170, 1635-1639.
- [17] M. Mammen, S. K. Choi, G. M. Whitesides, **1998**, 37, 2754-2794.
- [18] S. Schmidt, T. J. Paul, A. K. Strzelczyk, *Macromolecular Chemistry Physics* **2019**, 220, 1900323.
- [19] R. Hevey, R. B. Pouw, C. Harris, D. Ricklin, *British Journal of Pharmacology* **2020**.
- [20] H. Lis, N. Sharon, *Chemical Reviews* **1998**, 98, 637-674.
- [21] W. C. Boyd, E. Shapleigh, *Science* **1954**, 119, 419.
- [22] S. Barondes, *Trends in biochemical sciences* **1988**, 13, 480-482.

- [23] R. Samsonov, T. Shtam, V. Burdakov, A. Glotov, E. Tsyrlina, L. Berstein, A. Nosov, V. Evtushenko, M. Filatov, A. J. T. P. Malek, **2016**, 76, 68-79.
- [24] D. A. Wesener, K. Wangkanont, R. McBride, X. Song, M. B. Kraft, H. L. Hodges, L. C. Zarling, R. A. Splain, D. F. Smith, R. Cummings, *Nature structural molecular biology* **2015**, 22, 603-610.
- [25] T. L. Thurston, M. P. Wandel, N. von Muhlinen, Á. Foeglein, F. Randow, *Nature* **2012**, 482, 414-418.
- [26] S. R. S. Ting, G. J. Chen, M. H. Stenzel, *Polymer Chemistry* **2010**, 1, 1392-1412.
- [27] M. Ambrosi, N. R. Cameron, B. G. Davis, *Org Biomol Chem* **2005**, 3, 1593-1608.
- [28] W. I. Weis, K. Drickamer, *Annual review of biochemistry* **1996**, 65, 441-473.
- [29] J. M. Rini, *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **1995**, 24, 551-577.
- [30] R. Loris, F. Casset, J. Bouckaert, J. Pletinckx, M.-H. Dao-Thi, F. Poortmans, A. Imberty, S. Perez, L. Wyns, *Glycoconjugate journal* **1994**, 11, 507-517.
- [31] Y. C. Lee, R. T. Lee, *Accounts of Chemical Research* **1995**, 28, 321-327.
- [32] J. J. Lundquist, E. J. Toone, *Chemical Reviews* **2002**, 102, 555-578.
- [33] T. K. Lindhorst, C. Kieburg, U. Krallmann-Wenzel, *Glycoconj J* **1998**, 15, 605-613.
- [34] H. Maaheimo, R. Renkonen, J. P. Turunen, L. Penttilä, O. Renkonen, *European journal of biochemistry* **1995**, 234, 616-625.
- [35] D. A. Mann, M. Kanai, D. J. Maly, L. L. Kiessling, *Journal of the American Chemical Society* **1998**, 120, 10575-10582.
- [36] W. J. Lees, A. Spaltenstein, J. E. Kingery-Wood, G. M. Whitesides, *Journal of Medicinal Chemistry* **1994**, 37, 3419-3433.
- [37] L. L. Kiessling, J. E. Gestwicki, L. E. Strong, *Current opinion in chemical biology* **2000**, 4, 696-703.
- [38] R. J. Pieters, *Organic biomolecular chemistry* **2009**, 7, 2013-2025.
- [39] 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.
- [40] L. L. Kiessling, J. E. Gestwicki, L. E. Strong, *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, 45, 2348-2368.
- [41] C. F. Brewer, R. D. Brown, *Biochemistry* **1979**, 18, 2555-2562.
- [42] T. K. Dam, C. F. Brewer, *Glycobiology* **2010**, 20, 270-279.
- [43] F. Pertici, R. J. Pieters, *Chem Commun (Camb)* **2012**, 48, 4008-4010.
- [44] J. E. Gestwicki, C. W. Cairo, L. E. Strong, K. A. Oetjen, L. L. Kiessling, *Journal of the American Chemical Society* **2002**, 124, 14922-14933.
- [45] M. Cloninger, *Current opinion in chemical biology* **2002**, 6, 742-748.

- [46] D. Deniaud, K. Julienne, S. G. Gouin, *Organic biomolecular chemistry* **2011**, 9, 966-979.
- [47] M. Kanai, K. H. Mortell, L. L. Kiessling, *Journal of the American Chemical Society* **1997**, 119, 9931-9932.
- [48] M. Okada, *Progress in Polymer Science* **2001**, 26, 67-104.
- [49] M. N. Matrosovich, L. V. Mochalova, V. P. Marinina, N. E. Byramova, N. V. Bovin, *FEBS Lett* **1990**, 272, 209-212.
- [50] A. Spaltenstein, G. M. Whitesides, *Journal of the American Chemical Society* **1991**, 113, 686-687.
- [51] M. H. Stenzel, *Chem Commun (Camb)* **2008**, 3486-3503.
- [52] T. Yoshida, T. Akasaka, Y. Choi, K. Hattori, B. Yu, T. Mimura, Y. Kaneko, H. Nakashima, E. Aragaki, M. Premanathan, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **1999**, 37, 789-800.
- [53] L. Soria-Martinez, S. Bauer, M. Giesler, S. Schelhaas, J. Materlik, K. Janus, P. Pierzyna, M. Becker, N. L. Snyder, L. Hartmann, *Journal of the American Chemical Society* **2020**, 142, 5252-5265.
- [54] C. von der Ehe, C. Weber, M. Gottschaldt, U. S. Schubert, *Progress in Polymer Science* **2016**, 57, 64-102.
- [55] Y. L. Qu, Y. Y. Li, S. S. Liao, J. Y. Sun, M. Li, D. Wang, C. C. Xia, Q. Luo, J. N. Hu, K. Luo, Q. Y. Gong, B. Song, *Journal of Biomedical Nanotechnology* **2019**, 15, 1637-1653.
- [56] Y. Chen, M. S. Lord, A. Piloni, M. H. Stenzel, *Macromolecules* **2015**, 48, 346-357.
- [57] R. Grombe, M.-F. Gouzy, M. Nitschke, H. Komber, C. Werner, *Colloids Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects* **2006**, 284, 295-300.
- [58] C. Wang, J. Wu, Z. K. Xu, *Macromolecular rapid communications* **2010**, 31, 1078-1082.
- [59] C. Xue, S. P. Jog, P. Murthy, H. Liu, *Biomacromolecules* **2006**, 7, 2470-2474.
- [60] W. Ndugire, B. Wu, M. Yan, *Molecules* **2019**, 24, 157.
- [61] D. J. Lefebvre, J. P. Kamerling, J. F. Vliegthart, *Organic letters* **2000**, 2, 701-703.
- [62] P. Fügedi, P. J. Garegg, H. Lönn, T. Norberg, *Glycoconjugate Journal* **1987**, 4, 97-108.
- [63] T. Tanaka, G. Inoue, S. I. Shoda, Y. Kimura, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2014**, 52, 3513-3520.
- [64] P. Sinay, *Pure and Applied Chemistry* **1991**, 63, 519-528.
- [65] W. Koenigs, E. Knorr, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1901**, 34, 957-981.
- [66] R. U. Lemieux, K. B. Hendriks, R. V. Stick, K. James, *Journal of the American Chemical Society* **1975**, 97, 4056-4062.
- [67] R. R. Schmidt, W. Kinzy, in *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*, Vol. 50, Academic Press, **1994**, pp. 21-123.

- [68] B. Roy, B. Mukhopadhyay, *Tetrahedron Letters* **2007**, 48, 3783-3787.
- [69] T. Tanaka, Y. Zhou, C. Tamoto, Y. Kurebayashi, T. Takahashi, T. Suzuki, *Journal of Applied Glycoscience* **2017**.
- [70] A.-M. Pana, L.-M. Rusnac, G. Bandur, E. Sisu, V. Badea, M. Sillion, *MATERIALE PLASTICE* **2010**, 47, 28.
- [71] C. Gerke, M. F. Ebbesen, D. Jansen, S. Boden, T. Freichel, L. Hartmann, *Biomacromolecules* **2017**, 18, 787-796.
- [72] W. Ye, S. Wells, J. DeSimone, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2001**, 39, 3841-3849.
- [73] S. Loykulnant, M. Yamashiro, A. Hirao, *Macromolecular Chemistry Physics* **2001**, 202, 1791-1798.
- [74] A. Takasu, H. Kojima, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2010**, 48, 5953-5960.
- [75] K. Ohno, Y. Tsujii, T. Miyamoto, T. Fukuda, M. Goto, K. Kobayashi, T. Akaike, *Macromolecules* **1998**, 31, 1064-1069.
- [76] V. Hořejší, P. Smolek, J. Kocourek, *Biochimica et Biophysica Acta -General Subjects* **1978**, 538, 293-298.
- [77] C. Fraser, R. H. Grubbs, *Macromolecules* **1995**, 28, 7248-7255.
- [78] K. H. Mortell, R. V. Weatherman, L. L. Kiessling, *Journal of the American Chemical Society* **1996**, 118, 2297-2298.
- [79] B. D. Polizzotti, K. L. Kiick, *Biomacromolecules* **2006**, 7, 483-490.
- [80] D. M. Lynn, B. Mohr, R. H. Grubbs, *Journal of the American Chemical Society* **1998**, 120, 1627-1628.
- [81] D. Ponader, F. Wojcik, F. Beceren-Braun, J. Dervede, L. Hartmann, *Biomacromolecules* **2012**, 13, 1845-1852.
- [82] Y. Hoshino, M. Nakamoto, Y. Miura, *J Am Chem Soc* **2012**, 134, 15209-15212.
- [83] S. C. Purcell, K. Godula, *Journal of the Royal Society Interface Focus* **2019**, 9, 20180080.
- [84] J. E. Gestwicki, C. W. Cairo, D. A. Mann, R. M. Owen, L. L. Kiessling, *Analytical biochemistry* **2002**, 305, 149-155.
- [85] K. Godula, C. R. Bertozzi, *Journal of the American Chemical Society* **2012**, 134, 15732-15742.
- [86] Z. Liu, Y. Jiao, Y. Wang, C. Zhou, Z. Zhang, *Advanced drug delivery reviews* **2008**, 60, 1650-1662.
- [87] T. Jung, W. Kamm, A. Breitenbach, E. Kaiserling, J. Xiao, T. Kissel, *European Journal of Pharmaceutics Biopharmaceutics* **2000**, 50, 147-160.
- [88] K. S. Soppimath, T. M. Aminabhavi, A. R. Kulkarni, W. E. Rudzinski, *Journal of controlled release* **2001**, 70, 1-20.

- [89] C. P. Reis, R. J. Neufeld, A. J. Ribeiro, F. Veiga, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, Medicine* **2006**, 2, 8-21.
- [90] S. McClean, E. Prosser, E. Meehan, D. O'Malley, N. Clarke, Z. Ramtoola, D. Brayden, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **1998**, 6, 153-163.
- [91] D. H. Nguyen, J. H. Choi, Y. K. Joung, K. D. Park, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* **2011**, 26, 287-300.
- [92] M. N. Sithole, Y. E. Choonara, L. C. du Toit, P. Kumar, V. Pillay, *Pharmaceutical Development and Technology* **2017**, 22, 283-295.
- [93] T. G. Barclay, C. M. Day, N. Petrovsky, S. Garg, *Carbohydr Polym* **2019**, 221, 94-112.
- [94] C. Lemarchand, R. Gref, P. Couvreur, *European Journal of Pharmaceutics Biopharmaceutics* **2004**, 58, 327-341.
- [95] Y. Zhang, Q. Guo, S. An, Y. Lu, J. Li, X. He, L. Liu, Y. Zhang, T. Sun, C. Jiang, *ACS applied materials interfaces* **2017**, 9, 12227-12240.
- [96] J. Hu, P. Wei, P. H. Seeberger, J. Yin, *Chem Asian J* **2018**, 13, 3448-3459.
- [97] R. Gref, *Surface-engineered nanoparticles as drug carriers*, American Scientific Publishers: Stevenson Ranch, CA, **2003**.
- [98] M. T. Peracchia, C. Vauthier, D. Desmaële, A. Gulik, J.-C. Dedieu, M. Demoy, J. d'Angelo, P. Couvreur, *Pharmaceutical Research* **1998**, 15, 550-556.
- [99] D. Bazile, C. Prud'homme, M. T. Bassoullet, M. Marlard, G. Spenlehauer, M. Veillard, *J Pharm Sci* **1995**, 84, 493-498.
- [100] L. Serra, J. Doménech, N. Peppas, *Biomaterials* **2006**, 27, 5440-5451.
- [101] R. Augustine, D.-K. Kim, S. H. Jeon, T. W. Lee, N. Kalva, J. H. Kim, I. J. R. Kim, *F. Polymers*, **2020**, 104595.
- [102] O. C. Farokhzad, S. Jon, A. Khademhosseini, T.-N. T. Tran, D. A. LaVan, R. Langer, *Cancer research* **2004**, 64, 7668-7672.
- [103] M. D. Kurkuri, T. M. Aminabhavi, *Journal of controlled Release* **2004**, 96, 9-20.
- [104] R. Stahn, R. Zeisig, *Tumour Biol* **2000**, 21, 176-186.
- [105] A. Jain, S. K. Singh, S. K. Arya, S. C. Kundu, S. Kapoor, *ACS Biomaterials Science & Engineering* **2018**, 4, 3939-3961.
- [106] F. Jacobi, A. Camaleño de la Calle, S. Boden, A. Grafmüller, L. Hartmann, S. Schmidt, *Biomacromolecules* **2018**, 19, 3479-3488.
- [107] M. Toyoshima, Y. Miura, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2009**, 47, 1412-1421.
- [108] I. García, A. Sánchez-Iglesias, M. Henriksen-Lacey, M. Grzelczak, S. Penadés, L. M. Liz-Marzán, *Journal of the American Chemical Society* **2015**, 137, 3686-3692.

- [109] J. S. Basuki, L. Esser, H. T. Duong, Q. Zhang, P. Wilson, M. R. Whittaker, D. M. Haddleton, C. Boyer, T. P. Davis, *Chemical Science* **2014**, *5*, 715-726.
- [110] S. Schmidt, H. Wang, D. Pussak, S. Mosca, L. Hartmann, *Beilstein journal of organic chemistry* **2015**, *11*, 720-729.
- [111] E. Morgan, D. Wupperfeld, D. Morales, N. Reich, *Bioconjugate Chemistry* **2019**, *30*, 853-860.
- [112] E. Sokolovskaya, J. Yoon, A. C. Misra, S. Bräse, J. Lahann, *Macromolecular rapid communications* **2013**, *34*, 1554-1559.
- [113] X. Jiang, A. Housni, G. Gody, P. Boullanger, M.-T. Charreyre, T. Delair, R. Narain, *Bioconjugate chemistry* **2010**, *21*, 521-530.
- [114] S. I. van Kasteren, S. J. Campbell, S. Serres, D. C. Anthony, N. R. Sibson, B. G. Davis, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2009**, *106*, 18-23.
- [115] R. P. Brinäs, A. Sundgren, P. Sahoo, S. Morey, K. Rittenhouse-Olson, G. E. Wilding, W. Deng, J. J. Barchi, *Bioconjugate Chemistry* **2012**, *23*, 1513-1523.
- [116] M. Moros, B. Hernáez, E. Garet, J. T. Dias, B. Sáez, V. Grazú, Á. González-Fernández, C. Alonso, J. M. de la Fuente, *ACS Nano* **2012**, *6*, 1565-1577.
- [117] A. Kirillova, C. Marschelke, A. Synytska, *ACS Applied Materials & Interfaces* **2019**, *11*, 9643-9671.
- [118] A. Walther, A. H. Müller, *Soft Matter* **2008**, *4*, 663-668.
- [119] C. Casagrande, P. Fabre, E. Raphael, M. Veyssié, *EPL* **1989**, *9*, 251.
- [120] A. Kirillova, G. Stoychev, L. Ionov, A. Synytska, *Langmuir* **2014**, *30*, 12765-12774.
- [121] A. Synytska, A. Kirillova, L. Isa, *ChemPlusChem* **2014**, *79*, 656-661.
- [122] N. Glaser, D. J. Adams, A. Böker, G. Krausch, *Langmuir* **2006**, *22*, 5227-5229.
- [123] A. Perro, S. Reculosa, S. Ravaine, E. Bourgeat-Lami, E. Duguet, *Journal of materials chemistry* **2005**, *15*, 3745-3760.
- [124] L. Hong, S. Jiang, S. Granick, *Langmuir* **2006**, *22*, 9495-9499.
- [125] H. Takei, N. Shimizu, *Langmuir* **1997**, *13*, 1865-1868.
- [126] O. Cayre, V. N. Paunov, O. D. Velev, *Journal of Materials Chemistry* **2003**, *13*, 2445-2450.
- [127] K. Fujimoto, K. Nakahama, M. Shidara, H. Kawaguchi, *Langmuir* **1999**, *15*, 4630-4635.
- [128] A. Synytska, M. Stamm, S. Diez, L. Ionov, *Langmuir* **2007**, *23*, 5205-5209.
- [129] T. Tanaka, M. Okayama, H. Minami, M. Okubo, *Langmuir* **2010**, *26*, 11732-11736.
- [130] A. Walther, M. Hoffmann, A. H. Müller, *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47*, 711-714.
- [131] L. C. Bradley, K. J. Stebe, D. Lee, *Journal of the American Chemical Society* **2016**, *138*, 11437-11440.

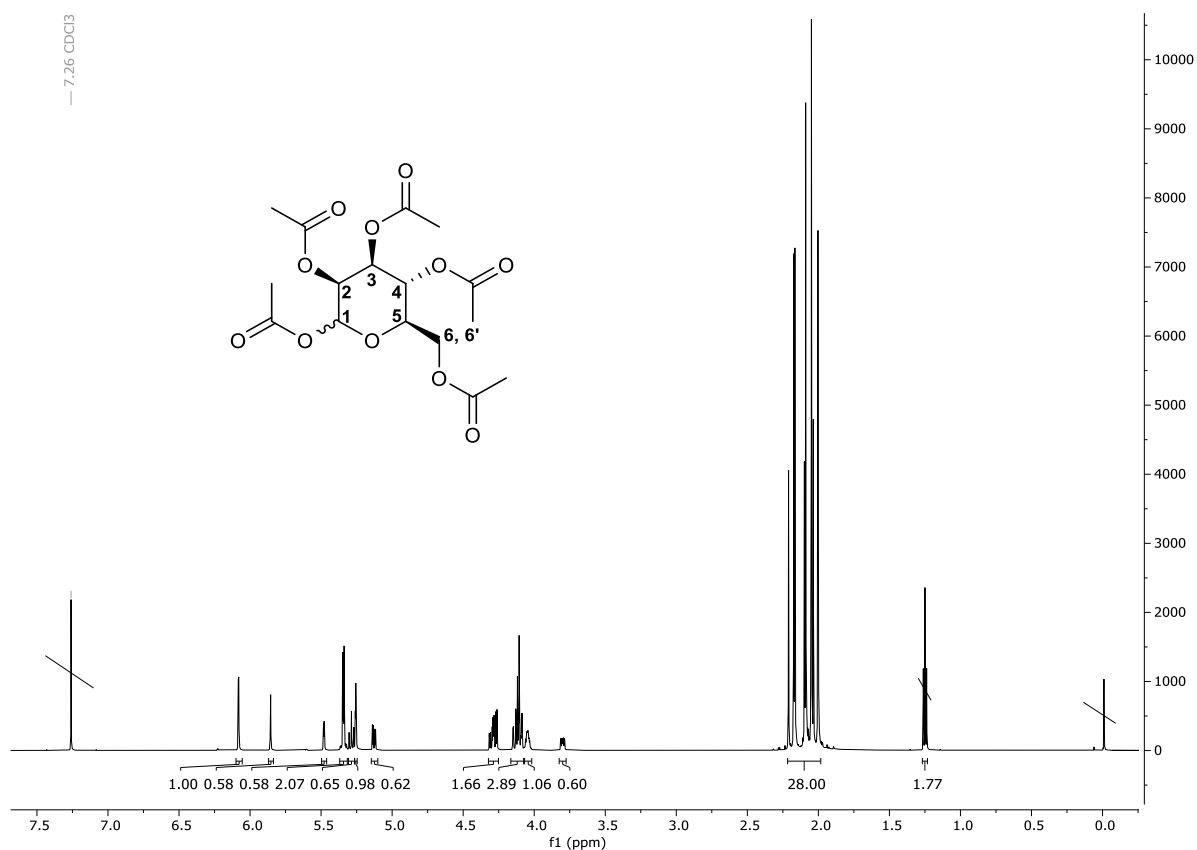
- [132] M. Schwarzer, T. Otto, M. Schremb, C. Marschelke, H. T. Tee, F. R. Wurm, I. V. Roisman, C. Tropea, A. Synytska, *Chemistry of Materials* **2019**, *31*, 112-123.
- [133] A. Kirillova, L. Ionov, I. V. Roisman, A. Synytska, *Chemistry of Materials* **2016**, *28*, 6995-7005.
- [134] A. Kirillova, C. Schliebe, G. Stoychev, A. Jakob, H. Lang, A. Synytska, *ACS Applied Materials & Interfaces* **2015**, *7*, 21218-21225.
- [135] Q. Zhang, S. Savagatrup, P. Kaplonek, P. H. Seeberger, T. M. Swager, *ACS Central Science* **2017**, *3*, 309-313.
- [136] C. Zhang, M.-W. Chang, Y. Li, Y. Qi, J. Wu, Z. Ahmad, J.-S. Li, *RSC Advances* **2016**, *6*, 77174-77178.
- [137] A. Kirillova, C. Marschelke, J. Friedrichs, C. Werner, A. Synytska, *ACS Applied Materials & Interfaces* **2016**, *8*, 32591-32603.
- [138] S. Zhang, Q. Xiao, S. E. Sherman, A. Muncan, A. D. M. Ramos Vicente, Z. Wang, D. A. Hammer, D. Williams, Y. Chen, D. J. Pochan, S. Vértessy, S. André, M. L. Klein, H.-J. Gabius, V. Percec, *Journal of the American Chemical Society* **2015**, *137*, 13334-13344.
- [139] A. Dag, J. Zhao, M. H. Stenzel, *ACS Macro Letters* **2015**, *4*, 579-583.
- [140] Y. Yuan, F. Liu, L. Xue, H. Wang, J. Pan, Y. Cui, H. Chen, L. Yuan, *ACS Applied Materials & Interfaces* **2016**, *8*, 11309-11317.
- [141] H. Uzawa, H. Ito, M. Izumi, H. Tokuhisa, K. Taguchi, N. J. T. Minoura, **2005**, *61*, 5895-5905.
- [142] Q. Yang, M. Strathmann, A. Rumpf, G. Schaule, M. Ulbricht, *ACS Applied Materials & Interfaces* **2010**, *2*, 3555-3562.
- [143] X. Yan, A. Sivignon, N. Yamakawa, A. Crepet, C. Travelet, R. Borsali, T. Dumych, Z. Li, R. Bilyy, D. Deniaud, E. Fleury, N. Barnich, A. Darfeuille-Michaud, S. G. Gouin, J. Bouckaert, J. Bernard, *Biomacromolecules* **2015**, *16*, 1827-1836.
- [144] Y. Chen, G. Chen, M. H. Stenzel, *Macromolecules* **2010**, *43*, 8109-8114.
- [145] I. Goldstein, C. Hollerman, E. Smith, *Biochemistry* **1965**, *4*, 876-883.
- [146] R. V. Weatherman, K. H. Mortell, M. Chervenak, L. L. Kiessling, E. J. Toone, *Biochemistry* **1996**, *35*, 3619-3624.
- [147] I. Salit, E. Gotschlich, *The Journal of experimental medicine* **1977**, *146*, 1169-1181.
- [148] I. Ofek, E. H. Beachey, *Infection immunity* **1978**, *22*, 247-254.
- [149] P. Pierzyna, University of Duesseldorf (Duesseldorf), **2016**.
- [150] M. Dubber, T. Lindhorst, *Organic Letters* **2001**, *3*, 4019-4022.
- [151] J. Chiefari, Y. K. Chong, F. Ercole, J. Krstina, J. Jeffery, T. P. T. Le, R. T. A. Mayadunne, G. F. Meijs, C. L. Moad, G. Moad, E. Rizzardo, S. H. Thang, *Macromolecules* **1998**, *31*, 5559-5562.
- [152] V. Coessens, T. Pintauer, K. Matyjaszewski, *Progress in polymer science* **2001**, *26*, 337-377.

- [153] H. Willcock, R. K. O'Reilly, *Polymer Chemistry* **2010**, *1*, 149-157.
- [154] D. J. Keddie, G. Moad, E. Rizzardo, S. H. Thang, *Macromolecules* **2012**, *45*, 5321-5342.
- [155] R. T. A. Mayadunne, E. Rizzardo, J. Chiefari, J. Krstina, G. Moad, A. Postma, S. H. Thang, *Macromolecules* **2000**, *33*, 243-245.
- [156] R. Francis, A. Ajayaghosh, *Macromolecules* **2000**, *33*, 4699-4704.
- [157] M. Dube, K. Rilling, A. Penlidis, *Journal of applied polymer science* **1991**, *43*, 2137-2145.
- [158] J. Yeow, R. Chapman, A. J. Gormley, C. Boyer, *Chemical Society Reviews* **2018**, *47*, 4357-4387.
- [159] M. Giesler, **2015**.
- [160] J. Homola, S. S. Yee, G. J. S. Gauglitz, a. B. Chemical, **1999**, *54*, 3-15.
- [161] O. Dannenberger, M. Buck, M. Grunze, *The Journal of Physical Chemistry B* **1999**, *103*, 2202-2213.
- [162] M. Himmelhaus, F. Eisert, M. Buck, M. Grunze, *The Journal of Physical Chemistry B* **2000**, *104*, 576-584.
- [163] Y. Terada, H. Seto, Y. Hoshino, T. Murakami, S. Shinohara, K. Tamada, Y. Miura, *Polymer Journal* **2017**, *49*, 255-262.
- [164] R. C. Ebersole, J. A. Miller, J. R. Moran, M. D. Ward, *Journal of the American Chemical Society* **1990**, *112*, 3239-3241.
- [165] P. M. Wolny, J. P. Spatz, R. P. Richter, *Langmuir* **2010**, *26*, 1029-1034.
- [166] S. Dominguez-Medina, S. McDonough, P. Swanglap, C. F. Landes, S. Link, *Langmuir* **2012**, *28*, 9131-9139.
- [167] P. Di Pietro, N. Caporarello, C. D. Anfuso, G. Lupo, A. Magrì, D. La Mendola, C. Satriano, *ACS Omega* **2017**, *2*, 4071-4079.
- [168] C. Zhao, Q. Chen, K. Patel, L. Li, X. Li, Q. Wang, G. Zhang, J. Zheng, *Soft Matter* **2012**, *8*, 7848-7857.
- [169] J. Li, X.-Y. Tian, L.-P. Zong, Q. Zhang, X.-J. Zhang, R. Marks, S. Cosnier, D. Shan, *ACS Applied Materials & Interfaces* **2019**, *11*, 32366-32372.
- [170] B. Wang, T. Blin, A. Kärkinen, X. Ge, E. H. Pilkington, J. F. Quinn, M. R. Whittaker, T. P. Davis, P. C. Ke, F. Ding, *Polymer chemistry* **2016**, *7*, 6875-6879.
- [171] V. Silin, H. Weetall, D. J. Vanderah, *Journal of colloid and interface science* **1997**, *185*, 94-103.
- [172] E. A. Smith, W. D. Thomas, L. L. Kiessling, R. M. Corn, *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 6140-6148.
- [173] J. Lazar, H. Park, R. R. Rosencrantz, A. Böker, L. Elling, U. Schnakenberg, *Macromolecular rapid communications* **2015**, *36*, 1472-1478.
- [174] J. C. Manimala, T. A. Roach, Z. Li, J. C. Gildersleeve, **2006**, *45*, 3607-3610.

- [175] M. Huang, Z. Shen, Y. Zhang, X. Zeng, P. G. Wang, *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2007**, *17*, 5379-5383.
- [176] Q. Zhang, L. Su, J. Collins, G. Chen, R. Wallis, D. A. Mitchell, D. M. Haddleton, C. R. Becer, *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136*, 4325-4332.
- [177] A. Master, M. Livingston, A. S. Gupta, *Journal of controlled release* **2013**, *168*, 88-102.
- [178] L. M. Wang, X. Y. Lin, J. Wang, Z. J. Hu, Y. L. Ji, S. Hou, Y. L. Zhao, X. C. Wu, C. Y. Chen, *Advanced Functional Materials* **2014**, *24*, 4229-4239.
- [179] S. H. Voon, L. V. Kiew, H. B. Lee, S. H. Lim, M. I. Noordin, A. Kamkaew, K. Burgess, L. Y. Chung, *Small* **2014**, *10*, 4993-5013.
- [180] X. Yan, G. Niu, J. Lin, A. J. Jin, H. Hu, Y. Tang, Y. Zhang, A. Wu, J. Lu, S. Zhang, *Biomaterials* **2015**, *42*, 94-102.
- [181] Z. Pan, X. Kang, Y. Zeng, W. Zhang, H. Peng, J. Wang, W. Huang, H. Wang, Y. Shen, Y. Huang, *Polymer Chemistry* **2017**, *8*, 5275-5285.
- [182] Z. Liu, F. Ke, C. Duan, H. Lan, J. Li, C. Gao, J. Li, Z. Zhong, *Bioconjug Chem* **2013**, *24*, 1387-1397.
- [183] J. J. Moon, B. Huang, D. Irvine, *Advanced materials* **2012**, *24*, 3724-3746.
- [184] N. Schweingruber, A. Haine, K. Tiede, A. Karabinskaya, J. van den Brandt, S. Wüst, J. M. Metselaar, R. Gold, J. P. Tuckermann, H. M. Reichardt, *The Journal of Immunology* **2011**, *187*, 4310-4318.
- [185] S. Avvakumova, P. Fezzardi, L. Pandolfi, M. Colombo, F. Sansone, A. Casnati, D. Prospero, *Chem Commun (Camb)* **2014**, *50*, 11029-11032.
- [186] M. Mirzababaei, K. Larijani, H. Hashemi-Moghaddam, Z. Mirjafary, H. Madanchi, *J Fluoresc* **2021**, *31*, 279-288.
- [187] V. Percec, P. Leowanawat, H. J. Sun, O. Kulikov, C. D. Nusbaum, T. M. Tran, A. Bertin, D. A. Wilson, M. Peterca, S. D. Zhang, N. P. Kamat, K. Vargo, D. Mook, E. D. Johnston, D. A. Hammer, D. J. Pochan, Y. C. Chen, Y. M. Chabre, T. C. Shiao, M. Bergeron-Brele, S. Andre, R. Roy, H. J. Gabius, P. A. Heiney, *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135*, 9055-9077.
- [188] T. Kaufmann, M. T. Gokmen, C. Wendeln, M. Schneiders, S. Rinnen, H. F. Arlinghaus, S. A. Bon, F. E. Du Prez, B. J. Ravoo, *Advanced Materials* **2011**, *23*, 79-83.
- [189] I. Luzinov, S. Minko, V. V. Tsukruk, *Progress in Polymer Science* **2004**, *29*, 635-698.
- [190] S. Berger, A. Synytska, L. Ionov, K.-J. Eichhorn, M. Stamm, *Macromolecules* **2008**, *41*, 9669-9676.
- [191] K. S. Bücher, P. B. Konietzny, N. L. Snyder, L. Hartmann, *Chemistry—A European Journal* **2019**, *25*, 3301-3309.
- [192] A. Kirillova, G. Stoychev, A. Synytska, *Faraday Discussions* **2016**, *191*, 89-104.
- [193] W. Stöber, A. Fink, E. Bohn, *Journal of colloid interface science* **1968**, *26*, 62-69.

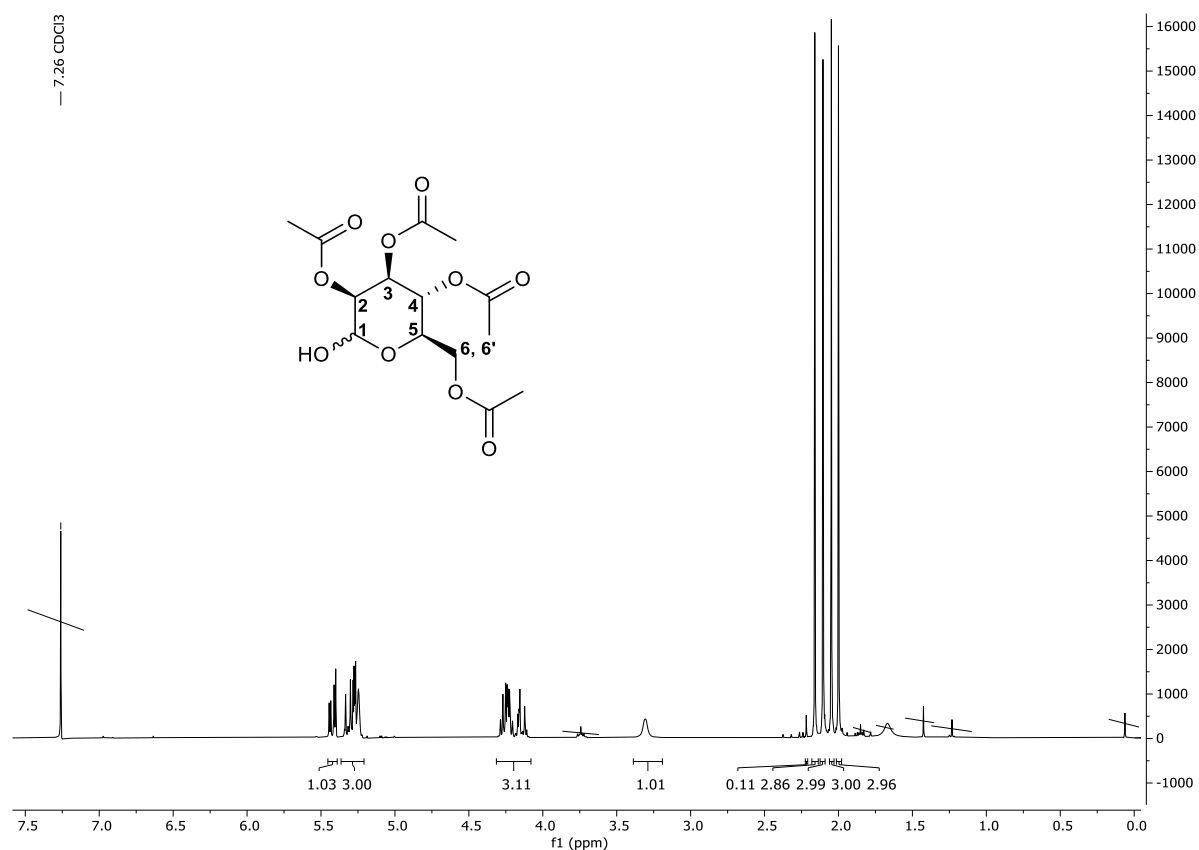
- [194] J. Li, W. D. He, X. L. Sun, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2007**, *45*, 5156-5163.
- [195] I. Ofek, D. Mirelman, N. Sharon, *Nature* **1977**, *265*, 623-625.
- [196] N. Elgiddawy, S. Ren, A. Yassar, A. Louis-Joseph, H. Sauriat-Dorizon, W. M. El Roubay, A. O. El-Gendy, A. A. Farghali, H. Korri-Youssoufi, *ACS Applied Materials Interfaces* **2020**, *12*, 39979-39990.
- [197] E. Romero-Ben, J. J. Cid, M. Assali, E. Fernández-García, R. E. Wellinger, N. Khiar, *International journal of Nanomedicine* **2019**, *14*, 3245.
- [198] M. Hartmann, P. Betz, Y. Sun, S. N. Gorb, T. K. Lindhorst, A. Krueger, *Chemistry* **2012**, *18*, 6485-6492.
- [199] Y.-F. Huang, Y.-F. Wang, X.-P. Yan, *Environmental Science Technology*, **2010**, *44*, 7908-7913.
- [200] M. Nagao, Y. Fujiwara, T. Matsubara, Y. Hoshino, T. Sato, Y. J. B. Miura, **2017**, *18*, 4385-4392.
- [201] C. B. Buck, C. D. Thompson, J. N. Roberts, M. Müller, D. R. Lowy, J. T. Schiller, **2006**, *2*, e69.
- [202] C. Cerqueira, Y. Liu, L. Kühling, W. Chai, W. Hafezi, T. H. van Kuppevelt, J. E. Kühn, T. Feizi, M. Schelhaas, **2013**, *15*, 1818-1836.
- [203] S. Bauer, Heinrich Heine Universität Düsseldorf (Düsseldorf), **2020**.
- [204] D. Müting, E. Kaiser, *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* **1963**, *332*, 276-281.
- [205] S. Boden, F. Reise, J. Kania, T. K. Lindhorst, L. Hartmann, *Macromolecular bioscience* **2019**, *19*, 1800425.
- [206] M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. t. Rebers, F. J. A. c. Smith, **1956**, *28*, 350-356.
- [207] S. M. Gerchakov, P. G. J. L. Hatcher, *Oceanography*, **1972**, *17*, 938-943.
- [208] J. A. Watt, Williams S. J., *Organic & biomolecular chemistry* **2005**, *3*, 1982.
- [209] J. Zhang, P. Kovac, *J Carbohyd Chem* **1999**, *18*, 461-469.
- [210] A. Fekete, K. Gyergyoi, K. E. Kover, I. Bajza, A. Liptak, *Carbohydr Res* **2006**, *341*, 1312-1321.
- [211] L. R. Gu, P. J. G. Luo, H. F. Wang, M. J. Meziani, Y. Lin, L. M. Veca, L. Cao, F. S. Lu, X. Wang, R. A. Quinn, W. Wang, P. Y. Zhang, S. Lacher, Y. P. Sun, *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 2408-2418.
- [212] N. Jetzki, Düsseldorf **2016**.
- [213] Pokharel, *RSC Advances* **2014**, *4*, 8746.
- [214] V. Gomez, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2011**, *49*, 3817.
- [215] C. R. Becer, K. Babiuch, D. Pilz, S. Hornig, T. Heinze, M. Gottschaldt, U. S. J. M. Schubert, **2009**, *42*, 2387-2394.
- [216] A. Krieg, C. R. Becer, R. Hoogenboom, U. S. Schubert, in *Macromolecular symposia*, Vol. 275, Wiley Online Library, **2009**, pp. 73-81.

6.5 NMR-Spektren der Experimente



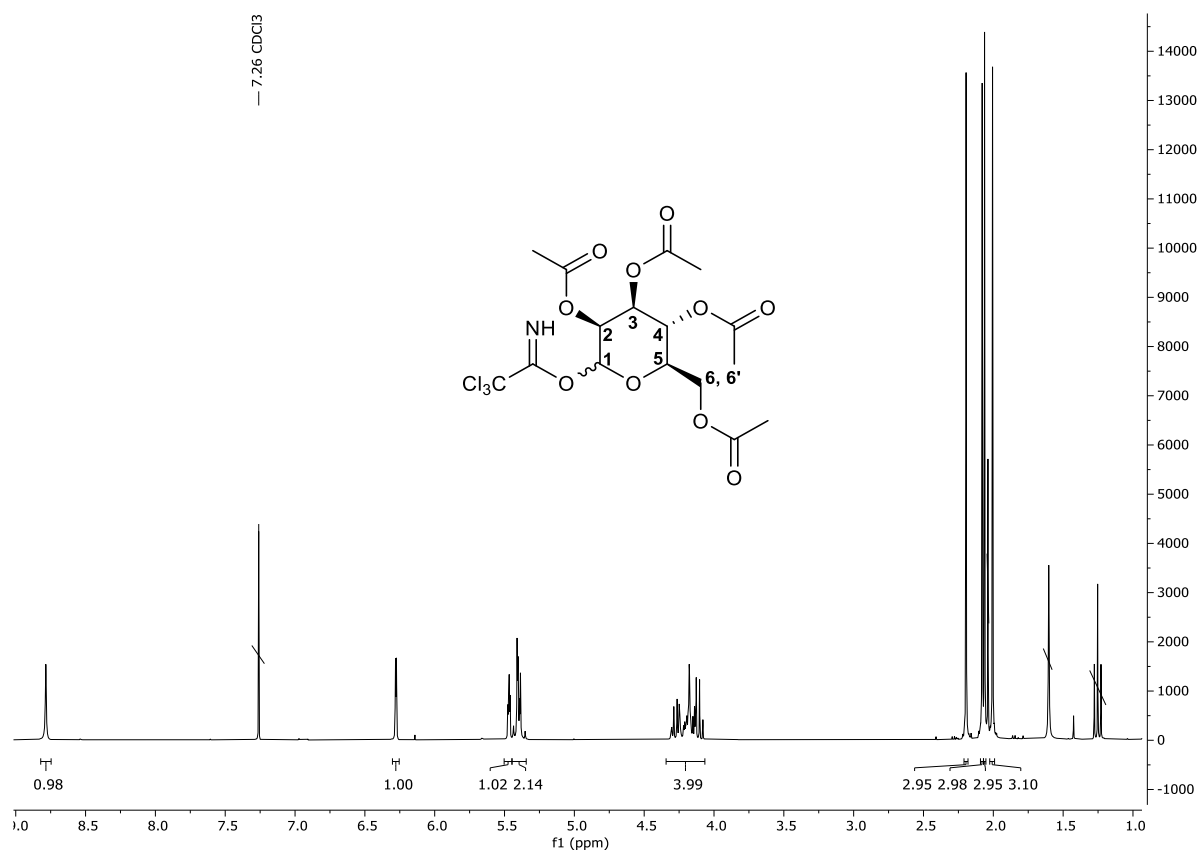
Anhang, Abbildung 1: ^1H -NMR von Penta-O-acetyl- α -D-mannopyranose (**1**).

^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3): δ = 6.07 (d, $^3J_{\text{H1}\alpha\text{-H2}} = 1.85$ Hz, 1H, **H1 α**), 5.85 (d, $^3J_{\text{H1}\beta\text{-H2}} = 1.09$ Hz, 0.6H, **H1 β**), 5.48 (dd, $^3J_{\text{H2-H3}} = 3.28$ Hz, 0.6H, **H2 β**), 5.36 – 5.31 (m, 2H, **H2 α** , **H4 α**), 5.28 (t, $^3J_{\text{H3-H4/H4-H5}} = 4.7$ Hz, 0.6H, **H3 β**), 5.25 (t, $^3J_{\text{H1-H3}} = 2.2$ Hz, 1H, **H3 α**), 5.13 (dd, $^3J_{\text{H5-H4}} = 10.0$ Hz, $^2J_{\text{H4-H3}} = 3.3$ Hz, 0.6H, **H4 β**), 4.32 – 4.25 (m, 1.6H, **H5 α** , **H5 β**), 4.16 – 4.08 (m, 3H, **H6 α** , **H6 β** , Ethylacetat enthalten), 4.07 – 4.03 (m, 1H, **H6' α**), 3.80 (ddd, $^4J_{\text{H6'-H4}} = 9.90$ Hz, $^3J_{\text{H6'-H5}} = 5.83$ Hz, $^2J_{\text{H6'-H6}} = 2.31$ Hz, 0.6H, **H6' β**), 2.19 – 2.01 (m, 28H, $-\text{CH}_3$, Ethylacetat enthalten) ppm.



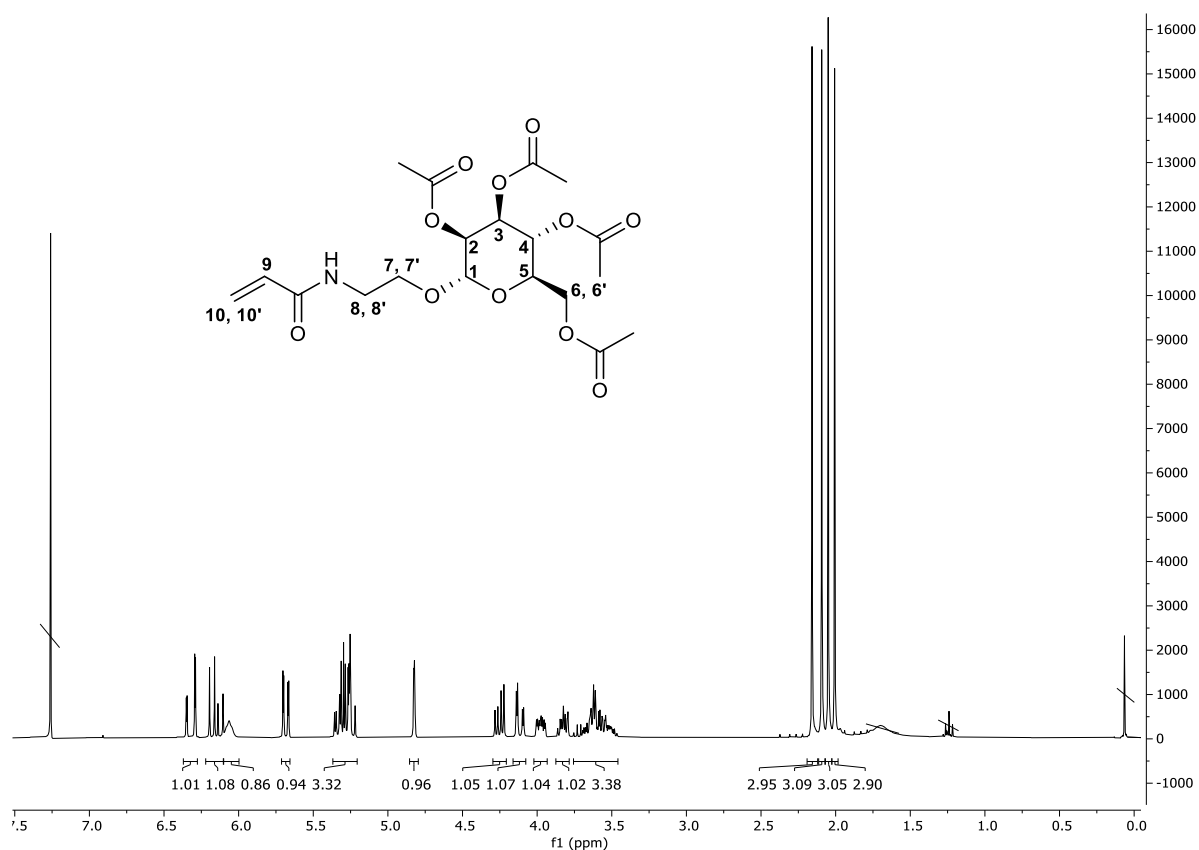
Anhang, Abbildung 2: ^1H -NMR von 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranose (**2**).

^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 5.46 – 5.39 (dd, 1H), 5.36 – 5.21 (m, 3H), 4.31 – 4.09 (m, 3H), 3.30 (s, 1H, -OH), 2.21 (s, 0.1H, -CH₃, Anomer), 2.16 (s, 3H, -CH₃), 2.11 (s, 3H, -CH₃), 2.05 (s, 3H, -CH₃), 2.00 (s, 3H, -CH₃) ppm.



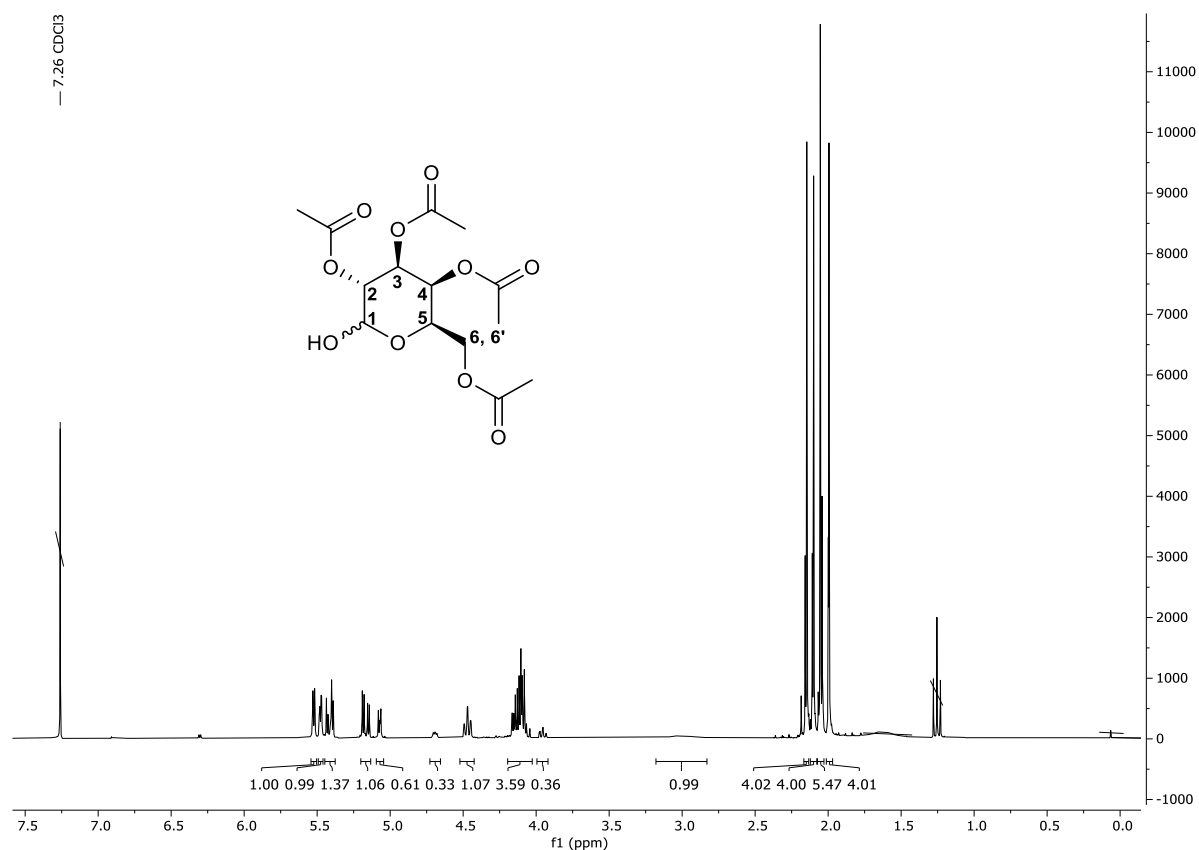
Anhang, Abbildung 3: ^1H -NMR von 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranosyl-trichloroacetimidat (3).

^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 8.78 (s, 1H, =NH), 6.27 (d, $^3J_{\text{H1-H2}}$ = 1.84 Hz, 1H, H1), 5.00 – 5.44 (m, 1H), 5.44 – 5.34 (m, 2H), 4.34 – 4.06 (m, 4H, Ethylacetat), 2.19 (s, 3H, -CH₃), 2.07 (s, 3H, -CH₃), 2.06 (s, 3H, -CH₃), 2.00 (s, 3H, -CH₃) ppm.



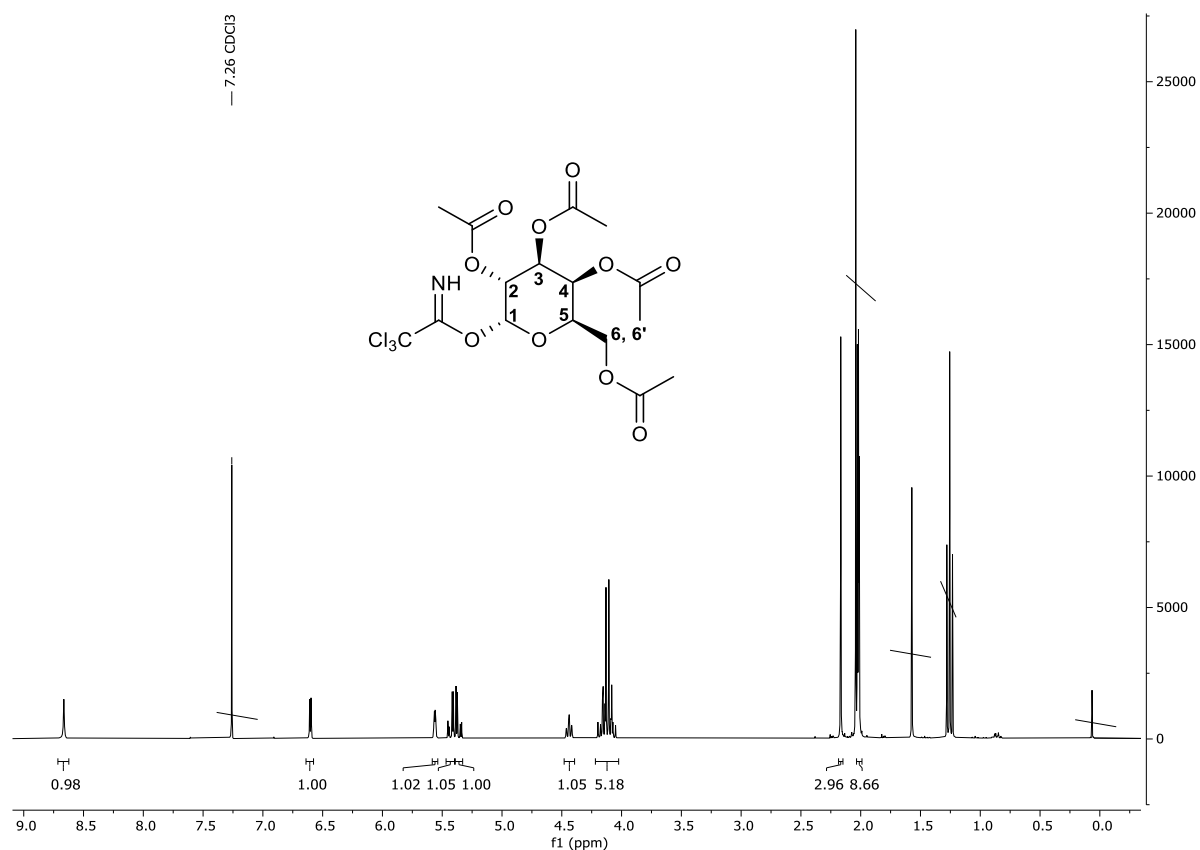
Anhang, Abbildung 4: ^1H -NMR von *N*-[2-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranosyloxy)ethyl]acrylamid (**4**).

^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 6.32 (dd, $^3J_{\text{H}10-\text{H}10'} = 16.98$ Hz, $^2J_{\text{H}10-\text{H}10'} = 1.67$ Hz, 1H, **H10**), 6.16 (dd, $^3J_{\text{H}9-\text{H}10} = 16.9$ Hz, $^3J_{\text{H}9-\text{H}10'} = 10.0$ Hz, 1H, **H9**), 6.10 – 6.00 (m, 1H, -NH-), 5.65 (dd, $^3J_{\text{H}10'-\text{H}9} = 10.10$ Hz, $^3J_{\text{H}10'-\text{H}10} = 1.63$ Hz, 1H, **H10'**), 5.37 – 5.20 (m, 3H), 4.82 (d, $^3J_{\text{H}1-\text{H}2} = 1.44$ Hz, 1H, **H1 α**), 4.25 (dd, $^3J_{\text{H}4-\text{H}3} = 12.32$ Hz, $^3J_{\text{H}4-\text{H}5} = 5.81$ Hz, 1H, **H4**), 4.12 (dd, $^3J_{\text{H}3-\text{H}4} = 12.21$ Hz, $^3J_{\text{H}3-\text{H}2} = 2.45$ Hz, 1H, **H3**), 3.98 (ddd, $^3J_{\text{H}5-\text{H}6} = 9.57$ Hz, $^3J_{\text{H}5-\text{H}4} = 5.63$ Hz, $^3J_{\text{H}5-\text{H}6'} = 2.42$ Hz, 1H, **H5**), 3.86 – 3.75 (m, 1H), 3.75 – 3.45 (m, 3H), 2.15 (s, 3H, -CH₃), 2.09 (s, 3H, -CH₃), 2.05 (s, 3H, -CH₃), 2.00 (s, 3H, -CH₃) ppm.



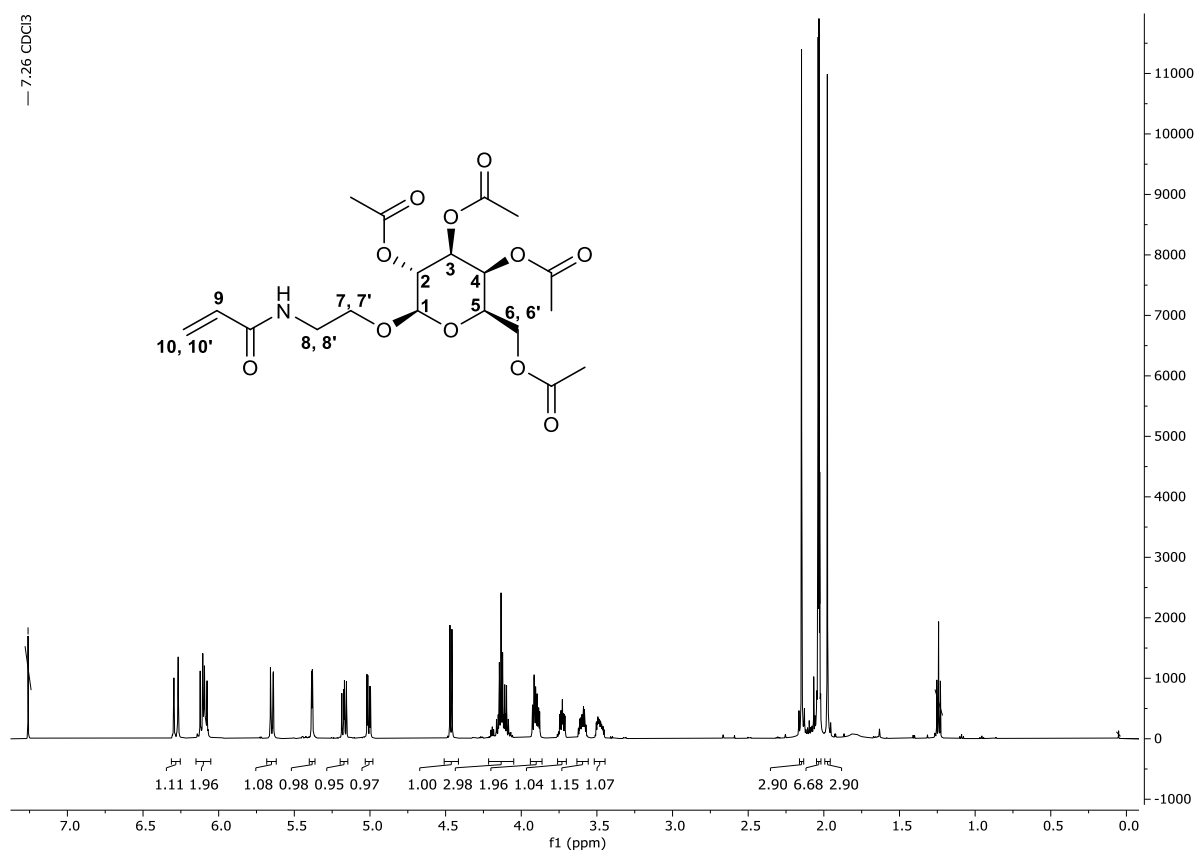
Anhang, Abbildung 5: ^1H -NMR von 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α/β -D-galactopyranose (**5**).

^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 5.52 (d, $^3J_{\text{H1-H2}}$ = 3.63 Hz, 1H, **H1 α**), 4.47 (dd, $^3J_{\text{H4-H3}}$ = 3.40 Hz, $^3J_{\text{H4-H5}}$ = 1.30 Hz, 1H, **H4 α**), 5.44 – 5.37 (m, 1.3H, **H3 α** , **H β**), 5.16 (dd, $^3J_{\text{H2-H3}}$ = 10.72 Hz, $^3J_{\text{H2-H1}}$ = 3.64 Hz, 1H, **H2 α**), 5.09 – 5.04 (m, 0.6H, 2**H β**), 4.72 – 4.65 (m, 0.3H, **H β**), 4.47 (dt, $^3J_{\text{H5-H6/H6'}}$ = 10.72 Hz, $^3J_{\text{H5-H4}}$ = 1.26 Hz, 1H, **H5 α**), 4.19 – 4.02 (m, 3.6H, **H6**, **H6'**, 2**H β** , Ethylacetat), 4.00 – 3.91 (m, 0.3H, 1**H β**), 3.00 (s, 1H, -**OH α**), 2.15 (s, 1H, -**CH $_3\beta$**), 2.14 (s, 3H, -**CH $_3\alpha$**), 2.11 (s, 1H, -**CH $_3\beta$**), 2.10 (s, 3H, -**CH $_3\alpha$**), 2.05 (s, 3H, -**CH $_3\alpha$**), 2.04 (s, 1H, -**CH $_3\beta$**), 2.00 (s, 1H, -**CH $_3\beta$**), 1.99 (s, 3H, -**CH $_3\alpha$**) ppm.



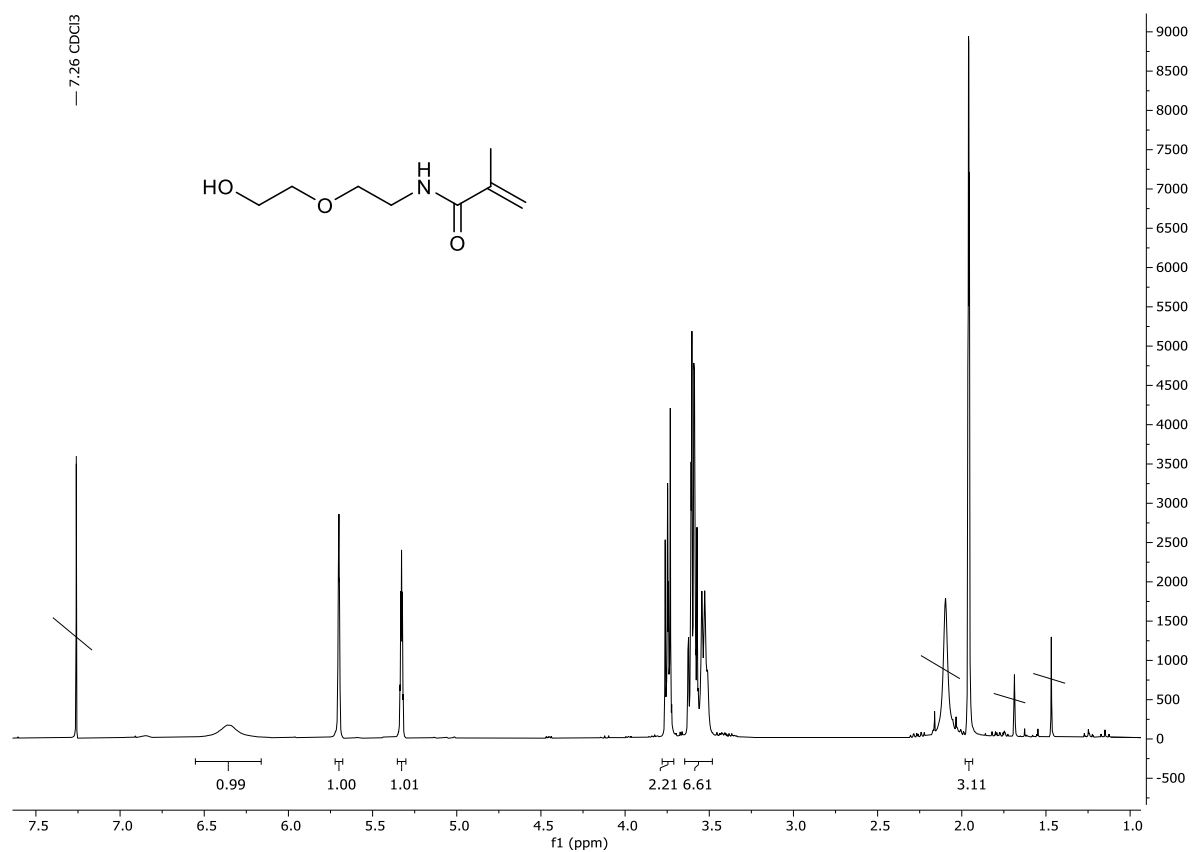
Anhang, Abbildung 6: ¹H-NMR von 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranosyl-trichloroacetimidat (6).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.66 (s, 1H, =NH), 6.60 (d, ³J_{H1-H2} = 3.33 Hz, 1H, H1), 5.56 (dd, ³J_{H4-H3} = 3.04, ³J_{H4-H5} = 1.30 Hz, 1H, H4), 5.43 (dd, ³J_{H3-H2} = 10.81 Hz, ³J_{H3-H4} = 3.08 Hz, 1H, H3), 5.35 (dd, ³J_{H2-H3} = 10.81 Hz, ³J_{H2-H1} = 3.34 Hz, 1H, H2), 4.43 (dt, ³J_{H5-H6/H6'} = 6.48 Hz, ³J_{H5-H4} = 0.95 Hz, 1H, H5), 4.22 – 4.02 (m, 5H, H6, H6', Ethylacetat), 2.16 (s, 3H, -CH₃), 2.03 – 1.99 (3 s, 9H, -CH₃) ppm.



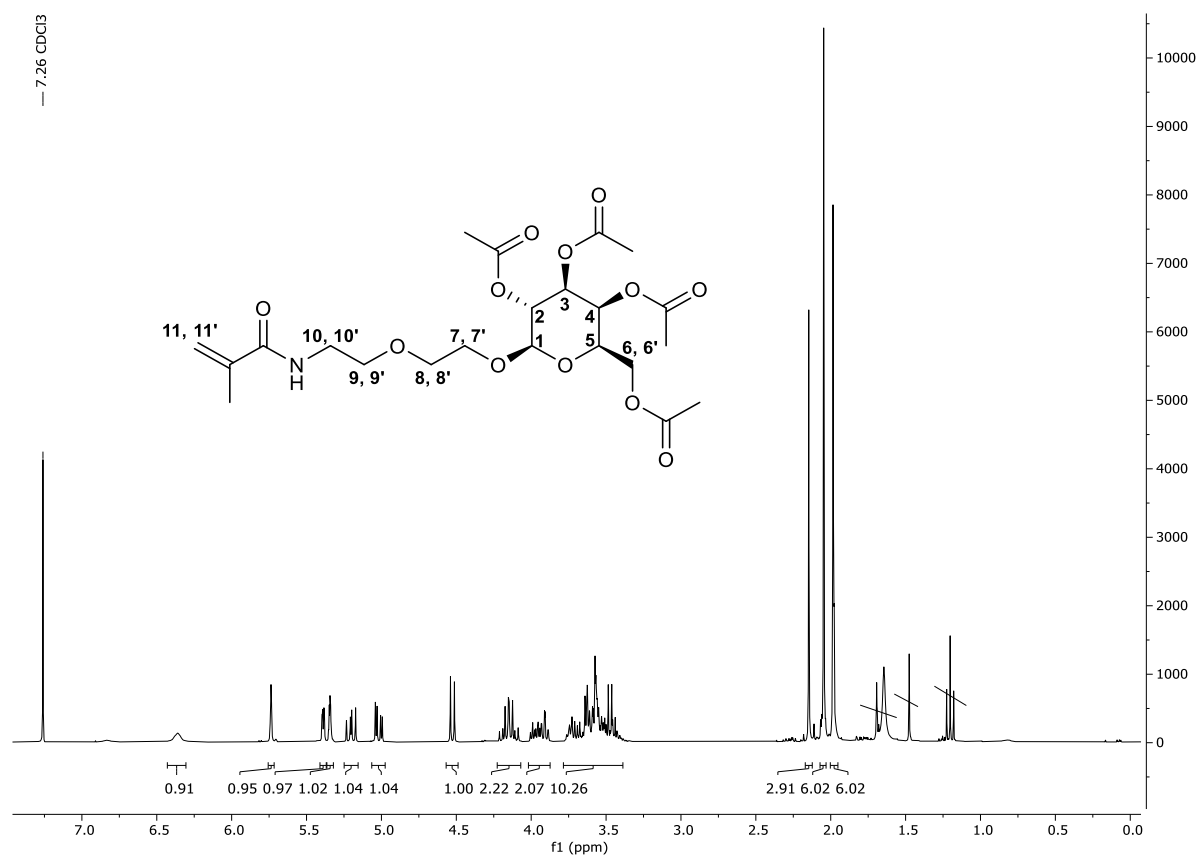
Anhang, Abbildung 7: ^1H -NMR von *N*-[2-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-galactopyranosyloxy)ethyl]acrylamid (7).

^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3): δ = 6.28 (dd, $^3J_{\text{H}10-\text{H}9}$ = 17.04 Hz, $^2J_{\text{H}10-\text{H}10'}$ = 1.40 Hz, 1H, H10), 6.27 – 6.22 (m, 2H, -NH-, H9), 5.64 (dd, $^3J_{\text{H}10'-\text{H}9}$ = 10.34 Hz, $^2J_{\text{H}10'-\text{H}10}$ = 1.50 Hz, 1H, H10'), 5.38 (dd, $^3J_{\text{H}4-\text{H}3}$ = 3.51 Hz, $^3J_{\text{H}4-\text{H}5}$ = 0.94 Hz, 1H, H4), 5.17 (dd, $^3J_{\text{H}2-\text{H}3}$ = 10.41 Hz, $^2J_{\text{H}2-\text{H}1}$ = 7.91 Hz, 1H, H2), 5.00 (dd, $^3J_{\text{H}3-\text{H}2}$ = 10.55 Hz, $^2J_{\text{H}3-\text{H}4}$ = 3.54 Hz, 1H, H3), 4.46 (d, $^3J_{\text{H}1-\text{H}2}$ = 7.99 Hz, 1H, H1 β), 4.21 – 4.04 (m, 3H, H6, H6', Ethylacetat), 3.94 – 3.86 (m, 2H), 3.73 (m, 1H), 3.63 – 3.55 (m, 1H), 3.51 – 3.44 (m, 1H), 2.14 (s, 3H, -CH₃), 2.04 – 2.01 (m, 6.7H, -CH₃, Ethylacetat), 1.97 (s, 3H, -CH₃) ppm.



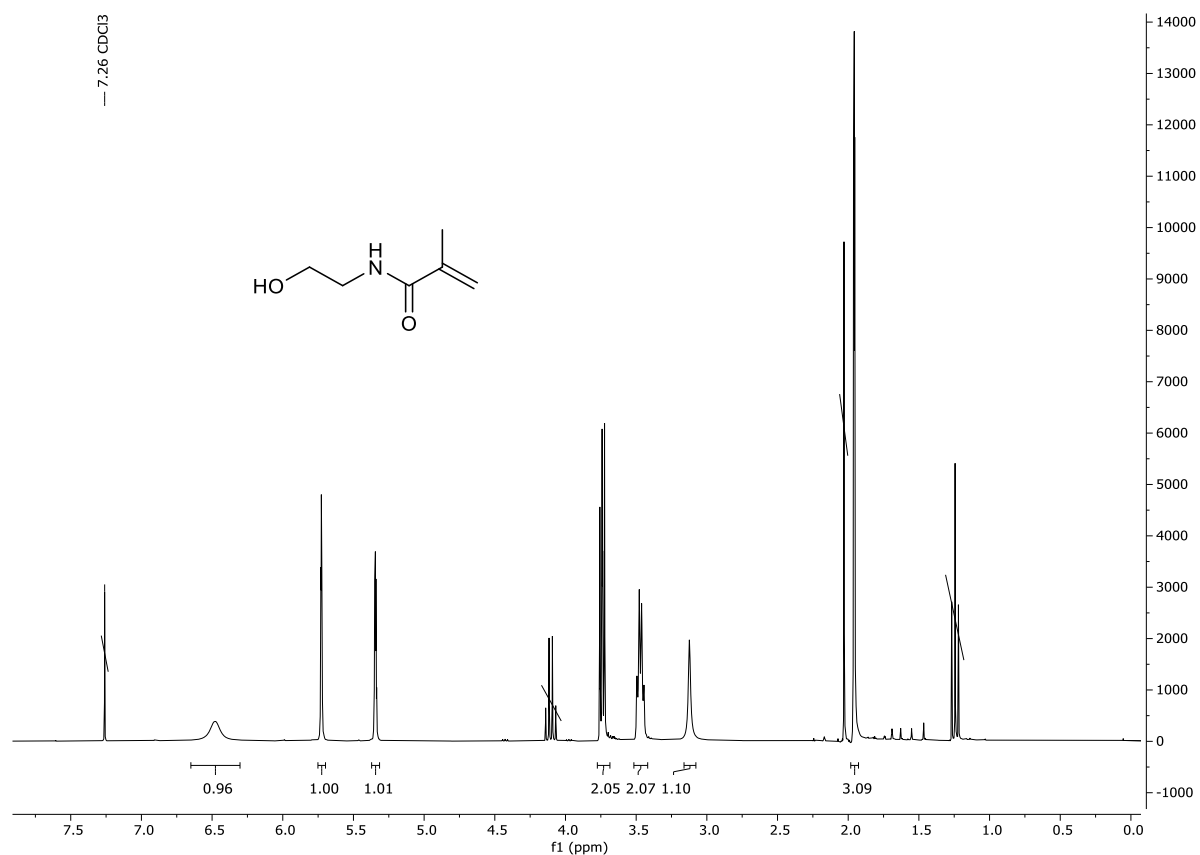
Anhang, Abbildung 8: ¹H-NMR von *N*-[2-(2-Hydroxyethoxy)ethyl]methacrylamid (**8**).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): 6.55 – 6.15 (s, 1H, -NH-), 5.72 – 5.67 (p, 1H, H₁), 5.35 – 5.30 (m, 1H, H₁'), 3.78 – 3.71 (m, 2H, -CH₂-), 3.64 – 3.48 (m, 6H, -CH₂-), 1.98 – 1.93 (m, 3H, -CH₃) ppm.



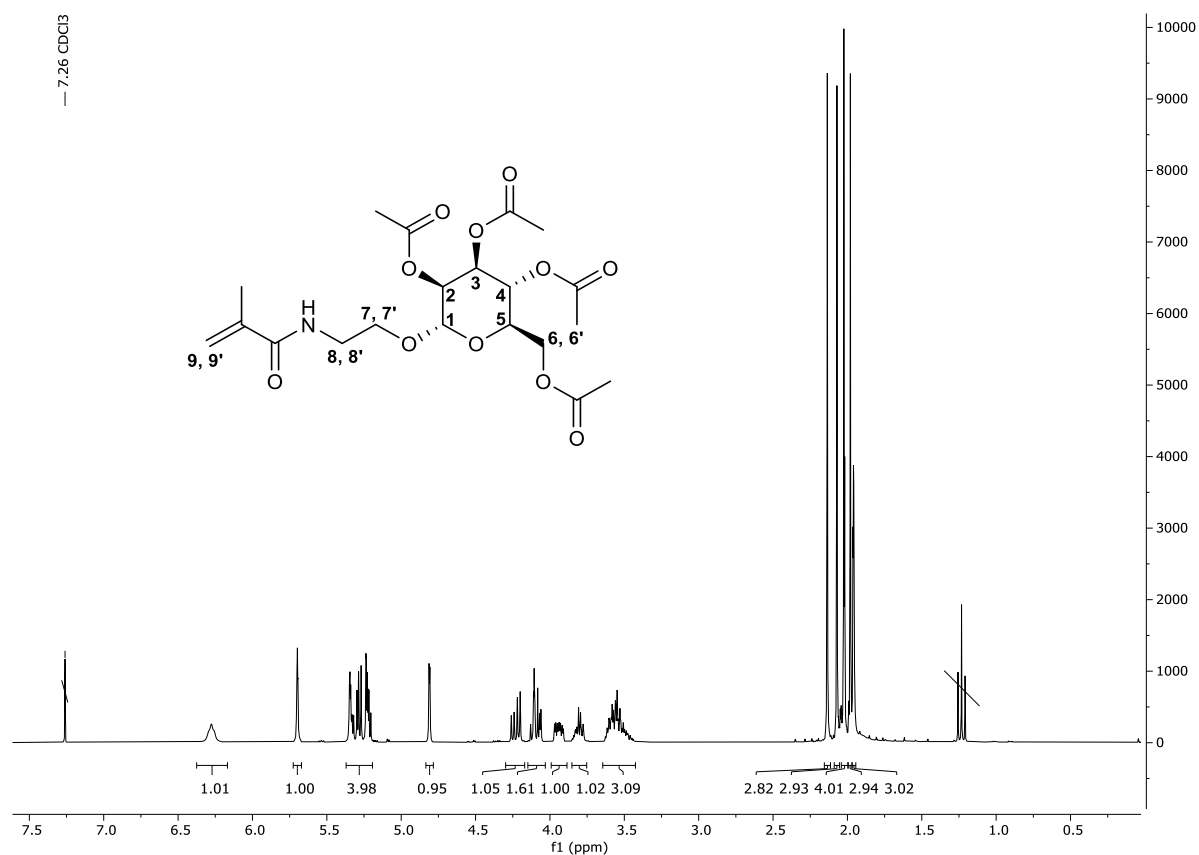
Anhang, Abbildung 9: ^1H -NMR von *N*-[2-(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-galactopyranosyloxy)-hydroxyethoxy)ethyl]-methacrylamid (**9**).

^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 6.35 (s, 1H, -NH-), 5.75 – 5.71 (m, 1H, H11), 5.39 (dd, $^3J_{\text{H2-H3}}$ = 3.41 Hz, $^3J_{\text{H2-H3}}$ = 1.05 Hz, 1H, H4), 5.36 – 5.32 (m, 1H, H11'), 5.20 (dd, 1H, $^3J_{\text{H2-H3}}$ = 10.51 Hz, $^3J_{\text{H2-H1}}$ = 7.91 Hz, 1H, H2), 5.01 (dd, $^3J_{\text{H3-H2}}$ = 10.47 Hz, $^3J_{\text{H3-H4}}$ = 3.44 Hz, 1H, H3), 4.52 (d, $^3J_{\text{H1-H2}}$ = 7.93 Hz, 1H, H1 β), 4.22 – 4.07 (m, 2H, -CH₂), 4.02 – 3.87 (m, 2H, -CH₂), 3.78 – 3.34 (m, 10H, -CH₂, Ethylacetat), 2.14 (s, 3H, -CH₃), 2.07 – 2.03 (m, 6H, -CH₃). 2.00 – 1.95 (m, 6H, -CH₃) ppm.



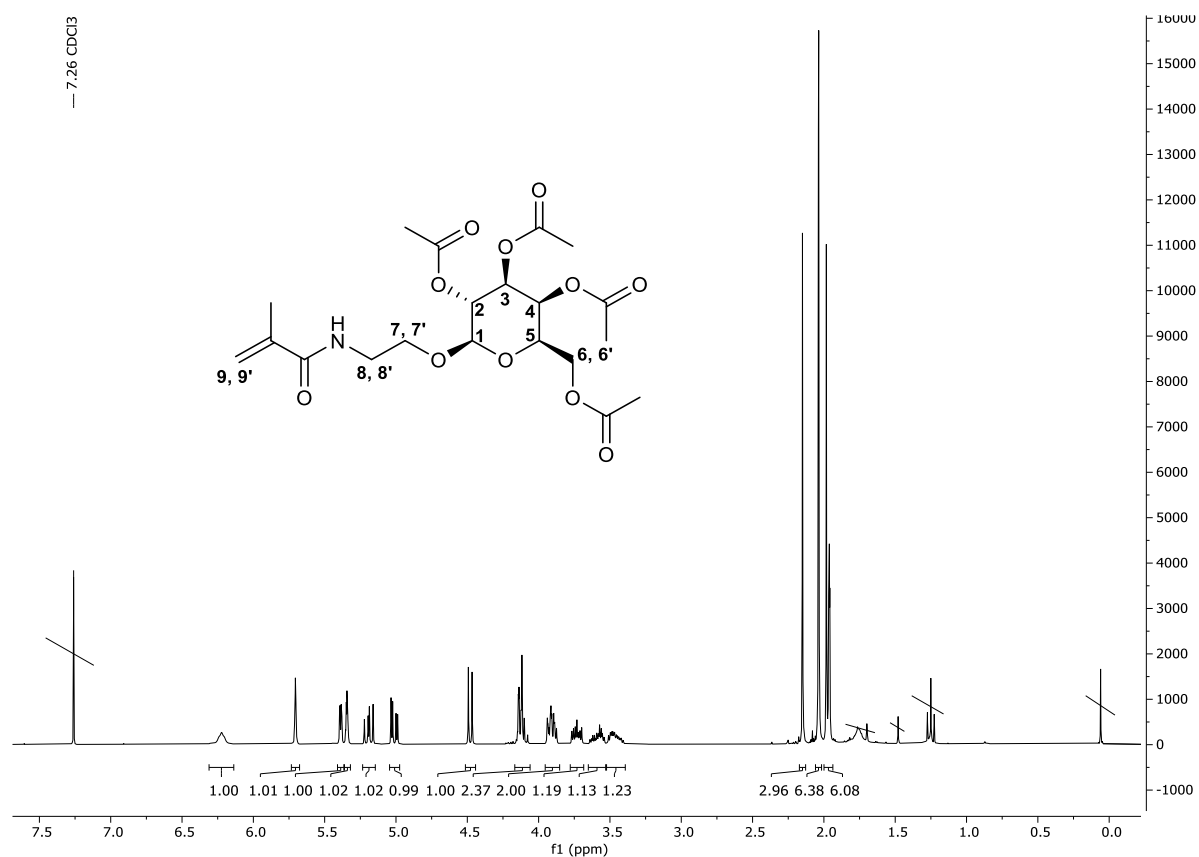
Anhang, Abbildung 10: ^1H -NMR von *N*-Hydroxymethylacrylamid (**10**).

^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 6,48 (s, 1H, -NH-), 5.75 - 5.70 (m, 1H, H₁), 5.37 – 5.31 (m, 1H, H_{1'}), 3.77 – 3.70 (m, 2H, -CH₂-), 3.51 – 3.42 (m, 2H, -CH₂-), 3.12 (s, 1H, -OH), 1.98 – 1.93 (m, 3H, -CH₃) ppm.



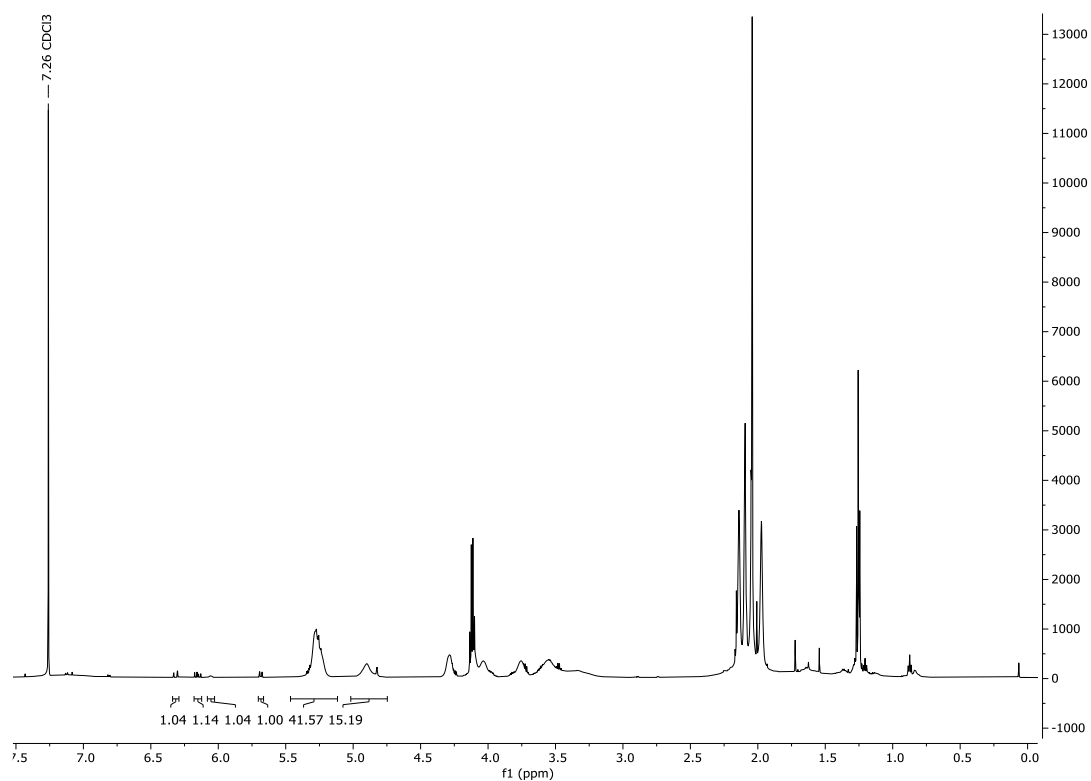
Anhang, Abbildung 11: ^1H -NMR von *N*-[2-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranosyl-oxy)ethyl]-methacrylamid (**11**).

^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 6.27 (s, 1H, -NH-), 5.69 (p, 1H, H₉), 5.34 (dt, 1H, H_{9'}), 5.31 (dd, 1H, H₃), 5.27 – 5.19 (m, 2H, H₂, H_{6'}), 4.83 (d, 1H, H₁), 4.23 (dd, 1H, H₄), 4.15 – 4.03 (m, 1H, H₆ Ethylacetat), 3.94 (ddd, 1H, H₅) 3.85 – 3.75 (m, 1H, -CH₂-), 3.64 – 3.42 (m, 3H, -CH₂-), 2.13 (s, 3H, -CH₃), 2.07 (s, 3H, -CH₃), 2.04 – 2.00 (m, 4H, -CH₃, Ethylacetat), 1.98 (s, 3H, -CH₃), 1.955 (dt, 3H, H₂C=RC-CH₃) ppm.



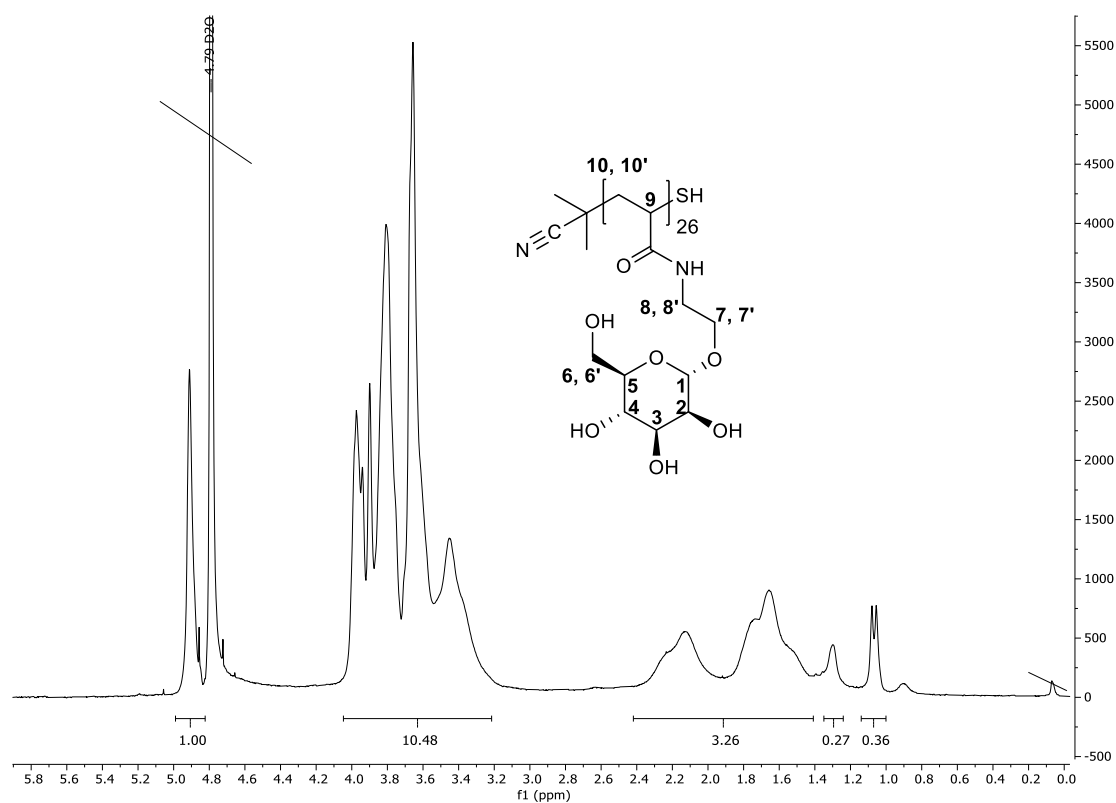
Anhang, Abbildung 12: ^1H -NMR von *N*-[2-(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosyloxy)ethyl]-methacrylamid (**12**).

^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 6.21 (s, 1H, -NH-), 5.73 – 5.67 (m, 1H, H9), 5.38 (dd, $^3J_{\text{H4-H3}}$ = 3.41 Hz, $^3J_{\text{H4-H5}}$ = 1.04 Hz, 1H, H4), 5.36 – 5.32 (m, 1H, H9'), 5.19 (dd, $^3J_{\text{H2-H3}}$ = 10.45 Hz, $^3J_{\text{H2-H1}}$ = 7.88 Hz, 1H, H2), 5.00 (dd, $^3J_{\text{H3-H2}}$ = 10.48 Hz, $^3J_{\text{H3-H4}}$ = 3.40 Hz, 1H, H3), 4.48 (d, $^3J_{\text{H1-H2}}$ = 7.80 Hz, 1H, H1), 4.17 – 4.06 (m, 2H, Ethylacetat), 3.95 – 3.85 (m, 2H), 3.78 – 3.68 (m, 1H, H5), 3.64 – 3.39 (m, 2H), 2.15 (s, 3H, -CH₃), 2.16 – 2.06 (m, 6H, -CH₃, Ethylacetat), 1.98 (s, 3H, -CH₃), 1.97 – 1.95 (m, 1H, CH₃) ppm.



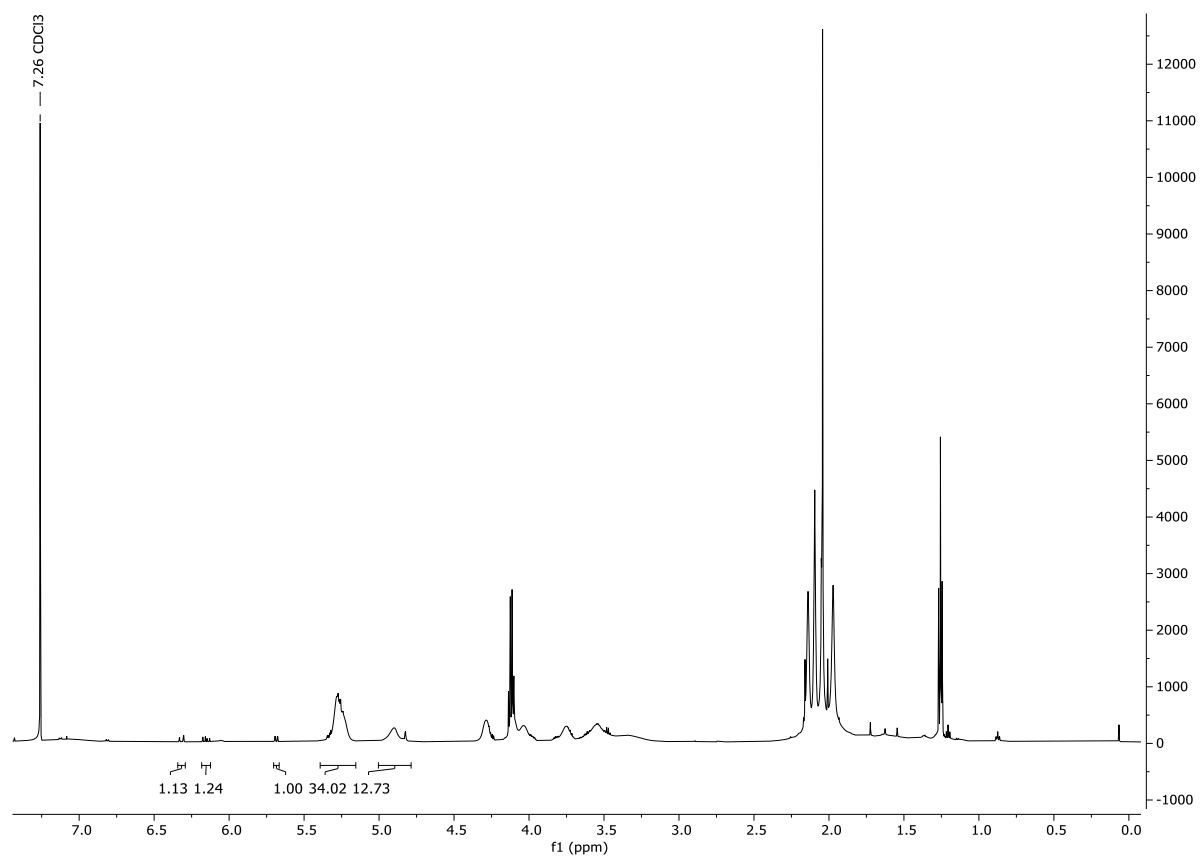
Anhang, Abbildung 13: ^1H -NMR von $\text{pMan}_2\text{CA}_{26}$ vor der weiteren Aufarbeitung zur Umsatzbestimmung.

Nach der Polymerisation wird das Polymer vor der Aufreinigung im ^1H -NMR analysiert, um den Polymerisationsumsatz bestimmen zu können. Der Bereich der noch vorhandenen Vinylprotonen (5.70 – 5.66 ppm) wird dafür ins Verhältnis gesetzt mit dem im Polymer eingebauten Proton im Bereich von 5.45 – 5.11 ppm.

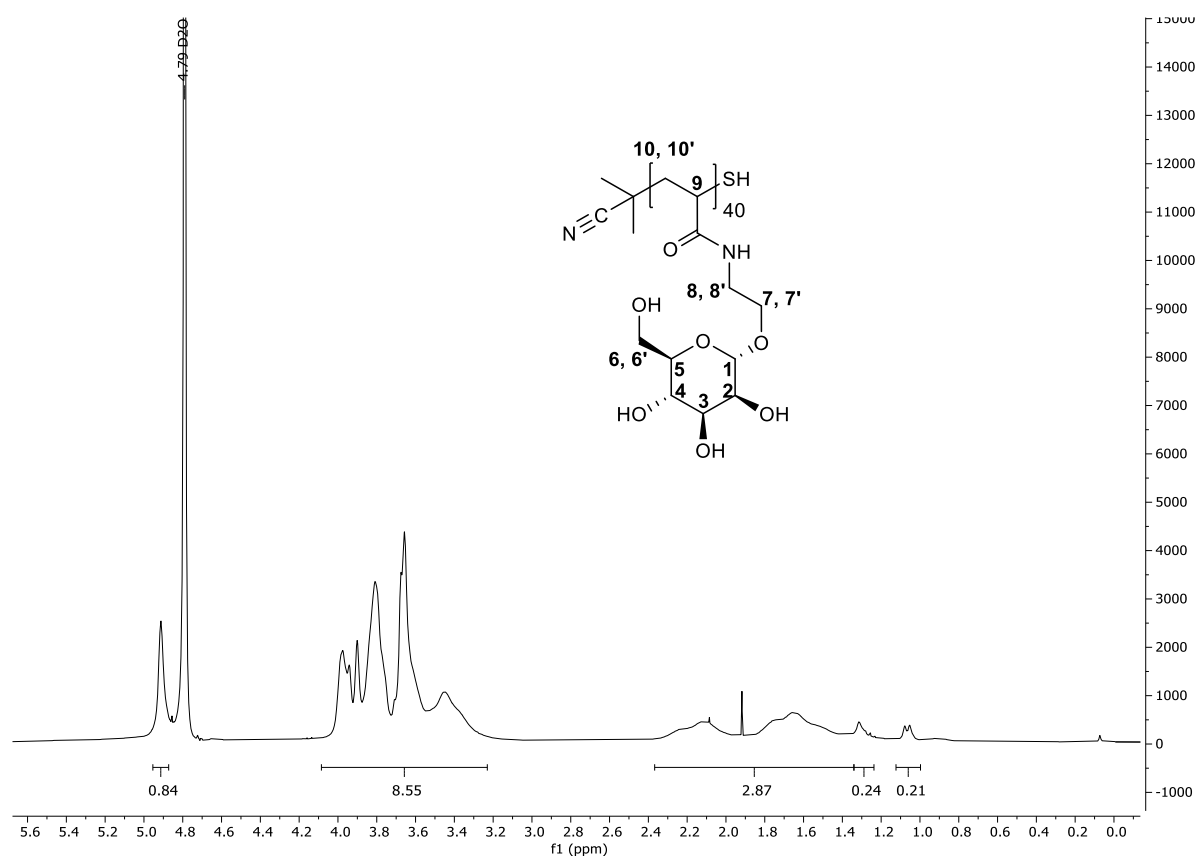


Anhang, Abbildung 14: ^1H -NMR von pMan2CA₂₆ nach Aufreinigung.

^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 4.99 – 4.82 (m, 1H, H₁), 4.90 – 3.20 (m, 11H, H₂-H_{8'}), 2.42 – 1.40 (m, 3H, H₉, H₁₀, H_{10'}), 1.38 – 1.20 (s, 0.36H), 1.14 – 1.10 (d, 0.36H, $-\text{CH}_3$) ppm.

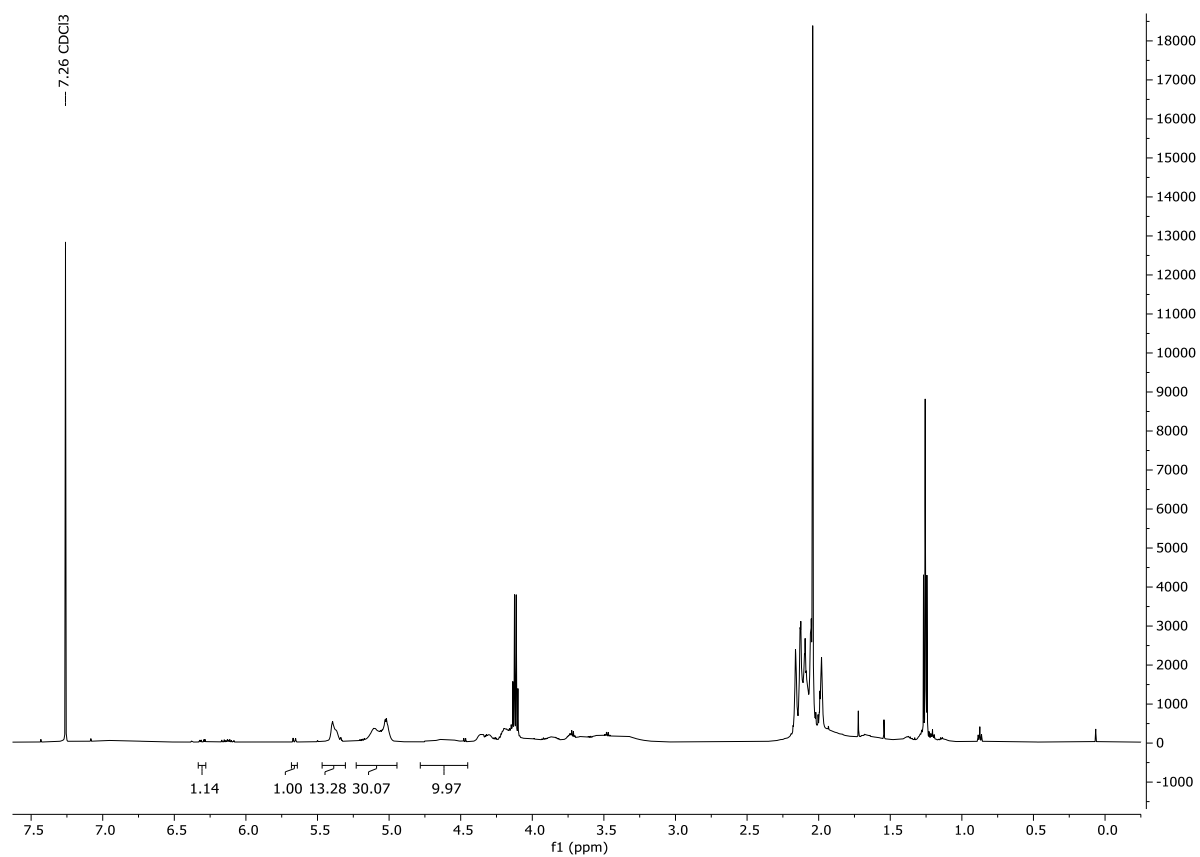


Anhang, Abbildung 15: ^1H -NMR von pMan2CA₄₀ vor der weiteren Aufarbeitung zur Umsatzbestimmung.

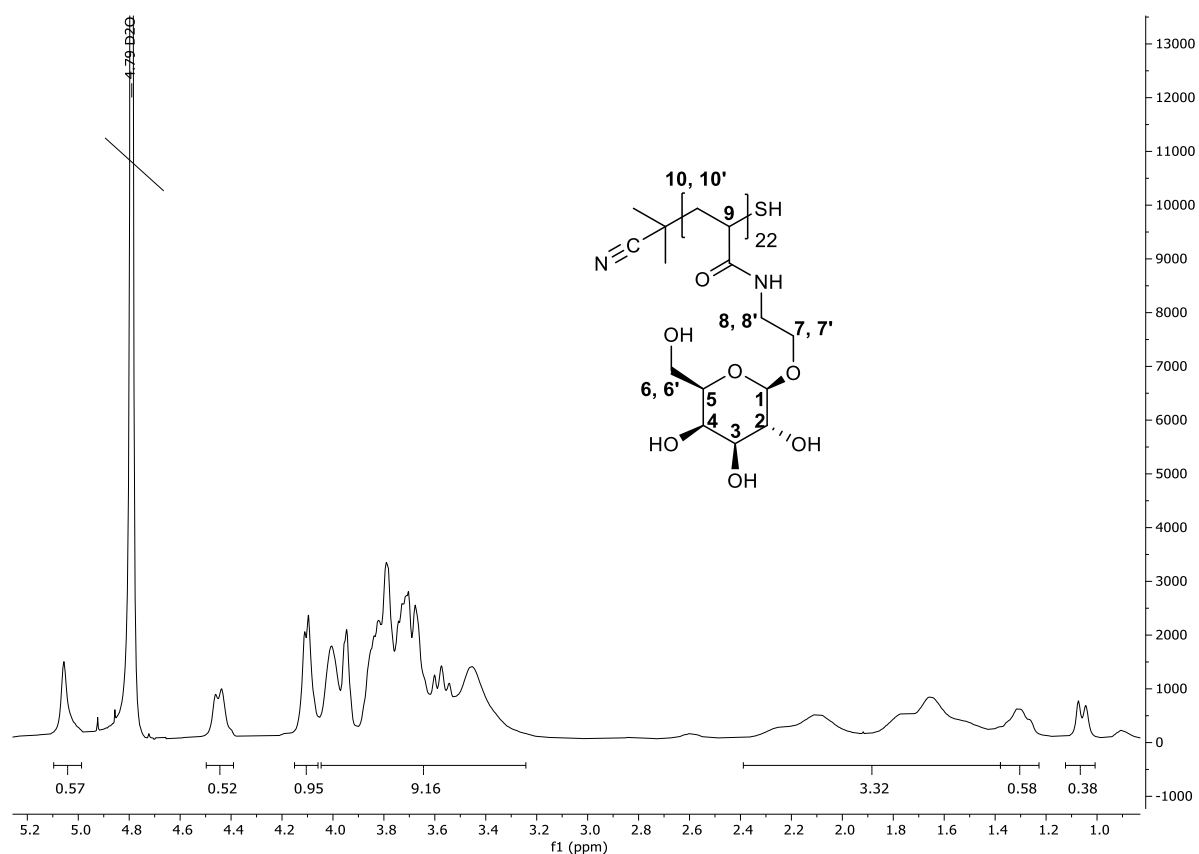


Anhang, Abbildung 16: ^1H -NMR von pMan2CA₄₀ nach Aufreinigung.

^1H -NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 4.91 (s, 1H, H1), 4.14 – 3.12 (m, 11H, H2-H8'), 2.36 – 1.40 (m, 3H, H9, H10, H10'), 1.34 – 1.23 (s, 0.28H), 1.12 – 0.99 (d, 0.25H, -CH₃) ppm.

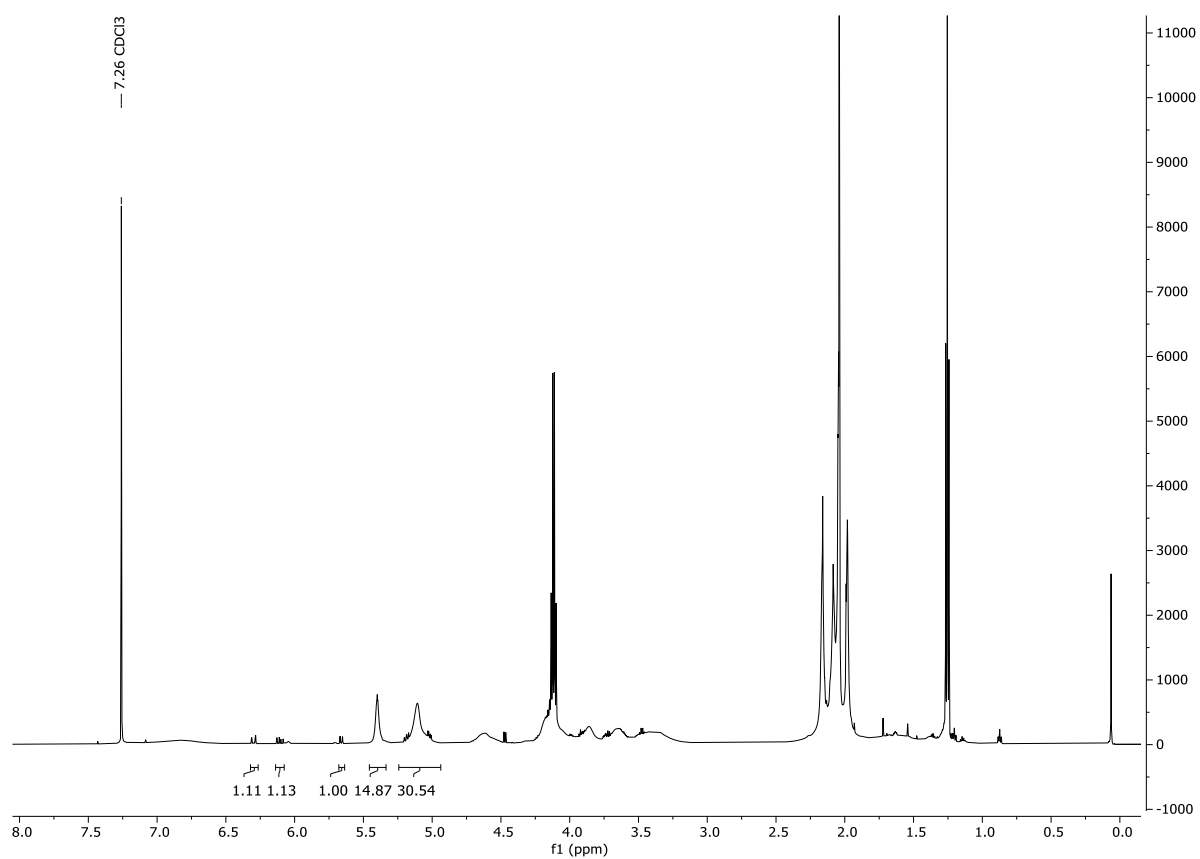


Anhang, Abbildung 17: ¹H-NMR von pGal2CA₂₂ vor der weiteren Aufarbeitung zur Umsatzbestimmung.

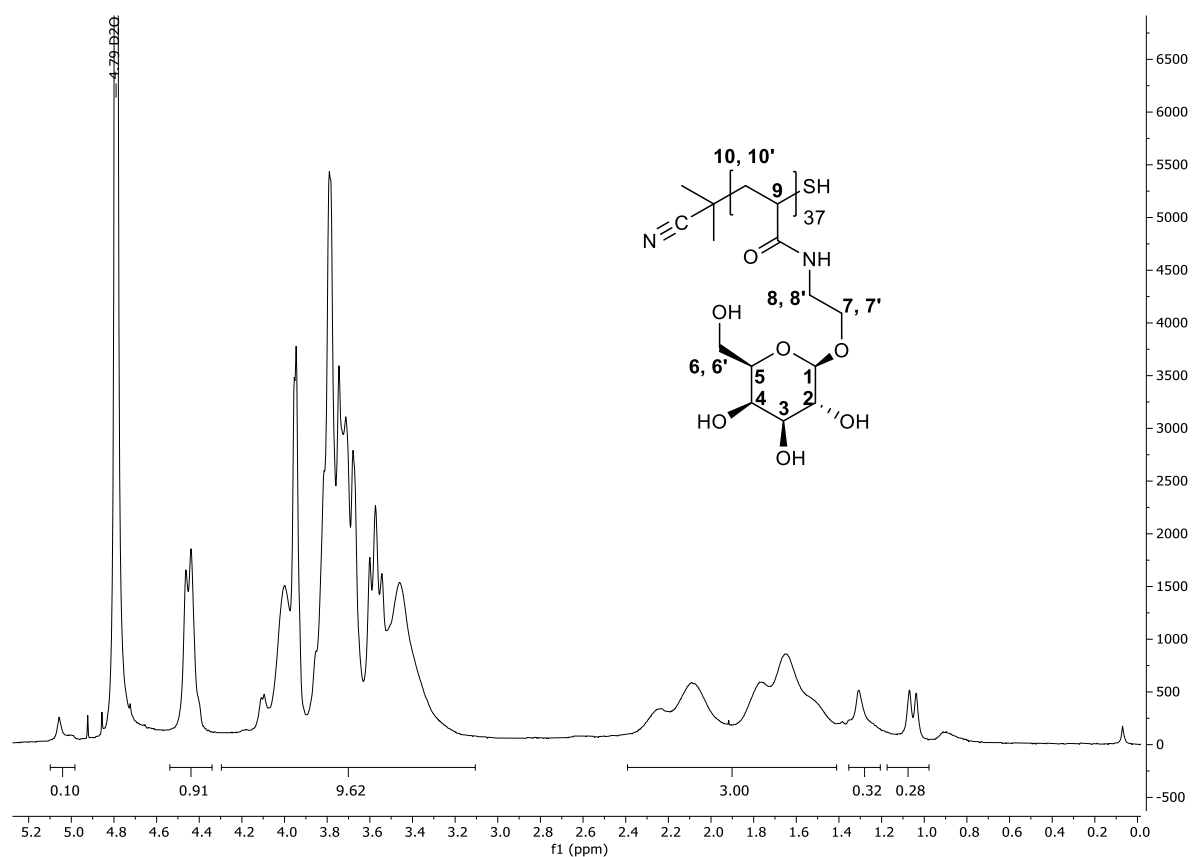


Anhang, Abbildung 18: ^1H -NMR von pGal2CA₂₂ nach Aufreinigung.

^1H -NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 5.05 (s, 0.5H, H1 α), 4.50 – 4.39 (m, 0.5H, H1 β), 4.15 – 4.06 (m, 1H), 4.04 – 3.24 (m, 9H, H2-H8'), 2.39 – 1.41 (m, 3H, H9, H10, H10'), 1.39 – 1.23 (s, 0.6H), 1.12 – 1.00 (d, 0.38H, -CH₃) ppm.



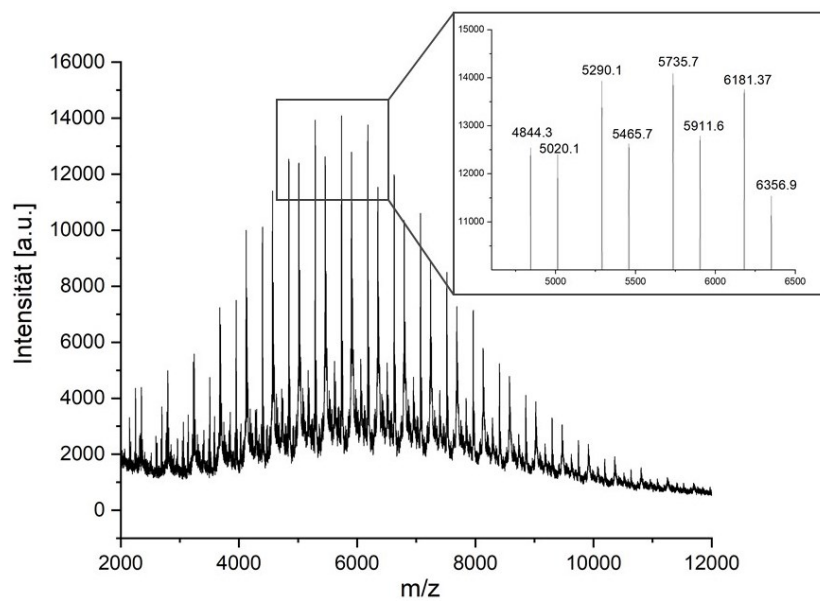
Anhang, Abbildung 19: ¹H-NMR von pGal2CA₃₇ vor der weiteren Aufarbeitung zur Umsatzbestimmung.



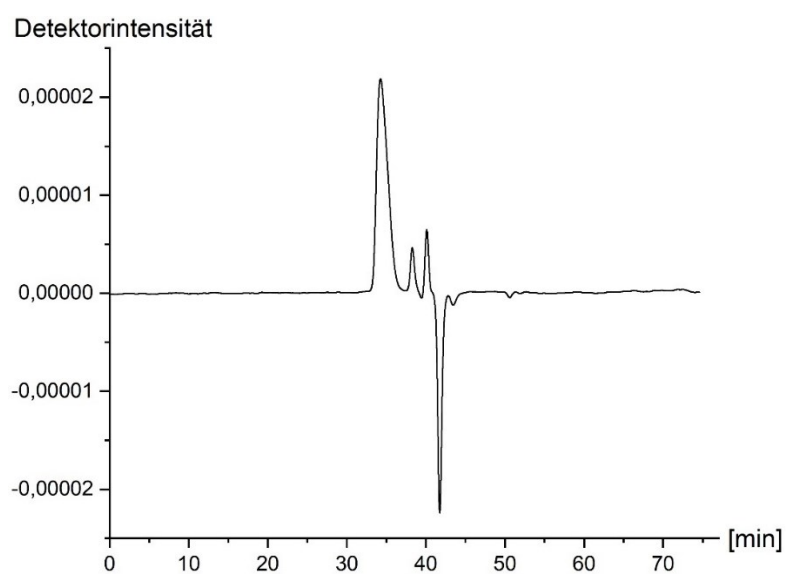
Anhang, Abbildung 20: ^1H -NMR von pGal2CA₃₇ nach Aufreinigung.

^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 5.1 (m, 0.1H, H1 α), 4.54 – 4.34 (m, 0.9H, H1 β), 4.29 – 4.10 (m, 10H, H2-H8'), 2.39 – 1.40 (m, 3H, H9, H10, H10'), 1.39 – 1.21 (s, 0.4H), 1.12 – 0.98 (d, 0.23H, -CH₃) ppm.

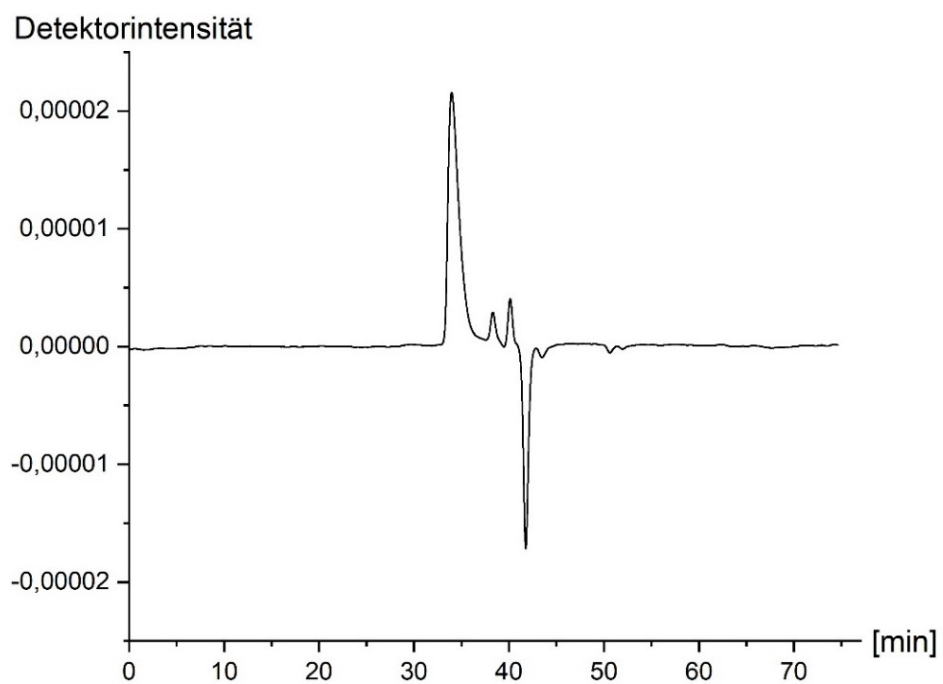
6.6 GPC- und MALDI-TOF-Spektren



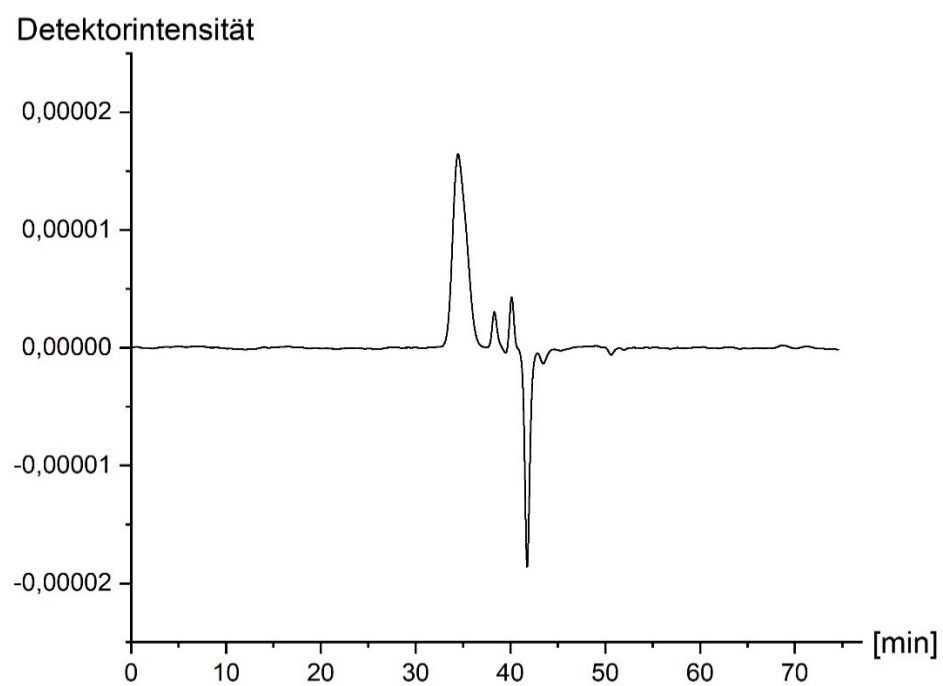
Anhang, Abbildung 21: MALDI-TOF-Spektrum von pMan2CA₂₆ (acetyliert).



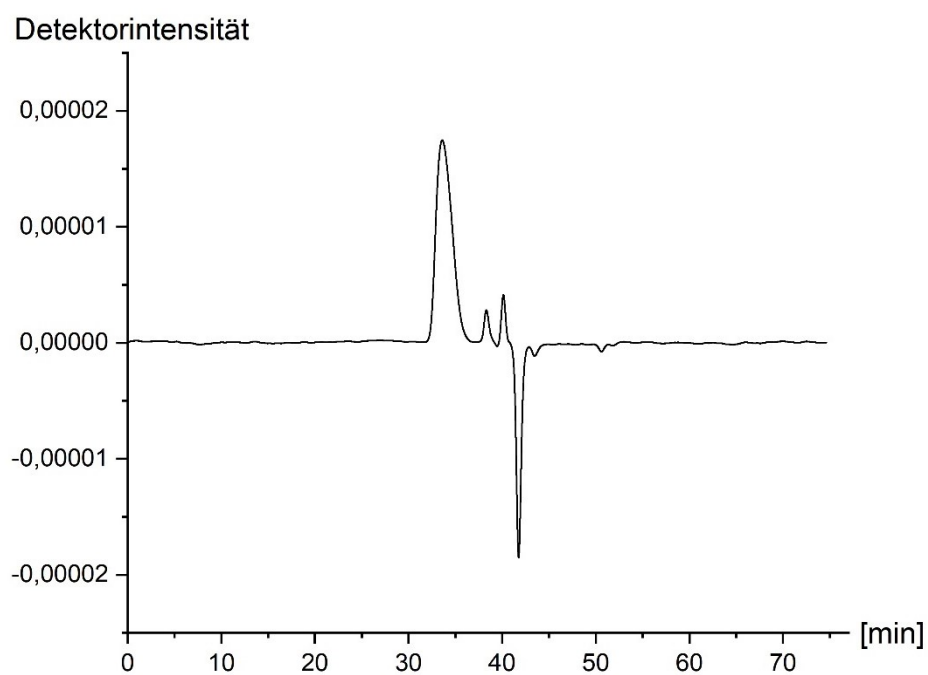
Anhang, Abbildung 22: Wasser-GPC-Spektrum von pMan2CA₂₆.



Anhang, Abbildung 23: Wasser-GPC-Spektrum von pMan2CA₄₀.



Anhang, Abbildung 24: Wasser-GPC-Spektrum von pGal2CA₂₂.



Anhang, Abbildung 25: Wasser-GPC-Spektrum von pGal2CA₃₇.

6.7 Grafiken, Daten und Spektren der SPR-Messungen

6.7.1 Daten zu GC_{Kurz}

Anhang, Tabelle 1: Reportpunkte der 1. Immobilisierung von GC_{Kurz}

FlowCell	Time	AbsResp	SD	RelResp	Report Point	Chip	Contact Time	FlowRate
1	99	18921,95	0,517297	N/A	Baseline	Custom	1000	5
1	1379	20388,27	1,099345	1466,315	Ligand	Custom	1000	5
1	1384	20385,56	0,979015	1463,609	Immobilized	Custom	1000	5
2	98	19299,41	1,719193	N/A	Baseline	Custom	1000	5
2	1378	19784,54	1,193625	485,1289	Ligand	Custom	1000	5
2	1383	19781,79	0,913649	482,3812	Immobilized	Custom	1000	5

Flow Cell 1 = Referenzzelle, Flow Cell 2 = Aktive Messzelle

Anhang, Tabelle 2: Reportpunkte der 2. Immobilisierung von GC_{Kurz}

FlowCell	Time	AbsResp	SD	RelResp	Report Point	Chip	ContactTime	FlowRate
1	98	20490,23	0,631232	N/A	Baseline	Custom	1000	5
1	1379	20817,25	1,474219	327,0199	Ligand	Custom	1000	5
1	1384	20813,45	1,370255	323,2161	Immobilized	Custom	1000	5
2	97	19834,84	1,575463	N/A	Baseline	Custom	1000	5
2	1378	20074,2	0,942188	239,362	Ligand	Custom	1000	5
2	1383	20071,79	0,811935	236,9564	Immobilized	Custom	1000	5

Flow Cell 1 = Referenzzelle, Flow Cell 2 = Aktive Messzelle

Anhang, Tabelle 3: k_d -Wertbestimmung (1) von ConA auf GC_{Kurz}

Cycle-No	RU
1	26093,24
2	26169,8
3	26246,38
4	26345,18
5	26445,71
6	26535,96
7	26652,11
8	26770,68

Anhang, Tabelle 4: k_d -Wertbestimmung (2) von ConA auf GC_{Kurz}

Cycle-No	RU
1	25862,01
2	25925,42
3	25993,77
4	26078,36
5	26154,61
6	26237,86
7	26367,05
8	26478,27

6.7.2 Daten zu GC_{Lang}

Anhang, Tabelle 5: Reportpunkte der 1. Immobilisierung von GC_{Lang}

Flowcell	Time	AbsResp	SD	RelResp	Report Point	Chip	Procedure	TargetLvl
'1	1	17.426	0,0	N/A	Baseline	Custom	TargetLevel	1620
'1	159	18.444	19,7	1.018	Pulse1	Custom	TargetLevel	1620
'1	213	18.577	19,2	1.151	Pulse2	Custom	TargetLevel	1620
'1	291	18.701	16,7	1.275	Pulse3	Custom	TargetLevel	1620
'1	405	18.832	14,9	1.406	Pulse4	Custom	TargetLevel	1620
'1	518	18.935	12,9	1.509	Pulse5	Custom	TargetLevel	1620
'1	608	19.011	11,2	1.585	Pulse6	Custom	TargetLevel	1620
'1	662	19.025	10,6	1.599	Pulse7	Custom	TargetLevel	1620
'1	716	19.041	10,4	1.615	Pulse8	Custom	TargetLevel	1620
'1	1084	18.774	0,1	1.348	Ligand	Custom	TargetLevel	1620
'1	1089	18.773	0,2	1.347	Immobilized	Custom	TargetLevel	1620
'2	1	17.860	0,0	N/A	Baseline	Custom	TargetLevel	1620
'2	159	18.037	9,6	177	Pulse1	Custom	TargetLevel	1620
'2	261	18.250	10,1	390	Pulse2	Custom	TargetLevel	1620
'2	507	18.568	9,6	707	Pulse3	Custom	TargetLevel	1620
'2	909	18.878	9,5	1.018	Pulse4	Custom	TargetLevel	1620
'2	1.335	19.094	10,0	1.234	Pulse5	Custom	TargetLevel	1620
'2	1703	18.877	0,4	1.016	Ligand	Custom	TargetLevel	1620
'2	1708	18.876	0,5	1.015	Immobilized	Custom	TargetLevel	1620

Flow Cell 1 = Referenzzelle, Flow Cell 2 = Aktive Messzelle

Anhang, Tabelle 6: Reportpunkte der 2. Immobilisierung von GC_{Lang}

Flowcell	Time	AbsResp	SD	RelResp	Report Point	Chip	Procedure	TargetLvl
'1	1	18829,3	0,00	N/A	Baseline	Custom	TargetLevel	320
'1	159	19230,0	17,16	400,6	Pulse1	Custom	TargetLevel	320
'1	525	18918,9	0,31	89,6	Ligand	Custom	TargetLevel	320
'1	530	18918,3	0,32	89,0	Immobilized	Custom	TargetLevel	320
'2	1	18860,2	0,00	N/A	Baseline	Custom	TargetLevel	600
'2	159	18959,1	5,21	98,9	Pulse1	Custom	TargetLevel	600
'2	261	19080,7	6,84	220,6	Pulse2	Custom	TargetLevel	600
'2	423	19185,4	6,96	325,2	Pulse3	Custom	TargetLevel	600
'2	657	19298,4	7,10	438,2	Pulse4	Custom	TargetLevel	600
'2	867	19376,6	6,87	516,4	Pulse5	Custom	TargetLevel	600
'2	1017	19423,0	6,99	562,8	Pulse6	Custom	TargetLevel	600
'2	1107	19440,5	6,59	580,3	Pulse7	Custom	TargetLevel	600
'2	1173	19444,8	6,25	584,6	Pulse8	Custom	TargetLevel	600
'2	1287	19483,4	7,09	623,3	Pulse9	Custom	TargetLevel	600
'2	1655	19316,4	0,24	456,3	Ligand	Custom	TargetLevel	600
'2	1660	19315,7	0,26	455,5	Immobilized	Custom	TargetLevel	600

Flow Cell 1 = Referenzzelle, Flow Cell 2 = Aktive Messzelle

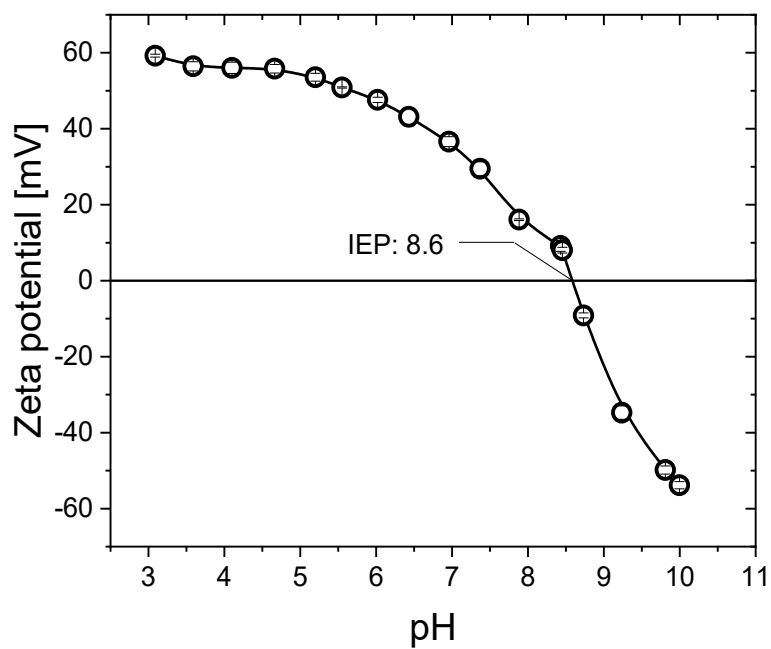
Anhang, Tabelle 7: k_d -Wertbestimmung (1) von ConA auf GC_{Lang}

Cycle-No	RU
1	26488,38
2	26500,28
3	26567,03
4	26600,98

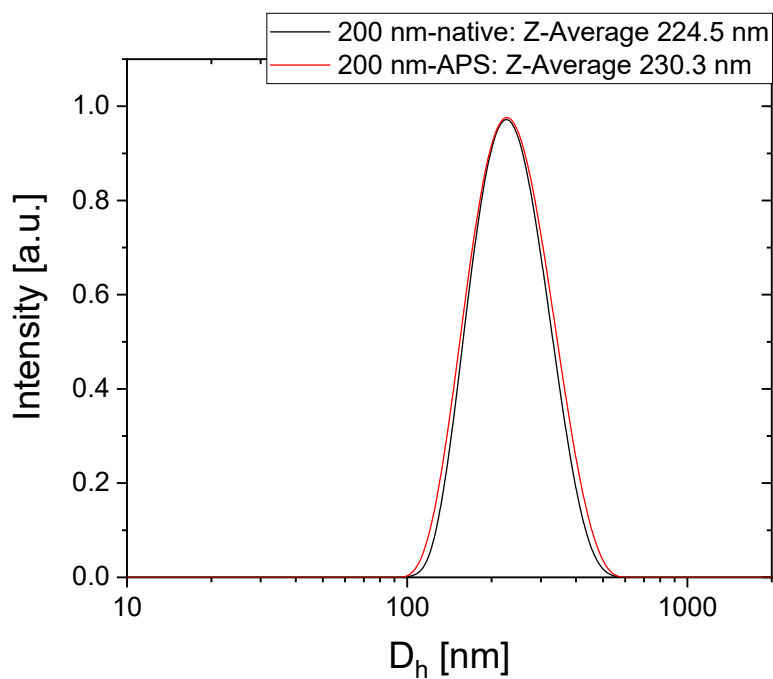
Anhang, Tabelle 8: k_d -Wertbestimmung (2) von ConA auf GC_{Lang}

Cycle-No	RU
1	21969,57
2	21985,08
3	21994,22
4	22032,23
5	22057

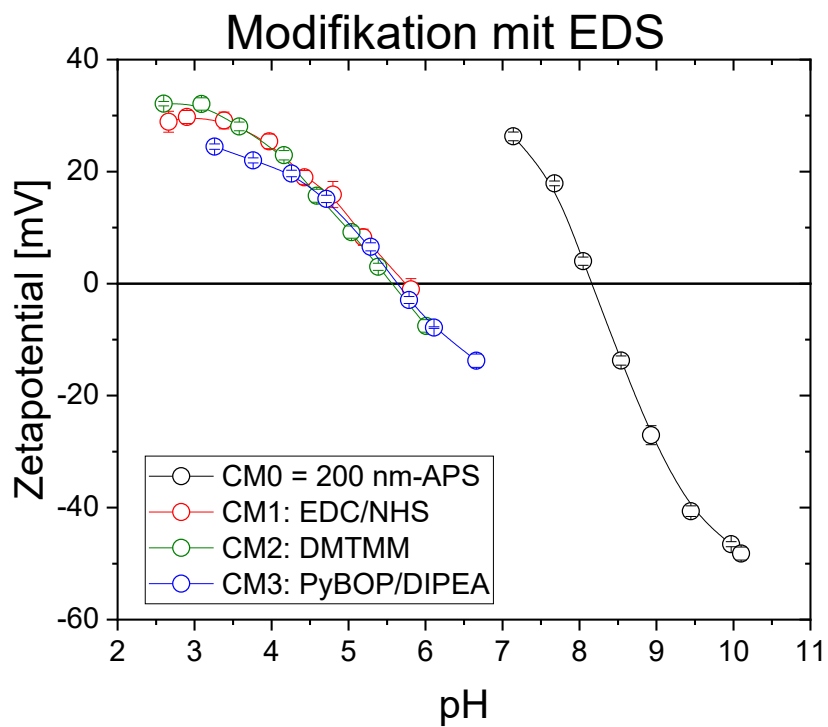
6.8 Partikelanalytik



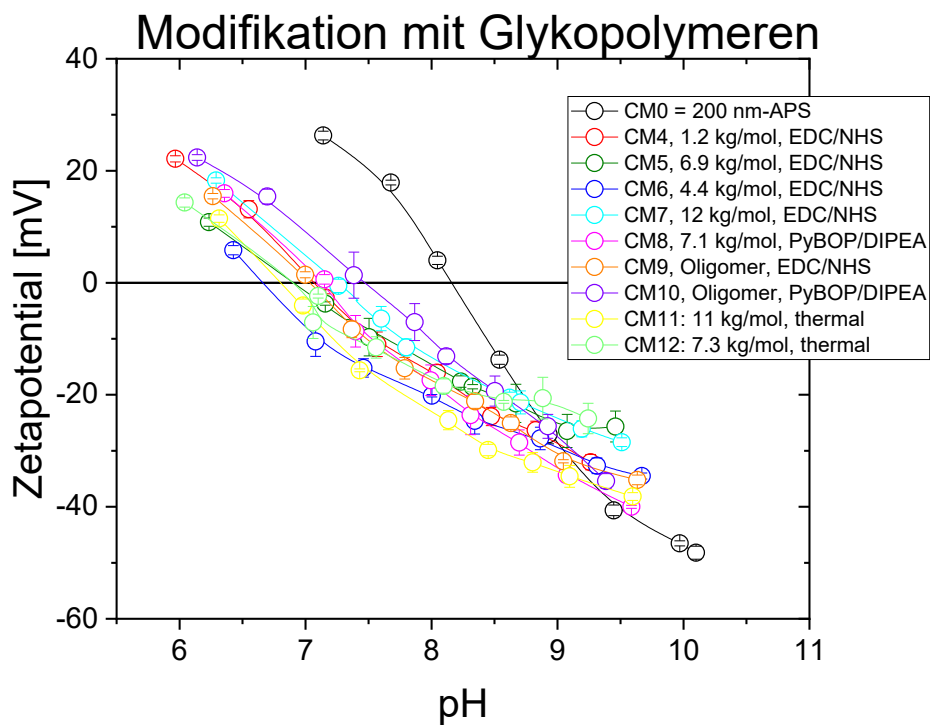
Anhang, Abbildung 26: Zetapotentialbestimmung der APS-Partikel



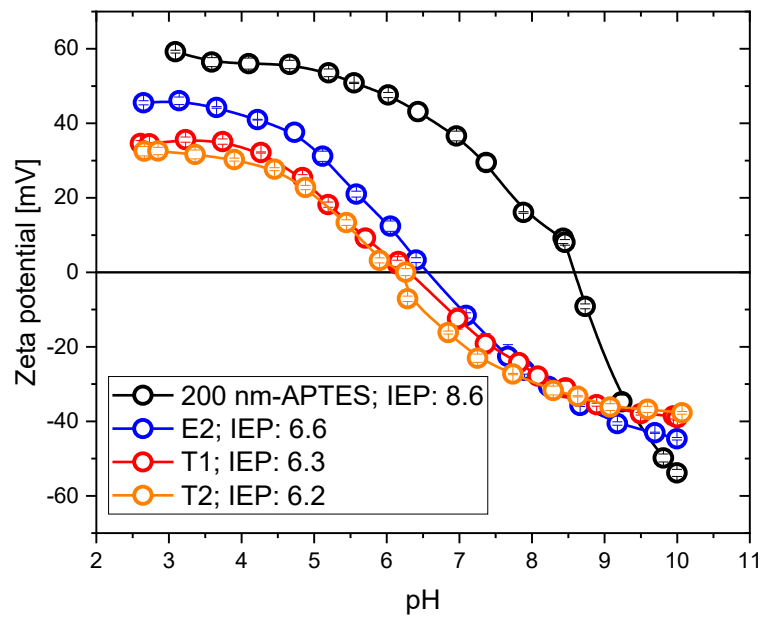
Anhang, Abbildung 27: Bestimmung der Größenverteilung der APS-Partikel und des hydrodynamischen Durchmessers.



Anhang, Abbildung 28: Bestimmung des Zetapotentials nach Funktionalisierung mit EDS.

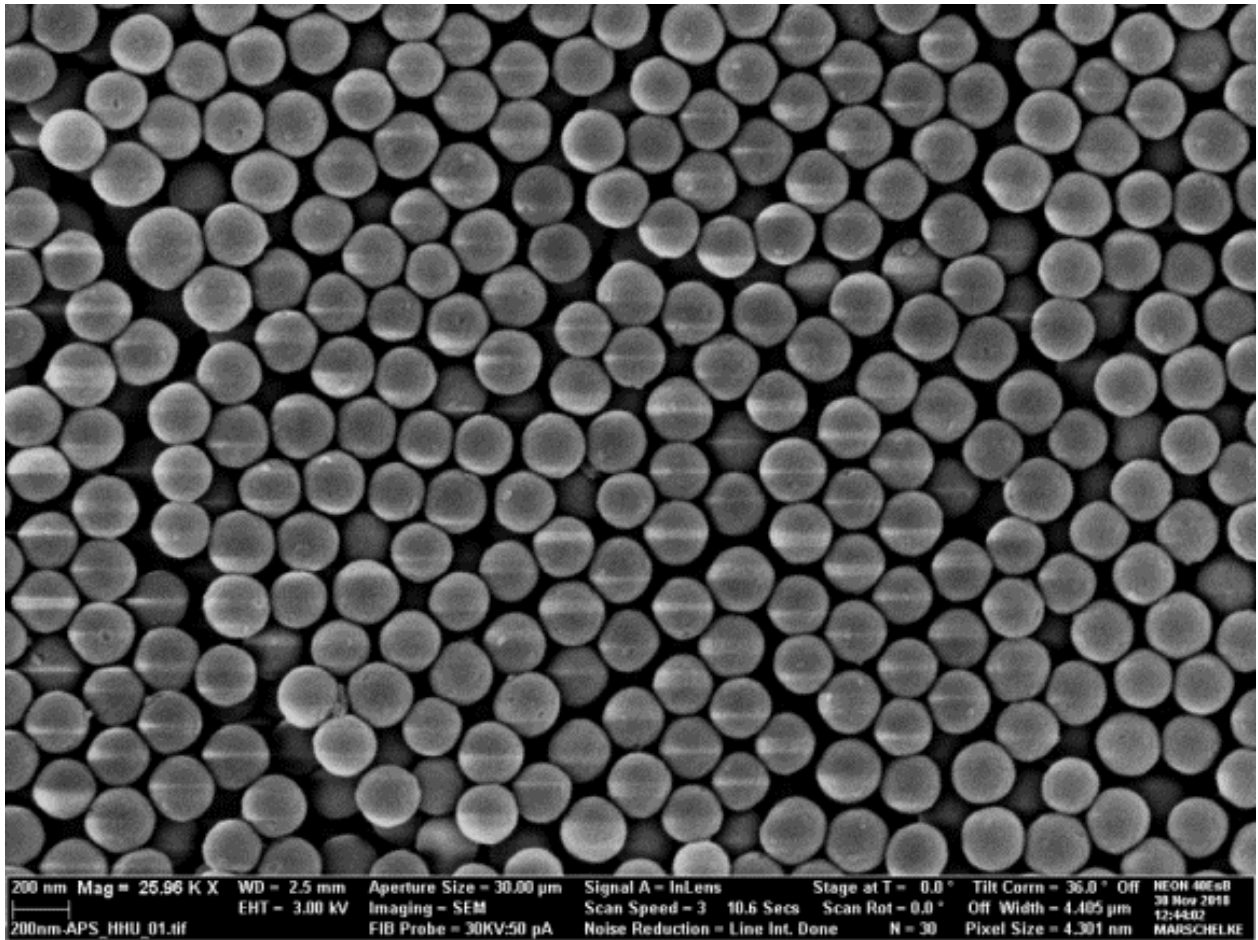


Anhang, Abbildung 29: Bestimmung der Zetapotentiale nach Funktionalisierung mit verschiedenen Glykopolymeren (hier unterschieden nach Molekulargewicht) zur Syntheseoptimierung.

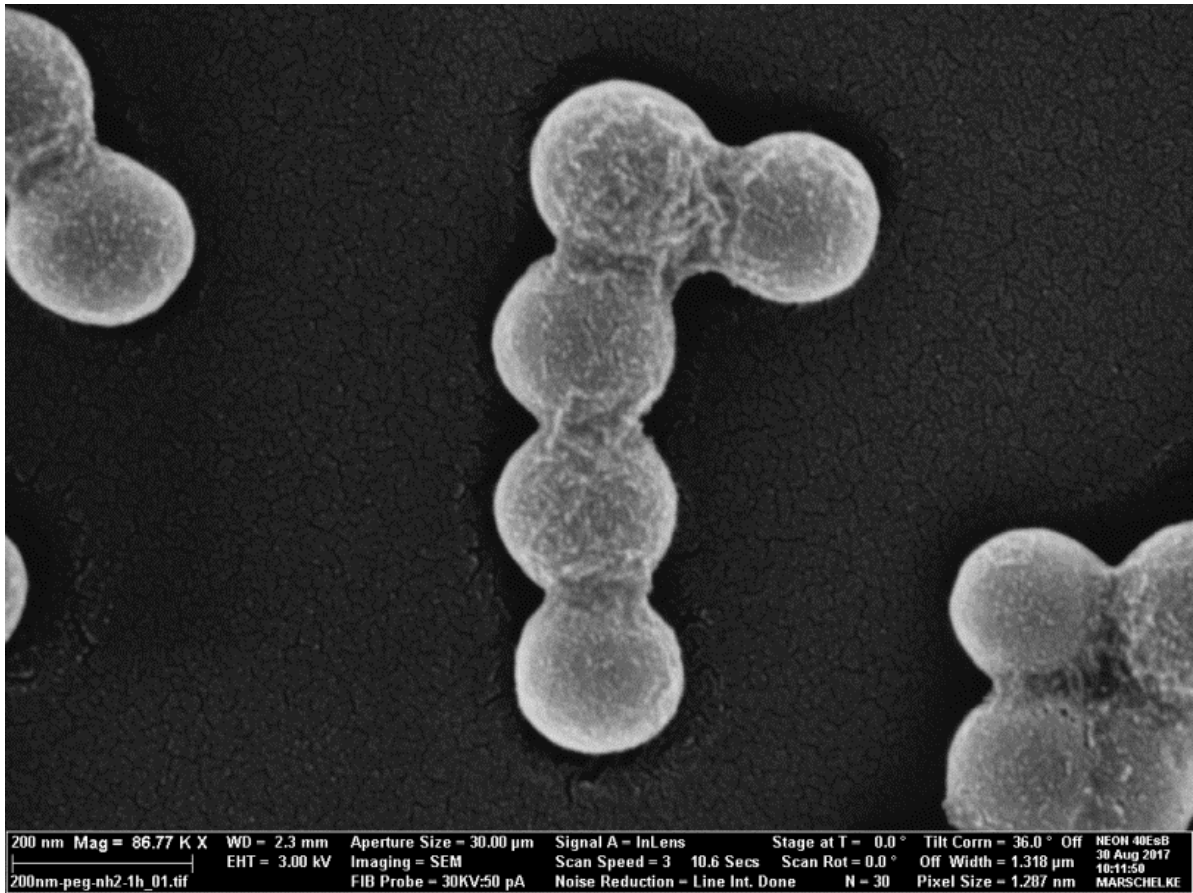


Anhang, Abbildung 30: Bestimmung der Zetapotentiale bei verschiedenen Funktionalisierungsbedingungen.

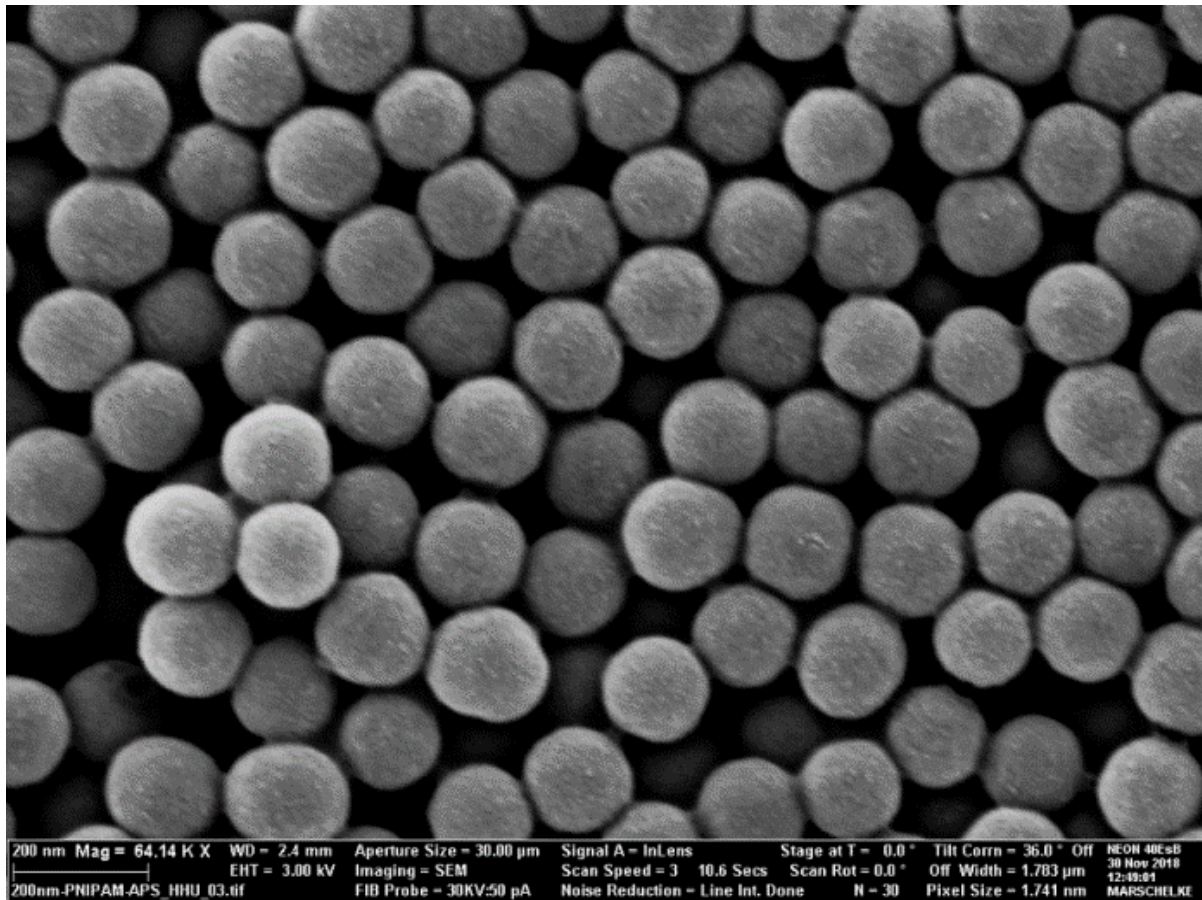
6.9 Mikroskopieaufnahmen



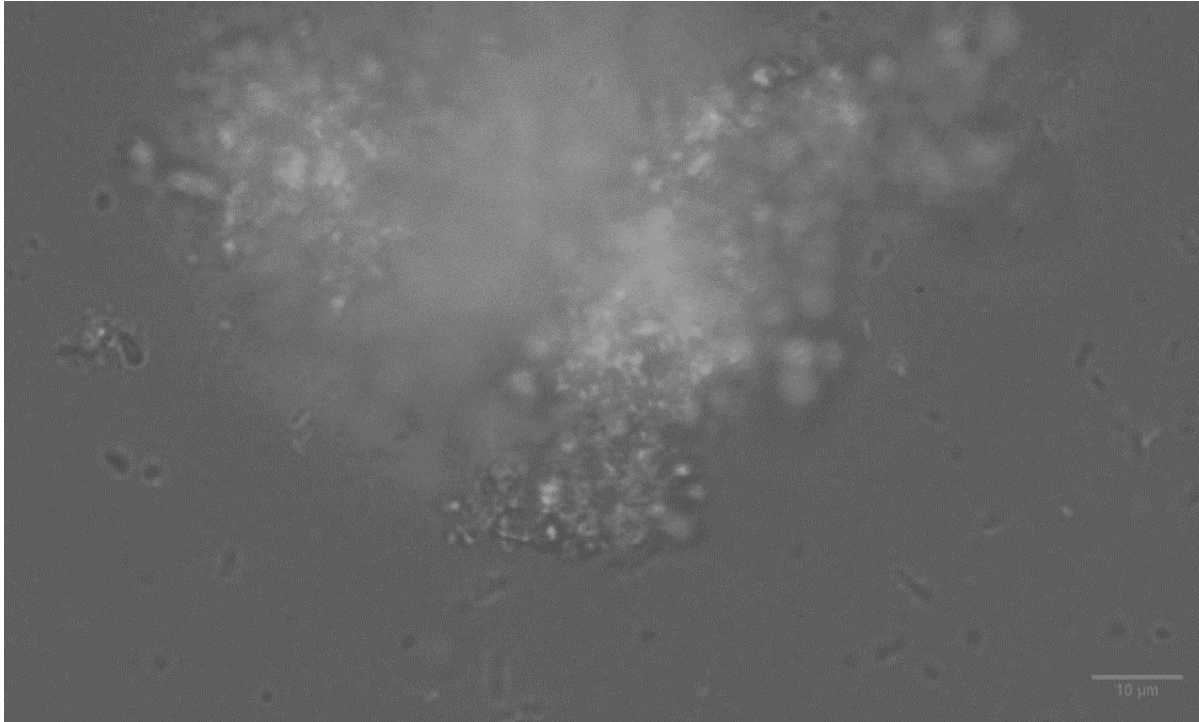
Anhang, Abbildung 31: APS-Partikel (unfunktionalisiert), bereitgestellt von Dr. Claudia Marschelke aus der Gruppe um Prof. Dr. Alla Synytska.



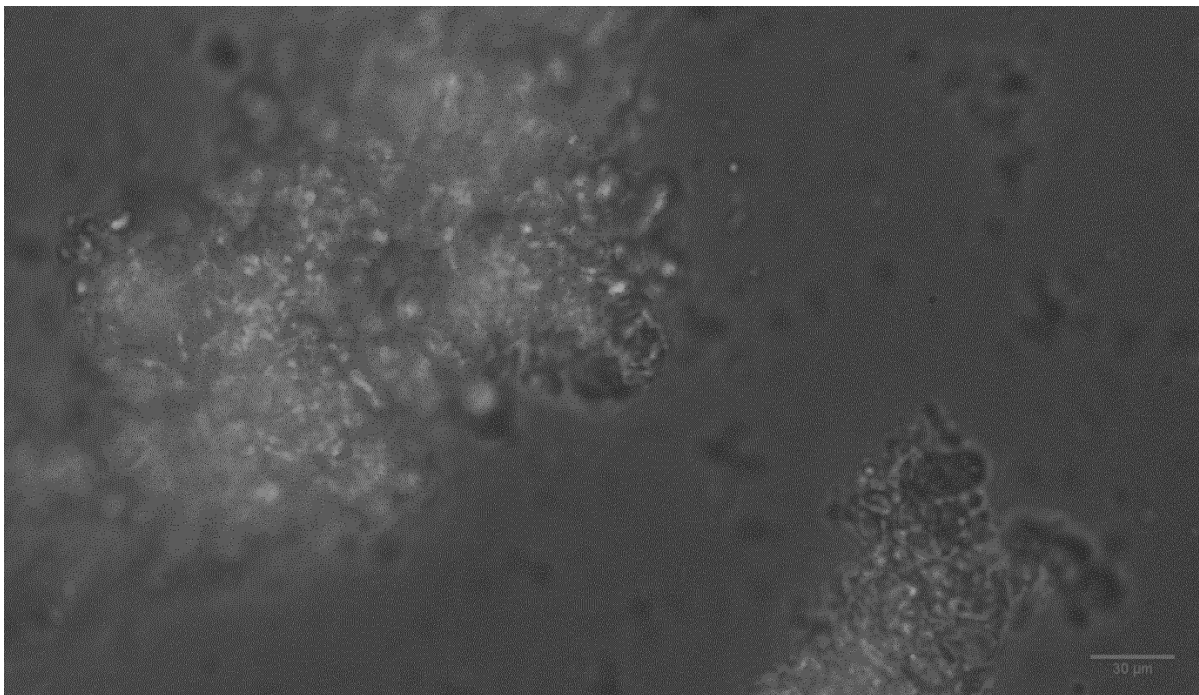
Anhang, Abbildung 32: Poly(PEGMA)-Januspartikel, bereitgestellt von Dr. Claudia Marschelke aus der Gruppe um Prof. Dr. Alla Synytska.



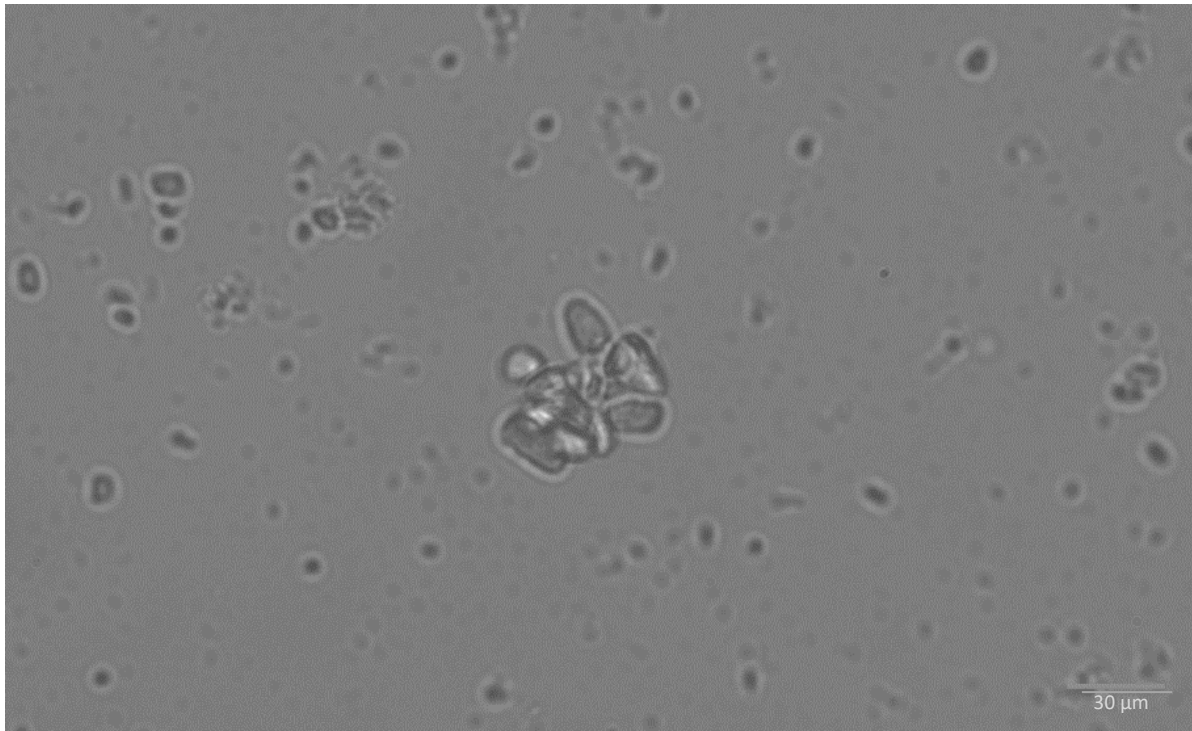
Anhang, Abbildung 33: Poly(NiPAm)-Januspartikel bereitgestellt von Dr. Claudia Marschelke aus der Gruppe um Prof. Dr. Alla Synytska.



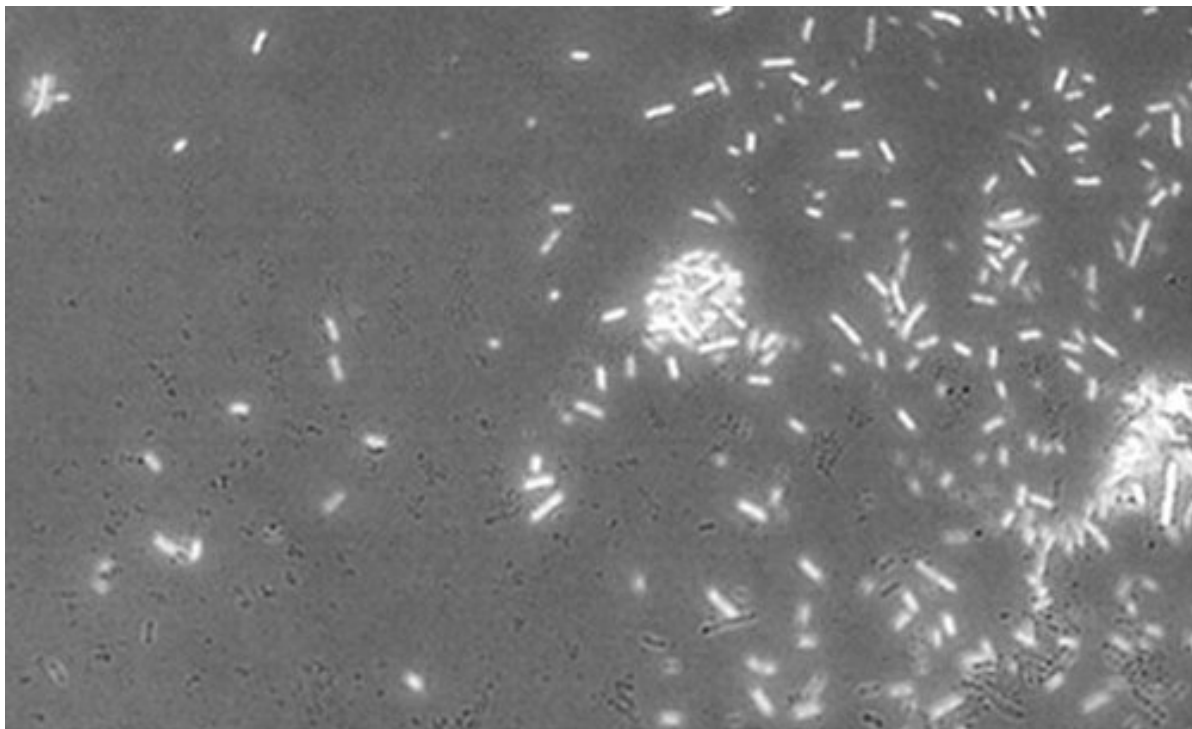
Anhang, Abbildung 34: Man₁₈-APS und *E. Coli* zu jeweils 2.0 mg/mL nach 3h.



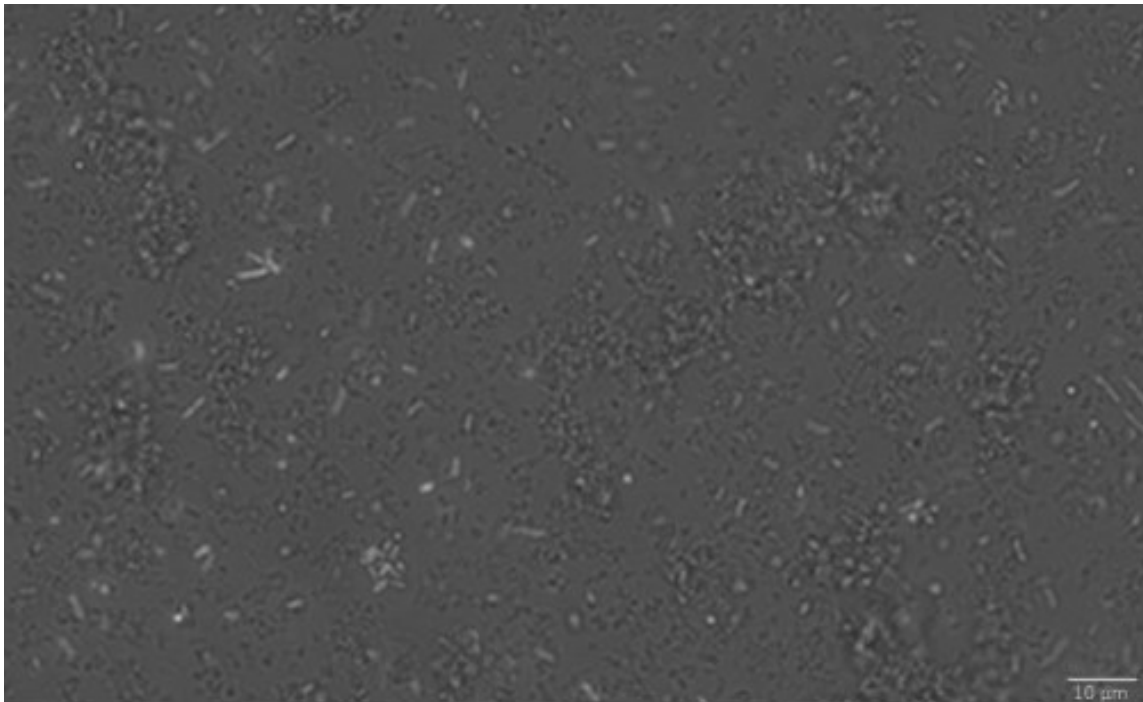
Anhang, Abbildung 35: Man₁₈-APS zu 2.0 mg/mL in Anwesenheit von *E. Coli* mit einer Konzentration von 1.0 mg/mL nach 3 h.



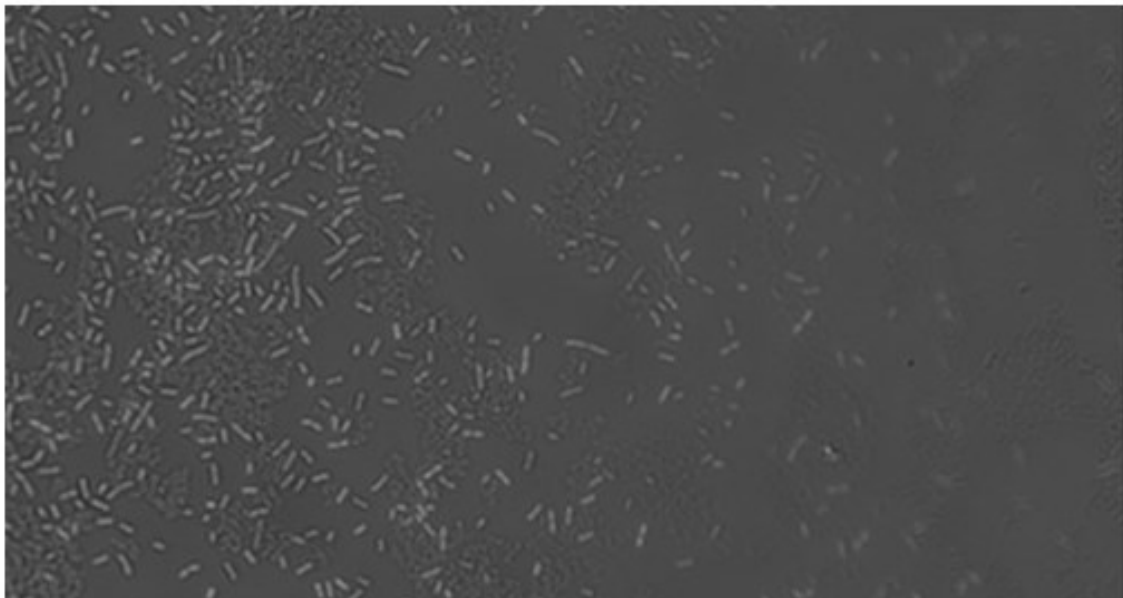
Anhang, Abbildung 36: Man₁₈-APS nach 24 h



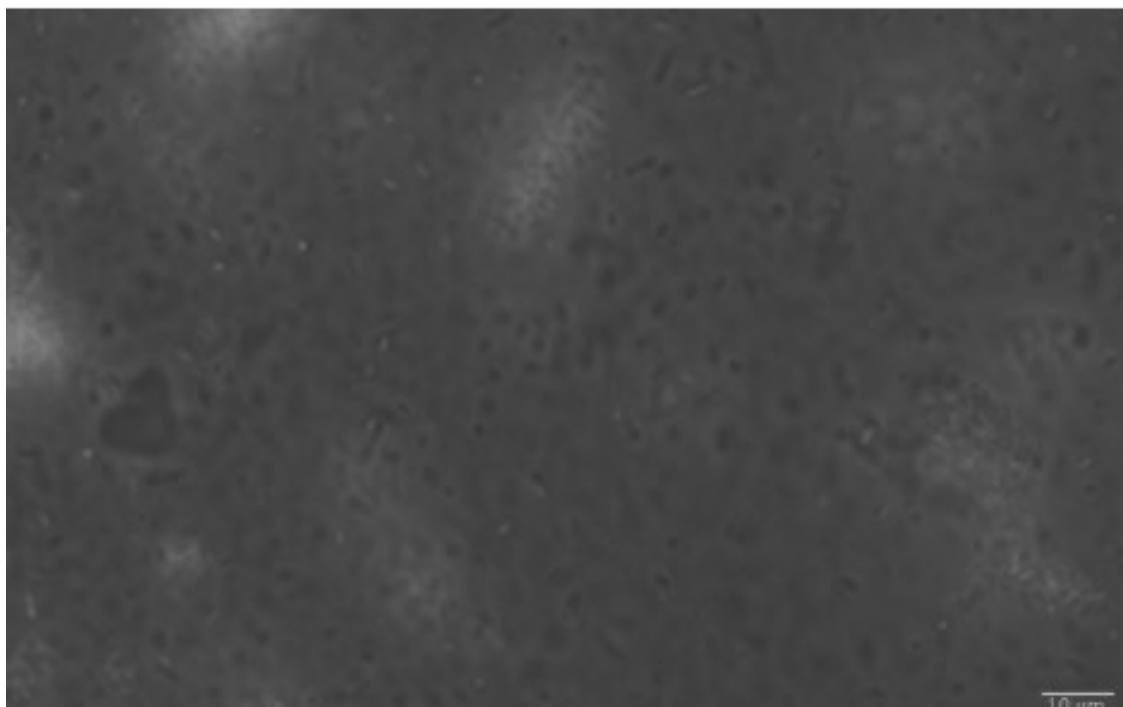
Anhang, Abbildung 37: APS-Partikel nach 10 min in Anwesenheit von *E. Coli*.



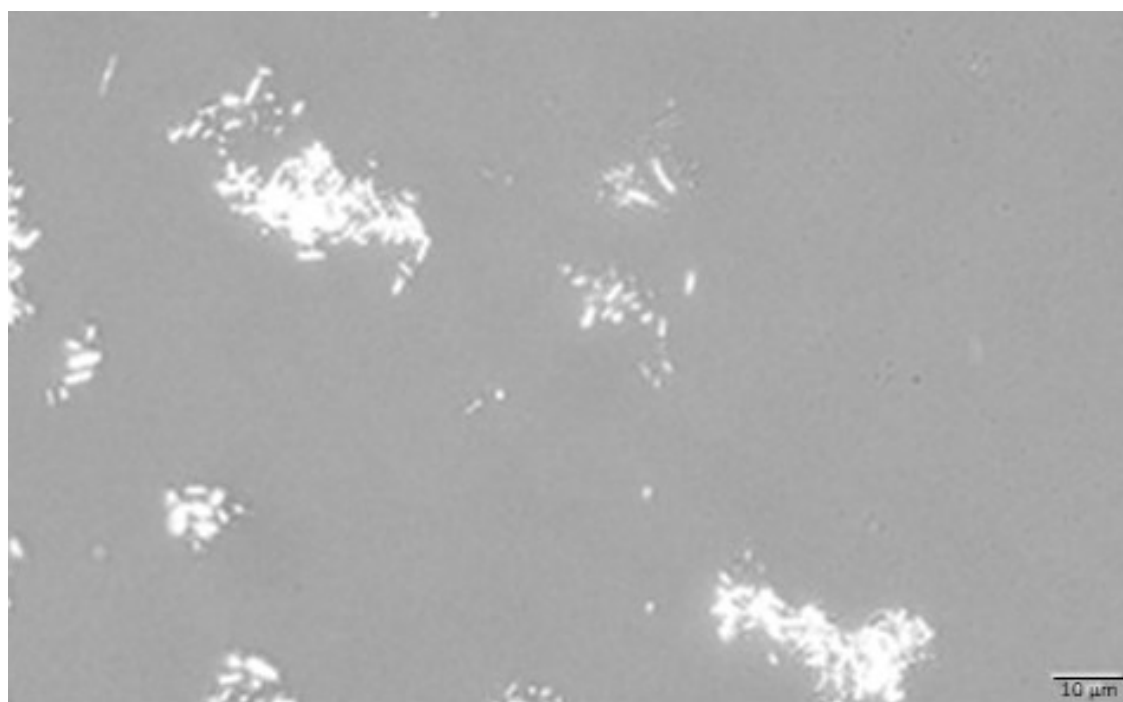
Anhang, Abbildung 38: APS-Partikel nach 3 h in Anwesenheit von *E. Coli*.



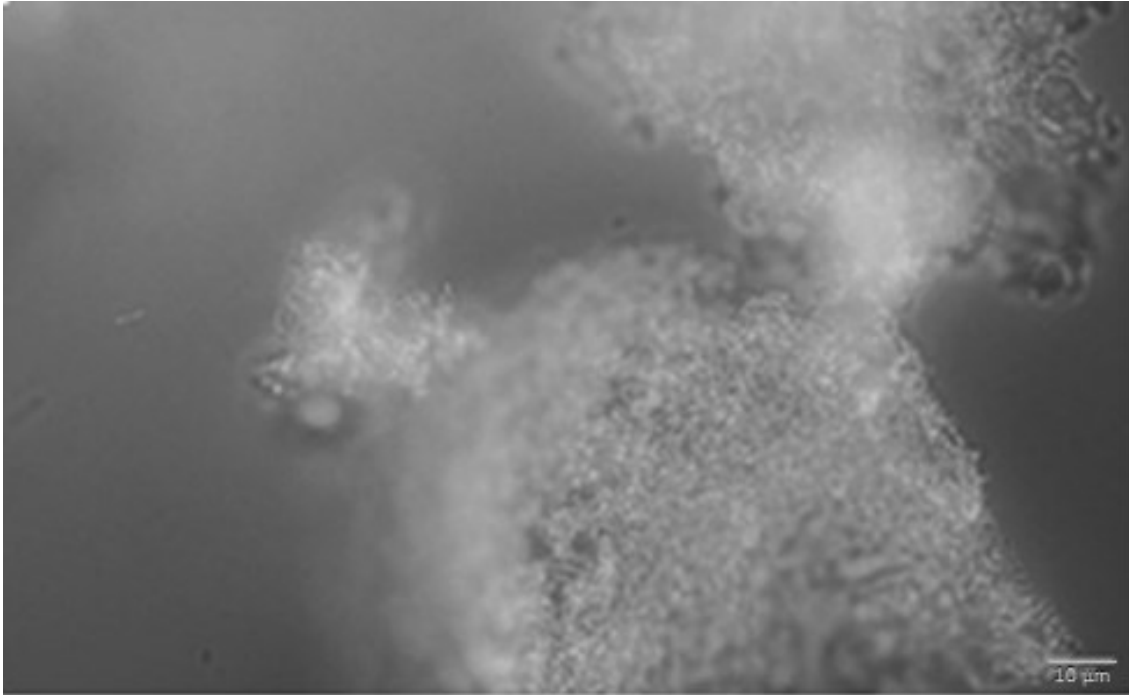
Anhang, Abbildung 39: APS-Partikel nach 6 h in Anwesenheit von *E. Coli*.



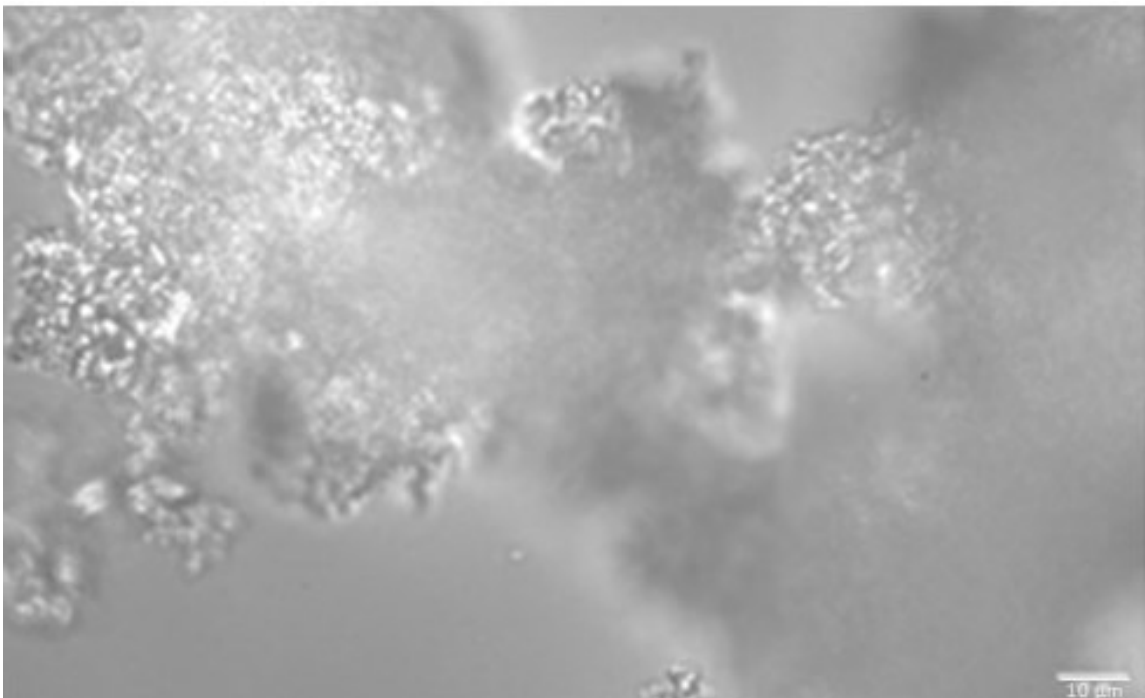
Anhang, Abbildung 40: APS-Partikel nach 24 h in Anwesenheit von *E. Coli*.



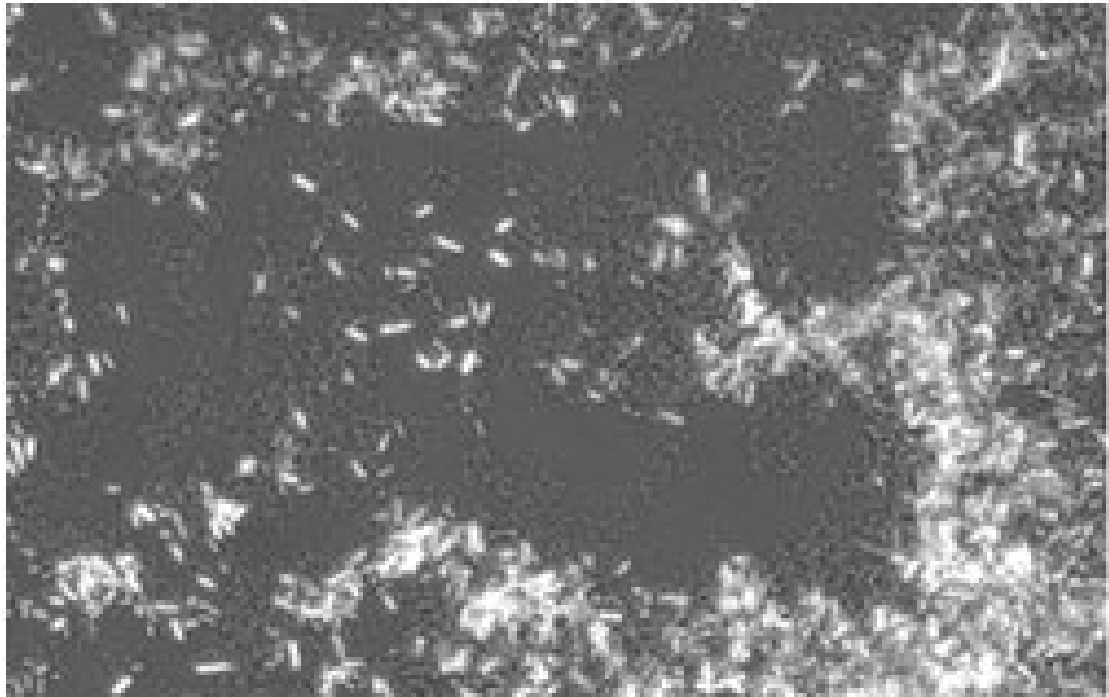
Anhang, Abbildung 41: Man₁₈-APS-Partikel nach 10 Minuten in Anwesenheit von *E. Coli*.



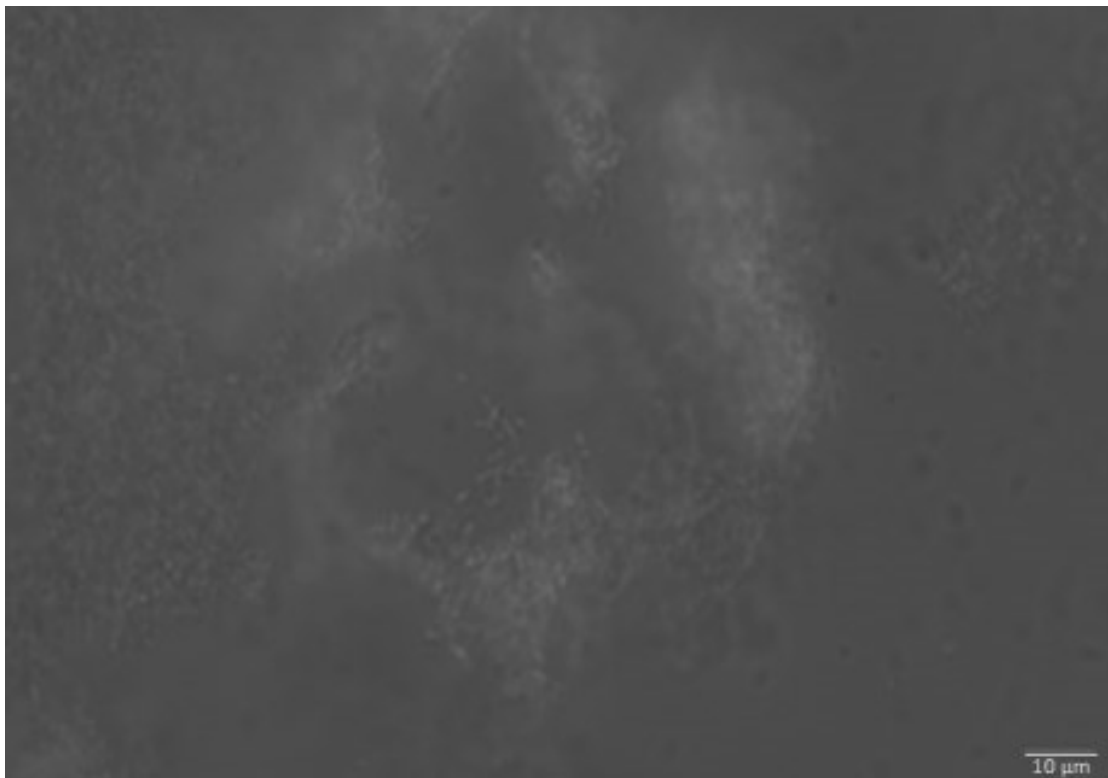
Anhang, Abbildung 42: Man₁₈-APS-Partikel nach 3 Stunden in Anwesenheit von *E. Coli*.



Anhang, Abbildung 43: Man₁₈-APS-Partikel nach 6 Stunden in Anwesenheit von *E. Coli*.



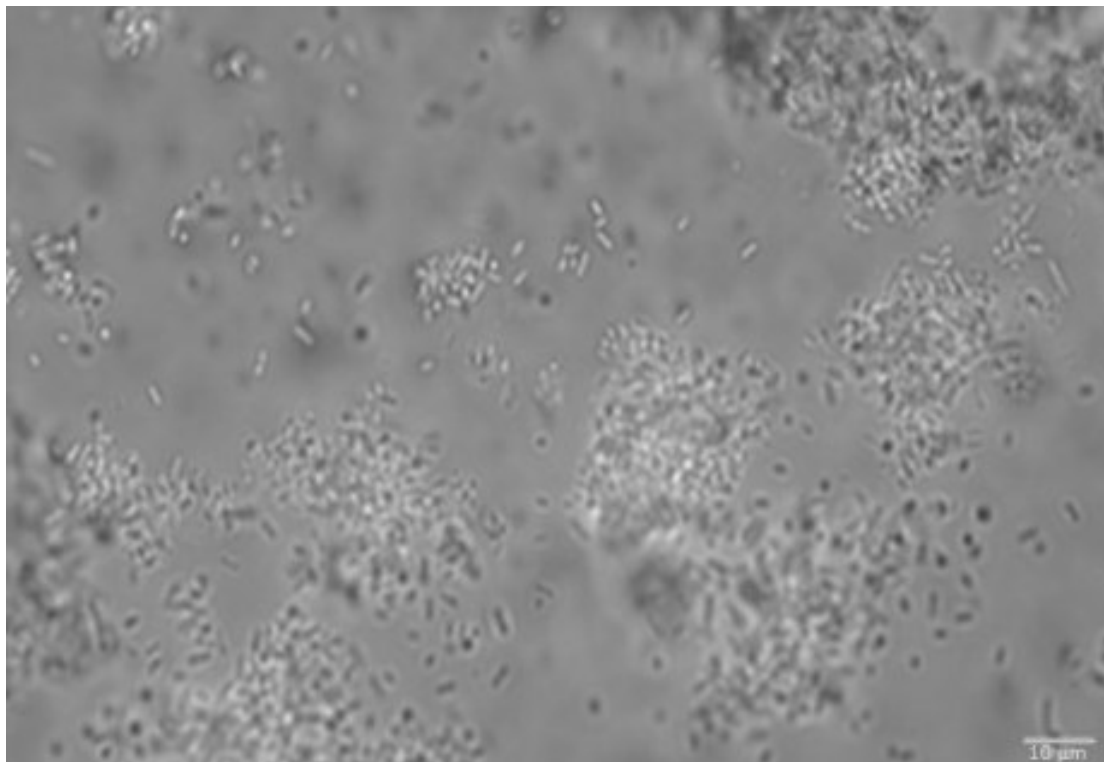
Anhang, Abbildung 44: Man₁₈-JNIPAM-Partikel nach 10 Minuten in Anwesenheit von *E. Coli*.



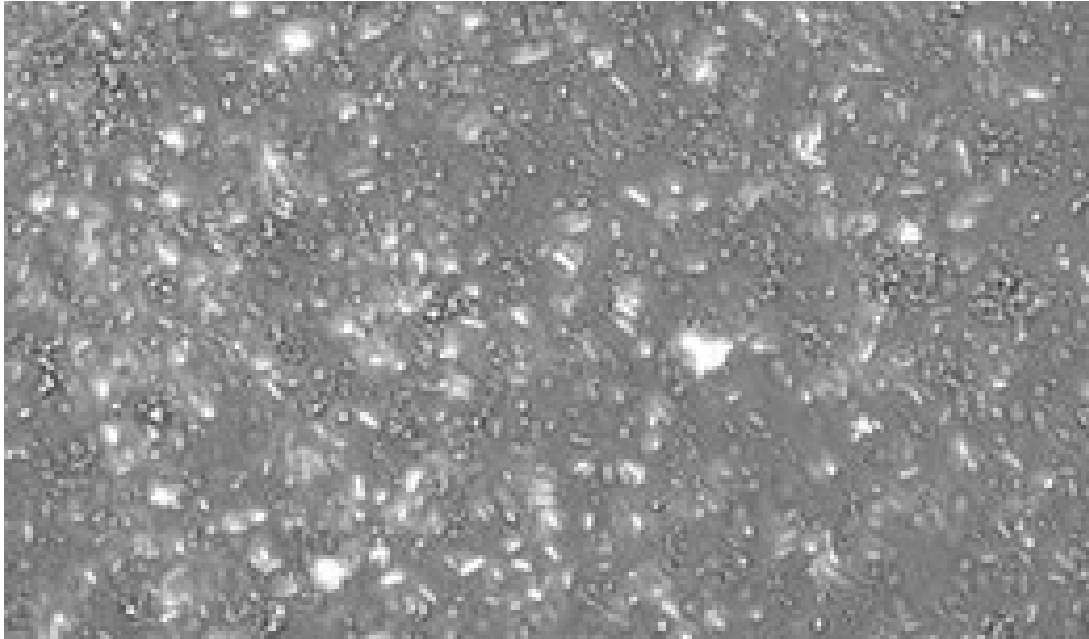
Anhang, Abbildung 45: Man₁₈-JNIPAM-Partikel nach 3 Stunden in Anwesenheit von *E. Coli*.



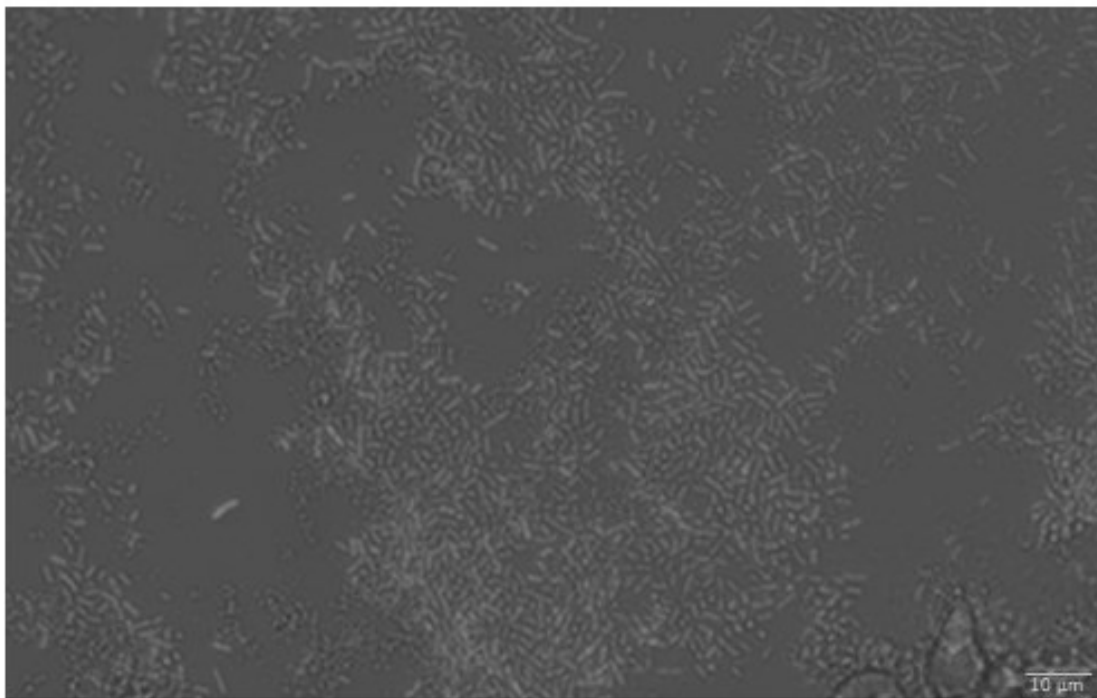
Anhang, Abbildung 46: Man₁₈-JNIPAM-Partikel nach 6 Stunden in Anwesenheit von *E. Coli*.



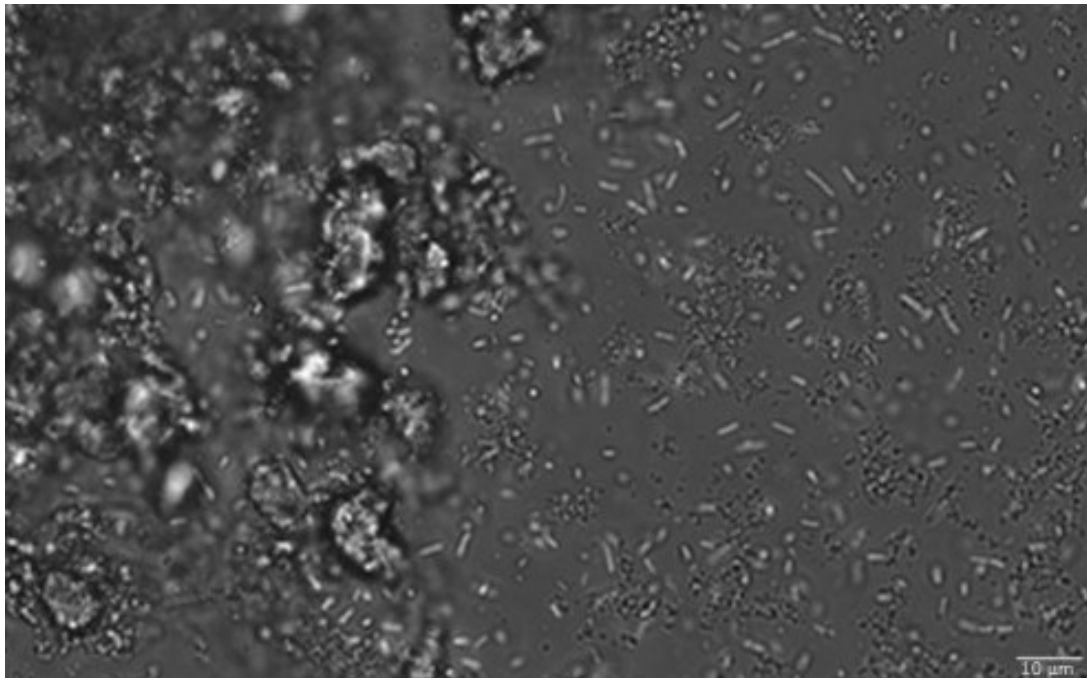
Anhang, Abbildung 47: Man₁₈-JNIPAM-Partikel nach 24 Stunden in Anwesenheit von *E. Coli*.



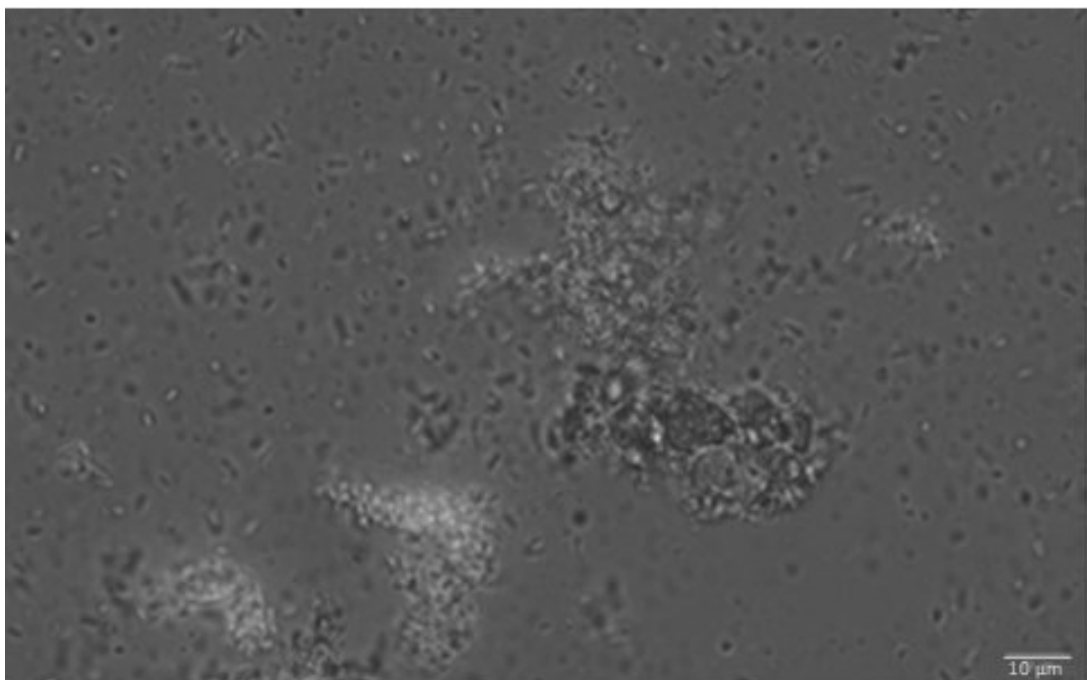
Anhang, Abbildung 48: Gal₃₇-JNIPAM-Partikel nach 10 Minuten in Anwesenheit von *E. Coli*.



Anhang, Abbildung 49: Gal₃₇-JNIPAM-Partikel nach 3 Stunden in Anwesenheit von *E. Coli*.



Anhang, Abbildung 50: Gal₃₇-JNIPAM-Partikel nach 6 Stunden in Anwesenheit von *E. Coli*.



Anhang, Abbildung 51: Gal₃₇-JNIPAM-Partikel nach 24 Stunden in Anwesenheit von *E. Coli*.

„Es [*das Kohlenstoffatom*] weilt erneut unter uns, in einem Glas Milch. Es ist in eine lange, komplizierte Kette eingeschlossen, die jedoch so gebaut ist, dass fast alle ihre Ringe vom menschlichen Körper aufgenommen werden. Es wird verschluckt: und da jede lebende Struktur sich wild gegen die Zufuhr weiteren lebenden Stoffes sträubt, zerbricht die Kette in kleine Stücke, die nacheinander aufgenommen oder ausgeschieden werden. Ein Atom, eben jenes, das uns am Herzen liegt, überschreitet die Schwelle des Darms und dringt in den Blutstrom ein: es wandert, klopft an die Pforte einer Nervenzelle, tritt ein und ersetzt ein anderes Kohlenstoffatom. Diese Zelle gehört zu einem Gehirn, dem meinigen, dessen, der hier sitzt und schreibt, die fragliche Zelle und das in ihr enthaltene Atom sind für mein Schreiben zuständig – ein gigantisches und zugleich mikroskopisch feines Spiel, das noch niemand beschrieben hat. Es ist die Zelle, die in diesem Augenblick, aus einem labyrinthartigen Wirrsal von Ja und Nein heraus, bewirkt, dass meine Hand einen bestimmten Weg auf dem Papier zurücklegt, es mit diesen Kringeln versieht, die Zeichen sind; ein doppeltes Losschnellen, nach oben und nach unten, in zwei Takten, führt meine Hand, und sie drückt diesen Punkt aufs Papier: diesen.“

Das Periodische System, Primo Levi