

**Ligand-Rezeptor Wechselwirkungen an biomimetischen
Grenzflächen: Untersuchung von Multivalenzeffekten mit
polymeren Sonden**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Fawad Jacobi

aus Kabul

Düsseldorf, September 2022

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: 25.01.2023

Eidesstaatliche Versicherung

Ich, Fawad Jacobi, geboren am 06.08.1987 in Kabul, 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 _____

Unterschrift

Veröffentlichungen

Im Laufe dieser Dissertation entstandene Publikationen:

1. The effect of PEGylation on receptor anchoring and steric shielding at interfaces: an adhesion and surface plasmon resonance study with precision polymers

Jacobi, F.; Wilms, D.; Seiler, T.; Queckboerner, T.; Tabatabai, M.; Hartmann, L.; Schmidt, S.

Biomacromolecules **2020**, 21, (12), 4850–4856

Beiträge zur Publikation:

Synthesen: PEGdAAm, ManAmin, CA-funktionalisierte SCPs, ManAmin-funktionalisierte SCPs, Bereitstellung von EDS und TDS und ManAzid sowie Unterstützung bei der Synthese der Glykostrukturen im Rahmen der Abschlussarbeit von T. Queckbörner

Analytik: H-NMR, MALDI-TOF, LC-MS, UV-Messungen, TBO-Assays, vor und nach Funktionalisierung der SCPs, AFM (Cantilever Präparation, Elastizitätsmodulmessung, Auswertung), SCP-RICM mit Glykooligomeren (Oberflächenpräparation mit ConA, Durchführung und Auswertung), SPR-Messungen (Vorbereitung, exkl. Chipmodifikation, Durchführung und Auswertung)

2. Multivalent Binding of Precision Glycooligomers on Soft Glycocalyx Mimicking Hydrogels

Jacobi, F.; Camaleño de la Calle, A.; Boden, S.; Grafmueller, A.; Hartmann, L.; Schmidt, S.

Biomacromolecules **2018**, 19 (8), 3479-3488

Beiträge zur Publikation:

Synthesen: EDS, TDS, alle verwendeten Glykooligomere, PEGdAAm, ManAzid, ManAmin, CA-funktionalisierte SCPs, ManAmin-funktionalisierte SCPs, Glyko-Oligo-SCPs, RBTIC

Analytik: H-NMR, MALDI-TOF, LC-MS, UV-Messungen, TBO-Assays vor und nach Funktionalisierung der SCPs, AFM (Cantilever Präparation, Elastizitätsmodulmessung, Auswertung), SCP-RICM mit Glykooligomeren (Oberflächenpräparation mit ConA, Durchführung und Auswertung), Fluoreszenzmessungen (Vorbereitung, Durchführung und Auswertung), ITC Messungen (Vorbereitung, Durchführung, Auswertung)

3. Sequence-Controlled High Molecular Weight Glyco(oligoamide)–PEG Multiblock Copolymers as Ligands and Inhibitors in Lectin Binding

Gerke, C.; **Jacobi, F.**; Goodwin, L. E.; Pieper, F.; Schmidt, S.; Hartmann, L.

Macromolecules **2018**, 51 (15), 5608

Beiträge zur Publikation:

Synthesen: PEGdAAm, ManAzid, ManAmin, CA-funktionalisierte SCPs, ManAmin-funktionalisierte SCPs

Analytik: TBO-Assays vor und nach Funktionalisierung der SCPs, AFM (Cantilever Präparation, Elastizitätsmodulmessung, Auswertung), SCP-RICM mit Glykooligomeren (Oberflächenpräparation mit ConA, Durchführung und Auswertung)

4. Elastic Modulus Dependence on the Specific Adhesion of Hydrogels

Wang, H.; **Jacobi, F.**; Waschke, J.; Hartmann, L.; Loewen, H.; Schmidt, S.

Advanced Functional Materials **2017**, 27, 1702040

Beiträge zur Publikation:

Synthesen: PEGdAAm, ManAzid, ManAmin

Analytik: Modifikation des TBO-Assays vor und nach Funktionalisierung der SCPs

Zusammenfassung

Multivalente Wechselwirkungen zwischen Kohlenhydraten und Proteinen bilden eine Grundlage für bedeutende biologische Prozesse. Durch die gezielte Untersuchung dieser Wechselwirkungen an der Glykokalyx, eine eukaryotische Zellen umhüllende Kohlenhydratschicht, können beispielsweise Zellkommunikations- und Infektionsprozesse besser beschrieben werden. Dabei interagieren einzelne Kohlenhydratmoleküle nach dem Ligand-Rezeptor Prinzip mit hochspezifischen Bindungsstellen des Gegenparts, den Lektinen. Obwohl eine einzelne Bindung relativ schwach ist, können durch gemeinsame Wechselwirkungen vieler Liganden und Rezeptoren vergleichsweise starke Bindungen mit hoher Selektivität erzielt werden, auch bekannt als Glykocluster-Effekt. Auf diese Weise werden beispielsweise Adhäsionsprozesse mit hohen Bindungsaffinitäten an Zelloberflächen mit Pathogenen beschrieben. Ermöglicht wird das durch die multivalente Präsentation beider Bindungspartner auf den jeweiligen biologischen Oberflächen. Der Prozess wird auch als molekularer Klettverschluss bezeichnet.

Obwohl die zugrundeliegenden Mechanismen multivalenter Wechselwirkungen seit mehr als 20 Jahren intensiv erforscht werden, bleiben weiterhin viele Fragen ungeklärt. Der Grund dafür ist die hochkomplexe Natur derartiger Wechselwirkungen. Durch Zell- und *in vivo* Studien können wertvolle Rückschlüsse gezogen werden, jedoch stellen diese aufgrund der heterogenen Oberflächen eine große Herausforderung dar weitere Erkenntnisse über einzelne Gruppen wie die Kohlenhydrate zu erlangen. Als Alternative können hier sogenannten Glykomimetika und auch glykomimetische Oberflächen dienen. Eine wichtige Klasse der Glykomimetika sind Glykopolymere. Ähnlich wie ihre natürlichen Analoga präsentieren die synthetischen Glykopolymere mehrere Bindungsstellen, z.B. Monosaccharide, können gezielt in ihrer Struktur und Zusammensetzung variiert und dann auf ihre Bindung an isolierten Proteinen untersucht werden. Für eine systematische und hochdefinierte Variation des strukturellen Aufbaus der Liganden wurde die Festphasensynthese zur Herstellung von Präzisionsglykomakromolekülen von Hartmann et. al etabliert und im Rahmen der vorliegenden Arbeit angewendet. Es wurden verschiedene monodisperse und sequenzdefinierte mono- und multivalente Glykomimetika hergestellt und gezielt in ihrer Struktur variiert. Die hier erzeugten und charakterisierten Strukturen weisen

Unterschiede in der Ligandenvaleanz und dem Ligandenabstand auf und wurden dann auf Unterschiede in der Wechselwirkung mit dem Modellektin Concanavalin A (ConA) hin untersucht.

Die Wechselwirkungen wurden mittels verschiedener Analysemethoden untersucht. Zum einen konnten die Strukturen erfolgreich an 15-50 µm große, weiche Polymerpartikel auf Polyethylenglykol Basis gebunden werden. So konnte durch eine ebenfalls durchgeführte Immobilisation des Lektins ConA auf einer Glasoberfläche der SCP-RICM Assay (Soft Colloidal Probe – Reflection Interference Contrast Microscopy) erfolgreich angewendet werden. Die Besonderheit besteht darin, dass wie bei Kontakten der Glykokalyx sowohl Ligand als auch Rezeptor auf Oberflächen gebunden sind. Die erhaltenen Ergebnisse konnten mit weiteren etablierten Analysemethoden bei denen entweder Ligand und/oder Rezeptor in Lösung vorliegen, verglichen werden. Sowohl in Studien bei denen die Bindungsaffinität ohne, aber auch in weiteren Studien mit Inhibitoren konnten zunächst stärkere Bindungen für Strukturen mit höherer Valenz ermittelt werden. Der Effekt nimmt ab drei Liganden aber wieder ab, was unter anderem durch den zunehmenden sterischen Einfluss erklärt werden kann. Weiterhin deuten die Ergebnisse darauf hin, dass mit zunehmender Polymergerüslänge die Bindungsaffinität aufgrund entropischer Effekte abnimmt. Kompensiert werden könnte dieser Effekt durch das Erreichen mehrerer ConA-Bindungstaschen ab einer gewissen Molekülgröße. Diese Beobachtungen konnten durch die ebenfalls durchgeführten Fluoreszenz- und ITC (*isothermal calorimetry titration*)-Assays bestätigt werden. Eine wichtige Erkenntnis dieser Arbeit und somit auch von Bedeutung für die zukünftige Entwicklung neuer und weiterer Glykomimetika ist, dass flexible Liganden in Lösung und an einem Polymernetzwerk gebunden ein ähnliches Bindungsverhalten aufweisen.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde der sterische Abschirmungseffekt von verschiedenen multivalenten Glykopolymeren quantifiziert. Das Ziel bestand darin, ein besseres Verständnis für das Design von Wirkstoffen zur Inhibition von Kohlenhydratbindenden Stellen von Pathogenen zu erlangen. Dazu wurden PEGylierte und nicht PEGylierte Glykomimetika auf ihr inhibitorisches Potenzial in Adhäsionsstudien innerhalb eines Zeitraums von vier Stunden untersucht. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass mit den PEGylierten Strukturen eine stärkere Reduktion der zu Beginn ermittelten Adhäsionsenergie erzielt werden kann.

PEGylierte Glykopolymere können somit von Vorteil sein bei der Entwicklung von Inhibitoren der Kohlenhydrat-vermittelten Adhäsion.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	2
Inhaltsverzeichnis.....	5
1 Einleitung.....	8
1.1 Kohlenhydrate als leistungsstarke Informationsspeicher	8
1.2 Proteinrezeptoren als hochspezifische Gegenstücke von Kohlenhydratliganden.....	10
1.3 Molekularer Klettverschluss an biologischen Grenzflächen	14
1.4 Synthetische Glykomakromoleküle für die Untersuchung von Struktur-Aktivitäts- Beziehungen.....	17
1.5 Monodisperse und sequenzdefinierte Glykomimetika mittels SPPoS.....	20
1.6 Methoden zur Untersuchung von Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen.....	21
1.6.1 Ligand und Rezeptor in Lösung: Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC).....	22
1.6.2 An der Grenzfläche in Lösung und gebunden: Der SPR-Assay.....	24
1.6.3 An biomimetischen Oberflächen: SCP-RICM.....	26
2 Motivation und Ziele	29
3 Ergebnisse und Diskussion	31
3.1 Multivalente Bindung von Präzisionsglykooligomeren an weiche Hydrogel Partikel..	32
3.1.1 Synthese von Präzisionsglykooligomeren mittels SPPoS	33
3.1.2 SCP-Synthese, Funktionalisierung mit Carbonsäuregruppen und Charakterisierung	36
3.1.3 Konjugation und Charakterisierung bei der Herstellung von Glyko-SCPs.....	39
3.1.4 Ermittlung geeigneter Bedingungen für den SCP-RICM Assay.....	42
3.2 Adhäsionsstudien an biomimetischen Grenzflächen	45
3.2.1 Direkte Bindung von Glyko-SCPs an ConA Oberflächen.....	45
3.2.2 Hemmung der Adhäsion in Inhibitionsstudien	49

3.2.3	Spezifische Bindung von gelöstem ConA an Glyko-SCPs.....	51
3.2.4	Bindungsverhalten von gelösten Glykooligomeren und ConA mittels ITC	55
3.2.5	Stärkere Bindung durch die Erhöhung der Ligandenanzahl.....	56
3.2.6	Einfluss der Gerüstlänge auf das Bindungsverhalten.....	57
3.3	Untersuchung von sterischen Abschirmungseffekten mit PEGylierten Präzisionspolymeren	60
3.3.1	Beschreibung des Studienaufbaus	60
3.3.2	Studien zur Adhäsionshemmung im Vergleich zur direkten Bindung an ConA	62
4	Zusammenfassung und Ausblick	68
5	Experimenteller Teil.....	73
5.1	Materialien	73
5.2	Methoden.....	74
5.3	Verfahren zur Herstellung von Glyko-SCPs	76
5.3.1	Protokolle für die Festphasensynthese	76
5.3.2	SCP-Gerüstsynthese und Nachfunktionalisierung mit Crotonsäure	77
5.3.3	Charakterisierung von glykokonjugierten SCPs.....	78
5.3.4	Bestimmung des Elastizitätsmoduls der SCPs	79
5.3.5	Konjugation von Glykooligomeren an SCPs	79
5.3.6	Funktionalisierung der Glasoberfläche mit ConA	80
5.3.7	SCP-RICM allgemeines Verfahren	80
5.3.8	IC ₅₀ Ergebnisse der SCP Adhäsionsstudien.....	81
5.4	Untersuchung von glykokonjugierten SCPs mit RBITC- ConA	83
5.5	SPR Messungen	84
5.6	Analytische Daten der hergestellten Verbindungen	86
6	Verzeichnisse	112
6.1	Abkürzungsverzeichnis	112

6.2	Abbildungsverzeichnis.....	114
6.3	Danksagung	119
7	Literaturverzeichnis.....	121

1 Einleitung

1.1 Kohlenhydrate als leistungsstarke Informationsspeicher

Erste Erkenntnisse über strukturelle Eigenschaften von Kohlenhydraten gehen auf die Arbeiten von Emil Fischer im späten 19. Jahrhundert zurück. Ihre Funktion wurde jedoch lange Zeit nur unzureichend, nämlich ausschließlich als Energiespeicher und Energieträger, beschrieben.^[1-3] Während der Einfluss von Proteinen und Nukleinsäuren für biologische Prozesse seit längerem bekannt ist, war die Rolle der Kohlenhydrate weniger gut erforscht und hat in der jüngeren Vergangenheit das Interesse zahlreicher Forschungsbereiche auf sich gezogen.^[4-5] Erst 1988 beschrieben Dwek et al. ihren Einfluss in biologischen Prozessen, besonders für Kommunikationsprozesse von Zellen. Die Forschung zum tieferen Verständnis dieser Prozesse wurde unter dem Begriff Glykobiologie zusammengefasst.^[6] Heute ist die zentrale Rolle von Kohlenhydraten bei der Informationsübertragung auf zellulärer Ebene zwar allgemein anerkannt, jedoch nur für wenige der zahlreichen existierenden Prozesse vollständig verstanden.^[5] Aus biologischer Sicht geht es dabei um die Übertragung von Informationen, sowohl intra- als auch interzellulär und deren Weitergabe an nachfolgende Generationen durch Zellteilungsprozesse.^[6-9]

Kohlenhydratstrukturen, die auch als Glykane bezeichnet werden, sind in der Natur allgegenwärtige Biomoleküle und weisen eine große strukturelle Vielfalt auf. Die Bildung glykosidischer Bindungen führen zu einer Vielzahl von Oligosacchariden und Glykokonjugaten wie beispielsweise den in der folgenden Abbildung schematisch dargestellten Glykolipiden, Glykopeptiden oder Glykoproteinen.^[10-12]

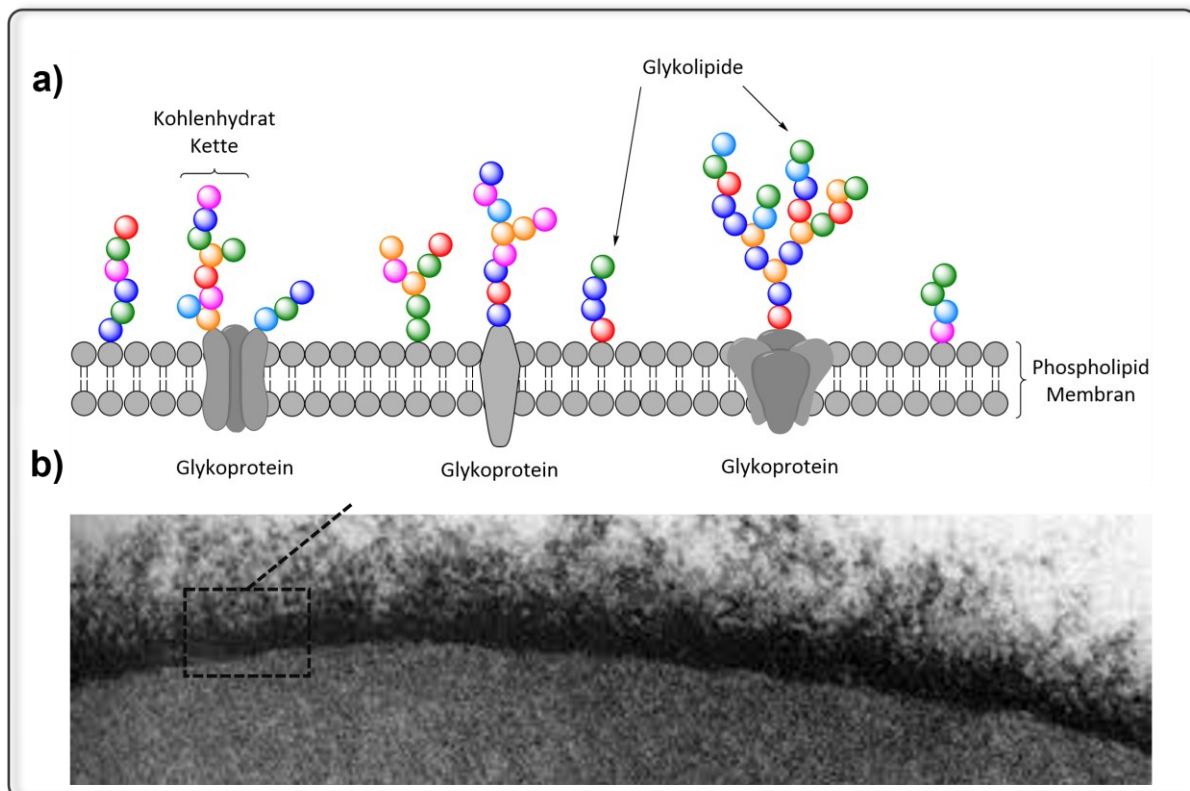


Abbildung 1: a) Schematische Darstellung ausgewählter Strukturen der Glykokalyx. b) Elektronenmikroskopische Aufnahme der Glykokalyx eines Erythrozyten. ^[13]

Die entscheidende Funktion von Glykolipiden und Glykoproteinen ist heute zum Beispiel bei Entzündungsprozessen, Immunreaktionen oder der Metastasierung und anderen wichtigen biomedizinischen Prozessen allgemein anerkannt. ^[10-11, 14] Darüber hinaus wurden bereits spezifische Kohlenhydratstrukturen als Marker für bestimmte Tumorarten oder als Bindungsstellen für bakterielle oder virale Krankheitserreger identifiziert. ^[15-20]

Die vielfältigen Funktionen von Glykokonjugaten resultieren aus der sehr hohen Variabilität bei der glykosidischen Bindungsbildung und machen sie damit aus biologischer Sicht zu idealen Informationsträgern. ^[12, 21-24] Im Vergleich zu Peptiden und Nukleotiden, bei denen die Speicherkapazität der Information durch die Anzahl und Abfolge der Monomereinheiten begrenzt ist, wird diese bei Oligosacchariden durch Regioselektivität, Konfiguration der glykosidischen Bindung (Diastereoselektivität) und der Ausbildung von Verzweigungen in der Struktur erweitert. ^[12] Folglich besitzen Oligosaccharide die Fähigkeit mehr Informationen pro atomarer Einheit zu speichern als jedes andere Biopolymer. ^[25] Dieses Phänomen soll anhand eines vereinfachten Beispiels verdeutlicht werden. Für ein Trimer, das aus drei

Monomereinheiten der gleichen Aminosäure besteht, gibt es ein mögliches Trimer. Wird dieses Beispiel von einer Aminosäure auf ein Monosaccharid wie die Glucopyranose übertragen, so ergeben sich 176 verschiedene Kombinationsmöglichkeiten für das Trisaccharid. Die Vielzahl ergibt sich aus den zwei Möglichkeiten für die anomere Selektivität (α und β), vier Möglichkeiten der Bindungsposition (2-,3-,4-, und 6-) sowie weiteren sechs Möglichkeiten der Verzweigung (1-2/1-3; 1-2/1-4; 1-2/1-6; 1-3/1-4; 1-3/1-6; 1-4/1-6). Folglich ergeben sich mit verschiedenen Monosacchariden eine außerordentlich hohe Anzahl von Kombinationsmöglichkeiten.^[25]

Neben dieser hochkomplexen Form der Kodierung biologischer Informationen in der zellumhüllenden Glykokalyx, hat sich im Laufe der Evolution das Gegenstück zur Entschlüsselung der Information in Form von Proteinrezeptoren entwickelt.^[26-28] Diese Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen bilden die Grundlage für viele biologische Funktionen und werden in den folgenden Kapiteln näher erläutert.

1.2 Proteinrezeptoren als hochspezifische Gegenstücke von Kohlenhydratliganden

Kohlenhydratbindende Proteine, auch als Lektine bezeichnet, kommen wie ihre Glyko-Gegenstücke in Organismen von Mikroben bis hin zum Menschen vor.^[29-31] Die Präsentation von Lektinen und Kohlenhydraten als Bestandteile der extrazellulären Matrix ermöglicht die Zelladhäsion durch Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen. Der hohe Spezifitätsgrad und die Präzision dieses biologischen Prozesses ist auf die Informationsspeicherkapazität der Kohlenhydratstrukturen in der Glykokalyx sowie auf die Eigenschaft der Lektine zurückzuführen, diese hochselektiv zu entschlüsseln.^[32] Die Ausbildung von Ligand-Rezeptor-Komplexen wird durch Wasserstoffbrücken, Ionenbindungen, van der Waals-Kräften sowie hydrophoben Wechselwirkungen ermöglicht und kann als dynamischer, reversibler Prozess zwischen gebundenem und ungebundenem Zustand verstanden werden.^[33-36] Dieser Vorgang wird seit langem als Schlüssel-Schloss-Prinzip veranschaulicht, also einer sehr präzisen Übereinstimmung zwischen zwei starren Objekten.^[37-38] Andere Formen dieses Prinzips sind das Induced-Fit-Konzept, das die Konformationsänderung des Lektins durch die Bindung des Liganden beschreibt, sowie die Darstellung verschiedener Konformationen des Lektins in Abhängigkeit vom zu bindenden Liganden.^[39]

Wie oben beschrieben, hängt die Affinität eines Liganden-Rezeptor-Komplexes im Wesentlichen von einer Reihe nicht-kovalenter, intermolekularer Wechselwirkungen ab. Weitere Einflussfaktoren sind elektrostatische Wechselwirkungen, Solvatationseffekte sowie Veränderungen in der Anzahl der Freiheitsgrade, die Ligand und Rezeptor infolge der Komplexbildung erfahren.^[40] Die kooperative Wasserstoffbrückenbindung wird beispielsweise durch sp^3 -hybridisierte Sauerstoffatome der Hydroxylgruppen des Kohlenhydrats ermöglicht, die sowohl als Akzeptoren für zwei H-Brücken als auch als Donatoren für die Ausbildung einer H-Brücke fungieren. Als Gegenspieler präsentieren die Haupt- und Seitenketten der Aminosäuren Amidgruppen als Donatoren und Carbonylgruppen als Akzeptoren.^[41]

Tabelle 1: Übersicht ausgewählter Wechselwirkungskräfte und ihrer Wechselwirkungsenergien.^[42]

Parameter Wechselwirkung	Energie Wechselwirkung [kJ mol ⁻¹]
Kovalente oder chemische Bindung	200 – 800
Ionische Wechselwirkung	600 – 1000
Wechselwirkungen zwischen polaren Molekülen	< 40
Dispersionsenergie	~ 1
Wasserstoffbrückenbindungen	10 – 40
Hydrophobe/Hydrophile Wechselwirkungen	< 20

$$1 k_B T = 2.476 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ bei } 298 \text{ K.}$$

Darüber hinaus verstärken indirekte H-Brücken mit Wassermolekülen die Wechselwirkungen. Trotz der vielen verschiedenen intermolekulare Kräfte die an der Komplexbildung beteiligt sind, ist die Bindung zwischen einem Kohlenhydratliganden und einer Bindungstasche eines Proteinrezeptors mit Gleichgewichtskonstanten im millimolaren und höheren mikromolaren Bereich ($10^3 - 10^6 \text{ M}^{-1}$) relativ schwach.^[43] Im Vergleich dazu liegen beispielsweise die Gleichgewichtskonstanten der Wechselwirkungen zwischen Antigenen und Antikörpern im mikro- und pikomolaren Bereich ($10^8 - 10^{12} \text{ M}^{-1}$).^[41, 43-45] Die Bildung des Kohlenhydrat-Ligand Protein-Rezeptor-Komplexes wird im Folgenden am Beispiel des Lektins Concanavalin A (ConA) mit den Monosacchariden α -D-Mannopyranosid (Man) und α -D-Glucopyranosid (Glc) näher beschrieben.

ConA, das in der Jackbohne (*Canavalia ensiformis*) vorkommt, war das erste Lektin, das einschließlich Primärsequenz und 3D-Struktur vollständig charakterisiert und kommerziell zugänglich war.^[46-49] Infolgedessen wird es häufig in der biologischen, chemischen und biochemischen Forschung als Modelllektin zur Aufklärung der Struktur-Eigenschafts-Korrelation (Structure Property Correlation, SPC) verwendet.^[50-51] Es bindet sowohl an Man- als auch an Glc-Liganden, wobei die Affinität für Glc viermal geringer ist.^[52-53] Die Bindungskonstante (kBT; 1 kBT= 2,476 kJ/mol bei 298,15 K) von ConA an Man beträgt 7,5 kBT, nur ein Bruchteil der ermittelten Bindungskonstanten kovalenter Bindungen im Bereich von 100-800 kBT.

In Abbildung 2 ist der Einfluss der Metallionen Ca^{2+} und Mn^{2+} schematisch dargestellt. Sie befinden sich in der Kohlenhydraterkennenden Domäne (Carbohydrate Recognition Domain, CRD) und sind nicht direkt an der Ligandenbindung beteiligt, optimieren jedoch die Positionierung der Aminosäuren in den Bindungstaschen für die Ligandenbindung.^[54-56]

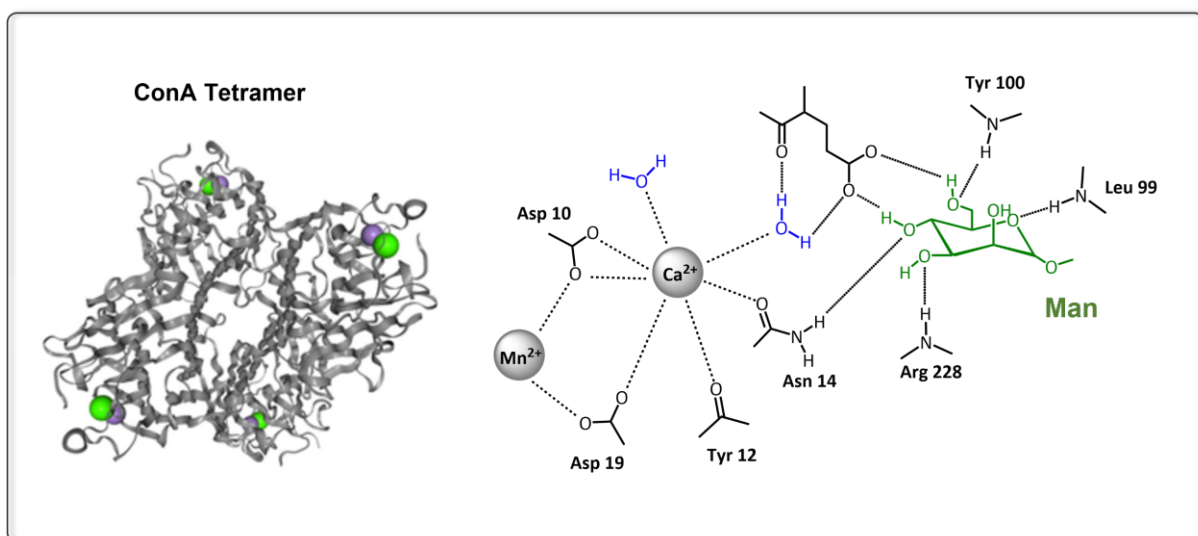


Abbildung 2: Wechselwirkungen zwischen Methyl-Mannose und Aminosäuren, die auf den Oberflächen von Lektinen gefunden werden.^[57]

Aufgrund der hohen Anzahl von Hydroxylgruppen in Kohlenhydraten ist der Beitrag hydrophober Wechselwirkungen zur Bindungsverstärkung auf den ersten Blick nicht offensichtlich. Die α - oder β -Seite des Kohlenhydrats, die aufgrund von CH-Bindungen hydrophob ist, interagiert jedoch zusätzlich bindungsverstärkend mit hydrophoben Aminosäureresten.^[58-60]

Ein Schlüsselprinzip der Natur, um dennoch starke, aber gleichzeitig reversible Wechselwirkungen in Adhäsionsprozessen zu erreichen, ist die Multivalenz. Multivalente Wechselwirkungen ermöglichen im Vergleich zu den beschriebenen schwachen monovalenten Wechselwirkungen multiple und damit verstärkte Wechselwirkungen auf molekularer Ebene, analog zum Funktionsprinzip von Klettverschlüssen. Grundsätzlich beschreibt das Prinzip die gleichzeitige Bindung eines multivalenten Kohlenhydratliganden an mehrere Bindungstaschen eines Rezeptors, aber auch an mehrere Rezeptormoleküle.^[61-63] ConA als Beispiel, liegt je nach pH-Wert in saurem Medium ($\text{pH} < 6$) als Dimer und in neutralem Medium ($\text{pH} 6-7$) als Tetramer vor und weist somit zwei bzw. vier Bindungstaschen auf.^[64] Die mehrfache Präsentation von Bindungspartnern und die daraus resultierende Erhöhung der Bindungsaffinität aufgrund von Multivalenzeffekten wird als Avidität bezeichnet.^[62, 65] Verschiedene Studien beschreiben eine Steigerung der Bindungsaktivität von divalenten im Vergleich zu monovalenten Liganden um bis zu fünf Größenordnungen.^[61-62, 66-68]

In der Natur findet die Glykanerkennung durch CRDs von Lektinen an der Grenzfläche von zwei Oberflächen statt, die mehrere Kopien von Liganden und Rezeptoren aufweisen. Die daraus resultierende Vervielfachung der Bindungsstärke wird im folgenden Unterkapitel anhand von Adhäsionsprozessen an biologischen Grenzflächen näher erläutert.

1.3 Molekularer Klettverschluss an biologischen Grenzflächen

Multivalente Wechselwirkungen an biologischen Grenzflächen spielen eine entscheidende Rolle bei Erkennungs- und Adhäsionsprozessen. Während der Erkennungsprozess im Wesentlichen auf der hohen Spezifität von Lektinen bei der Identifizierung spezifischer Kohlenhydratsequenzen beruht, resultiert die Verstärkung der Adhäsion aus der Präsentation mehrerer Kopien von Liganden und Rezeptoren auf biologischen Oberflächen.^[62] Wechselwirkungen zwischen Liganden und Rezeptoren, die eine hohe Anzahl ($n \gg 10$) von zweidimensional verteilten Bindungsstellen aufweisen, werden auch als polyvalente Wechselwirkungen bezeichnet.^[61]

In eukaryotischen Zellen sind Glykolipide und Glykoproteine an die Plasmamembran gebunden, während in der extrazellulären Umgebung neben Glykoproteinen auch Glukose-Aminoglykane und Mucine dominieren.^[69-71] Die hochgradig individuelle Struktur der Glykane wird durch die gezielte räumliche Anordnung in sogenannten Glykanclustern noch gesteigert. So wird die Adhäsion an Zelloberflächen nicht nur durch die strukturelle Vielfalt der Glykane, sondern auch durch ihre Anzahl und die daraus erreichbare Avidität maßgeblich beeinflusst.^[44, 72-74] In diesem Zusammenhang ist es sinnvoll, die Plasmamembran als ein dynamisches, fluides System zu verstehen, auf dem sich diese funktionellen Glykocluster bilden und auch wieder auflösen können. In ähnlicher Weise können sich Lektincluster an der Zellmembran bilden und damit Andockstellen für die Glykane einer anderen Zelle oder eines Pathogens darstellen.^[75-76] Dabei erhöht die dynamische räumliche Verdichtung von Liganden und Rezeptoren die Wahrscheinlichkeit einer stabilen Oberflächenadhäsion, auch unter den in der Natur vorkommenden Bedingungen. Dort findet die Interaktion zwischen zwei Körperzellen oder mit Krankheitserregern im flüssigen Medium (Blut, Schleim, Urin) und entsprechend unter Einwirkung von Scherkräften statt.^[77-79] Dabei ragen stark glykosylierte Konjugate aus der Plasmamembran heraus und initiieren den Erstkontakt.^[9, 80-82] Diese Komplexe lassen sich aufgrund der vereinzelter, und dadurch wie bereits beschrieben schwachen Wechselwirkungen, relativ leicht auflösen. Laterale Bewegungen auf biologischen Oberflächen, führen zu Assoziation und Dissoziation der schwachen Bindungen, aber durch multivalente Wechselwirkungen kommt es insgesamt zu einer stabilen Adhäsion.^[83-85]

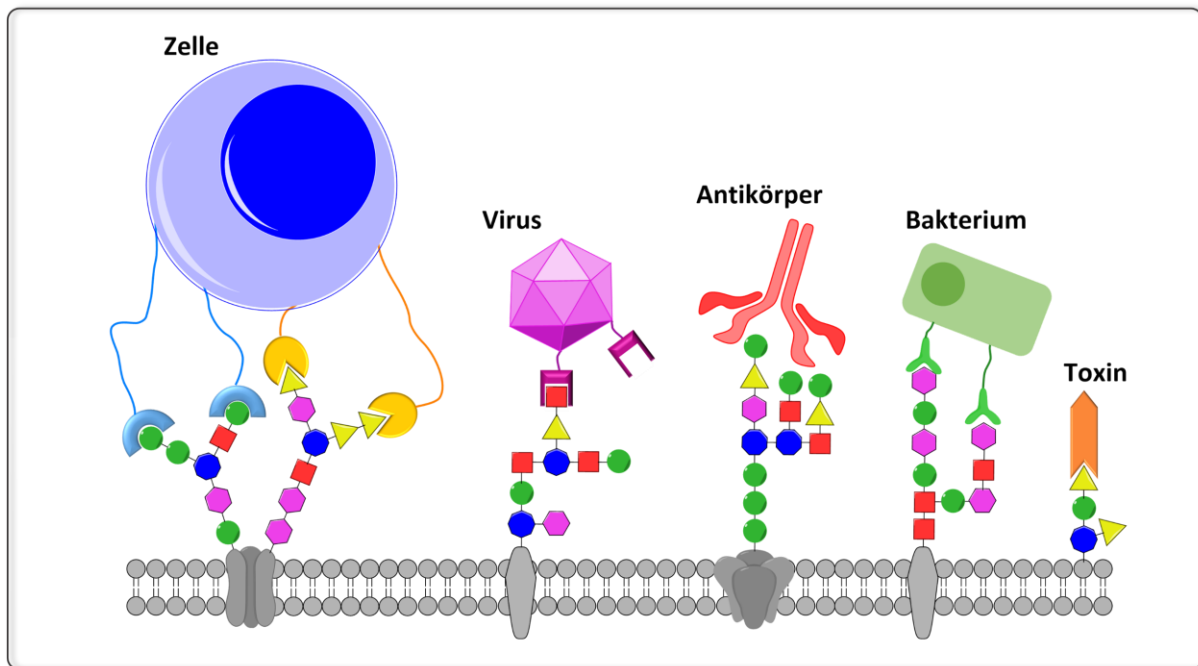


Abbildung 3: Interaktion zwischen Zellen, Pathogenen und Antikörpern durch multivalente Ligand-Rezeptor Wechselwirkungen, in Anlehnung an ^[62].

Ein Beispiel für multivalente Wechselwirkungen an biologischen Grenzflächen ist die Adhäsion von Bakterien an Körperzellen, die im Folgenden näher erläutert werden sollen. Für die bakterielle Adhäsion sind sowohl spezifische als auch unspezifische Wechselwirkungen erforderlich.^[86] Beispielsweise finden bei einem Kontakt mit Salmonellen unspezifische Wechselwirkungen durch negativ geladene Sialinsäureepitope auf der Oberfläche der Wirtszellen statt.^[87] Spezifische Wechselwirkungen erfolgen durch eine Vielzahl verschiedener bakterieller Fimbrien, die eine erste Anhaftung des Bakteriums ermöglichen. Einzelne Fimbrien erkennen und binden an Glykane der Glykokalyx und verstärken so die Adhäsion.^[88-89] Im Zusammenhang mit Salmonelleninfektionen sind Fimbrien vom Typ 1 vergleichsweise gut untersucht. Sie bestehen aus der Hauptkomponente FimA und der Nebenkompone FimH. Die sich an der Spitze befindenden FimH-Proteine erkennen Man-Liganden in den Oligosacchariden der Glykokalyx und leiten die Adhäsion ein, die anschließend durch multivalente Interaktionen stabilisiert werden kann.^[87, 90-91] Fimbrien vom Typ 1 werden auch von anderen bekannten gramnegativen Bakterien wie *Escheria Coli* (*E. Coli*) und *Klebsiella Pneumoniae* produziert.^[92] Am Beispiel von *E. Coli* konnte, wie bei Salmonellen, eine hohe Affinität der FimH-Proteine für Mannoseeinheiten enthaltende Oligosaccharide festgestellt werden.^[93-94]

Ein weiteres Beispiel für multivalente Wechselwirkungen an biologischen Grenzflächen ist die Adhäsion von Viren an Zelloberflächen. So kann die Bindung des Herpes-Simplex-Virus an das Glykosaminoglykan Heparinsulfat oder die Wechselwirkungen des Influenza-A-Virus mit Sialinsäuren in der Glykokalyx beschrieben werden.^[95-97] Die Adhäsion des trimeren Hämagglutinins des Influenzavirus wird durch Wechselwirkungen mit N-Acetylneuraminsäure Liganden der Wirtszelle initiiert. Kollektive Wechselwirkungen mehrerer Sialinsäuremoleküle auf der Wirtszelle mit Hämagglutinin-Molekülen ermöglichen eine stabile Adhäsion des Virus und die Endozytose in das Zellinnere. Die Spezifität wurde in Studien mit einwertiger Sialinsäure nachgewiesen, aufgrund der schwachen Wechselwirkungen waren jedoch für eine biologisch relevante Bindungsaffinität Konzentrationen im millimolaren Bereich erforderlich. Whitesides *et al.* gelang es, die Wechselwirkungen zwischen Hämagglutinin und N-Acetylneuraminsäure zu hemmen, indem sie mehrere Kopien der Sialinsäure-Liganden auf einem Polyacrylamid aufbrachten und dadurch die lokale Ligandendichte deutlich erhöhten. Durch die multivalente Präsentation von Sialinsäureliganden am Polymergerüst konnte die Adhäsion des Virus durch eine geringere Ligandenkonzentration gehemmt werden.^[62, 98-99] Die Untersuchungen multivalenter Bindungseffekte hat zur Identifikation der in Abbildung 4 dargestellten Bindungsmodi geführt. Dabei beschreibt der Chelat-Effekt die Bindung eines zusätzlichen Liganden am selben Polymergerüst an eine weitere Bindungstasche des Lektins.

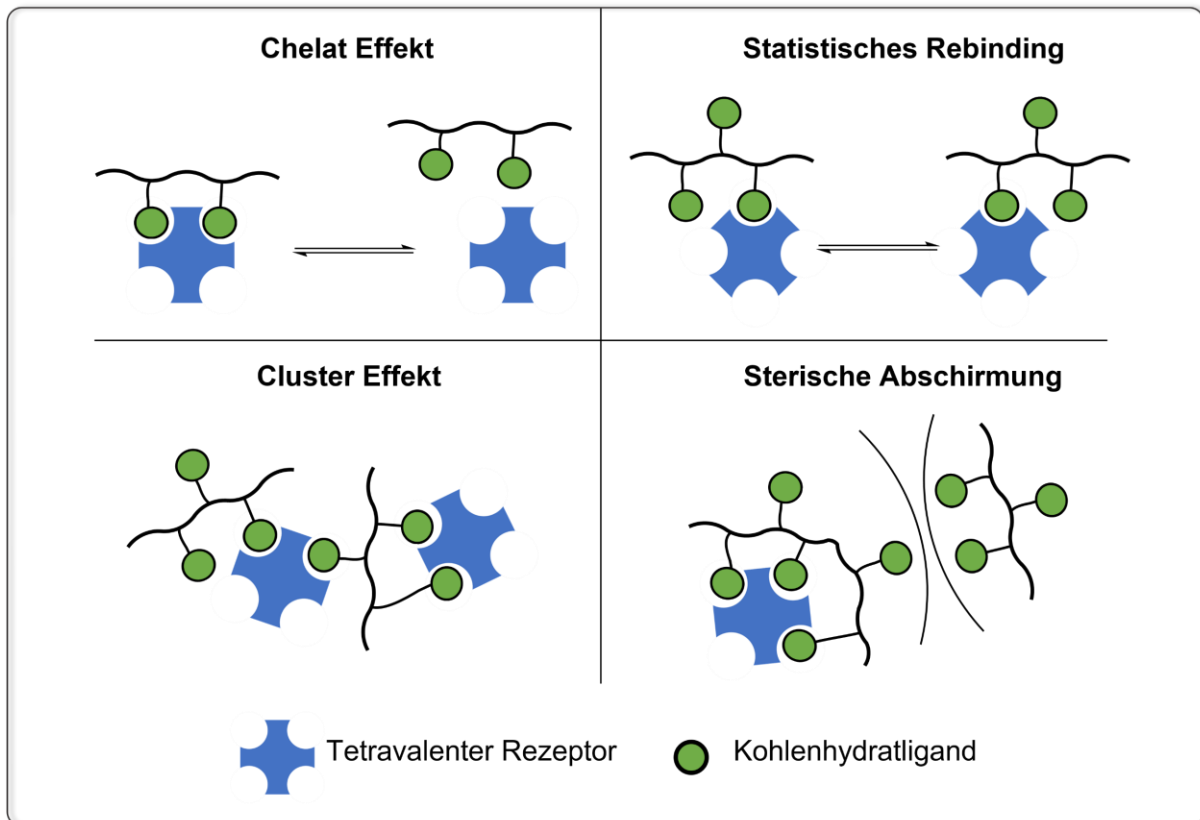


Abbildung 4: Schematische Darstellung von identifizierten multivalenten Ligand-Rezeptor Komplexbildungsmöglichkeiten, in Anlehnung an^[100].

Auf Basis dieser Ergebnisse hat sich das Verständnis von multivalenten Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkungen zu einem wichtigen Schwerpunkt in verschiedenen Forschungsbereichen entwickelt. Die Fortschritte auf diesem Gebiet bilden die Grundlage für die Entwicklung effizienterer Mittel zur Hemmung der Adhäsion von Krankheitserregern.^[101-103] Das Potenzial synthetischer Kohlenhydrate und der aus ihnen hergestellten Mimetika von Glykokalyxstrukturen soll in den folgenden Kapiteln näher erläutert werden.

1.4 Synthetische Glykomakromoleküle für die Untersuchung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen

Trotz der Bedeutung natürlicher Kohlenhydrate und ihrer Rezeptoren in der Biologie stellt die Ableitung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen (*structure-activity relationship*, SAR) aus biologischen Studien weiterhin eine große Herausforderung dar.^[104-106] Wie in Kapitel 1.1 beschrieben, liegt dies zum einen an der hochkomplexen, da sehr heterogenen Natur solcher Wechselwirkungen, und zum anderen an der sehr heterogenen und komplexen Struktur

natürlicher multivalenter Kohlenhydratliganden.^[101, 107] Daraus resultierend wurde die Entwicklung und Synthese künstlicher Modellsysteme angestrebt, um mechanistische Prozesse auf molekularer Ebene aufzuklären.^[84, 108-109] Auf Zelloberflächen erfolgt die Bindung dieser komplexeren Kohlenhydratstrukturen an Lektine hauptsächlich zwischen dem terminalen Kohlenhydratliganden und den CRDs multimerer oder geclusterter Lektine.^[110-111] Durch weitere Untersuchungen konnte weiterhin eine passive Beteiligung des Oligosaccharid-Rückgrats am Bindungsprozess postuliert werden.

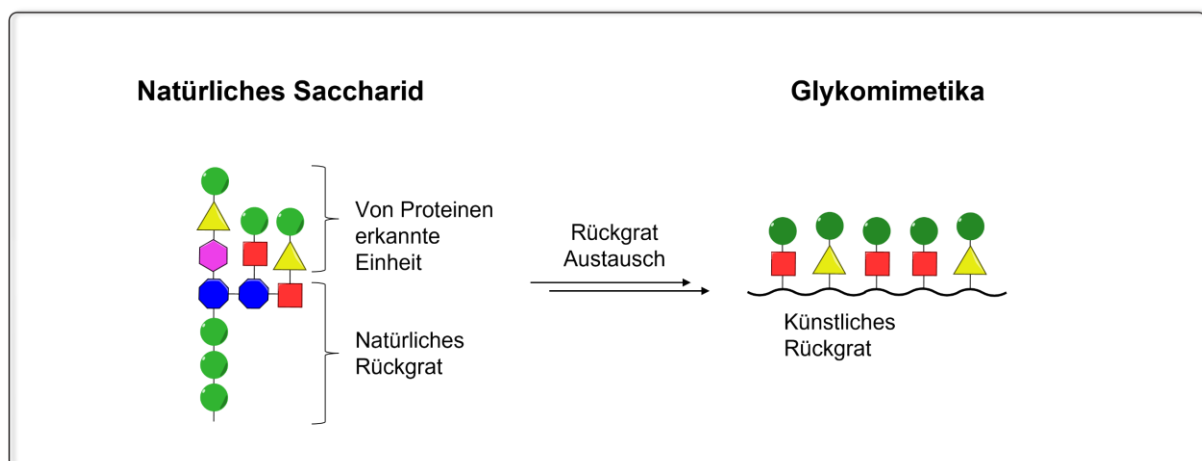


Abbildung 5: Schematische Darstellung von natürlichen Saccharidstrukturen und Glykomimetika mit multivalenter Präsentation der CRD auf einem Polymergerüst.

In verschiedenen Studien konnten Glykomimetika erfolgreich als Modellsubstanzen für die Untersuchung multivalenter Effekte eingesetzt werden.^[61, 112-113] So konnte beispielsweise eine starke Abhängigkeit der Bindungsaffinität und Selektivität von der Zuckerligandenpräsentation auf dem Polymerrückgrat gezeigt werden. Mit modernen Synthesemethoden können vielfältige Strukturen aufgebaut werden.

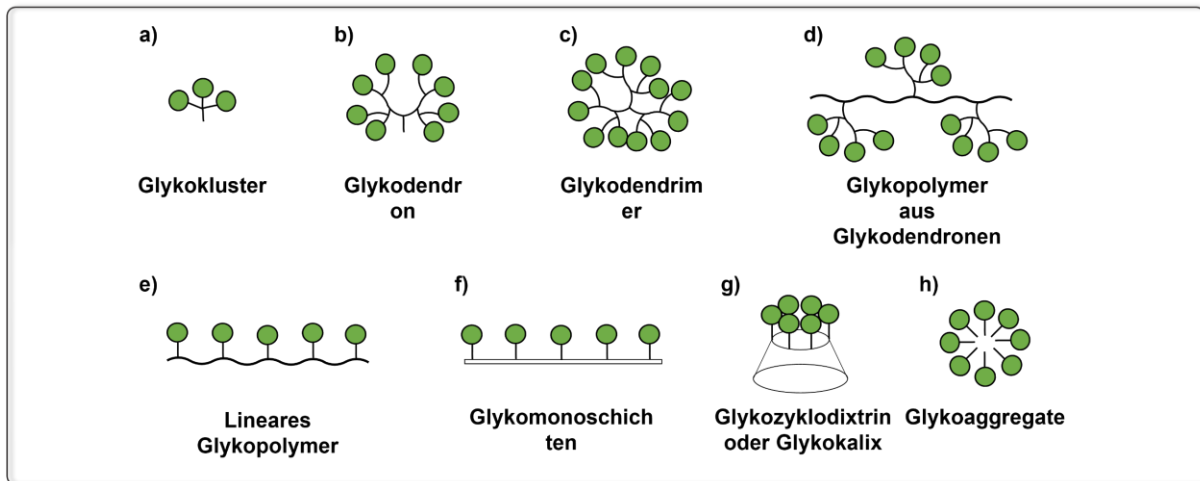


Abbildung 6: Schematische Darstellung unterschiedlicher Glykomimetika mit variierender Gerüststruktur, in Anlehnung an^[114].

Weiterhin konnte der Einfluss struktureller Eigenschaften, wie der Ligandendichte, der Ligandenvalenz, dem Interligandenabstand oder auch der Präsentation verschiedener Zuckerliganden (Heterovalenz) auf die Bindungsaffinität gemessen werden.^[44, 62, 74, 107]

Aufgrund der beschriebenen Einschränkungen bei der Vorhersage von Bindungsaffinitäten ist es mit klassischen Synthesemethoden der Polymerchemie schwierig, eine Reihe der Strukturmotiven mit vertretbarem Aufwand zu variieren und dabei die notwendige Kontrolle über die Dispersität und Sequenz beizubehalten.^[115]

Ein kürzlich entwickelter Ansatz zur Überwindung dieser synthetischen Beschränkung ist die auf der Festphasensynthese basierende Herstellung von Glykooligomeren zur Untersuchung von Multivalenzeffekten.^[116] Die zugrundeliegende Methode der SPPoS (Solid Phase Polymer Synthesis) wird im folgenden Kapitel näher erläutert.

1.5 Monodisperse und sequenzdefinierte Glykomimetika mittels SPPoS

Die Festphasensynthese wird heute in zahlreichen Forschungsbereichen eingesetzt und basiert auf der Pionierarbeit von R.B. Merrifield. Ursprünglich für die Synthese von Peptiden gedacht, wird sie heute z. B. auch für die Synthese von Oligonukleotiden, Oligosacchariden, Glykopeptiden sowie für die Synthese biomimetischer Gerüste eingesetzt.^[117-120] Der Hauptvorteil der Festphasensynthese gegenüber dem schrittweisen Aufbau einer Monomersequenz in Lösung ist die vereinfachte Reinigung nach jedem Kupplungsschritt. Im Gegensatz zu der für die Synthese in Lösung erforderlichen Aufreinigungsschritte und Isolierung werden die Reaktanden durch Filtration entfernt, und das Produkt wird erst nach vollständiger Synthese des Oligomers zur Isolation vom festen Trägermaterial abgespalten.^[121-122] Die im Rahmen dieser Arbeit verfolgte Synthesestrategie ist eine auf die klassische Festphasensynthese basierende und kürzlich veröffentlichte Festphasenpolymersynthese (SPPoS) von Hartmann et. al. Bei diesem Ansatz kann durch die schrittweise Kupplung von Monomerbausteinen die vollständige Kontrolle über die Monomersequenz und Dispersität der Strukturen erzielt werden.^[116] Mit Hilfe der SPPoS lassen sich zahlreiche verschiedene Strukturen mit unterschieden in Ligandenanzahl, -abstand, Architektur und weiteren Parametern systematisch und zügig variieren.

Während bei der klassischen Festphasensynthese verschiedene Aminosäuren repetitiv und kovalent gekuppelt werden um die Sequenz aufzubauen, werden bei der SPPoS maßgeschneiderte Monomerbausteine, die Monomeren aus der klassischen Polymerchemie ähnlich sind, verwendet.^[116, 123-125] Das weitere Vorgehen unterscheidet sich nicht wesentlich. So werden bei beiden Ansätzen Schutzgruppen verwendet, die jeweils nach erfolgreicher Kupplung abgespalten werden, um die funktionelle Gruppe für den nächsten Schritt wieder zugänglich zu machen. Das Prinzip der SPPoS ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

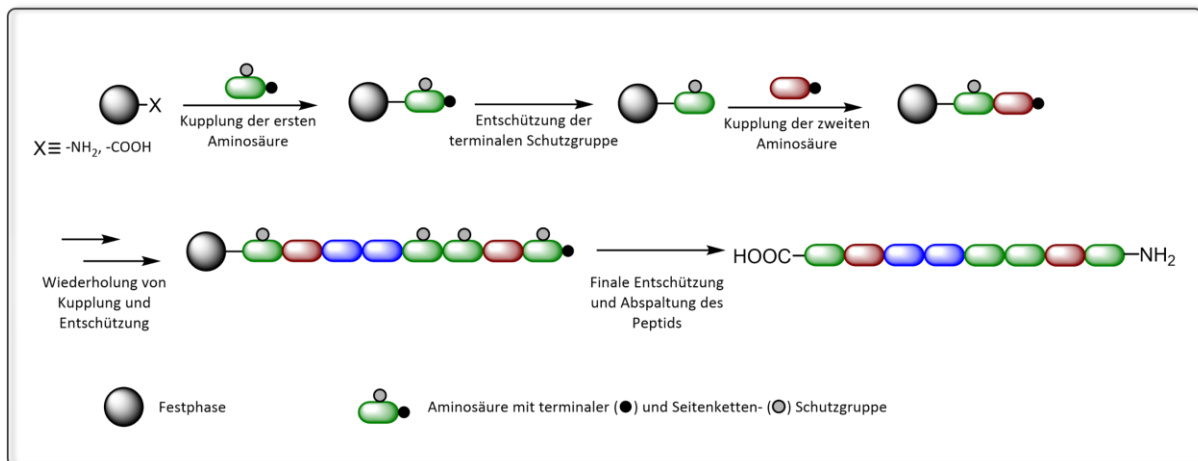


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Solid Phase Polymer Synthesis (SPPoS).^[116]

Die chemisch definierte Struktur sowie die Sequenzkontrolle entlang des Polymergerüsts dieser Präzisionsmakromoleküle erlauben direkte Informationen über die Struktur-Eigenschafts-Beziehungen. Dadurch konnten Rückschlüsse auf ihre multivalenten Bindungsmodi, wie sie für eine erste Serie von Ponader et al. veröffentlicht wurden, geschlossen werden.^[116]

Nachdem das Potential von hochpräzisen Glykomimetika zur Erforschung von biologischen Ligand-Rezeptor Wechselwirkungen beschrieben wurde, sollen in den folgenden Kapiteln ausgewählte analytische Methoden zur Quantifizierung der Wechselwirkungen näher erläutert werden.

1.6 Methoden zur Untersuchung von Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen

Ein wichtiges Anwendungsbeispiel für Glykopolymere ist wie in Kapitel 1.3 beschrieben deren Einsatz zur Erforschung von Wechselwirkungen in der Biochemie, Biomedizin oder Biotechnologie.^[126-127]

Neben den Weiterentwicklungen in Bezug auf Synthesemethoden zur Herstellung von Glykomimetika werden in der jüngeren Vergangenheit auch große Anstrengungen unternommen neben der Glykopolymerforschung den darauf aufbauenden Schritt, die Wechselwirkungen zwischen Liganden und Rezeptoren quantitativ zu untersuchen. Dazu gehört sowohl die Entwicklung neuartiger Analysemethoden, aber auch die Verbesserung bereits bekannter Techniken.^[115]

Das tiefere Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen bildet die Grundlage für die Entwicklung von Glykopolymeren für neuartige Therapien, wie z. B. antibakterielle oder antivirale Wirkstoffe.^[128-129] Zur Quantifizierung der Bindungsavidität von hochpotenten Glykopolymeren für weitere in vitro- und in vivo-Studien bietet sich der Einsatz mehrerer analytischer Methoden an, um kombinierte Aussagen über das Bindungsverhalten zu postulieren.^[130]

Der Grund dafür ist die Schwierigkeit, aus den Ergebnissen einzelner Analysemethoden direkte Aussagen über die Avidität von Glykopolymeren zu treffen, da die ermittelten Absolutwerte durch diverse Parameter stark beeinflusst werden können.^[115] So können unterschiedliche Werte erhalten werden, je nachdem, ob Lektin und Rezeptor beide gelöst sind, beide an feste Phasen oder Grenzflächen gebunden sind, oder einer der beiden Bindungspartner gelöst ist, während der andere an eine feste Phase gebunden ist. Im besten Fall bildet der verwendete Assay die potenzielle Anwendung des Glykopolymers, z. B. als Inhibitor der viralen Adhäsion, die künftige Anwendung so genau wie möglich nach. In der Vergangenheit wurden verschiedene Analysemethoden entwickelt, von denen ausgewählte Methoden für das weitergehende Verständnis dieser Arbeit detaillierter vorgestellt werden.

1.6.1 Ligand und Rezeptor in Lösung: Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

Ein Ansatz zur Untersuchung der Bindungsaffinitäten besteht darin, dass sowohl Ligand als auch Rezeptor in Lösung vorliegen. Beispiele hierfür sind die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS), die *saturation-transfer difference nuclear magnetic resonance* (STD-NMR), trübungsphotometrische Assays sowie die Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC).^[131] Als eine vielversprechende Analysemethode hat sich die ITC erwiesen. Bei dieser Analysemethode können neben quantitativen Werten thermodynamischer Parameter (ΔG , ΔH , ΔS und K_A), auch Rückschlüsse über die Bindungsstöchiometrie der Ligand-Rezeptor Wechselwirkungen gezogen werden.^[132-135] Da jeder Prozess auf molekularer Ebene zu einem thermischen Energieaustausch mit seiner Umgebung führt, wirken bei dieser Analysemethode verschiedene Faktoren zusammen.^[136-137] Die Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen liefern neben Informationen über die Assoziation und Dissoziation von reversiblen inter- und intramolekularen Bindungen, auch Rückschlüsse auf sekundäre Wechselwirkungen, die beispielsweise aus hydrophoben Effekten

resultieren. Die quantifizierte Wärmeänderung ist also das Ergebnis vielfältiger Vorgänge.^[136, 138-139]

Der Versuchsaufbau der ITC ist im Wesentlichen durch zwei identische Messzellen gekennzeichnet, von denen eine als Referenzzelle dient und mit dem verwendeten Messmedium gefüllt ist, während in der zweiten Zelle das Protein-Rezeptor in dem Medium gelöst vorliegt. Der Kohlenhydrat-Ligand ist in einem gesonderten Gefäß ebenfalls im Messmedium gelöst und wird während der Messung in die Messzelle titriert. Während der Messung wird die Lösung ständig gerührt um lokale Wärmeeffekte und damit Fehlinterpretationen der erhaltenen Ergebnisse zu vermeiden.^[140-141]

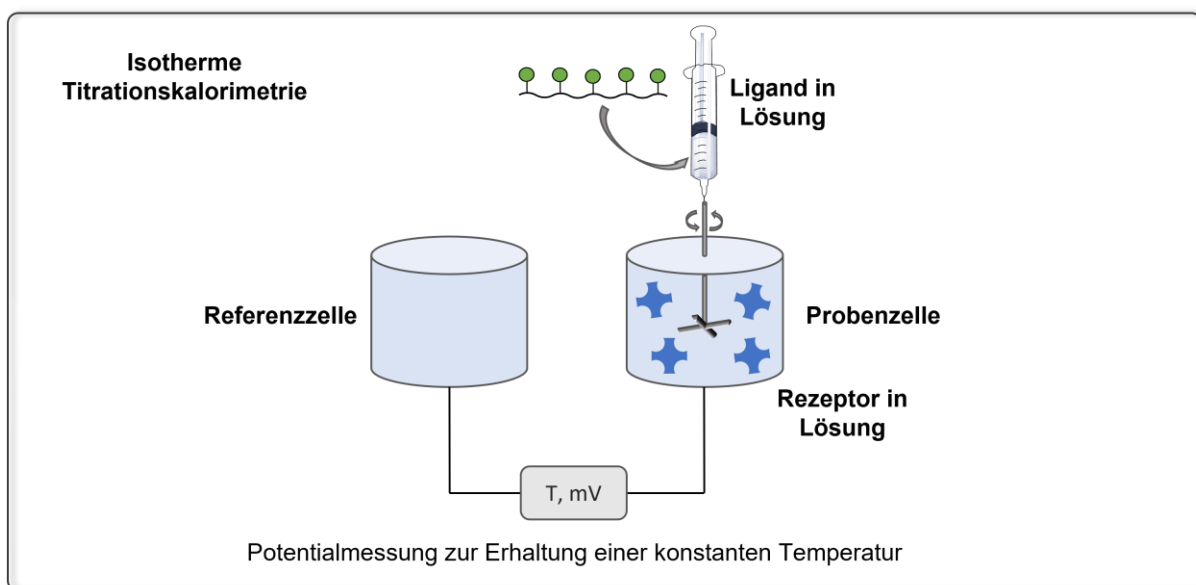


Abbildung 8: Schematischer Aufbau ITC Methode zur Analyse von Ligand-Rezeptor Wechselwirkungen in Lösung.

Der aus den Wechselwirkungen zwischen Ligand und Rezeptor resultierende Wärmeeffekt wird durch die Temperaturdifferenz (ΔT) zwischen der Referenzzelle und der Messzelle quantifiziert.^[142-143] Der Temperatursausgleich zwischen den beiden Zellen wird von einem Regler mit einer dazu proportionalen elektrischen Energie gewährleistet. Aus der Rückkopplung wird das beobachtete Primärsignal in Form eines zeitaufgelösten thermischen Impulses generiert. Die benötigte Energie kann zeitaufgelöst quantifiziert werden und ist direkt mit der Menge des der Messzelle zugeführten Liganden korreliert. Anschließend kann durch Auftragen der resultierenden Energiewerte gegen das molare Verhältnis von Ligand und Rezeptor eine charakteristische Titrationskurve in sigmoidaler Form erstellt werden. Diese

Kurve ermöglicht die Bestimmung der Enthalpie (ΔH), der Stöchiometrie (n) und der Affinitätskonstante (K_A). Andere thermodynamische Parameter können mit den experimentell ermittelten Werten unter Verwendung der Gibbs-Helmholtz-Gleichung und der van't Hoff-Gleichung berechnet werden.^[142, 144-145]

1.6.2 An der Grenzfläche in Lösung und gebunden: Der SPR-Assay

Neben dem Ansatz, beide Komponenten frei in Lösung diffundieren zu lassen, wurden auch Techniken entwickelt, bei denen sich eine Komponente, der Ligand oder Rezeptor, frei bewegt, während der Gegenspieler an einer Oberfläche gebunden ist. Bekannte und etablierte Methoden, die auf diesem Ansatz beruhen, sind zum Beispiel die Quarzkristall-Mikrowaage (Quartz Crystal Microbalance, QCM), der Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), die Oberflächenplasmonenresonanz Spektroskopie (Surface Plasmon Resonance, SPR) oder die Fluoreszenzmikroskopie.^[146-150] Im Folgenden wird die bei dieser Arbeit verwendete SPR-Analysetechnik näher erläutert.

Die SPR-Analytik ist eine spektroskopische Methode, bei der die Resonanzschwingung von evaneszenten Wellen des eintreffenden Lichts und Plasmonenwellen auf der Metalloberfläche eines Sensorchips gemessen wird. Dadurch kann die Adsorption eines Liganden an den auf der Chipoberfläche immobilisierten Rezeptor quantifiziert werden.^[151-152] Eine der verwendeten Varianten ist die Kretschmann-Konfiguration als Nachweisverfahren. Dabei wird ein Laserstrahl, der ein Prisma durchläuft, auf die Metalloberfläche auf der Rückseite des Sensorchips gerichtet, wodurch eine Reflexion zum Laserdetektor erfolgt. Bei einem bestimmten Einfallswinkel wird das Licht von den Elektronen auf den Metalloberflächen absorbiert, was zu einer sensitiven und gut quantifizierbaren Oberflächenplasmonenresonanz führt.^[72, 153-154] Inzwischen sind verschiedene Vorgehensweisen zur Durchführung des SPR-Assays verbreitet. Eine Auswahl ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

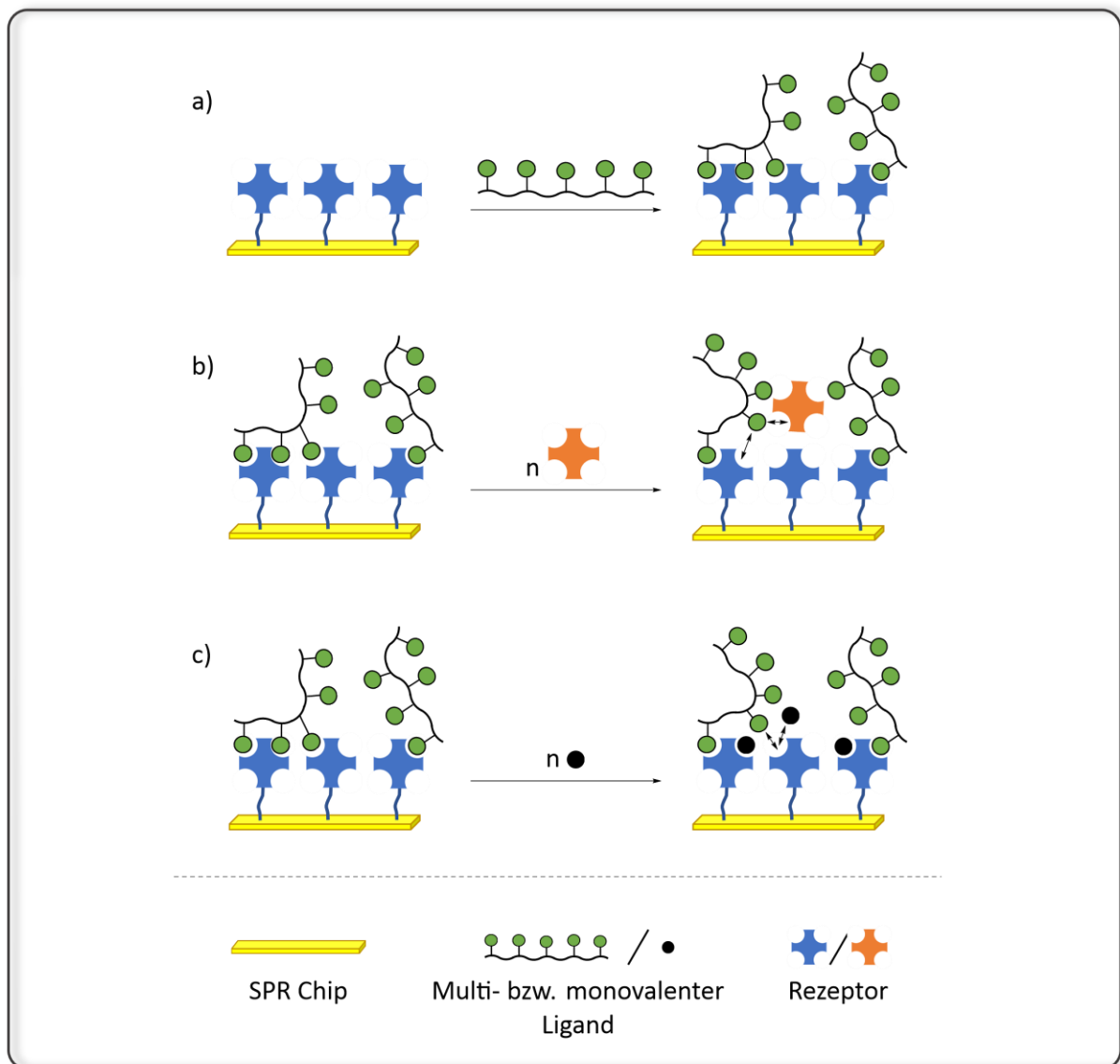


Abbildung 9: Schematische Darstellung der SPR-Assayoptionen. a) Direkte Bindung: Rezeptor immobilisiert, Ligand wird injiziert. b) Inhibitionsassay: Rezeptor immobilisiert und Liganden sind daran gebunden, anschließende Inhibition durch konkurrierende Rezeptoren. c) Rezeptor immobilisiert und Ligand gebunden, anschließende Inhibition durch konkurrierende Liganden.

Der SPR-Assay ermöglicht kinetische Messungen in real-time, kann markierungsfrei und wird nichtinvasiv durchgeführt.^[155] So konnten beispielsweise durch die Ermittlung von IC_{50} -Werten für verschiedene Bindungspaare wertvolle Rückschlüsse gezogen werden. Der Wert beschreibt die benötigte Konzentration eines Inhibitors, um ein Target in vitro zu 50% zu blockieren.^[156-162] Durch diese Entwicklungen hat sich der SPR-Assay als eine hilfreiche Methode in der Biologie, Pharmazie und Biochemie erwiesen und wird im Ergebnisteil dieser Arbeit näher beschrieben.

1.6.3 An biomimetischen Oberflächen: SCP-RICM

Neben den in den vorangegangenen Kapiteln beschriebenen Analysemethoden zur Untersuchung von Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen in denen beide Komponenten gelöst (Kapitel 1.6.1), eine Komponente gelöst und eine an eine Oberfläche gebunden (Kapitel 1.6.2), ist es technisch auch möglich, beide Komponenten an Oberflächen zu binden und ihre Affinitäten zueinander an der Grenzfläche zu messen. Ein Beispiel dafür ist die Rasterkraftmikroskopie (Atomic Force Microscopy, AFM) für Zelladhäsionsstudien.^[163-164] Eine weitere Möglichkeit bietet die vor einiger Zeit entwickelte SCP-RICM Methode (Soft Colloidal Probe – Reflection Interference Contrast Microscopy), bei der die Adhäsion an biomimetischen Grenzflächen gemessen wird.^[165] Der Vorteil dieser beiden Analysemethoden ist die Möglichkeit der Quantifizierung von Wechselwirkungen zwischen Ligand und Rezeptor an biomimetischen Oberflächen und somit sehr ähnlich zu den in der Natur gegebenen Bedingungen. Analog zu den weiteren beschriebenen Analysemethoden ist es auch mit der SCP-RICM Methode möglich, aus verschiedenen Möglichkeiten für die Durchführung der Bindungsstudien auszuwählen, was jeweils auch in dieser Arbeit gemacht wurde.

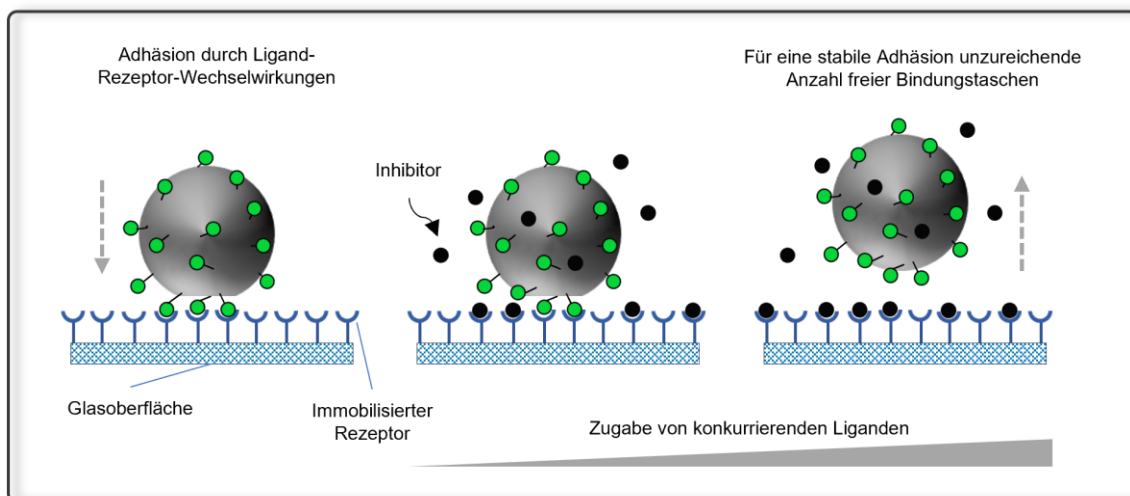


Abbildung 10: Schematische Darstellung verschiedener Ausführungsprinzipien der SCP-RICM Analysemethode.

Bei der SCP-RICM Methode wird der Ligand kovalent an einer weichen Oberfläche, dem SCP, gebunden. Im Adhäsions-Assay verformt sich der Mikropartikel durch Wechselwirkung der Liganden mit auf einer Glasoberfläche immobilisierten Rezeptormoleküle. Das Funktionsprinzip ist in der folgenden Abbildung dargestellt:

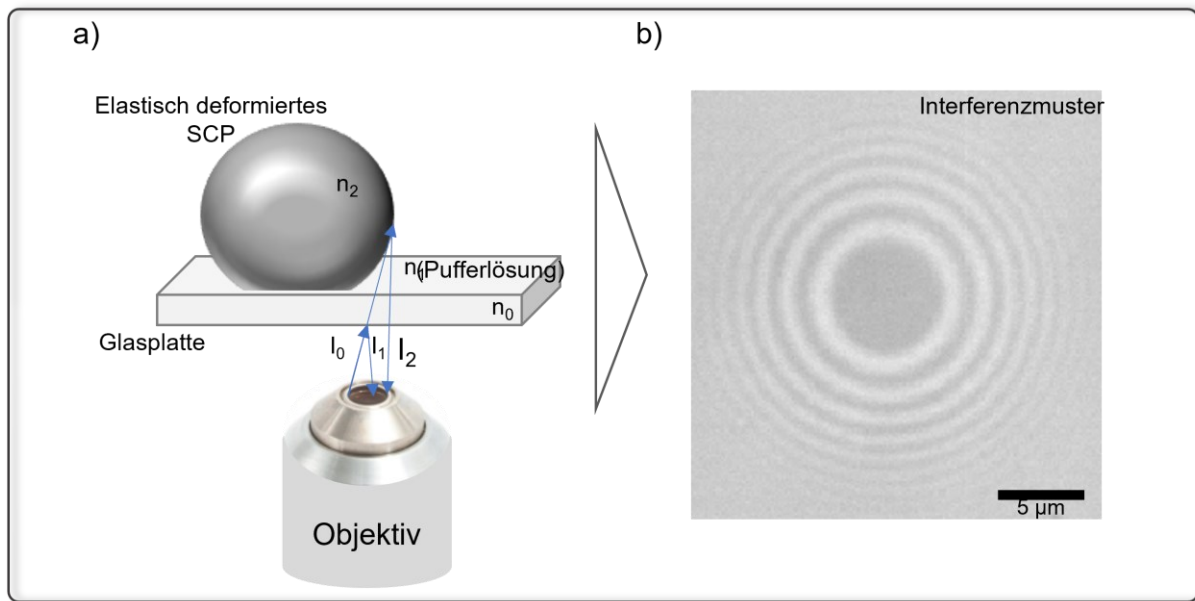


Abbildung 11: Prinzip der SCP-RICM Methode und ein exemplarisches Interferenzmuster in Anlehnung an Pussak et al.^[165]

Die Visualisierung des Interferenzmusters wird technisch ermöglicht durch den folgenden Aufbau. Der Lichtstrahl einer Halogenlampe als Lichtquelle passiert im ersten Schritt einen monochromatischen Filter. Anschließend wird der Lichtstrahl durch zwei verstellbare Blenden und einem linearen Polarisationsfilter geleitet. Nach einem semi-reflektierenden Spiegel trifft der Lichtstrahl auf ein Objektiv, wodurch er in einen zirkular polarisierten Lichtstrahl umgewandelt wird. Dieser trifft auf die Glasoberfläche mit dem SCP, wodurch das Licht reflektiert wird. Ein Teil des einfallenden Lichtstrahls (I_0) wird von der Grenzfläche zwischen Glasobjektträger und der Pufferlösung reflektiert (I_1), ein zweiter Teil wird an der Grenzfläche zwischen SCP und Puffer (I_2) reflektiert. Der Lichtstrahl durchläuft erneut das Objektiv und wird nun linear polarisiert. Aufgrund der unterschiedlichen Lichtintensität an verschiedenen Positionen bilden sich Newton-Ringe als Interferenzmuster, welches mit einer nachgeschalteten Kamera aufgenommen werden kann.^[166-169] Die mathematische Herleitung ist im experimentellen Teil der Arbeit aufgeführt (Kapitel 5).

Der kleinste Ring entsteht durch den Kontakt des SCPs mit der Glasoberfläche. Der im Zentrum gelegene dunkle Kreis stellt also die Kontaktfläche mit quantifizierbarem Kontaktradius der beiden Objekte dar. Der Kontaktradius wird durch Verformung des SCP erhöht, je stärker Liganden und Rezeptoren an der Grenzfläche wechselwirken. Zur Berechnung der Adhäsionsenergie aus der mechanischen Verformung wurde das 1971 von Johnson, Kendall

und Roberts (JKR) entwickelte Modell für die Analyse verwendet.^[170] Es ermöglicht die Beschreibung großer Adhäsionsflächen von weichen Partikeln, wie sie in dieser Arbeit verwendet werden.

$$a^3 = 6\pi \frac{W}{E_{eff}} R^2 \quad \text{mit} \quad E_{eff} = \frac{4E}{3(1-\nu^2)} \quad (\text{Gleichung 1})$$

Dabei beschreibt a den Kontaktradius, W die Oberflächenenergie und E_{eff} das effektive Elastizitätsmodul des SCP. Die Poissonzahl ν ist ein Parameter aus der Mechanik und beschreibt, ob sich das Volumen einer Probe verändert, wenn sie in Längsrichtung auseinandergezogen wird. Für diese Arbeit wird der Wert für ν auf 0,5 gesetzt, also wird keine Verringerung des SCP-Volumens durch Verformung angenommen.^[165, 171] Das außerdem notwendige Elastizitätsmodul (E) des SCP wurde in dieser Arbeit mittels AFM ermittelt (Kapitel 3.1.3)

2 Motivation und Ziele

Lebende Zellen sind von der Glykokalyx umhüllt, die bei verschiedenen biologischen Vorgängen wie der Zellkommunikation oder bei Immunreaktionen eine wichtige Rolle spielt. Dabei konnten insbesondere multivalente Wechselwirkungen zwischen Glykokonjugaten und Lektinen als wichtiges Instrument der Natur für stark ausgeprägte Adhäsionen an Grenzflächen identifiziert werden. Die vorliegende Dissertation hat das Ziel, einen Beitrag zur weiteren Erforschung von Ligand-Rezeptor Wechselwirkungen an biologischen Grenzflächen zu leisten. Dabei soll eine ausschließlich auf synthetische Glykomimetika basierende Strategie verfolgt werden.

Als Glykomimetika sollen dazu mit der in Literatur bekannten SPPoS Methode monodisperse und sequenzdefinierte Glykooligomere hergestellt werden. Die Synthese soll aus speziellen Schutzgruppentragenden Bausteinen, die ähnlich zu Monomeren aus der Polymerchemie aufgebaut sind, erfolgen. Diese sollen mittels SPPoS in repetitiven Zyklen aus Schutzgruppenabspaltung und Bausteinkupplung aneinandergelagert werden, bis die gezielte Struktur aufgebaut ist. Anschließend sollen Mannose-Liganden mittels einer CuAAC-Reaktion an das synthetisch aufgebaute Gerüst gebunden werden. Das Bindungsverhalten Mannose tragender Strukturen mit dem kommerziell erhältlichen Lektin ConA ist gut erforscht und soll auch als Basis für diese Arbeit dienen. Das Ziel ist die systematische Variation zum Aufbau einer Reihe von Glykoliganden die sich in Glykovalenz, Ligandenabstand und Gerüstringe unterscheiden, um Rückschlüsse auf multivalente Bindungseffekte zu ermöglichen.

Bei der experimentell durchgeführten Analytik zur Ermittlung des Bindungspotentials der hergestellten Strukturen sollen verschiedene Assays angewendet werden. Sie unterscheiden sich im Wesentlichen im Versuchsaufbau, wobei: 1) Ligand und Rezeptor in Lösung (ITC); 2) gelöst und immobilisiert (SPR und Fluoreszenzmikroskopie); oder 3) beide Bindungspartner immobilisiert (SCP-RICM) vorliegen können. Die Motivation dafür ist, Unterschiede in den Wechselwirkungen, die aus der Methodenwahl resultieren, zu identifizieren. Insbesondere der kürzlich entwickelte SCP-RICM Assay eignet sich für eine gute Annäherung an den natürlichen Bindungsprozessen an der Glykokalyx. Zu diesem Zweck werden weiche kolloidale Sonden (SCPs) als synthetische Zellkörper verwendet. Die auf PEG basierenden SCPs

präsentieren nach der Funktionalisierung mit Crotonsäure Carboxylgruppen, wodurch eine Konjugation der Glykomimetika ermöglicht wird. Diese sollen durch die Wahl eines geeigneten Trägermaterials mit einer freien Amin-Funktionalität ausgestattet sein. Die glykokonjugierten SCPs bieten als weiche, verformbare Sonden eine Möglichkeit mit großem Potential sehr heterogene natürliche Prozesse isoliert und folglich mit reduzierter Komplexität nachzuahmen. Eine große Herausforderung dabei ist die Erhöhung der Glykoligandendichte auf den SCPs, um eventuelle Unterschiede im Bindungsverhalten der Strukturen eindeutig quantifizieren zu können. Zum Vergleich werden sowohl multivalente Liganden präsentierende Glyko-SCPs als auch solche mit monovalenten Liganden (mit und ohne Polymergerüst) hergestellt.

Zunächst soll die direkte Bindung der Glykoliganden an ConA untersucht werden. Die Messung erfolgt nach Zugabe einer Glyko-SCP Probe auf eine mit ConA funktionalisierte Glasoberfläche in einem geeigneten Puffermedium. Nach Sedimentation erfolgt die Ligand-Rezeptor induzierte Adhäsion an der Grenzfläche und kann durch Anwendung des in dieser Arbeit beschriebenen JKR-Modells quantifiziert werden.

In einem darauffolgenden Schritt soll die Bindungsaffinität der Strukturen in einem Inhibitionsassay durch Zugabe von Methyl-Mannose untersucht werden. Die Ergebnisse beider Messungen sollen als Basis für den Vergleich mit weiteren durchgeführten Assays herangezogen werden.

Darauf aufbauend soll in einem weiteren SCP-RICM Projekt das inhibitorische Potenzial der durch die SPPoS zugänglichen Präzisionsglykomakromoleküle an biomimetischen Grenzflächen untersucht werden. Von Interesse ist dabei, ob zusätzliche nicht-bindende aber sterisch anspruchsvolle PEG-Blöcke am Glykoliganden ein stärkeres inhibitorisches Verhalten erzeugen.

3 Ergebnisse und Diskussion

In dieser Arbeit wird ein synthetischer Ansatz für weiche, mit Präzisionsglykooligomeren funktionalisierte Mikrogelpartikel (SCP), die kohlenhydratpräsentierende Zelloberflächen nachahmen, vorgestellt und ihre spezifische Bindung an das Modelllektin ConA untersucht. Der Fokus liegt dabei auf der Identifikation möglicher und in Kapitel 1.3 näher beschriebener multivalenter Bindungseffekte.

In Kapitel 3.1 liegt der Schwerpunkt auf den synthetischen Herausforderungen zur Herstellung der SCPs auf PEG-Basis, monodisperser und sequenzdefinierter Glykooligomere, deren Konjugation an die Partikel sowie der anschließenden Charakterisierung. Es werden verschiedene Ansätze zur Weiterentwicklung des SCP-RICM Assays, wie zum Beispiel der Steigerung des Glykofunktionalisierungsgrades der SCPs und zur Steigerung der Reproduzierbarkeit von Messergebnissen, vorgestellt.

In Kapitel 3.2 folgt die Diskussion der Ergebnisse der verschiedenen durchgeführten Bindungsstudien. Dabei wurden sowohl direkte Bindungs- als auch Inhibitionsassays mit etablierten analytischen Methoden durchgeführt und anschließend verglichen. Ein besonderer Fokus lag auf dem SCP-RICM Assay, außerdem wurden die weiter oben beschriebenen Methoden ITC, SPR und Fluoreszenz eingesetzt. Grundsätzlich unterscheiden sich die Methoden darin, dass Ligand und Rezeptor in Lösung oder an einer festen Phase vorliegen. Ein Beispiel ist die Adhäsion der weichen Glyko-SCPs an der mit ConA bedeckten Glasoberfläche, die Ligand-Rezeptor Wechselwirkungen an Grenzflächen bei diversen natürlichen Prozessen im Untersuchungsaufbau ähnlich ist. Wesentliche Unterschiede neben mechanischen Eigenschaften der in der Natur vorkommenden Oberflächen sind eine geringere Komplexität der Glykoliganden, die Homogenität der Präsentation sowie der geringere Funktionalisierungsgrad auf der Oberfläche der Mimetika. Dabei ist die Homogenität zur isolierten Betrachtung des Bindungsverhaltens einzelner Ligand-Rezeptor Paare vorteilhaft.

Basierend auf den Erkenntnissen der durchgeführten Untersuchungen wurden weitere Studien zum tieferen Verständnis von multivalenten Ligand-Rezeptor Wechselwirkungen erarbeitet und durchgeführt. Die Ergebnisse der Kollaborationsprojekte werden in Kapitel 3.3 erläutert.

3.1 Multivalente Bindung von Präzisionsglykooligomeren an weiche Hydrogel Partikel

Wie in Kapitel 1 beschrieben, finden biologische Prozesse wie die Zell-Zell-Kommunikation häufig durch die Bildung von multiplen Liganden-Rezeptor-Komplexen an der Zelloberfläche statt. Ebenfalls beschrieben wurden einige der vielen Forschungsansätze, um ein besseres Verständnis dieser Multivalenz-Effekte zu erlangen. Die meisten Studien zur Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Glykomimetika und Lektinen wurden jedoch mit einzelnen, frei gelösten Glykostrukturen durchgeführt. Die Glykokalyx hingegen bietet eine große Fläche mit oberflächenverankerten Liganden und kann daher abweichende Bindungseigenschaften aufweisen als einzelne, in Lösung befindliche Glykostrukturen. Rückschlüsse darüber, ob die Rezeptorbindung an einer solchen Oberfläche, die mit Liganden bedeckt ist, durch multivalente Effekte verstärkt wird, sind von großem Interesse für weiterführende Forschungsfragen.

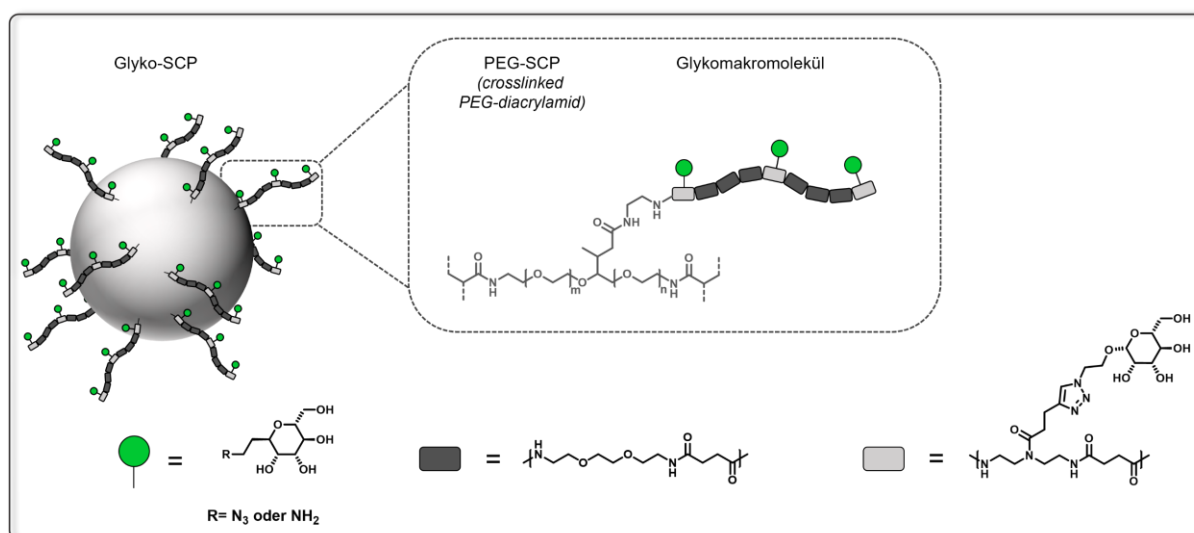


Abbildung 12: Schematische Darstellung eines glykokonjugierten PEG-SCPs oder kurz Glyko-SCPs.^[172]

In diesem Kapitel der Arbeit wird die Synthesestrategie zur Herstellung weicher, mit Präzisionsglykooligomeren funktionalisierten Mikrogelpartikel (Glyko-SCPs) für die Nachbildung kohlenhydratpräsentierender Zelloberflächen beschrieben. Darauf aufbauend werden die Ergebnisse der Bindungsstudien in verschiedenen Assays mit dem in Kapitel 1.2 eingeführten Modelllektin ConA vorgestellt. Der Fokus liegt dabei auf der Identifikation potenzieller multivalenter Effekte im Bindungsverhalten der sich in Zuckereinheiten

und -abstand unterscheidenden Glykooligomeren sowie die Untersuchung möglicher Abweichungen im Bindungsverhalten in Abhängigkeit vom gewählten Assay. Zunächst wird die spezifische Adhäsion zwischen Glyko-SCPs und dem mittels Physisorption auf Glasoberflächen gebundenen ConA quantifiziert. Das heißt beide Bindungspartner sind immobilisiert (Abbildung 13, links). Als nächstes wird das Bindungsverhalten von in einem Puffermedium gelösten ConA an die Glyko-SCPs mittels Fluoreszenzmikroskopie gemessen, d.h. nur ein Bindungspartner ist immobilisiert (Abbildung 13, Mitte). Schließlich werden die Ergebnisse dieser beiden Assays mit ITC-Messungen verglichen, bei denen sich sowohl das ConA als auch die Glykooligomere in Lösung befinden (Abbildung 13, rechts). Durch die Variation der Struktur der Glykooligomere kann der Einfluss des polymeren Gerüsts, der Glykovalenz und der Dichte der Zucker Einheiten untersucht werden.

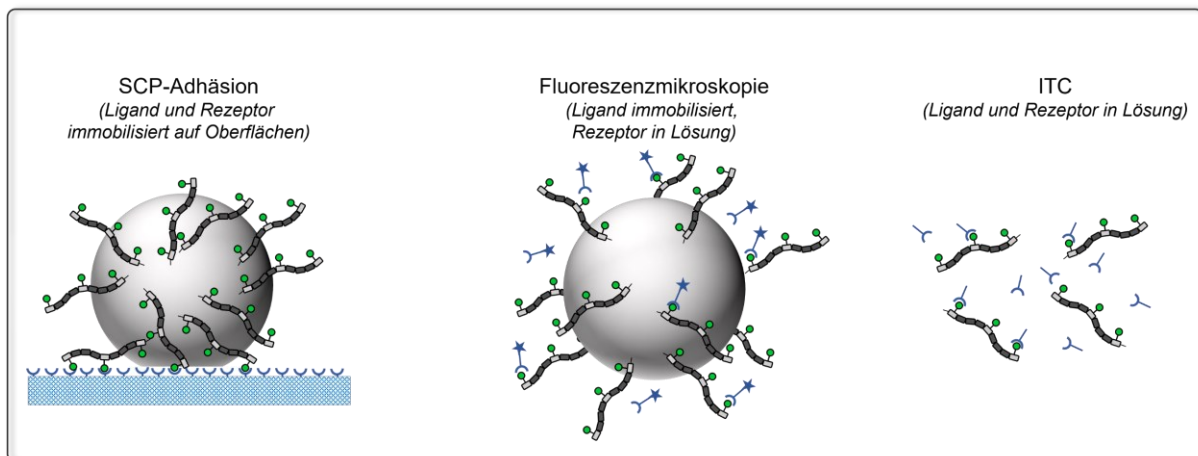


Abbildung 13: Durchgeführte Bindungsstudien: Mit Glykooligomeren funktionalisierte SCPs (Adhäsion, Fluoreszenz), oberflächengebundenen ConA (Adhäsion) oder frei gelösten Glykooligomeren (ITC) und ConA (ITC, Fluoreszenz).^[172]

In den folgenden Unterkapiteln werden die Vorgehensweise sowie die Ergebnisse von der Synthese der Glykooligomere, der SCP-Synthese und Charakterisierung, der Glykokonjugation an den SCPs mit erneuter Charakterisierung sowie den durchgeführten spezifischen Bindungsstudien vorgestellt.

3.1.1 Synthese von Präzisionsglykooligomeren mittels SPPoS

Um den Einfluss struktureller Merkmale von Glykoliganden innerhalb multivalenter Wechselwirkungssysteme zu untersuchen, bestand das erste Ziel in der Synthese von monodispersen und sequenzdefinierten Glykooligomeren. Diese wurden im späteren Verlauf

der Arbeit in Bindungsstudien, zum Beispiel als glykomimetische Liganden für die SCP-Biosensoren eingesetzt. Die Herstellung erfolgte nach dem in Kapitel 1.5 beschriebenen modularen Bottom-Up-Ansatz, in dem verschiedene Monomer-Bausteine schrittweise an einem festen Trägermaterial zusammengesetzt werden. Auf diese Weise konnten verschiedene Glykooligomere mit definierter Länge, Valenz und Ligandenabstand hergestellt werden.

Der erste erforderliche Schritt war die Herstellung der funktionellen Bausteine für die Festphasensynthese. Dazu wurden zwei verschiedene Monomere, der TDS- und EDS-Baustein, nach Synthesevorschriften von Ponader et al. hergestellt.^[116] Diese im Design von natürlichen Aminosäuren inspirierten synthetischen Bausteine besitzen analog zu ihren in der Natur vorkommenden Pendants eine Carbonsäure- sowie eine Aminogruppe. Die Konjugation von Mannose-Liganden an das Oligomergerüst erfolgte durch die TDS-Bausteinstruktur, die eine Alkin-Seitenkette präsentiert. Als Zuckerbaustein für den Modulkasten wurde als Gegenstück im Rahmen dieser Arbeit Mannose mit einer Azid-Gruppe funktionalisiert.^[116]

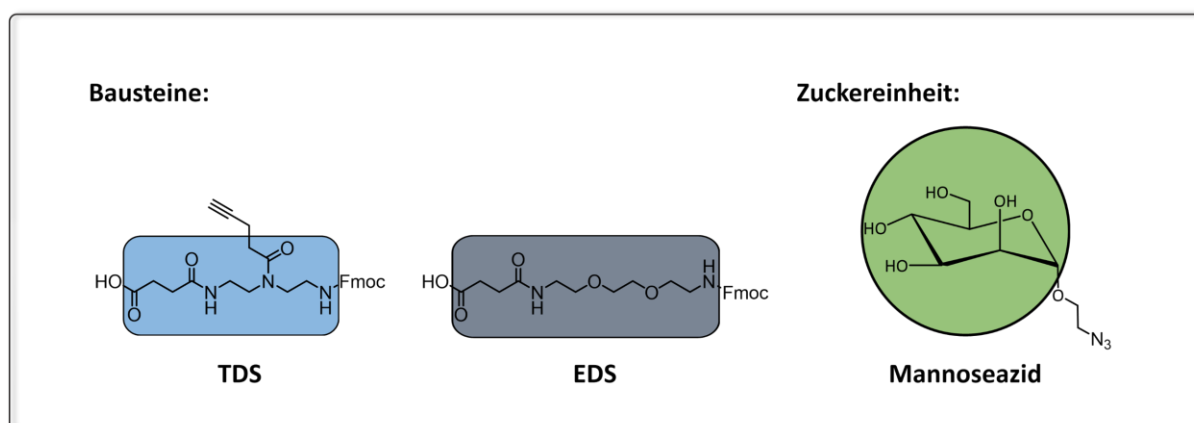


Abbildung 14: Funktionelle Monomer-Bausteine zum Aufbau der Glykooligomere.

Die Bausteine konnten erfolgreich isoliert werden. Beachtet werden sollte eine gründliche abschließende Analytik der synthetisierten Bausteine. So führen Verunreinigungen, zum Beispiel fehlende Schutzgruppe im Edukt EDS, bei mehrmaligem Einbau des Bausteins zu einer signifikanten Reduktion des finalen Reinheitsgrads der Oligomere. So führt eine fehlende Schutzgruppe bei 3% des Edukts EDS zu einer Verunreinigung von mehr als 10% bei viermaligem Einbau.

Anschließend wurde die SPPoS an einem mit Ethylendiamin-Linker modifizierten Polymerharz (TentaGel® S Chlorotriethylharz, RAPP Polymers), das bis zur vollständigen Synthese der Zielstruktur als festes Trägermaterial diente, durchgeführt. Die Beladung des Trägermaterials nach der Linker-Modifikation wurde nach bekannten Protokollen bestimmt und betrug 0,25mmol/g. Die Kupplung der ersten Bausteineinheit erfolgte durch die Reaktion der Carbonsäuregruppe an das Polymerharz mit der Aminogruppe unter Verwendung von PyBOP als carbonsäureaktivierendes Kupplungsreagenz. Anschließend wurden die EDS- und TDS-Bausteine in der zuvor festgelegten Reihenfolge durch wiederholte Entschützung und Aktivierung der terminalen Carbonylgruppe an die Festphase angebracht.

Insgesamt wurden fünf verschiedene Oligomere mit unterschiedlicher Kettenlänge und Position der TDS-Bausteine innerhalb des Oligomergerüsts synthetisiert. Über die Alkin Funktionalität wurde das Mannose-Azid-Derivat über eine Kupferkatalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) an das Oligomergerüst gekuppelt. Die hergestellten Glykooligomere wurden nach Abspaltung vom Trägermaterial mittels $^1\text{H-NMR}$, RP-HPLC, und ESI-MS analysiert. Insgesamt konnten die Synthesen erfolgreich durchgeführt werden. Die Terminologie der in Tabelle 2 gezeigten Glykooligomere beschreibt Zahl in der Klammer der Probenbezeichnung beschreibt die Position der Mannose-Einheiten auf dem Oligomergerüst. Die Zahl nach der Klammer und dem Bindestrich gibt die Gesamtzahl der gekuppelten Bausteine an. Nach der erfolgreichen Synthese der Zielstrukturen, wird im nächsten Kapitel die Herstellung der SCPs beschrieben.

Die in Tabelle 2 dargestellten Ergebnisse der jeweils ermittelten relativen Reinheit vor Aufreinigung mittels präparativer HPLC weisen eine absteigende Tendenz auf, je länger das aufgebaute Oligomergerüst war. Eingesetzte analytische Methoden sowie erzielte Ausbeuten sind im experimentellen Teil der beschrieben. Ein Grund dafür können zum Beispiel kleinste Verunreinigungen (<1%) in den eingesetzten Baustein-Batches, wie zum Beispiel eine fehlende Schutzgruppe, die aufgrund der Sensitivität der verwendeten Analysemethoden nicht identifiziert werden konnten. Obwohl der Aufbau der Glykooligomere an der Festphase in zwei verschiedenen Laborabzügen durchgeführt wurde, kann eine Restkontamination mit Piperidin im für die Kupplung vorgesehenen Bereich nicht ausgeschlossen werden, worin ein weiterer Grund für die erhaltenen Reinheitswerte liegen kann. Grundsätzlich gibt es viele

verschiedene Quellen für Kontaminationen, die tendenziell zu niedrigeren Reinheitsgraden führen können.

Tabelle 2: Übersicht der synthetisierten Glykooligomere mit Probenbezeichnung, ermittelter relativen Reinheit (mittels RP-HPLC) vor und nach Aufreinigung mittels präparativer RP-HPLC.

Probenbezeichnung	Ligandenstruktur	Reinheit vor Aufreinigung	Reinheit nach Aufreinigung
Man(3)-5		>95%	>95%
Man(1,3,5)-5		>95%	>95%
Man(1,5,9)-9		93%	>95%
Man(1,7,13)-13		90%	>95%
Man(1,3,5,7,9)-9		94%	>95%

3.1.2 SCP-Synthese, Funktionalisierung mit Carbonsäuregruppen und Charakterisierung

Für die Herstellung der SCPs war im ersten Schritt die Synthese von PEG-dAAM erforderlich. In Arbeiten von Pussak et. al.^[167] wurde als Ausgangsmaterial PEG mit einem Molekulargewicht von 8 kDa als geeignet für den späteren Einsatz als SCP-Netzwerk identifiziert. Die Synthese erfolgte nach einer dreistufigen Reaktion, die im Folgenden dargestellt ist:

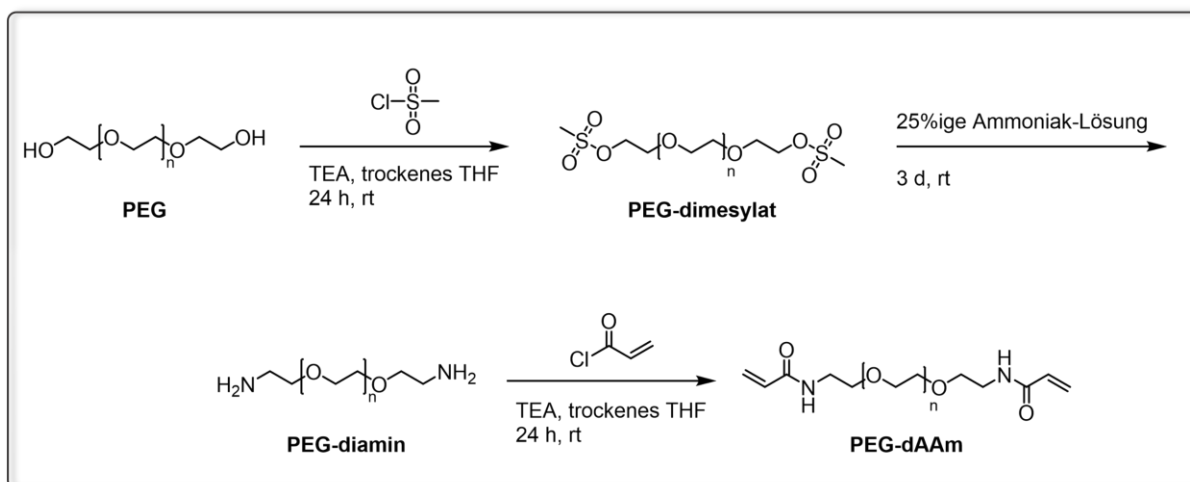


Abbildung 15: Synthese von PEG-dAAm für die Herstellung der SCPs.^[173]

Als Ursache für fehlgeschlagene Versuche PEG-dAAm nach der Arbeitsvorschrift herzustellen konnten einerseits Wasserrückstände (führen zu unvollständiger Substitution der Hydroxylgruppen) im Edukt PEG-8000 identifiziert werden, die im initialen Schritt, z.B. durch Destillation, vollständig entfernt werden sollten. Weiterhin wurde nach Verwendung von Diethylether (*technical grade*) Verunreinigungen im Endprodukt festgestellt, die als gelbliche Verfärbung und in einem veränderten Vernetzungsverhalten in der Folge beobachtet wurden. Zuletzt sollte darauf geachtet werden, die letzten Synthese Schritte bei Temperaturen unter 30° C durchzuführen, da bei höheren Temperaturen ein Teil des Produkts polymerisieren kann und dadurch ein in Wasser unlösliches Gel entsteht. In einer dahingehend optimierten Syntheseroute konnte dann erfolgreich PEG-OH zu PEG-dAAm umgesetzt und mittels ¹H-NMR und MALDI-TOF Analysen (Kapitel 5) identifiziert werden.

Das hergestellte PEG-dAAm wurde im nächsten Schritt in eine wässrige Na₂SO₄-Lösung gegeben. Dabei ist es eine Herausforderung wiederholt ähnlich große SCPs im angestrebten Bereich von 20-50 µm herzustellen da zum einen die SCPs kleiner werden, je stärker das Probengefäß geschüttelt wird, zum anderen jedoch durch die unmittelbar einsetzende Oswald-Reifung die SCPs innerhalb kurzer Zeit deutlich an Größe gewinnen. Beide Effekte berücksichtigend konnte die SCP-Synthese nach den bekannten Protokollen erfolgreich durchgeführt werden.

Eine Verzögerung des Projektes entstand hingegen aufgrund der Fehlinterpretation von Rückständen auf den SCPs, die nach der Vernetzungsreaktion im Mikroskop beobachtet

wurden. Zu sehen waren etwa 1 μm große dunkle Stellen im SCP-Netzwerk. Dies konnte für Proben unmittelbar nach der Vernetzungsreaktion und 15 Zentrifugationszyklen zur Aufreinigung festgestellt werden. Zunächst wurde davon ausgegangen, dass es sich um Lufteinschlüsse handelt, weshalb Freeze & Pump-Zyklen vorgeschaltet wurden. Im späteren Verlauf stellte sich jedoch heraus, dass es sich um aggregierte Rückstände des Natriumsulfats handelt, welche durch Lagerung in deionisiertem Wasser über 12 Stunden vor den Zentrifugationszyklen 10-15 vollständig entfernt werden konnten.

Im nächsten Schritt wurden Carbonsäurefunktionalitäten durch photochemische Modifikation des PEG-Rückgrats mittels Benzophenon und Crotonsäure (CA) eingeführt. Bei der Funktionalisierung der SCPs mit Crotonsäure wurde ebenfalls auf die Versuchsvorschrift von Pussak et. al zurückgegriffen.^[167] Die Herausforderung bestand darin, den Funktionalisierungsgrad durch neue, im Rahmen dieser Arbeit erarbeitete Optimierungen des Protokolls zu erhöhen.

Dazu wurden unter anderem verschiedene UV-Lichtquellen aber auch unterschiedlich große Überschüsse an Benzophenon und Crotonsäure sowie die Belichtungsdauer als Parameter variiert. Der signifikanteste Anstieg des Funktionalisierungsgrades wurde bei einer Kombination eines hohen Überschusses der beiden Edukte Benzophenon und Crotonsäure, sowie einer Erhöhung der Belichtungszyklen auf bis zu 24 Wiederholungen beobachtet. Jeder Belichtungszyklus hatte eine Dauer von 180 Sekunden. Nach jedem zweiten Zyklus wurde die Lösung mit Stickstoff gespült, nach jeweils 6 Wiederholungen erfolgte ein Lösungsmittelaustausch unter erneuter Zugabe von Benzophenon und Crotonsäure im entsprechenden Überschuss. In Abbildung 16 sind die Ergebnisse der verschiedenen Versuchsansätze sowie ermittelten Funktionalisierungsgrade nach 6, 12, 18 und 24 Belichtungszyklen gezeigt. Während sich der Funktionalisierungsgrad nach 6 Wiederholungen nicht signifikant unterscheidet, sind nach 12 Zyklen deutliche Unterschiede in Abhängigkeit der Eduktkonzentration zu erkennen. Höhere Konzentration konnten aufgrund der Löslichkeit der Edukte nicht untersucht werden. Bei der am höchsten konzentrierten Probe wird die Steigung nach 12 Zyklen etwas flacher bis zwischen 18 (139 $\mu\text{mol/g}$) und 24 (141 $\mu\text{mol/g}$) Zyklen keine signifikante weitere Erhöhung zu beobachten war.

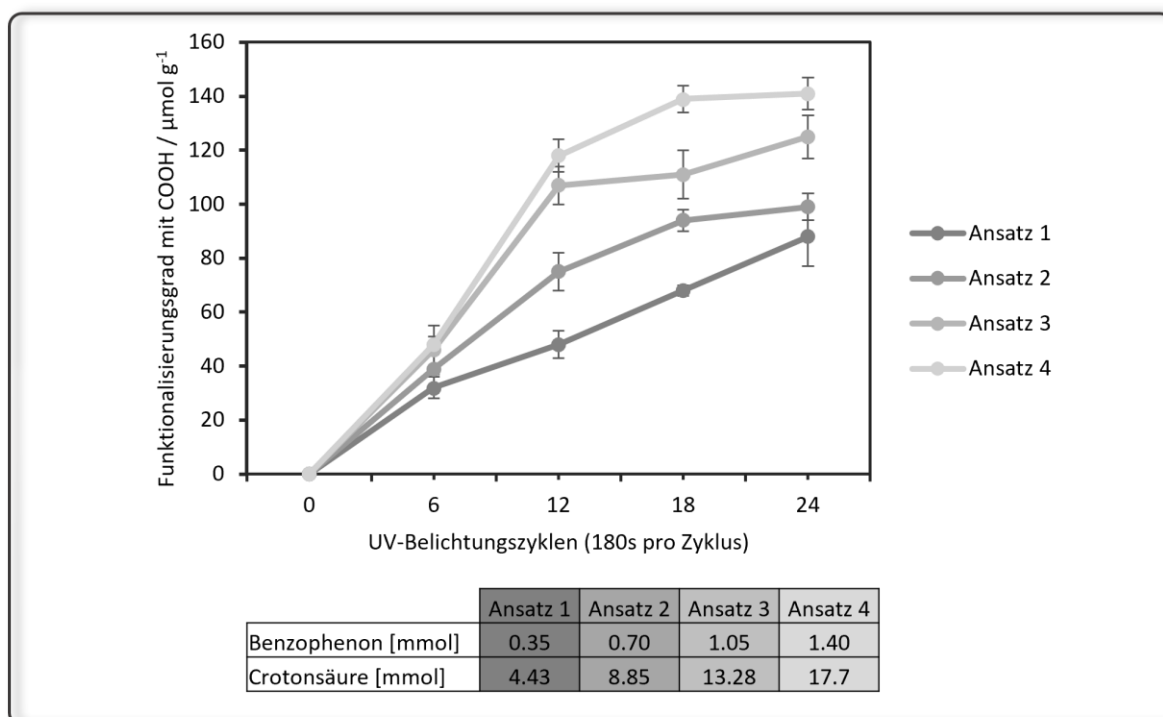


Abbildung 16: Erhöhung des COOH-Funktionalisierungsgrades der SCPs durch Variation von verwendeten Überschüssen und der Belichtungszeit.

Die Bestimmung des Funktionalisierungsgrades erfolgte mittels kolorimetrischer Titration unter Verwendung von Toluidin Blue (TBO). Der Farbstoff TBO bildet in basischer Lösung einen stabilen Komplex mit COO⁻-Gruppen im SCP Polymernetzwerk (Kapitel 5). Der TBO-Test ist eine sehr sensitive Methode, weshalb es insbesondere aufgrund der sehr geringen Menge an Probenmaterial in diesem Projekt wichtig ist, die Einwaagen der zu untersuchenden Analytmenge mit jeweils drei Auswiegezyklen an einer Analysewaage durchzuführen und mit den Durchschnittswerten weiterzuarbeiten. Zur vollständigen Entfernung vom Medium (zur Lagerung kann Ethanol oder LBB-Puffer mit 0.1% Natriumazid empfohlen werden) der SCPs, können diese nach Zentrifugation mit geringen Rückständen an z.B. Ethanol im Vakuumtrockenschrank bei 35°C getrocknet werden.

3.1.3 Konjugation und Charakterisierung bei der Herstellung von Glyko-SCPs

Zur Konjugation der Glykooligomere an die CA-funktionalisierten SCPs, wurde die SPPoS mit einem Ethylendiamin modifizierten Harz (Kapitel 3.1.1) durchgeführt, so dass die Oligomere nach Abspaltung vom festen Trägermaterial eine Aminofunktionalität am C-Terminus aufweisen. Für die Ermittlung optimaler Reaktionsbedingungen wurden verschiedene

Kupplungsreagenzien sowie Reaktionsbedingungen mit dem Ziel einer möglichst hohen Umsetzung untersucht. Dazu wurden verschiedene Überschüsse der Glykoliganden und verschiedene etablierte Kupplungsreagenzien verwendet. Die Aufreinigung erfolgte durch mehrfache Zentrifugationszyklen. Dabei wurden im ersten Schritt jeweils 5 Zyklen mit dem verwendeten Lösungsmittel durchgeführt, um Edukt-Rückstände zu entfernen. Anschließend erfolgte durch 5 weitere Zyklen mit Lösungsmittel/Ethanol (50/50) sowie 5 Zyklen in Ethanol der Lösungsmittelaustausch, um bei Wärme (max. 40° C) und unter vermindertem Druck die Trocknung der SCPs für den TBO Assay zu erreichen.

Zur Durchführung der Studien kann theoretisch auf eine große Zahl kommerziell erhältlicher Aktivierungsreagenzien zurückgegriffen werden. Eine wichtige Klasse sind Carbodiimide wie zum Beispiel Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), Diisopropylcarbodiimid (DIC) oder 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC)-Hydrochlorid. Eine weitere Klasse von Aktivierungsreagenzien sind Phosphoniumsalze aus der Klasse der Benzotriazole. Ein etablierter Vertreter dieser Klasse ist das in Kapitel 1.5 beschriebene und während der Festphasensynthese eingesetzte PyBOP. Ein weiteres eingesetztes Aktivierungsreagenz ist HBTU (2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat). Der Kupplungsmechanismus läuft ähnlich wie bei den Phosphoniumsalzen ab, mit dem Unterschied, dass Harnstoff als Nebenprodukt gebildet wird. HATU, ein Derivat von HBTU mit einem Phenylring anstelle des Pyridinrings und hat sich bei sterisch anspruchsvollen Amid-Kupplungen als sehr effizient erwiesen. Die Umsetzung der COOH-Gruppen wurde mittels erneutem TBO Assay quantifiziert. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

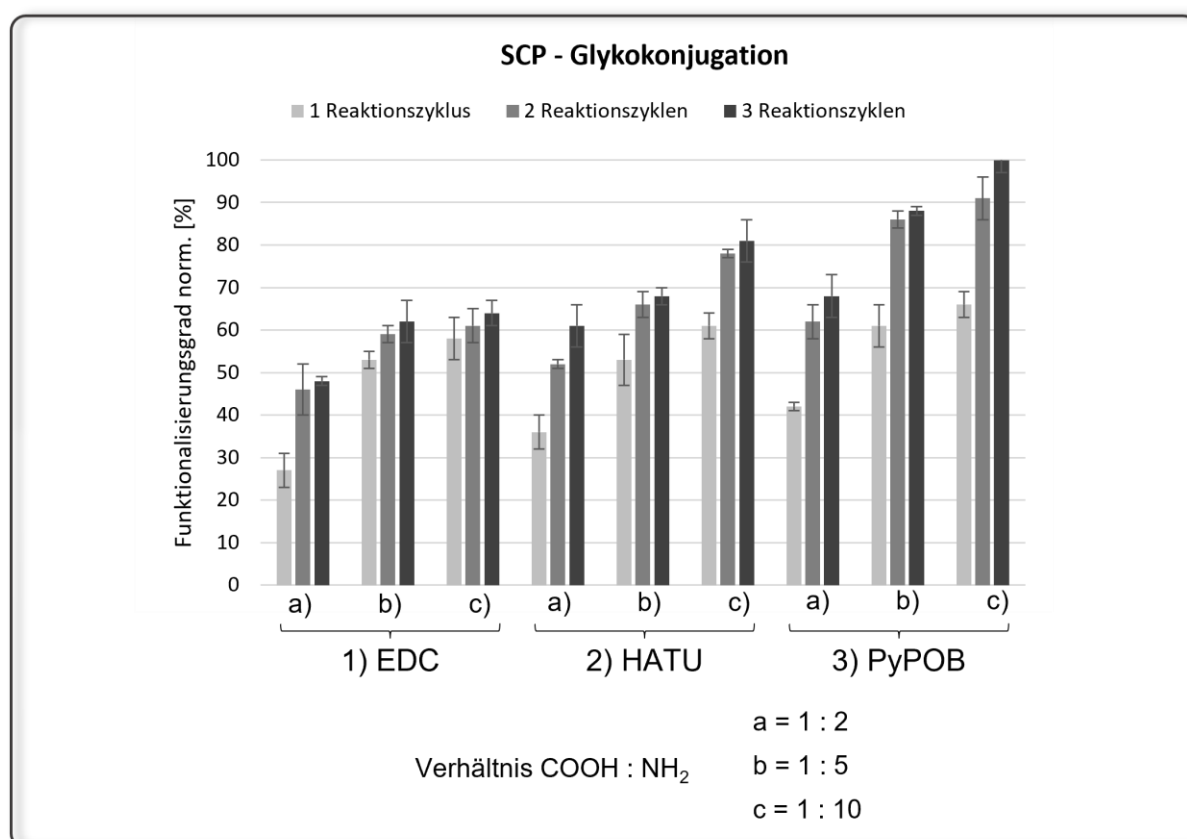


Abbildung 17: Übersicht der Ergebnisse zur Maximierung der Glykofunktionalisierung von PEG-SCP-CA. Dargestellte Fehler sind Standardabweichungen aus 3 Wiederholungen des TBO-Tests.

Am erfolgreichsten war die durch PyBOP- und HOBt unterstützte Amid-Kupplung der Glykooligomere an die SCPs. Bei den gewählten Reaktionsbedingungen, die in Kapitel 5 genauer beschrieben sind, konnte eine fast vollständige Umsetzung von >95 % der Carbonsäuregruppen festgestellt werden. Die Reaktionsbedingungen konnten erfolgreich auf alle weiteren Proben angewendet werden. Ein weiterer für SCP-RICM Messungen zwingend zu bestimmender Parameter ist das in Kapitel 1.6.3 eingeführte Elastizitätsmodul (im Englische *Young's Modul*, YM) der Glyko-SCPs. Dazu wurde sowohl vor (YM = 71 kPa) als auch nach der Glykokonjugation der YM (79 -122 kPa) mittels AFM-Force-Indentation Messungen bestimmt. Die Präparation des AFM Cantilevers erfolgte durch das Kleben eines 3-5 µm großen Glaspartikel an der Spitze des Cantilevers mit einem zwei-Komponenten Klebstoff. Eine nähere Beschreibung zur Durchführung der SCP YM-Messung mittels AFM ist in Kapitel 5 beschrieben. Die Ergebnisse zeigen steigende YM für alle Proben nach der Glykokonjugation. Dies könnte auf die Konjugation der Glykooligomere an das gesamte PEG-Netzwerk und einer daraus resultierenden Erhöhung der Netzwerkdichte zurückzuführen sein.

Tabelle 3: Übersicht der ermittelten Funktionalisierungsgrade und YM der hergestellten Glyko-SCPs. Dargestellte Fehler sind Standardabweichungen aus 3 Wiederholungen des TBO-Tests (Funktionalisierungsgrad Bestimmung) sowie 10 SCPs jeder Probe zur Bestimmung des YM.

Probenbezeichnung	Ligandenstruktur	COOH-Funktionalisierungsgrad [mmol/g]	Umgesetzte COOH-Gruppen [%]	Young's modulus [kPa]
Man(1)		135 ± 7	97 ± 5	79 ± 11
Man(3)-5		133 ± 7	96 ± 5	95 ± 14
Man(1,3,5)-5		136 ± 4	98 ± 3	113 ± 18
Man(1,5,9)-9		133 ± 8	96 ± 6	98 ± 33
Man(1,7,13)-13		133 ± 4	96 ± 3	104 ± 12
Man(1,3,5,7,9)-9		135 ± 14	97 ± 10	122 ± 21

3.1.4 Ermittlung geeigneter Bedingungen für den SCP-RICM Assay

Für die SCP-RICM Analytik wurden verschiedene Parameter zur Ermittlung optimaler Bedingungen variiert. Exemplarisch werden die Untersuchung der ConA-Oberflächenpräparationstechnik sowie kinetische Studien zur Ermittlung eines geeigneten Messzeitpunkts nach Zugabe und Sedimentation der Glyko-SCPs auf die Glasoberfläche, vorgestellt. Als eine signifikante Fehlerquelle konnte zum Beispiel die Vorgehensweise bei der Immobilisierung von ConA auf der Glasoberfläche identifiziert werden. Dazu wurde einerseits die Glymo-Methode sowie die physikalische Adsorption von ConA auf Glas durchgeführt. Die Durchführung der beiden Methoden ist im experimentellen Teil dieser Arbeit genauer beschrieben. Zur Immobilisierung von ConA mittels Physisorption auf Glas wurden die Oberflächen zunächst 30 Minuten im UV Ozon Reiniger aktiviert. Die 12 Stunden zuvor angesetzte ConA Lösung (0,2 mg/ml) wurde direkt danach auf die Oberfläche gegeben und abgedunkelt 1 Stunde lang bei niedriger Intensität auf der Schüttelplatte inkubiert. Anschließend wurde der Lösungsmittelsaustausch vorgenommen, in dem das Glass Slide für jeweils eine Minute in ein Becherglas, gefüllt mit LBB Puffer, gestellt wurde. Anschließend erfolgte die Entfernung und sofortige Wiederauffüllung des Lösungsmittels in jeder Messkammer durch die zwei Pipetten Methode um in jeder Kammer die gleiche Menge

Lösungsmittel hinzuzufügen. Das Vorgehen wurde im Rahmen dieser Arbeit entwickelt und ist insbesondere bei der Durchführung von Inhibitionsstudien von großer Bedeutung. Exemplarisch sind die erzielten Ergebnisse mittels GLYMO- und Physisorptionsmethode in der folgenden Abbildung dargestellt und werden anschließend diskutiert.

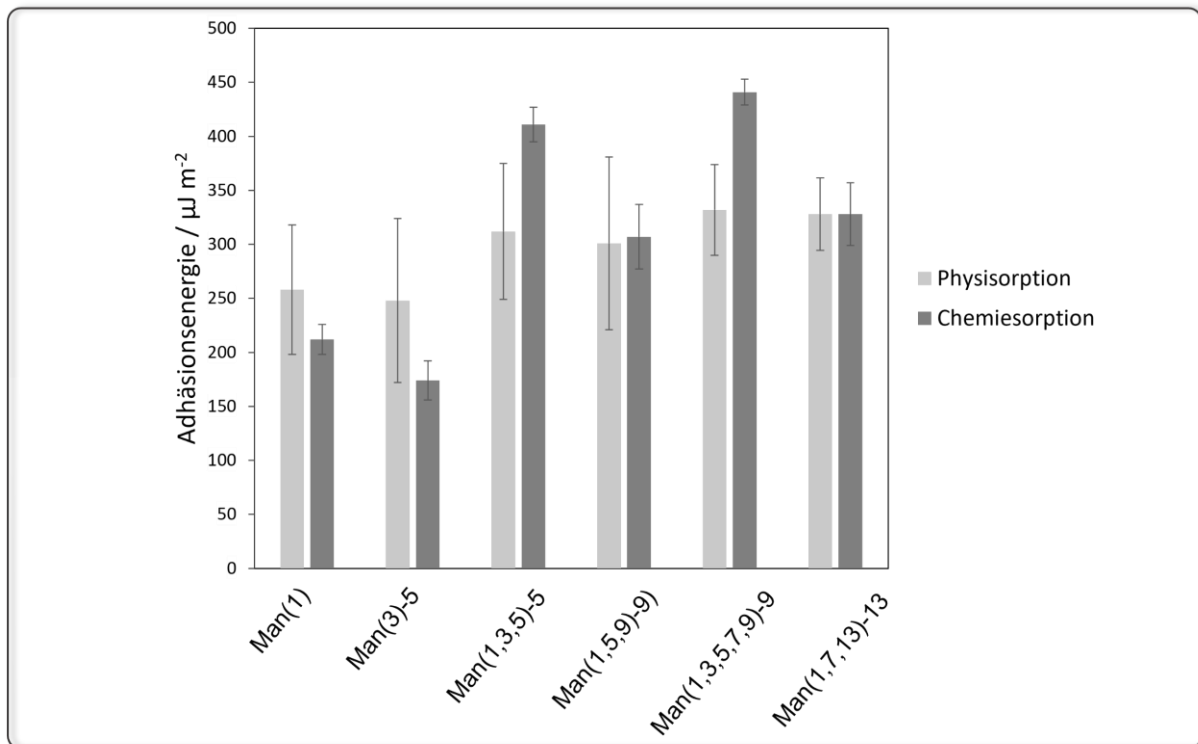


Abbildung 18: Darstellung der Adhäsionsenergien (jeweils drei verschiedene Oberflächen) bei unterschiedlichen Methoden zur ConA Immobilisierung. Dargestellte Fehler sind Standardabweichungen aus Wiederholungen der SCP-RICM Messungen auf jeweils 3 Oberflächen und jeweils 15 gemessenen SCPs.

Die Kontaktflächen wurden für beide Methoden 60 min, also der zuvor ermittelten benötigten Dauer bis zu einer stabilen Adhäsion, nach Zugabe der SCPs aufgenommen. Bei beiden Präparationsmethoden konnten im Anschluss erfolgreich Kontaktflächen quantifiziert werden. Es ist jedoch zu beachten, dass die ermittelte Adhäsionsenergie durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Man-Liganden und der Siliziumdioxid-Glasoberfläche, also auch ohne oder mit unvollständig immobilisierten ConA-Rezeptoren, beeinflusst sein kann. Aus diesem Grund wurden die Messungen pro Methode und Probe auf drei verschiedenen Oberflächen durchgeführt. Als Indikator für eine regelmäßig beschichtete und reproduzierbare ConA-Oberfläche kann ein Vergleich der ermittelten Standardabweichungen herangezogen werden. Für den im späteren Verlauf angestrebten Vergleich vieler Messungen

wiesen die Ergebnisse für die Physisorptionsmethode im Rahmen dieser durchgeführten Studie eine insgesamt bessere Reproduzierbarkeit auf. Zwar ist der Wertebereich ($241 - 340 \mu\text{J m}^{-2}$) der gesamten Probenreihe für die mittels Chemisorption hergestellten Oberflächen kleiner als für die Physisorption-Oberflächen ($172 - 446 \mu\text{J m}^{-2}$). Jedoch zeigen die in Abbildung 18 dargestellten Ergebnisse der Studien einen deutlich kleineren Messfehler für die Physisorptionsmethode, die auch im weiteren Verlauf verwendet wurde und im späteren Verlauf der Arbeit vorgestellt wird.

Als nächstes sollte die optimale Zeit zwischen Zugabe der SCPs ins Messmedium und dem Zeitpunkt der Aufnahme des Interferenzmusters bestimmt werden. Der Grund für dieses Experiment war die fehlende Information darüber wie viel Zeit bis zu einer stabilen und konstanten Adhäsion der SCPs vergeht.

Für den ersten Messzeitpunkt wurden die Kontaktflächen der jeweiligen Probe 10 Minuten nach Zugabe der SCPs in die Messzelle aufgenommen. Der Trend weist auf steigende Adhäsionsenergien im Zeitverlauf hin, jedoch mit relativ kleinen Veränderungen die insbesondere in den ersten 30 Minuten nach Zugabe eintreten. Insgesamt lassen die Beobachtungen zur Veränderung der ermittelten Adhäsionsenergien keine Rückschlüsse auf Unterschiede in der Bindungskinetik zwischen den verschiedenen Proben zu. Dazu sind die Veränderungen zwischen 5-10% ein relativ kleiner Anteil an der gesamten ermittelten Adhäsionsenergie und erlauben auch aufgrund der Fehlertoleranz der RICM-Methode keine weiteren Schlussfolgerungen. Von großem Interesse wäre die Beobachtung der Adhäsionsenergieveränderung nach dem ersten stabilen Kontakt zwischen SCP und der Glasoberfläche, woraus potenziell wertvolle Rückschlüsse zur Ligand-Rezeptor Bindungskinetik gezogen werden könnten. Im Rahmen der Laborarbeit wurden Versuche unternommen, die Veränderungen der Kontaktflächen innerhalb der ersten Sekunden aufzunehmen. Jedoch waren diese Versuche nicht erfolgreich, auch eine versuchte Programmierung zur automatischen Bildaufnahme und hohen Bildraten pro Minute konnten nicht erfolgreich umgesetzt werden.

Zur reproduzierbaren Immobilisierung von ConA auf einer Glasoberflächen konnten im Verlauf der Arbeit eine Vielzahl weiterer Parameter identifiziert werden, die einen Einfluss auf die später ermittelten Messergebnisse gezeigt haben. Im Verlauf der Arbeit wurde das im Folgenden beschriebene Vorgehen für eine reproduzierbare Glasoberflächenpräparation

entwickelt werden. Wie oben beschrieben wurde das ConA durch physikalische Adsorption gebunden. Als Objektträger wurden zunächst im Durchmesser etwas 2,5 cm Glasoberflächen, welche in auf Kunststoff basierten Ringvorrichtung eingespannt wurden, verwendet. Von Nachteil war die vergleichsweise große Fläche und damit einhergehend einem ineffizienten Probenverbrauch. Aus diesem Grund wurde im späteren Verlauf auf speziell für mikroskopische Zellstudien entwickelte und kommerziell erhältliche IBIDI Glasoberflächen zurückgegriffen. Dabei handelt es sich um einen in Kammern (jeweils 1 x 1 cm) unterteilten Objektträger. Die eingesetzten Probenmenge wurden deutlich reduziert, eine Kreuzkontamination wurde aufgrund der hohen Zwischenwände verhindert. Die Glass-Slides wurden im ersten Schritt in einem UV-Ozonreiniger 30 Minuten lang gereinigt und aktiviert. Unmittelbar danach wird eine am Vortag hergestellte ConA-Lösung (0,2 mg/ml in LBB) mit einem pH-Wert von 7,4 hinzugegeben. In jede Kammer werden 250 µl pipettiert und anschließend für 90 Minuten auf einen Schüttler gestellt. Für den anschließenden Lösungsmittels Austausch wurde jeder Objektträger zwei Mal in verschiedene Bechergläser mit LBB-Puffer gestellt. Danach wurde das Lösemittel aus jeder Kammer vorsichtig mit einer Pipette entfernt und sofort wieder mit einer definierten Menge LBB-Puffer wieder kontrolliert befüllt, um ein Austrocknen zu verhindern.

Für die durchgeführten Inhibitionsexperimente wurden die ConA beschichteten Objektträger mit LBB-Lösungen von Methyl- α -D-Mannopyranosid (MeMan) inkubiert. Verschiedene Inhibitor-Konzentrationen zwischen 5 µM-50µM wurden dazu 60 Minuten vor Zugabe der SCPs in jede Messkammer gegeben. Durch die Entwicklung des Versuchsprotokolls konnten Messergebnisse reproduziert werden, wodurch die Basis für weitere Bindungsstudien geschaffen war.

3.2 Adhäsionsstudien an biomimetischen Grenzflächen

3.2.1 Direkte Bindung von Glyko-SCPs an ConA Oberflächen

Im ersten Schritt wurde die direkte Bindung der Glykooligomere an ConA untersucht. Wie in den vorherigen Kapiteln beschrieben, sind die Bindungspartner jeweils auf SCPs oder an einer Glasoberfläche immobilisiert. Nach Vorbereitung der Oberflächen wurden 10 µl der SCP-Dispersion in die Messkammer getropft. Die Ausbildung der Kontaktflächen konnte bereits

nach wenigen Sekunden der Sedimentation beobachtet werden. Der Zeitraum von der Zugabe bis zur Aufnahme der Kontaktfläche wurde durch kinetische Studien (Kapitel 3.1.4) auf 60 Minuten festgelegt, also der ermittelten maximalen Kontaktfläche im Gleichgewicht. Die Kontaktflächen wurden mittels Lichtmikroskopie ausgelesen. Anhand des in Kapitel 1.6.3 erläuterten Interferenzmusters der adhärenierten SCPs wurden die Kontakt- sowie SCP-Radien quantifiziert. Dabei lagen die SCP-Radien im Bereich von 15-40 μm .

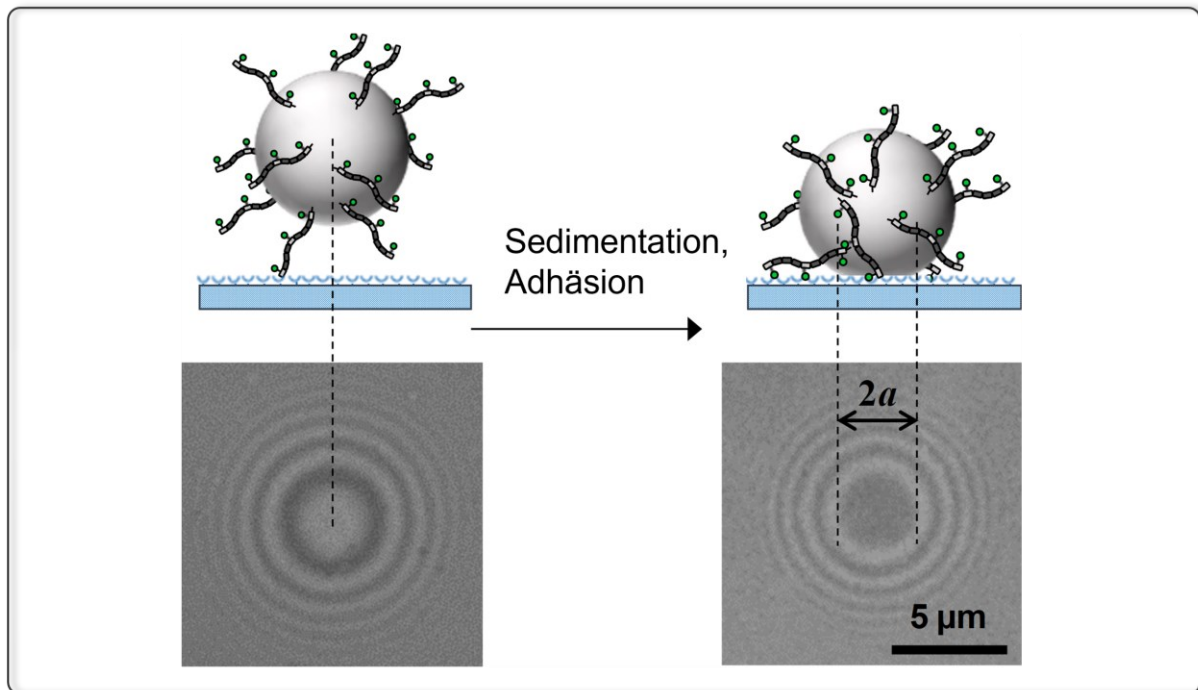


Abbildung 19: Schematische Darstellung der JKR-Adhäsionsmessungen mit Glyko-SCPs. Der dunkle Bereich in der Mitte kennzeichnet den SCP-Adhäsionsbereich.^[172]

Durch diese Werte sowie unter Einbezug der zuvor ermittelten Elastizitätsmodule wurden anschließend die jeweiligen Adhäsionsenergien quantifiziert. Die Adhäsionsenergien wurden mithilfe des beschriebenen JKR-Modells ermittelt. Ein typisches JKR-Diagramm ist in Kapitel 5 dieser Arbeit exemplarisch dargestellt. Abbildung 21 zeigt beispielhafte Kontaktflächen von zwei verschiedenen glykooligomerfunktionalisierten SCPs, mit einer größeren Kontaktfläche für den trivalenten Liganden im Vergleich zum monovalenten Liganden. Die Größe der Partikel wird durch die genannten Berechnungen berücksichtigt.

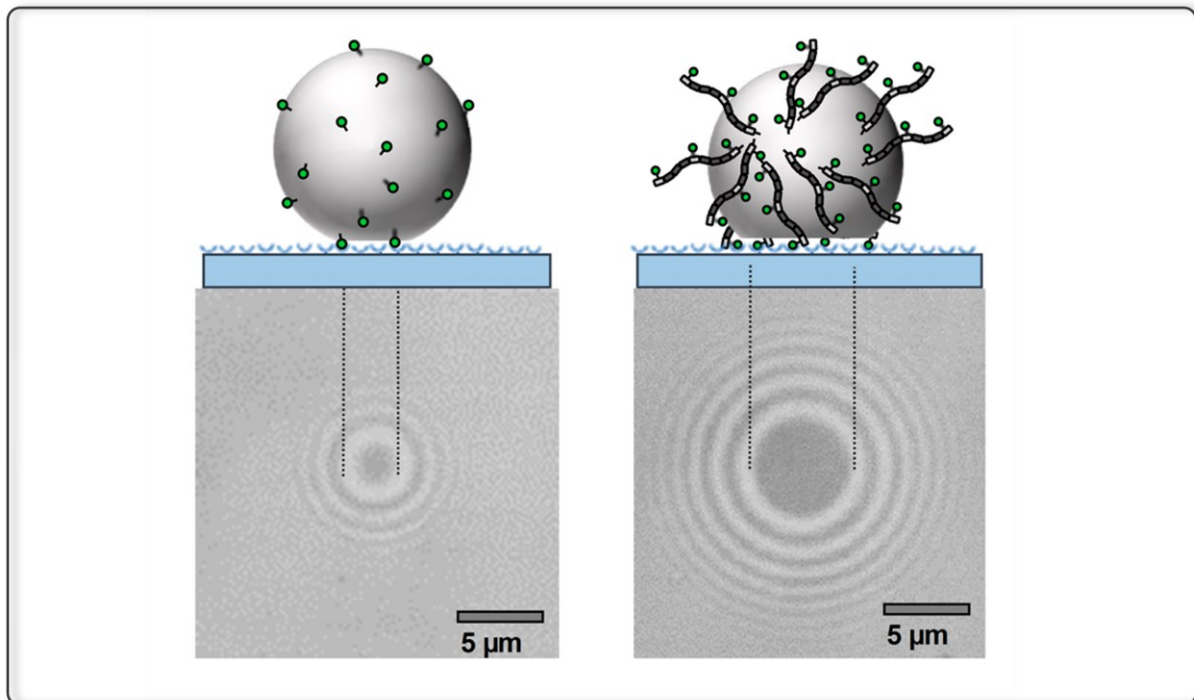


Abbildung 20: Adhäsion von Glyko-SCPs auf ConA-Oberflächen mit exemplarischen Kontaktflächen für monovalente und trivalente Liganden.^[172]

Die Messungen wurden mit allen zuvor hergestellten SCPs durchgeführt. Die Ergebnisse im Vergleich verschiedener Valenzen sowie die erhaltene Adhäsionsenergie für die gesamte Untersuchungsreihe sind in Abbildung 21 dargestellt. Es konnte beobachtet werden, dass die Adhäsionsenergie insgesamt mit der Anzahl der vom Glykooligomer präsentierten Zucker zunimmt. Bei SCPs mit der größten Anzahl an Mannoseeinheiten (Man(1,3,5,7,9)-9) fällt die Adhäsionsenergie jedoch ab, was darauf hindeutet, dass die verfügbaren ConA-Bindungsstellen gesättigt sind. Dies zeigt sich auch in der pro Mannose normalisierten Adhäsionsenergie, die mit zunehmender Valenz des Glykooligomers abnimmt. Darüber hinaus zeigten kürzere Glykooligomere eine erhöhte Adhäsion, wie der Vergleich zwischen dem einwertigen Oligomer (Man (3)-5) und der direkt gebundenen Man ohne Oligomergerüst zeigt. Jedoch sollte an dieser Stelle berücksichtigt werden, dass sich hier der Linker auch unterscheidet, da die am Glykooligomer gebundenen Man-Einheiten eine Triazolgruppe einbringen. Der Trend bei den dreiwertigen Glykooligomeren ist weniger eindeutig. Das kürzeste dreiwertige System Man(1,3,5)-5 wies die größte Adhäsion auf, während für das Glykooligomer Man(1,5,9)-9 mit mittlerer Länge eine geringere Adhäsion als für das größte Oligomer mit dreizehn Bausteinen, Man(1,7,13) 13 ermittelt wurde.

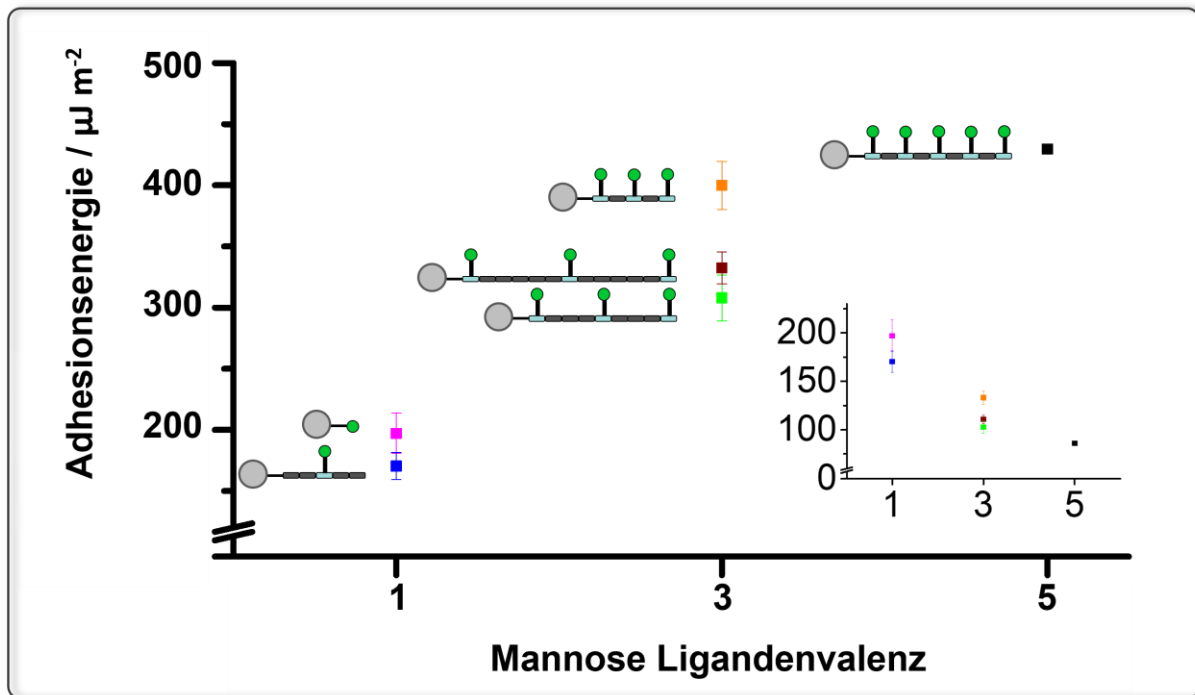


Abbildung 21: Ermittelten Adhäsionsenergien für die gesamte Probenreihe. Das Inset zeigt die nach Man-Valenz normalisierten Adhäsionsenergien.^[172] Dargestellte Fehler sind Standardabweichungen aus Wiederholungen der SCP-RICM Messungen auf jeweils 3 verschiedenen Glasoberflächen und jeweils 15 gemessenen SCPs jeder Probe pro Oberfläche.

Zum einen bestätigen die Ergebnisse insgesamt eine höhere Bindungsaffinität für Strukturen mit einer größeren Anzahl an Man-Einheiten, was auf statistische Effekte, also einer Erhöhung der lokalen Ligandendichte zurückzuführen ist. Weiterhin deuten sie darauf hin, dass die Präsentation der Liganden, also mit oder ohne Gerüst sowie der Abstand der Liganden, einen Einfluss auf die Bindungsstärke hat. Die aufgeführten Ergebnisse bilden eine Basis für weitere Untersuchungen über eine mögliche sterische Repulsion des Oligomergerüsts, d.h. geringere Adhäsion bei größeren Strukturen (siehe Man(1) vs. Man(3)-5) sowie der Ermittlung eines geeigneten Ligandenabstands (trivalente Strukturen). Während Man(1,3,5)-5 mit dem geringsten Ligandenabstand, also mit einer hohen lokalen Dichte, auf statistische Effekte hindeutet, könnte ab einer bestimmten Gerüstlänge eine weitere ConA-Bindungstasche erreichbar werden, wofür die höhere Affinität von Man(1,7,13)-13 gegenüber Man(1,5,9)-9 ein erstes Indiz darstellt.

3.2.2 Hemmung der Adhäsion in Inhibitionsstudien

Im nächsten Schritt wurden untersucht, wie sich die spezifische Adhäsion hergestellten der Glyko-SCPs in Gegenwart von MeMan als Inhibitor, der kompetitiv an die ConA-Oberfläche bindet, verändert. Die ConA-Oberflächen wurden dazu mit verschiedenen MeMan-Konzentrationen (5 μ M-50 mM) 60 min vor der Zugabe der Glyko-SCPs inkubiert. Das Vorgehen ist in der folgenden Abbildung exemplarisch für die Verbindung Man(1,5,9)-9 dargestellt.

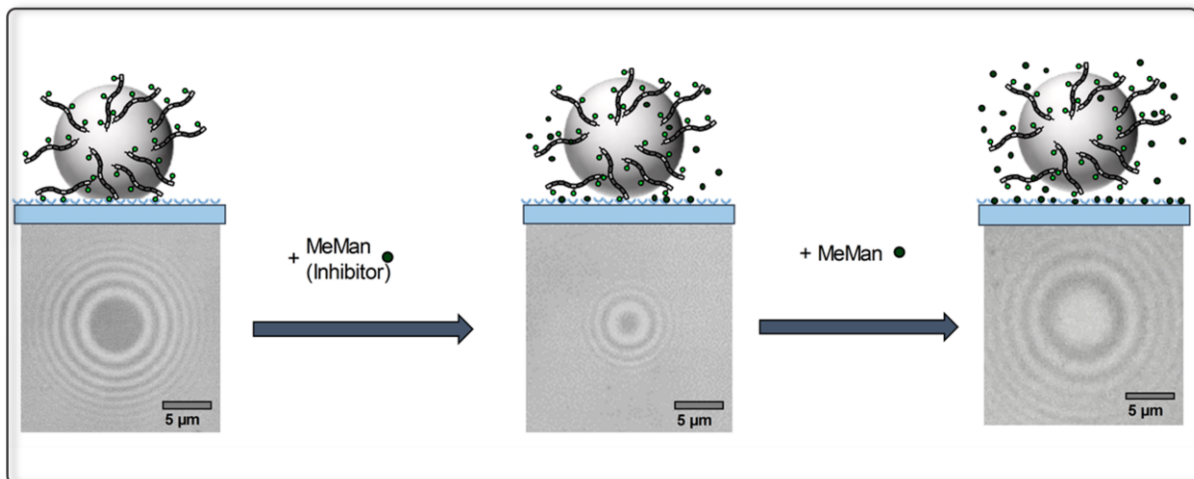


Abbildung 22: Schematische Darstellung der SCP-Adhäsionsreduktion bei Zugabe von MeMan in unterschiedlichen Konzentrationen. Abnahme der Adhäsionsfläche bei Inhibitor-Konzentrationen 0 μ M (links), 300 μ M (Mitte) und 20 mM (rechts).

Wie erwartet waren die Adhäsionsflächen aller SCPs aufgrund der kompetitiven Bindung von MeMan verringert. Dieser Test zeigt exemplarisch, wie viel Inhibitor zugegeben werden muss, um die Adhäsion der verschiedenen Glyko-SCPs zu verhindern. Die Aufnahme der Veränderungen der Adhäsionsenergie als Funktion der MeMan Konzentration ergibt die halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC_{50}) und ist für alle Proben in Abbildung 23 dargestellt. In Übereinstimmung mit den zuvor durchgeführten direkten Bindungsstudien sowie mit früherer Untersuchungen^[165], steigen die IC_{50} -Werte mit zunehmender Anzahl von Man-Einheiten. Das bedeutet, dass mehr MeMan benötigt wird, um die Adhäsion vollständig zu verhindern.

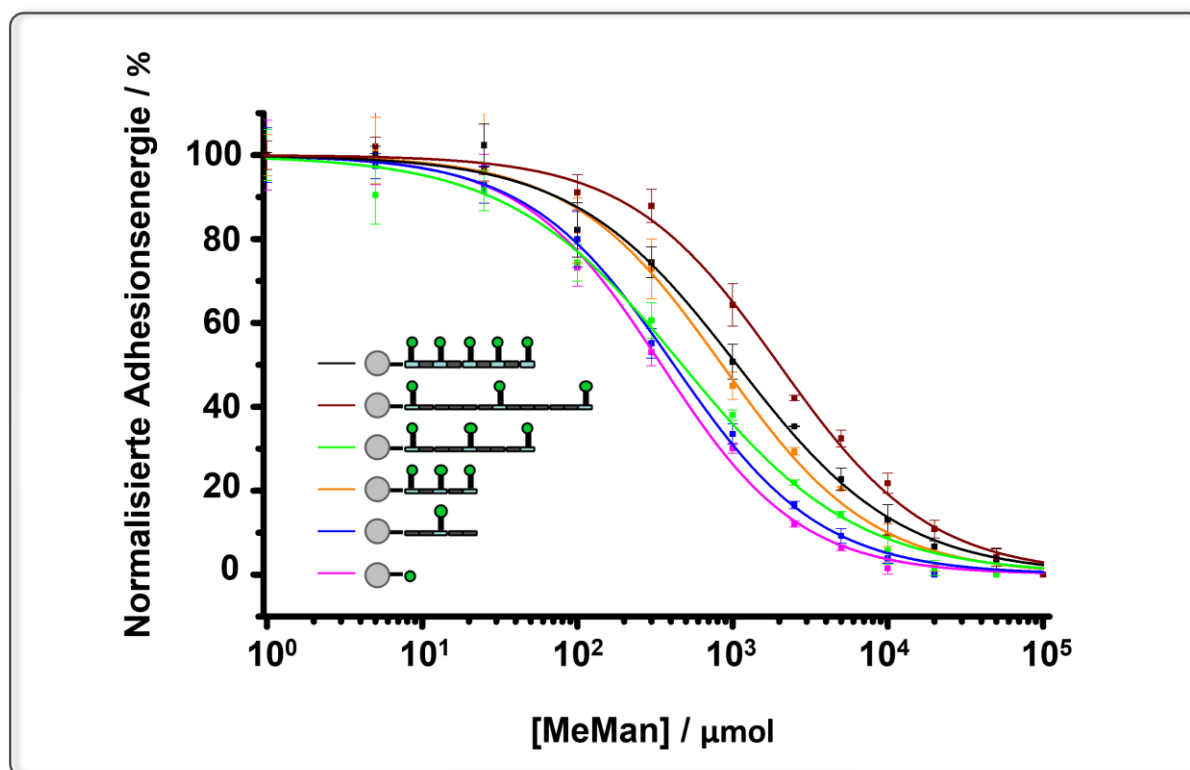


Abbildung 23: Ergebnisse der IC_{50} Inhibitionsstudien für alle Proben bei Zugabe von MeMan in unterschiedlichen Konzentrationen. Dargestellte Fehler sind Standardabweichungen aus Wiederholungen der SCP-RICM Messungen auf jeweils 3 verschiedenen Glasoberflächen und jeweils 15 gemessenen SCPs jeder Probe pro Oberfläche.

Im Vergleich zu den statistischen Effekten ist ein möglicher Einfluss durch die systematische Längenvariation der Glykooligomers weniger eindeutig. Jedoch deuten die Ergebnisse darauf hin, dass eine Erhöhung der Gesamtlänge der Glykooligomere zu größeren inhibitorischen Konzentrationen, also zu einer größeren Hemmungsresistenz, führt. Glyko-SCPs die das größte Glykooligomer (Man(1,7,13)-13) präsentieren, weisen eine außergewöhnlich hohe Inhibitor Konzentration auf. Die ermittelten IC_{50} -Werte sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

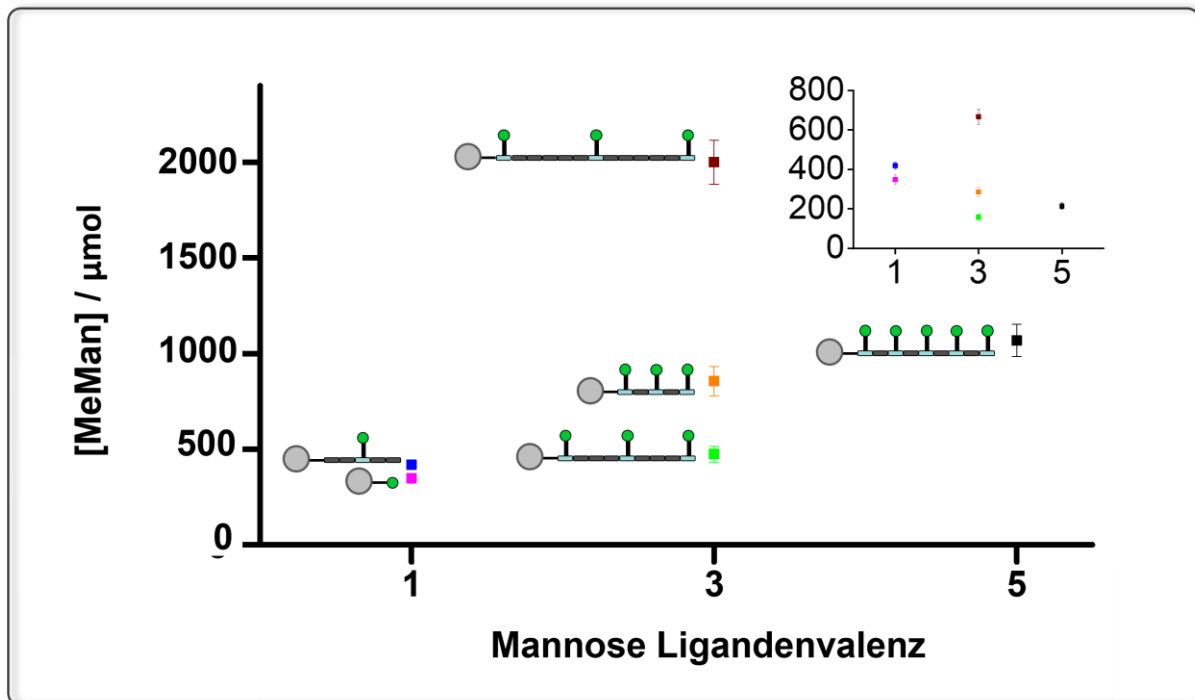


Abbildung 24: Grafische Darstellung der ermittelten IC_{50} -Werte für die verschiedenen Glyko-SCPs. Das Inset zeigt die auf die Anzahl der Man-Einheiten normierten Werte.^[172] Dargestellte Fehler sind Standardabweichungen aus Wiederholungen der SCP-RICM Messungen auf jeweils 3 verschiedenen Glasoberflächen und jeweils 15 gemessenen SCPs jeder Probe pro Oberfläche.

Die Beobachtung, dass die größeren Moleküle unter hemmenden Bedingungen eine stärkere Bindung aufweisen, könnte durch sterische Effekte erklärt werden. Größere Oligomere können größere Bereiche der immobilisierten ConA-Oberfläche abschirmen, ohne direkt zu binden. Infolgedessen wird der MeMan-Inhibitor daran gehindert, um ConA-Bindungsstellen zu konkurrieren. Daher ist die Adhäsionsenergie für größere Glykooligomere erhöht.

Nachdem in diesem Teil der Arbeit das Bindungsverhalten der Glykooligomere anhand der Adhäsion der Glyko-SCPs an Glasoberflächen mit immobilisiertem ConA untersucht wurde, sollten die erhaltenen Ergebnisse mittels weiterer, sich im Aufbau unterscheidender Assays, weiter ergründet werden. Als nächstes wurde das Bindungsverhalten der Glyko-SCPs mit fluoreszenzmarkiertem ConA in Lösung mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

3.2.3 Spezifische Bindung von gelöstem ConA an Glyko-SCPs

Während die verschiedenen Glykooligomere an den SCPs immobilisiert sind, kann das gelöste ConA frei diffundieren. Für die direkten Bindungsstudien wurden die SCP-Dispersionen zunächst mit fluoreszenzmarkiertem ConA inkubiert und anschließend mit einer Pufferlösung

gewaschen, um nicht gebundenes ConA zu entfernen. Anschließend wurde die Fluoreszenzintensität mittels Fluoreszenzmikroskopie gemessen, um die Menge des gebundenen ConA zu bestimmen. Für die Inhibitionsstudien wurden anschließend die Menge von gebundenen ConA in Anwesenheit von MeMan gemessen.

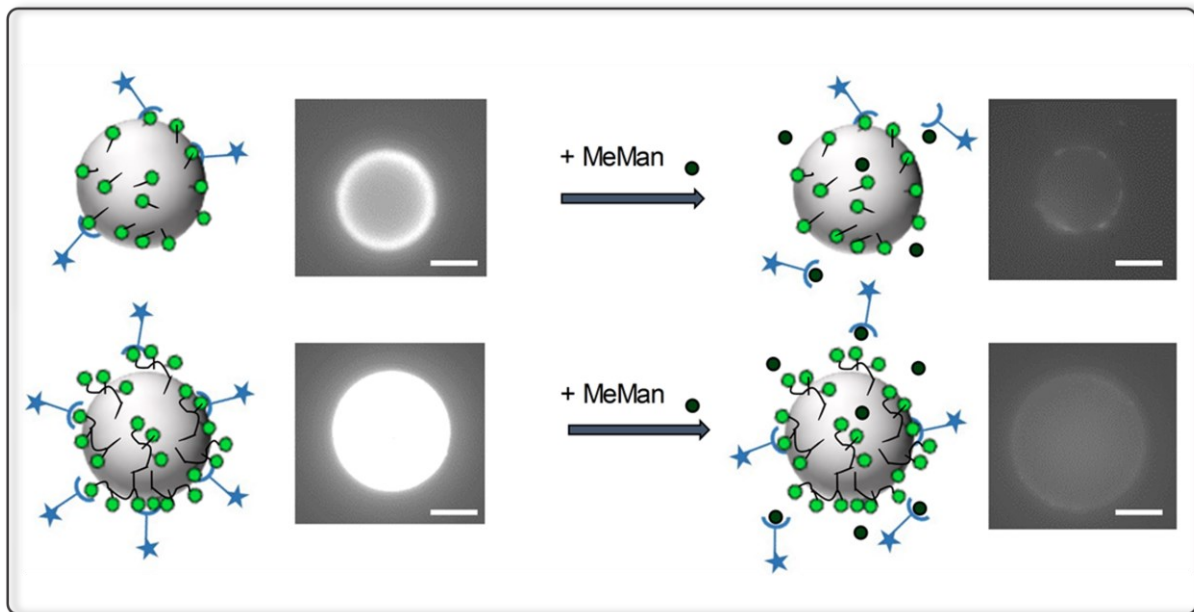


Abbildung 25: Bindung von fluoreszenzmarkiertem ConA an Glyko-SCPs vor (links) und nach Hemmung mit 5 mM MeMan (rechts) für Man-1 (oben) und Man(1,3,5)-5 SCP (unten).^[172]

Insgesamt weisen die direkten Bindungsstudien mittels Fluoreszenz die gleichen Trends wie bei den SCP-RICM Adhäsionsstudien mit den Glyko-SCPs auf. Zum einen konnte eine verstärkte Bindung mit einer größeren Anzahl von Man-Liganden und der damit erhöhten lokalen Man-Verfügbarkeit beobachtet werden. Weiterhin wurden für längere Oligomere eine tendenziell geringere Bindung beobachtet. Die Ergebnisse für die Probenreihe sind in der folgenden Grafik dargestellt.

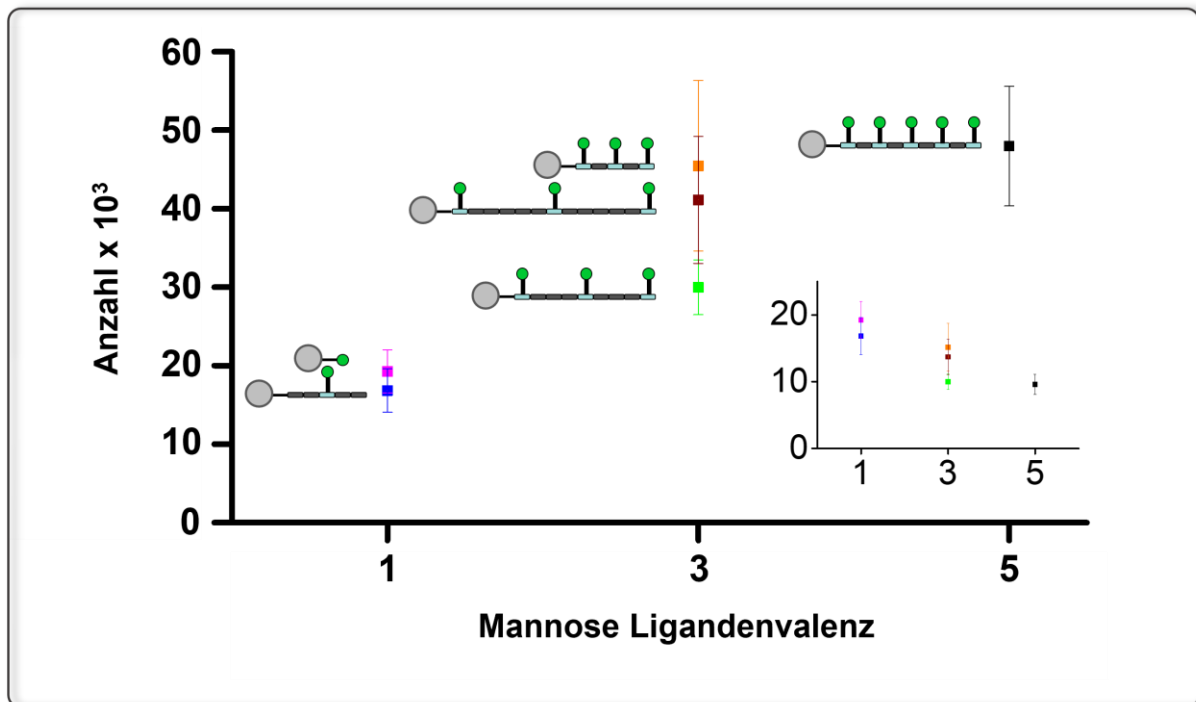


Abbildung 26: Direkte Bindung von fluoreszenzmarkiertem ConA an Glyko-SCPs. Dargestellte Fehler sind Standardabweichungen aus 3 Wiederholungen des Fluoreszenz-Assays mit jeweils 10 gemessenen SCPs jeder Probe.

Für die darauf aufbauenden Inhibitionsstudien wurde die Menge des gebundenen ConA zusätzlich in Gegenwart von 5 mM MeMan als Inhibitor bestimmt. Die Zugabe des Inhibitors führt zu einer verringerten Fluoreszenz, also einer verminderten Bindung von fluoreszenzmarkiertem ConA, der SCPs für alle Proben. Die Inhibition der ConA-Bindung ist als Reduktion der Fluoreszenzintensität nach Zugabe von MeMan dargestellt (Abbildung 27).

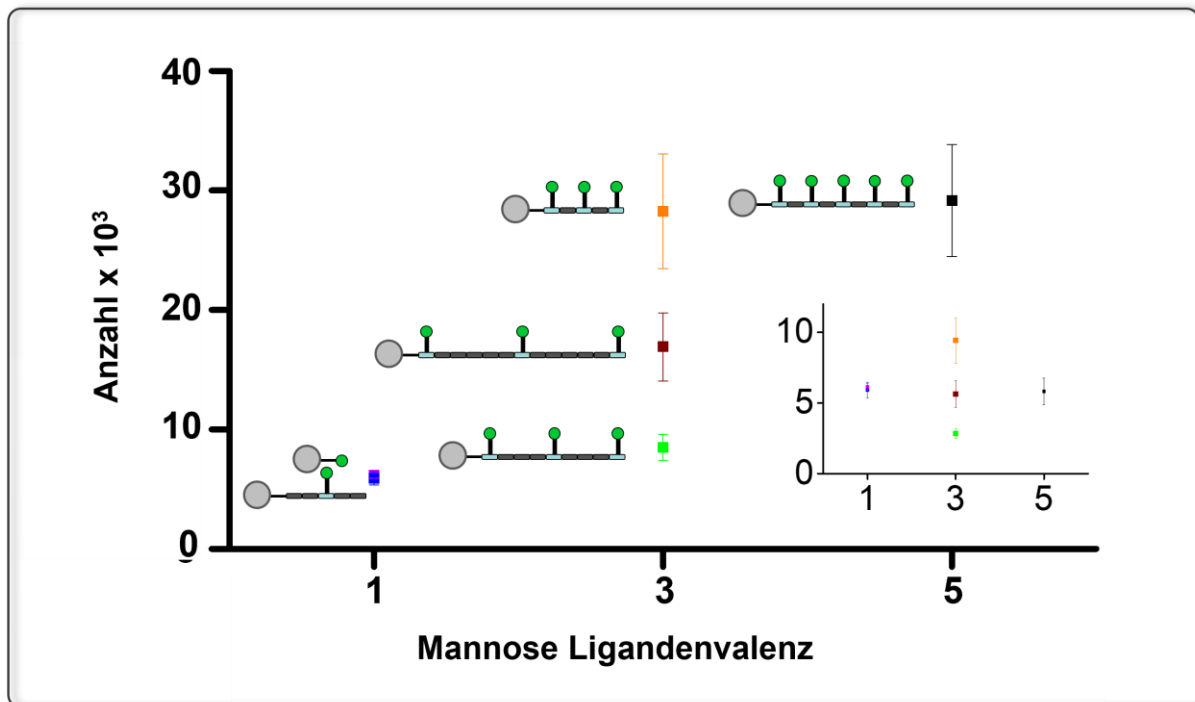


Abbildung 27: Fluoreszenzintensität nach Inhibition mit 5 mM MeMan. Das Inset zeigt die auf Man-Einheiten normierten Werte. Dargestellte Fehler sind Standardabweichungen aus 3 Wiederholungen des Fluoreszenz-Assays mit jeweils 10 gemessenen SCPs jeder Probe.

Die Inhibition der ConA Bindung an die Glyko-SCPs weist in diesem Assay in Bezug auf die Anzahl der Man-Einheiten die gleichen Trends wie bei den SCP-Adhäsionsstudien auf (Abbildung 23). So kann auch in diesem Assay beobachtet werden, dass eine Erhöhung der lokalen Ligandendichte zu einer verringerten Inhibition führt.

Dagegen führt eine Erhöhung der Ligandengröße zu einer verstärkten Inhibition. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen aus den Adhäsionsstudien, bei den insbesondere für den größten Liganden Man(1,7,13)-13 eine signifikant höhere inhibitorische Konzentration festgestellt wurde. Das ist ein erster Hinweis darauf, dass sich das Bindungsverhalten je nach Bedingungen, also in diesem Fall gelöstem anstelle von immobilisiertem ConA, unterscheidet. Bei der fluoreszenzmikroskopischen Ermittlung war an den SCPs mit dem trivalenten Man(1,3,5)-5 in Anwesenheit von MeMan mehr ConA gebunden als an den Man(1,7,13)-13. Somit könnten sterische Abschirmungseffekte an Grenzflächen einen größeren Einfluss als bei gelöstem, frei beweglichen ConA haben.

Für die weitere Aufklärung wurden ITC-Studien, in denen sich sowohl die Glykooligomere als auch das ConA in Lösung befinden, durchgeführt.

3.2.4 Bindungsverhalten von gelösten Glykooligomeren und ConA mittels ITC

In den bisher vorgestellten Assays war mindestens ein Bindungspartner, Glykooligomer oder ConA, auf den SCPs oder einer Glasoberfläche immobilisiert. Zum weiteren Vergleich wurden ITC-Messungen, bei denen beide Bindungspartner frei in der Lösung diffundieren, durchgeführt (Kapitel 1.6.1). Bei diesem Assay wurden die Glykooligomere in eine Messzelle, in der sich das gelöste ConA befindet, titriert. Interessanterweise weisen die Ergebnisse der ITC-Studien einen ähnlichen Trend wie bei den Oberflächenbindungsexperimenten auf. Genauer gesagt konnte beobachtet werden, dass eine Steigerung der freien Bindungsenergie einer steigenden Anzahl von Mannoseeinheiten korreliert.

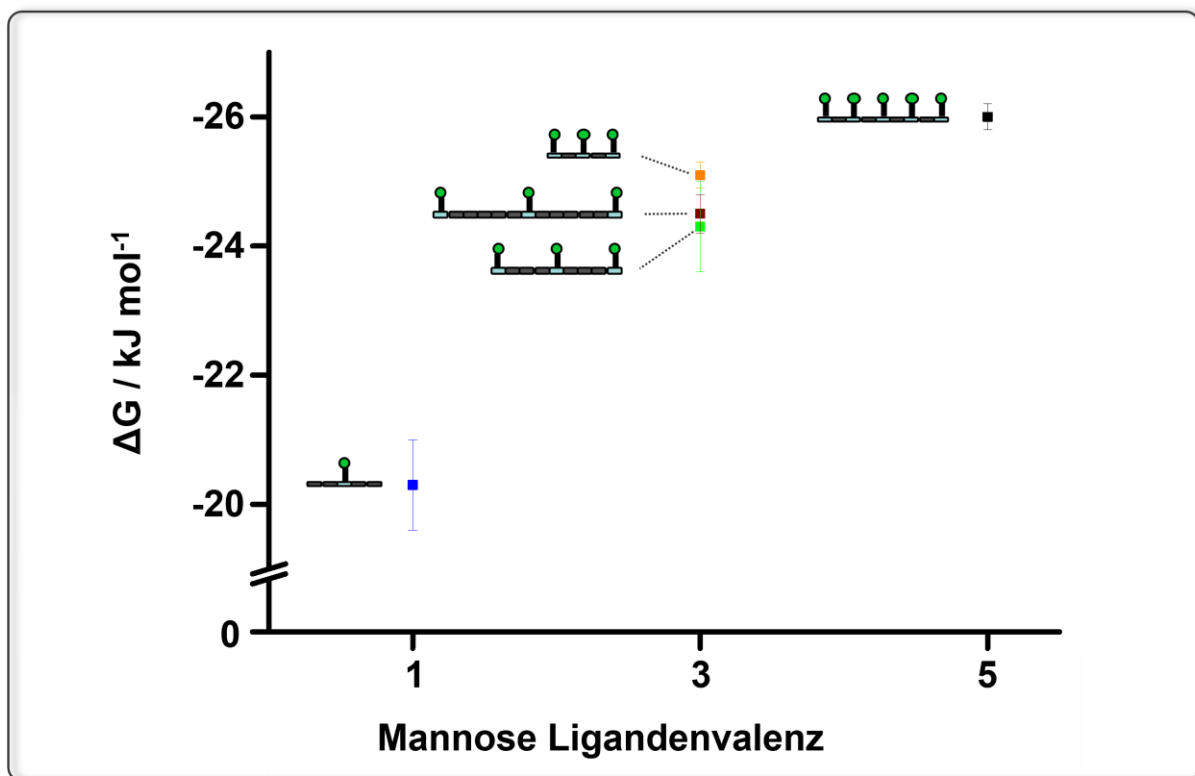


Abbildung 28: Mittels ITC gemessene freie Energie ΔG von gelösten Glykooligomeren und ConA. Dargestellte Fehler sind Standardabweichungen aus 3 Wiederholungen des ITC Assays für jede Probe.

Auch hier wurde der ungewöhnliche Trend zwischen der Gerüstlänge und der Bindungsenergie für die dreiwertigen Systeme bestätigt. Der längste trivalente Ligand Man(1,7,13)-13 zeigte eine erhöhte Bindungsenergie im Vergleich zu Man(1,5,9)-9, während der kürzeste trivalente Ligand Man(1,3,5)-5 die höchste Bindungsenergie aufwies.

Das in den drei verschiedenen Assays ermittelte Bindungsverhalten der verschiedenen Glykooligomere weist auf einen Einfluss der Ligandenanzahl, der Ligandendichte sowie der Größe des Oligomergerüsts hin. Außerdem konnten Unterschiede hinsichtlich gelösten und immobilisierten Bindungspartnern festgestellt werden und sollen im Folgenden genauer diskutiert werden.

3.2.5 Stärkere Bindung durch die Erhöhung der Ligandenanzahl

Zunächst sollen die Auswirkungen der Anzahl der Man-Einheiten auf dem Oligomergerüst beschrieben werden. Grundsätzlich weisen die Ergebnisse der drei verschiedenen durchgeführten Bindungsstudien einen ähnlichen Trend auf (Abbildung 21, 22, 26, 28). Insgesamt konnte ermittelt werden, dass bei Erhöhung der Anzahl der Man-Einheiten erwartungsgemäß die direkte Bindung zwischen Glykooligomeren und ConA erhöht wird. Eine Erhöhung der Man-Einheiten auf dem Oligomergerüst von 1 auf 3 führt zu einer Erhöhung der Adhäsionsenergie zwischen Glyko-SCPs und oberflächenimmobilisiertem ConA um den Faktor 2. Der deutliche Anstieg bei den dreiwertigen gegenüber den einwertigen Strukturen kann durch einen statistischen Effekt, also aufgrund des additiven Bindungsbeitrags der einzelnen Man-Einheiten, erklärt werden. Eine weitere Erhöhung der Man-Einheiten von dreiwertigen zu pentavalenten Molekülen führte jedoch nicht zu einer signifikanten Erhöhung der Bindung. Dies kann auf einen größeren sterischen Anspruch sowie auf einen möglichen coiling Effekt, wodurch die Man-Einheiten für eine ConA Bindung weniger zugänglich sind, zurückgeführt werden. Zur Bestätigung wurde die Bindung unter inhibitorischen Bedingungen durch Zugabe von MeMan als Inhibitor getestet (Abbildung 24, 30). Dabei wiesen, wie erwartet, Glykooligomere mit mehr Zuckern höhere inhibitorische Konzentrationen auf, das heißt sie konnten in Anwesenheit des Inhibitors stärker an ConA binden.

Allerdings konnte auch beobachtet werden, dass für die Inhibition der Bindung des längsten trivalenten Glykooligomers Man(1,7,13)-13 höhere MeMan-Konzentrationen benötigt wurden. Dies deutet auf ein anderes Bindungsverhalten hin und soll im nächsten Kapitel erläutert werden.

3.2.6 Einfluss der Gerüstlänge auf das Bindungsverhalten

Sowohl für die monovalenten als auch für die trivalenten Glykooligomere wurde die Länge des Gerüsts variiert. Bei den monovalenten Strukturen führten die zusätzlichen EDS-Bausteine in Man(3)-5 zu einem geringen, aber über alle Bindungsstudien hinweg konsistenten Rückgang der Affinität im Vergleich zu direkt and die SCPs gebundener Mannose (Man(1)). Bei den trivalenten Strukturen ist der Einfluss des eingefügten EDS-Spacers weniger deutlich. Die kürzeste Kette mit zwei EDS-Spacern zwischen den Man-Einheiten Man(1,3,5)-5 bindet im Vergleich zu den anderen trivalenten Strukturen deutlich stärker (bis zu einem Faktor von 1,5). Werden allerdings die beiden trivalenten Strukturen mit drei oder 5 EDS-Spacern zwischen den Man-Einheiten verglichen, zeigt die längere Struktur Man(1,7,13)-13 eine stärkere Bindung gegenüber von Man(1,5,9)-9 in allen Assays auf. Dieser auf den ersten Blick widersprüchliche Effekt der Kettenlänge und des Abstands der Man-Liganden auf die ConA-Bindung könnte auf verschiedene Einflüsse zurückzuführen sein. Einerseits führt, unter Annahme des idealen Knäuels, die Verlängerung der Gerüstlänge zu einer proportionalen Erhöhung der durch Konformationsänderungen resultierenden Entropie. Daraus folgt eine Erhöhung der Entropie bedingten Abstoßung, wodurch die Bindungsaffinität insgesamt verringert wird. Andererseits ermöglicht eine größere Gerüstlänge weitere multivalente Effekte, in dem zum Beispiel weitere Bindungstaschen erreicht werden können, wodurch die Bindung verstärkt wird. Entropiebedingte Abstoßungseffekte für multivalente Liganden mit flexiblen Spacern sind in der wissenschaftlichen Literatur beschrieben.^[62, 174] Insbesondere bei Kettensegmenten mit Oligo(ethylenglykol)-Spacer, ähnlich zum verwendeten EDS-Baustein, ist von einer erhöhten molekularen Flexibilität und sterischer Abstoßung auszugehen. Daher kann die insgesamt hohe Affinität des kürzesten monovalenten Liganden (Man-1) sowie des kürzesten trivalenten Liganden Man(1,3,5)-5 auch auf eine geringere sterische Abstoßung zurückgeführt werden.

Die Zunahme der Affinität für das längere trivalente Oligomer Man(1,7,13)-13 könnte aus der größeren räumlichen Reichweite und damit einer möglicherweise gleichzeitigen Bindung an zwei ConA Bindungsstellen (kürzester Abstand 7,2 nm) resultieren. Zur weiteren Untersuchung dieses potenziellen Effekts wurden die theoretischen Moleküldimensionen der Glykooligomere mittels Molekulardynamiken berechnet. Die Simulationen wurden von Andrea Grafmüller am Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung

durchgeführt. Die Berechnungen deuten auf Molekülknäuel mit einem Trägheitsradius von 0,7-1 nm und Abständen von etwa 2 nm zwischen den Man-Einheiten hin.

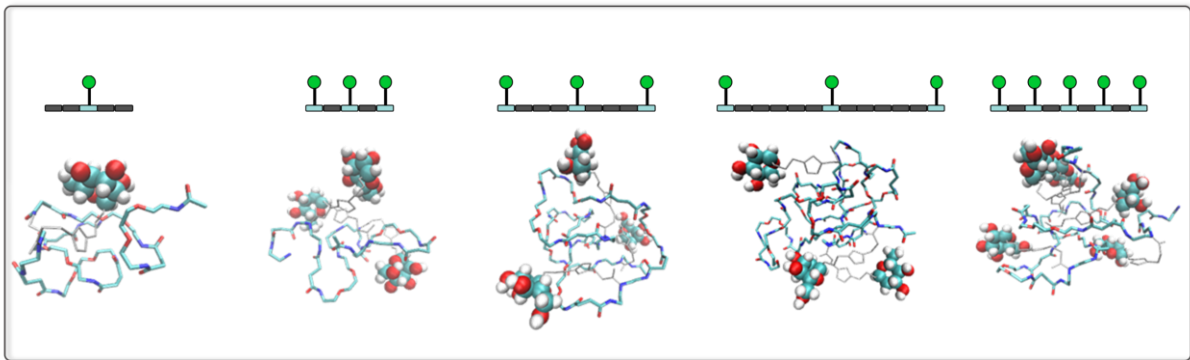


Abbildung 29: Modelling Daten von Andrea Grafmüller. Visualisierte Glykomakromoleküle mit schematisch dargestellter Struktur und Strukturen aus der Molekularen Modellierung.

Aus den Berechnungen folgt, dass die Abstände zwischen den Man-Einheiten zu kurz sind, um mehrere ConA Bindungsstellen zu erreichen, jedoch konnte gezeigt werden, dass als Knäuel vorliegende, flexible Gerüste in Gegenwart von Rezeptoren gestreckt werden können.^[175] Das kann zu einer Kompensation von Entropieverlust durch einen Enthalpiegewinn durch *multisite binding* führen. Unter der Annahme einer vollständig gestreckten Konformation würden die Abstände der endständigen Man-Einheiten 9 nm, 13 nm bzw. 20 nm für die trivalenten Strukturen betragen, und wären damit in der Lage die Distanz von 7,2 nm zwischen den ConA Bindungstaschen zu überbrücken. Anhand der vorliegenden Daten kann jedoch noch nicht darauf geschlossen werden, ob solche Konformationsänderungen bei der Rezeptorbindung für die hier untersuchten Glykooligomere auftreten. Um potenzielle Konformationsänderungen bei der Rezeptorbindung zu beobachten, könnten zukünftig Glykomakromoleküle in einem ähnlichen Größenbereich unter Verwendung von FRET- oder Spin-Markern genauer untersucht werden.^[175]

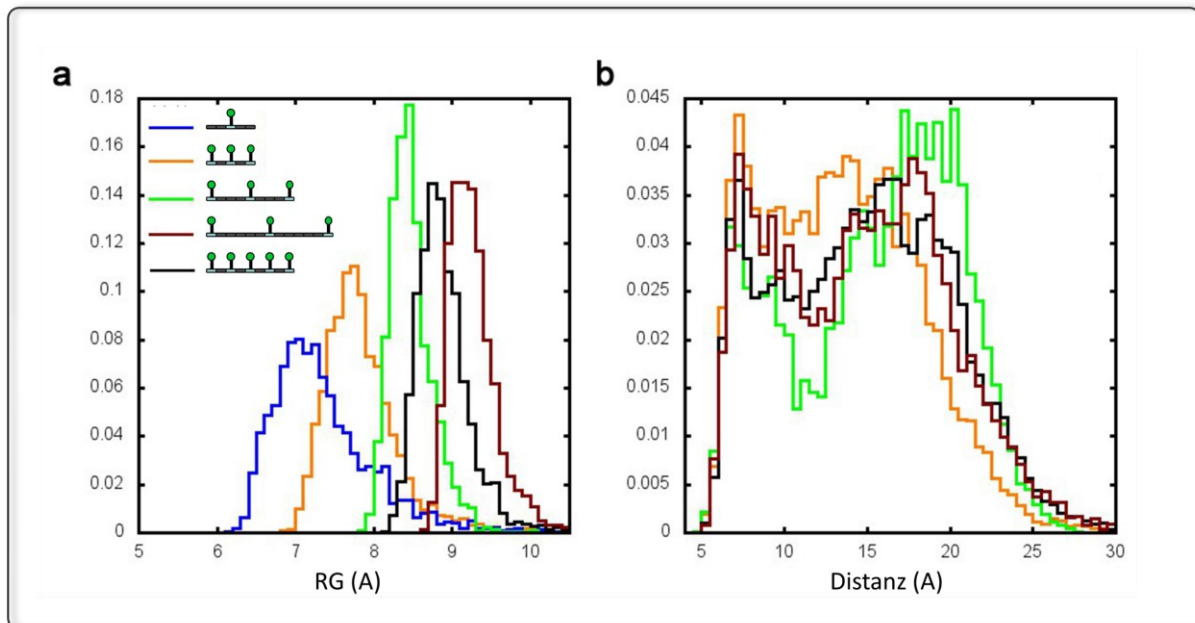


Abbildung 30: Modelling Daten von Andrea Grafmüller. Analyse der Größe von Glykooligomeren durch molekulare Modellierung a) Trägheitsradius b) Abstand zwischen terminalen Ligandeneinheiten.^[172]

Die Ergebnisse der Studien sind im Folgenden kurz zusammengefasst. Mit dem Fokus auf eine multivalente Präsentation von mono- und multivalenten Glykooligomeren wurde eine Reihe von sequenzdefinierten Strukturen mit unterschiedlichen Abständen und Anzahl der Mannoseeinheiten synthetisiert und auf die Glykooligomer-ConA-Bindungsaffinität hin untersucht. Sowohl direkte Bindungs- als auch Inhibitionsstudien zeigten eine höhere Affinität mit zunehmender Anzahl von Zuckereinheiten, die jedoch bei höherwertigen Systemen abnimmt, was auf sterische Effekte hindeutet. Darüber hinaus deuten die Ergebnisse darauf hin, dass mit zunehmender Gerüstellänge die Bindung aufgrund entropischer Abstoßung abnimmt, was durch größere Gerüste, die mehrere ConA-Bindungsstellen erreichen können, kompensiert werden könnte. Diese Ergebnisse waren in allen Assays (Adhäsion, Fluoreszenz und ITC) unabhängig von der Immobilisierung des Bindungspartners konsistent. Das zeigt, dass flexible Liganden in Lösung und in Verbindung mit Polymernetzwerken ähnliche Bindungsmodi aufweisen, was für die Entwicklung glykofunktionalisierter Materialien von Bedeutung ist.

Im folgenden Teil der Arbeit werden die Ergebnisse weiterer Untersuchungen zu sterischen Abschirmungseffekten mittels PEGylierter Strukturen vorgestellt und diskutiert.

3.3 Untersuchung von sterischen Abschirmungseffekten mit PEGylierten Präzisionspolymeren

3.3.1 Beschreibung des Studienaufbaus

Diese Studie zielt darauf ab, den sterischen Abschirmungseffekt von multivalenten Glykokonjugaten zu quantifizieren, indem ihr Potenzial, Kohlenhydrat bindende Taschen von Lektinen schwerer zugänglich zu machen, untersucht wird. Dabei sollen PEGylierte und nicht-PEGylierte Glykokonjugate als Inhibitoren von Lektinen untersucht werden, um den sterischen Abstoßungseffekt der PEG-Ketten zu bewerten. Auch in diesen Studien wird der in den vorherigen Kapiteln beschriebene SCP-RICM Adhäsionsassay verwendet. Dabei wird die Veränderung der Adhäsionsenergie von mit monovalenten Man-Liganden dekorierten Hydrogel Partikeln auf einer Schicht aus ConA in Gegenwart sequenzdefinierter multivalenter Glykokonjugate als Inhibitoren über einen bestimmten Zeitraum gemessen. Eine sterische Abschirmung liegt vor, wenn ein bereits gebundener Ligand aufgrund seiner Größe andere Bindungsstellen des Rezeptors verdeckt und dadurch das Inhibitions Potenzial des Liganden erhöht. Daher stellt die Maximierung der sterischen Abschirmung von Glykokonjugaten eine vielversprechende Möglichkeit für die Entwicklung von Inhibitoren für die Adhäsion von Pathogenen dar. Bei polymeren Inhibitoren für die Verhinderung der Adhäsion von Krankheitserregern spielen wahrscheinlich sowohl sterische Abschirmungseffekte durch den Ausschluss von Bindungsstellen als auch entropische Abstoßungseffekte eine wichtige Rolle (Kap. 1.4). Die Entwicklung von Glykokonjugaten zielte bislang darauf ab, die direkte Bindung oder Avidität an Lektine zu maximieren, woraus eine Verringerung der Adhäsion von Krankheitserregern resultiert.

Um die Auswirkung der sterischen Abstoßung bei der Entwicklung von Inhibitoren für die Adhäsion von Krankheitserregern zu erforschen, wurden Glykooligomere mit einer PEG-Kette modifiziert, um das inhibitorische Potenzial mit den von nicht-PEGylierten Strukturen zu vergleichen. Die hergestellten Glykokonjugate unterschieden sich in der Ligandenanzahl sowie dem Interligandenabstand und wurden mittels der zuvor beschriebenen SPPoS-Methode hergestellt.

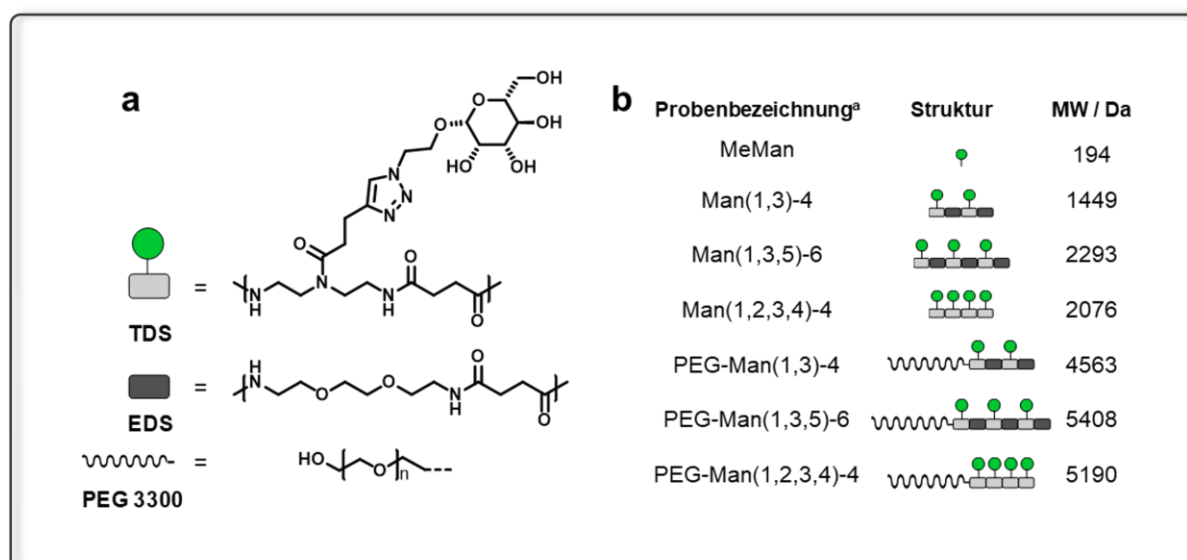


Abbildung 31: a) Schematischer Überblick über die Glykooligomer-Bausteine. b) Die Glykooligomer-Namen zeigen die Position der Man-Einheit auf dem Gerüst in der Klammer, die Zahl am Ende gibt die Gesamtzahl der Bausteine an.

Durch Variation der Reihenfolge der Bausteine während des Strukturaufbaus wurden die Position und Anzahl der Man-Liganden sowie die Gesamtlänge der Glykooligomere gesteuert. Die PEGylierten Glykooligomere wurden unter Verwendung eines Trägermaterials, in diesem Fall des Tentagel SRAM-Harzes (PEG = 3,3 kDa) hergestellt. Nach Abspaltung vom Trägermaterial wurden die angestrebten Strukturen erhalten.

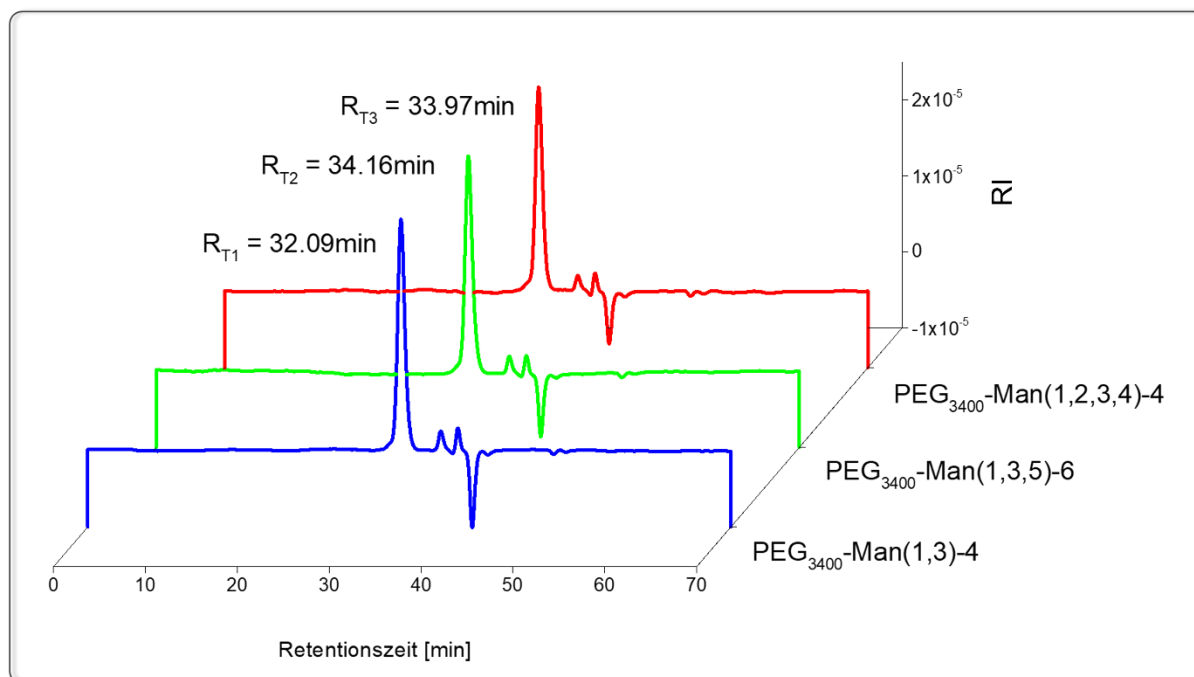


Abbildung 32: Ergebnisse der Größenausschluss-Chromatographie (Lösungsmittel H_2O) der hergestellten PEGylierten Strukturen.

Insgesamt wurden drei PEGylierte und drei dazu analoge nicht-PEGylierte Strukturen synthetisiert. Bei Man(1,2,3,4)-4 und dem PEGylierten Äquivalent wurden vier Man-funktionalisierte TDS-Bausteine aneinandergereiht, ohne dazwischen EDS-Spacer einzubauen. Man(1,3)-4, Man(1,3,5,4)-6 und ihre PEGylierten Äquivalente wurden mit zwei bzw. vier Man-Resten mit jeweils einem EDS-Spacer dazwischen funktionalisiert.

3.3.2 Studien zur Adhäsionshemmung im Vergleich zur direkten Bindung an ConA

Durch die Anwendung des SCP-RICM Assays wurde das Inhibitionspotenzial der verschiedenen Verbindungen durch die Veränderung der Adhäsionsenergie vor und nach Zugabe der Strukturen quantifiziert. Zum Vergleich wurden direkte Bindungstests mittels SPR-Spektroskopie durchgeführt. Im Folgenden werden die Ergebnisse der durchgeführten Assays diskutiert.

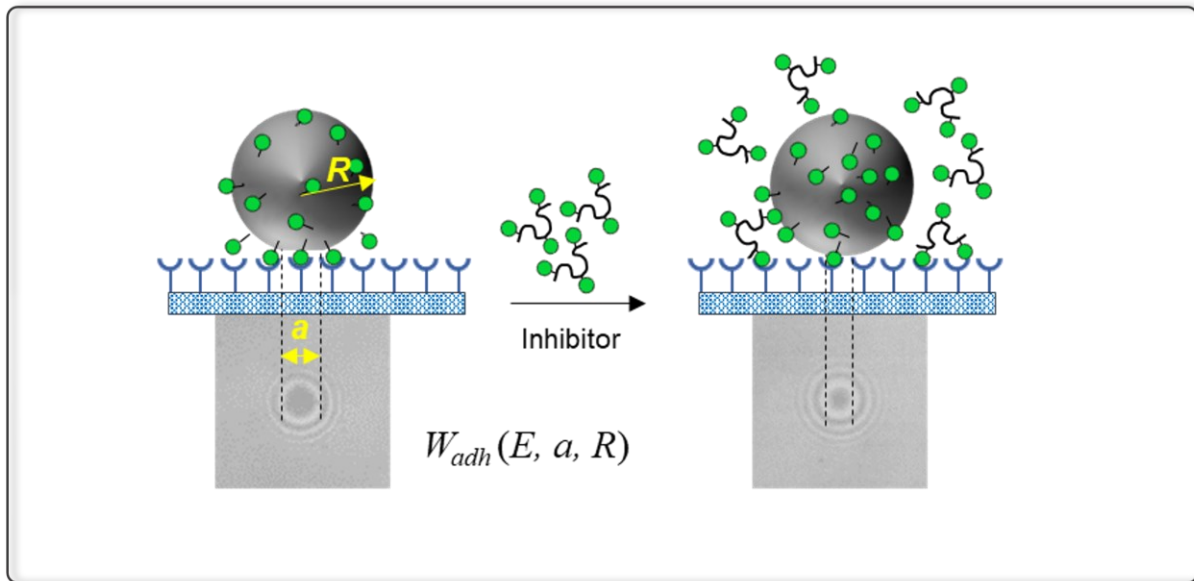


Abbildung 33: Die Adhäsionsenergien der Man-funktionalisierten SCPs auf dem Glasobjektträger wurden mit Hilfe des JKR-Modells durch Auswertung des SCP-Interferenzmusters quantifiziert.

Nach der Sedimentation und Adhäsion der mit monovalenten Man-Liganden modifizierten Glyko-SCPs wurden die Kontaktflächen aufgenommen und durch das in Kapitel 1.6.3 eingeführte JKR Modell quantifiziert. Für alle Proben konnte eine Abnahme der Adhäsionsenergie im Zeitverlauf festgestellt werden. Die folgende Abbildung zeigt exemplarisch die Veränderung der ermittelten Kontaktradien direkt nach Zugabe der Inhibitoren, sowie nach 10 min und 90 min.

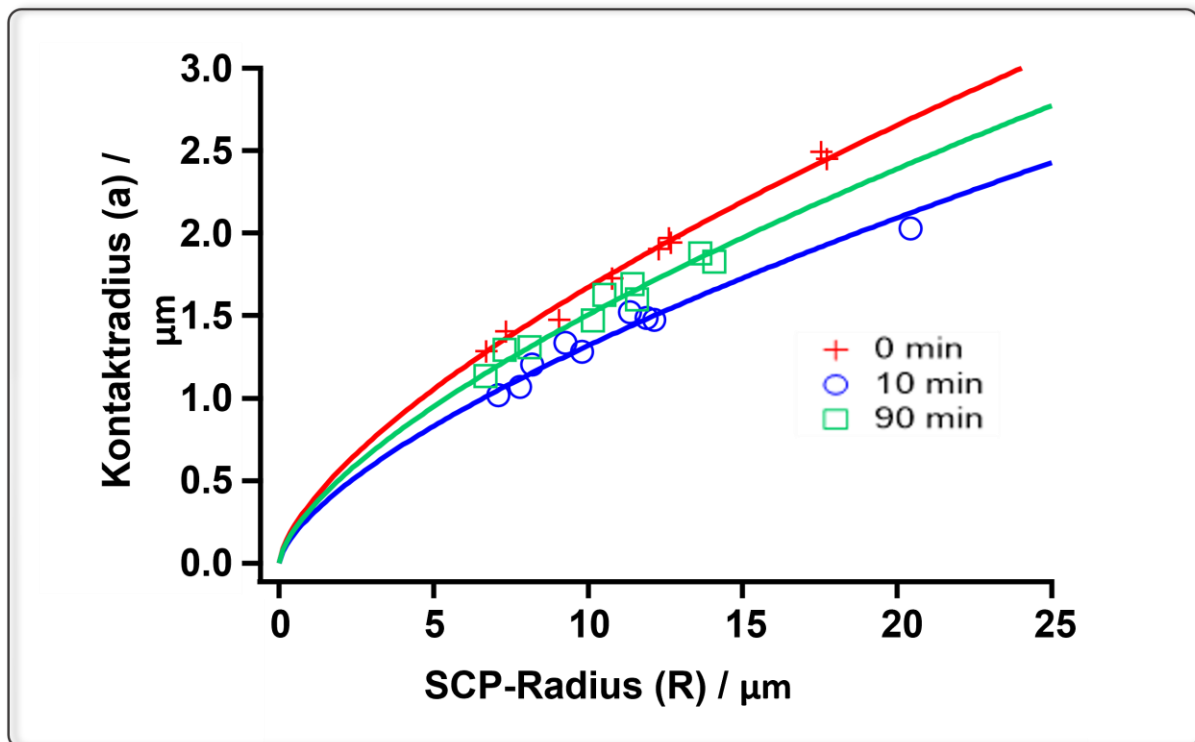


Abbildung 34: Die dargestellten Diagramme zeigen, dass die Kontakttradien der anhaftenden SCPs bei längeren Inkubationszeiten des Inhibitors abnehmen.

Zur Quantifizierung der Adhäsionsenergie aus der Kontaktfläche zwischen den Glyko-SCPs mit der ConA-Oberfläche wurden der Kontakttradius a und der SCP-Radius R anhand der RICM-Bilder ausgewertet (Abbildung 34). Mit dem zuvor bestimmten SCP Elastizitätsmodul Y_M und der Annahme einer Poissonzahl ν von 0,5 wurde die Adhäsionsenergie mit Hilfe des bereits eingeführten JKR-Modells vor Zugabe des jeweiligen Glykooligomer Inhibitors, sowie in bestimmten Zeitabständen in Anwesenheit des Inhibitors gemessen. Die Kontaktflächen der SCPs nach vollständiger Sedimentation (Äquibrierungsdauer = 60 min) auf der ConA-Oberfläche gemessen und als Ausgangswert festgelegt. Anschließend wurde, mit dem Ziel die bestehende Adhäsion mit den Inhibitoren zu reduzieren, pro Messzelle ein Glykooligomer (200 μM) aus der oben beschriebenen Reihe hinzugegeben. Die Veränderung der Kontaktfläche wurde in festen Zeitabständen direkt nach Zugabe der Oligomere, sowie nach 10min, 30 min, 90 min und 12 h quantifiziert. Es konnte beobachtet werden, dass die Zugabe der Glykooligomere zu einer kompetitiven Bindung zwischen den Man-Einheiten an den SCPs und den Man-Einheiten an den Glykooligomeren führt, da beide an die ConA-Schicht binden. Der inhibierenden Wirkung der Glykooligomere lässt sich direkt aus den abnehmenden

Kontaktflächen mit fortschreitender Inkubationszeit (Abbildung 35) für alle Glykooligomere herleiten. Anhand der Grafik kann auf eine relativ langsame Reduktion der Adhäsion geschlossen werden. So sind innerhalb der ersten 10 min und auch nach 30 min noch keine signifikanten Unterschiede im inhibitorischen Potenzial festzustellen. Ein Gleichgewicht wurde erst nach mehreren Stunden Inkubationszeit erreicht.

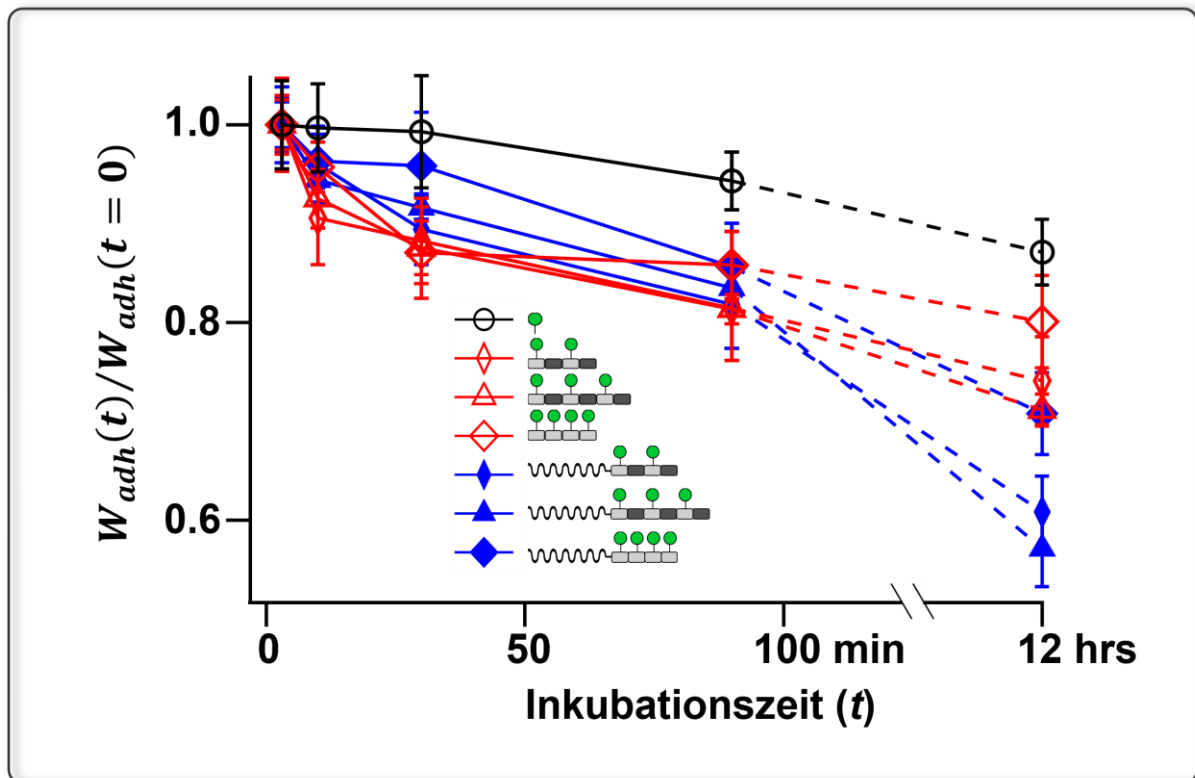


Abbildung 35: Reduktion der SCP-Adhäsionsenergie als Funktion der Inkubationszeit mit dem Glykooligomer. Die Gleichgewichtswerte wurden nach 12 Stunden Inkubation ermittelt.

Im Gleichgewicht stieg die Reduktion der Adhäsionsenergie mit der Anzahl der Man-Einheiten auf dem Gerüst von zwei- zu dreiwertigen Glykooligomeren. Interessanterweise war das tetravalente Glykooligomer der schwächste Inhibitor in dieser Reihe. Dies könnte auf die dichte Anordnung von Man auf dem Oligomergerüst und der daraus potenziell resultierenden sterischen Hinderung, die ihre Zugänglichkeit für eine Bindung verringern, zurückzuführen sein. Eine wichtige Beobachtung war, dass die PEGylierten Glykooligomere zu einer stärkeren Reduktion der SCP-Adhäsionsenergien führten. Diese Beobachtung konnte auch in Bindungsstudien in denen die gleiche Reihe der Glykooligomere direkt an ConA-Oberflächen gebunden und mittels SPR gemessen wurden, bestätigt werden. Hier zeigten alle PEGylierten Glykooligomere eine geringere Bindung im Vergleich zu ihren nicht-PEGylierten Gegenstücken

(Abbildung 37). Zum Beispiel führte PEG-Man(1,3,5)-6 im SCP-Assay zu einer um 42 % geringeren Adhäsion und zeigte eine Dissoziationskonstante (KD) von 143 μM im SPR-Assay. Im direkten Vergleich dazu führte das nicht PEGylierte Oligomer Man(1,3,5)-6 zu einer um 28 % reduzierten Adhäsion, zeigte bei der direkten Bindung an ConA im SPR aber eine stärkere Bindungsaffinität ($K_D = 83 \mu\text{M}$). In der folgenden Grafik ist die normalisierte Adhäsionsenergie nach 12-stündiger Inkubation in Abhängigkeit vom Molekulargewicht der eingesetzten Struktur dargestellt. Die ermittelte Adhäsion ist für die drei PEGylierten Strukturen um 10-14 % geringer als für ihre Vergleichsstrukturen ohne zusätzliches PEG.

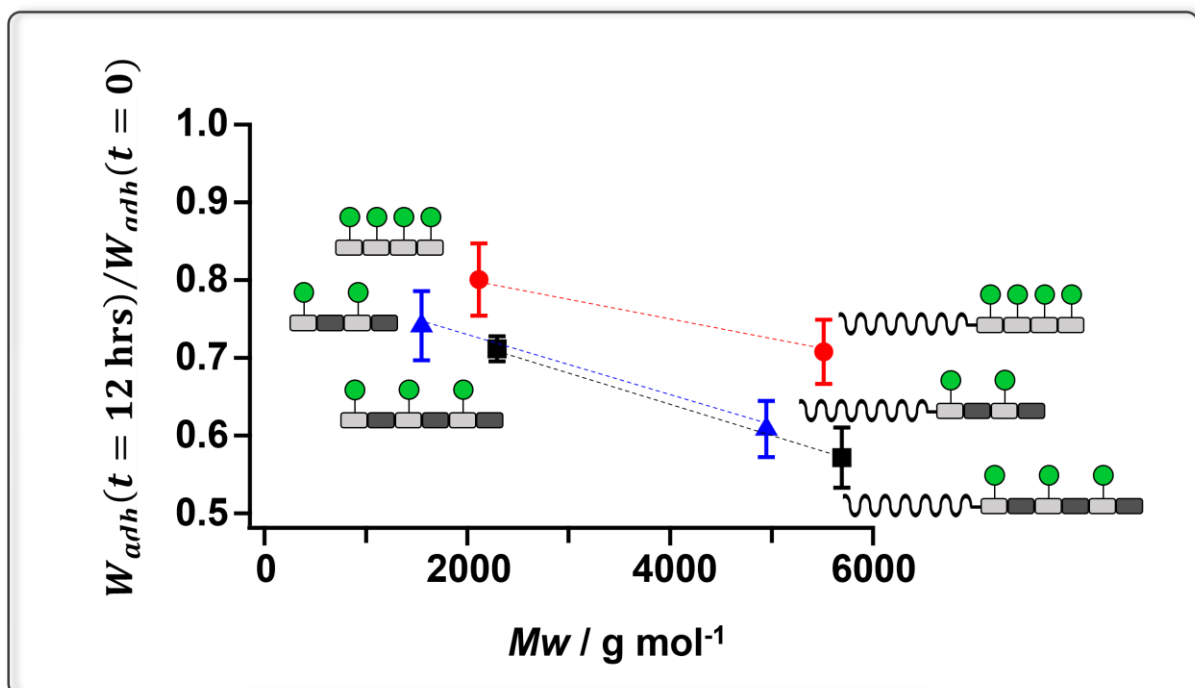


Abbildung 36: Direkter Vergleich zwischen nicht-PEGylierten und PEGylierten Oligomeren. Relative SCP-Adhäsionsenergie nach 12-stündiger Inkubation, normalisiert durch den Ausgangsadhäsionswert.

Auch in früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass PEGylierte Glykokonjugate im Vergleich zu nicht PEGylierten Strukturen eine reduzierte Affinität aufweisen. So zeigten beispielsweise Fernandez-Villamarin et al. mittels SPR und isothermischer Titrationskalorimetrie, dass Glykokonjugate mit zunehmender Größe von konjugiertem PEG geringere Affinität zur Bindung an Lektinen besitzen.^[176] Die Ergebnisse der SPR-Studien für die eingesetzten Strukturen bestätigen diesen Trend und sind im Folgenden dargestellt.

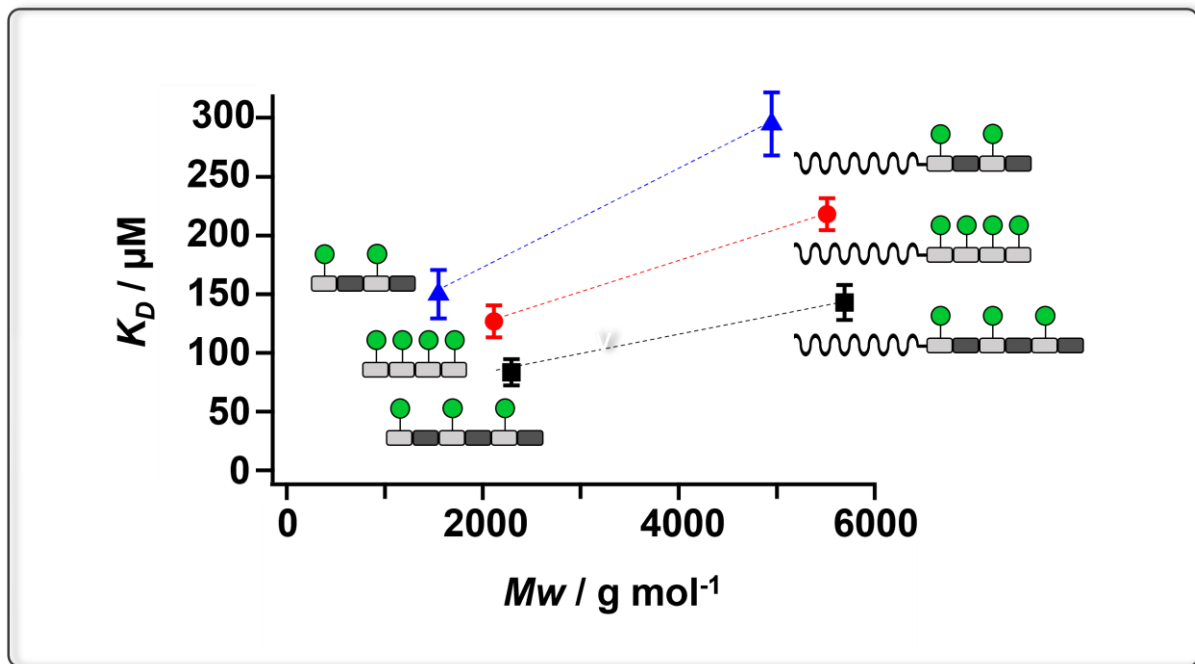


Abbildung 37: Direkter Vergleich zwischen nicht-PEGylierten und PEGylierten Oligomeren. b) K_D -Werte, gemessen durch SPR auf ConA-Oberflächen.

In dieser Abbildung ist der ermittelte K_D -Wert gegen das Molekulargewicht der eingesetzten Strukturen aufgetragen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Anwesenheit des PEG-Gerüsts die direkte Bindungsaffinität verringert, was wie oben beschrieben auf den sterischen Anspruch zurückgeführt werden kann. Die Ergebnisse zeigen, dass PEGylierte Glykokonjugate im Vergleich zu nicht-PEGylierten Glykokonjugaten eine stärkere Adhäsionshemmung erzielen, obwohl die Dissoziationskonstanten der PEGylierten Verbindungen zu ConA größer waren. Dies deutet darauf hin, dass eine Erhöhung der sterischen Abschirmung durch PEGylierung dazu beitragen kann, die Adhäsion von Krankheitserregern zu verringern, selbst wenn diese bereits angeheftet haben. Adhäsionsstudien auf der Grundlage elektrostatischer Wechselwirkungen unter Verwendung von Amin-gebundenem PEG mit unterschiedlichem Molekulargewicht bestätigen, dass ein solcher sterischer Abschirmungseffekt nicht auf die kohlenhydratvermittelte Adhäsion beschränkt ist. Die in diesem Kapitel der Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass ein PEG-Blockpolymer an einem Glykokonjugat die direkte Bindungsaffinität ebenfalls reduziert, jedoch zu einem höheren inhibitorischen Potenzial führt.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Die genauere Untersuchung der auf der Zelloberfläche stattfindenden multivalenten Ligand-Rezeptor Wechselwirkungen zwischen Kohlenhydraten und Lektinen wird intensiv erforscht. Durch große Fortschritte bei der Entwicklung von hochspezifischen Glykomimetika können offene Fragestellungen effizient untersucht werden. Die Identifikation von Struktur-Eigenschaftsbeziehungen, die zu einer selektiven Proteinerkennung führen und eine hohe Bindungsaffinität aufweisen, spielt für die Entwicklung, von zum Beispiel neuen Wirkstoffen, eine große Rolle. In dieser Arbeit wurden Präzisionsglykomakromoleküle auf weiche Mikrogelpartikel aufgepfropft, um polymere Sonden als Mimetika von Oberflächenglykanen, wie sie in der Glykokalyx der Zelle vorkommen, zu entwickeln. Die mittels SPPoS hergestellten Präzisionsglykomakromoleküle können hier aufgrund ihrer hohen strukturellen Definiiertheit bei gleichzeitiger einfacher Variabilität zu einem vertieften Verständnis zugrundeliegender Struktur-Eigenschaftsbeziehungen beitragen.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studien lassen sich in verschiedene Phasen unterteilen. In der ersten Phase wurden verschiedene Monomere für die im späteren Verlauf angestrebte Herstellung von Präzisionsmakromolekülen mittels SPPoS sowie von SCPs auf Basis von PEG nach etablierten Protokollen synthetisiert. Die Synthese von EDS, TDS und Mannose-Azid und Mannose-Amin, sowie die daraufhin durchgeführte SPPoS konnte anhand der beschriebenen Protokolle realisiert werden. Parallel dazu konnten nach Modifikationen der bekannten Synthesvorschriften erfolgreich PEG-dAAM sowie anschließend PEG-SCPs als weiches Polymergerüst für die polymeren Sonden hergestellt werden. Zur Konjugation der Glykoliganden an die SCPs wurden diese mit Crotonsäure funktionalisiert. Zur Erhöhung des Funktionalisierungsgrades wurden insbesondere der Einfluss der Belichtungsdauer sowie des eingesetzten Eduktüberschusses untersucht. In beiden Fällen konnte durch eine Erhöhung zunächst ein relativ starker Anstieg beobachtet werden, bevor eine Plateauphase erreicht wurde (Kapitel 3.1.2). Die Charakterisierung der COOH-funktionalisierten SCPs erfolgte durch die Weiterentwicklung eines bereits beschriebenen Verfahrens mittels kolorimetrischer TBO-Titration.

Im nächsten Schritt sollten die mit einer freien Aminogruppe ausgestatten und zuvor mittels SPPoS hergestellten Präzisionsglykooligomere auf die COOH-funktionalisierten SCPs aufgepfropft werden. Zur Erhöhung der Glykokonjugationsausbeute wurden verschiedene

Methoden auf ihre Effizienz hin untersucht. Die höchste Umsetzung von COOH-Gruppen konnte mit einem 10-fachen Überschuss Glykoligand und dreifacher Wiederholung, sowie PyBOP als Kupplungsreagenz erzielt werden. Das zuvor beschriebene Protokoll zur Charakterisierung wurde dahingehend angepasst, dass diese anhand des Gewichts nach Überführung in Ethanol und anschließender schonender Entfernung des Lösungsmittels bei 35°C sowie vermindertem Druck durchgeführt wurde. Erst dadurch konnten Ungenauigkeiten in der Probenmenge, die einen enormen Einfluss auf die Ergebnisse haben können, vermieden werden und reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden. Als nächsten Schritt zur Charakterisierung der SCPs wurde mittels AFM-Kraftmessungen das für die angestrebten SCP-RICM Messungen notwendige Elastizitätsmodul bestimmt. Dazu musste mittels eines zwei Komponenten Klebstoffs ein wenige μm großer Glaspartikel an einen hochempfindlichen Cantilever geklebt werden, um die Kraftmessungen durchführen zu können. Das Elastizitätsmodul wurde für jede Probe bestimmt (Kapitel 3.1.3) und anschließend im Datenmodell zur Auswertung der RICM-Messungen berücksichtigt.

In der folgenden Phase wurde intensiv an der Weiterentwicklung des SCP-RICM Assays gearbeitet. Verschiedene Parameter wurden auf ihren Einfluss evaluiert. Insbesondere die Präparation der Glasoberfläche stellte dabei eine Herausforderung dar. Da an dieser Stelle Zielwerte gefehlt haben, wurde jeder Parameter mit verschiedenen SCP-Proben und jeweils auf drei Glasoberflächen untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass die Reproduzierbarkeit der Glasoberflächen ein hohes Maß an Präzision erfordert. So hat zum Beispiel die exakte Einhaltung von Bearbeitungszeiten während der Oberflächenpräparation einen großen Einfluss auf die Ergebnisse gezeigt. Außerdem konnte festgestellt werden, dass kleinste Abweichungen bei der Einwaage von zum Beispiel ConA große Auswirkungen auf die Endergebnisse haben konnte (Kapitel 3.1.4).

Nach dem die oben dargestellten Grundlagen erreicht wurden, konnte das entwickelte Protokoll erfolgreich für die anschließenden Messungen verwendet werden um das definierte Ziel der Arbeit, die Untersuchung von Multivalenzeffekten mit polymeren Sonden, anzugehen. Eine Auswahl der durchgeführten Synthesen sowie der im Anschluss eingesetzten analytischen Methoden sind der folgenden Abbildung dargestellt.

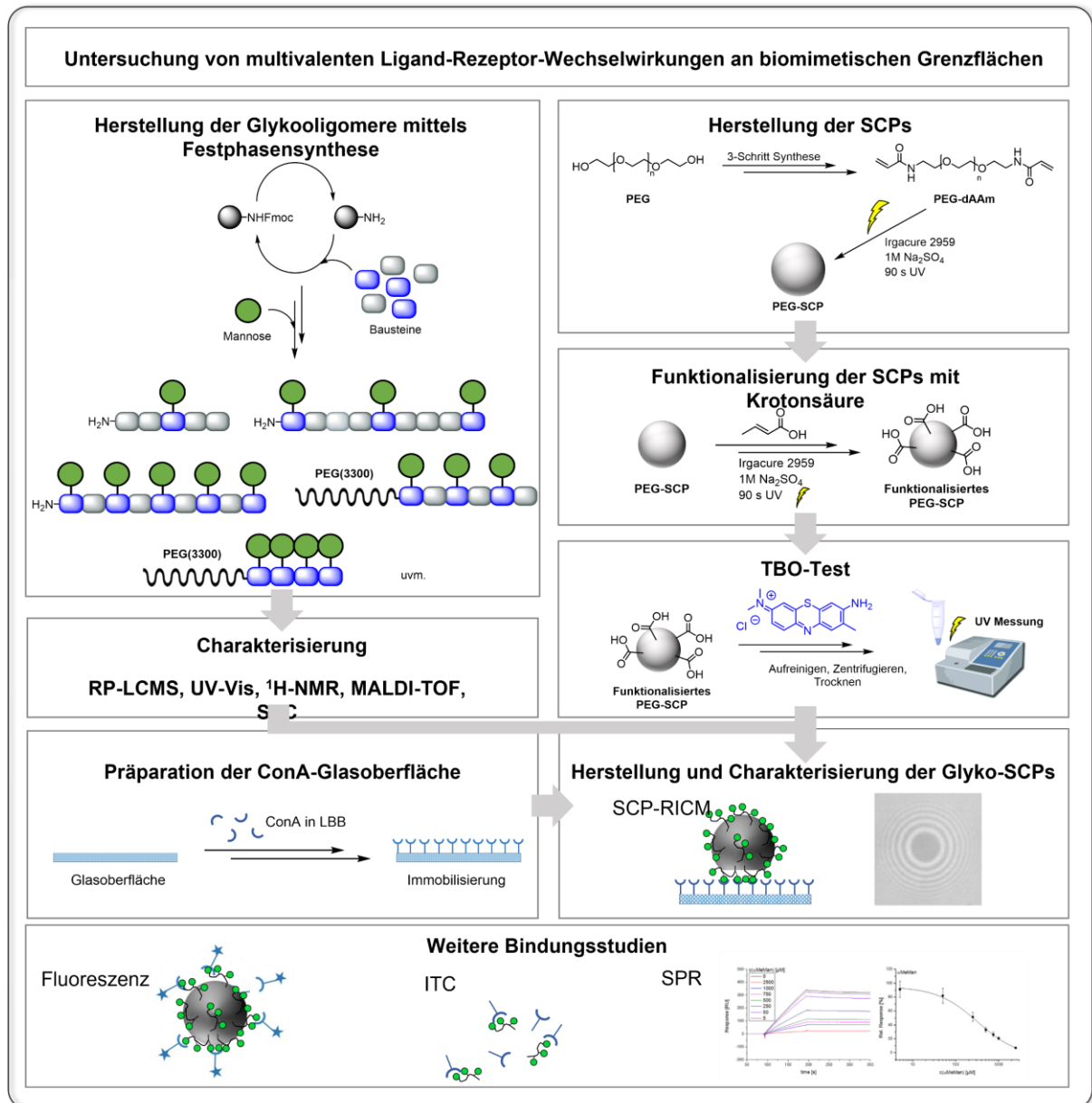


Abbildung 38: Gesamtübersicht der durchgeführten Synthesen und Analysemethoden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die spezifische Interaktion des Modelllektins ConA mit multivalenten Präzisionsglykomakromolekülen auf Zelloberflächen nachahmenden Polymersonden untersucht werden. Die eingesetzte SPPoS erwies sich dabei als eine hocheffiziente Methode zur kontrollierten Variation der Anzahl und Dichte der Man-Liganden sowie zur Herstellung von Liganden mit unterschiedlichen Gerüstlängen. In Übereinstimmung mit früheren Studien führte die Erhöhung der Man-Einheiten im Allgemeinen zu einer erhöhten Affinität, was hauptsächlich auf statistische Effekte zurückzuführen ist. Wie bei den mono und trivalenten Liganden zu sehen war, verringerte sich mit zunehmender Länge des

Glykooligomern die Gesamtaffinität, was wahrscheinlich auf die hohe Flexibilität der Ketten und damit einhergehend sterischer Abstoßungseffekte zurückzuführen ist. Die Ergebnisse der trimeren Strukturen liefern den ersten Hinweis darauf, dass dieser Effekt kompensiert werden könnte, wenn das Ligandengerüst groß genug wird, um mehrere Rezeptorbindungsstellen zu erreichen. Die Auswirkungen der Oligomerlänge und der Man-Dichte war in allen drei Bindungstests ähnlich, d. h. die immobilisierten und frei gelösten Glykooligomere wiesen ähnliche Bindungseigenschaften auf. Die Adhäsionsenergie pro Glykooligomer, die aus den SCP-Messungen gewonnen wurde, war vergleichbar mit den durch ITC ermittelten freien Bindungsenergien, was zeigt, dass die SCP-Methode aussagekräftige Ergebnisse im Zusammenhang von Kohlenhydrat-Lektin-Adhäsionsprozessen liefern kann. Gleichzeitig weisen die ähnlichen Bindungseigenschaften der freien und immobilisierten Liganden darauf hin, dass die Oberflächenpräsentation zur Erhöhung der Bindung nur mit statistischen Effekten beiträgt.

Im weiteren Verlauf wurden sterische Abschirmungseffekte von multivalenten Glykokonjugaten untersucht. Dazu wurde das Inhibitionspotential von PEGylierten und nicht PEGylierten Glykooligomeren in Kohlenhydrat-Lektin induzierten Adhäsionsprozessen mittels SCP-RICM Assay quantifiziert. Wie in direkten Bindungsstudien mittels SPR beobachtet werden konnte, führte die Integration von PEG-Ketten bei allen Paaren zu einer verringerten Avidität, was auf sterische Abstoßungseffekte der PEG-Kette zurückgeführt wurde.

Die Vermutung ist eine durch erhöhte Gerüstflexibilität durch lange PEG-Linker verringerte Avidität, möglicherweise aufgrund einer erhöhten Kettenentropie. Obwohl die direkte Lektin Bindungsavidität für PEGylierte Glykooligomere reduziert war, war ihr Inhibitionspotential im Vergleich zu nicht PEGylierten Verbindungen höher. Dies bestätigt, dass die sterische Abschirmung das inhibitorische Potenzial von Glykokonjugaten erhöhen kann, obwohl die direkte Bindungsaffinität negativ beeinflusst sein kann. Daher könnte der Einsatz von Glykokonjugaten für antiadhäsive Zwecke mit flexiblen Polymeren eine wertvolle Strategie darstellen, um das Eignungspotenzial zu erhöhen.

Insgesamt zeigte diese Arbeit tiefere Einblicke in die molekularen Bindungsmechanismen zuckerfunktionalisierter Präzisionsmakromoleküle, die speziell für die Interaktion mit Lektinen entwickelt wurden. Mit diesen Erkenntnissen wurden unter anderem die Grundlagen für die

Anwendungen als verbesserte Inhibitoren für zuckerbindende Pathogene in der Biomedizin geschaffen.

5 Experimenteller Teil

5.1 Materialien

Triisopropylsilan (TIPS) (98%), Triethylsilan (99%) wurden von Sigma-Aldrich bezogen. Diisopropylethylamin (DIPEA) ($\geq 99\%$) wurde von Carl Roth bezogen. Dimethylformamid (DMF) (99,8%, für die Peptidsynthese), Piperidin (99%), Triphenylmethylchlorid (Trt-Cl) (98%) und Bernsteinsäureanhydrid (99%) wurden von Acros Organics erworben. Dichlormethan (DCM) (99,99%), Natriumchlorid (99,98%), Tetrahydrofuran (THF) (analytical grade), Ethylacetat (analytical grade) und Natriumhydrogencarbonat (analytische analytical) wurden von Fisher Scientific bezogen. Triethylamin (TEA) wurde von AppliChem erworben. Trifluoressigsäure (TFA) (99%) und (Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat (PyBOP) (98%) wurden von Fluorochem bezogen. Succinamidsäure (97%) und Thioanisol (99%) wurden von Alfa Aesar bezogen. 3-(3,4-Dimethoxyphenyl)propionsäure (99%) wurde von BLD Pharmatech Ltd. bezogen. Fmoc (99%), Trifluormethansulfonsäure (98%) und Trifluorethanol (99%) wurden von Carbolution gekauft. Diethylether (mit BHT als Inhibitor, $>99\%$) wurde von Honeywell bezogen. Tentagel® S RAM-Harz wurde von Rapp Polymere bezogen. Natriumsulfat (99,5%) wurde von Fisher Chemicals bezogen. Polyethylenglykoldiacrylat (PEG (8000)-DiAc) wurde von Alfa Aesar bezogen. Irgacure 2959 (98%) und Crotonsäure (98%) wurden von Sigma-Aldrich bezogen. Benzophenon (99%) wurde von Acros Organics erworben. 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid-hydrochlorid (EDC HCl) ($\geq 99\%$) wurde von Carl Roth bezogen. Das für die Assays eingesetzte Wasser wurde mit einem Milli-Q-System (Millipore) gereinigt. Amberlite® IR 120-Harz, Toluidinblau O (TBO), ($\geq 96\%$), α -D-Mannose (99%) und Manganchlorid-Tetrahydrat ($\geq 99\%$) wurden alle Sigma-Aldrich bezogen. N, N-Diisopropylethylamin (DIPEA) ($\geq 99\%$), Methanol (p.a.), konzentrierte Schwefelsäure (95%), Natriumhydroxid (1 M) und Essigsäureanhydrid (99,7%) wurden von VWR BDH bezogen. Dimethylformamid (DMF) (99,8%, für die Peptidsynthese), Piperidin (99%), Methyl- α -D-mannopyranosid (MeMan), Natriumazid (Biochemie, 99+%) und Kupfer(II)-Sulfat (98%) wurden von Acros Organics bezogen. Dichlormethan (DCM) (99,99%), Natriumchlorid (99,98%), Tetrahydrofuran (THF) (analytical grade), Ethylacetat (analytical grade), Natrium

Hydrogencarbonat (analytical grade) und Toluol (analytical grade), wurden von Fisher Scientific bezogen. Concanavalin A (ConA) wurde von LKT Laboratories erworben. Kalzium Chlorid ($\geq 97\%$), Zitronensäure (zur Analyse) und Triethylamin (rein) wurden von AppliChem erworben.

5.2 Methoden

Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

^1H -NMR und ^{13}C -NMR Spektren wurden mit einem Bruker Avance III 300, einem Bruker Avance DRX oder einem Bruker Avance III 600 aufgenommen. Chemische Verschiebungen wurden als Delta (δ) in ppm und Kopplungskonstanten als J in Hertz (Hz) angegeben. Aufspaltungen wurden wie folgt angegeben: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett.

Reverse Phase-High Pressure Liquid Chromatography (RP-HPLC)

Die RP-HPLC Analysen wurden an einem Agilent 1260 Infinity Gerät das mit einem auf 214 nm eingestellten Detektor mit variabler Wellenlänge (VWD) gekoppelt war, durchgeführt. Als Säule wurde eine Poroshell 120 EC-C18 1,8 μM (3,0x50 mm, 2,5 μM) Umkehrphasensäule verwendet. Die mobile Phase A bestand aus 95/5 $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ mit 0,1 % Ameisensäure und die mobile Phase B bestand aus 95/5 $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$ mit 0,1 % Ameisensäure. Die Flussrate für alle Messungen betrug 0,4 mL/min.

Präoperative Reverse Phase- High Pressure Liquid Chromatography (Prep-RP-HPLC)

Die Prep-RP-HPLC wurde auf einem Agilent 1260 Infinity-Gerät durchgeführt, das mit einem auf 214 nm eingestellten Detektor mit variabler Wellenlänge (VWD) gekoppelt war. Als Säule wurde eine CAPCELL PAL C18 (20mmI.D. x 250 mm, 5 μM) Umkehrphasensäule verwendet. Die mobile Phase A bestand aus H_2O mit 0,1 % Ameisensäure und die mobile Phase B bestand aus MeCN mit 0,1 % Ameisensäure. Alle Proben wurden mit einer Flussrate von 10 ml/min und einem Gradienten von 100 % A bis 50 % A über 15 Minuten gereinigt. Die Fraktionen wurden mit einem automatisierten Sampler gesammelt und anschließend lyophilisiert.

Gefriertrocknung

Die Gefriertrocknung der hergestellten Strukturen wurde auf einem Alpha 1-4 LD plus Gerät der Martin Christ Freeze Dryers GmbH durchgeführt. Die Lyophilisation erfolgte bei einem Druck von 0,1 mbar.

Massenspektrometrie (ESI, MALDI-TOF-MS, HR-MS)

Die Messungen wurden von Dr. Peter Tommes an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.

Elektrospray-Ionisations-Massenspektren (ESI) wurden an einem Massenspektrometer vom Typ Ion-Trap-API Finningan LCQ Deca aufgenommen.

Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time Of Flight (MALDI-TOF) wurden an einem MALDI-TOF Ultraflex I (Bruker Daltonics) mit 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) und α -cyano-4-Hydroxymethylsäure (CHCA) als Matrix durchgeführt. Das Verhältnis von Verbindung zu Matrix betrug 10:1.

UV-VIS Photometer

UV-Vis-spektroskopische Messungen wurden an einem Specord® 210 Plus der Analytik Jena AG durchgeführt. Das Gerät wurde mit der Software Win Aspect Plus betrieben. Für die ConA Konzentrationsbestimmung wurde ein Spektralscan von 270-290 nm verwendet. Die Konzentration von ConA bezogen auf das Monomer ($M = 26\,500\text{ g/mol}$) wurde dann bei 280 nm durch Anwendung des Lambert-Beer-Gesetz mit $\epsilon_{280} = 26380\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ für divalentes ConA und mit $\epsilon_{280} = 30150\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ für tetravalentes ConA berechnet. Alle Lösungen wurden in einer 3,5 mL Präzisions-Quarzglasküvette ($d = 1\text{ cm}$) der Carl Roth GmbH + Co. KG oder Einweg Polystyrol-Küvetten gemessen.

ITC-Messungen

Die ITC-Experimente wurden mit einem MicroCal™ VP-ITC-Gerät durchgeführt. Insgesamt wurde eine Anzahl von 29 Injektionen mit jeweils 10 μL einer Glykomakromoleküllösung in einem Intervall von 400 Sekunden in die Probenlösung mit ConA gegeben.

5.3 Verfahren zur Herstellung von Glyko-SCPs

5.3.1 Protokolle für die Festphasensynthese

Alle Glykooligomere wurden mittels Festphasensynthese nach den zuvor von Hartmann et al. beschriebenen Verfahren hergestellt. Als fester Träger wurde ein TentaGel® S Chlortritylharz (Beladung 0,25 mmol/g) von RAPP Polymers erworben und mit einem Ethylendiamin-Linker modifiziert, wie zuvor berichtet. Die Chargengröße für alle Glykooligomere betrug 0,05 mmol (0,2 g Harz), wobei für alle SPS-Reaktionen ein Spritzenreaktor verwendet wurde. Das Harz wurde vor den Synthesen 20 Minuten lang in 10 mL DCM gequollen.

Allgemeines Kupplungsprotokoll

Die Bausteine wurden an die feste Phase gekuppelt, indem 5 Äquivalente, bezogen auf die Chargengröße, in 1,5 mL DMF gelöst, 5 Äquivalente PyBOP als Kopplungsreagenz zugegeben und die Carbonsäure durch Zugabe von DIPEA (10 Äquivalente, 170 μ L, 1 mmol) zur Lösung voraktiviert wurde. Die Mischung wurde 2 Minuten lang geschüttelt und anschließend zum Harz gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 1 Stunde lang geschüttelt, bevor es 7 Mal mit DMF und 3 Mal mit DCM gewaschen wurde. Bei Strukturen, die aus mehr als 9 Bausteinen bestehen, wurden ab dem zehnten Baustein bei jeder Kopplung Doppelkupplungen durchgeführt.

Auf die Bausteinkupplung folgte die Fmoc-Entschützung. Dazu wurde das Harz zweimal in einer 25%igen Lösung von Piperidin in DMF geschüttelt, einmal für 20 min und ein zweites Mal für 10 min.

Um die freie N-terminale Stelle des letzten zusammengesetzten Bausteins zu schützen, wurde das Harz zweimal 15 Minuten lang in 6 ml Essigsäureanhydrid geschüttelt, wodurch ein mit einer Acetylgruppe geschütztes Amin entstand. Das Harz wurde 10 Mal mit DMF und anschließend 5 Mal mit DCM gewaschen.

Glykokonjugation mit CuAAC

Für die Glykokonjugation wurden 4 Äquivalente des acetylgeschützten 2 Azidoethyl-Mannosids pro Konjugationsstelle in 1,5 ml DMF gelöst und zu dem harzgebundenen oligomeren Gerüst hinzugefügt. Parallel dazu wurden 0,2 eq. CuSO₄ und 0,2

Äquivalente Natriumascorbat pro Alkin-Gruppe in 1 ml deionisiertem Wasser gelöst und in den Spritzenreaktor gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht geschüttelt und anschließend zyklisch mit 23 mM Natriumdiethyldithiocarbamat in H₂O/DMF (1:1), DMF und DCM gewaschen.

Die Acetyl-Schutzgruppen der 2-Azidoethylmannosid-Einheiten wurden durch Zugabe von 10 ml einer 0,2-M-Natriummethoxidlösung in Methanol und anschließendes Schütteln für 2 Stunden entfernt. Anschließend wurde das Harz 10-mal mit DMF und 5-mal mit DCM gewaschen.

Abspaltung von Glykooligomeren vom Trägermaterial

Die Strukturen wurden in einer Mischung aus 30 % TFA und 5 % TIPS in DCM 1 Stunde lang von der festen Phase abgespalten. Das Harz wurde zwei weitere Male mit 3 mL DCM gewaschen. Das organische Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde in 1,5 mL DCM gelöst und in 30 mL kalten Diethylether getropft. Der Niederschlag wurde zentrifugiert und der Diethylether dekantiert. Das Produkt wurde unter vermindertem Druck getrocknet, in 1,5 mL Methanol gelöst und erneut in kaltem Diethylether ausgefällt. Nach Trocknung unter vermindertem Druck wurde das Produkt in 5 mL H₂O gelöst und lyophilisiert.

Alle Glykooligomere wurden durch präparative HPLC auf einem Agilent 1260 Gerät mit einer C18 RP-Säule (UG80, Shiseido) gereinigt. Die Glykooligomere wurden mit einem linearen Gradienten von 5 % bis 20 % MeCN in Wasser in 15 Minuten mit einer Flussrate von 20 ml/min eluiert. Die gesammelten Fraktionen mit dem gewünschten Produkt wurden mit einem integrierten Detektor mit variabler Wellenlänge (VWD, eingestellt auf 214 nm) bestimmt, gesammelt und vor der endgültigen Lyophilisierung unter vermindertem Druck konzentriert.

5.3.2 SCP-Gerüstsynthese und Nachfunktionalisierung mit Crotonsäure

PEG-basierte SCPs wurden nach einem zuvor etablierten Protokoll synthetisiert. Dazu wurden 50 mg (6,3 µmol) der zuvor ebenfalls nach bekannten Protokollen hergestellten PEG-dAAM (M_n = 8000 Da) Makromonomer in 10 mL einer 1 M Natriumsulfat-Lösung dispergiert, in der 1 mg (4,5 µmol) des UV-Photoinitiators Irgacure 2959® enthalten war. Die Dispersion wurde geschüttelt und die gebildeten Tröpfchen wurden unter UV-Licht (Hereaus HiLite) für jeweils

180 s in 15 Zyklen polymerisiert. Die SCPs wurden anschließend 10-mal in Wasser zentrifugiert und dekantiert und anschließend über Nacht in Wasser gelagert. Am nächsten Tag wurden die SCPs erneut 5-mal mit Wasser und anschließend je 5 Mal mit Wasser/Ethanol (1:1) und anschließend 5-mal in Ethanol zentrifugiert und dekantiert um es für den nächsten Reaktionsschritt von Wasserrückständen zu befreien. Im nächsten Schritt wurde Crotonsäure auf ähnliche Weise auf die SCPs aufgepfropft. In Ethanol als Lösungsmittels und Benzophenon (250 mg, 1,4 mmol) und Crotonsäure (1,5 g, 17,4 mmol) als weitere Edukte. Das Gemisch wurde 20 s lang mit Stickstoff gespült und anschließend in 10 Belichtungszyklen für insgesamt 1080 s mit UV-Licht bestrahlt (jeweils 20 s Stickstoffspülung nach zwei Belichtungszyklen), bevor die Lösung ausgetauscht und der Vorgang wiederholt wurde. Insgesamt wurde das Gemisch 3240 s bestrahlt und die Lösung nach jedem Zyklus von 1080 s ausgetauscht. Die PEG-CA-SCPs wurden durch wiederholtes Zentrifugieren 15-mal mit Ethanol gewaschen.

5.3.3 Charakterisierung von glykokonjugierten SCPs

TBO Titration

Zur Bestimmung der Menge der Glykoliganden wurde eine kolorimetrische Titration mit TBO durchgeführt. Dazu wurden 0,5 mL der SCP-Dispersion dreimal zentrifugiert und 1 mL einer 0,5 mM TBO-Lösung (pH 10,5) hinzugefügt. Die Mischung wurde über Nacht geschüttelt, bevor die Dispersion dreimal zentrifugiert wurde, um die TBO-Lösung durch wässrige Natriumhydroxidlösung (pH 10,5) zu ersetzen. Die Probe mit dem höchsten Funktionalisierungsgrad (139 $\mu\text{mol/g}$) wurde auch im weiteren Verlauf der Arbeit verwendet. Die folgenden Bilder zeigen die nicht CA-funktionalisierten SCPs (a) die erwartungsgemäß keine Blaufärbung aufweisen, während die Inkubation mit TBO für die PEG-CA-SCPs (b) zu einer deutlichen Blaufärbung führt. In Bild (c) sind die mit Glykoliganden funktionalisierten SCPs die fast keine Färbung mehr aufweisen (um 95 % reduziert), was den hohen Grad der Funktionalisierung mit den Glykoliganden bestätigt.

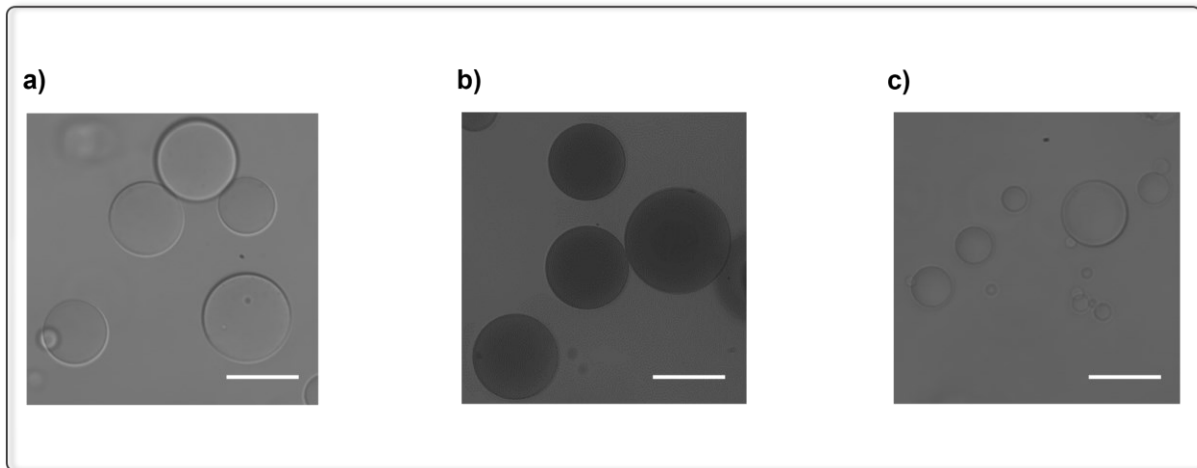


Abbildung 39: Kolorimetrische TBO-Messungen. a) PEG-SCPs vor der Funktionalisierung mit CA, verwendet als Referenz. b) PEG-CA-SCPs nach der Funktionalisierung mit CA als Referenz für 100 % Carbonsäurefunktionalisierungsgrad. c) PEG-Mannose-SCPs nach der Glykokonjugation mit deutlich reduzierter Färbung im Vergleich zu b). Maßstabsbalken = 50 μm .

5.3.4 Bestimmung des Elastizitätsmoduls der SCPs

AFM-Kraftmessungen wurden mit einem NanoWizard II-System in Kombination mit einem optischen Mikroskop durchgeführt. Zunächst wurde der Cantilever für die Messung präpariert, indem eine Glasperle (Durchmesser: 4,75 μm) mit Epoxidkleber auf einen Silizium-Cantilever (NanoAndMore GmbH) geklebt wurde. Für die Messung wurden 20 μL der SCP-Dispersion in 3 mL einer LBB (pH 7,4) in einer Petrischale gegeben. Die Bilder der SCPs wurden mit der Bildverarbeitungssoftware ImageJ aufgenommen, um den Durchmesser der jeweiligen SCPs zu bestimmen. Die Berechnungen sind in den SI der im Rahmen dieser Arbeit veröffentlichten Publikationen näher beschrieben.

Anhand der Empfindlichkeit der Spitze, der Federkonstante der Spitze und des effektiven Radius wurde die Kraftkurve mit dem Hertz'schen Modell angepasst, um das Elastizitätsmodul der SCP zu bestimmen.

5.3.5 Konjugation von Glykooligomeren an SCPs

Für die Herstellung von Glykooligomer funktionalisierten SCPs wurde 1 mL (~1 mg SCP) der SCP-Dispersion durch 10-maliges Zentrifugieren und Lösungsmittelaustausch in DMF überführt. Entsprechend der ermittelten Menge an Carboxylgruppen auf den SCPs wurden 10 eq. PyBOP, 5 eq. HOBt und 10 Äq. DIPEA zu der SCP-Dispersion gegeben und 5 Minuten lang geschüttelt,

um die Säurefunktionen zu aktivieren. Anschließend wurden 10 Äquivalente der aminfunktionalisierten Liganden zu der Reaktionsmischung gegeben und 2 Stunden lang bei 40 °C geschüttelt. Die Lösung wurde ausgetauscht und der Kupplungsvorgang wurde zweimal mit den gleichen Mengen an Reaktanten wiederholt. Schließlich wurden die SCPs durch Zentrifugation 15 Mal mit DMF gewaschen und zur Lagerung in Lektinbindungspuffer (pH 7,4) mit 0,1 Gew.-% Natriumazid überführt.

5.3.6 Funktionalisierung der Glasoberfläche mit ConA

Ein Objektträger aus Glas (μ -Slide 8 well, von IBIDI, Deutschland) wurden 30 Minuten lang in einem UV-Ozonreiniger gereinigt. Die Oberfläche wurde durch physikalische Adsorption mit ConA beschichtet. Dazu wurde 1 mg ConA einen Tag vorher in 5 mL LBB (pH 7,4) gelöst. Unmittelbar nach dem UV-Reinigungsprozess wurden 0,2 mL der Proteinlösung in die Kammern gegeben und die Oberfläche 1 h lang auf einem Schüttler inkubiert. Die Lösung in den Kammern wurde durch das Messmedium (LBB für direkte Bindungsstudien oder mit α -Methyl-D-Mannosid als Inhibitor) ausgetauscht, um den Überschuss an Protein zu entfernen und die Oberfläche mit dem Messmedium zu bedecken.

5.3.7 SCP-RICM allgemeines Verfahren

Auf die mit der Messlösung bedeckten proteinfunktionalisierten Glasobjektträger wurden 10 μ L SCP-Dispersion gegeben. Nach 60 Minuten wurden die Kontaktflächen der SCPs quantifiziert. Für die RICM-Bildgebung wurde ein inverses Mikroskop (Olympus IX73) mit einem Ölimmersionsobjektiv (Olympus 60 x NA 1,35) und einer CMOS-Kamera (UI-3360CP-M-GL, IDS) verwendet. Eine monochromatische LED-Sammellinse (530 nm, Thorlabs, M530L2-C1) wurde als Lichtquelle verwendet. Ein Filtersatz mit einem semitransparenten Spiegel, einer Wellenplatte und Polarisatoren wurde verwendet, um eine Interferenz des Lichts zu erzeugen. Mit diesem Aufbau kann die durch Ligand Rezeptor Adhäsion induzierte Kontaktfläche zwischen den Glyko-SCPs und den rezeptorfunktionalisierten Objektträgern auf der Glasoberfläche ermittelt werden. Zur Bewertung der Kontaktflächen mit dem JKR-Modell wurden sowohl der Kontaktradius (im RICM-Modus) als auch der Partikelradius (im Transmissionsmodus) gemessen. Für die Bildaufnahme wurde μ Manager (v1.4.16) verwendet. Die Bildanalyse erfolgte mit einer Software zur Erkennung der RICM-Muster und einer skriptgesteuerten Analyse mit IgorPro (v6.38, Wavemetrics) zur Auswertung der Muster.

Weitere Erläuterungen zum RICM-Prinzip sind in den Sektionen zu weiterführenden Informationen der im Rahmen dieser Arbeit veröffentlichten Publikationen enthalten. Für jede Probe wurden 20 SCP-Interferenzmuster aufgezeichnet, und die Messungen wurden zwei weitere Male auf anderen Glasoberflächen wiederholt.

Abbildung 40 zeigt ein beispielhaftes Diagramm, in dem der SCP-Radius gegen den Kontaktradius für PEG-Man-1 SCPs aufgetragen ist. Die Darstellung zeigt, dass die SCP-Radien 8-20 μm betrugen und die Kontaktradien zwischen 1 und 3 μm variierten. Die Adhäsionsenergie, die sich aus der Anpassung dieser Daten ergibt, beträgt $190 \pm 5 \mu\text{J m}^{-2}$.

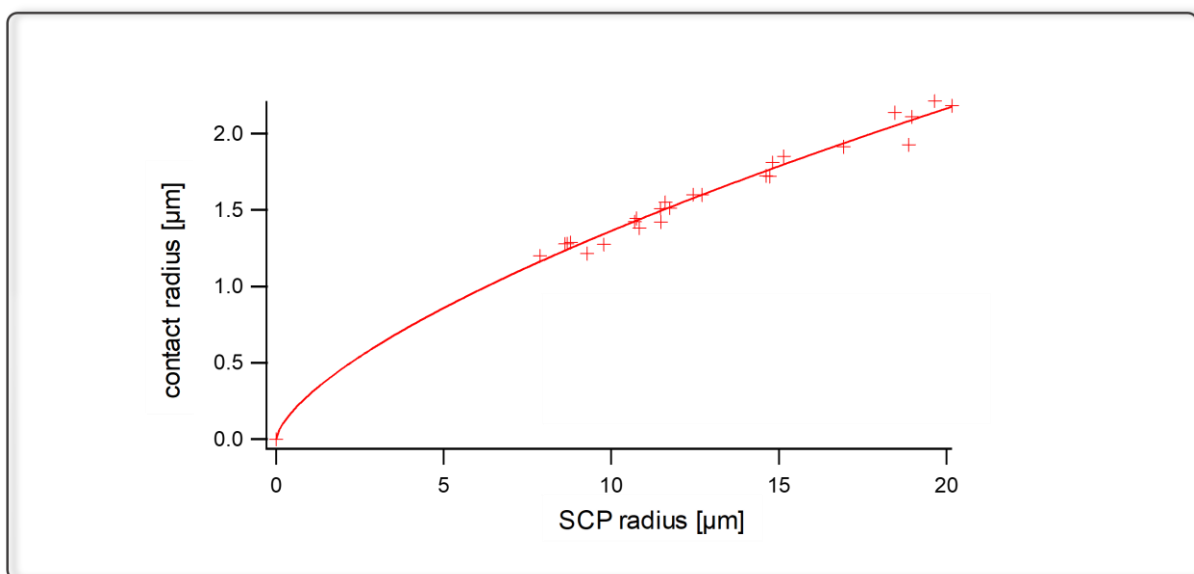
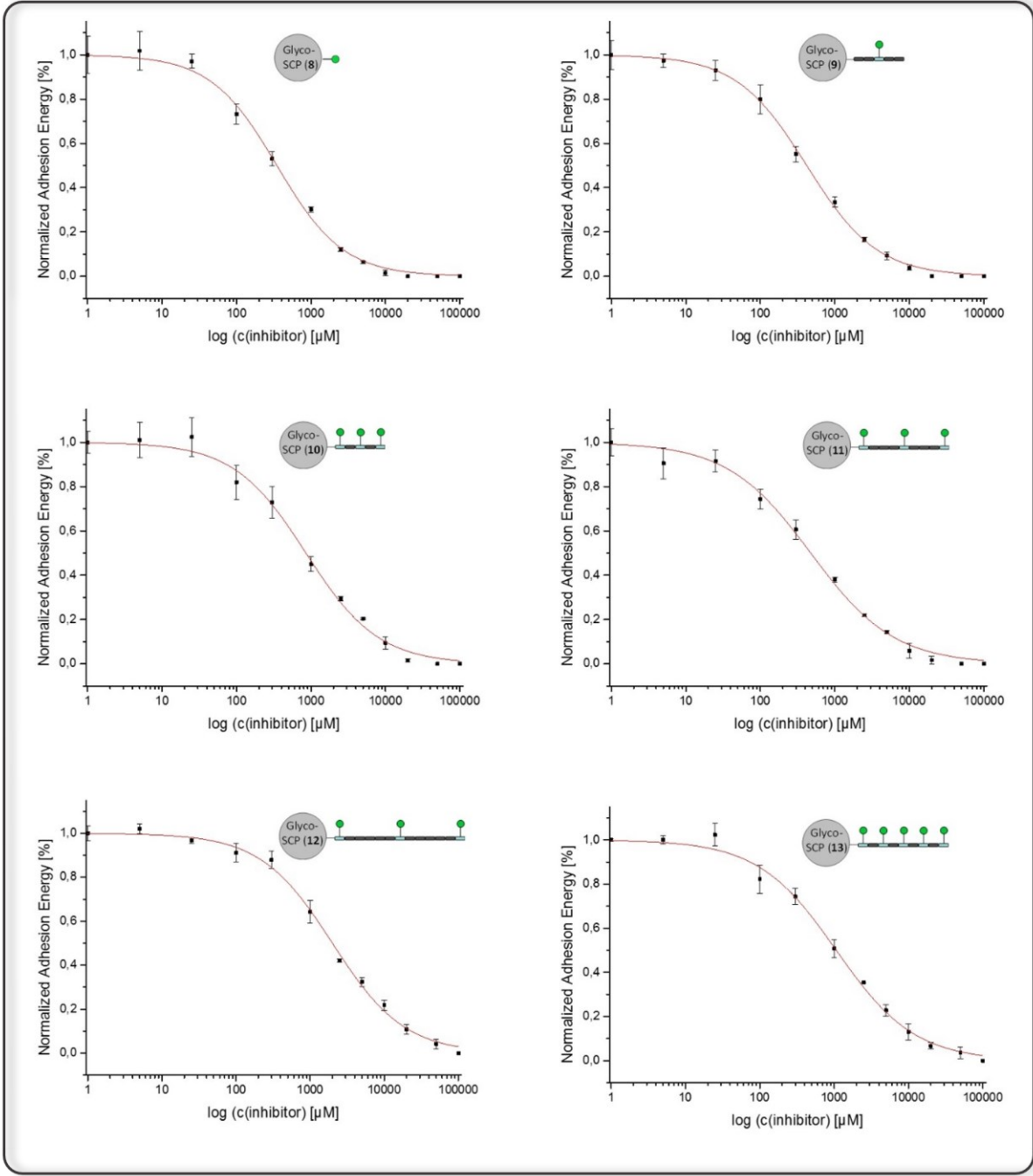


Abbildung 40: SCP-Radius (R) im Vergleich zum Kontaktradius aus RICM-Messungen, nach Gleichung 1 normiert.

5.3.8 IC₅₀ Ergebnisse der SCP Adhäsionsstudien

Für die gesamte Reihe der hergestellten Glyko-SCPs wurden Inhibitionsstudien mit MeMan durchgeführt. Pro dargestelltem Datenpunkt wurde auf drei verschiedenen Oberflächen eine bestimmte Konzentration MeMan in LBB in der Messzelle vorgelegt, bevor 60 min nach der SCP Zugabe (Äquilibration) die Kontaktflächen aufgenommen und bewertet wurden. Jeder Datenpunkt stellt somit den Durchschnittswert der normalisierten Adhäsionsenergien für etwa 60 SCPs (20 pro Messung) auf drei verschiedenen Oberflächen dar.



5.4 Untersuchung von glykokonjugierten SCPs mit RBITC- ConA

Proteinfunktionalisierung mit RBITC

Für die Funktionalisierung von ConA mit RBITC wurden zunächst 2 mL eines 100 mM Carbonat/Bicarbonat-Puffers hergestellt und auf pH 9 eingestellt, bevor 2 mg ConA hinzugefügt wurden. Anschließend wurden 100 μ L einer RBITC-Lösung in DMSO ($c = 1$ mg/mL) zu der ConA-Lösung gegeben. Das Eppendorf-Röhrchen wurde mit Aluminiumfolie abgedeckt und 2 h lang geschüttelt. Anschließend wurde eine Gelfiltration mit einer PD-10-Säule (GE-Healthcare, SephadexTM G-25) mit LBB (pH 7,4) als Elutionsmittel durchgeführt, um den Überschuss an RBITC und agglomeriertem ConA zu entfernen. Der Grad der Markierung und die Konzentration der Lösung wurden durch UV-Vis-Spektroskopie bestimmt, wobei die Absorption bei 280 nm für ConA und bei 555 nm für RBITC gemessen wurde. Die ConA-Konzentration von 6,3 μ M in der Lösung wurde über das Lambert-Beer-Gesetz mit $\epsilon_{555}=106000$ M⁻¹ cm⁻¹ für RBITC und $\epsilon_{280}=30150$ M⁻¹ cm⁻¹ für tetravalentes ConA berechnet. Der Markierungsgrad von ConA mit RBITC von 91 % wurde als Konzentration von ConA im Verhältnis zur Konzentration von RBITC bestimmt.

Fluoreszenzmessungen von glykonkonjugierten SCP

20 μ L der SCP-Dispersion wurden in einem Eppendorf-Röhrchen mit LBB auf 1,5 mL aufgefüllt, und 200 μ L der ConA-Lösung wurden hinzugefügt. Das Gemisch wurde 1 Stunde lang geschüttelt, bevor die Lösung durch Zentrifugation gegen LBB ausgetauscht wurde, um nicht gebundenes ConA zu entfernen.

Für die Inhibitionsexperimente wurde α -Methyl-D-Mannosid ($c = 5000$ μ M) in LBB für die Reaktions- und Aufreinigungsschritte verwendet.

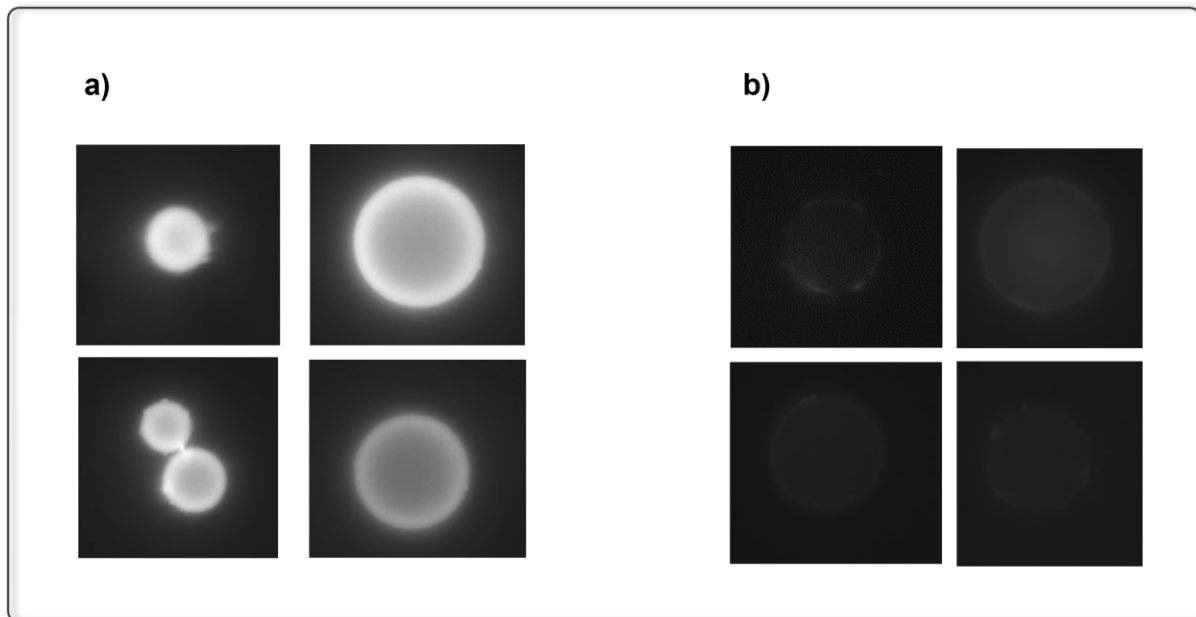


Abbildung 41: Konfokale Mikroskopiebilder von glykokonjugierten SCPs, die über einen Zeitraum von 2 Stunden in LBB mit RBITC-markiertem ConA geschüttelt wurden (a), und Inhibitionsstudien mit α -Methyl-D-Mannosid ($c=5000\ \mu\text{M}$) (b).

5.5 SPR Messungen

Die Messungen wurden an einem Biacore X100 (GE Healthcare LifeSciences, Schweden) durchgeführt. ConA wurde auf einem CM5-Carboxymethyldextran Sensorchip mittels Carbodiimidchemie immobilisiert. Die PEGylierten und nicht-PEGylierten Glykooligomere wurden in Konzentrationen von 50, 100, 200, 400 und 800 μM injiziert. Die Flussrate wurde auf 15 $\mu\text{L min}^{-1}$ und die Kontakt- und Dissoziationszeit betrug jeweils 360 s. Die resultierende Sättigungskurve wurde mithilfe eines Steady-State-Modells zur Berechnung der Dissoziationskonstante (K_D) angepasst. Der Sensorchip wurde nach Messung der Konzentrationsreihe durch zweimalige Injektion von 0,8 M MeMan bei einer Flussrate von 10 $\mu\text{L min}^{-1}$ und einer Kontaktzeit von 30 s regeneriert.

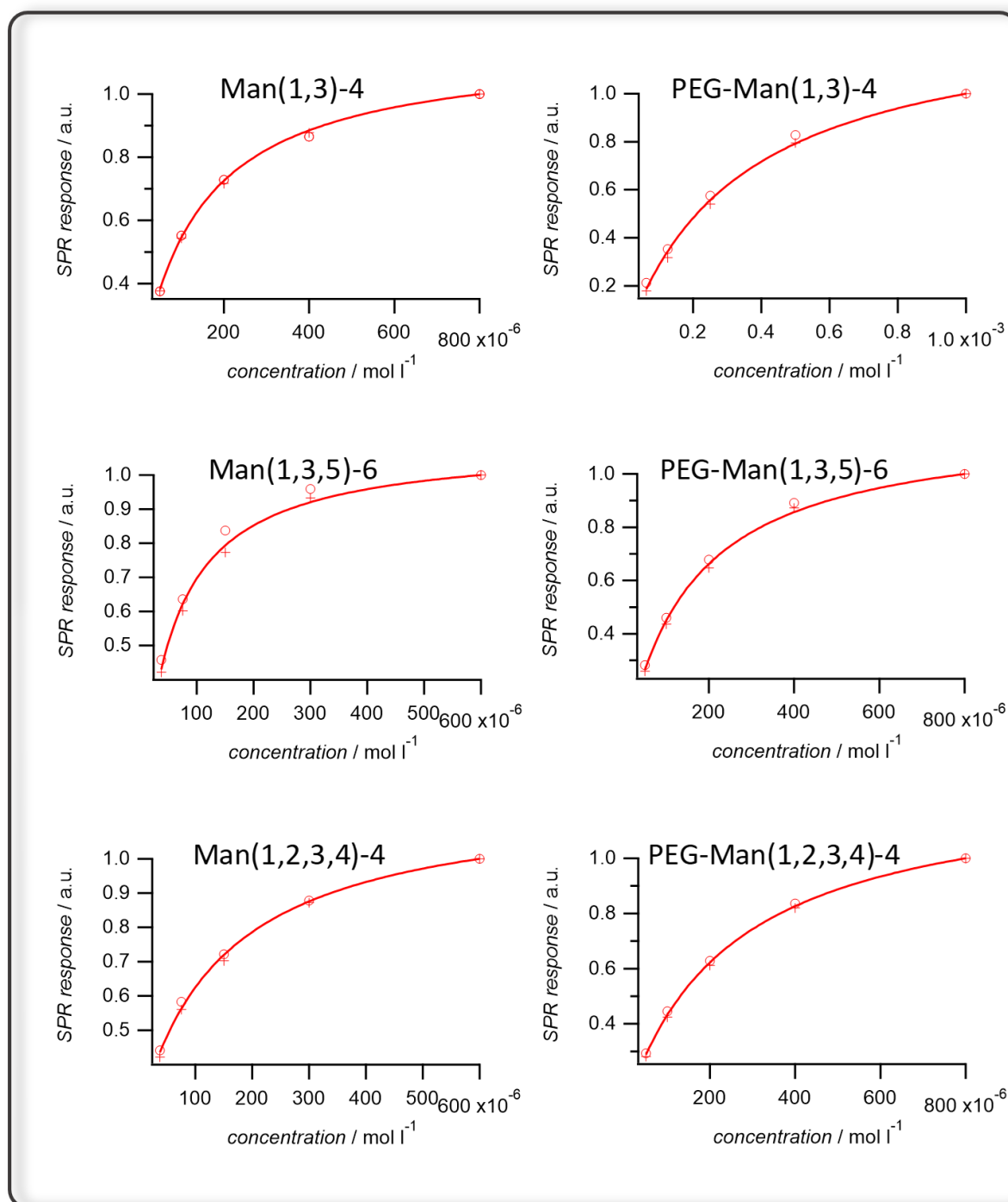
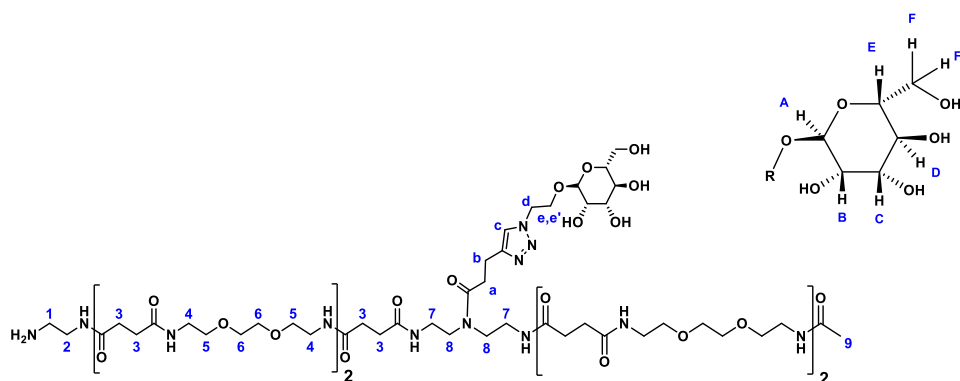


Figure S6 SPR response units als Funktion der Konzentration zur Berechnung der Dissoziationskonstante K_D .

5.6 Analytische Daten der hergestellten Verbindungen

Verbindung 2: Man(3)-5

Verbindung **2** wurde nach Aufreinigung mittels präparativer HPLC in einer Ausbeute von 43 % erhalten. Das anomere Proton der Mannoseliganden (A) wird im ^1H -NMR-Spektrum nicht nachgewiesen werden, da das Signal von im Lösungsmittel enthaltenem HDO bei 4.79 ppm überlagert wird.



^1H -NMR (600 MHz, D_2O): δ 7.88 (s, 1H, c), 4.68 – 4.60 (m, 2H, d), 4.12 – 4.06 (m, 1H, e oder e') 3.96 – 3.90 (m, 1H, e oder e'), 3.88 - 3.84 (dd, $J = 1.73$ Hz und $J = 3.27$ Hz, 1H, B), 3.75 – 3.60 (m, 36H, 5+6+C+E+F+F'), 3.53 – 3.45 (m, 6H, 2+8), 3.43 – 3.32 (m, 20H, 4+7), 3.18 – 3.13 (t, $J = 6.08$ Hz, 2H, 1), 3.05 - 2.98 (m, 3H, b+D), 2.83 – 2.77 (t, $J = 7.33$ Hz, 2H, a), 2.60 – 2.45 (m, 20H, 3), 2.02 – 1.99 (s, 3H, 9) ppm.

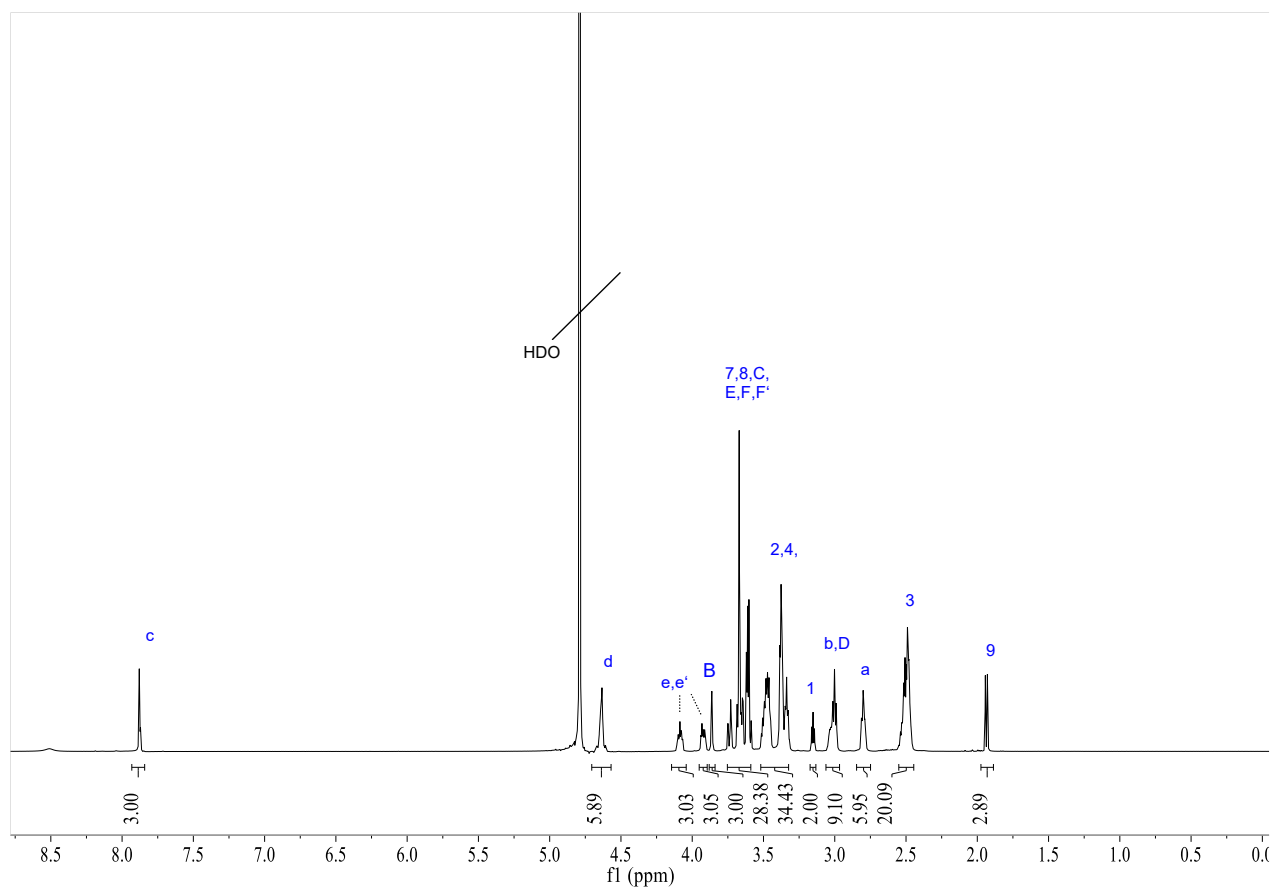


Abbildung 42: ^1H -NMR (600 MHz, D_2O) von Verbindung 2.

ESI-MS m/z berechnet für $\text{C}_{65}\text{H}_{116}\text{N}_{16}\text{O}_{26}$ Molekulargewicht: 1536.8 g/mol): $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ berechnet.: 769.4; gefunden: 769.5, $[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^{2+}$ berechnet.: 520.6; gefunden: 520.8, $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ berechnet.: 513.3; gefunden 513.4, $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ berechnet.: 385.2; gefunden 385.4

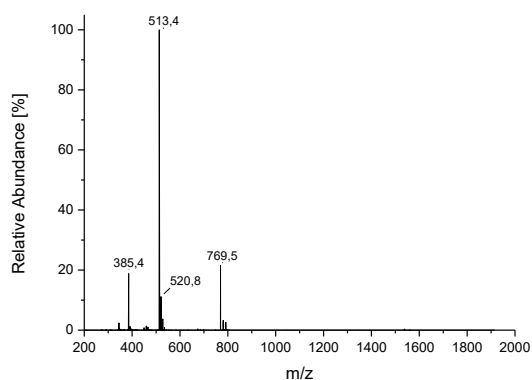


Abbildung 43: ESI-MS-Analyse von Verbindung 2 (Positivmodus).

RP-HPLC (linearer Gradient von 0 - 50% Eluent B in 30 min bei 25 °C): $t_R = 10,3$ min. Ermittelte Reinheit: >95%

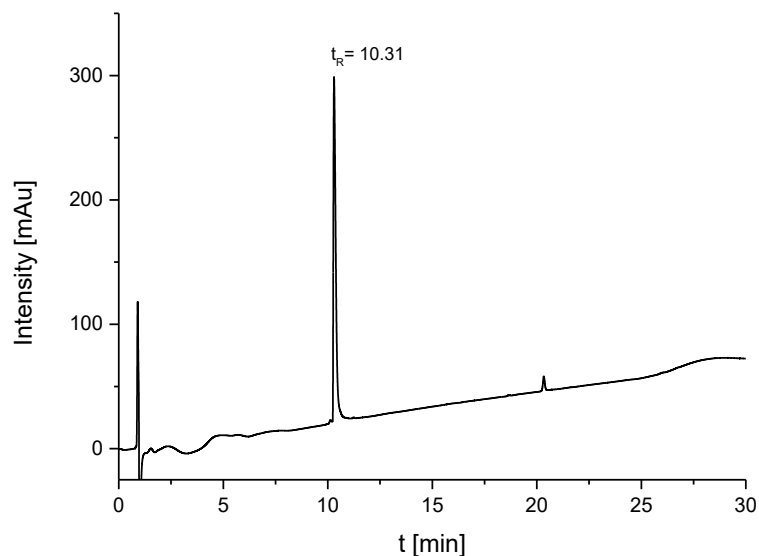
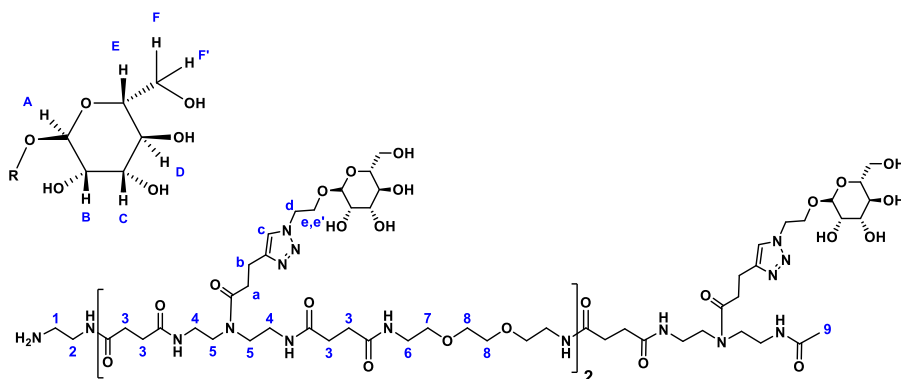


Abbildung 44: RP-HPLC Analyse von Verbindung 2

Verbindung 3: Man(1,3,5)-5

Verbindung 3 wurde nach Aufreinigung mittels präparativer HPLC in einer Ausbeute von 58 % erhalten. Das anomere Proton der Mannoseliganden (A) wird im ^1H -NMR-Spektrum nicht nachgewiesen werden, da das Signal von im Lösungsmittel enthaltenem HDO bei 4.79 ppm überlagert wird.



^1H -NMR (600 MHz, D_2O): δ 7.92 – 7.85 (m, 3H, c), 4.70 – 4.58 (m, 6H, d), 4.14 – 4.05 (m, 3H, e oder e') 3.95 – 3.90 (m, 3H, e oder e'), 3.88 – 3.84 (m, 3H, B), 3.76 – 3.60 (m, 28H, 7+8+C+E+F+F'), 3.53 – 3.33 (m, 34H, 2+4+5+6), 3.17 – 3.13 (t, $J = 5.90$ Hz, 2H, 1), 3.06 – 2.97 (m, 9H, b+D), 2.84 – 2.76 (m, 6H, a), 2.58 – 2.45 (m, 20H, 3), 1.97 – 1.98 (m, 3H, 9) ppm.

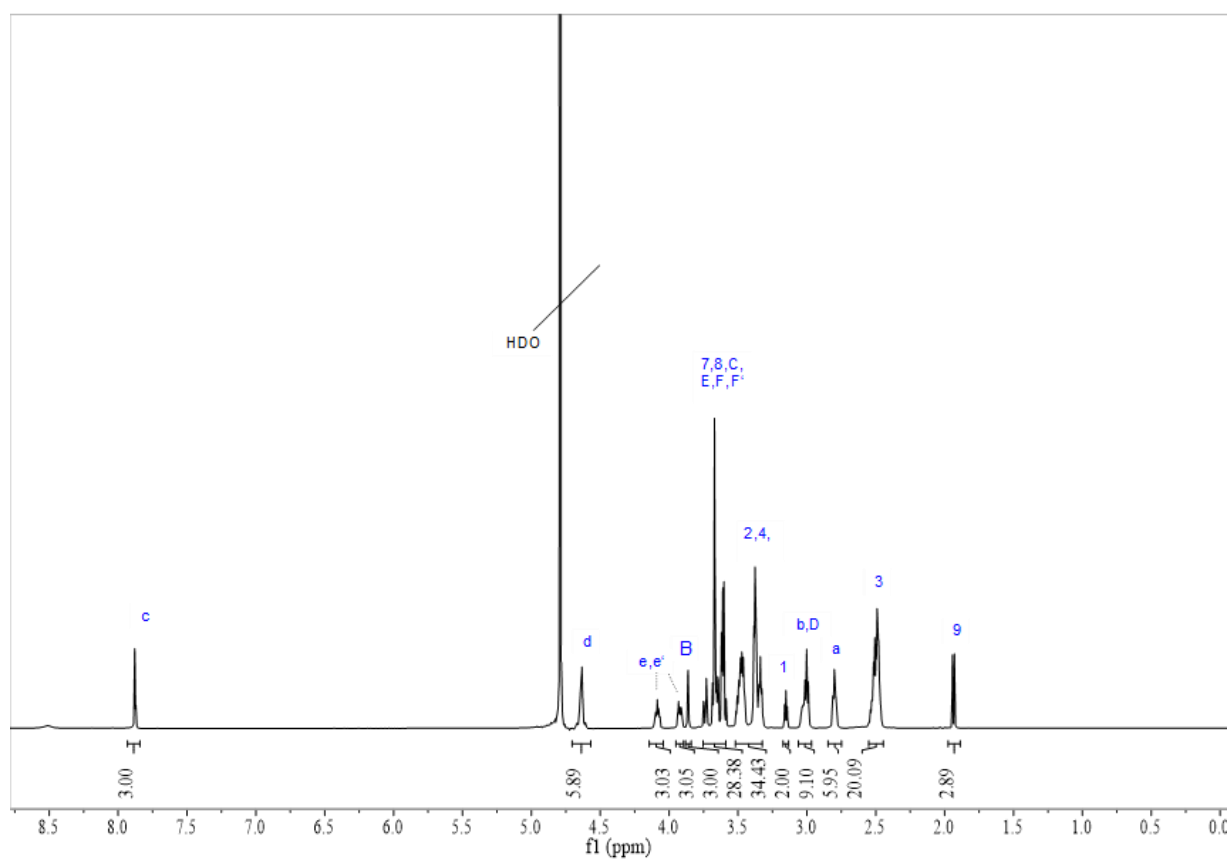


Abbildung 45: ^1H -NMR (600 MHz, D_2O) von Verbindung 3.

ESI-MS m/z Berechnet für $C_{87}H_{148}N_{24}O_{36}$ (Molekulargewicht: 2105.05 g/mol): $[M+2H]^{2+}$ berechnet.: 1053.5; gefunden: 1053.7, $[M+3H]^{3+}$ berechnet.: 702.7; gefunden 702.9, $[M+4H]^{4+}$ berechnet.: 527.3; gefunden 527.5.

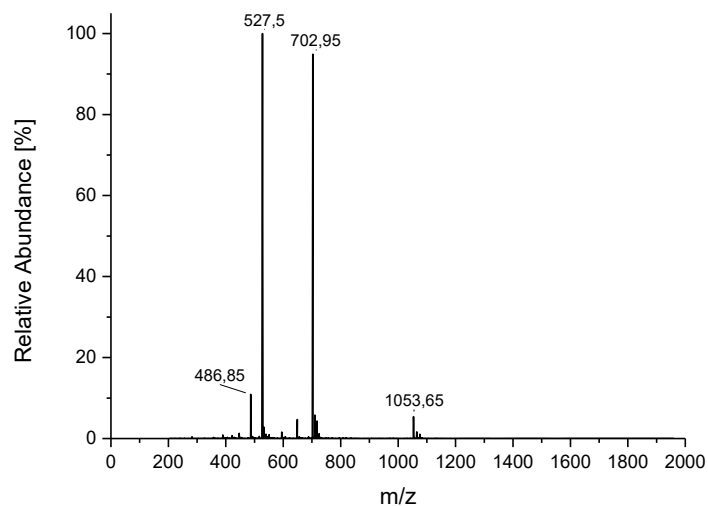


Abbildung 46: ESI-MS-Analyse von Verbindung 3 (Positivmodus).

RP-HPLC (linearer Gradient von 0 - 50% Eluent B in 30 min bei 25 °C): t_R = 9.74 min. Ermittelte Reinheit: >95%

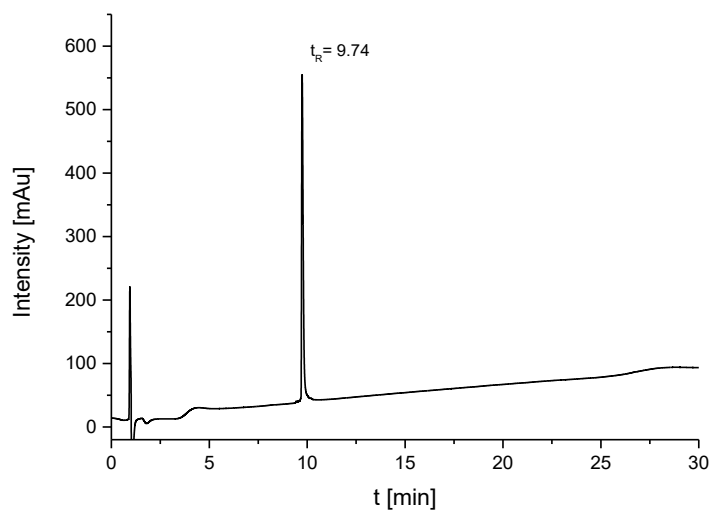
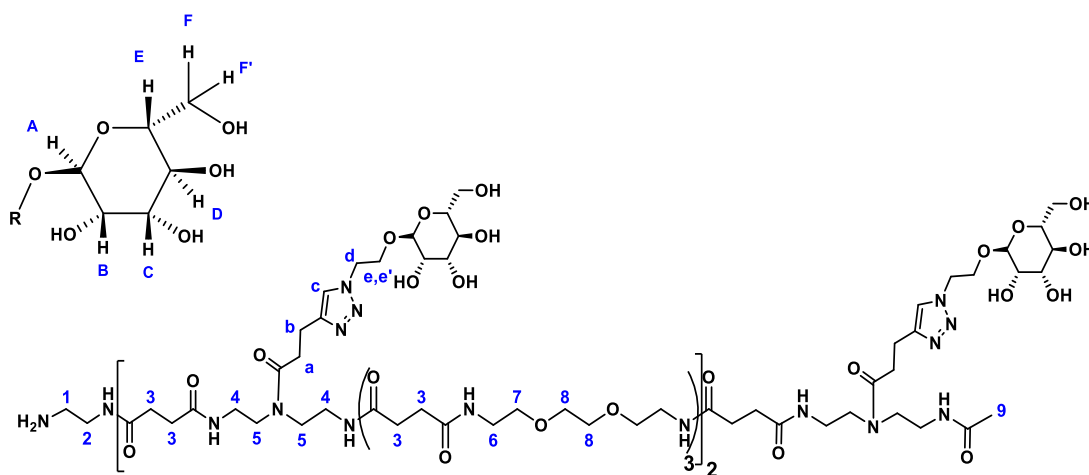


Abbildung 47: RP-HPLC Analyse von Verbindung 3.

Verbindung 4: Man(1,5,9)-9

Verbindung 4 wurde nach Aufreinigung mittels präparativer HPLC in einer Ausbeute von 39 % erhalten. Das anomere Proton der Mannoseliganden (A) wird im ^1H -NMR-Spektrum nicht nachgewiesen werden, da das Signal von im Lösungsmittel enthaltenem HDO bei 4.79 ppm überlagert wird.



^1H -NMR (600 MHz, D_2O): δ 7.90 – 7.85 (m, 3H, c), 4.69 – 4.60 (m, 6H, d), 4.12 – 4.06 (m, 3H, e oder e'), 3.95 – 3.90 (m, 3H, e oder e'), 3.88 – 3.85 (m, 3H, B), 3.76 – 3.60 (m, 60H, 7+8+C+E+F+F'), 3.52 – 3.34 (m, 50H, 2+4+5+6), 3.18 – 3.12 (t, $J = 5.91$ Hz, 2H, 1), 3.06 – 2.98 (m, 15H, b+D), 2.84 – 2.76 (m, 10H, a), 2.55 – 2.46 (m, 36H, 3), 1.97 – 1.89 (m, 3H, 9) ppm.

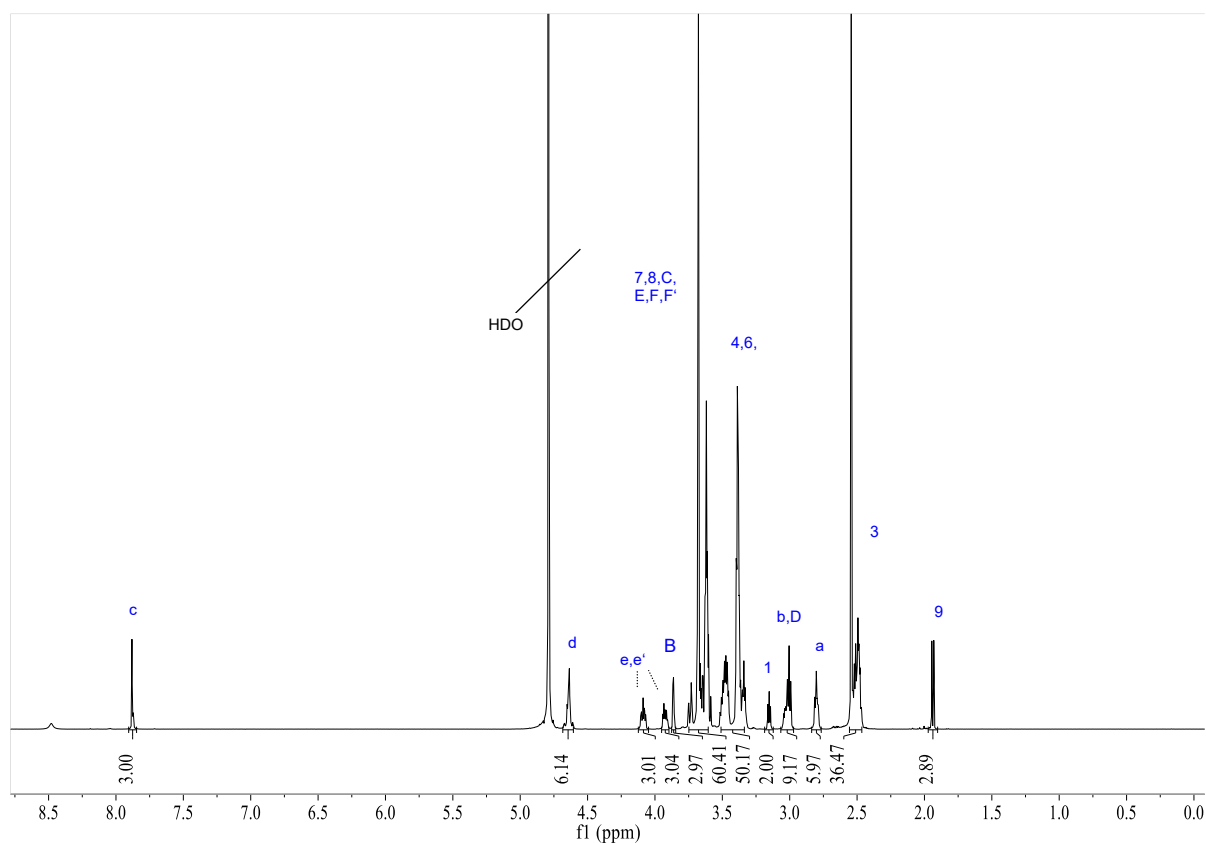


Abbildung 48: ^1H -NMR (600 MHz, D_2O) von Verbindung 4.

ESI-MS m/z Berechnet für $\text{C}_{127}\text{H}_{220}\text{N}_{32}\text{O}_{52}$ (Molekulargewicht: 3025.56): $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ berechnet.: 1009.5; gefunden: 1009.8, $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ berechnet.: 757.4; gefunden: 757.7, $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ berechnet.: 606.1; gefunden 606.3, $[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$ berechnet.: 505.3; gefunden 505.5.

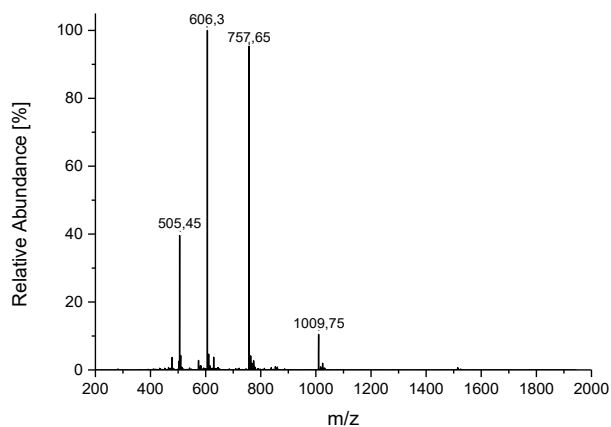


Abbildung 49: ESI-MS-Analyse von Verbindung 4 (Positivmodus).

RP-HPLC (linearer Gradient von 0 - 50% Eluent B in 30 min bei 25 °C): t_R = 11.80 min. Ermittelte Reinheit: >95%

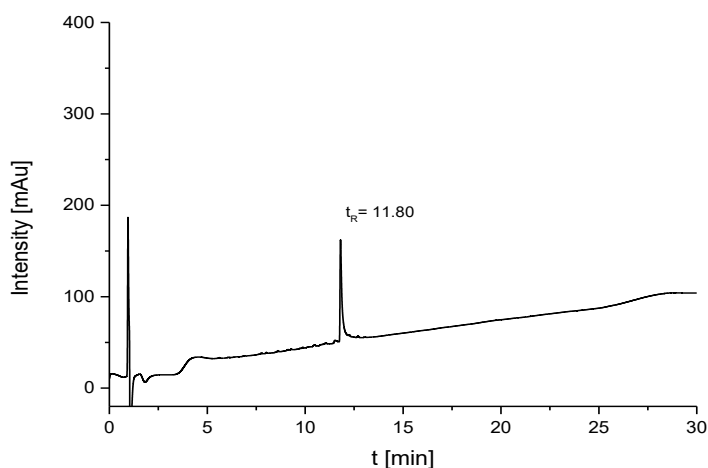
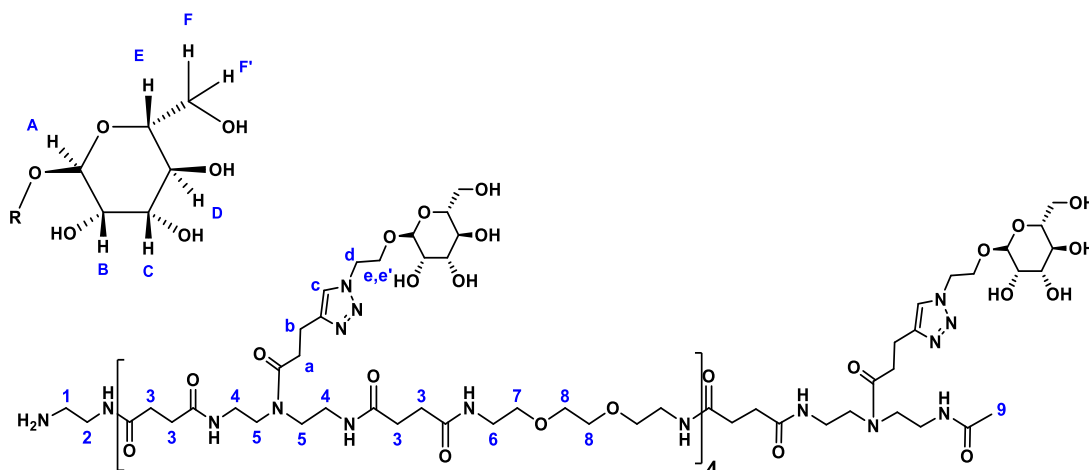


Abbildung 50: RP-HPLC Analyse von Verbindung 4.

Verbindung 5: Man(1,3,5,7,9)-9

Verbindung 5 wurde nach Aufreinigung mittels präparativer HPLC in einer Ausbeute von 52 % erhalten. Das anomere Proton der Mannoseliganden (A) wird im ^1H -NMR-Spektrum nicht nachgewiesen werden, da das Signal von im Lösungsmittel enthaltenem HDO bei 4.79 ppm überlagert wird.



^1H -NMR (600 MHz, D_2O): δ 7.90 – 7.85 (m, 5H, c), 4.67 – 4.59 (m, 10H, d), 4.12 – 4.06 (m, 5H, e or e') 3.95 – 3.90 (m, 5H, e or e'), 3.88 – 3.84 (m, 5H, B), 3.76 – 3.59 (m, 52H, 7+8+C+E+F+F'), 3.52 – 3.44 (m, 22H, 2+5), 3.41 – 3.18 (m, 36H, 4+6) 3.18 – 3.13 (t, $J = 5.90$ Hz, 2H, 1), 3.07 – 2.97 (m, 9H, b+D), 2.84 – 2.77 (m, 6H, a), 2.56 – 2.46 (m, 36H, 3), 1.97 – 1.91 (m, 3H, 9) ppm.

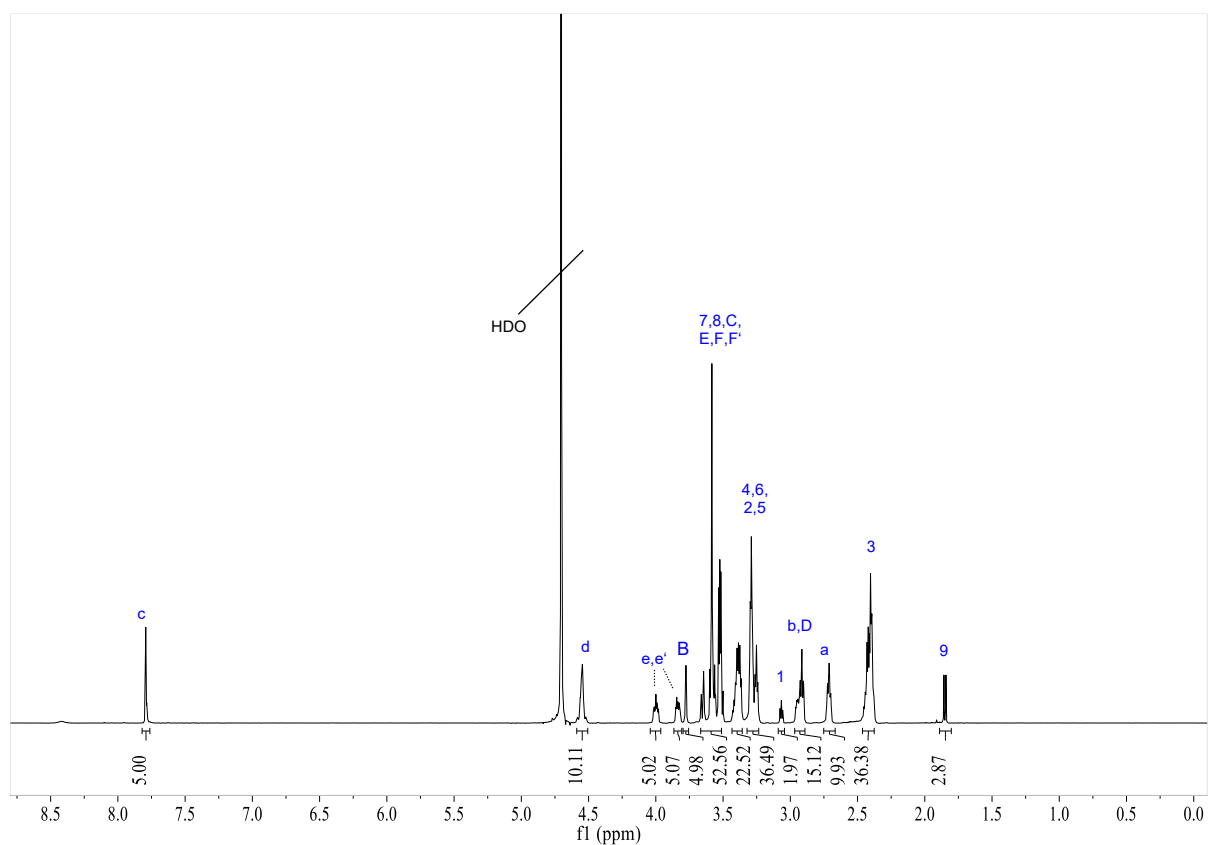


Abbildung 51: ^1H -NMR (600 MHz, D_2O) von Verbindung 5.

ESI-MS m/z berechnet für $C_{149}H_{252}N_{40}O_{62}$ (Molekulargewicht: 3593.78 g/mol): $[M+4H]^{4+}$ berechnet.: 899.4; gefunden: 899.8, $[M+5H]^{5+}$ berechnet.: 719.8; gefunden: 720.1, $[M+6H]^{6+}$ berechnet.: 600.0; gefunden 600.3.

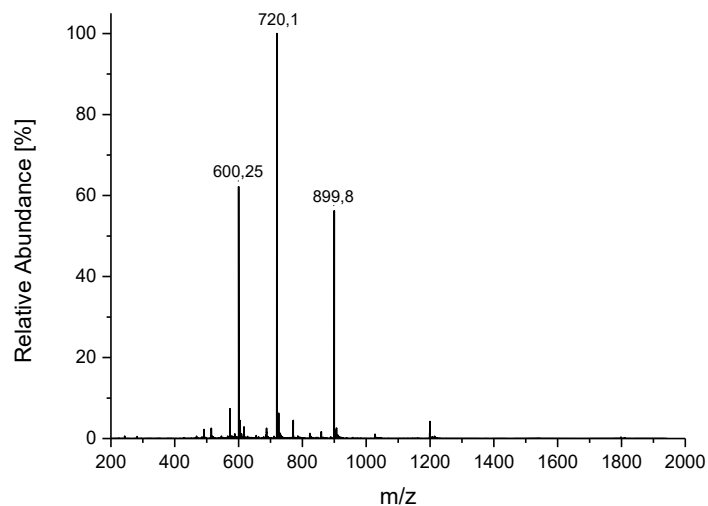


Abbildung 52: ESI-MS-Analyse von Verbindung 5 (Positivmodus).

RP-HPLC (linearer Gradient von 0 - 50% Eluent B in 30 min bei 25 °C): t_R = 11.19 min. Ermittelte Reinheit: >95%

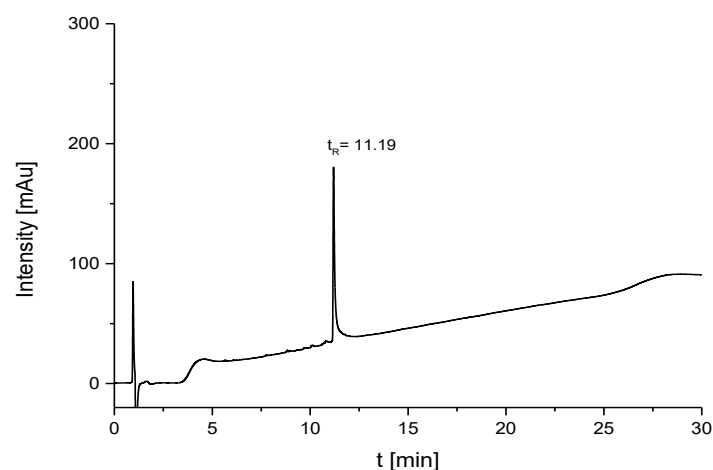


Abbildung 53: RP-HPLC Analyse von Verbindung 5.

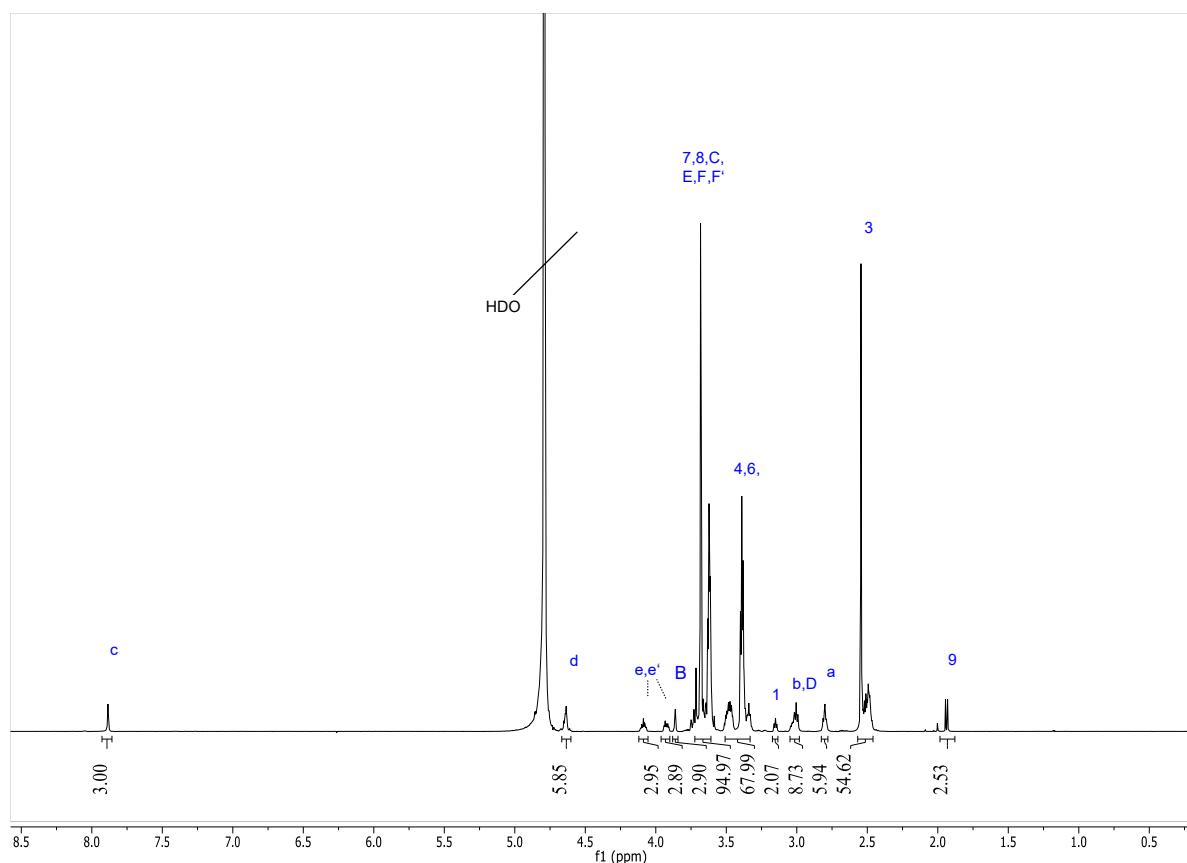


Abbildung 54: ^1H -NMR (600 MHz, D_2O) von Verbindung 6.

ESI-MS m/z berechnet. für $\text{C}_{167}\text{H}_{292}\text{N}_{40}\text{O}_{68}$ (Molekulargewicht: 3948.39 g/mol): $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ berechnet.: 988.1; gefunden: 987.98, $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ berechnet.: 790.7; gefunden: 790.5, $[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$ berechnet.: 659.1; gefunden 659.0, $[\text{M}+7\text{H}]^{7+}$ berechnet.: 565.1; gefunden 565.1, $[\text{M}+8\text{H}]^{8+}$ berechnet.: 494.5; gefunden 494.5.

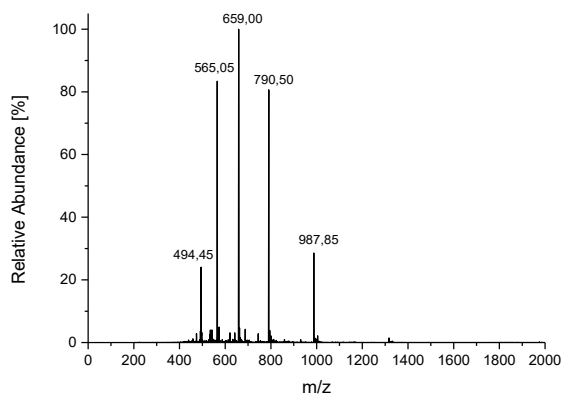


Abbildung 55: ESI-MS-Analyse von Verbindung 6 (Positivmodus).

RP-HPLC (linearer Gradient von 0 - 50% Eluent B in 30 min bei 25 °C): $t_R = 9.87$ min. Ermittelte Reinheit: >95%

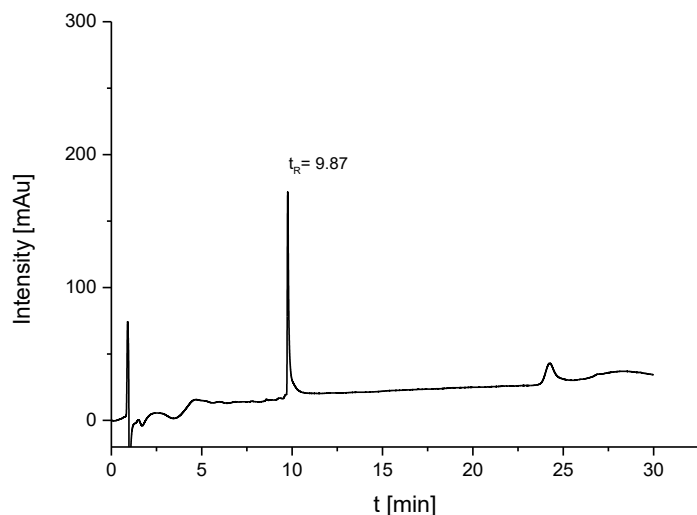
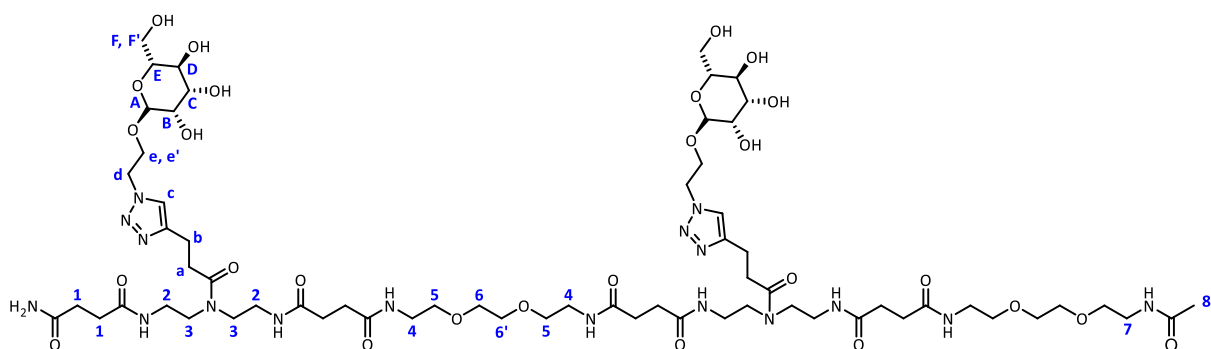


Abbildung 56: RP-HPLC Analyse von Verbindung 6.

Die im Folgenden dargestellten Verbindungen 7 – 12 wurden mit Theresa Seiler und Torben Queckbörner hergestellt.

Verbindung 7: *Man(1,4)-4*

Verbindung 7 wurde nach Aufreinigung mittels präparativer HPLC in einer Ausbeute von 38 % erhalten. Das anomere Proton der Mannoseliganden (A) wird im ^1H -NMR-Spektrum nicht nachgewiesen werden, da das Signal von im Lösungsmittel enthaltenem HDO bei 4.79 ppm überlagert wird.



^1H -NMR (600 MHz, D_2O): δ [ppm] = 8.26 (s, -NH-), 7.90 (s, 2H, **c**), 4.65 – 4.52 (m, 4H, **d**), 4.11 – 4.06 (m, 2H, **e**), 3.98 – 3.87 (m, 2H, **e'**), 3.86 – 3.82 (m, 2H, **B**), 3.73 – 3.48 (m, 30H, **C**, **D**, **F**, **F'**, **5**, **6**), 3.54 – 3.45 (m, 8H, **3**), 3.40 – 3.29 (m, 16H, **2**, **4**, **7**), 3.08 – 2.99 (m, 6H, b, **E**), 2.82 (t, 4H, **a**), 2.58 – 2.39 (m, 16H, **1**), 1.88 (s, 3H, **8**).

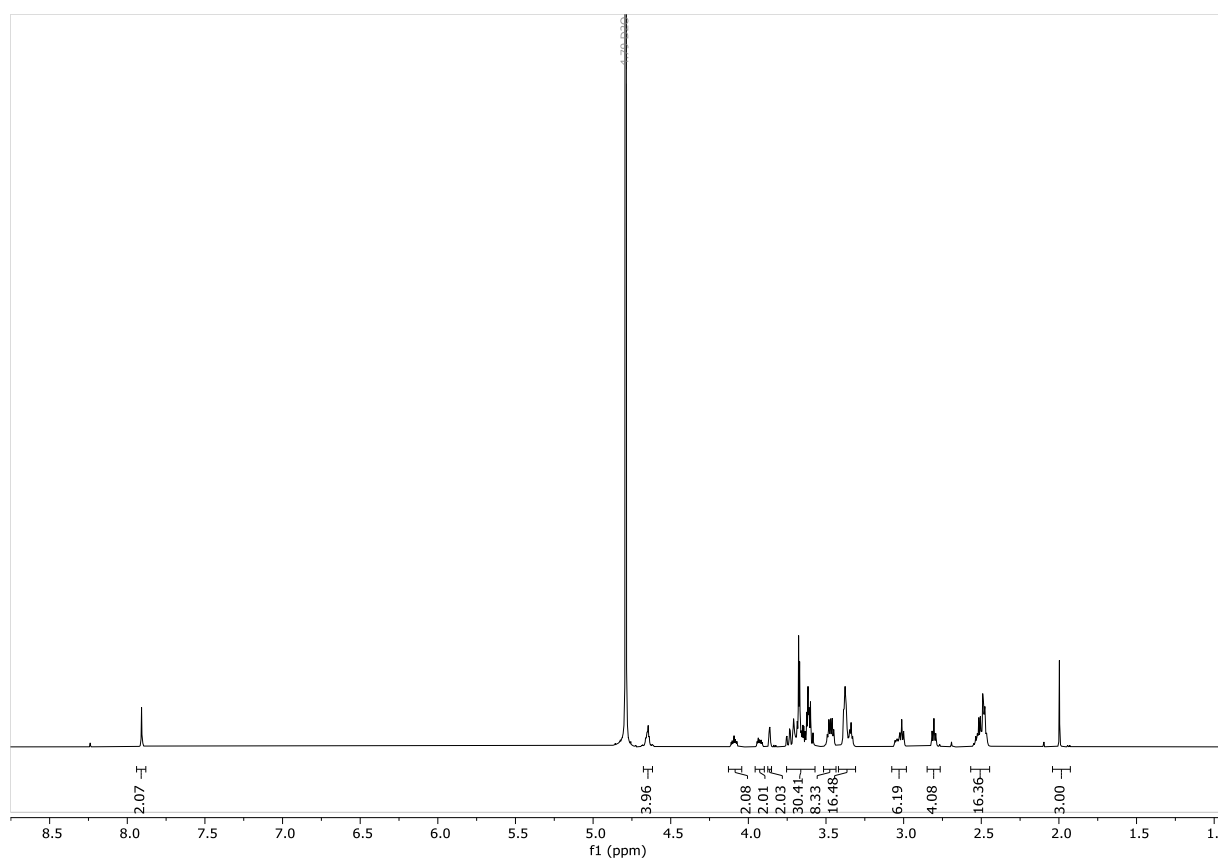


Abbildung 57: ^1H -NMR (600 MHz, D_2O) von Verbindung 7.

ESI-MS: 1547.77 m/z berechnet. Gefunden: 775.2 $[M+2H]^{+2}$; 517.1 $[M+3H]^{+3}$.

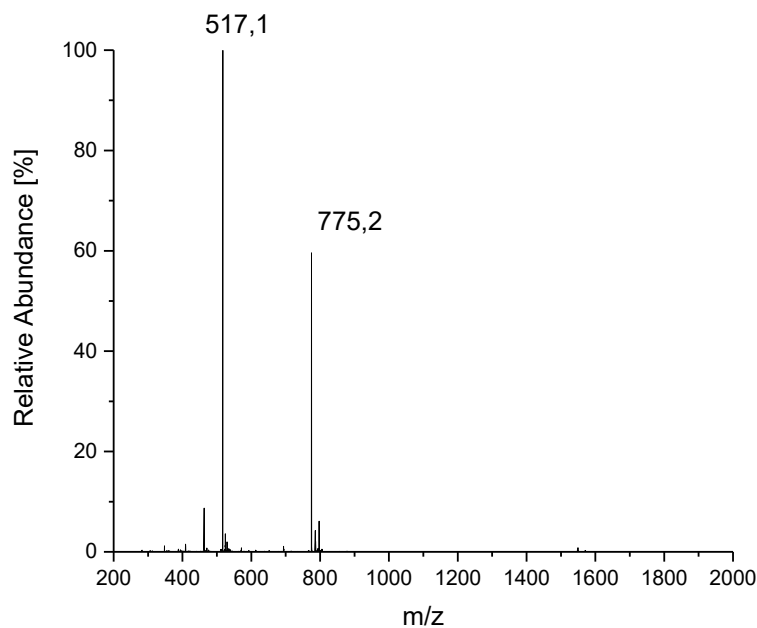


Abbildung 58: ESI-MS-Analyse von Verbindung 7 (Positivmodus).

RP-HPLC: H₂O/MeCN (95/5 vol.%) mit 0.1% Ameisensäure (A); 100 % A / 70 % A in 30 min): t_R = 10.22 min, ermittelte Reinheit= 90 %.

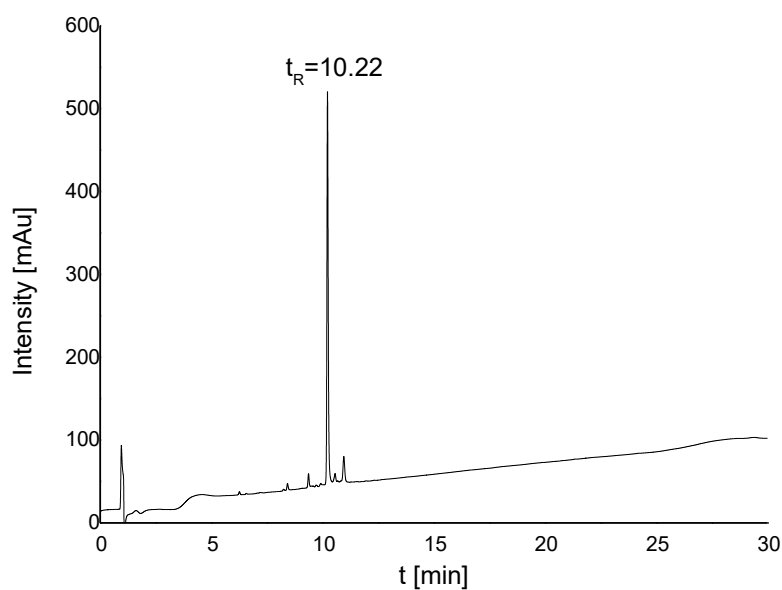
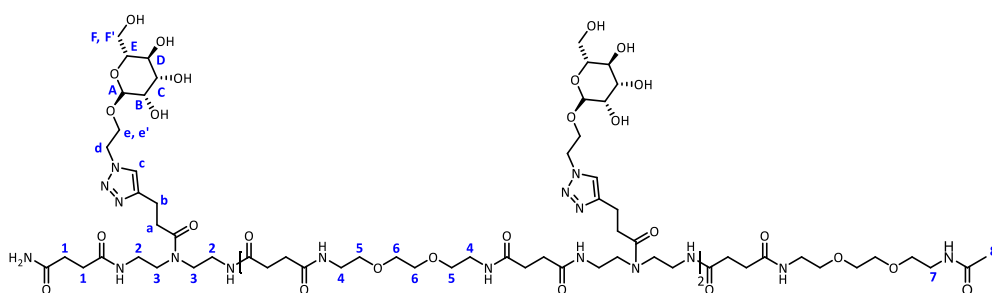


Abbildung 59: RP-HPLC Analyse von Verbindung 7.

Verbindung 8: Man(1,3,5)-6

Verbindung 8 wurde nach Aufreinigung in einer Ausbeute von 46 % erhalten. Das anomere Proton der Mannoseliganden (A) wird im ^1H -NMR-Spektrum nicht nachgewiesen werden, da das Signal von im Lösungsmittel enthaltenem HDO bei 4.79 ppm überlagert wird.



^1H -NMR (600 MHz, D_2O): 7.89 (s, 3H, **c**), 4.68 – 4.50 (m, 6H, **d**), 4.08 – 4.06 (m, 3H, **e**), 3.95 – 3.88 (m, 3H, **e'**), 3.85 – 3.81 (m, 3H, **B**), 3.74–3.55 (m, 40H, **C, D, F, F', 5, 6**), 3.50–3.33 (m, 36H, **2, 3, 4, 7**), 3.10 – 2.98 (m, 9H, **b, E**), 2.80 (t, 6H, **a**), 2.55 – 2.45 (m, 24H, **1**), 1.93 (d, 3H, **8**).

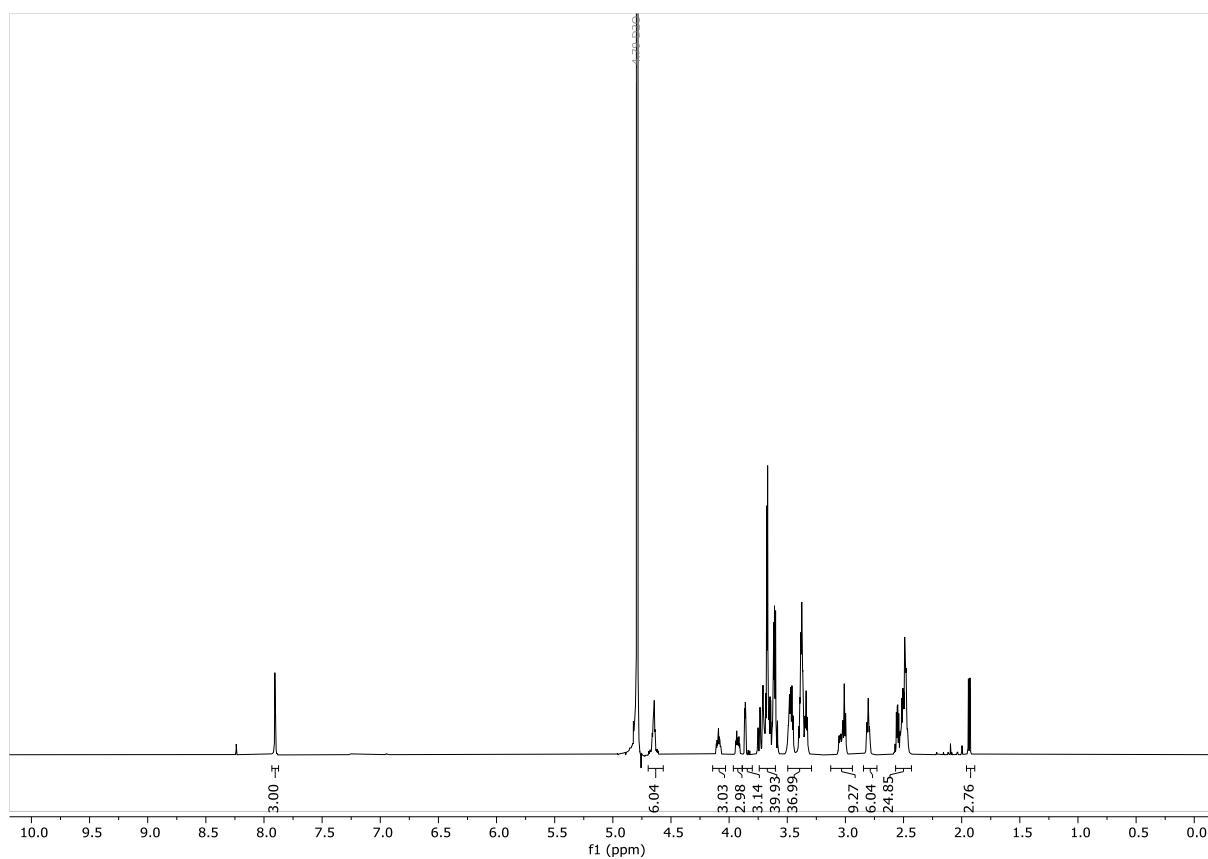


Abbildung 60: ^1H -NMR (600 MHz, D_2O) von Verbindung 8.

ESI-MS: 2292.13 m/z berechnet. Gefunden: 1147.3 $[\text{M}+2\text{H}]^{+2}$; 765.3 $[\text{M}+3\text{H}]^{+3}$ und 574.3 $[\text{M}+4\text{H}]^{+4}$

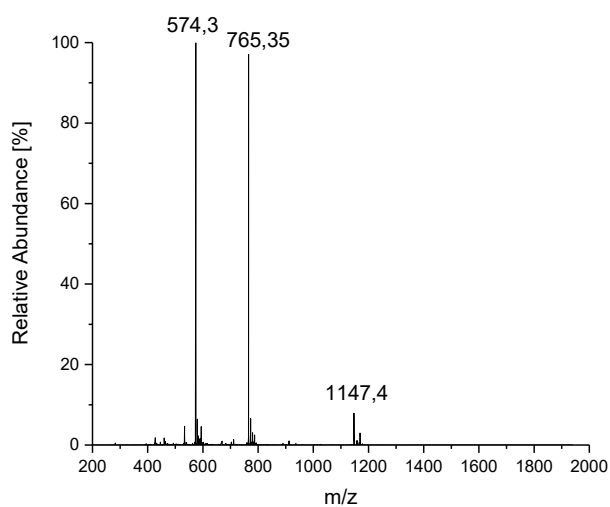


Abbildung 61: ESI-MS-Analyse von Verbindung 8 (Positivmodus).

RP-HPLC: H₂O/MeCN (95/5 vol.%) mit 0.1% Ameisensäure (A); 100 % A / 70 % A in 30 min): t_R = 11.02 min. Ermittelte Reinheit = 92 %.

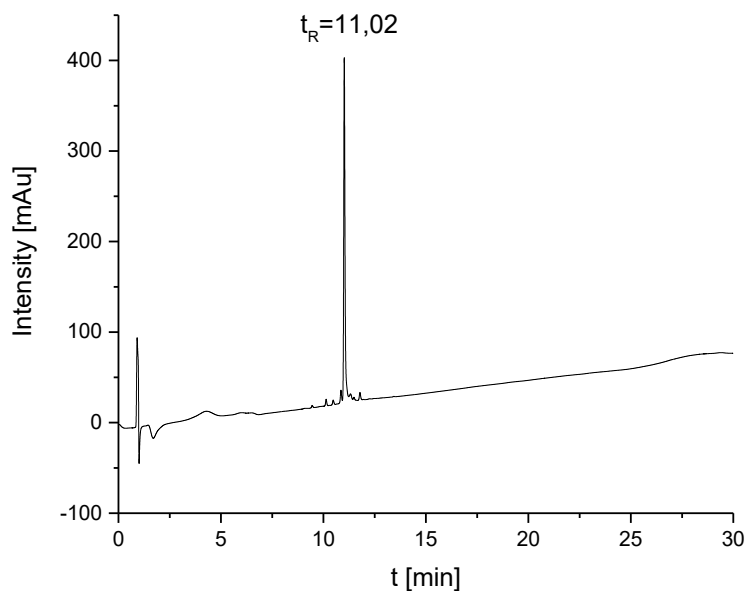
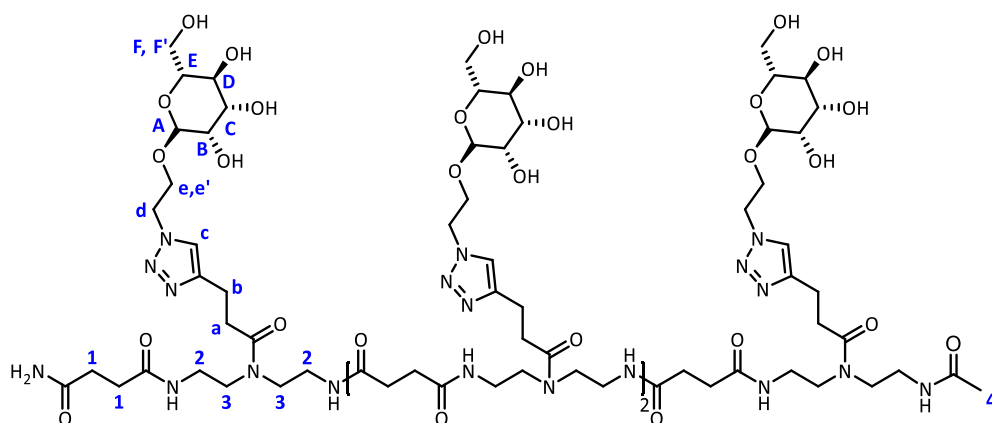


Abbildung 62: RP-HPLC Analyse von Verbindung 8.

Verbindung 9: Man(1,2,3,4)-4

Verbindung 9 wurde nach Aufreinigung in einer Ausbeute von 52 % erhalten. Das anomere Proton der Mannoseliganden (A) wird im ¹H-NMR-Spektrum nicht nachgewiesen werden, da das Signal von im Lösungsmittel enthaltenem HDO bei 4.79 ppm überlagert wird.



^1H -NMR (600 MHz, D_2O): δ [ppm] = 7.92 (s, 4H, **c**), 4.68 – 4.51 (m, 8H, **d**), 4.08 – 4.04 (m, 4H, **e**), 3.98 – 3.91 (m, 4H, **e'**), 3.88 – 3.84 (m, 4H, **B**), 3.78 – 3.58 (m, 20H, **C**, **D**, **F**, **F'**), 3.48 – 3.31 (m, 32H, **2**, **3**), 3.10 – 3.04 (m, 12H, **b**, **E**), 2.80 – 2.76 (m, 8H, **a**), 2.58 – 2.46 (m, 16H, **1**), 1.94 & 1.92 (2 d, 3H, **4**).

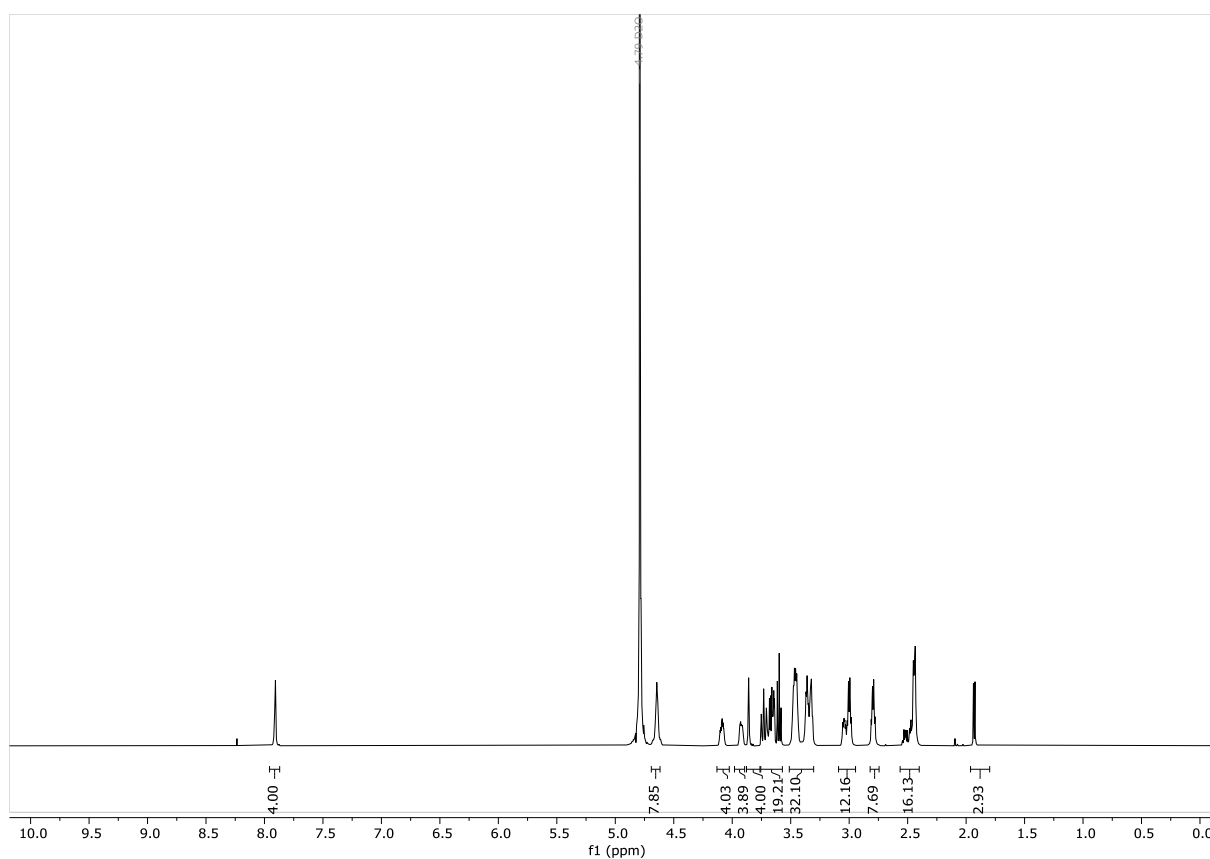


Abbildung 63: ^1H -NMR (600 MHz, D_2O) von Verbindung 9.

ESI-MS: 2115.99 m/z berechnet. Gefunden: 1059.2 $[M+2H]^{+2}$, 706.6 $[M+3H]^{+3}$ und 530.2 $[M+4H]^{+4}$

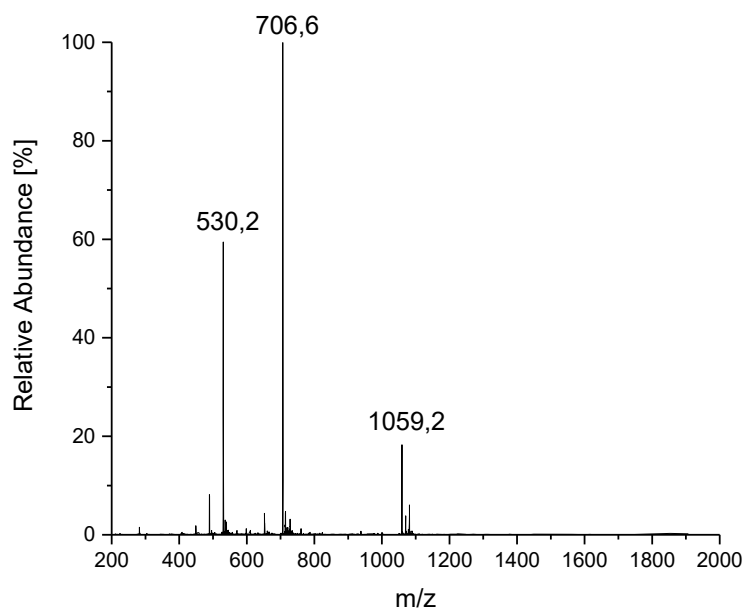


Abbildung 64: ESI-MS-Analyse von Verbindung 9 (Positivmodus).

RP-HPLC: H₂O/MeCN (95/5 vol.%) mit 0.1 vol.% Ameisensäure (A); 100 % A / 70 % A in 30 min):
 t_R = 9.57 min. Ermittelte Reinheit = 92 %.

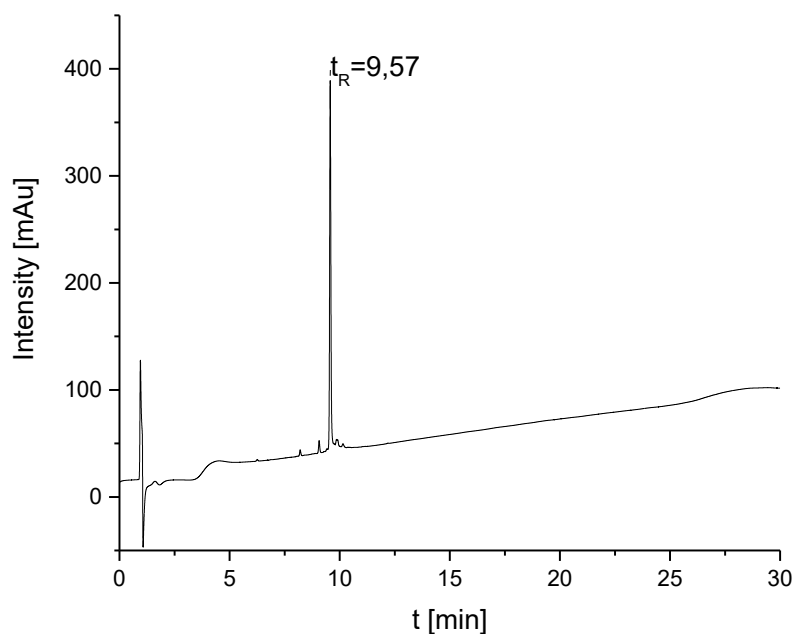
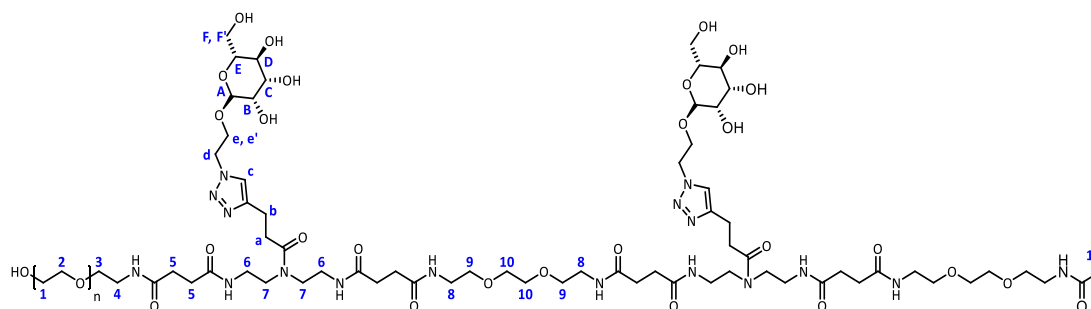


Abbildung 65: RP-HPLC Analyse von Verbindung 9.

Verbindung 10: PEG-Man(1,3)-4



$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O): δ [ppm] = 7.89 (s, 2H, **c**), 4.66 – 4.53 (m, 4H, **d**), 4.05 – 4.03 (m, 2H, **e**), 3.98 – 3.90 (m, 2H, **e'**), 3.87 – 3.83 (m, 2H, **B**), 3.80 – 3.56 (m, 385H, 1-4, 6, 9, 10, **C**, **D**, **F**, **F'**), 3.49 – 3.33 (m, 24H, **6**, **7**, **8**), 3.11 – 3.02 (m, 6H, **b**, **E**), 2.85 – 2.80 (m, 4H, **a**), 2.57 – 2.45 (m, 16H, **5**), 1.98 – 1.94 (s, 2,5H, **11**).

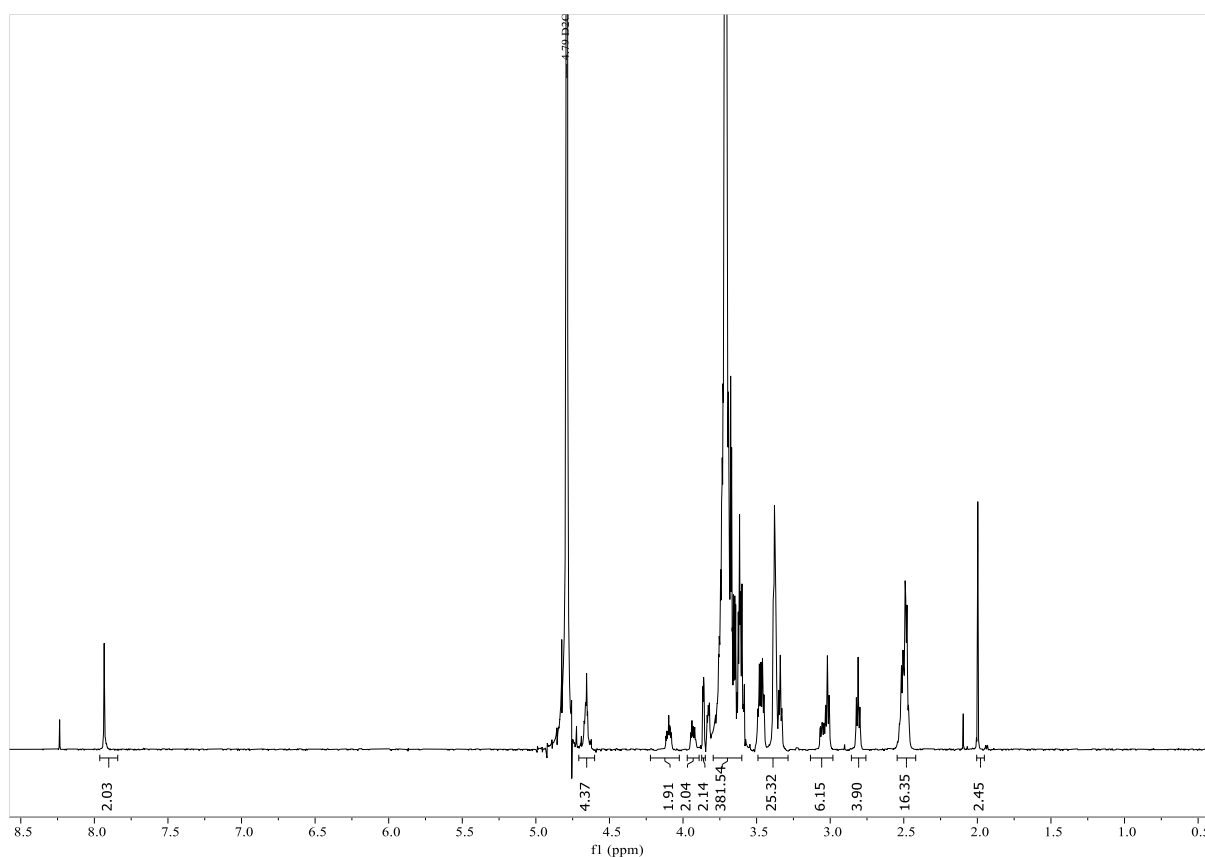


Abbildung 66: $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O) von Verbindung 10.

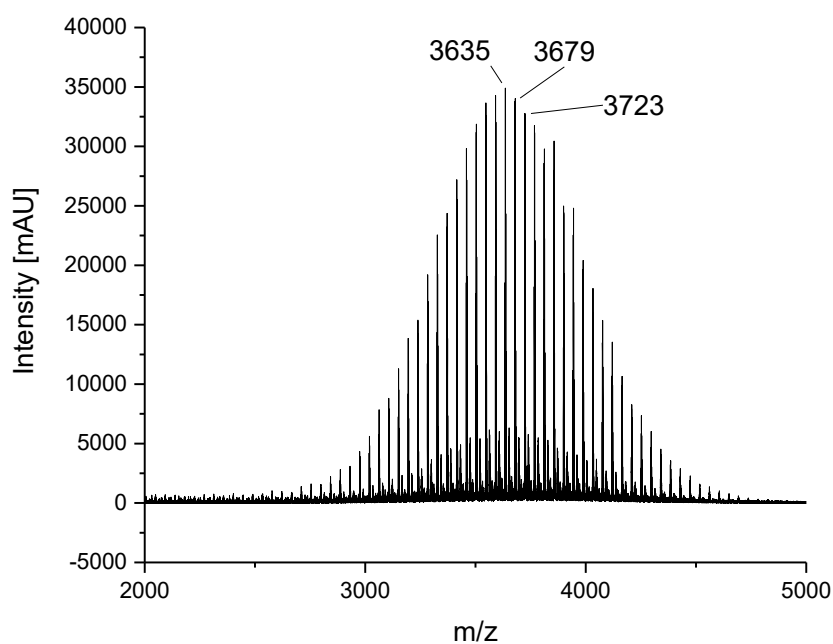
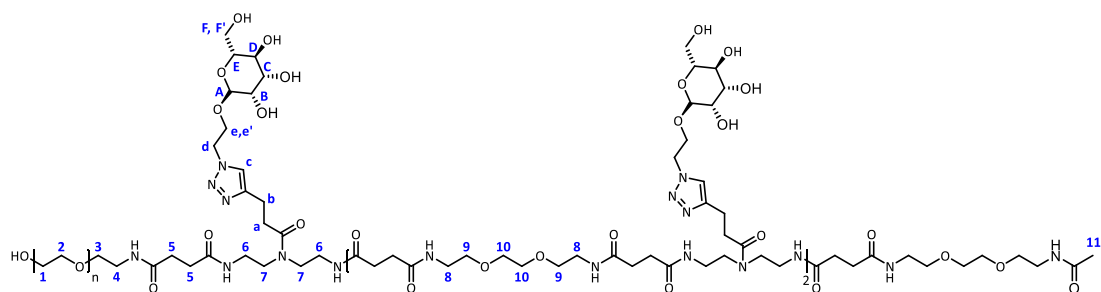


Abbildung 67: MALDI-TOF-MS von Verbindung 10.

Verbindung 11: PEG-Man(1,3,5)-6



$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O): δ [ppm] = 7.92 (s, 3H, **c**), 4.66, (m, 6H, **d**), 4.12 – 4.03 (m, 3H, **e**), 3.97 – 3.90 (m, 3H, **e'**), 3.86 – 3.56 (m, 595H, **1–4**, **6**, **9**, **10**, **C**, **D**, **F**, **F'**), 3.60 – 3.41 (m, 12H, **6**), 3.39 – 3.29 (m, 27H, **7**, **8**), 3.08 – 2.97 (m, 9H, **b**, **E**, DMF), 2.86 – 2.77 (m, 6H, **a**), 2.54 – 2.43 (m, 24 H, **5**), 1.91 (s, 3H, **11**).

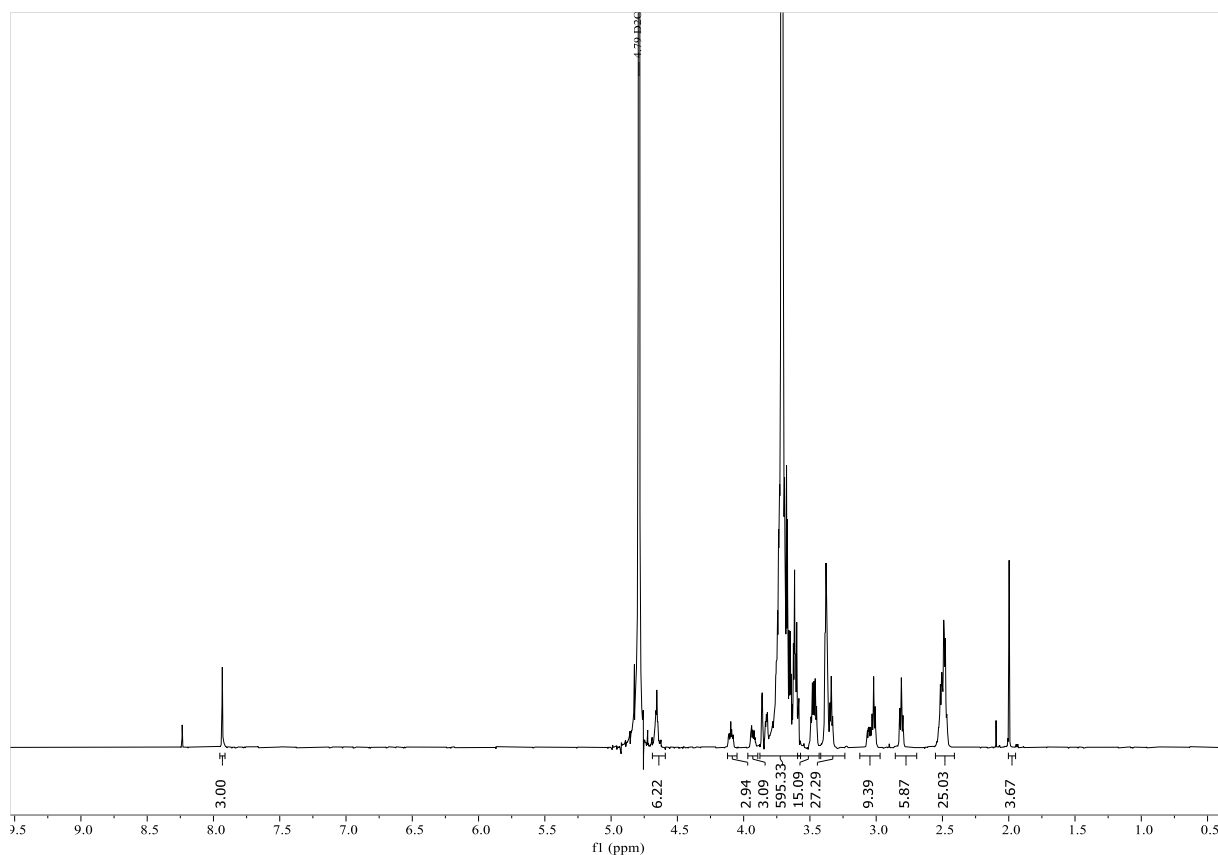


Abbildung 68: $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O) von Verbindung 11.

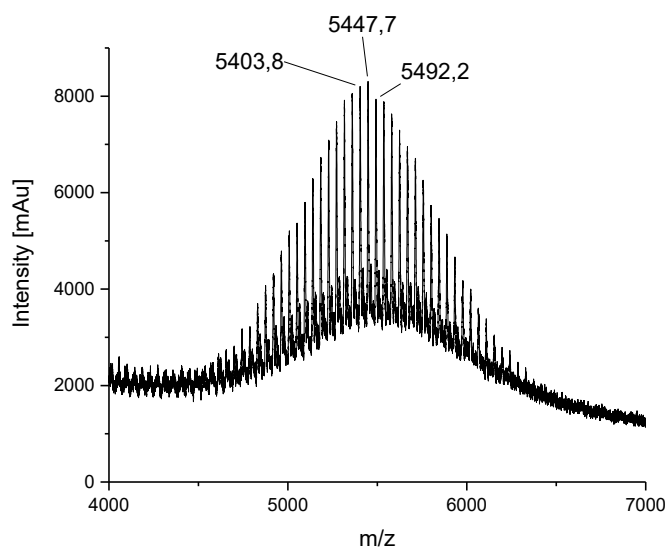


Abbildung 69: MALDI-TOF-MS von Verbindung 11.

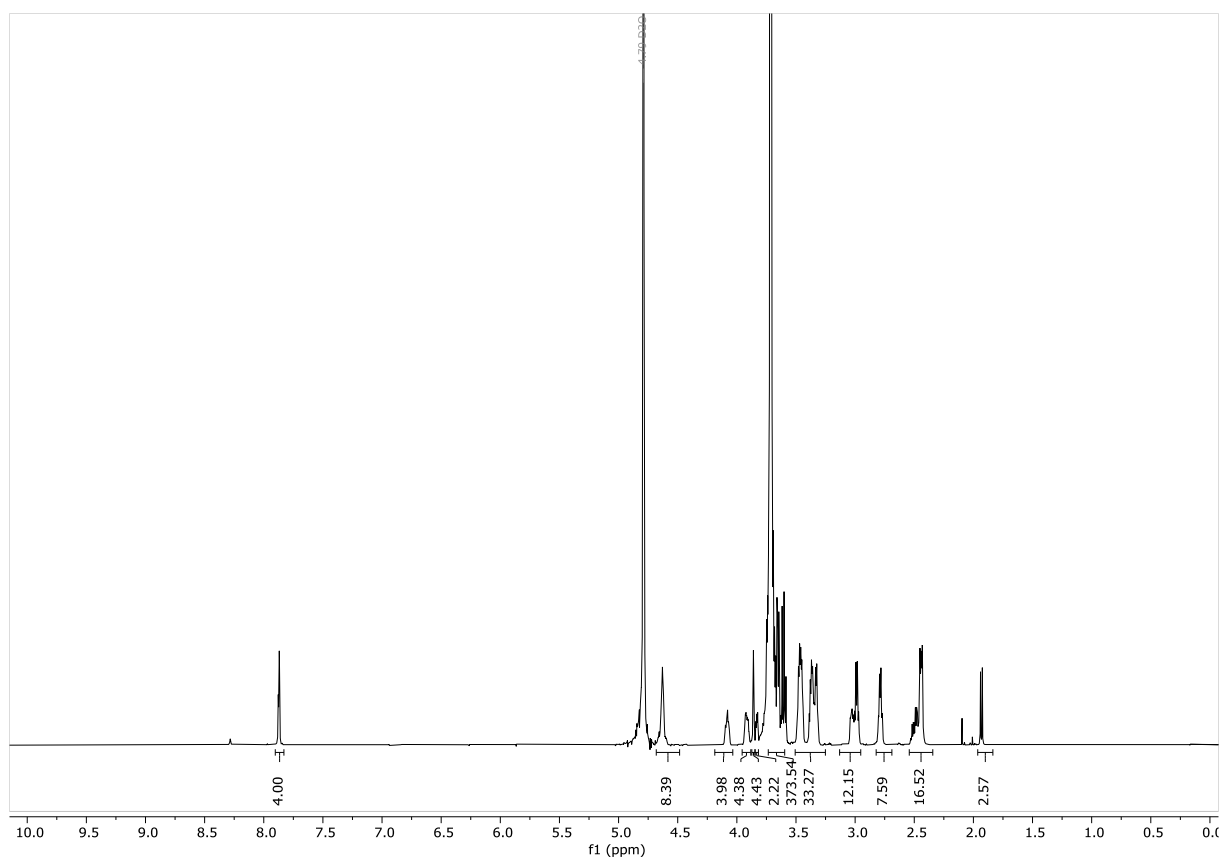


Abbildung 70: ^1H -NMR (600 MHz, D_2O) von Verbindung 12.

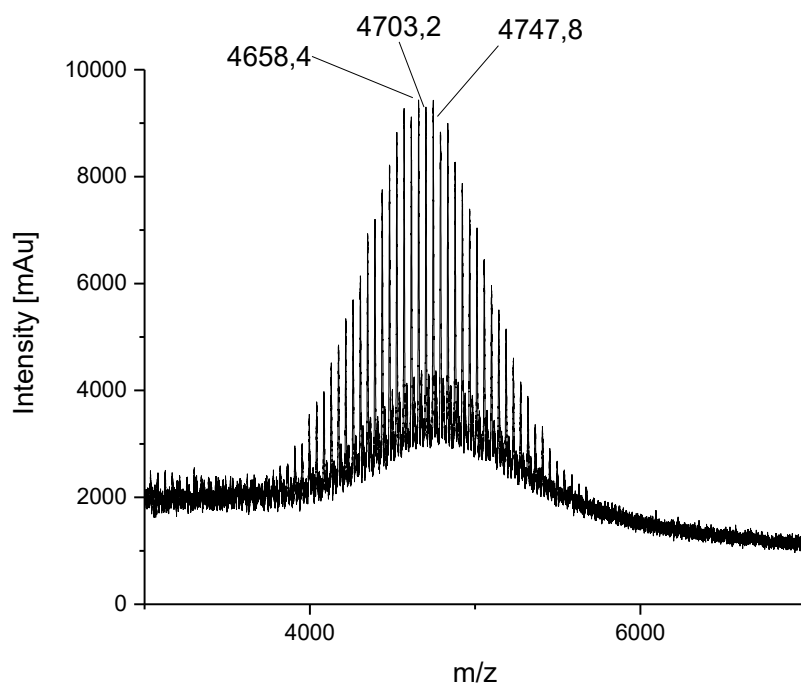


Abbildung 71: MALDI-TOF-MS von Verbindung 12.

Ich erkläre hiermit, dass diese Dissertation das Ergebnis meiner eigenen Arbeit ist. Die Beiträge der Mitautoren zu dieser Arbeit sind im Folgenden aufgeführt:

- Torben Queckbörner & Teresa Seiler: Synthese von PEGylierten Präzisionsglykomakromolekülen
- Andrea Grafmüller: Theoretische Berechnung Molecular Dynamics (Kapitel 3.2.6)
- Sophia Boden & Christoph Gerke: Einweisung in und Bereitstellung des Sensor-Chips für SPR Messungen

6 Verzeichnisse

6.1 Abkürzungsverzeichnis

AFM	Atomkraftmikroskopie
CA	Crotonsäure
calcd	Berechnet
ConA	Concanavalin A
ConA	Concanavalin A
CRD	Carbohydrate Recognition Domain
CuAAC	CuI-catalyzed azide/alkyne cycloaddition
DCM	Dichlormethan
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDA	Ethylendiamin
EDS	Ethylene dioxy diamine succinic acid
ELISA	Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay
Equiv	Äquivalente
Et al.	Et alteri, und andere
EtOH	Ethanol
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
IC ₅₀	Mittlere Inhibitorische Konzentration
ITC	Isothermalkalorimetrie
L	Ligand
LBB	Lektin binding buffer
MECN	Acetonitril
MeOH	Methanol
Me α Man	Methyl α -D-mannopyranosid
min	Minute
NaOMe	Natriummethanolat
NMR	Kernresonanzspektroskopie
PEG-dAAm	Polyethyleneglycol-diacrylamid
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
QCM	Quartz Crystal Microbalance
R	Rezeptor
RICM	Reflexionskontrastmikroskopie

RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAR	Structure Activity Relation
SCP	Soft Colloidal Probe
SPC	Structure Property rel
SPPoS	Solid Phase Polymer Synthesis
SPR	Surface Plasmon Resonance
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
UV	Ultraviolett
Vol.	Volumen
wt.	Gewicht

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: a) Schematische Darstellung ausgewählter Strukturen der Glykokalyx. b) Elektronenmikroskopische Aufnahme der Glykokalyx eines Erythrozyten. ^[13]	9
Abbildung 2: Wechselwirkungen zwischen Methyl-Mannose und Aminosäuren, die auf den Oberflächen von Lektinen gefunden werden. ^[57]	12
Abbildung 3: Interaktion zwischen Zellen, Pathogenen und Antikörpern durch multivalente Ligand-Rezeptor Wechselwirkungen, in Anlehnung an ^[62]	15
Abbildung 4: Schematische Darstellung von identifizierten multivalenten Ligand-Rezeptor Komplexbildungsmöglichkeiten, in Anlehnung an ^[100]	17
Abbildung 5: Schematische Darstellung von natürlichen Saccharidstrukturen und Glykomimetika mit multivalenter Präsentation der CRD auf einem Polymergerüst.....	18
Abbildung 6: Schematische Darstellung unterschiedlicher Glykomimetika mit variierender Gerüststruktur, in Anlehnung an ^[114]	19
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Solid Phase Polymer Synthesis (SPPoS). ^[116]	21
Abbildung 8: Schematischer Aufbau ITC Methode zur Analyse von Ligand-Rezeptor Wechselwirkungen in Lösung.....	23
Abbildung 9: Schematische Darstellung der SPR-Assayoptionen. a) Direkte Bindung: Rezeptor immobilisiert, Ligand wird injiziert. b) Inhibitionsassay: Rezeptor immobilisiert und Liganden sind daran gebunden, anschließende Inhibition durch konkurrierende Rezeptoren. c) Rezeptor immobilisiert und Ligand gebunden, anschließende Inhibition durch konkurrierende Liganden.	25
Abbildung 10: Schematische Darstellung verschiedener Ausführungsprinzipien der SCP-RICM Analyseverfahren.	26
Abbildung 11: Prinzip der SCP-RICM Methode und ein exemplarisches Interferenzmuster in Anlehnung an Pussak et al. ^[165]	27
Abbildung 12: Schematische Darstellung eines glykokonjugierten PEG-SCPs oder kurz Glyko-SCPs. ^[172]	32
Abbildung 13: Durchgeführte Bindungsstudien: Mit Glykooligomeren funktionalisierte SCPs (Adhäsion, Fluoreszenz), oberflächengebundenes ConA (Adhäsion) oder frei gelöste Glykooligomere (ITC) und ConA (ITC, Fluoreszenz). ^[172]	33
Abbildung 14: Funktionelle Monomer-Bausteine zum Aufbau der Glykooligomere.	34

Abbildung 15: Synthese von PEG-dAAm für die Herstellung der SCPs. ^[173]	37
Abbildung 16: Erhöhung des COOH-Funktionalisierungsgrades der SCPs durch Variation von verwendeten Überschüssen und der Belichtungszeit.	39
Abbildung 17: Übersicht der Ergebnisse zur Maximierung der Glykofunktionalisierung von PEG-SCP-CA. Dargestellte Fehler sind Standardabweichungen aus 3 Wiederholungen des TBO- Tests.	41
Abbildung 18: Darstellung der Adhäsionsenergien (jeweils drei verschiedene Oberflächen) bei unterschiedlichen Methoden zur ConA Immobilisierung. Dargestellte Fehler sind Standardabweichungen aus Wiederholungen der SCP-RICM Messungen auf jeweils 3 Oberflächen und jeweils 15 gemessenen SCPs.	43
Abbildung 19: Schematische Darstellung der JKR-Adhäsionsmessungen mit Glyko-SCPs. Der dunkle Bereich in der Mitte kennzeichnet den SCP-Adhäsionsbereich. ^[172]	46
Abbildung 20: Adhäsion von Glyko-SCPs auf ConA-Oberflächen mit exemplarischen Kontaktflächen für monovalente und trivalente Liganden. ^[172]	47
Abbildung 21: Ermittelten Adhäsionsenergien für die gesamte Probenreihe. Das Inset zeigt die nach Man-Valenz normalisierten Adhäsionsenergien. ^[172] Dargestellte Fehler sind Standardabweichungen aus Wiederholungen der SCP-RICM Messungen auf jeweils 3 verschiedenen Glasoberflächen und jeweils 15 gemessenen SCPs jeder Probe pro Oberfläche	48
Abbildung 22: Schematische Darstellung der SCP-Adhäsionsreduktion bei Zugabe von MeMan in unterschiedlichen Konzentrationen. Abnahme der Adhäsionsfläche bei Inhibitor- Konzentrationen 0 μ M (links), 300 μ M (Mitte) und 20 mM (rechts).....	49
Abbildung 23: Ergebnisse der IC ₅₀ Inhibitionsstudien für alle Proben bei Zugabe von MeMan in unterschiedlichen Konzentrationen. Dargestellte Fehler sind Standardabweichungen aus Wiederholungen der SCP-RICM Messungen auf jeweils 3 verschiedenen Glasoberflächen und jeweils 15 gemessenen SCPs jeder Probe pro Oberfläche	50
Abbildung 24: Grafische Darstellung der ermittelten IC ₅₀ -Werte für die verschiedenen Glyko- SCPs. Das Inset zeigt die auf die Anzahl der Man-Einheiten normierten Werte. ^[172] Dargestellte Fehler sind Standardabweichungen aus Wiederholungen der SCP-RICM Messungen auf jeweils 3 verschiedenen Glasoberflächen und jeweils 15 gemessenen SCPs jeder Probe pro Oberfläche	51

Abbildung 25: Bindung von fluoreszenzmarkiertem ConA an Glyko-SCPs vor (links) und nach Hemmung mit 5 mM MeMan (rechts) für Man-1 (oben) und Man(1,3,5)-5 SCP (unten). ^[172]	52
Abbildung 26: Direkte Bindung von fluoreszenzmarkiertem ConA an Glyko-SCPs. Dargestellte Fehler sind Standardabweichungen aus 3 Wiederholungen des Fluoreszenz-Assays mit jeweils 10 gemessenen SCPs jeder Probe.	53
Abbildung 27: Fluoreszenzintensität nach Inhibition mit 5 mM MeMan. Das Inset zeigt die auf Man-Einheiten normierten Werte. Dargestellte Fehler sind Standardabweichungen aus 3 Wiederholungen des Fluoreszenz-Assays mit jeweils 10 gemessenen SCPs jeder Probe.	54
Abbildung 28: Mittels ITC gemessene freie Energie ΔG von gelösten Glykooligomeren und ConA. Dargestellte Fehler sind Standardabweichungen aus 3 Wiederholungen des ITC Assays für jede Probe.	55
Abbildung 29: Modelling Daten von Andrea Grafmüller. Visualisierte Glykomakromoleküle mit schematisch dargestellter Struktur und Strukturen aus der Molekularen Modellierung.	58
Abbildung 30: Modelling Daten von Andrea Grafmüller. Analyse der Größe von Glykooligomeren durch molekulare Modellierung a) Trägheitsradius b) Abstand zwischen terminalen Ligandeneinheiten. ^[172]	59
Abbildung 31: a) Schematischer Überblick über die Glykooligomer-Bausteine. b) Die Glykooligomer-Namen zeigen die Position der Man-Einheit auf dem Gerüst in der Klammer, die Zahl am Ende gibt die Gesamtzahl der Bausteine an.	61
Abbildung 32: Ergebnisse der Größenausschluss-Chromatographie (Lösungsmittel H ₂ O) der hergestellten PEGylierten Strukturen.	62
Abbildung 33: Die Adhäsionsenergien der Man-funktionalisierten SCPs auf dem Glasobjektträger wurden mit Hilfe des JKR-Modells durch Auswertung des SCP-Interferenzmusters quantifiziert.	63
Abbildung 34: Die dargestellten Diagramme zeigen, dass die Kontaktradien der anhaftenden SCPs bei längeren Inkubationszeiten des Inhibitors abnehmen.	64
Abbildung 35: Reduktion der SCP-Adhäsionsenergie als Funktion der Inkubationszeit mit dem Glykooligomer. Die Gleichgewichtswerte wurden nach 12 Stunden Inkubation ermittelt.	65
Abbildung 36: Direkter Vergleich zwischen nicht-PEGylierten und PEGylierten Oligomeren. Relative SCP-Adhäsionsenergie nach 12-stündiger Inkubation, normalisiert durch den Ausgangsadhäsionswert.	66

Abbildung 37: Direkter Vergleich zwischen nicht-PEGylierten und PEGylierten Oligomeren. b) K_D -Werte, gemessen durch SPR auf ConA-Oberflächen.	67
Abbildung 38: Gesamtübersicht der durchgeführten Synthesen und Analysemethoden.	70
Abbildung 39: Kolorimetrische TBO-Messungen. a) PEG-SCPs vor der Funktionalisierung mit CA, verwendet als Referenz. b) PEG-CA-SCPs nach der Funktionalisierung mit CA als Referenz für 100 % Carbonsäurefunktionalisierungsgrad. c) PEG.Mannose-SCPs nach der Glykokonjugation mit deutlich reduzierter Färbung im Vergleich zu b). Maßstabsbalken = 50 μm	79
Abbildung 40: SCP-Radius (R) im Vergleich zum Kontaktradius aus RCM-Messungen, nach Gleichung 1 normiert.	81
Abbildung 41: Konfokale Mikroskopiebilder von glykokonjugierten SCPs, die über einen Zeitraum von 2 Stunden in LBB mit RBITC-markiertem ConA geschüttelt wurden (a), und Inhibitionsstudien mit α -Methyl-D-Mannosid ($c = 5000 \mu\text{M}$) (b).	84
Abbildung 42: ^1H -NMR (600 MHz, D_2O) von Verbindung 2.	87
Abbildung 43: ESI-MS-Analyse von Verbindung 2 (Positivmodus).	87
Abbildung 44: RP-HPLC Analyse von Verbindung 2	88
Abbildung 45: ^1H -NMR (600 MHz, D_2O) von Verbindung 3.	89
Abbildung 46: ESI-MS-Analyse von Verbindung 3 (Positivmodus).	90
Abbildung 47: RP-HPLC Analyse von Verbindung 3.	90
Abbildung 48: ^1H -NMR (600 MHz, D_2O) von Verbindung 4.	92
Abbildung 49: ESI-MS-Analyse von Verbindung 4 (Positivmodus).	92
Abbildung 50: RP-HPLC Analyse von Verbindung 4.	93
Abbildung 51: ^1H -NMR (600 MHz, D_2O) von Verbindung 5.	94
Abbildung 52: ESI-MS-Analyse von Verbindung 5 (Positivmodus).	95
Abbildung 53: RP-HPLC Analyse von Verbindung 5.	95
Abbildung 54: ^1H -NMR (600 MHz, D_2O) von Verbindung 6.	97
Abbildung 55: ESI-MS-Analyse von Verbindung 6 (Positivmodus).	97
Abbildung 56: RP-HPLC Analyse von Verbindung 6.	98
Abbildung 57: ^1H -NMR (600 MHz, D_2O) von Verbindung 7.	99
Abbildung 58: ESI-MS-Analyse von Verbindung 7 (Positivmodus).	100
Abbildung 59: RP-HPLC Analyse von Verbindung 7.	100
Abbildung 60: ^1H -NMR (600 MHz, D_2O) von Verbindung 8.	102

Abbildung 61: ESI-MS-Analyse von Verbindung 8 (Positivmodus).	102
Abbildung 62: RP-HPLC Analyse von Verbindung 8.	103
Abbildung 63: ^1H -NMR (600 MHz, D_2O) von Verbindung 9.	104
Abbildung 64: ESI-MS-Analyse von Verbindung 9 (Positivmodus).	105
Abbildung 65: RP-HPLC Analyse von Verbindung 9.	105
Abbildung 66: ^1H -NMR (600 MHz, D_2O) von Verbindung 10.	106
Abbildung 67: MALDI-TOF-MS von Verbindung 10.....	107
Abbildung 68: ^1H -NMR (600 MHz, D_2O) von Verbindung 11.	108
Abbildung 69: MALDI-TOF-MS von Verbindung 11.....	108
Abbildung 70: ^1H -NMR (600 MHz, D_2O) von Verbindung 12.....	110
Abbildung 71: MALDI-TOF-MS von Verbindung 12.....	110

6.3 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Laura Hartmann dafür bedanken, dass sie mir die Möglichkeit gegeben hat in ihrer Arbeitsgruppe zu promovieren. Du warst immer enthusiastisch, unterstützend und bereit, wertvolle Ratschläge zu geben. Danke für deinen Einsatz die Forschungsergebnisse zu publizieren und dafür, dass ich diese auf der ACS Konferenz in Washington vorstellen durfte. Das war eine unvergessliche Erfahrung für mich.

Ich möchte Dr. Klaus Schaper dafür danken, dass er sich bereit erklärt hat, Zweitbetreuer dieser Arbeit zu sein. Vielen Dank auch dafür, dass du uns auch immer wieder über das Wochenende mit NMR-Analytik versorgt hast.

Ein besonderer Dank gilt Jun.-Prof. Dr. Stephan Schmidt. Deine Geduld, die Neugier und Diskussionsbereitschaft über SCP-RICM haben mir unglaublich geholfen. Danke für jedes der gefühlt 250 Gespräche zur Interpretation der Ergebnisse und für deinen großen Anteil an der Veröffentlichung. Die Zusammenarbeit auf Augenhöhe über den gesamten Zeitraum unserer dreijährigen Kooperation war wunderbar.

Dr. Monir Tabatabai möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft über den gesamten Zeitraum meiner Bachelor-, Master- und Promotionszeit danken. Du warst immer eine gute Beraterin, persönlich und fachlich. Danke für jede Analytik-Nachhilfe und die endlosen Stunden, die du mit der Korrektur unserer Abschlussarbeiten und Veröffentlichungen verbringst. Und Danke für deinen Einsatz für eine gute Arbeitsatmosphäre.

Stephanie Scheelen, Michaela Kitz, Maria Breuer, Birgit Ohlers und Sonja Coors und Dr. Stefan Beutner danke ich für alle kleinen Gespräche und Hilfestellung über die gesamte Zeit im Institut.

Besonderer Dank gilt meinen Labor- und Projektkollegen. Tanja Paul für deine unendliche Ausdauer für Ordnung in unserem Labor einzutreten. Michele Illmann und Torben Queckbörner für sehr schöne Abschlussarbeiten. Hanqing Wang für Philosophie und Work-life-Balance und Albertus Magnus Camaleno für alles über die Region Valladolid sowie Michael Kankam für alles über Innovation und Zeitmanagement und allen für eine gute Freundschaft.

Für die gute Zeit im Institut möchte ich mich auch bei Oliver Peters, Sebastian Reinelt, Florian Trilling, Sinaida Igde, Kira Neuhaus, Katharina Bücher, Tanja Freichel, Morten Ebbesen,

Alexander Strlecyk, Sophia Boden, Peter Pasch, Alexander Banger, Florian Malotke, Theresa Seiler, Dmitri Wilms, Serap Ueclue und allen weiteren Mitarbeitern des AK Hartmanns und AK Schmidt sowie allen Kooperationspartnern bedanken.

Danke an Markus Giesler für die Sporteinheiten, die Möglichkeit den Vortrag eines Nobelpreisträgers aus der ersten Reihe zu erleben, alles über Wut, deine spontanen Marathon-Vorträge und deinen legendären Lachanfall im Seminar.

Christoph Gerke möchte ich dafür danken, dass er so gut, selbstlos und integer ist. Die verschollene LCMS-Nadel werde ich als Andenken wahrscheinlich mein Leben lang mit mir herumtragen. Unseren Trip in die USA mit Mischa Baier und die dort gefundenen Freunde werde ich nie vergessen.

Patrick Konietzny danke ich für die wunderbare Freundschaft die entstanden ist und für deinen Support bis zum Ende dieser Arbeit.

Danke für die Freundschaften und die sehr intensive Zeit im Büro Fadi Shamout, Josip Stipanovic, Sebastian Bauer, Özgür Capar und Lukas Fischer. Ich freue mich darauf, nach ein paar Jahren das Erlebte wieder auf den Tisch zu packen. Danke Jungs!

Leonardo Itskalov danke ich für seinen Einsatz als Feel Good Manager, Mark und Alissa Itskalov für ihre Herzlichkeit. Dana Itskalov danke ich für einfach alles was du für mich getan hast. Ich freue mich auf die Zukunft.

Zuletzt möchte ich den Menschen danken seit sehr langem an meiner Seite stehen. Ohne meine Geschwister und meine uns immer liebenden, motivierenden und sowohl finanziell als auch persönlich unterstützenden Eltern Scharifa und Kazimali wäre diese Arbeit nicht entstanden.

7 Literaturverzeichnis

- [1] A. Varki, *Glycobiology* **1993**, 3, 97-130.
- [2] N. Krishnaswamy, *Resonance* **2011**, 16, 620-639.
- [3] J. E. Hudak, C. R. Bertozzi, *Chemistry & biology* **2014**, 21, 16-37.
- [4] D. B. Werz, P. H. Seeberger, *Chemistry–A European Journal* **2005**, 11, 3194-3206.
- [5] P. H. Seeberger, W.-C. Haase, *Chemical reviews* **2000**, 100, 4349-4394.
- [6] T. Rademacher, R. Parekh, R. Dwek, *Annual review of biochemistry* **1988**, 57, 785-838.
- [7] B. Ernst, J. L. Magnani, *Nature Reviews Drug Discovery* **2009**, 8, 661-677.
- [8] H. S. Bennett, *Journal of histochemistry & cytochemistry* **1963**, 11, 14-23.
- [9] C. R. Bertozzi, L. L. Kiessling, *Science* **2001**, 291, 2357-2364.
- [10] H. J. Allen, E. C. Kisailus, *Glycoconjugates: Composition: Structure, and Function*, CRC Press, **1992**.
- [11] A. Kobata, *Accounts of chemical research* **1993**, 26, 319-324.
- [12] H.-J. Gabius, S. Gabius, *Glycosciences: Status & Perspectives*, John Wiley & Sons, **2008**.
- [13] S. Roseman, *Journal of Biological Chemistry* **2001**, 276, 41527-41542.
- [14] B. G. Luisa, *Neoglycoconjugates: preparation and applications*, Academic Press, **2012**.
- [15] D. E. Levy, P. C. Tang, J. H. Musser, *Annual Reports in Medicinal Chemistry* **1994**, 29, 215-224.
- [16] E. Scott, J. Munkley, *International journal of molecular sciences* **2019**, 20, 1389.
- [17] B. Adamczyk, T. Tharmalingam, P. M. Rudd, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **2012**, 1820, 1347-1353.
- [18] S. Shanker, L. Hu, S. Ramani, R. L. Atmar, M. K. Estes, B. V. Prasad, *Current opinion in structural biology* **2017**, 44, 211-218.
- [19] L. J. Ströh, T. Stehle, *Annual review of virology* **2014**, 1, 285-306.
- [20] K. Sarter, C. Mierke, A. Beer, B. Frey, B. G. Führnrohr, C. Schulze, S. Franz, *Autoimmunity* **2007**, 40, 345-348.
- [21] H.-J. Gabius, *Biochemical Society Transactions* **2008**, 36, 1491-1496.
- [22] R. R. Schmidt, *Angewandte Chemie* **1986**, 98, 213-236.
- [23] H. Paulsen, *Angewandte Chemie* **1990**, 102, 851-867.
- [24] D. Solís, J. Jiménez-Barbero, H. Kaltner, A. Romero, H.-C. Siebert, C.-W. Von der Lieth, H.-J. Gabius, *Cells Tissues Organs* **2001**, 168, 5-23.
- [25] R. A. Laine, *Glycosciences: Status and Perspectives* **1996**, 1-14.
- [26] S. Ahmad, S. Singh, S. Wasim, S. Naziya, *Saudi J Biomed Res* **2021**, 6, 85-94.
- [27] M. Barbieri, *The codes of life: the rules of macroevolution, Vol. 1*, Springer Science & Business Media, **2007**.
- [28] B. Belardi, C. R. Bertozzi, *Chemistry & biology* **2015**, 22, 983-993.
- [29] I. Liener, *The lectins: properties, functions, and applications in biology and medicine*, Elsevier, **2012**.
- [30] K. Drickamer, M. E. Taylor, *Annual review of cell biology* **1993**, 9, 237-264.
- [31] D. C. Kilpatrick, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **2002**, 1572, 187-197.
- [32] A. Varki, *Glycobiology* **2017**, 27, 3-49.
- [33] E.-L. Florin, V. T. Moy, H. E. Gaub, *Science* **1994**, 264, 415-417.
- [34] Y. Chen, H. J. Busscher, H. C. van der Mei, W. Norde, *Applied and environmental microbiology* **2011**, 77, 5065-5070.
- [35] D. Leckband, F.-J. Schmitt, J. Israelachvili, W. Knoll, *Biochemistry* **1994**, 33, 4611-4624.
- [36] W. F. Loomis, D. Fuller, E. Gutierrez, A. Groisman, W.-J. Rappel, **2012**.

- [37] E. Fischer, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1894**, 27, 2985-2993.
- [38] C. A. Helm, W. Knoll, J. N. Israelachvili, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1991**, 88, 8169-8173.
- [39] M. Totrov, R. Abagyan, *Current opinion in structural biology* **2008**, 18, 178-184.
- [40] H. Gohlke, G. Klebe, *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, 41, 2644-2676.
- [41] W. I. Weis, K. Drickamer, *Annual review of biochemistry* **1996**, 65, 441-473.
- [42] H. Wang, **2017**.
- [43] P.-H. Liang, S.-K. Wang, C.-H. Wong, *Journal of the American Chemical Society* **2007**, 129, 11177-11184.
- [44] Y. C. Lee, R. T. Lee, *Accounts of chemical research* **1995**, 28, 321-327.
- [45] L. L. Kiessling, N. L. Pohl, *Chemistry & biology* **1996**, 3, 71-77.
- [46] J. Sumner, S. Howell, **1936**.
- [47] J. B. Sumner, *Journal of Biological Chemistry* **1919**, 37, 137-142.
- [48] W. t. Bernhard, S. Avrameas, *Experimental Cell Research* **1971**, 64, 232-236.
- [49] J. Dwyer, C. Johnson, *Clinical and experimental immunology* **1981**, 46, 237.
- [50] B. S. Cavada, V. R. Pinto-Junior, V. J. Osterne, K. S. Nascimento, *International journal of molecular sciences* **2019**, 20, 30.
- [51] H. Lis, N. Sharon, *The lectins: properties, functions and applications in biology and medicine* **1986**, 265-291.
- [52] D. K. Mandal, N. Kishore, C. F. Brewer, *Biochemistry* **1994**, 33, 1149-1156.
- [53] X. Wang, O. Ramstrom, M. Yan, *Analytical chemistry* **2010**, 82, 9082-9089.
- [54] J. M. Rini, *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **1995**, 24, 551-577.
- [55] A. Poveda, J. Jiménez-Barbero, *Chemical Society Reviews* **1998**, 27, 133-144.
- [56] Z. Fujimoto, H. Tateno, J. Hirabayashi, *Lectins* **2014**, 579-606.
- [57] J. Bouckaert, Y. Dewallef, F. Poortmans, L. Wyns, R. Loris, *Journal of Biological Chemistry* **2000**, 275, 19778-19787.
- [58] I. J. Goldstein, C. M. Reichert, A. Misaki, **1974**.
- [59] X. Zeng, C. A. Andrade, M. D. Oliveira, X.-L. Sun, *Analytical and bioanalytical chemistry* **2012**, 402, 3161-3176.
- [60] S. S. Komath, M. Kavitha, M. J. Swamy, *Organic & biomolecular chemistry* **2006**, 4, 973-988.
- [61] C. Fasting, C. A. Schalley, M. Weber, O. Seitz, S. Hecht, B. Koksche, J. Darnedde, C. Graf, E. W. Knapp, R. Haag, *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, 51, 10472-10498.
- [62] M. Mammen, S. K. Choi, G. M. Whitesides, *Angewandte Chemie International Edition* **1998**, 37, 2754-2794.
- [63] C. Müller, G. Despras, T. K. Lindhorst, *Chemical Society Reviews* **2016**, 45, 3275-3302.
- [64] F. A. Quiñocho, *Annual review of biochemistry* **1986**, 55, 287-315.
- [65] M. Monsigny, R. Mayer, A.-C. Roche, *Carbohydrate letters* **2000**, 4, 35-52.
- [66] P. I. Kitov, J. M. Sadowska, G. Mulvey, G. D. Armstrong, H. Ling, N. S. Pannu, R. J. Read, D. R. Bundle, *Nature* **2000**, 403, 669-672.
- [67] F. Pertici, R. J. Pieters, *Chemical Communications* **2012**, 48, 4008-4010.
- [68] D. Schwefel, C. Maierhofer, J. G. Beck, S. Seeberger, K. Diederichs, H. M. Möller, W. Welte, V. Wittmann, *Journal of the American Chemical Society* **2010**, 132, 8704-8719.
- [69] R. L. Schnaar, R. Gerardy-Schahn, H. Hildebrandt, *Physiological reviews* **2014**.
- [70] C. Reily, T. J. Stewart, M. B. Renfrow, J. Novak, *Nature Reviews Nephrology* **2019**, 15, 346-366.
- [71] M. Cohen, *Biomolecules* **2015**, 5, 2056-2072.
- [72] S. S. Ting, G. Chen, M. H. Stenzel, *Polymer Chemistry* **2010**, 1, 1392-1412.

- [73] C. H. Liang, S. K. Wang, C. W. Lin, C. C. Wang, C. H. Wong, C. Y. Wu, *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, 50, 1608-1612.
- [74] J. J. Lundquist, E. J. Toone, *Chemical reviews* **2002**, 102, 555-578.
- [75] F. Zhang, G. M. Lee, K. Jacobson, *Bioessays* **1993**, 15, 579-588.
- [76] K. Jacobson, P. Liu, B. C. Lagerholm, *Cell* **2019**, 177, 806-819.
- [77] J. W. Costerton, K. Cheng, G. G. Geesey, T. I. Ladd, J. C. Nickel, M. Dasgupta, T. J. Marrie, *Annual Reviews in Microbiology* **1987**, 41, 435-464.
- [78] Y. F. Dufrene, A. Persat, *Nature Reviews Microbiology* **2020**, 18, 227-240.
- [79] A. R. Mackie, F. M. Goycoolea, B. Menchicchi, C. M. Caramella, F. Saporito, S. Lee, K. Stephansen, I. S. Chronakis, M. Hiorth, M. Adamczak, *Macromolecular bioscience* **2017**, 17, 1600534.
- [80] M. Critcher, T. O'Leary, M. L. Huang, *Biochemical Journal* **2021**, 478, 703-719.
- [81] G. Reuter, H.-J. Gabius, *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* **1999**, 55, 368-422.
- [82] R. P. McEver, *Current opinion in cell biology* **2002**, 14, 581-586.
- [83] D. Leckband, J. Israelachvili, *Quarterly reviews of biophysics* **2001**, 34, 105-267.
- [84] S.-K. Choi, *Synthetic multivalent molecules: concepts and biomedical applications*, John Wiley & Sons, **2004**.
- [85] G. A. Rabinovich, M. A. Toscano, S. S. Jackson, G. R. Vasta, *Current opinion in structural biology* **2007**, 17, 513-520.
- [86] H. J. Busscher, A. H. Weerkamp, *FEMS microbiology reviews* **1987**, 3, 165-173.
- [87] K. Kato, A. Ishiwa, **2015**.
- [88] S. M. Jajere, *Veterinary world* **2019**, 12, 504.
- [89] S. Clegg, G. Gerlach, *Journal of Bacteriology* **1987**, 169, 934-938.
- [90] S. A. Zeiner, B. E. Dwyer, S. Clegg, *Infection and immunity* **2012**, 80, 3289-3296.
- [91] D. Kisiela, A. Laskowska, A. Sapeta, M. Kuczkowski, A. Wieliczko, M. Ugorski, *Microbiology* **2006**, 152, 1337-1346.
- [92] B. Madison, I. Ofek, S. Clegg, S. N. Abraham, *Infection and immunity* **1994**, 62, 843-848.
- [93] M. Dubber, O. Sperling, T. K. Lindhorst, *Organic & biomolecular chemistry* **2006**, 4, 3901-3912.
- [94] M. Hartmann, T. K. Lindhorst, *European Journal of Organic Chemistry* **2011**, 2011, 3583-3609.
- [95] J. D. Esko, N. Sharon, *Essentials of Glycobiology. 2nd edition* **2009**.
- [96] M. F. Bravo, M. A. Lema, M. Marianski, A. B. Braunschweig, *Biochemistry* **2020**, 60, 999-1018.
- [97] N. Thakkar, T. Yadavalli, D. Jaishankar, D. Shukla, *Pathogens* **2017**, 6, 43.
- [98] I. Loke, D. Kolarich, N. H. Packer, M. Thaysen-Andersen, *Molecular aspects of medicine* **2016**, 51, 31-55.
- [99] H. H. Wandall, M. A. Nielsen, S. King-Smith, N. de Haan, I. Bagdonaite, *The FEBS Journal* **2021**, 288, 7183-7212.
- [100] 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.
- [101] S. Cecioni, A. Imberty, S. Vidal, *Chemical reviews* **2015**, 115, 525-561.
- [102] I. Nierengarten, J. F. Nierengarten, *Chemistry—An Asian Journal* **2014**, 9, 1436-1444.
- [103] N. Jayaraman, *Chemical society reviews* **2009**, 38, 3463-3483.
- [104] R. J. Linhardt, *Journal of medicinal chemistry* **2003**, 46, 2551-2564.
- [105] S. Eustache, J. Leprince, P. Tufféry, *Expert opinion on drug discovery* **2016**, 11, 771-784.
- [106] P. H. Seeberger, *Carbohydrate research* **2008**, 343, 1889-1896.

- [107] L. L. Kiessling, J. E. Gestwicki, L. E. Strong, *Current opinion in chemical biology* **2000**, 4, 696-703.
- [108] E. Krieg, M. M. Bastings, P. Besenius, B. Rybtchinski, *Chemical reviews* **2016**, 116, 2414-2477.
- [109] B. Rybtchinski, *ACS nano* **2011**, 5, 6791-6818.
- [110] A. Cambi, M. Koopman, C. G. Figdor, *Cellular microbiology* **2005**, 7, 481-488.
- [111] A. Varki, M. E. Etzler, R. D. Cummings, J. D. Esko, *Essentials of Glycobiology* **2009**, 2.
- [112] Y. Miura, *Polymer journal* **2012**, 44, 679-689.
- [113] R. Sunasee, R. Narain, *Macromolecular bioscience* **2013**, 13, 9-27.
- [114] S. Penadés, *Host-Guest Chemistry: Mimetic approaches to study carbohydrate recognition, Vol. 218*, Springer, **2003**.
- [115] C. R. Becer, L. Hartmann, *Glycopolymer Code: Synthesis of Glycopolymers and Their Applications*, Royal Society of Chemistry, **2015**.
- [116] D. Ponader, F. Wojcik, F. Beceren-Braun, J. Dervede, L. Hartmann, *Biomacromolecules* **2012**, 13, 1845-1852.
- [117] J. Sebestik, P. Niederhafner, J. Jezek, *Amino acids* **2011**, 40, 301-370.
- [118] J.-F. Lutz, H. G. Börner, *Progress in Polymer Science* **2008**, 33, 1-39.
- [119] J. M. Holub, K. Kirshenbaum, *Chemical Society Reviews* **2010**, 39, 1325-1337.
- [120] A. J. Wills, S. Balasubramanian, *Current opinion in chemical biology* **2003**, 7, 346-352.
- [121] E. Bayer, M. Mutter, *Nature* **1972**, 237, 512-513.
- [122] R. B. Merrifield, *Science* **1986**, 232, 341-348.
- [123] 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.
- [124] A. S. Abd-El-Aziz, M. Antonietti, C. Barner-Kowollik, W. H. Binder, A. Böker, C. Boyer, M. R. Buchmeiser, S. Z. Cheng, F. D'Agosto, G. Floudas, *Macromolecular Chemistry and Physics* **2020**, 221, 2000216.
- [125] K. Neuhaus, E.-C. Wamhoff, T. Freichel, A. Grafmüller, C. Rademacher, L. Hartmann, *Biomacromolecules* **2019**, 20, 4088-4095.
- [126] A. P. Moran, *Microbial glycobiology: structures, relevance and applications*, Elsevier, **2009**.
- [127] M. Jesús, S. Penadés, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **2006**, 1760, 636-651.
- [128] T. Mosaiab, D. C. Farr, M. J. Kiefel, T. A. Houston, *Advanced drug delivery reviews* **2019**, 151, 94-129.
- [129] L. Pan, C. Cai, C. Liu, D. Liu, G. Li, R. J. Linhardt, G. Yu, *Current Opinion in Biotechnology* **2021**, 69, 191-198.
- [130] G. Yilmaz, C. R. Becer, *Frontiers in bioengineering and biotechnology* **2014**, 2, 39.
- [131] N. TEN BRUMMELHUIS, H. G. BORNER, *Bio-Inspired Polymers* **2016**, 22, 1.
- [132] L. S. Roselin, M. S. Lin, P. H. Lin, Y. Chang, W. Y. Chen, *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology* **2010**, 5, 85-98.
- [133] L. Damian, in *Protein-ligand interactions*, Springer, **2013**, pp. 103-118.
- [134] I. Jelesarov, H. R. Bosshard, *Journal of molecular recognition* **1999**, 12, 3-18.
- [135] N. O. Pulido, E. A. Chavelas, F. Turner, E. García-Hernández, *Advances in Protein Physical Chemistry, García-Hernández E, Fernández-Velasco DA (eds). Transworld Research Network: India* **2008**, 115-138.
- [136] J. E. Ladbury, B. Z. Chowdhry, *Chemistry & biology* **1996**, 3, 791-801.
- [137] M. Kabiri, L. D. Unsworth, *Biomacromolecules* **2014**, 15, 3463-3473.
- [138] K. Bouchemal, *Drug discovery today* **2008**, 13, 960-972.

- [139] A. Thanassoulas, G. Nounesis, in *Thermodynamics and Biophysics of Biomedical Nanosystems*, Springer, **2019**, pp. 63-103.
- [140] S. Leavitt, E. Freire, *Current opinion in structural biology* **2001**, *11*, 560-566.
- [141] J. E. Ladbury, *Biotechniques* **2004**, *37*, 885-887.
- [142] M. W. Freyer, E. A. Lewis, *Methods in cell biology* **2008**, *84*, 79-113.
- [143] G. A. Holdgate, W. H. Ward, *Drug discovery today* **2005**, *10*, 1543-1550.
- [144] R. Ghai, R. J. Falconer, B. M. Collins, *Journal of Molecular Recognition* **2012**, *25*, 32-52.
- [145] M. M. Pierce, C. Raman, B. T. Nall, *Methods* **1999**, *19*, 213-221.
- [146] B. Becker, M. A. Cooper, *Journal of Molecular Recognition* **2011**, *24*, 754-787.
- [147] M. A. Cooper, V. T. Singleton, *Journal of Molecular Recognition: An Interdisciplinary Journal* **2007**, *20*, 154-184.
- [148] F. Santoyo-González, F. Hernández-Mateo, *Heterocycles from Carbohydrate Precursors* **2007**, 133-177.
- [149] Y. Chevolot, S. Vidal, E. Laurenceau, F. Morvan, J.-J. Vasseur, E. Souteyrand, in *Recognition receptors in biosensors*, Springer, **2010**, pp. 275-341.
- [150] E. Dosekova, J. Filip, T. Bertok, P. Both, P. Kasak, J. Tkac, *Medicinal research reviews* **2017**, *37*, 514-626.
- [151] P. Pattnaik, *Applied biochemistry and biotechnology* **2005**, *126*, 79-92.
- [152] J. Homola, S. S. Yee, G. Gauglitz, *Sensors and actuators B: Chemical* **1999**, *54*, 3-15.
- [153] H. Wätzig, I. Oltmann-Norden, F. Steinicke, H. A. Alhazmi, M. Nachbar, D. Abd El-Hady, H. M. Albishri, K. Baumann, T. Exner, F. M. Böckler, *Journal of computer-aided molecular design* **2015**, *29*, 847-865.
- [154] M. Mrksich, *Chemical Society Reviews* **2000**, *29*, 267-273.
- [155] J. D. Suter, I. M. White, H. Zhu, H. Shi, C. W. Caldwell, X. Fan, *Biosensors and Bioelectronics* **2008**, *23*, 1003-1009.
- [156] S. Aykul, E. Martinez-Hackert, *Analytical biochemistry* **2016**, *508*, 97-103.
- [157] C. E. P. Maljaars, S. André, K. M. Halkes, H.-J. Gabius, J. P. Kamerling, *Analytical biochemistry* **2008**, *378*, 190-196.
- [158] S. Boden, K. G. Wagner, M. Karg, L. Hartmann, *Polymers* **2017**, *9*, 716.
- [159] 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.
- [160] K. El-Boubbou, X. Huang, *Current medicinal chemistry* **2011**, *18*, 2060-2078.
- [161] D. Ponader, S. Igde, M. Wehle, K. Märker, M. Santer, D. Bléger, L. Hartmann, *Beilstein journal of organic chemistry* **2014**, *10*, 1603-1612.
- [162] S. Cecioni, S. Faure, U. Darbost, I. Bonnamour, H. Parrot-Lopez, O. Roy, C. Taillefumier, M. Wimmerová, J. P. Praly, A. Imberty, *Chemistry—A European Journal* **2011**, *17*, 2146-2159.
- [163] E. P. Wojcikiewicz, X. Zhang, V. T. Moy, *Biological procedures online* **2004**, *6*, 1-9.
- [164] U. Dammer, O. Popescu, P. Wagner, D. Anselmetti, H.-J. Guntherodt, G. N. Misevic, *Science* **1995**, *267*, 1173-1175.
- [165] D. Pussak, D. Ponader, S. Mosca, S. V. Ruiz, L. Hartmann, S. Schmidt, *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, *52*, 6084-6087.
- [166] D. Pussak, **2014**.
- [167] D. Pussak, M. Behra, S. Schmidt, L. Hartmann, *Soft Matter* **2012**, *8*, 1664-1672.
- [168] L. Limozin, K. Sengupta, *ChemPhysChem* **2009**, *10*, 2752-2768.
- [169] G. B. Airy, *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* **1833**, *2*, 20-30.
- [170] K. L. Johnson, K. Kendall, a. Roberts, *Proceedings of the royal society of London. A. mathematical and physical sciences* **1971**, *324*, 301-313.

- [171] B. Derjaguin, *Kolloid-Zeitschrift* **1934**, 69, 155-164.
- [172] F. Jacobi, A. Camaleño de la Calle, S. Boden, A. Grafmüller, L. Hartmann, S. Schmidt, *Biomacromolecules* **2018**, 19, 3479-3488.
- [173] L. Hartmann, K. Watanabe, L. L. Zheng, C. Y. Kim, S. E. Beck, P. Huie, J. Noolandi, J. R. Cochran, C. N. Ta, C. W. Frank, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **2011**, 98, 8-17.
- [174] H. Wang, F. Jacobi, J. Waschke, L. Hartmann, H. Löwen, S. Schmidt, *Advanced Functional Materials* **2017**, 27, 1702040.
- [175] P. Braun, B. Nägele, V. Wittmann, M. Drescher, *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, 50, 8428-8431.
- [176] M. Fernandez-Villamarin, A. Sousa-Herves, J. Correa, E. M. Munoz, P. Taboada, R. Riguera, E. Fernandez-Megia, *ChemNanoMat* **2016**, 2, 437-446.

Phoebe: What are you doing here?

David: Well, I'm back from Minsk. Permanently.

Phoebe: Well, what happened?

David: Well, remember how I was trying to achieve the positronic distillation of subatomic particles?

Phoebe: Yeah.

David: Well, after eight years of research, I discovered that ... that it can't be done.

Aus der Serie **Friends**, Staffel 9, Folge 2