

**Synthese multivalenter Glykooligomere mithilfe
von enzymatischer oder DNA vermittelter
Glykokonjugation von Zuckern an
sequenzdefinierten Oligo(amidoaminen)**

Inaugural-Dissertation

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

Vorgelegt von

Marc Lennart Hofer

aus Düsseldorf

Düsseldorf, den 18.03.25

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

Berichterstatter:

1. Prof. Dr. Laura Hartmann
2. Prof. Dr. Thomas J. J. Müller

Tag der mündlichen Prüfung: 23.05.2025

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Diese Dissertation wurde weder in der vorliegenden noch in ähnlicher Form bei einer anderen Institution eingereicht, noch wurden bisher anderweitige Promotionsversuche meinerseits unternommen.

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Laura Hartmann für die Aufnahme in Ihren Arbeitskreis und die Vergabe der interessanten Themen für meine Dissertation. Des Weiteren bedanke ich mich für die produktiven wissenschaftlichen Gespräche, sowie ihr Vertrauen in die Zusammenarbeit mit internationalen Kooperationspartnern.

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Thomas J. J. Müller für die Übernahme der Zweitkorrektur meiner Dissertation und die Übernahme der Laborverantwortlichkeit nach dem Umzug von Prof. Hartmann bedanken.

Bei Dr. Stephen Hill und Dr. Ulla Gerling-Driesen möchte ich mich für Ihre Unterstützung bedanken, vor allem für die vielen Ideen und ihre Hilfsbereitschaft. Sie haben es geschafft in anspruchsvollen und schwierigen Zeiten Erleichterungen und neue Motivation zu bringen.

Ein weiterer Dank richtet sich an das Team der Arbeitsgruppe Hartmann. Besonderer Dank an Frau Dr. Monir Tabatabai für fachliche Gespräche sowie der kommissarischen Übernahme des Makromolekularen Lehrstuhles und an Frau Michaela Kitzka für ihre Unterstützung bei organisatorischen oder bürokratischen Angelegenheiten. Ebenso bedanke ich mich bei Frau Stephanie Scheelen, Sonja Coors und Birgit Ohler für die Übernahme von logistischen und synthetischen Aufgaben.

Weiter Danke ich meinen Bachelorstudenten Jonah Wege, Ayla Yaman und Raphael Neff deren Ergebnisse grundlegend für diese Dissertation waren.

Ebenfalls bedanke ich bei meinen Kooperationspartnern Dr. Robert de Vries der Universität Utrecht für die Bereitstellung der Enzyme für die enzymatische Sialylierung und Simon Vinther des iNANO der Universität Aarhus für die Bereitstellung der Holliday Junction sowie deren biologische Auswertung.

Ein besonderer Dank geht an den gesamten Arbeitskreis. Besonderer Dank geht an Theresa Seiler für ihre Unterstützung und eine schöne gemeinsame Zeit seit meiner Masterarbeit im Labor und Büro. Ebenso Danke ich Nicole Hugo, Robert Steinfert und Peter Pasch für eine lustige und angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor. Weiter möchte ich mich bei Patrick Konietzny für die netten und produktiven Gespräche sowie seiner Hilfsbereitschaft bedanken. Ebenso bedanke ich mich bei Theresa Seiler, Melanie Schmidt, Sandra Mücke, Melina Feldhof, Jacob Nachtwey, Alex Banger, Alisa Kayser, Michele Illmann und Peter Pasch für eine großartige Zeit im Großraumbüro. Außerdem möchte ich mich bei Sandra Mücke und Simon Walber für die tolle Atmosphäre und Teamarbeit beim Biologenpraktikum bedanken.

Abschließend will ich einen großen Danke meiner Familie, meine Freundin Laura Laß und meinen engen Freunden aussprechen. In stressigen Zeiten konnte ich auf eure Unterstützung zählen. Dafür bin unglaublich dankbar.

"Die meisten Menschen legen ihre Kindheit ab wie einen alten Hut. Sie vergessen sie wie eine Telefonnummer, die nicht mehr gilt.

Früher waren sie Kinder, dann wurden sie Erwachsene, aber was sind sie nun?

Nur wer erwachsen wird und ein Kind bleibt, ist ein Mensch."

Erich Kästner

Inhalt

Kurzzusammenfassung	XV
1. Einleitung	1
1.1 Die Glykokalyx	1
1.1.1 Zusammensetzung und biologische Funktionen	1
1.1.2. Sialinsäurehaltige Oligo- und Polysaccharide	2
1.1.3. Sialinsäure und deren Konjugate in der molekularen Medizin	3
1.2. Multivalente Glykomimetika.....	3
1.2.1. Multivalenz	3
1.2.2. Synthetische Gerüste zur multivalenten Präsentation von Glykanen	5
1.2.2.1 Polymere	6
1.2.2.2 Sequenzdefinierte Oligo(amidoamine).....	7
1.2.2.3 Sequenzdefinierte Oligonukleotide – Holliday Junctions	10
1.3. Glykankonjugation	12
1.3.1. Chemische Konjugation von Glykanen mittels Click-Chemie	12
1.3.2. Enzymatische Konjugation von Glykanen am Beispiel der Sialyltransferase.....	14
2. Motivation.....	17
3. Ergebnis und Diskussion	21
3.1. Enzymatische Synthese von Neu5Ac-haltigen nicht-Glykanen und Polymeren	21
3.1.1 Enzymatische Sialylierung von nicht-glykanbasierten Polyol-Motiven.....	21
3.1.1.1 Optimierung der Sialylierungsbedingungen	22
3.1.1.2 Bestimmung der Reaktionskinetik der enzymatischen Sialylierung	28
3.1.1.3 Substratbibliothek	31
3.1.1.4 Sialylierung eines Bis-Tris-Substrates	37
3.1.1.5 Permethylierung.....	37
3.1.1.6 Trennung mittels einer HILIC-Säule	39
3.1.1.7 Größenausschluss-Chromatographie GPC	40
3.1.2 Synthese von Tris-basierten Polymeren zur enzymatischen Sialylierung.....	42
3.1.2.1 Tris-basierte Monomersynthesen	43

3.1.2.2 Copolymerisation von T7 mit Ethylacrylat.....	49
3.2. Synthese von Azid funktionalisierten Präzisionsoligomeren	53
3.2.1 Untersuchung von PEG- und Azid-Bausteinen zur Synthese von Präzisionsoligo(amidoaminen).....	53
3.2.1.1 Optimierung der Kupplungsbedingungen zur Kupplung des DAP-N₃ -Bausteins.	55
3.2.2 Synthese von azidhaltigen Oligomeren für DNA-Konjugation	56
3.2.3 Konjugation des DNA-Strangs Q2 an die Oligomergerüste.....	58
3.2.3.1. Synthese Cumarinbaustein	61
3.2.4 Synthese der 2. Generation von azidhaltigen Oligomeren und Konjugation mit Q2	63
3.2.5 Selbstassemblierung der DNA-Stränge Q1 , Q3 und Q4 an die Oligo(amidoamin)- Q2 -Konjugate.	67
3.3. Synthese von Neu5Ac-haltigen Calix[5]arenen zur Bindung an das VP1 des MCPyV69	
3.3.1 Synthese der Neu5Ac haltigen Calix[4]arene und Calix[5]arene	70
3.3.2 NMR-Studien der Calix[5]arene	72
4. Zusammenfassung und Ausblick	77
5. Experimentalteil	83
5.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften und Analytik.....	83
Enzymatische Sialylierung.....	86
Permethylierung	86
GPC	87
5.2 Oligo(amidoamin)-Synthese.....	88
Bausteinkupplung.....	88
N-Terminus Capping	88
Kupfer katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition.....	88
Abspaltung des Oligomers von der Festphase	89
Entschützung Neu5Ac.....	89
Präparative Aufreinigung	89
TFA Entfernung	89

5.3 Synthesen.....	90
Screening	92
Permethylierung.....	107
6. Anhang.....	143
NMR-Spektren.....	143
RP-HPLC- und ESI-Spektren.....	159
Maldi-Spektren.....	216
HR-ESI-Spektren	232
Fluoreszenz-Spektren.....	246
7. Literaturverzeichnis	247

Kurzzusammenfassung

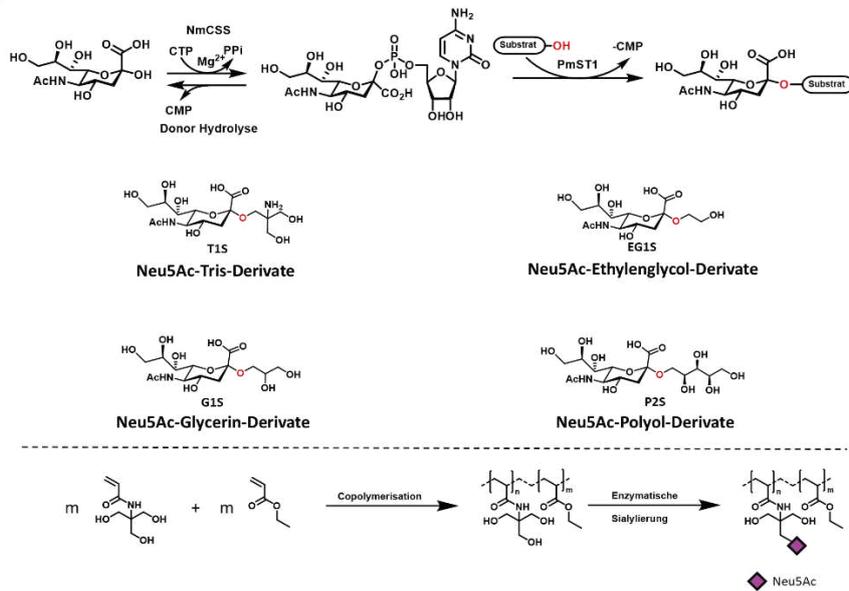
Zucker, auch Glykane genannt, sind essenzielle Bausteine aller Organismen. Insbesondere auf Zelloberflächen sind eine Vielzahl verschiedener Glykane präsent. Diese Glykanschicht wird Glykokalyx genannt und besteht aus Glykoproteinen, Glykolipiden oder Proteoglykanen. Diese fungieren als Signalübermittler in zahlreichen biologischen Prozessen, wie Zell-Zell-Kommunikation und Zelladhäsion. Auch Pathogene nutzen die Glykokalyx und die zuckervermittelte Anbindung eines Pathogens an der Zelloberfläche ist häufig der erste Schritt des Infektionsprozesses. Um einerseits die biologischen Prozesse im Körper und andererseits den Infektionsmechanismus der Pathogene zu verstehen, ist es von Interesse, den Aufbau und die Wechselwirkung der Glykane zu untersuchen.

Ein Glykanmotiv, das von vielen Pathogenen, insbesondere Viren, in der Zellanbindung genutzt wird, ist die Neuraminsäure (Neu5Ac). Darüber hinaus ist dieser Zucker an vielen weiteren biologischen Prozessen beteiligt.

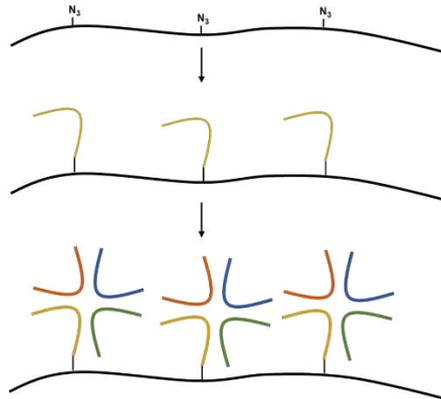
Da die Isolierung Neu5Ac-haltiger Glykane und Glykankonjugate kompliziert ist, ist ein alternativer Ansatz die Erzeugung sogenannter Glykanmimetika, die als Modelle zur Untersuchung der biologischen Funktion der Glykane eingesetzt werden können. Ein weit verbreiteter Ansatz ist die Beschränkung der komplexen natürlichen Glykanliganden auf das minimale Bindungsmotiv. Hierbei werden alle Kohlenhydrateinheiten, die vermutlich nicht direkt an der Bindung beteiligt sind, vernachlässigt. Die verbleibenden Kohlenhydratliganden werden dann an ein künstliches Gerüst angebracht, um über diese multivalente Präsentation eine Bindungsverstärkung zu erreichen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, drei unterschiedliche Methoden zur Funktionalisierung variabler aber gleichzeitig strukturell definierter und multivalenter Gerüste mit Neu5Ac zu etablieren. Hierfür wurden sowohl chemische als auch enzymatische Methoden verwendet.

Projekt 1
Enzymatische Sialylierung von Polyolmotiven



Projekt 2
Multivalente Kamm-Systeme aus Oligo(amidoaminen) und Holliday Junctions



Projekt 3
Neu5Ac funktionalisierte starre cyclische Präzisionsoligomere

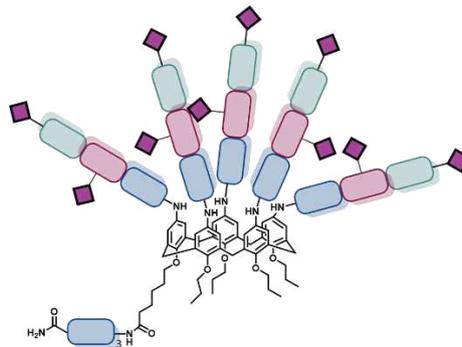


Abbildung 1 Schematische Darstellung der drei verschiedenen Projekte die in dieser Arbeit besprochen werden. Projekt 1: Enzymatische Synthese von niedermolekularen und makromolekularen Polyolmotiven mittels dem Exo-Enzymatischen-Labeling-System aus PmST1 und NmCSS. Projekt 2: Synthese von multivalenten Kamm-Systemen aus Oligo(amidoaminen) und Holliday Junctions mittels Kupferfreier-Clickchemie zur Präsentation von Zuckern. Projekt 3: Synthese von Neu5Ac funktionalisierenden, starren und cyclischen Calix[n]aren-Präzisionsoligomeren (n=4 oder 5).

Eine der bereits etablierten enzymatischen Methoden ist das Exo-Enzymatischen-Labeling-System aus NmCSS und PmST1 zur Sialylierung von Galaktoseeinheiten. Kürzlich wurde von *Konietzny* aus dem Arbeitskreis *Hartmann* herausgefunden, dass es neben der gezielten Sialylierung von Galaktose funktionalisierten Strukturen auch zur Sialylierung des Tris-Puffers kommt. Diese Entdeckung ermöglicht eine einfache chemoenzymatische Synthese von nicht glykanbasierten Neu5Ac-Derivaten auf Basis von natürlichen und nicht natürlichen Substraten für biologische und medizinische Anwendungen. Aus diesem Grund wurde im ersten Teil dieser Arbeit die chemoenzymatische Synthese von neuartigen Neu5Ac-Derivaten untersucht. Hierbei wurde insbesondere ein Fokus auf die Sialylierungsbedingungen, ein Screening verschiedener Substratklassen (Tris-, Glycerin-, Ethylenglycol-, Polyol-basierte) und die Isolation der sialylierten Substrate gelegt. Es konnte gezeigt werden, dass Substrate mit mindestens zwei Hydroxygruppen in räumlicher Nähe sialyliert werden können. Außerdem konnte gezeigt werden, dass elektronendonierende und elektronenreiche funktionelle Seitenketten eine Sialylierung begünstigen. Die Isolation der sialylierten Derivate konnte mit einer für niedermolekulare Substanzen optimierten GPC erreicht werden. Zusätzlich wurden erste Versuche für die Synthese von Neu5Ac-funktionalisierten Tris-Copolymeren durchgeführt.

Im zweiten Teil wurde anstelle einer enzymatischen kovalenten Verknüpfung der Oligo(amidoamin)-Gerüste und Sialinsäure die Möglichkeit zu DNA-vermittelten Konjugation untersucht. In einer Kooperation mit Prof. Kjems und seinem Team wurden Oligo(amidoamin)-Gerüste mehrfach mit Oligonukleotid Seitenketten funktionalisiert. Diese sind Teil der sogenannten Holiday Junctions, einem X-förmigen DNA-Origami Motiv. In der vorliegenden Arbeit konnten erfolgreich ein bis drei Holiday Junctions durch Selbstassemblierung an einem Cumarin-gelabelten Oligo(amidoamin)-Gerüst konjugiert und isoliert werden. Zukünftig können dann Sialinsäuren an die Oligonukleotid-Segmente angebracht werden und so eine sequenzdefinierte, multivalente Präsentation ermöglicht werden.

Im dritten Teil der Arbeit wurden von Alisa Kayser synthetisierte Calix[n]aren-Gerüste (n=4 und 5) zur Verfügung gestellt und über chemische Konjugation mittels Cu-vermittelter Azid-Alkin-Reaktion mit Sialinsäuren funktionalisiert. Hierfür wurden drei Calix[5]aren-Oligomere mit unterschiedlichen Bindungsabständen und Valenz der Neu5Ac und ein Calix[4]aren-Oligomer synthetisiert.

Die so erhaltenen Liganden präsentieren fünf oder zehn Neu5Ac und orientieren sich in ihrer Größe und Anordnung der Glykanfragmente an dem pentameren VP1 Kapsidprotein des Merkelzell-Polyomavirus (MCPyV). Beim MCPyV handelt es sich um den ersten bekannten Onkovirus der Polyomaviren. Es ist bekannt, dass nur Zellen, die mit Neu5Ac funktionalisiert sind, von dem MCPyV infiziert werden können. Das VP1 Kapsidprotein besteht aus einem

symmetrischen, ringförmigen Homopentamer aus fünf VP1 Subeinheiten, die Neu5Ac binden können. Es konnte bereits für flexible lineare Liganden eine Bindung an das VP1 gezeigt werden.

In ersten Bindungsstudien wurden in Kooperation mit Prof. Stehle und seinem Team die Calix[n]aren-Oligomere mit dem VP1 kokristallisiert und an einem Synchrotron vermessen. Hierbei hat sich gezeigt, dass es zur Bindung einzelner Neu5Ac kommt, allerdings keine genauen Aussagen über die Bindungsstudien getroffen werden können.

1. Einleitung

1.1 Die Glykokalyx

1.1.1 Zusammensetzung und biologische Funktionen

Kohlenhydrate sind für lebende Organismen ein wichtiger Baustein. Sie kommen vor allem auf der Zelloberfläche von eukaryotischen und prokaryotischen Zellen vor. Diese erstmals 1970 von *Martínez-Palomo* beschriebene Lipiddoppelschicht ist die Glykokalyx.¹ Auf dieser sind Oligo- und Polysaccharide einerseits kovalent an Membranproteine (Glykoproteine) oder Membranlipide (Glykolipide) gebunden oder über hydrophobe Wechselwirkungen (Mucine) in der Lipiddoppelschicht verankert (Abbildung 2).² Zu deren Aufgaben gehören die Zell-Zell-Erkennung und Kommunikation sowie die Zelladhäsion.^{3, 4} Hierbei wird eine hohe Selektivität durch die Verknüpfung und Verzweigung von verschiedenen Zuckern an den Hydroxygruppen erzielt. Die entstehenden Zuckermotive sind dadurch sehr komplex und stellen daher eine große Herausforderung bei der Untersuchung von biologischen Prozessen dar. Dennoch ist es von Interesse, diese Prozesse besser zu verstehen, um einerseits die Funktionen der Glykokalyx als auch den Mechanismus von Pathogenen bei einer Infektion von Zellen besser zu verstehen. Ein weit verbreiteter Ansatz ist, die Komplexität der Kohlenhydratliganden auf ein Minimum zu beschränken.⁵ Hierbei werden alle Kohlenhydrateinheiten, die vermutlich nicht an einer Bindung beteiligt sind, entfernt und das übriggebliebene Kohlenhydratmotiv an ein künstliches Gerüst gebunden. Der Aufbau dieser so genannten Glykomimetika ist dabei sehr variabel und kann an spezifische Ziele angepasst werden.^{5, 6}

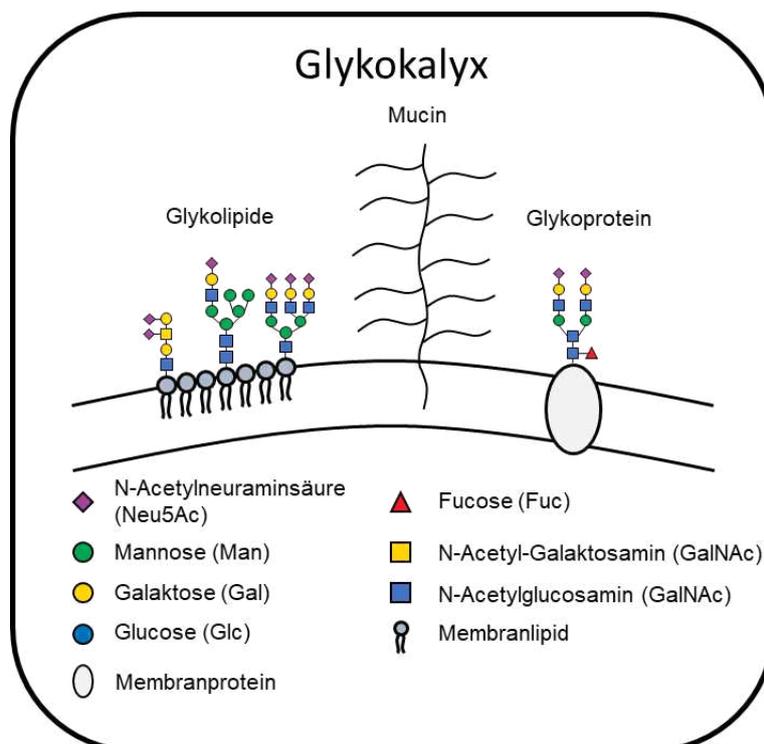


Abbildung 2 Schematische Darstellung der Glykokalyx und ausgewählter Glykan-Konjugate.

1.1.2. Sialinsäurehaltige Oligo- und Polysaccharide

Sialinsäuren nehmen eine besondere Rolle ein, da diese in der Regel die letzte Funktionalisierung von Glykanen sind.⁷⁻⁹ Die im Menschen vorkommende N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) gehört zu der Obergruppe der Sialinsäuren, wobei dieser Begriff fälschlicherweise als Synonym für die Neu5Ac verwendet wird.

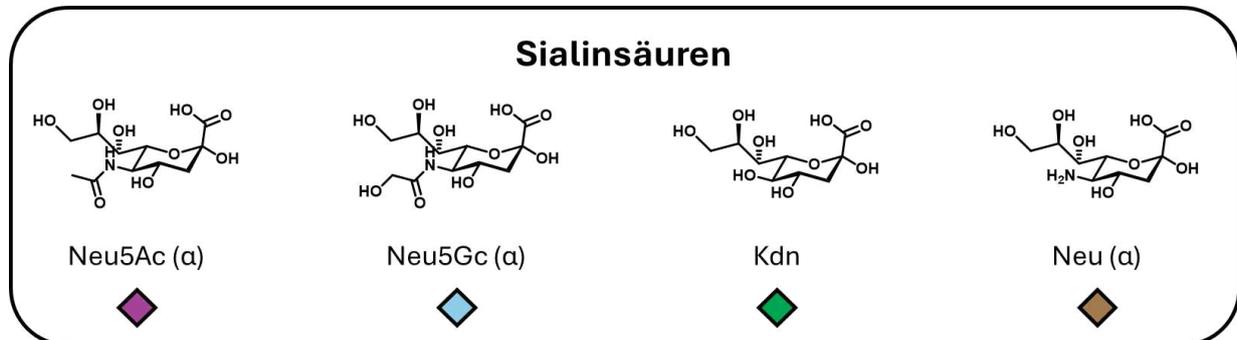


Abbildung 3 Darstellung verschiedener Sialinsäuren.

Sie kann im ganzen Körper gefunden werden, wobei die Konzentration variiert. Im Gehirn ist eine wesentlich höhere Konzentration als im Fettgewebe festzustellen.^{10, 11} Neu5Ac besteht aus neun Kohlenstoffatomen und trägt am C1-Kohlenstoff eine Carbonsäure. Durch die Ladung und die hydrophilen Eigenschaften nimmt Neu5Ac Einfluss auf die Struktur und die räumliche Anordnung von Zellen.^{10, 12-14} Vor allem bei weit entwickelten Wirbeltieren sind diese an einer Vielzahl an physiologischen und pathogenen Prozessen beteiligt. Zu den physiologischen Prozessen gehören die neuronale Plastizität,^{15, 16} die glomeruläre Filtration,^{15, 16} die Abstoßung von roten Blutkörperchen¹⁰, sowie die Zell-Zell-Kommunikation oder Proteinerkennung.^{10, 17, 18} Einige Pathogene und Toxine nutzen die Wiedererkennung der Zuckermotive und die Ladung der Glykane auf der Glykokalyx aus, um durch molekulares Mimikry Zellen zu infizieren. Hierbei stellen sich die Pathogene mit Zuckermotiven einschließlich Neu5Ac aus, um von Zellen erkannt zu werden und der Immunabwehr auszuweichen.^{7, 19-21}

Neben der hohen Komplexität der biologischen Prozesse, an denen Neu5Ac beteiligt ist, ist es ebenso anspruchsvoll, sie synthetisch als Baustein zugänglich zu machen.²² Hierbei ist vor allem die Struktur der Neu5Ac für die Instabilität verantwortlich. So ist die glykosidische Bindung am anomeren Zentrum säurelabil und das Amid am C5-Kohlenstoff basenlabil.²³ Außerdem ist der Zugang zum anomeren Zentrum durch die elektronenziehenden Eigenschaften der Carboxylgruppe und die fehlende Hydroxygruppe des C2-Kohlenstoffs und deren dirigierende Wirkung nicht trivial. Trotz des hohen chemischen Aufwands und der Labilität der Neu5Ac ist sie aufgrund der Besonderheit der Eigenschaften und der Funktionen eine der am besten untersuchten Glykierungen.²⁴ Hierbei werden vor allem natürliche und nicht

natürliche Glykomimetika wie z.B. Neoglykoside oder Glykopolymere²⁵⁻²⁸ auf medizinische, biologische oder pharmakologische Eigenschaften getestet.^{10, 29-31}

1.1.3. Sialinsäure und deren Konjugate in der molekularen Medizin

Durch die Omnipräsenz der Neu5Ac im Körper besteht die Möglichkeit, für pathologische oder physiologische Prozesse eine Therapie zu entwickeln. Aus diesem Grund wurde eine Vielzahl an Sialinsäure tragende oder Sialinsäure basierte Therapeutika entwickelt. Hierbei sind die Anwendungsbereiche Entzündungshemmer, Krebstherapeutika, Virostatika, Adhäsionshemmer und Wirkstofftransporter.³²⁻³⁵ Zu den bekanntesten Inhibitoren viraler Sialidasen gehören Relenza und Tamiflu (Abbildung 4). Diese hindern die Vermehrung und Ausbreitung von Influenzaviren. Eine weitere Strategie ist das Entfernen von Bindungstaschen im Gewebe, die von Pathogenen angesteuert werden.³⁶ Hierfür werden Sialoglykane verwendet. Allerdings konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt keine Infektionshemmung erzielt werden.³⁶ Krebszellen haben eine veränderte Konzentration an Sialinsäuren auf der Zelloberfläche. Diese führen durch die Interaktion mit Siglecs zu einem erhöhten Schutz vor Immunreaktionen.^{37, 38} Ebenso kann der erhöhte Sialyierungsgrad mit der Aggressivität, Metastasen und Medikamentenresistenz in Verbindung gebracht werden.³⁹⁻⁴¹ Aus diesem Grund wird zurzeit an Inhibitoren für die Sialoglykansynthese sowie an der Sialoglykan-Siglec-Interaktion geforscht. Dabei wurde in ersten Tierversuchen gezeigt, dass das Tumorstadium eingeschränkt und die Immunreaktion auf die Krebszellen verbessert werden konnte.⁴²

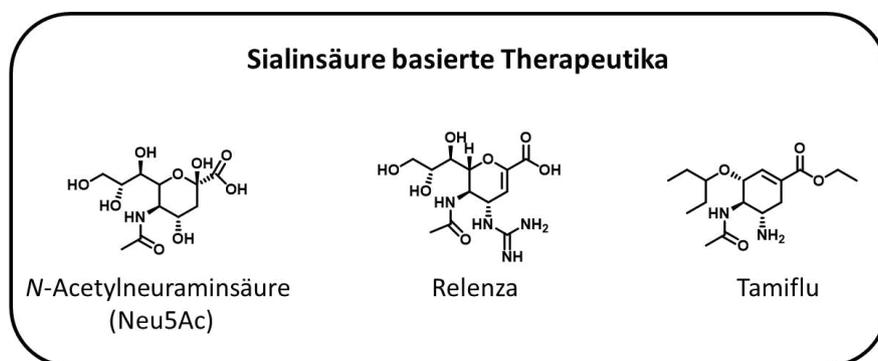


Abbildung 4 Darstellung von Sialinsäure basierten Medikamenten (Relenza und Tamiflu).

1.2. Multivalente Glykomimetika

1.2.1. Multivalenz

Multivalenz ist ein allgemeines Prinzip, um die Bindung von Liganden und Rezeptoren miteinander zu verstärken. Hierbei kommt es durch die multivalente Präsentation dazu, dass nicht die Affinität eines Liganden mit einem Rezeptor, sondern die sich zur Avidität summierenden Affinitäten aller Liganden und Rezeptoren, für die Bindungsstärke verantwortlich ist.⁴³ Beim Vergleich der Bindungsstärke von multivalent präsentierten Liganden mit monovalenten Liganden ist die Bindungsstärke von multivalenten Liganden um ein

Vielfaches stärker, weil in der Regel einzelne Bindungsereignisse sehr schwach sind. Es konnte gezeigt werden, dass bei einer Vervielfachung an Kohlenhydratmotiven es zu einer 10.000-fach erhöhten Avidität zum zugehörigen Lektin führt.^{44, 45} Allerdings bleiben diese Interaktionen weiterhin reversibel. Das ist vor allem wichtig für Prozesse, die nur eine gewisse Zeit ausgeführt werden sollen. Ein Beispiel hierfür wäre die Ausschüttung von Insulin nach der Aufnahme von Zucker.⁴⁶ Allgemein ist die Multivalenz für biologische Systeme und Prozesse essenziell, da diese für den Signaltransport, die Adhäsion und die Erkennung der Bindungspartner unerlässlich ist.²⁹ Die Erhöhung der Avidität durch die Multivalenz kann durch vier verschiedene Bindungseffekte erklärt werden.^{29, 47-50} Diese vier Effekte sind die Chelatisierung, die statistische Rekombination, die Clusterbildung und die sterische Abschirmung (Abbildung 5).

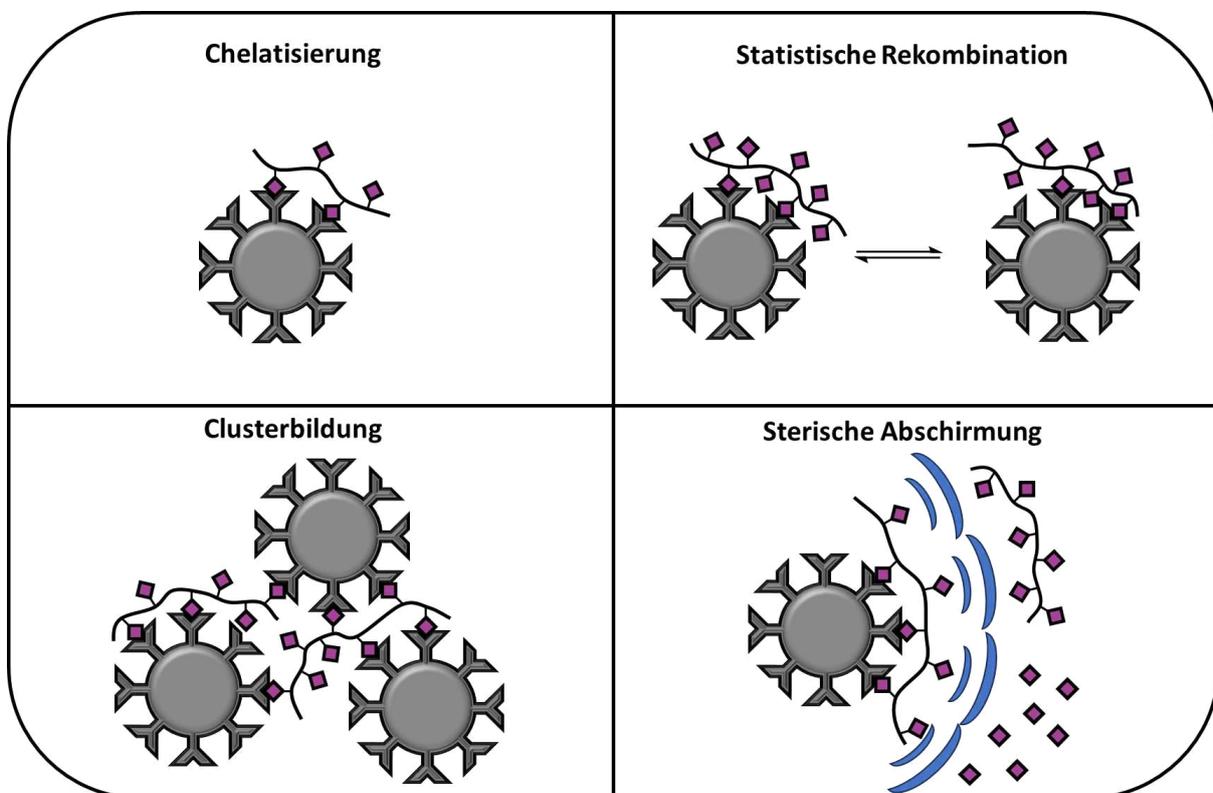


Abbildung 5 Schematische Darstellung der Multivalenzeffekte (oben links = Chelatisierung, oben rechts = statistische Rekombination, unten links = Clusterbildung, unten rechts = sterische Abschirmung).

Bei der Chelatisierung verbrückt ein multivalenter Ligand mindestens zwei Bindungstaschen eines multivalenten Rezeptors. Durch die Bindung der Liganden an den Rezeptor werden Wassermoleküle aus der Bindungstasche verdrängt.⁵¹ Bei einem monovalenten Liganden kommt es somit zu einem äquivalenten Austausch von Liganden und Wassermolekülen, wodurch die Anzahl der frei beweglichen Moleküle in Lösung identisch bleibt.⁵¹ Besitzt ein Ligand dagegen mindestens zwei Bindungsmotive, die an den Rezeptor binden, so werden proportional zu den gebundenen Bindungsmotiven des Liganden Wassermoleküle pro Liganden freigesetzt. Hierbei steigt die Anzahl der frei beweglichen Moleküle an und es kommt

zu einem Gewinn an Entropie.⁵¹ Ebenso erhöht jede weitere Bindung eines Liganden an einen multivalenten Rezeptor die Entropie, da durch die Bindung des ersten Bindungsmotivs die Entropie jedes weiteren Bindungsmotivs verringert wird. Durch jede weitere Bindung kommt es dadurch zu einem höheren Entropiegewinn als bei der ersten Bindung.^{52, 53}

Die statistische Rekombination basiert auf dem kinetischen Verhalten der Liganden. Einerseits kann es zum Austausch eines gebundenen Bindungsmotivs mit einem freien Bindungsmotiv des Liganden kommen. Andererseits kann es bei der Dissoziation eines Bindungsmotives des Liganden zu einer schnellen Bindung eines benachbarten Bindungsmotivs des Liganden kommen. Somit setzt sich die Gesamtbindungsstärke des multivalenten Liganden mit dem Rezeptor aus der Chelatisierung und der statistischen Rekombination zusammen.^{51, 53, 54}

Bei der Clusterbildung bindet ein multivalenter Ligand an die Bindungstaschen verschiedener Rezeptoren. Hierbei bilden sich Cluster aus. Die Größe der Cluster ist abhängig von der Konzentration des Liganden und des Rezeptors. Bei hohen Konzentrationen kann es zur Ausbildung von großen unlöslichen Agglomeraten kommen, die aus der Lösung ausfallen.^{29, 50}

Bei der sterischen Abschirmung schützen die ungebundenen Bindungsmotive den Ligand-Rezeptor-Komplex vor dem Austausch mit anderen freien Liganden. Dadurch kann verhindert werden, dass der Rezeptor an einen anderen Liganden anbinden kann. Dieser Mechanismus wird verwendet, um eine virale oder bakterielle Infektion zu inhibieren, indem das Pathogen an einen Liganden bindet und dieser durch die sterische Abschirmung den Kontakt mit der Zelloberfläche verhindert.^{43, 50, 55-57}

1.2.2. Synthetische Gerüste zur multivalenten Präsentation von Glykanen

Über die Jahre wurde eine Vielzahl an verschiedenen Glykomimetika entwickelt. Diese unterscheiden sich vor allem in der Synthese, der Struktur, der Dispersität, der Größe und der Präsentation der Kohlenhydratmotive.^{4, 58} Hierbei reicht die Größe von kleinen niedermolekularen Strukturen bis hin zu großen multivalenten Makromolekülen und Polymeren.^{59, 60}

In der Natur sind viele Oligosaccharide nicht linear und auf verschiedene Arten in Lebewesen präsentiert. Um diese verschiedenen Präsentationsmethoden zu imitieren oder um ein möglichst vorteilhaftes multivalentes System für eine Interaktion zu präsentieren, wurden verschiedene Gerüste entwickelt. Diese Gerüste können z.B. eher zellähnlichen sphärischen Gerüsten wie Nanopartikel⁶, Liposome⁶¹ oder hochgradig verzweigten Gerüsten wie Dendrimere^{50, 62} entsprechen (Abbildung 6). Bei Nanopartikeln und Liposomen handelt es sich um sphärische Partikel, die mit Kohlenhydraten funktionalisiert werden.

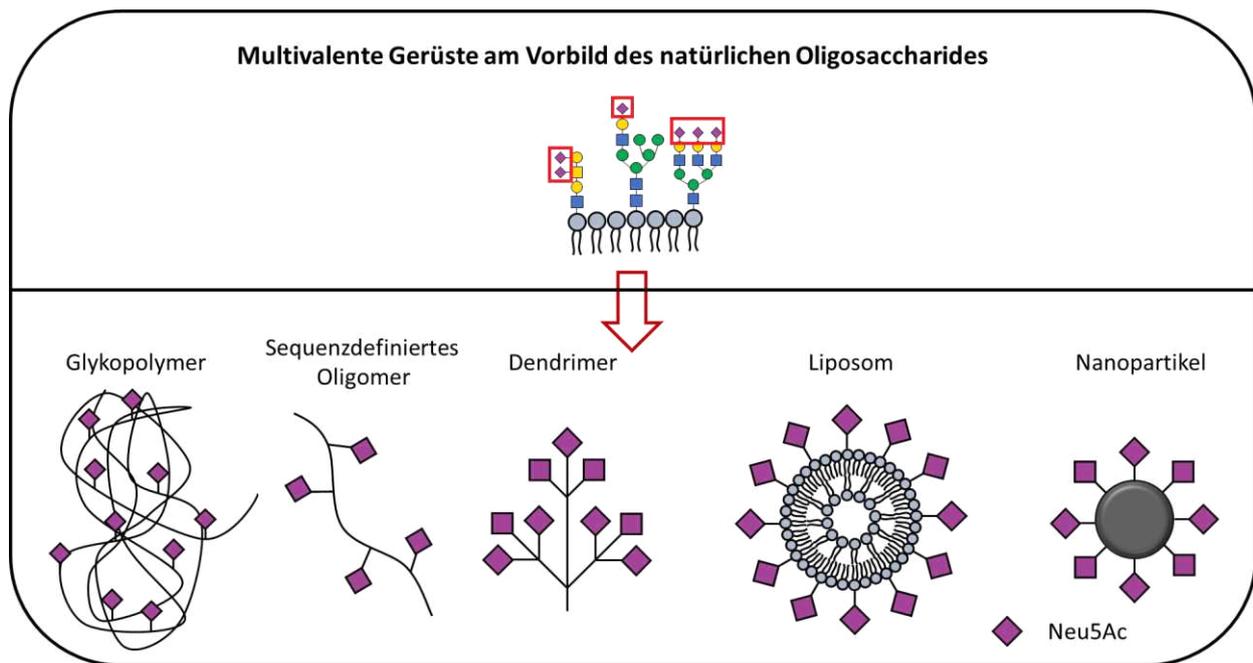


Abbildung 6 Darstellung von verschiedenen multivalenten Gerüsten zur Präsentation von Sialinsäure-Liganden.

Hierbei unterscheiden sie sich in ihrer Größe und dem Trägermaterial. Nanopartikel können mit einer hohen Anzahl an Kohlenhydraten funktionalisiert werden und sind auch wegen ihrer elektronischen und spektrometrischen Eigenschaften interessant.⁶³ Liposome sind dagegen strukturell Zellen ähnlicher. Die Zuckermotive sind auf der Oberfläche heterogen verteilt und beweglich. Das führt dazu, dass keine eindeutige Aussage über die genaue Struktur des Liposoms getroffen werden kann.⁶¹ Liposome besitzen einen leeren Kern, der z.B. zum Transport von Medikamenten genutzt werden kann.⁶⁴ Dendrimere sind dagegen aufgrund ihrer verzweigten Struktur interessant. Obwohl die Strukturen hochverzweigt sind, sind sie symmetrisch und monodispers.^{50, 62} Außerdem kann die räumliche Geometrie nach Belieben angepasst werden.⁶¹

Viele dieser multivalenten Gerüste haben gemeinsam, dass sie die natürlichen Oligosaccharide mittels synthetischer Partikel oder Polymere imitierten.

1.2.2.1 Polymere

Polymere begleiten heutzutage unser ganzes Leben. *Herrmann Staudinger* zeigte vor über 100 Jahren das erste Mal, dass Polymere aus langen kovalent miteinander verknüpften Monomeren bestehen.⁶⁵ Während synthetische Polymere in der heutigen Zeit für den Menschen unerlässlich sind, nutzt die Natur ebenfalls eine Vielzahl an verschiedenen Polymeren, um das Leben überhaupt erst zu ermöglichen.⁶⁶⁻⁶⁸ Diese Biopolymere werden in lebenden Zellen hergestellt und können grundsätzlich in die Klassen der Polynukleotide,⁶⁹ Polypeptide^{70, 71} und Polysaccharide aufgeteilt werden.⁷² DNA und RNA gehören zu der Klasse der Polynukleotide und bestehen aus linear verknüpften Nukleotiden, die aus einer der fünf Nukleinbasen (Adenin, Guanin, Cytosin, Thymin, Uracil), einem Zucker (D-Ribofuranose, 2-

Desoxy-D-Ribofuranose) und ein bis drei Phosphatgruppen bestehen.⁶⁹ Polypeptide bestehen aus Aminosäuren, die mittels einer Peptidbindung verknüpft sind. Diese können sowohl kurze Ketten aus zwei oder mehr Aminosäuren bis hin zu Proteinen mit einer Größe von mehreren kDa ausbilden.⁷³ Polysaccharide bestehen aus Monosacchariden, die über eine glykosidische Bindung miteinander verbunden sind. Hierbei ist anzumerken, dass die Menge an verschiedenen Bausteinen limitiert ist. Allerdings können durch die Variation an Mustern unendlich viele verschiedene Strukturen mit verschiedenen Eigenschaften und Wirkungen hergestellt werden.

Diese linearen Polymerstrukturen können mittels synthetischer Polymere imitiert werden. In der Regel werden diese Glykomimetika über die Polymerisation von Kohlenhydratmonomeren oder die Funktionalisierung eines Polymergerüsts mit Kohlenhydratmotiven synthetisiert. Hierfür werden unter anderem die freie (FRP) oder eine kontrollierte (KRP) radikalische Polymerisation angewendet.⁶² Der Vorteil einer FRP ist, dass eine Vielzahl von Monomeren leicht polymerisiert werden kann.⁷⁴ Allerdings ist die Kontrolle über Polymerlänge und Dispersität im Gegensatz zur KRP geringer.⁷⁴ Der Nachteil bei KRP, wie z.B. der Atom Transfer Radikal Polymerisation (ATRP) oder der Reversiblen-Addition-Fragmentierungs-Ketten-Transfer-Polymerisation (RAFT), ist, dass diese viel anfälliger sind für Störungsfaktoren und nicht jedes Monomer mit diesen Methoden polymerisiert werden kann.^{62, 75} Ebenso können Glykopolymere mit anderen etablierten Polymerisationsmethoden wie z.B. ROMP synthetisiert werden.⁷⁶

Eine weitere Klasse, bei der die Struktur an ein gewünschtes Ziel angepasst werden kann, ist die Klasse der sequenzdefinierten Oligomere.⁷⁷ Hierbei wird in der Regel ein einfach zu modifizierendes Oligomer hergestellt, das sowohl linear als auch verzweigt sein kann. Zu den Modifikationen gehören Länge, Form, Valenz und Flexibilität. Im Gegensatz zum Glykopolymer wird nur ein kleiner Abschnitt aus der gesamten Struktur nachgeahmt. Ein Ansatz, der die volle Kontrolle über die Sequenz, die Gerüsteigenschaften und die Position der Kohlenhydrateinheiten ermöglicht, ist die Festphasensynthese.

1.2.2.2 Sequenzdefinierte Oligo(amidoamine)

Auf der Basis der Festphasenpeptidsynthese von *Merrifield*⁷⁸ wurde im Arbeitskreis von Prof. *Hartmann* eine Methode zur Synthese von sequenzdefinierten monodispersen Oligo(amidoaminen) entwickelt.⁷⁹ Diese Oligo(amidoamine) werden mittels einer schrittweisen Synthese aus synthetischen und natürlichen Bausteinen hergestellt (Abbildung 7). Damit ein Stufenwachstum garantiert ist, wird auf eine orthogonale Schutzgruppenstrategie zurückgegriffen. Die Bausteine besitzen analog zur Festphasensynthese von Peptiden eine Carboxylgruppe und ein geschütztes Amin. Die Zielstruktur wird aus iterativen Zyklen von

Reaktivität durch den Aktivester führt zu einer hohen Kupplungseffizienz bei Raumtemperatur. Über die Jahre wurde eine Vielzahl an verschiedenen Kupplungsreagenzien entwickelt. 1975 wurde von *Castro* das erste phosphorbasierende Kupplungsreagenz BOP (Benzotriazol-1-yloxy-tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphat) entwickelt.⁹⁰ BOP bildet als Nebenprodukt das krebserregende HMPA (Hexamethylphosphoramid) aus. Aus diesem Grund wurde es durch das weniger giftige PyBOP (Benzotriazol-1-yloxy-tripyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphat) ersetzt (Abbildung 8).⁹¹ Neben den Phosphoniumsalzen wurden ebenfalls Carbodiimide, Immonium-, Aminium-, Uronium- und Imidazoliumsalze entwickelt.⁷⁹ Viele dieser Kupplungsreagenzien benötigen für die Ausbildung des Aktivesters eine gering nukleophile Base wie Diisopropylethylamin (DIPEA) zur Deprotonierung der Carbonsäure.⁹²

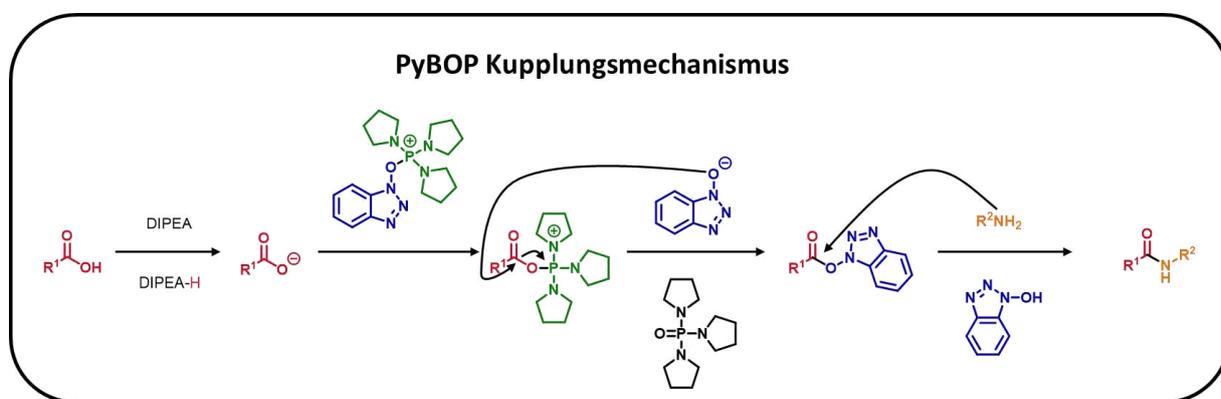


Abbildung 8 Reaktionsmechanismus der PyBOP vermittelten Amidbindungsknüpfung.

Die Schutzgruppe am N-Terminus verhindert eine Mehrfachkupplung an dem gleichen Oligomer. *Merrifield* verwendete ursprünglich ein Benzyloxycarbonyl als Schutzgruppe für den N-Terminus der Aminosäuren. Zum Nachteil dieser Schutzgruppe wurde diese mit Bromwasserstoff vom N-Terminus abgespalten.⁷⁸ Diese stark sauren Entschützungsbedingungen führen ebenfalls zu einer teilweisen Abspaltung des Linkers mit dem Peptid vom Harz.⁹³ Deswegen wird heutzutage in der Regel Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) als Standardschutzgruppe für den N-Terminus des Gerüsts verwendet. Im Gegensatz zum Benzyloxycarbonyl ist Fmoc eine basenlabile Schutzgruppe, wodurch eine ungewollte Abspaltung der Zielstruktur während der Entschützung verhindert wird.⁹⁴

Die Entschützung eines Fmoc-geschützten Bausteins wird unter milden Bedingungen mit Piperidin durchgeführt (Abbildung 9). Das abgespaltene Dibenzofulven wird durch den Überschuss an Piperidin abgefangen. Das hat zum einen den Vorteil, dass Nebenreaktionen verhindert werden, und zum anderen besteht die Möglichkeit die Abspaltung mittels UV-Spektroskopie auf ihrer Vollständigkeit zu untersuchen.⁹⁵

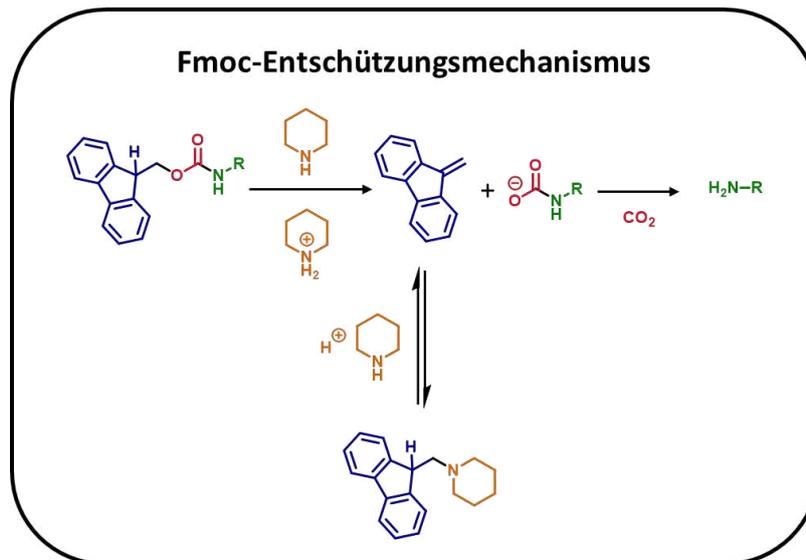


Abbildung 9 Reaktionsmechanismus der Fmoc-Entschützung bei der Verwendung von Piperidin.

1.2.2.3 Sequenzdefinierte Oligonukleotide – Holliday Junctions

Die Holliday Junction (HJ) ist nach dem Molekularbiologen Robin Holliday benannt. Er sagte im Jahr 1964 deren Existenz voraus.⁹⁶ In der Biologie nehmen die HJ eine Schlüsselfunktion in der genetischen Rekombination und der Reparatur des Doppelstrangabbrisses ein. Sie besteht aus vier DNA-Strängen, bei denen Nukleinsäuren eines DNA-Strangs mit jeweils zwei anderen Strängen eine Doppelhelix ausbilden.⁹⁷ Die einzelnen Stränge haben hierbei normalerweise eine symmetrische Sequenz, wodurch ein freies Gleiten der Stränge zueinander möglich ist. Hierbei entsteht eines von drei möglichen X-förmigen Konformationsisomeren. Die planare, offene X-förmige Struktur entsteht bei der Abwesenheit von zweifach geladenen Kationen.^{96, 98} Durch die negativ geladenen Phosphatgruppen des Nukleotidgerüsts kommt es zur elektrostatischen Abstoßung der vier Arme. Sind dagegen zweifach geladene Kationen anwesend, kommt es zu einer kationisch vermittelten Anlagerung von zwei anionischen Helices. Hierbei wurde im Jahr 1972 zunächst angenommen, dass die äußeren DNA-Stränge parallel zueinander verlaufen und es zu einer Kreuzung der inneren zwei DNA-Stränge kommt.⁹⁸ Allerdings konnte später in biochemischen und strukturellen Studien gezeigt werden, dass eine antiparallele Konformation vorliegt. In dieser Konformation wird zwischen den nicht austauschenden Strängen, die die Außenseite der HJ darstellen, und den austauschenden DNA-Strängen unterschieden. Diese inneren DNA-Stränge verlaufen in entgegengesetzter Richtung und werden von einem der äußeren DNA-Stränge auf den anderen übertragen, ohne dass sich die beiden inneren Stränge dabei kreuzen.⁹⁹

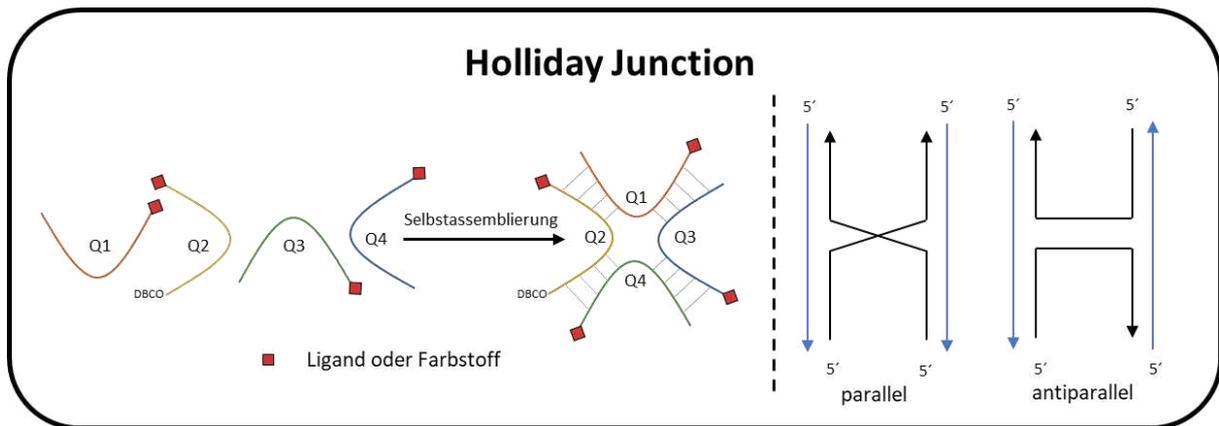


Abbildung 10 Schematische Darstellung der einzelnen DNA-Stränge sowie die selbstassemblierte Struktur der Holliday Junction (links). Paralleler und antiparalleler Verlauf der DNA-Stränge in Holliday Junction (rechts).

Das Prinzip der Selbstassemblierung kann auf nukleotidbasierte Strukturen übertragen werden. Voraussetzung für eine Assemblierung ist das Zusammenpassen der Oligonukleotide. Ein Nachteil der natürlichen Oligonukleotide-Stränge ist, dass diese nur eingeschränkt stabil sind. Eine Möglichkeit, das zu umgehen, ist die Verwendung von modifizierten Nucleotiden oder „Locked nucleic acids“ (LNA).¹⁰⁰⁻¹⁰² Eine mögliche Modifikation ist die Methylierung der Hydroxygruppe am C2-Kohlenstoff der Ribose. LNAs wurden erstmals von *Obika et al.* 1997 synthetisiert.¹⁰³ Hierbei wird eine Verbrückung zwischen der Hydroxygruppe am C2-Kohlenstoff und dem C4-Kohlenstoff der Ribose eingeführt.¹⁰³ Die modifizierten Nucleotide können zum Erreichen gewünschter Eigenschaften mit natürlichen DNA- und RNA-Bausteinen beliebig gemischt werden.¹⁰⁴

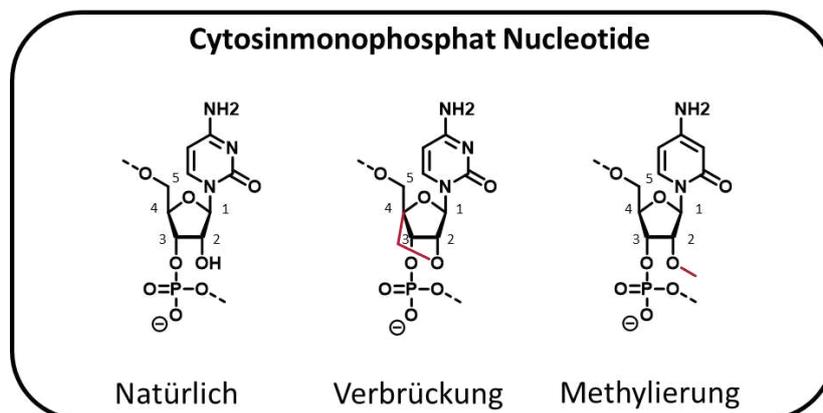


Abbildung 11 Übersicht über natürliche und „Locked“ Nucleinsäure am Beispiel von Cytosin mit verbrückter und methylierter Funktionalisierung.

Aufgrund der definierten räumlichen Struktur, der biologischen Kompatibilität sowie der Stabilität sind HJ sowohl für biomedizinische Anwendungen¹⁰⁵ als auch für verschiedenste Anwendungen in der Nanotechnologie^{106, 107} von großem Interesse. Hierbei kann z.B. durch Modifikation der HJ mit unterschiedlichsten Liganden ein komplexes Oligonukleotid hergestellt werden, welches Anwendung in der Biomedizin findet.

1.3. Glykankonjugation

Die Glykankonjugation gehört zu der Klasse der Biokonjugationen. Hierbei können biologische Moleküle mit einer Vielzahl an beliebigen Molekülen z.B. Farbstoffen oder Zuckern funktionalisiert werden. Es wird von bioorthogonalen Reaktionen gesprochen, wenn eine Funktionalisierung *In Vivo* ohne die Beeinflussung von biologischen Prozessen durchgeführt werden kann.^{108, 109} Der Begriff der Bioorthogonalität wurde maßgeblich von *Carolyn Bertozzi* geprägt. Bei diesen Reaktionen handelt es sich in der Regel um Click-Reaktionen.

1.3.1. Chemische Konjugation von Glykanen mittels Click-Chemie

Click-Chemie ist eine gängige Methode zur Verknüpfung von zwei Molekülen. Bei Click-Reaktionen handelt es sich um ein Konzept und nicht um einen speziellen Mechanismus. Um als Click-Reaktion eingestuft zu werden, müssen folgende Kriterien erfüllt werden: die modulare und breite Anwendbarkeit, eine Unempfindlichkeit gegenüber Sauerstoff und verschiedenen Lösungsmitteln insbesondere Wasser, hohe Umsätze, eine hohe Atomökonomie, Regio- und Stereospezifität sowie eine hohe thermodynamische Triebkraft von mindestens $84 \frac{kJ}{mol}$.¹¹⁰ Zu den bekannteren Click-Reaktionen gehören die Thiol-En-Reaktion, die Diels-Alder-Reaktion sowie die 1,3-dipolare Cycloaddition von Aziden und Alkinen. In Bezug auf diese Arbeit werde ich im Folgenden auf die Kupfer(I)-katalysierte Azid Alkin Cycloaddition (Copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition|CuAAC) sowie die Ringspannung induzierte Azid-Alkin Cycloaddition (Strain-promoted azide-alkyne cycloaddition|SPAAC) eingehen.

Bei der CuAAC handelt es sich um eine Weiterentwicklung der 1,3-dipolaren Cycloaddition von Huisgen, die für eine Reaktion hohe Temperaturen von mindestens 100 °C benötigt. Außerdem wird eine Mischung aus den 1,4- und 1,5- 1,2,3-Triazol Isomeren ausgebildet.¹¹¹ Durch die Verwendung von Cu(I) als Katalysator kann die Reaktion bei Raumtemperatur durchgeführt werden und es wird selektiv das 1,4-Isomer ausgebildet.¹¹¹ Aktuelle Studien sowie DFT-Rechnungen^{112, 113} legen nahe, dass zwei Cu(I) Spezies an der Reaktion beteiligt sind.^{114, 115} Wie in Abbildung 12 gezeigt, bildet sich zunächst ein π -Komplex aus der Cu(I)-Spezies mit dem Alkin aus. Die zweite Cu(I)-Spezies koordiniert an das Azid, wodurch eine Aktivierung stattfindet. Im nächsten Schritt ersetzt das Azid einen der Liganden, wodurch ein Kupfer-Azid-Acetylid-Komplex gebildet wird. Nach der Zyklisierung und Protonierung unter Abspaltung der zweiten Cu(I)-Spezies bildet sich das 1,4-1,2,3-Triazol-Isomer aus.

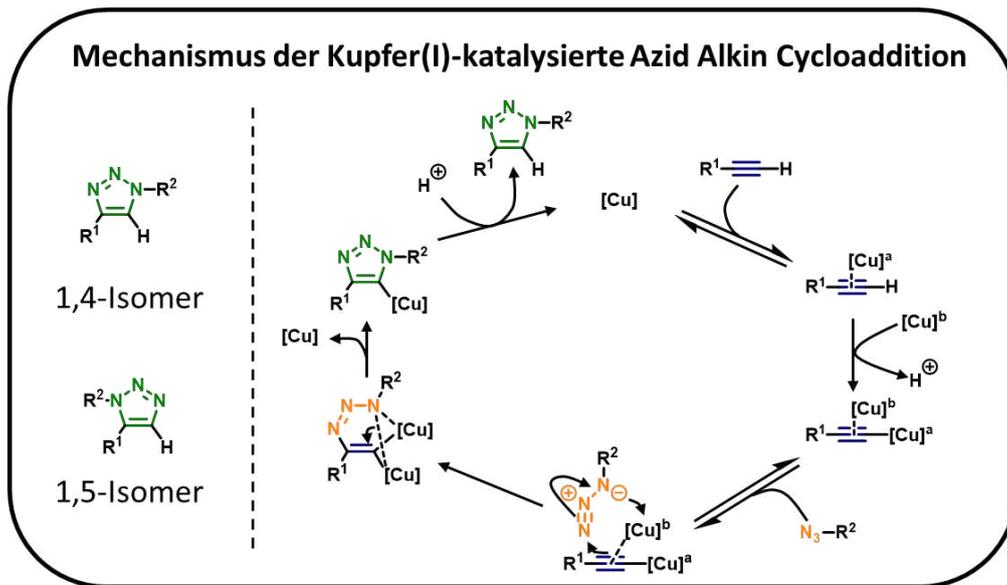


Abbildung 12 Schematische Darstellung der 1,4- und 1,5-1,2,3-Triazol Isomere, die bei einer metallkatalysierten Alkin-Azid-Cycloaddition entstehen können(links). Mechanismus der Kupfer(I) katalysierten 1,3-dipolaren Cycloaddition von Aziden und Alkinen.

Auch wenn die CuAAC sehr effizient unter biologischen Bedingungen angewendet werden kann, werden dennoch Kupfersalze verwendet, die zytotoxisch wirken. Um diesem Problem entgegenzuwirken, wurden Liganden entwickelt, die entweder zu einer erhöhten Zellpenetration führen oder die effektive Cu(I)-Konzentration erhöhen. Dadurch können geringere Mengen an Kupfersalzen verwendet werden.¹¹⁶⁻¹¹⁹ Neben Methoden, die Menge an Cu(I) zu verringern, wurde an kupfer- und metallfreien Methoden geforscht.¹²⁰

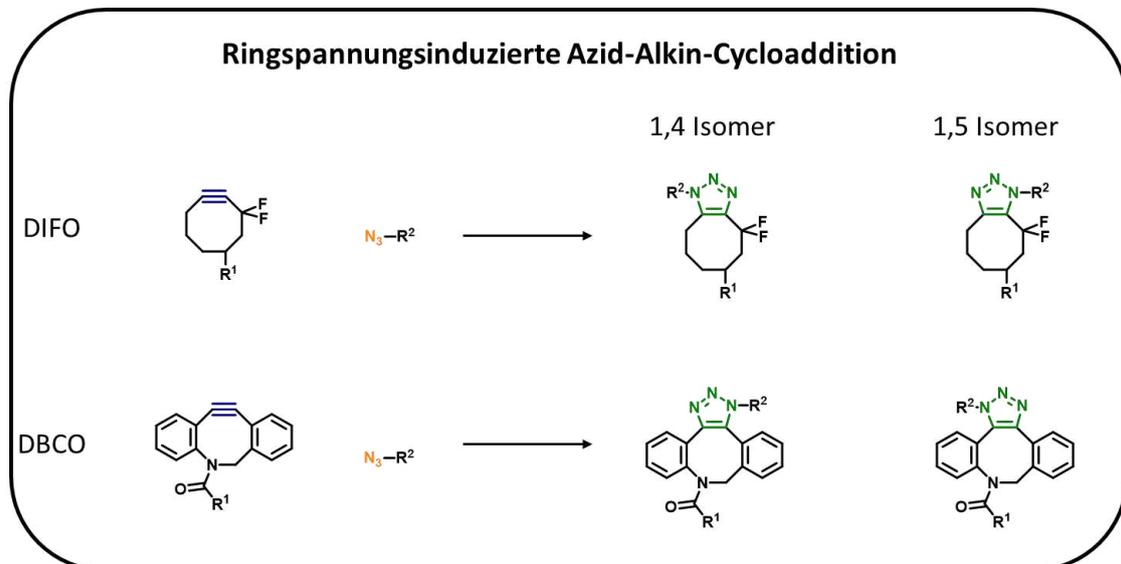


Abbildung 13 Darstellung von verschiedenen Alkinen für die ringspannungsinduzierte Cycloaddition.

Hierbei wurde von *Bertozzi* die ringspannungsinduzierte Azid-Alkin-Cycloaddition SPAAC entwickelt. Bei den gespannten cyclischen Alkinen handelt es sich um Cyclooctin-Derivate. Einerseits kann die Reaktivität durch die Einführung von elektronenziehenden Gruppen an der Propargylfunktionalität erhöht werden. Die elektronenziehende Gruppe führt zu einer

Destabilisierung des Alkins, wodurch die Triebkraft der Reaktion gesteigert wird. Ein Beispiel hierfür ist das Difluorooctin (DIFO).¹²⁰ Andererseits kann die Ringspannung auch weiter erhöht werden, wodurch eine Reaktion begünstigt wird. Die erhöhte Ringspannung kann durch das Einführen von Aromaten und den Cyclooctinring erfolgen. Ein Beispiel hierfür sind Dibenzylcyclooctine (DBCO). Der Vorteil der SPAAC ist, dass auf Kupfersalze verzichtet werden kann. Allerdings werden dadurch, dass weder DFIO- noch DBCO-Derivate symmetrisch sind, immer zwei verschiedene Produkte gebildet, was bei einer CuAAC nicht der Fall ist.

1.3.2. Enzymatische Konjugation von Glykanen am Beispiel der Sialyltransferase

Die Glykosylierung ist ein Mechanismus von Organismen um Biomakromoleküle, wie z.B. Proteine oder Lipide, mit Kohlenhydrateinheiten enzymatisch zu funktionalisieren.¹²¹ Bei dieser Reaktion wird ein Glykosyldonor, z.B. ein Kohlenhydrat oder Glykan, kovalent an eine Hydroxygruppe oder eine andere funktionelle Gruppe des Glykosylakzeptors gebunden, wobei ein Glykokonjugat entsteht. Grundsätzlich wird zwischen Glykierung und Glykosylierung unterschieden. Die Glykierung ist ein chemischer Prozess ohne den Einfluss von Enzymen. In Gegensatz dazu sind die bei der Glykosylierung entstehenden Glykokonjugate enzymatisch synthetisiert. Die Glykosylierung kann sowohl co-translational als auch post-translational sowie intra- als auch extrazellulär erfolgen. Zu den bekanntesten Glykosylierungen gehören die N-Glykosylierung und O-Glykosylierung. Für die N-Glykosylierung dient die Aminosäuresequenz auf Asn-X-Ser/Thr, wobei das Kohlenhydratmotiv kovalent an den Stickstoff der Seitenkette des Asparagins (Asn) gebunden wird. Hierbei ist die mittlere Aminosäure variabel, ausgenommen davon sind Prolin (Pro), Serin (Ser) und Threonin (Thr).¹²² Im Gegensatz dazu werden die Kohlenhydrate bei der O-Glykosylierung an die Hydroxygruppen von Serin oder Threonin enzymatisch angebracht. Die nach diesem Mechanismus aufgebauten Glykomakromoleküle sind hauptsächlich aus Fucose, Galaktose, Glucose, Glucosamin, Mannose und Sialinsäuren aufgebaut. Dabei nimmt Neu5Ac eine besondere Rolle ein.¹²²

Die enzymatische Transferreaktion besteht aus zwei Schritten. Im ersten Schritt wird ein Nukleotidtriphosphat und ein Zucker durch eine Nukleotidzuckersynthetase zu einem aktivierten Zuckerdonor umgesetzt.¹²³ Im menschlichen Körper gibt es zehn verschiedene Nukleotidzucker, die als Zuckerdonor fungieren. Von diesen sind sechs auf der Basis von Uracil, zwei auf der Basis von Guanin und zwei auf der Basis von Cytosin. In anderen Organismen gibt es eine Vielzahl weiterer Nukleotidzucker auf Basis aller fünf Nukleotide.¹²⁴ Bei der Synthese der Nukleotidzucker kommt es zur Abspaltung einer Phosphatgruppe mit Ausnahme von Cytosinmonophosphat-Neu5Ac (CMP-Neu5Ac), bei der es zur Abspaltung von zwei Phosphatgruppen kommt. Im zweiten Schritt wird der Zuckerdonor enzymatisch durch eine Glykosyltransferase an einen Akzeptor gebunden.¹²⁵ Dieser Akzeptor ist entweder ein nukleophiler Sauerstoff, Stickstoff, Schwefel oder Kohlenstoff.¹²¹

Diese enzymatischen Reaktionen können ebenfalls im Labor durchgeführt werden. Hierfür müssen die Enzyme aufgereinigt und isoliert werden.¹²⁶ Diese Art von Synthesen wird „exo enzymatic labelling system“ genannt. Ein etabliertes System für die enzymatische Glykosylierung besteht aus der *Neisseria meningitidis* CMP-Neu5Ac Synthetase (NmCSS)¹²³ und der *Pasteurella multocida* Sialyltransferase (PmST1).^{127, 128} Mit diesem System können Galaktosederivate mit Neu5Ac funktionalisiert werden.

Bei der Funktionalisierung von Lactosederivaten mit Neu5Ac wurde erstmal durch *Patrick Konietzny* festgestellt, dass die Spezifität des NmCSS/PmST1 Systems geringer ist als erwartet. Als Nebenprodukt konnte eine Sialylierung des Tris-Puffers festgestellt werden.¹²⁶ Diese Entdeckung ermöglicht die enzymatische Synthese von nicht-Glykan Strukturen, die sonst nur durch eine aufwendige organische Synthese möglich wären.

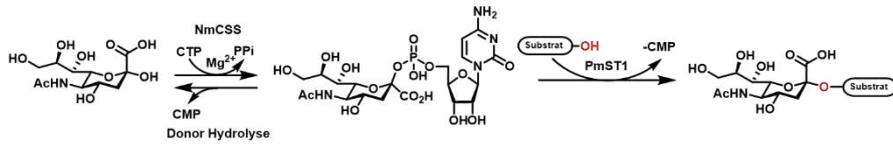
2. Motivation

Viele essenzielle Funktionen in der Natur basieren auf sich wiederholenden und definierten Sequenzen von funktionalen Bausteinen in Biopolymeren. Eine wichtige Klasse der Biopolymere sind die Glykane. Sie sind überall in Organismen zu finden. Besonders auf Zelloberflächen können viele immer wiederkehrende Zuckermotive beobachtet werden. Hierbei haben die einzelnen Sequenzen und Zuckermotive eigenständige Aufgaben und Funktionen. Neu5Ac ist an vielen physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt. Einige Pathogene und Toxine nutzen die multivalent präsentierten Zuckermotive, um durch molekulares Mimikry Zellen zu infizieren. Diese Motive können von Zellen erkannt werden und führen zum Einschleusen der Pathogene in die Zelle. Um ein genaueres Verständnis für die Funktionsweise von physiologischen und pathologischen Prozessen zu erreichen, ist es von Interesse, die Prozesse schrittweise zu verstehen. Der Zugang zu definierten Glykanstrukturen ist sehr beschränkt und mit klassischen chemischen Methoden nur mit erheblichem Aufwand erreichbar. Eine weit verbreitete Methode ist, die Komplexität der Zuckermotive auf das minimale Bindungsmotiv zu reduzieren, diese an künstlichen Gerüsten zu präsentieren und auf physiologische und pathologische Eigenschaften zu untersuchen.

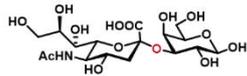
Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, drei unterschiedliche Methoden zur Funktionalisierung variabler aber gleichzeitig strukturell definierter und multivalenter Gerüste mit Sialinsäuren zu etablieren. Im ersten Projekt wird ein enzymatischer Ansatz verfolgt. Hierfür wird das Exo-Enzymatisches-Labeling-System aus NmCSS und PmST1 genutzt, um neuartige Neu5Ac tragende Liganden aus nicht glykanbasierten, natürlichen und nicht natürlichen Substraten zu synthetisieren und zu isolieren. Hierbei liegt ein besonderer Fokus darauf, die Grenzen der chemoenzymatischen Synthese zu untersuchen. Im Anschluss werden erste Versuche zur multivalenten Präsentation der neuartigen Neu5Ac tragenden Liganden an einem Polymer durchgeführt.

Im zweiten und dritten Projekt wird die Optimierung und Entwicklung neuartiger multivalenter Ligandensysteme untersucht. Das zweite Projekt fokussiert sich auf die Synthese eines neuartigen, multivalenten und selbstassemblierenden Kamm-Systems aus Oligonukleotiden und Oligo(amidoaminen). Hierfür sollen multivalente und sequenzdefinierte Oligo(amidoamine) als Grundgerüst genutzt werden. An dieses Grundgerüst sollen Holliday-Junctions konjugiert werden. Dafür wird einer der vier DNA-Stränge an das Oligo(amidoamin)-Gerüst konjugiert. Die restlichen drei DNA-Stränge bilden durch Selbstassemblierung die Holliday-Junction aus. Besonders vorteilhaft an diesem System ist, dass durch die Variation unterschiedlich funktionalisierter DNA-Stränge einfache Modifikationen für das gesamte System möglich sind.

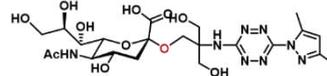
Projekt 1
Enzymatische Sialylierung von Polyolmotiven



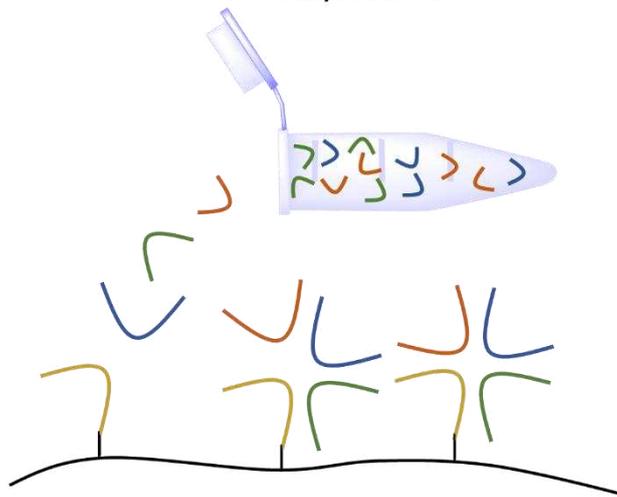
Natürliches Substrat



Nichtnatürliches Substrat



Projekt 2
Multivalente Kamm-Systeme aus Oligo(amidoaminen)
und Holliday Junctions



Projekt 3
Neu5Ac funktionalisierte starre cyclische Präzisionsoligomere

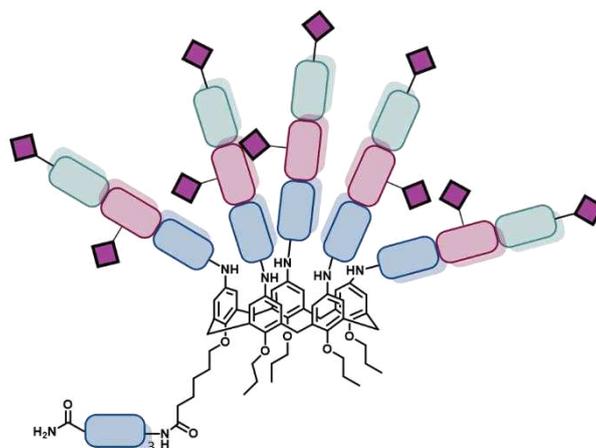


Abbildung 14 Schematische Darstellung der drei verschiedenen Methoden zur Funktionalisierung definierter multivalenten Gerüste mit Sialinsäuren.

Die Motivation des dritten Projekts ist, die künstlich synthetisierten Liganden über chemische Konjugation mittels Cu-vermittelter Azid-Alkin-Reaktion mit Neu5Ac funktionalisiert und strukturell den natürlichen Motiven anzupassen. In der Vergangenheit wurden neben linearen auch verzweigte Oligo(amidoamine) zur Bindung an Viren und Bakterien synthetisiert. Allerdings sind viele der Oberflächenproteine, an die eine Bindung erfolgt, cyclisch angeordnet, wodurch oft nicht alle Bindungstaschen gleichzeitig besetzt werden und die Avidität der synthetischen Liganden geringer ist als die der natürlichen Liganden. Das Ziel dieses Projektes ist es, einen rigiden cyclischen Liganden zu entwickeln, der durch seine Struktur einfacher mehrere Bindungstaschen gleichzeitig besetzen kann. Ein Beispiel hierfür ist das VP1 des Merkelzell-Poliomavirus, welches an Neu5Ac bindet. Das VP1 ist ein symmetrisches, cyclisches Homopentamer aus VP1-Untereinheiten. Als rigides Grundgerüst werden Calix[n]arene-Bausteine ($n = 4$ und 5) für die Festphasensynthese synthetisiert und anschließend mit Neu5Ac funktionalisiert, um eine bessere Bindung gegenüber linearen Liganden zu erzielen.

3. Ergebnis und Diskussion

3.1. Enzymatische Synthese von Neu5Ac-haltigen nicht-Glykanen und Polymeren

Die Glykokalyx auf der Zelloberfläche von lebenden Organismen spielt eine wichtige Rolle für eine Vielzahl von biologischen Prozessen. Hierbei haben die verschiedenen komplexen Zuckermotive sowohl die Funktion als Ligand zur molekularen Erkennung und der damit einhergehenden biologischen Reaktion, als auch als Strukturgeber durch elektrostatische und sterische Wechselwirkungen. Hierbei sind besonders die Diversität und Komplexität, bei immer wiederkehrenden Motiven von besonderer Bedeutung. Diese wiederkehrenden Motive werden über eine enzymatische Glykosylierung erzielt. Hierbei nimmt die Sialylierung eine besondere Rolle ein, da diese meistens am Ende einer Glykansynthese stattfindet und somit als Bindungsmotiv zur Verfügung steht. Diese endständigen Sialinsäuren werden unter anderem von einer Vielzahl von Viren wie Polyoma- und Influenzaviren für eine Primärinteraktion für eine Infektion genutzt.

3.1.1 Enzymatische Sialylierung von nicht-glykanbasierten Polyol-Motiven

Für eine bessere Untersuchung der Infektionsmechanismen ist die Untersuchung der Liganden für den Primärkontakt unabdingbar. Die organische Synthese von Komplexen oder sogar verzweigten Glykanen ist mit einem erheblichen hohen Aufwand zu bewerkstelligen. Neben der klassischen organischen Synthese können diese Glykane ebenfalls enzymatisch hergestellt werden. Hierfür können aus Organismen, die für eine spezifische glykosidische Bindung verantwortlichen Enzyme isoliert und modifiziert werden. Eines dieser verwendeten Exo-Enzymatischen-Labeling-Systeme für die Sialylierung von Galaktose ist das Enzympaar aus PmST1 und NmCSS. Bei der Verwendung dieses Enzympaares wurde von *P. Konietzny* festgestellt, dass es neben der Sialylierung der Galaktose ebenfalls zu einer Sialylierung des Tris-Puffers gekommen ist. Dies ermöglicht eine einfache chemoenzymatische Synthese von neuen Neu5Ac-funktionalisierten Tris-Derivaten.

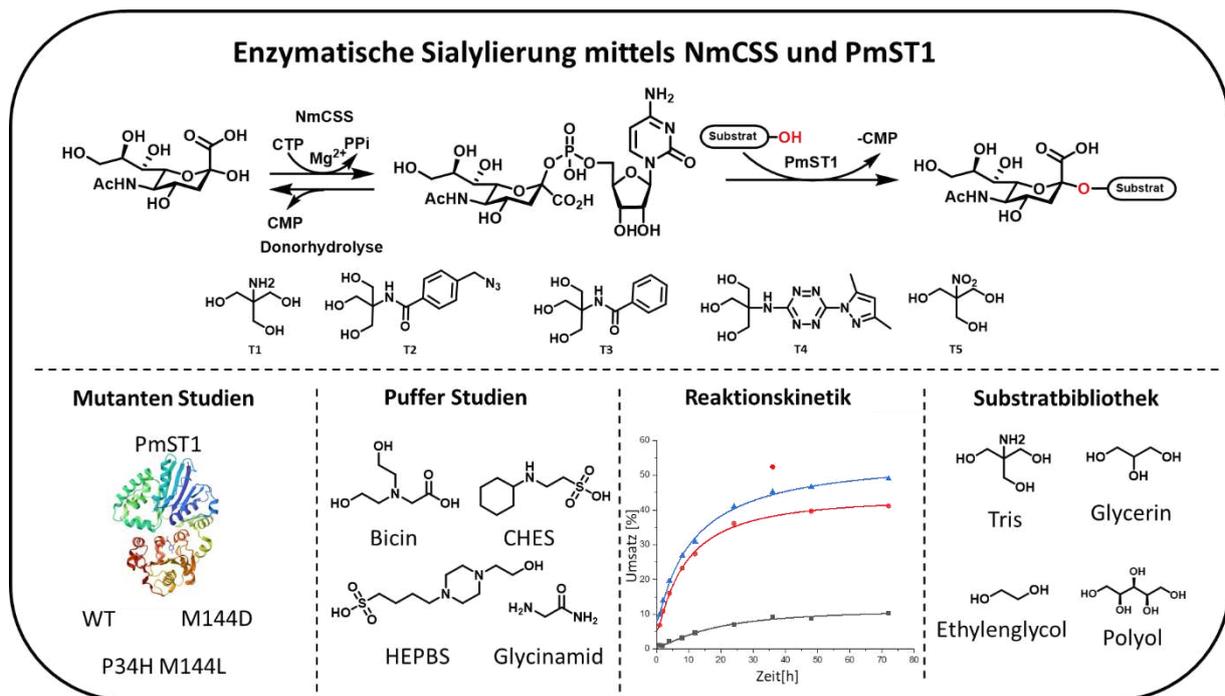


Abbildung 15 Schematische Darstellung der Enzymatischen Synthese von niedermolekularen Polyolmotiven am Beispiel von Tris-Derivaten mittels dem Exo-Enzymatischen-Labeling-System aus PmST1 und NmCSS (oben). Das Exo-Enzymatischen-Labeling-System aus PmST1 und NmCSS wurde mittels Mutanten Studien (WT, M144D, P34H M144L), Puffer Studien (Bicin, CHES, HEPBS, Glycinamid) und der Reaktionskinetik untersucht und optimiert. Anschließend wurde eine Substanzbibliothek auf aus Tris-, Glycin-, Ethylenglycol-, und Polyol-Derivate erstellt. (unten)

Die enzymatische Sialylierung von dem natürlichen Galaktose Motiv mittels NmCSS und PmST1 ist eine gut untersuchte und optimierte Synthese. Es wurde an **T1-5** den ersten nicht-natürlichen Strukturen gezeigt, dass eine enzymatische Sialylierung möglich ist. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll nun ausführlich untersucht werden, welche Gerüste als Akzeptoren für die Sialyltransferasen fungieren können. Außerdem wurden untersucht, welche Optimierungen für die enzymatische Synthese von natürliche und nicht natürliche nicht Glykanmotive erforderlich sind. Hierbei wird ein besonderer Fokus auf das Sialylierungsverhalten der verschiedenen PmST1-Varianten, den Einfluss verschiedener Puffersysteme auf die Sialylierung und dem Umsatz sowie der Reaktionskinetik. Mit den optimierten Sialylierungsbedingungen wurden für die Erstellung einer Substanzbibliothek von Tris-, Glycerin-, Ethylenglycol- und Polyol-Derivate.

3.1.1.1 Optimierung der Sialylierungsbedingungen

Umsatzbestimmung verschiedener PmST1-Mutanten

Für die enzymatische Synthese wurden von *Robb de Vries* die Enzyme zur Verfügung gestellt. Dies beinhaltet sowohl die Cytosin-Sialinsäure-Synthetase aus der E.coli Rekombinante von *Neisseria Meningitides* (NmCSS) als auch Sialinsäuretransferasen aus der E.coli Rekombinante von *Pasteurella Multocida* (PmST1). Hierbei wurden von der PmST1 sowohl der Wildtyp (WT), die Einfachmutante M144D als auch die Doppelmutante P34H M144L zur

Verfügung gestellt. Bei der PmST1 M144D wurde an der Stelle 144 im Proteingerüst Methionin gegen Asparaginsäure ausgetauscht. Durch diese Modifikation konnte die Donorhydrolyse um den Faktor 20 reduziert sowie eine um den Faktor 18 reduzierte Sialidaseaktivität erzielt werden.¹²⁹ Allerdings wird durch die Mutation ebenfalls die Transferaseaktivität um den Faktor 18 reduziert.¹²⁹

Bei der Mutante P34H M144L wurden die Aminosäuren im Peptidgerüst an der Stelle 34 Prolin durch Histidin und an der Stelle 144 Methionin durch Leucin ersetzt. Durch diese Modifikation kommt es zu einer Änderung der enzymatischen Selektivität. Der WT und die Mutante M144D katalysieren eine α -(2-3) – Transferreaktion. Im Gegensatz dazu katalysiert die Mutante P34H M144L eine α -(2-6) – Transferreaktion. Des Weiteren ist im Vergleich zum WT eine um 50% reduzierte Donorhydrolyse und um den Faktor 50 reduzierte Sialidaseaktivität nachweisbar.¹³⁰

131

Diese Reaktivitäten wurden allerdings nur für das natürliche Donor-Akzeptor-System aus CMP-Neu5Ac und einem Galaktosederivat untersucht. Da die Reaktivität bei dem nicht natürlichen Substrat abweichen kann, wurde der Umsatz der einzelnen Mutanten anhand von Tris-Motiv-Derivaten untersucht.

Hierfür musste zuerst ein Tris-Derivat synthetisiert werden, das eine einfache und schnelle Umsatzbestimmung ermöglicht. Aufgrund der hohen Polarität, der Ladung der Neu5Ac, des Nichtvorhandenseins einer UV-aktiven-Gruppe, sowie des kleinen Molekulargewichts kann eine Trennung mittels herkömmlicher Methoden wie RP-HPLC, Säulenchromatographie etc. nicht ohne weiteres durchgeführt werden. Eine Möglichkeit, diesem Problem auszuweichen, ist die Einführung einer hydrophoben aromatischen Gruppe über das Amin. Hierbei ist zu beachten, dass der aromatische Anteil nicht zu groß ist, damit eine Wasserlöslichkeit weiterhin garantiert werden kann.

Das von *P. Konietzny* bereits synthetisiert Tris-Derivat **T2** mit einem Aromaten und einer Azidfunktionalität wurde zur Umsatzbestimmung mit den verschiedenen Mutanten verwendet. Die Reaktionslösung der enzymatischen Sialylierung aus Puffer (Bicin|pH 8,8), **T2**, Neu5Ac, CTP und NmCSS wurde bei 37°C in einem Thermoschüttler inkubiert. Nach 1 h wird die PmST1-Variante hinzugegeben und für 18 h inkubiert. Die Reaktion wird mit einer kleinen Menge Acetonitril unterbrochen und mittels RP-HPLC-MS(ESI) untersucht.

Ein Vorteil bei der Sialylierung von Tris-Derivaten ist, dass die regioselektiven Eigenschaften der Enzyme aufgrund der Symmetrie vernachlässigt werden können.

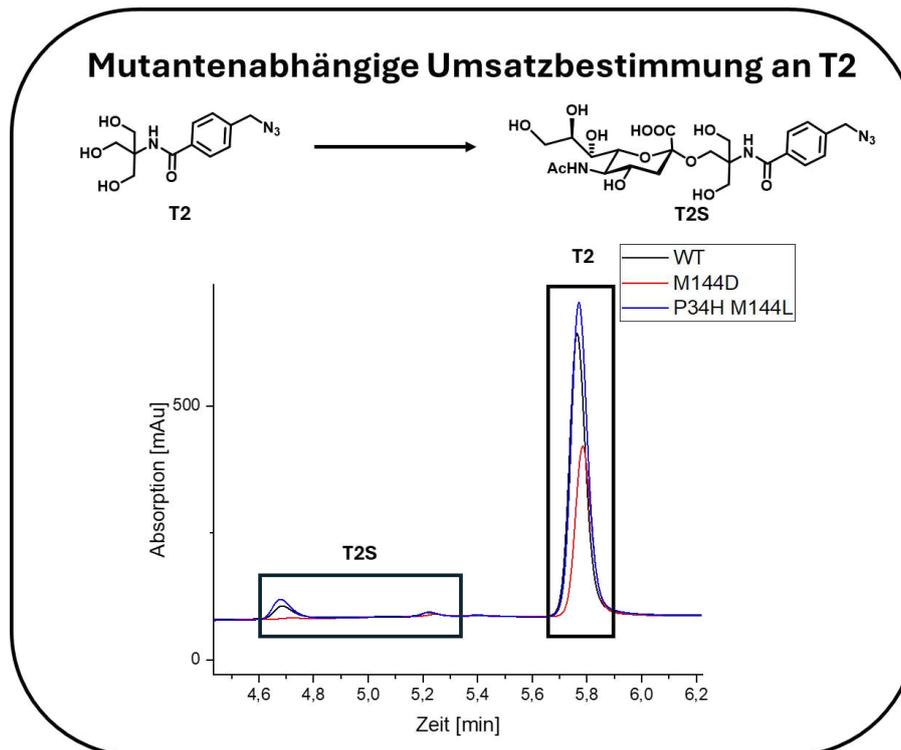


Abbildung 16 Enzymatische Sialylierung von T2 (oben). RP-HPLC-Spektrum der Reaktionslösung von T2 zu T2S (unten) (linearer Gradient von 5-95 vol.% MeCN in H₂O in 15 min bei 25 °C).

Tabelle 1 Einfachbestimmung des mutantenabhängigen Umsatzes von T2 in Bicin mittels RP-HPLC.

Enzym	Umsatz [%]
PmST1 WT	5,7
PmST1 M144D	1,1
PmST1 P34H M144L	7,3

In Abbildung 16 sind die RP-HPLC-MS(ESI) Chromatogramme der verschiedenen PmST1 übereinander aufgetragen. Hierbei ist bei einer Retentionszeit von 5,76 min das Edukt **T2** zu erkennen. Die Signale bei 4,67 min und 5,22 min können dem gewünschten Produkt **T2S** zugeordnet werden. Bei der Retentionszeit von 4,67 min wird die Masse der sialylierten Struktur **T2S** detektiert. Die zugehörige Masse zu dem Signal bei 5,22 min, entspricht der des Edukts. Da allerdings die Retentionszeit zwischen den hydrophileren sialylierten Produkt und dem hydrophoberen Edukt liegt, ist anzunehmen, dass es zu einer Desialylierung auf der Säule kommt. Der Grund dafür ist, dass die Neu5Ac aufgrund der nicht vorhandenen Hydroxygruppe am C3-Kohlenstoff für eine säurekatalysierte Eliminierung empfindlich ist.

In Tabelle 1 ist zu erkennen, dass der prozentuale Umsatz der PmST1 Typen vergleichbar zu den natürlichen Substraten verläuft. Nach 18 h Reaktionszeit zeigt die Mutante PmST1 P34H M144L aufgrund der erhöhten Reaktivität den höchsten Umsatz und die Mutante PmST1 M144D aufgrund der reduzierten Reaktivität den geringsten Umsatz. Basierend auf diesen

Erkenntnissen wurde PmST1 P34H M144L als Standardenzym für alle weiteren Sialylierungen verwendet.

Bestimmung des pufferabhängigen Umsatzes der PmST1

Eine weitere Syntheseoptimierung der Ein-Topf-Synthese ist die Variation des Puffersystems. Hierbei wird der Einfluss des Puffers auf die Sialylierung untersucht. Es muss darauf geachtet werden, dass der verwendete Puffer nicht selbst sialyliert und gleichzeitig bei einem pH-Wert von 8,8 als Puffer eingesetzt werden kann. Für die Studie wurden Bicin (pH 7,6-9), HEBPS ((N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'(4butansulfonsäure)) | pH 7,6-9), CHES ((N-cyclohexyl-2-aminoethansulfonsäure | pH 8,6-10) und Glycinamid (pH physiologischer Bereich) getestet. Um zusätzlich den Einfluss des Azids von **T2** einerseits auf die Wechselwirkung mit den Enzymen und dem Puffersystem und andererseits eine Vergleichbarkeit der elektronischen Eigenschaften zu **T2** herzustellen, wurde sich für die Synthese eines weiteren Tris-Motives mit einer aromatischen Seitenkette entschieden. Um eine Vergleichbarkeit der elektronischen und sterischen Eigenschaften mit **T2** herzustellen, wurde eine Funktionalisierung des Tris-Motives mit Benzoyl-Chlorid durchgeführt. Dieses kann über das Amin von Tris als Amid eingeführt werden.

Synthese eines mit einem Aromaten funktionalisierten Tris-Motives (T3)

Für die Synthese von **T3** wurde Tris in Dimethylformamid (DMF) gelöst und in einem Eisbad gekühlt. Das Benzoyl-Chlorid wird portionsweise zugetropft, um eine Einfachfunktionalisierung am Amin zu begünstigen. Nach vollständiger Reaktion wurde das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie und präparativer RP-HPLC aufgereinigt, um ein reines Produkt zu garantieren, das in biologischen Messungen verwendet werden kann. **T3** konnte mittels RP-HPLC-MS(ESI), HR-ESI sowie mit ¹H-NMR nachgewiesen werden.

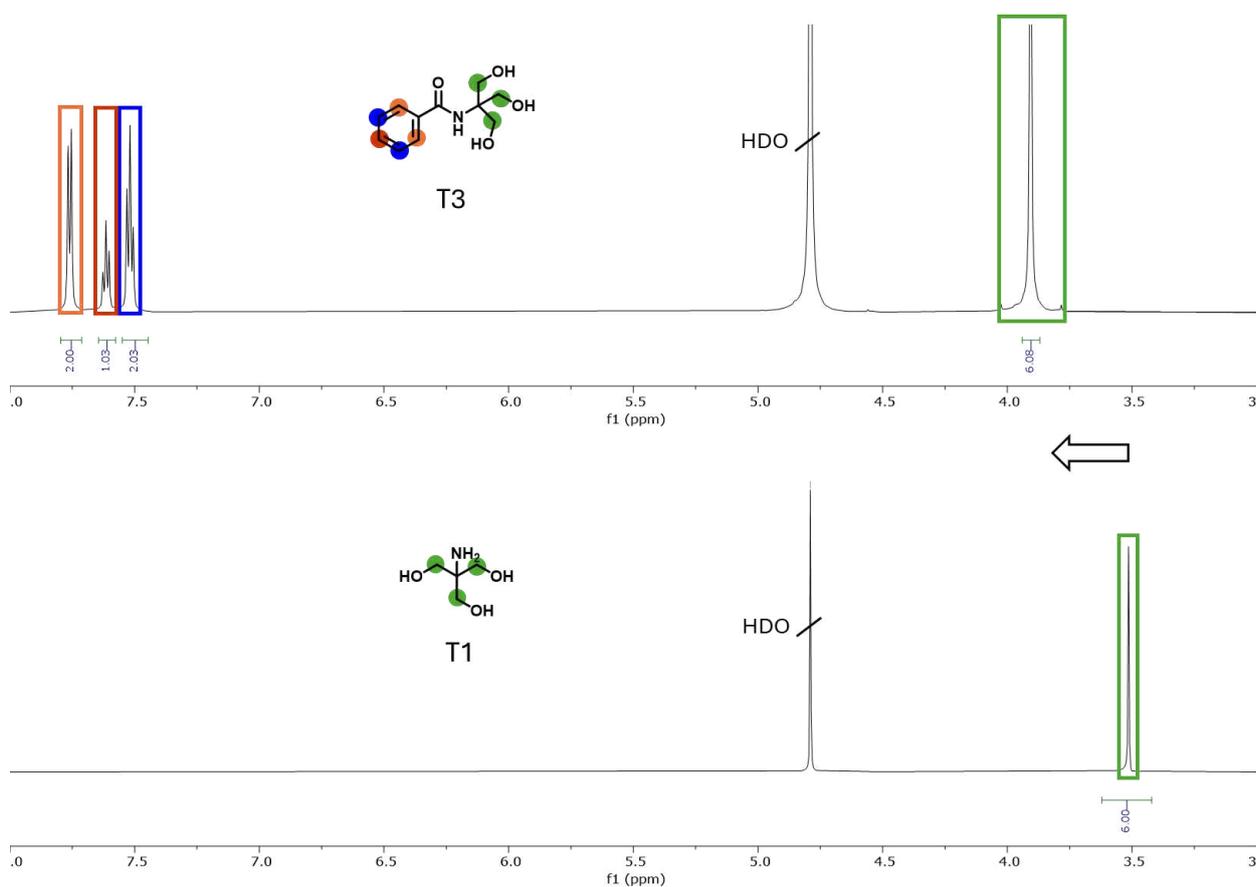


Abbildung 17: $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (600MHz, D_2O , 25°C) von **T1** (unten) **T3** (oben).

In Abbildung 17 ist das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **T3** abgebildet. Die sechs Protonen der H1 Protonen sind dem Singulett mit einer Verschiebung von 3,8 ppm zuzuordnen. Die Protonen des Aromaten spalten in ein Dublett der zwei H2 Protonen bei 7,68 ppm, zwei Triplets der zwei H3 Protonen bei einer Verschiebung von 7,45 ppm sowie des H4 Protons bei einer Verschiebung von 4,53 ppm auf. Ebenso ist zu erkennen, dass erfolgreich die Edukte entfernt werden konnten, da die Signalintensität im passenden Verhältnis ist.

Im RP-HPLC-MS(ESI)-Spektrum (Abbildung 84) konnte die Zielstruktur **T3** mit einer Reinheit von 99% bei einer Retentionszeit von 3.59 min nachgewiesen werden.

Sialylierung in verschiedenen Puffersystemen

Mithilfe von **T3**, den kommerziell erhältlichen **T4** und **T5**, sowie der von *P. Konietzny* synthetisierten Struktur **T2** kann der Umsatz von Tris-Derivaten in Bicin, Glycinamid, CHES und HEPBS mittels RP-HPLC-MS(ESI) bestimmt werden.

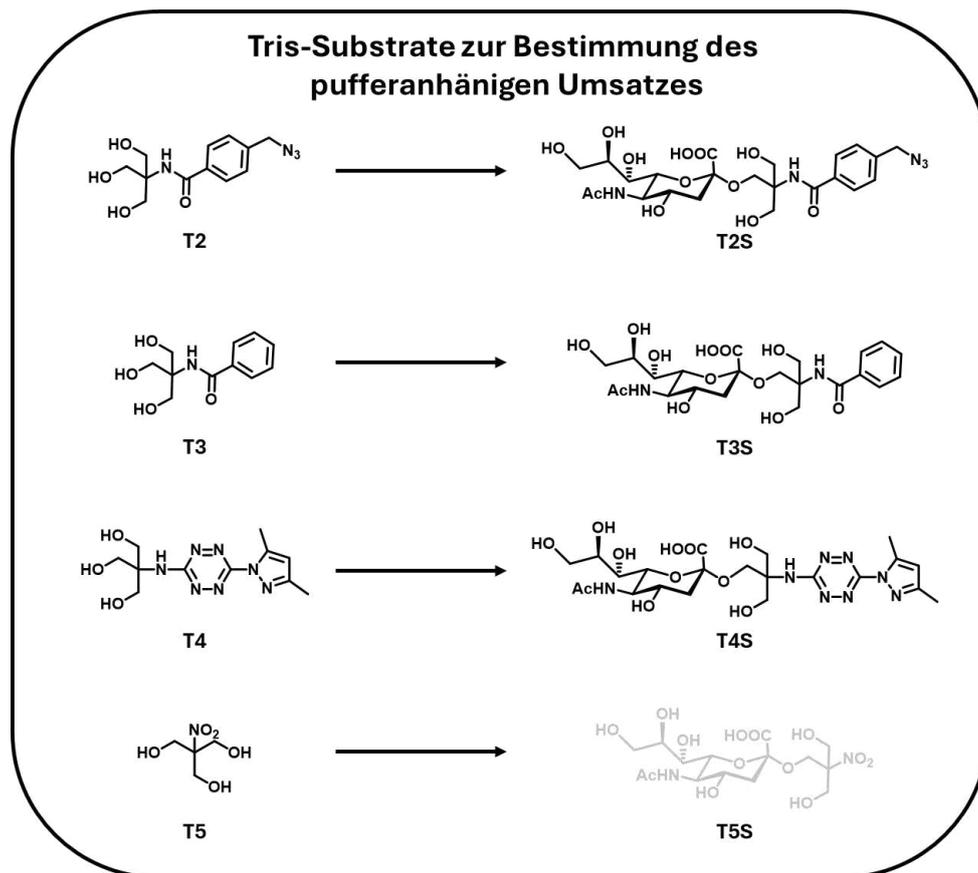


Abbildung 18 Edukte und Produkte zur Bestimmung des pufferabhängigen Umsatzes.

Tabelle 2 Bestimmung des pufferabhängigen Umsatzes an den Substraten **T2-5** mittels RP-HPLC.

Puffer	T2	T3	T4	T5
HEPBS	8,0 ± 2,2	10,3 ± 0,4	41,3 ± 3,8	-
Glycinamid	11,1 ± 4,1	11,6 ± 0,8	38,6 ± 4,0	-
Bicin	10,9 ± 1,3	8,6 ± 0,6	52,8 ± 4,9	-
CHES	0,8 ± 0,6	-	0,4 ± 0,4	-

Beim Vergleich der verschiedenen Puffer-Systeme (Tabelle 2) ist zu erkennen, dass im CHES-Puffer keine Sialylierung für **T3** und **T5** sowie nahezu keine Sialylierung für **T2** und **T4** erzielt werden konnte. Für die anderen drei Puffer zeigen die einzelnen Substrate Umsätze in der gleichen Größenordnung. Beim Vergleich der einzelnen Umsätze in den Puffersystemen HEPBS, Glycinamid und Bicin ist zu erkennen, dass Glycinamid für alle Substrate im Mittel die besten Umsätze zeigt. Allerdings zeigt sich bei **T4**, dass gerade in Bicin höhere Umsätze erzielt werden können. Da Glycinamid im Mittel die höchsten Umsätze aufweist, wurde Glycinamid als Standardpuffer verwendet.

Beim Vergleich der Umsätze der Substanzen **T2-5** ist zu erkennen, dass **T4** den höchsten Umsatz mit 40 -50 %, **T2** und **T3** einen Umsatz von ca. 10 % und **T5** keinen detektierbaren

Umsatz aufweist. Der Unterschied der verschiedenen Strukturen liegt vor allem in den elektronischen Eigenschaften der Verbindungen. Bei **T4** handelt es sich um ein sekundäres Amin mit einem elektronenreichen Aromaten, der in der Lage ist, Elektronendichte zum Tris-Motiv zu donieren. Bei **T2** und **T3** hingegen sind die elektronenreichen Aromaten über ein Amid gebunden, welche Elektronendichte aus dem Tris-Motiv entfernen. Bei **T5** handelt es sich um das Tris-Motiv, bei dem das Amin mit einem +M-Effekt durch eine Nitrogruppe mit einem -M-Effekt substituiert ist. Daraus kann geschlossen werden, dass eine höhere Elektronendichte am Tris-Motiv zu einem höheren Umsatz führt. Weiter ist zu erkennen, dass das Azid von **T2** im Vergleich zu **T3** keinen Einfluss auf den Umsatz zeigt. Ein Grund hierfür ist, dass weder die Ladung noch die potenzielle Toxizität des Azids einen Einfluss auf die Sialyltransferreaktion hat.

3.1.1.2 Bestimmung der Reaktionskinetik der enzymatischen Sialylierung

Neben der Pufferoptimierung wurde ebenfalls die Kinetik des Systems untersucht, um eine optimale Reaktionszeit für die Erstellung einer Substanzbibliothek von Tris-, Glycerin-, Ethylenglycol- und Polyol-Derivate oder einer möglichen Bulksynthese von nicht natürlichen Neu5Ac-Derivaten zu bestimmen. Hierfür werden analog zur Pufferoptimierung Derivate benötigt, mit denen ein Umsatz leicht nachvollzogen werden kann. Aus diesem Grund wurden **T3** und **T4** für die Kinetikstudien verwendet. Hierbei wurde auf **T2** verzichtet, da es in der Pufferoptimierung den gleichen Umsatz wie **T3** aufweist. Ebenso wurde einmal **T4** bei halber Konzentration vermessen. Der Grund hierfür ist, dass **T4** nur langsam bei Temperaturen von 70°C in derselben Konzentration wie die anderen Derivate gelöst werden konnte. Hierfür wurde neben der dafür vorgesehenen Menge an Wasser ebenfalls das Wasser verwendet, das bei allen anderen Reaktionen hinzugegeben wurde, um die gewünschte Konzentration einzustellen. So wurde für das Lösen von **T4** ein 4,5-faches Volumen im Vergleich zu den anderen Substraten verwendet. Es besteht die Möglichkeit, dass während der Reaktion ein Teil von **T4** wieder aus der Lösung ausfällt, da diese über 18 h bei 37 °C durchgeführt wird. Um zu überprüfen, ob durch das potenzielle Ausfallen von **T4** aus der Lösung ein Fehler entsteht und eine Verfälschung des Umsatzes erfolgt, wurde eine Umsatzbestimmung mit einer halb konzentrierten Substratlösung von **T4** durchgeführt. Es ist nicht anzunehmen, dass das sialylierte Produkt **T4S** aus der Lösung ausfällt, da die Substrate durch die Einführung der Neu5Ac hydrophiler werden, was auch aus den RP-HPLC-Spektren in Abbildung 16 aufgrund der geringeren Retentionszeit zu entnehmen ist.

Für die kinetischen Messungen wurde über 72 h zu verschiedenen Zeitpunkten Proben aus der Reaktionslösung entnommen. Der Umsatz wurde mittels RP-HPLC-MS(ESI) bestimmt. Die erhaltenen Datenpunkte wurden mit einem logarithmischen Fit aufgetragen. Beim Betrachten von Abbildung 19 ist zu erkennen, dass sowohl die Messungen für **T4** und **T3** sich asymptotisch einem maximalen Wert annähert. Für **T3** konnte ein maximaler Umsatz von

11,3 % \pm 1,9 und für **T4** konnte ein Umsatz von 43,3 % \pm 3,8 bzw. 53,8 % \pm 5,5 für den Ansatz mit dem halbkonzentrierten Substrat berechnet werden. Ebenfalls wurden die Zeiten berechnet, bei denen ein Umsatz von 70 % und 90 % des maximalen Umsatzes erreicht wurden. Außerdem wurde der Umsatz nach 18 h sowie der prozentuale Umsatz des maximalen Umsatzes berechnet (Tabelle 3). Beim Vergleich von **T4** zu **T3** ist zu erkennen, dass der Umsatz von **T3** langsamer verläuft als von **T4**. **T3** erreicht nach 18 h 53 % der Maximalumsatzes und nach 30 h erreicht wird 70 % des Maximalumsatzes erreicht. **T4** erreicht nach 18 h einen Umsatz von 74% und bereits nach 14,5 h wird ein Umsatz von 70 % erreicht. Der gleiche Trend ist auch für **T4** bei halber Konzentration zu erkennen.

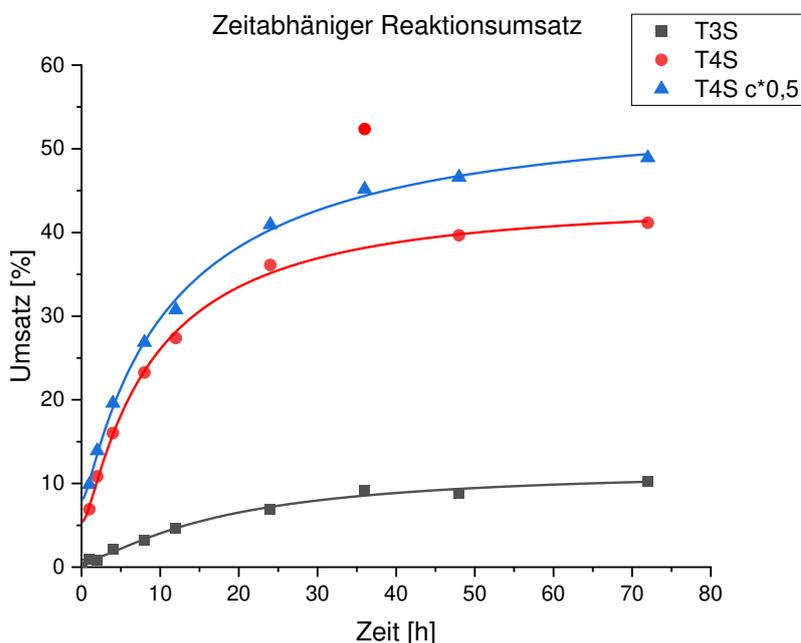


Abbildung 19 Grafische Darstellung des zeitabhängigen Reaktionsumsatzes der enzymatischen Reaktionskinetik von **T3** und **T4** über 72h. Die Umsätze wurden mittels RP-HPLC-MS(ESI) (linearer Gradient von 5-95 vol.% MeCN in H₂O in 30 min bei 25 °C) bestimmt.

Der berechnete maximale Umsatz von **T3** ist höher als der von **T4**. Hierfür sind wahrscheinlich die unterschiedlichen elektronischen Eigenschaften von Aminen und Amiden verantwortlich. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass elektronenärmere Derivate schlechter von der PmST1 erkannt werden können, wodurch sowohl ein geringer Umsatz als auch ein geringerer maximaler Umsatz resultiert.

Tabelle 3 Berechnung des maximalen theoretischen Umsatzes mittels logarithmischen Fit (Abbildung 85) für die Sialylierung von **T3** und **T4**. Bestimmung des Umsatzes nach 18h sowie an welchem Zeitpunkt 70% und 90% des maximalen Umsatzes erreicht sind.

	Berechneter max. Umsatz	90% Umsatz	70% Umsatz	Umsatz nach 18 h (Anteil des max. Umsatz)
T4	43,3 ± 3,8	40 h	14,5 h	32% (74%)
T4 c=5,5mM	53,8 ± 5,5	64 h	19 h	37% (69%)
T3	11,3 ± 1,9	62 h	30 h	6% (53%)

Bei Vergleich des berechneten maximalen Umsatzes von **T4** mit der **T4**_{c=5,5mM} ist zu erkennen, dass für **T4**_{c=5,5mM} der maximale Umsatz höher ist. Anhand der Umsätze nach 18 h sowie den berechneten Zeitpunkten für Umsätzen von 70 % und 90 % ist zu erkennen, dass für **T4**_{c=5,5mM} längere Reaktionszeiten benötigt werden, um den gleichen prozentualen Umsatz zu erzielen. Der höhere maximale Umsatz könnte damit erklärt werden, dass aufgrund der geringeren Konzentration von **T4** im Verhältnis doppelt so viel ATP und somit auch das *in situ* enzymatisch hergestellte CMP-Neu5Ac vorhanden ist. Die erhöhte Menge an CMP-Neu5Ac begünstigt somit eine Sialylierung mittels der PmST1. Ein weiterer Faktor, der berücksichtigt werden muss, ist dadurch, dass bei geringeren Reaktionszeiten bereits höhere Umsätze erreicht wurden, der Einfluss des thermischen und hydrolytischen Zerfalls von CTP, CMP-Neu5Ac und Neu5Ac reduziert wird. Dadurch steht effektiv mehr CMP-Neu5Ac für die Sialylierung durch die PMST1 zur Verfügung, wodurch eine höhere prozentuale maximale Ausbeute erzielt werden kann.

Darüber hinaus stellt sich die Frage, warum die PmST1 überhaupt in der Lage ist, das Tris-Motiv zu Sialylieren, da enzymatische Reaktionen nur an spezifischen Mustern durchgeführt werden. Bei genauerem Vergleich der chemischen Strukturen des Tris-Motives mit einem Zuckermotiv ist vor allem die strukturelle Ähnlichkeit des Polyolmotives vergleichbar. Dadurch ähnelt das Tris-Motiv mit seinen drei Hydroxygruppen, die über einen Isobutylkern gebunden sind, einem Teil eines Zuckerbausteins. Die Substratspezifität von bakteriellen Enzymen wie der PmST1 ist geringer als bei humanen Enzymen. Diese führt im Fall der PmST1 dazu, dass nicht das ganze Bindungsmotiv der Galaktose für eine Sialylierung erforderlich ist. Daraufhin stellt sich die Frage, welche Bindungsmotive grundsätzlich erkannt und sialyliert werden können. Hierfür wurden verschiedene Stoffklassen mit unterschiedlichen elektronischen Eigenschaften und räumlicher Orientierung untersucht.

3.1.1.3 Substratbibliothek

Das System aus NmCSS und PmST1 wurde daraufhin einem Screening unterzogen, da dieses System das Potential besitzt, neuartige Neu5Ac-Derivate einfach synthetisch herzustellen. Hierbei liegt der Fokus besonders darauf, nicht-glykanbasierte Neu5Ac-Derivate auf Basis von natürlichen und nicht natürlichen Substraten herzustellen. Da das natürliche Bindungsmotiv die Galaktose ist und bereits gezeigt werden konnte, dass das Tris-Motiv ebenfalls sialyliert werden kann, wurden weitere Substanzklassen gesucht, welche den beiden Motiven ähneln. Da besonders das Polyolmotiv die größte Ähnlichkeit zwischen dem Tris-Motiv und der Galaktose aufweist, wurde der Fokus auf diese vier verschiedenen Substanzklassen gelegt: Tris, Glycerin, (Poly)Ethylenglycol ((P)EG) und Polyol (Abbildung 20). Hierbei wurden vor allem kommerziell erhältliche Substrate priorisiert. Dadurch ist einerseits ein leichter und schneller Zugang zu verschiedenen Motivmustern mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen möglich und andererseits können bereits etablierte Substanzen, die für andere Synthesen und Prozesse verwendet werden, auf eine mögliche Sialylierung untersucht werden. Neben den kommerziell erhältlichen Substanzen wurden ebenfalls bereits von *P. Konietzny* und *M. Schmitter* synthetisierte Tris-Derivate (**T2**, **T9**, **T10**, **T11**, **T12**) untersucht.

Klassen	Substrate
Tris	
Glycerine	
(P)EG	
Polyol	

Abbildung 20 Abbildung der Substrate aus den vier Substratklassen (Tris, Glycerin, (P)EG, Polyol).

Die Sialylierung der verschiedenen Substratklassen wurde analog zur Kinetik- und Pufferbestimmung durchgeführt. Hierbei wurde aufgrund der zuvor durchgeführten Puffer-Umsatz-Studien ein Fokus auf Glycinamid und Bicin gelegt. Für ausgewählte Substrate wurden ebenfalls Sialylierungen in HEPBS und CHES durchgeführt, da sich beim Test verschiedener Puffersysteme gezeigt hatte, dass der Sialylierungsgrad der Substrate bei verschiedenen Puffersystemen variiert.

Tabelle 4 Graphische Darstellung der erfolgreichen Synthese der verschiedenen gescreenten Substrate. (Grün = Sialyliertes Produkt konnte eindeutig nachgewiesen werden; Grau = Überlagerung der Produktsignales mit anderen in der Reaktionslösung vorhandenen Substraten, rot = Das sialylierte Produkt konnten nicht nachgewiesen werden; schwarz = nicht vermessen). Die Umsätze wurden mittels RP-HPLC-MS(ESI) (linearer Gradient von 5-95 vol.% MeCN in H₂O in 30 min bei 25 °C) oder MS(ESI) bestimmt

Tris	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
Bicin	Grün	Grün	Grün	Grün	Rot	Grau	Grün	Grün	Grau	Grün	Grün	Grau
Glycinamid	Grün	Grün	Grün	Grün	Rot	Grün	Grün	Grün	Grau	Grün	Grau	Grün
HEPBS	Grün	Grün	Grün	Grün	Rot	Schwarz	Schwarz	Grün	Rot	Rot	Rot	Rot
CHES	Grün	Grün	Grün	Grün	Rot	Schwarz	Schwarz	Grün	Schwarz	Schwarz	Schwarz	Schwarz
Glycerin	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9			
Bicin	Grün	Grau	Rot	Grau	Grau	Grün	Grün	Grün	Rot			
Glycinamid	Grün	Grün	Grün	Grün	Grau	Grün	Grün	Grün	Rot			
HEPBS	Grün	Schwarz	Schwarz	Schwarz	Schwarz	Schwarz	Schwarz	Rot	Rot			
CHES	Schwarz	Rot	Schwarz									
Ethylenglycol	EG1	EG2	EG3	EG4	EG5	EG6	EG7	PEG				
Bicin	Grün	Grau	Rot	Rot	Rot	Rot	Rot	Schwarz				
Glycinamid	Grün	Grau	Rot	Grau	Grün	Rot	Grün	Grau				
HEPBS	Grün	Schwarz	Schwarz	Schwarz	Grün	Schwarz	Schwarz	Schwarz				
CHES	Schwarz	Schwarz	Schwarz	Schwarz	Rot	Schwarz	Schwarz	Schwarz				
Polyol	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8				
Bicin	Grün	Grün	Grün	Rot	Grau	Rot	Schwarz	Schwarz				
Glycinamid	Grün	Grün	Grün	Grün	Grau	Rot	Grün	Grün				
HEPBS	Rot	Grün	Schwarz	Schwarz	Schwarz	Rot	Schwarz	Schwarz				
CHES	Schwarz	Rot	Schwarz	Schwarz	Schwarz	Schwarz	Schwarz	Schwarz				

In Tabelle 4 sind die Ergebnisse der RP-HPLC-MS(ESI) der einzelnen Substrate in den verschiedenen Puffern abgebildet. Aufgrund der hohen Hydrophilie der Substrate und der durch die Neu5Ac eingefügten positiven Ladung weisen fast alle Neu5Ac-Substrat-Konjugate sehr hohe Polarität auf. Das führt dazu, dass eine Trennung mittels RP-HPLC-Methoden nur für Substrate mit einem hohen hydrophoben Anteil möglich ist, da der hydrophobe Anteil dafür sorgt, dass die Substrate nicht im Injektionspeak eluieren. Dieser hydrophobe Anteil ist lediglich für die Substrate **T2-4** groß genug, um eine detektierbare Trennung zu erhalten. Von allen anderen Substraten konnte mittels ESI-MS nur die Aussage getroffen werden, ob ein Substrat sialyliert werden kann. Dadurch konnte keine Aussage über den prozentualen Umsatz gegeben werden. Substrate die erfolgreich sialyliert werden konnten sind in grün markiert. Für alle anderen Substrate konnte entweder das sialylierte Produkt nicht nachgewiesen werden (rot) oder es konnte durch Überlagerung der zu erwartenden Massesignale für die sialylierten Produkte mit anderen in der Reaktionslösungen vorhandenen Substanzen wie z.B. der Puffer oder die Neu5Ac, keine eindeutige Aussage getroffen werden, ob es sich hierbei um eine in der Reaktionslösung vorhandene Substanz oder ein Produktsignal (grau) handelt. Erschwerend dazu haben Puffer oft die Eigenschaft mit mehrwertigen Ionen Addukte einzugehen. Diese Addukte sind mittels MS-Methoden wie der

ESI-MS nachweisbar, wobei Addukte aus mehreren Puffermolekülen und mehreren Ionen in beliebigen Kombinationen entstehen können.

Beim Vergleich der vier Puffer in Bezug auf deren Möglichkeit ein breites Spektrum an verschiedenen Substraten enzymatisch zu Sialylieren ist der gleiche Trend wie bei der Umsatzbestimmung in den verschiedenen Puffern zu erkennen (Tabelle 2). Hierbei ist ebenfalls CHES der schlechteste Puffer, da selbst von den partiell ausgewählten Substraten (**T1, T2, T3, T4, T5, T8, G8, EG5, P2**) vier Substrate nicht sialyliert werden konnten (**T5, G8, EG5, P2**). Von diesen konnte lediglich **T5** in keinem der anderen Puffersystemen sialyliert werden, wohin gegen eine Sialylierung von (**G8, EG5, P2**) in anderen Puffern möglich ist. Für die Sialylierung in HEPBS konnte gezeigt werden, dass von den ausgewählten Substraten (**T1, T2, T3, T4, T5, T8, T9, T10, T11, T12, G1, G8, G9, EG1, EG5, P1, P2, P6**) keine Sialylierung von den Substraten **T5, T9, T10, T11, G8, G9, P1** und **P6** nachgewiesen werden konnte. Beim Vergleich der in HEPBS und CHES durchgeführten Reaktionen, ist zu erkennen, dass **EG5** und **P2** in HEPBS sialyliert werden konnten. Die anderen Substrate, die in HEPBS nicht sialyliert werden konnten, wurden in CHES nicht vermessen. In Bicin und Glycinamid wurden alle Substrate mit Ausnahme von **PEG, P7** und **P8** in Bicin auf eine Sialylierung getestet. Von den 34 getesteten Substraten in Bicin konnte für 16 eine Sialylierung nachgewiesen werden (**T1, T2, T3, T4, T7, T8, T10, T11, G1, G6, G7, G8, EG1, P1, P2, P3**). Für acht der Substrate konnte der Umsatz nicht eindeutig nachgewiesen werden (**T6, T9, T12, G2, G4, G5, EG2, P5**) und für zehn Substrate konnte kein sialyliertes Substrat nachgewiesen werden (**T5, G3, G9, EG3, EG4, EG5, EG6, EG7, P4, P6**). In Glycinamid konnten für von den 37 getesteten Substrate für 25 eine Sialylierung (**T1, T2, T3, T4, T6, T7, T8, T10, T12, G1, G2, G3, G4, G6, G7, G8, EG1, EG5, EG7, P1, P2, P3, P4, P7, P8**), für neun keine eindeutige Sialylierung (**T9, T11, G5, EG2, EG4, PEG, P5**) und für fünf keine Sialylierung (**T5, G9, EG3, EG6, P6**) nachgewiesen werden. Anhand dieser Ergebnisse ist es eindeutig, dass Glycinamid für ein Screening das beste Puffersystem ist, da die wenigsten Substrate nicht sialyliert werden oder kein eindeutiges Ergebnis bestimmt werden konnte. Dennoch ist es sinnvoll in Glycinamid getestete Sialylierungen auch in anderen Puffersystemen zu überprüfen, so konnte beispielsweise für **T11** keine eindeutige Sialylierung in Glycinamid nachgewiesen werden, allerdings war dieser Nachweis in Bicin möglich. Ein weiterer wesentlicher Vorteil von Glycinamid ist, dass durch mehrwertige Ionen nahezu keine Puffer-Salz-Addukte ausgebildet werden. Das führt dazu, dass die Auswertung der Analytik erleichtert wird. Insbesondere ist dadurch die Aussage über eine Sialylierung leichter, da die Wahrscheinlichkeit der Überlagerung von Puffer-Salz-Addukt-Signalen mit Produktsignalen erheblich verringert wird.

Im Folgenden werden die Substrate der einzelnen Substratklassen miteinander in Bezug auf ihre funktionellen Gruppen und deren elektronischen und sterischen Eigenschaften miteinander verglichen.

Tris-Motiv-Substrate

Die Tris-Motiv-Substrate haben von den vier vermessenen Stoffklassen die meisten verschiedenen funktionellen Gruppen. Hierbei kann grundsätzlich in zwei unterschiedlichen Funktionalisierungsarten unterschieden werden. Bei der einen Funktionalisierungsart wurde das Amin des Tris-Motives weiter funktionalisiert. Hierbei wurden die Reste entweder als sekundäres Amin (**T4**, **T8**, **T12**) oder als Amid (**T2**, **T3**, **T7**, **T10**, **T11**) an das Tris-Motiv angebracht. Bei der anderen Funktionalisierungsart wurde das Amin des Tris-Motives substituiert. Das Amin wurde durch eine Nitrogruppe (**T5**), Methylrest (**T6**) oder ein Azid (**T9**) ersetzt.

Unter Berücksichtigung aller Puffersysteme konnte in mindestens einem Puffer für alle Tris-Motiv-Substrate mit Ausnahme von **T5** und **T9** eine Sialylierung der verschiedenen Motive nachgewiesen werden. Da alle Tris-Substrate, deren Funktionalisierung am Amin angebracht wurden, sialyliert werden konnten, ist anzunehmen, dass das Amin auf verschiedenste Arten funktionalisiert werden kann und gleichzeitig weiterhin sialyliert werden kann. Der einzige signifikante Unterschied ist der bereits in Kapitel 3.1.1.1 bestimmte Umsatz. So zeigte **T4**, das über ein sekundäres Amin funktionalisiert ist, einen signifikant höheren Umsatz als **T2** und **T3**, die über ein Amid funktionalisiert sind.

Von den Substraten, bei denen das Amin substituiert wurde, konnte lediglich **T6** sialyliert werden. **T6** unterscheidet sich im Wesentlichen durch den +I-Effekt und das Nichtvorhandensein eines zwitterionischen Charakters durch das Azid oder die Nitrogruppe. Es ist davon auszugehen, dass ein starker -I-Effekt und ein zwitterionischer Charakter eine Sialylierung einschränkt. Allerdings konnte gezeigt werden, dass für eine Sialylierung das Amin des Tris-Motives nicht essenziell ist. Deshalb wurden ähnliche Triolmotive gesucht. Das Ähnlichste in der Natur vorkommende Derivat ist Glycerin. Hierbei ist der Grundkörper vom Tris und Glycerin bis auf die mittlere Hydroxygruppe identisch. An der mittleren Hydroxygruppe ist ein Kohlenstoff weniger vorhanden, wodurch diese Hydroxygruppe kein primärer, sondern ein sekundärer Alkohol ist.

Glycerinsubstrate

Analog zu den verschiedenen Tris-Derivaten gibt es eine Vielzahl an Glycerin-Derivate mit unterschiedlichen Substitutionsmustern. Bei den Glycerin-Derivaten wurde ein Fokus auf den Einfluss von Alkoholen, Aminen, Halogenen und Alkylketten gelegt. Für die Substrate **G2-5** sind einzelne Alkohole durch Amine substituiert. Bei den restlichen Glycerin-basierten Substraten ist jeweils ein Alkohol modifiziert. Die Modifikationen sind eine Substitution mit Chlor (**G6**), eine Funktionalisierung mit einem Propargylrest (**G7**) oder die Eliminierung der Hydroxygruppe (**G8**). Bei den Substraten **G3** und **G9** sind Methylreste an das Grundgerüst angefügt.

In Glycinamid konnte für alle Glycerin-basierten Substrate mit Ausnahme von **G5** und **G9** eine Sialylierung nachgewiesen werden. Die Sialylierung von **G5** konnte aufgrund von Überlagerungen in der MS(ESI) nicht eindeutig bestimmt werden. Analog zu der Sialylierung der Tris-Substrate konnten bei der Reaktion in Bicin weniger sialylierte Glycerin-basierte Substrate (**G1**, **G6**, **G7**, **G8**) eindeutig nachgewiesen werden. Außerdem konnte für **G2**, **G4** und **G5** für **G3** und **G9** eine Sialylierung nicht eindeutig nachgewiesen werden, sodass auch für Glycerin-basierte Substrate Glycinamid das breiter anwendbare Puffersystem ist. Dass die Sialylierung von **G9** in keinem der Puffersysteme erfolgreich durchgeführt werden konnte ist ein unerwartetes Ergebnis, da eine Vielzahl der anderen vermessenen Glycerin-basierter Substrate ebenfalls nur zwei Hydroxygruppen haben und dennoch sialyliert werden konnten. Des Weiteren hat **G9** keine funktionelle Gruppe wie ein Azid oder eine Nitrogruppe, die analog zur Sialylierung der Tris-Substrate eine Sialylierung inhibieren können. Allerdings ist es eines der beiden vermessenen Motive (**G9**, **P5**), die keine primäre Hydroxygruppe, sondern nur sekundäre Hydroxygruppen besitzen. Da auch beim natürlichen Galaktosemotiv eine primäre Hydroxygruppe vorhanden ist, könnte das ein Indiz dafür sein, dass mindestens ein primärer Alkohol für eine Sialylierung vorhanden sein muss. Da **G5** nur eine Hydroxygruppe besitzt, ist es nicht unerwartet, dass in keinem der Puffersysteme eine Sialylierung nachgewiesen werden konnte, insbesondere da das natürliche Galaktosemotiv fünf Hydroxygruppen besitzt.

Es konnte gezeigt werden, dass Substrate mit nur zwei Hydroxygruppen sialyliert werden können. Die nächstkleinere Stoffklasse mit zwei Hydroxygruppen, die auf die enzymatische Sialylierung untersucht werden kann sind Ethylenglycol-Derivate.

Ethylenglycolsubstrate

Ethylenglycole sind mit verschiedenen Heteroatomen und Wiederholungseinheiten erhältlich. Durch diese Variation ist es möglich einerseits die Anzahl der nötigen Hydroxygruppen und andererseits deren maximaler Abstand zueinander für eine erfolgreiche Sialylierung zu untersuchen. Hierbei können die verschiedenen Ethylenglycol-Substrate in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die erste Gruppe besteht aus Ethylenglycol-Derivaten bei denen eine der beiden Hydroxygruppen durch ein Alkin (**EG2**), ein Amin (**EG3**) oder ein Thiol (**EG4**) ausgetauscht wurden. Bei der zweiten Gruppe handelt es sich um Ethylenglycol-Derivate mit zwei oder mehr Wiederholungseinheiten (**EG5-7**, **PEG**).

Beim Vergleich der Ethylenglycol-Substrate mit den Tris- und Glycerin-Substraten konnten weniger Substrate (**EG1**, **EG5**, **EG7**) sialyliert werden. Hierbei ist zu erkennen, dass nur Ethylenglycol-basierte Substrate erfolgreich sialyliert werden konnten, welche mindestens zwei primäre Hydroxygruppen tragen. Der Abstand, der zwischen den Hydroxygruppen maximal vorhanden sein darf, wurde durch die Substrate EG5 und EG6 bestimmt. Da **EG5** sialyliert allerdings **EG6** nicht mehr erfolgreich sialyliert werden konnte, dürfen die

Hydroxygruppen über sechs Bindungen voneinander getrennt sein. Bei **EG6** sind zwischen den beiden Hydroxygruppen durch neun Bindungen voneinander getrennt. Da keine Substrate mit Abständen von sieben oder acht Bindungen vermessen wurden ist es ebenfalls möglich das eine Sialylierung über diese Distanzen möglich ist. Der Einbau von Heteroatomen in die Kette zwischen den Hydroxygruppen (**EG7**), scheint eine Sialylierung nicht zu inhibieren. Dadurch, dass keines der Substrate (**EG2-4**) mit nur einer Hydroxygruppe sialyliert werden konnte, ist davon auszugehen, dass mindestens zwei Hydroxygruppen für eine Sialylierung erforderlich sind.

Die Sialylierung der PEG 200-10kD konnten nicht eindeutig bestimmt werden. Das kommt vor allem dadurch, dass kommerzielles PEG nicht monodispers ist. Durch die breite Massenverteilung überlagern die verschiedenen Kettenlängen des PEGs mit möglichen sialylierten Massen.

Polyolsubstrate

Neben den in den anderen Klassen vermessenen Polyolen sind weitere Polyole kommerziell erhältlich, die strukturelle Ähnlichkeiten zu den bereits vermessenen Substraten haben. Da sowohl lineare als auch verzweigte Substrate sialyliert werden konnten, wurden weitere Polyolderivate mit zwei bis fünf Hydroxygruppen auf eine mögliche Sialylierung untersucht. Hierbei wurden unter anderem **P7** und **P8** aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zur Galaktose untersucht. Sowohl für **P7** als auch **P8** konnte eine Sialylierung nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ist nicht unerwartet, da beide Substrate nahezu identisch zur Galaktose sind. Außerdem wurde die Synthese mit PmST1 P34H M144L durchgeführt, welche eine α -2-6 Bindung knüpft. Dadurch, dass die Modifikation des Galaktosemotives am C2 der Galaktose ist, kann die Sialylierung des C6 ungehindert stattfinden.

Neben **P7** und **P8** wurden natürliche und nicht natürliche Polyole untersucht. Die natürlichen Süßstoffe Xylit (**P2**) und Erythrit (**P3**) haben fünf bzw. vier Hydroxygruppen. Zu den untersuchten synthetischen Polyolen gehören *trans*-2,5-Bis(hydroxymethyl)-1,4-dioxane-2,5-diol (**P4**|4 OH), Dithiothreitol (**P5**|2 OH, 2 SH), Pentaerythrit (**P1**|4 OH) sowie Tris(hydroxymethyl)phosphin (**P6**|3 OH).

Lediglich für **P5** und **P6** konnte eine Sialylierung nicht eindeutig nachgewiesen werden. Bei **P5** handelt es sich um Dithiothreitol (DTT). Es kann verwendet werden, um Proteine in ihrer funktionalen Form zu konservieren, indem es die Ausbildung von Disulfidbrücken durch die reduktiven Eigenschaften verhindert. Allerdings können auch Disulfidbrücken gespalten werden, die für die Faltung der Proteine verantwortlich sind, wodurch sie ihre enzymatische Aktivität verlieren. Durch diese Eigenschaften kann es sein, dass eines der Enzyme inaktiviert wird und eine Sialylierung nicht mehr möglich ist. Es besteht auch die Möglichkeit, dass die NmCSS und PmST1 nicht in ihrer Funktion inhibiert werden, allerdings das sialylierte **P5** durch

die reduktiven Eigenschaften von **P5** wieder reduziert werden. Das würde dazu führen, dass kein sialyliertes **P5** nachgewiesen werden kann.

3.1.1.4 Sialylierung eines Bis-Tris-Substrates

Beim Betrachten aller Sialylierungen im Screening konnte für alle Substrate immer nur eine einfache Sialylierung nachgewiesen werden. Das entspricht der Sialylierung des natürlichen Galaktosemotives, das auch nur einfach sialyliert wird. Da es sowohl bei Substraten mit regiochemischen Informationen wie Galaktose oder Galaktosamin als auch symmetrischen Derivaten wie dem Tris-Motiv nur zu einer einfachen Sialylierung kommt, ist anzunehmen, dass die PmST1 die Neu5Ac an den Substraten erkennt und keine weitere Sialylierung erfolgt. Hierfür können sterische oder elektronische Effekte, die durch negative Ladung der Carbonsäure am C2 der Neu5Ac induziert werden, für die Erkennung eines sialylierten Derivates verantwortlich sein.

Dennoch ist es in der Natur möglich, komplexe Glykanstrukturen enzymatisch zu sialylieren. Hierbei werden in der Regel Seitenketten der Glykane sialyliert. Eine Möglichkeit, die Verzweigung zu imitieren, ist, zwei Tris-Motive über eine Kohlenstoffkette zu verknüpfen. Hierfür wurde das kommerziell erhältliche Bis-Tris-Propan (**T6**) verwendet. Die beiden Tris-Motive sind durch einen Propyl linker voneinander getrennt. Dennoch konnte weiterhin nur die Sialylierung eines Tris-Motivs detektiert werden, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die PmST1 auch bei einem Abstand der Bindungsmotive über einen Propyl linker immer noch die Sialylierung detektieren kann und es somit zu keiner weiteren Sialylierung kommt.

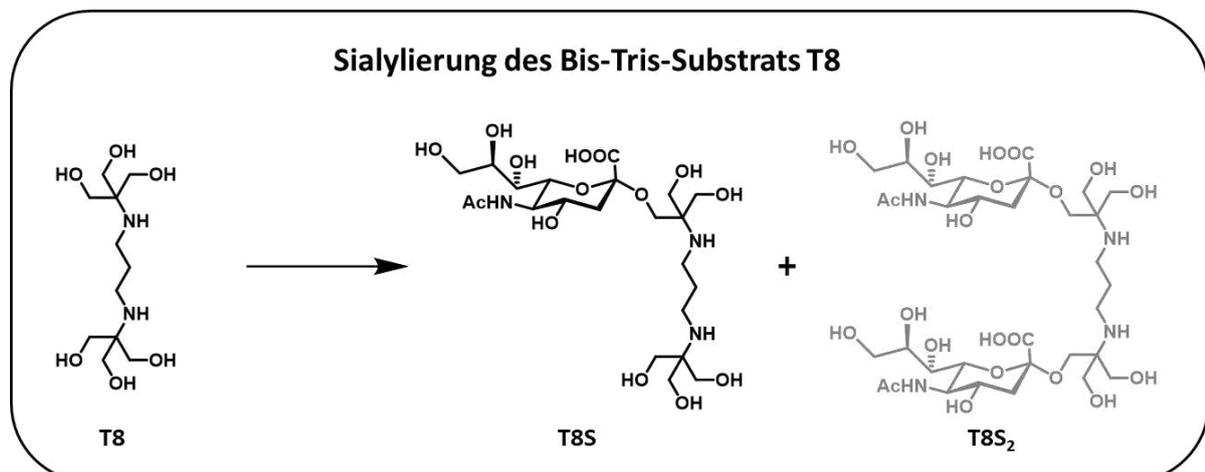


Abbildung 21 Enzymatische Sialylierung vom **T8**, welches zwei Tris-Motive besitzt. Hierbei wird lediglich das einfach sialylierte Produkt **T8S** (schwarz) und nicht das bisialylierte Produkt **T8S₂** (grau) gebildet.

3.1.1.5 Permethylierung

Die Analytik vieler der sialylierten Substrate ist aufgrund ihrer hohen Polarität mittels RP-HPLC-MS(ESI) nicht möglich. Eine weit verbreitete Methode zur Analyse von hoch polaren und geladenen Substanzen wie z.B. Glykanen ist die Permethylierung.^{132, 133} Diese ist eine

bewährte Methode zur genauen Analyse und Strukturaufklärung von komplexen Oligosacchariden. Bei der Permethylierung werden die freien polaren funktionellen Gruppen mit Methyljodid umgesetzt, um die Hydrophobizität durch die Reduzierung von Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen zu erhöhen. Durch die erhöhte Hydrophobizität ist es möglich, die permethylierten Strukturen mit einer RP-HPLC zu trennen. Die Permethylierung wurde nach einem Protokoll des „Complex Carbohydrate Research Center“ (CCRC) der Universität in Georgia durchgeführt. Die Enzyme müssen als aller erstes aus der Lösung entfernt werden, bevor die Probe gefriergetrocknet wird, da sonst der erhaltene Feststoff nicht in DMSO löslich ist. Zu der gelösten Probe werden Methyljodid und ein NaOH-DMSO-Gel hinzugegeben. Nachdem die Reaktion vollständig abgelaufen ist, wird die Reaktion mit Wasser abgebrochen. Das permethylierte Produkt kann mit DCM extrahiert werden. Nach dem Entfernen vom DCM durch einen Stickstoffstrom kann die Probe in einem Gemisch aus ACN/Wasser gelöst und analytisch untersucht werden.

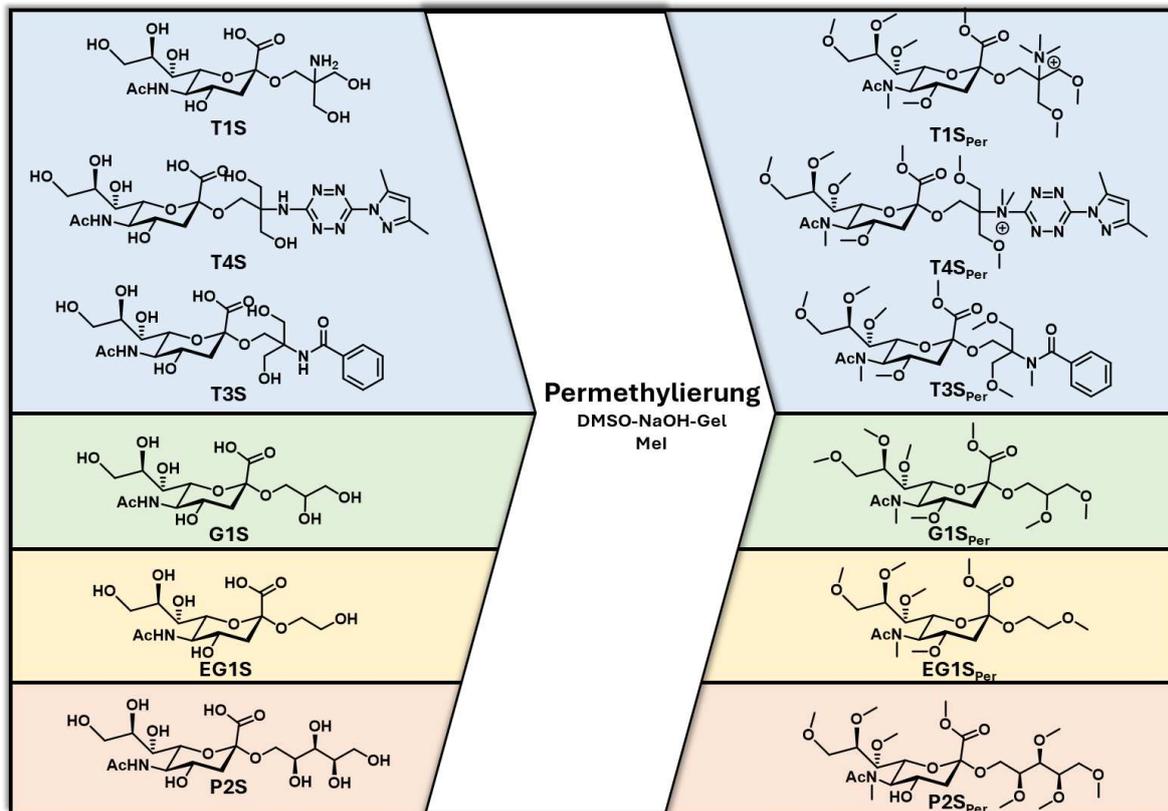


Abbildung 22 Reaktionsgleichung zur Permethylierung ausgewählter Tris-, Glycerin-, Ethylenglycol- und Polyol-Substraten.

Die Permethylierung wurde für sechs verschiedene Substrate (**T1**, **T4**, **T3**, **G1**, **EG1**, **P2**) durchgeführt (Abbildung 22). Bei den Substraten handelt es sich um drei Tris-basierte, ein Glycerin-basiertes, ein Ethylenglycol-basiertes und ein Polyol-basiertes Substrat. Für alle sechs Substrate konnte eine vollständig permethylierte Struktur mittels RP-HPLC-MS(ESI) detektiert werden. Durch die Permethylierung konnte das UV-Signal der Substrate aus dem

Injektionspeak zu späteren Retentionszeiten verschoben werden. Mit Hilfe der Permethylierung konnte ein weiterer Nachweis für die Synthese von neuartigen Neu5Ac funktionalisierten Nicht-Glykanen mittels der PmST1 nachgewiesen werden.

Die Permethylierung ist eine sehr gute Methode, um Strukturen nachzuweisen. Allerdings sind die Substrate durch die Permethylierung biologisch inaktiv und können auch nicht wieder in ihre nicht alkylierte Form überführt werden. Um dennoch die sialylierten Substrate zu isolieren, muss eine Methode verwendet werden, die unabhängig von Ladung und Polarität das Produkt von den restlichen Bestandteilen der Ein-Topf-Synthese trennt. Eine Möglichkeit, die Reaktionslösung zu trennen, ist, ein Säulenmaterial für sehr polare und geladene Substanzen zu verwenden. In der Regel handelt es sich hierbei um „Reverse Phase – Reverse Phase“ – Säulen (RP-RP-Säulen).

3.1.1.6 Trennung mittels einer HILIC-Säule

Bei einer „Hydrophilic interaction liquid chromatography“ (HILIC)–Säule handelt es sich um eine RP-RP-Säule. Hierbei sind die Kohlenstoffketten einer RP–Säule mit geladenen funktionellen Gruppen oder Polyolen funktionalisiert. Das führt zu einer erhöhten Wechselwirkung von polaren und geladenen Proben mit dem Säulenmaterial, wodurch eine Trennung erfolgen kann. Hierbei sind die anionischen, kationischen und hydrophilen Eigenschaften der zu trennenden Substanzen für die Wahl des Säulenmaterials ausschlaggebend. So ist die Diol-HILIC für gering kationische, leicht saure Substrate, die Polyethylenimin (PEI)-HILIC für saure, kationische und neutrale Substrate, die Urea-HILIC für wenig geladene Substrate und die Zwitterionische-HILIC für hydrophile und hydrophobe, wenig geladene Substrate geeignet. Aufgrund der kationischen und leicht sauren Eigenschaften der Sialinsäure-Derivate wurde sich für die Trennung mittels einer Diol-HILIC-Säule entschieden.¹³⁴

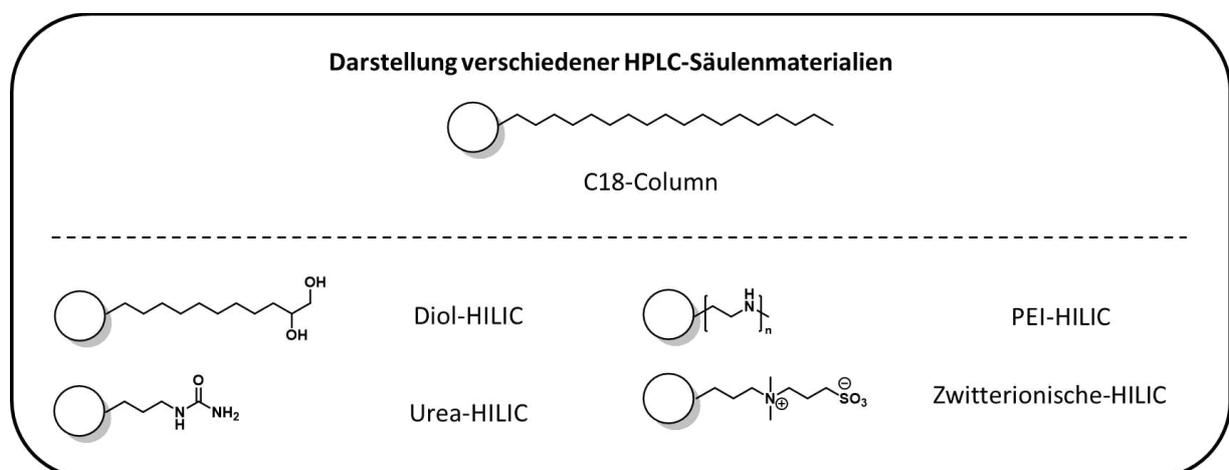


Abbildung 23 Schematische Darstellung verschiedener Säulenmaterialien zur Trennung von Substraten mit verschieden anionischen, kationischen und hydrophilen Eigenschaften.

Die Trennung über eine analytische Diol-HILIC-Säule wurde am Beispiel von **EG6** durchgeführt. Eine Trennung von **EG6** auf einer C18-Säule ist nicht möglich, da alle Bestandteile aus der Reaktionslösung im Injektionspeak eluiert werden. Das Chromatogramm der HILIC zeigt, dass die Probe nicht im Injektionspeak mitläuft, sondern es zu einer Auftrennung der Probe kommt. Die Trennung wurde über 30 min bei einem Lösungsmittelverhältnis von 81,5% ACN in Wasser durchgeführt. Bei diesen Bedingungen kann das Zielprodukt bei Retentionszeit von 13,2 min detektiert werden.

Dadurch, dass die Trennung von **EG8** auf der analytischen HILIC-Säule erfolgreich war, wurde versucht, unter den identischen Bedingungen eine Trennung auf einer präparativen Säule zu erreichen. Hierbei hat sich gezeigt, dass das **EG8** nicht isoliert werden konnte. Hierfür können zwei Gründe ausgemacht werden. Der erste Grund ist, dass die Stoffmenge von **EG8** im Vergleich zu den anderen Bestandteilen der Reaktionslösung, insbesondere im Vergleich zum Puffer, sehr gering ist. Dadurch kann es leicht zu einer Überlagerung von Signalen kommen. Der zweite Grund ist die Separation der Probe. Da in keiner der gesammelten Fraktionen **EG8** nachgewiesen, werden konnte ist anzunehmen, dass das **EG8** entweder auf der Säule oder im Anschluss bei der Entfernung des Lösungsmittels zerfällt.

Um die sialylierten Substrate dennoch zu isolieren, wurde eine weitere Methode gesucht, die eine Trennung nach Größe ermöglicht und gleichzeitig unabhängig von Ladung und Polarität ist.

3.1.1.7 Größenausschluss-Chromatographie GPC

Analog zur GPC für Polymere und Makromoleküle gibt es auch Harze, die in der Lage sind, niedermolekulare Substanzen zu trennen.¹³⁵ Für diese Art Größenausschluss-Chromatographie werden besondere Harze oder Gele benötigt, die eine sehr geringe Maschenbreite besitzen. Ein Beispiel hierfür ist das Biogel P2 von BIO-RAD, das eine fraktionierte Auftrennung von Substanzen mit einem Molekulargewicht zwischen 100 - 1800 $\frac{g}{mol}$ ermöglicht.¹³⁶ Durch die geringe Maschenbreite ist die Flussgeschwindigkeit bei Normaldruck sehr langsam und in etwa vergleichbar mit einem C18-Säulenmaterial. Die Trennung wurde an einer von *Sebastian Wilke* gebauten Apparatur durchgeführt. Der Vorteil daran ist, dass die Trennung auf einer selbst vorgepackten Säule mit konstantem Druck durchgeführt werden kann. Dadurch konnte die Trennleistung von 1 ml pro Stunde auf 0,75 ml pro 3 min erhöht werden.

Für die Trennung wurden dieselben Substrate (**T1**, **T4**, **T3**, **G1**, **P2**) wie für die Permethylierung verwendet. Die Enzyme müssen analog zur Permethylierung entfernt werden. Die restliche Lösung wurde lyophilisiert. Der erhaltene Feststoff wurde in 0,5 ml MQ-Wasser gelöst und auf die Säule aufgetragen. Die Neu5Ac funktionalisierten Substrate konnten erfolgreich von ihren unfunktionalisierten Derivaten abgetrennt werden. Die Trennung wird am Beispiel von **T4**

Die erhaltenen isolierten Neu5Ac-funktionalisierten Derivate können in zukünftigen Messungen auf ihre biologische Aktivität untersucht werden. Ebenso eröffnen sich durch die einfache enzymatische Sialylierung eine Vielzahl an weiteren biologisch oder medizinisch interessanten Derivaten.

3.1.2 Synthese von Tris-basierten Polymeren zur enzymatischen Sialylierung

Neben den hoch komplexen Neu5Ac-funktionalisierten Glykanen, ist Neu5Ac ebenfalls von Bedeutung im Bereich der Mucine. Mucine bestehen aus einem Proteinkern, an den lange Polysaccharide gebunden sind. Ebenso sind Mucine mit Neu5Ac und Sulfatgruppen funktionalisiert. Durch diese Funktionalisierung haben Mucine viele negative Ladungen. Die negativen Ladungen sowie die Vielzahl an Hydroxygruppen führen dazu, dass viel Wasser gebunden werden kann, wodurch die Mucine eine schleimartige Konsistenz haben. Durch diese Eigenschaften sind sie an einigen biologischen Prozessen beteiligt, wie die Inhibition der Aufnahme von Pathogenen. Aufgrund der medizinischen Eigenschaften wurde in der Literatur eine Vielzahl an Neu5Ac funktionalisierten Polymeren hergestellt. Mithilfe der enzymatischen Sialylierung des Enzymmpaares aus NmCSS und PmST1 besteht die Möglichkeit, Neu5Ac funktionalisierte Polymerstrukturen herzustellen, sofern ein Polyolmotiv vorhanden ist. Wie bereits im Screening gezeigt wurde, konnte das kommerziell erhältliche **T7** enzymatisch sialyliert werden. Aufgrund der Erkenntnisse aus der Umsatzbestimmung ist davon auszugehen, dass andere Monomere, die nicht auf Acrylamidbasis sind, einen höheren Sialylierungsgrad erreichen können. Aus diesem Grund wurde die Synthese von Acrylatmonomeren mit einem aliphatischen Spacer untersucht, um die positiven Eigenschaften von elektronendonierenden Systemen für einen hohen Sialylierungsgrad auszunutzen. Die Synthese der Monomere sowie der Copolymere wurde von dem Bachelorstudenten Raphael Neff unter meiner Aufsicht durchgeführt. Die enzymatische Sialylierung der Copolymere wurde von mir durchgeführt.

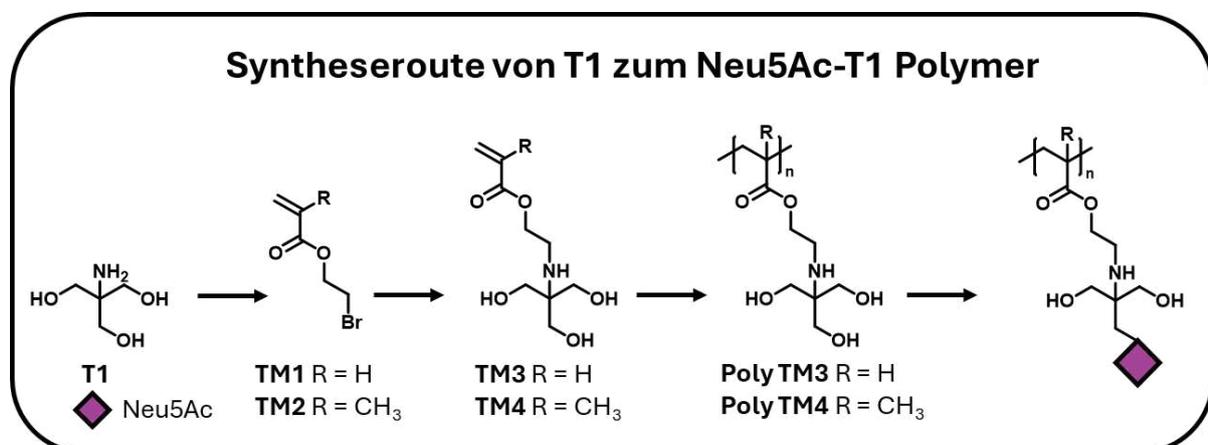


Abbildung 25 Syntheseroute eines enzymatisch sialylierten Tris-Polymers.

3.1.2.1 Tris-basierte Monomersynthesen

Für den ersten Ansatz wurde die Synthese der Acrylatmonomere in zwei Schritte aufgeteilt (Abbildung 25). Im ersten Schritt wurde Bromethanol mit Acryloylchlorid bzw. Methacryloylchlorid zu 2-Bromoethylacrylat (**TM1**) bzw. 2-Bromoethylmethacrylat (**TM2**) umgesetzt. **TM1** konnte mit einer Ausbeute von 70 % und **TM2** konnte mit einer Ausbeute von 80 % hergestellt werden. Die Proben wurden mittels $^1\text{H-NMR}$ auf ihre Reinheit untersucht. Hierbei ist zu erkennen, dass die Ethylprotonen H3 und H4 aufgrund der gleichen chemischen Umgebung bei beiden Monomeren bei einer Verschiebung von 4,5 ppm und 3,5 ppm in jeweils ein Triplet aufspalten. Durch die Methylgruppe des **TM2** spalten die Vinylprotonen der beiden Monomere unterschiedlich auf. Die Vinylprotonen von **TM2** können den Signalen bei einer Verschiebung von 5,6 ppm und 6,2 ppm und die drei H2 Protonen können dem Signal bei 1,95 ppm zugeordnet werden. Die Vinylprotonen von **TM1** können miteinander koppeln, wodurch es zu einer Aufspaltung der zwei H1 Protonen in jeweils ein Duplett bei einer Verschiebung von 5,9 ppm und 6,5 ppm und zur Ausbildung eines Triplets des H2 bei einer Verschiebung von 6,15 ppm, kommt. Bei Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren ist zu erkennen, dass **TM2** erheblich mehr verunreinigt ist als **TM1**.

Im zweiten Schritt soll Tris durch eine nukleophile Substitution eingeführt werden. Hierfür wurde **TM1** mit Tris für 22 h umgesetzt. Der erhaltene weiße Feststoff wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ und RP-HPLC-MS(ESI) untersucht.

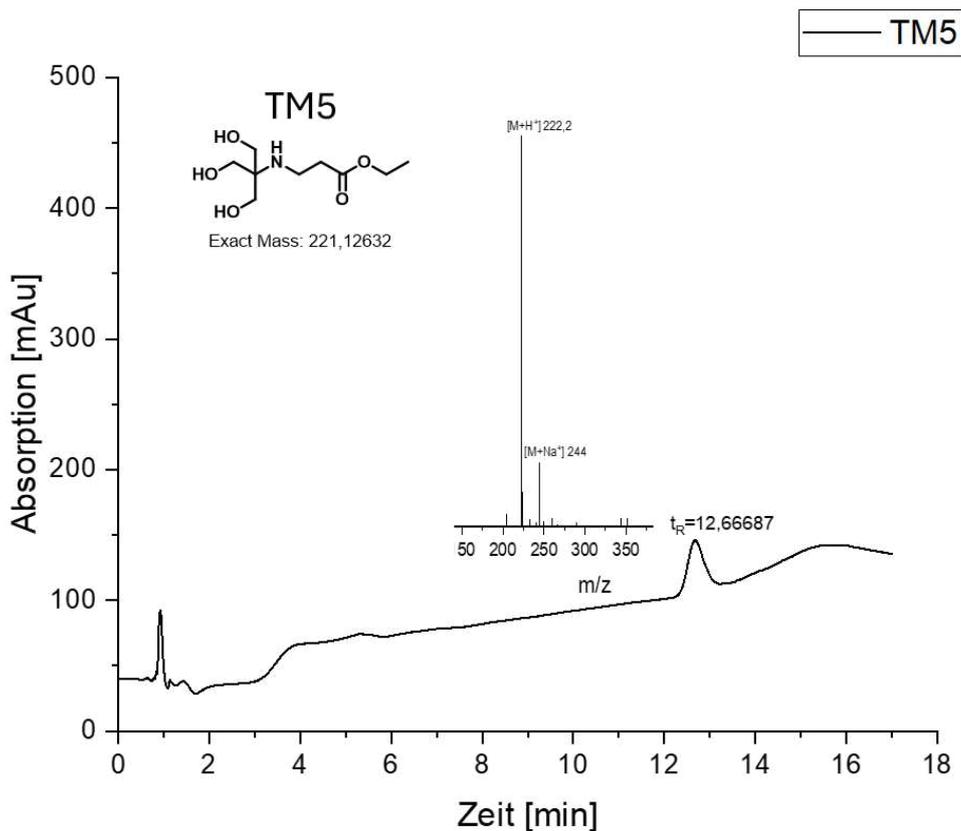


Abbildung 26 RP-HPLC-Chromatogramm und MS-Spektrum vom Aza-Micheal-Produkt **TM5** (linearer Gradient 5-95% Wasser/Acetonitril in 17 min bei 25°C).

In der RP-HPLC-MS(ESI) (Abbildung 26) konnte im UV-Lauf ein Signal bei 12,7 min detektiert werden. Im zugehörigen Massenspektrum ist allerdings nicht die erwartete Masse von $219,11 \frac{g}{mol}$, sondern $221,2 \frac{g}{mol}$, detektiert worden. Dadurch ist anzunehmen, dass nicht das gewünschte Produkt **TM3** gebildet worden ist. Eine genauere Strukturaufklärung ist mittels des 1H -NMR möglich.

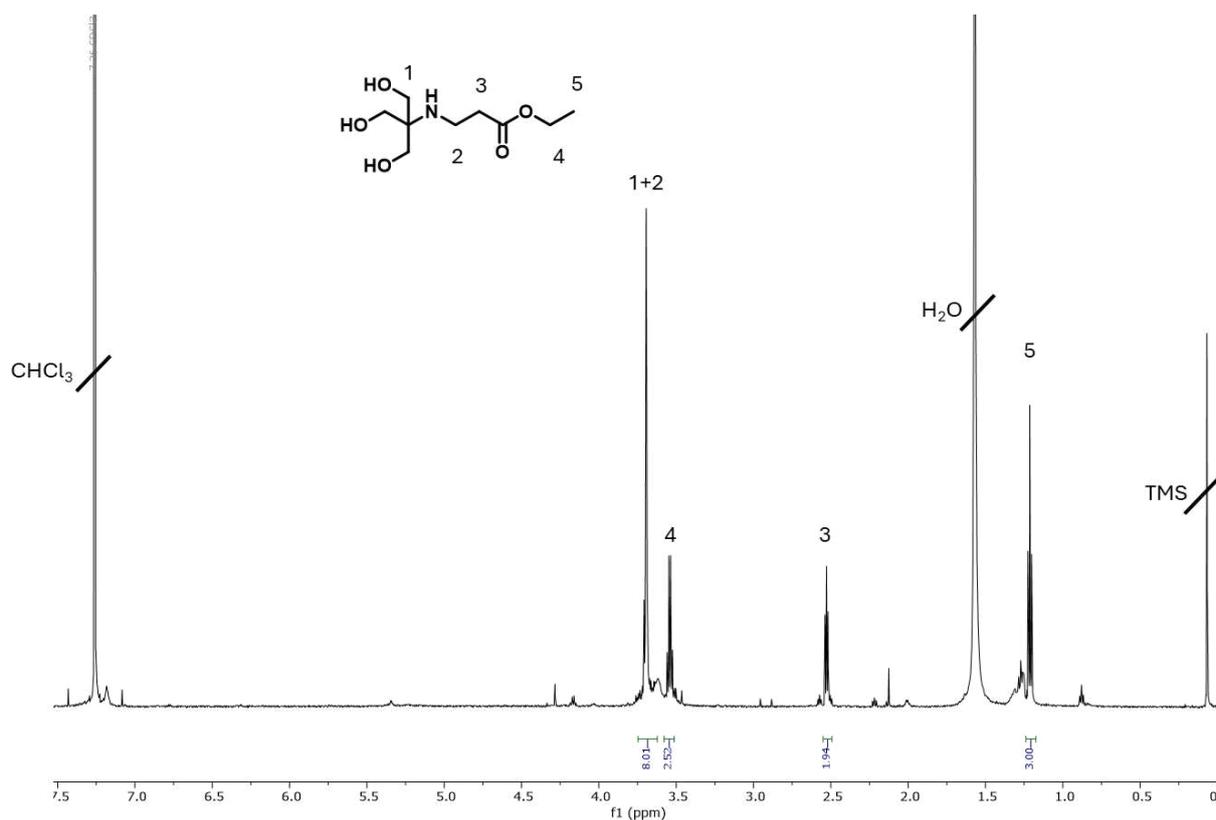


Abbildung 27 ¹H-NMR-Spektrum des Aza-Michael-Produkts **TM5** in CDCl₃ (MHz 600).

Beim Vergleich der ¹H-NMR Spektren **TM1** (Abbildung 53) und **TM5** (Abbildung 27) ist zu erkennen, dass nach der Umsetzung von **TM1** mit Tris die Vinylprotonen bei einer Verschiebung von 5,9 ppm - 6,5 ppm verschwunden sind. Es ist davon auszugehen, dass es nicht zu der nukleophilen Substitution des Broms gekommen ist, sondern zu einer Addition. Ebenso können sechs der acht Protonen bei einer Verschiebung von 3,65 ppm den Tris-Protonen zugeordnet werden. Es kann daraus geschlossen werden, dass es zu einer Reaktion von **TM1** mit Tris gekommen ist. Bei **TM1** handelt es sich um ein Michael-System. Dieses kann in Anwesenheit von Aminen eine Aza-Michael-Addition durchlaufen, wobei **TM5** ausgebildet werden würde. Zu dieser Hypothese passen ebenfalls die restlichen Signale im ¹H-NMR-Spektrum. So könnten das Triplet bei einer Verschiebung von 1,2 ppm (H5) und das Quartett bei einer Verschiebung 3,5 ppm (H4) dem Ethylester zugeordnet werden. Das Triplet bei einer Verschiebung von 2,5 ppm kann dem H3 zugeordnet werden, welches mit den sechs Tris Protonen H2 überlagert, wodurch die Summe von acht Protonen bei einer Verschiebung von 3,7 ppm zu erklären ist. Bei genauerem Betrachten dieses Signales ist ebenfalls die Überlagerung eines Singulets mit einem Triplet zu erkennen. Dadurch kann davon ausgegangen werden, dass ausschließlich das Aza-Michael-Produkt gebildet wurde. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde der Aufbau des Monomers in umgekehrter Reihenfolge erneut durchgeführt.

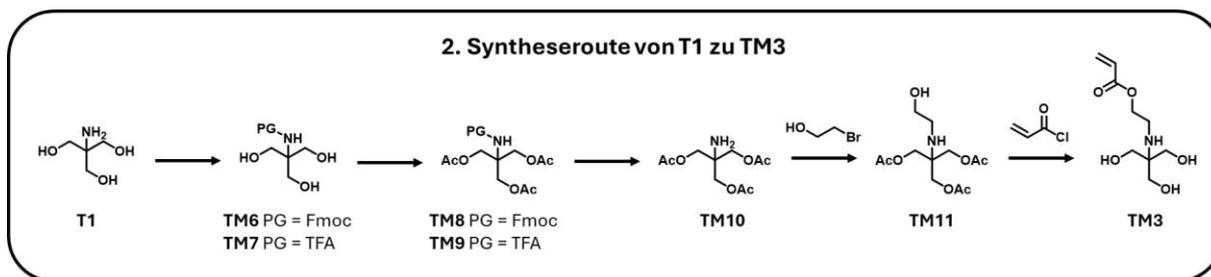


Abbildung 28 Neue Syntheseroute zur Synthese des Tris-Monomers **TM3**.

Bei diesem Syntheseweg soll die Aza-Michael-Addition durch die vorherige Umsetzung des freien Amins mit Bromethanol unterbunden werden. Die erfolgreiche Funktionalisierung des Alkohols mit Acryloylchlorid konnte bereits bei den Synthesen von **TM1** und **TM2** gezeigt werden. Das essenzielle Zwischenprodukt für die Synthese ist **TM11**. Hierbei wurde sich für eine Acetylschutzgruppenstrategie für die Alkohole entschieden, da sie unter milden Bedingungen wieder abgespalten werden können, ohne dass es zu einer Reduktion der Vinylprotonen kommt. Für die Synthese von **TM11** wurden zwei unterschiedliche Methoden untersucht.

Der erste Syntheseschritt erfolgte mittels einer Fmoc-Schutzgruppenstrategie, da aufgrund der erhöhten Reaktivität des Amins sowie die Orthogonalität der Schutzgruppe eine selektive Schützung erfolgen kann. **TM6** konnte als flockiger, weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 40 % erhalten werden. Die Reinheit wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ untersucht (Abbildung 55). Im zweiten Schritt wurden die freien Hydroxygruppen mit Essigsäureanhydrid geschützt. Das Produkt **TM8** konnte mit einer Ausbeute von 92 % erhalten werden. Die Reinheit wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ untersucht (Abbildung 57). Im letzten Schritt wird die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten, um das freie Amin zu erhalten. Das Amin kann im nächsten Schritt weiter funktionalisiert werden. Für die Entschützung wird Piperidin verwendet. Dieses bildet nach der Abspaltung ein Fmoc-Piperidin-Addukt aus. Von dem Rohprodukt **TM10** wurde eine $^1\text{H-NMR}$ -Analyse durchgeführt (Abbildung 29).

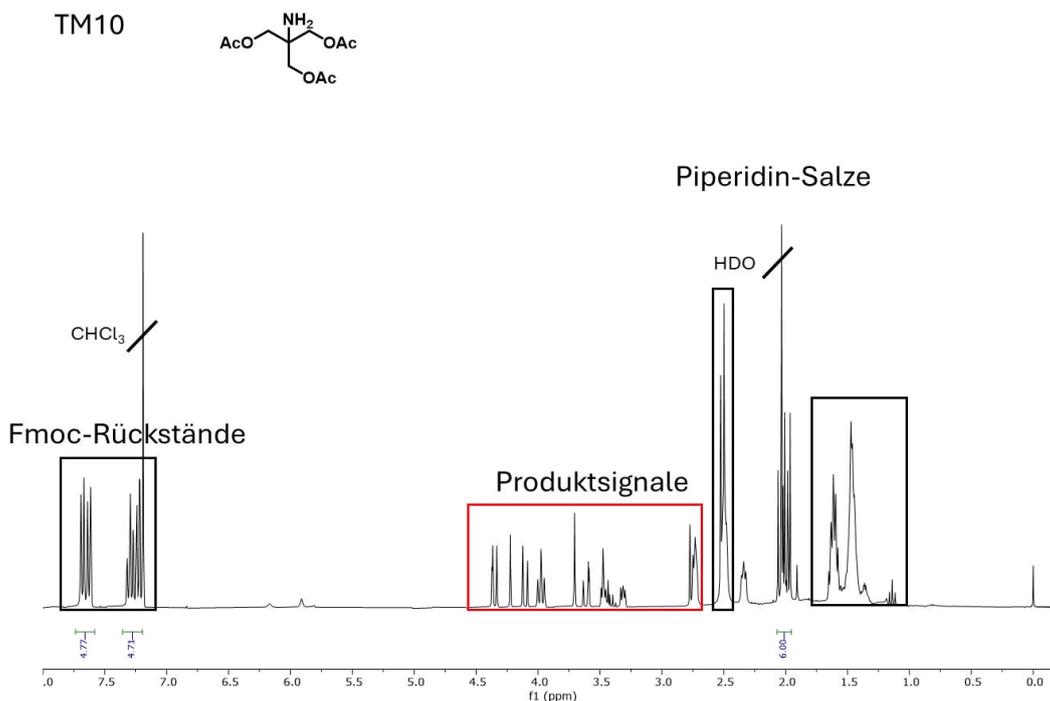


Abbildung 29 $^1\text{H-NMR}$ von **TM10** in CDCl_3 (300MHz).

In Abbildung 29 ist zu erkennen, dass noch eine große Menge an Fmoc-Piperidin-Addukt (7-8 ppm und 1-3 ppm) in der Probe vorhanden ist. Die aufgespaltenen Protonen bei 2 ppm sind den sechs Protonen vom Tris zuzuordnen. Beim Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ Spektren von **TM8** und **TM10** ist zu erkennen, dass viele Signale verschoben und nicht mehr chemisch äquivalent sind. Da die Protonen von **TM10** allerdings Äquivalent sein sollten, muss ein nicht symmetrisches Produkt ausgebildet werden. Eine mögliche Erklärung für die erhöhte Aufspaltung der Signale ist, dass **TM10.1** nicht stabil ist und weiter zum Ketal reagiert.

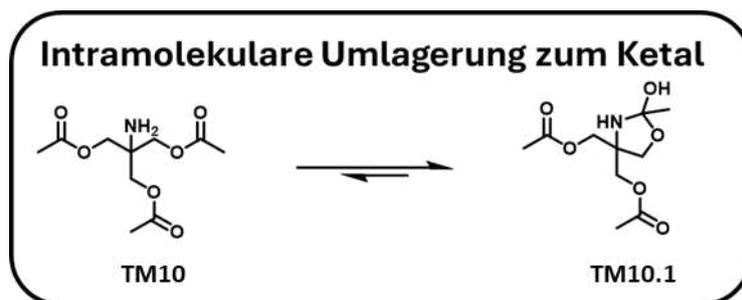


Abbildung 30 Mögliche Ausbildung des Ketals (**TM10.1**) bei der Synthese von **TM10** zur Erklärung der verschobenen $^1\text{H-NMR}$ -Signale.

Die Ausbildung des Ketals würde die Rotationsfähigkeit des Moleküls verringern, wodurch es zu einer größeren Aufspaltung der Protonensignale kommt. Die Ausbildung dieses Ketals **TM10.1** wurde bereits von *Schmitter* für dieses Molekül vorgeschlagen (Abbildung 30).

Für den zweiten Syntheseweg wurde Trifluoracetat als Schutzgruppe gewählt. Hierfür wurde im ersten Schritt das Amin mit Ethyltrifluoracetat umgesetzt. **TM7** konnte als weißer, wachsartiger Feststoff mit einer Ausbeute von 99 % erhalten werden. Die Reinheit wurde

mittels $^1\text{H-NMR}$ untersucht (Abbildung 31). Hierbei konnte durch die veränderte Verschiebung der Tris-Protonen von 3,5 ppm für Tris zu 3,8 ppm für **TM7** die Einführung der Trifluoracetat-Schutzgruppe bestimmt werden. Im zweiten Schritt werden die Acetylschutzgruppen (**TM9**) mittels Acetylchlorid eingeführt. Hierfür wird im Gegensatz zur Schützung mit Essigsäureanhydrid keine Base benötigt, da bereits schwache Basen in der Lage sind, die TFA-Gruppe abzuspalten. **TM9** ist ein weißer, wachsartiger Feststoff Die Reinheit wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ untersucht (Abbildung 58).

TM7

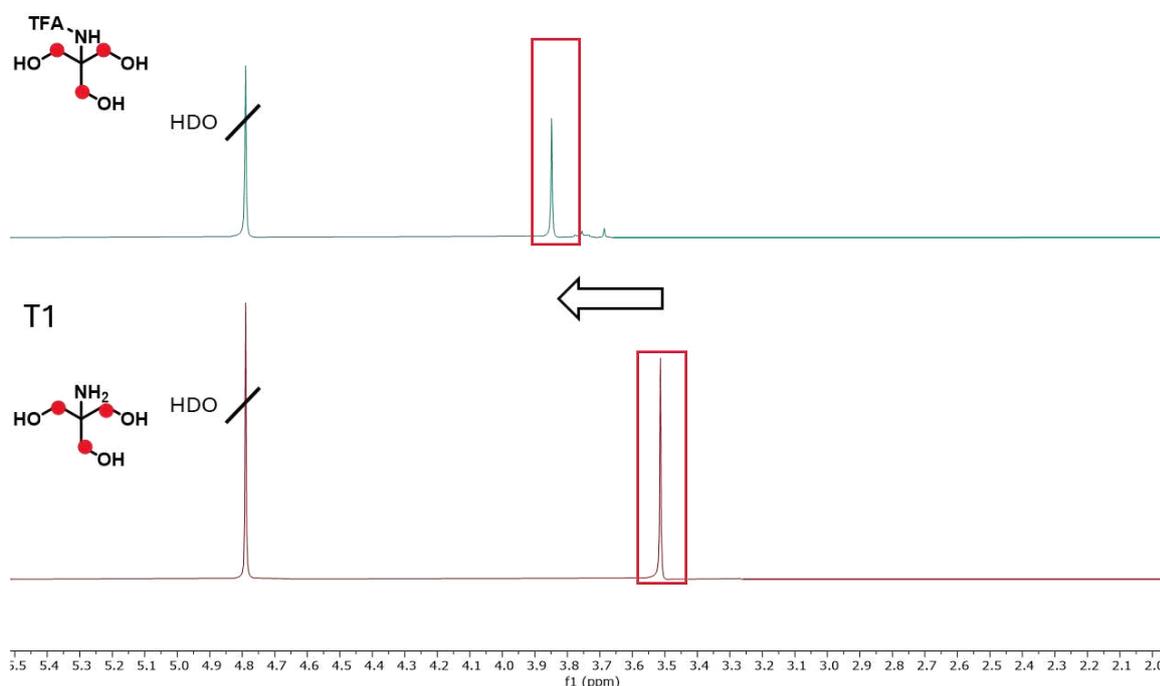


Abbildung 31 Verschiebung der CH_2 -Protonen von **TM7** im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum durch TFA-Schützung von Tris.

Die Entschützung von **TM9** wurde mit Kaliumcarbonat in Methanol durchgeführt. Allerdings konnte **TM10** nicht isoliert werden.

Da **TM10** analog zur ersten Syntheseroute nicht isoliert werden konnte und es zusätzlich zu einer Aza-Michael-Addition bei dem Umsatz mit Acryloylchlorid bzw. Methacryloylchlorid kommt, konnten die Synthese der Trismonomere **TM3** und **TM4** nicht erfolgreich durchgeführt werden. Da allerdings die Monomere **TM1** und **TM2** synthetisiert werden konnten, kann die Aza-Michael-Addition in einem zukünftigen Projekt umgangen werden, indem durch eine Polymerisation des Acrylats das Michael-System entfernt wird. Nach der Polymerisation kann Tris an das Polymergerüst mit der „Grafting To“ Methode angebracht werden.

3.1.2.2 Copolymerisation von T7 mit Ethylacrylat

Für **T7** konnte bereits beim Erstellen der Substratbibliothek gezeigt werden, dass es enzymatisch sialyliert werden kann. Außerdem ist es bekannt, dass **T7** radikalische Polymerisation möglich ist, weil es für die Herstellung von biologischen Gelen verwendet wird. Aus diesem Grund wurden Copolymere aus **T7** und Ethylacrylat (**EA**) für eine erste Versuchsreihe ausgewählt. Für die Copolymere **Poly(T7_x-co-EA_{100-x})** wurde ein Anteil von **T7** von 100 %, 70 %, 50 % und 20 % angestrebt. Die Polymere wurden radikalisch mit Azobis(isobutyronitril) (AIBN) als Initiator für 5 h bei 70 °C polymerisiert. Aufgrund des steigenden hydrophoben Anteils durch den höheren Einbau von Ethylacrylat musste das Fällungsmittel für jedes Polymer angepasst werden. So konnten **Poly(T7₁₀₀-co-EA₀)** und **Poly(T7₂₀-co-EA₈₀)** in Isopropanol, aber nicht in Aceton gefällt werden. Im Gegensatz dazu konnten **Poly(T7₇₀-co-EA₃₀)** und **Poly(T7₅₀-co-EA₅₀)** nur in Aceton und nicht in Isopropanol gefällt werden. Die gefällten Polymere wurden mittels ¹H-NMR-Analyse auf das Einbauverhältnis, sowie mit Wasser-GPC auf das Molekulargewicht und die Dispersität analysiert.

Tabelle 6 Ausbeute der verschiedenen Copolymere aus T7 und Ethylacrylat mit deren dazugehörigen Fällungsmitteln. Mittels Wasser-GPC bestimmtes M_n und Dispersität. Überprüfung des Einbauverhältnisses und des Sialylierungsgrads wurde mittels ¹H-NMR-Analyse bestimmt.

	Ausbeute	Fällungsmittel	Molare Masse M _n	Dispersität D	NMR- Einbauverhältnis der Comonomer (T7:EA)	Sialylierungs- grad
Poly(T7₁₀₀- co-EA₀)	82%	Isopropanol	30 kDa	1,72	-	-
Poly(T7₇₀- co-EA₃₀)	87%	Aceton	71 kDa	1,37	65:35	13,7-21,6 %
Poly(T7₅₀- co-EA₅₀)	55%	Aceton	27 kDa	1,27	50:50	99 %
Poly(T7₃₀- co-EA₇₀)	62%	Isopropanol	-	-	-	-

Das Copolymer **Poly(T7₂₀-co-EA₈₀)** konnte aufgrund des hohen Ethylacrylanteils nicht in Wasser gelöst werden. Da allerdings eine Wasserlöslichkeit für die enzymatische Sialylierung nötig ist, wurde das Polymer **Poly(T7₂₀-co-EA₈₀)** nicht weiter untersucht.

Für die Bestimmung des Einbauverhältnisses wurden die charakteristischen Signale in der ¹H-NMR-Analyse verwendet. Die Polymere zeigen im typischen Bereich für das Polymergerüst bei einer Verschiebung von 1,5 ppm – 2,5 ppm ein breites Signal. In der ¹H-NMR-Analyse von

Poly(T7₁₀₀-co-EA₀) (Abbildung 59) ist das charakteristische Signal der CH₂ – Gruppe von **T7** bei einer Verschiebung von 3,8 ppm zu erkennen. Bei den Polymeren **Poly(T7₇₀-co-EA₃₀)** (Abbildung 60) und **Poly(T7₅₀-co-EA₅₀)** (Abbildung 61) können neben den Signalen des **T7** Monomers ebenfalls die zwei charakteristischen Signale vom EA bestimmt werden. Das Signal bei einer Verschiebung von 4,2 ppm kann der CH₂-Gruppe und das Signal bei 1,3 ppm kann der CH₃-Gruppe zugeordnet werden.

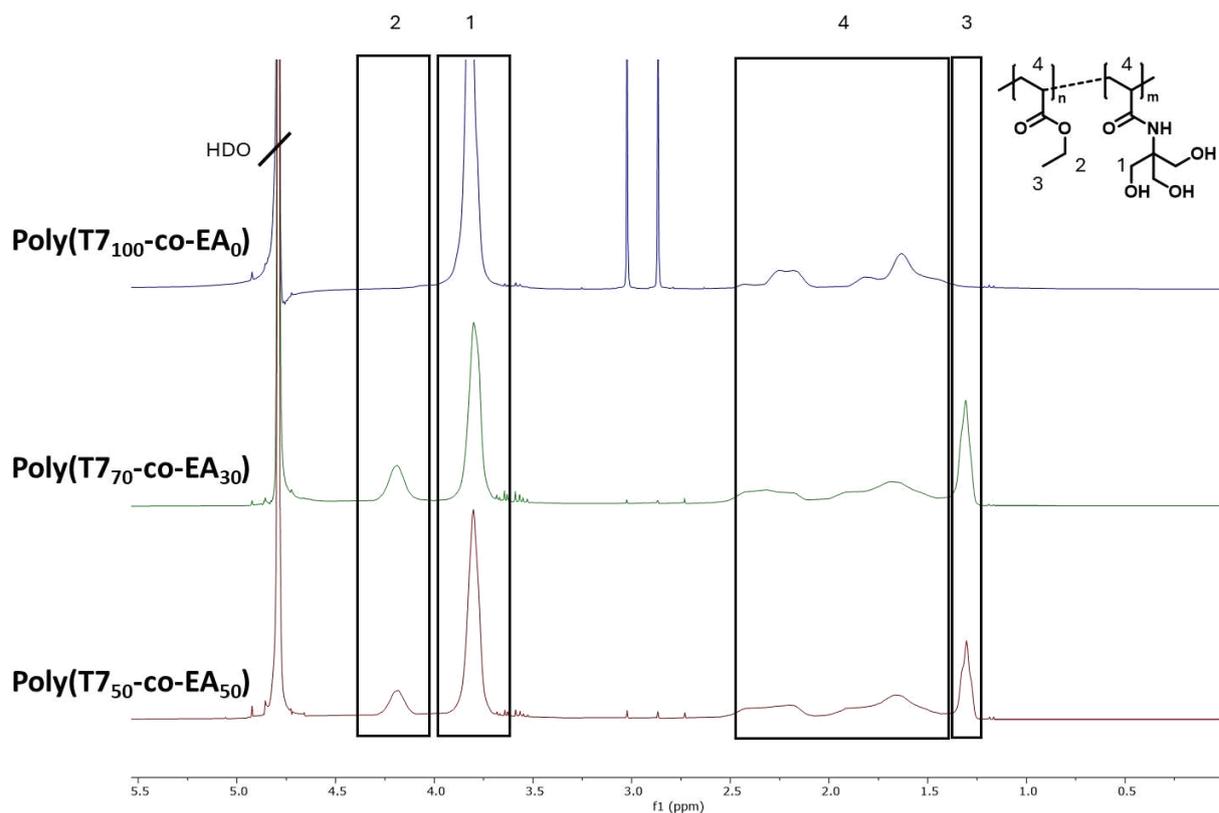


Abbildung 32 Gestapelte ¹H-NMR-Spektren der Copolymere **Poly(T7_x-co-EA_{100-x})** ($x = 100, 70, 50$) zum Vergleich der Einbauverhältnisse.

Poly(T7₁₀₀-co-EA₀) konnte mit einem zahlenmittleren Molekulargewicht von 30 kDa und einer Dispersität von 1,72 isoliert werden. Aufgrund des ausschließlichen Einsatzes von **T7** als Monomer musste kein Monomer Verhältnis bestimmt werden. Für **Poly(T7₇₀-co-EA₃₀)** wurde ein zahlenmittleres Molekulargewicht von 71 kDa mit einer Dispersität von 1,37 bestimmt. Ebenso konnte das angestrebte Einbauverhältnis von 70 % mit 65:35 | **T7:EA** erreicht werden. Für das Polymer **Poly(T7₅₀-co-EA₅₀)** konnte ein zahlenmittleres Molekulargewicht von 27 kDa mit einer Dispersität von 1,27 bestimmt werden. Das angestrebte Einbauverhältnis von 50:50 | **T7:EA** konnte genau erreicht werden.

Die erhaltenen Polymere wurden lyophilisiert. Hierbei wurde festgestellt, dass die Polymere stark hygroskopisch sind. Die hygroskopischen Eigenschaften steigen mit höherem Anteil von **T7**. Wird das Polymer nicht innerhalb von wenigen Minuten luftdicht und unter Schutzgas verschlossen, wird aus dem Polymerfeststoff eine viskose Flüssigkeit. Neben den hohen

hygroskopischen Eigenschaften hat **Poly(T7₁₀₀-co-EA₀)** ebenfalls die Eigenschaft, Lösungsmittel in die Polymerketten einzulagern. So konnte nach der Lyophilisierung trotz einer Vielzahl an Waschzyklen immer noch DMF in einer erheblichen Menge durch die ¹H-NMR-Analyse nachgewiesen werden.

Enzymatische Sialylierung der Copolymere

Die Sialylierung der Polymere **Poly(T7_x-co-EA_{100-x})** (x= 100, 70, 30) wurde analog zum Screening durchgeführt. Nach 24 h wurde die Sialylierung abgebrochen. Um die sialylierten Polymere aufzureinigen, wurden die Polymere mit einem Vivaspin 10 kDa aufgereinigt. Hierbei werden neben der Neu5Ac die anderen niedermolekularen Verunreinigungen Glycinamid, CTP, CMP, Mg²⁺ und CMP-Neu5Ac entfernt. Die Enzyme PmST1 und NmCSS werden hierbei nicht aus der Polymerlösung entfernt.

Der Sialylierungsgrad wurde mittels der ¹H-NMR-Analyse bestimmt (Abbildung 33). Hierbei überlagern die Hydroxygruppen der Neu5Ac mit den charakteristischen Protonen des Tris-Motives. Neben den hinzugekommenen Signalen der Neu5Ac sind ebenfalls Signale der Enzyme im Bereich von 3,5 ppm - 4,5 ppm vorhanden. Allerdings kann der Umsatz über die Acetylprotonen der Neu5Ac bei einer Verschiebung von 2,1 ppm bestimmt werden.

Im ¹H-NMR ist für das Polymer **Poly(T7₁₀₀-co-EA₀)** (Abbildung 62) zu erkennen, dass, abgesehen von den ursprünglichen Polymersignalen, kein neues Signal hinzugekommen ist. Daraus kann geschlossen werden, dass keine Sialylierung erfolgt ist. Da eine Sialylierung vom **T7** möglich war, ist dieses Ergebnis unerwartet. Eine mögliche Erklärung sind die DMF-Reste, die nicht vollständig vor der Sialylierung entfernt werden konnten. Diese DMF-Reste könnten für die Enzyme potenziell toxisch wirken, wodurch eine Sialylierung nicht erfolgen würde.

Für die Polymere **Poly(T7₇₀-co-EA₃₀)** (Abbildung 63) und **Poly(T7₅₀-co-EA₅₀)** (Abbildung 64) konnte ein Sialylierungsgrad bestimmt werden. Hierfür wurden die Acetylprotonen ins Verhältnis zu den CH₃-Protonen des **EA** gesetzt. Dadurch konnte ein Sialylierungsgrad für **Poly(T7₇₀-co-EA₃₀)** von 13,7-21,6 % und für **Poly(T7₅₀-co-EA₅₀)** von 99 % bestimmt werden. Daraus resultiert, dass nicht nur prozentual, sondern auch absolut mehr Tris-Motive sialyliert werden mit ansteigendem EA-Anteil. Ein so deutlicher Anstieg des Sialylierungsgrads ist nicht zu erwarten gewesen, da bei dem Sialylierungsversuch von **T8** keine Sialylierung beider Tris-Motive detektiert werden konnte.

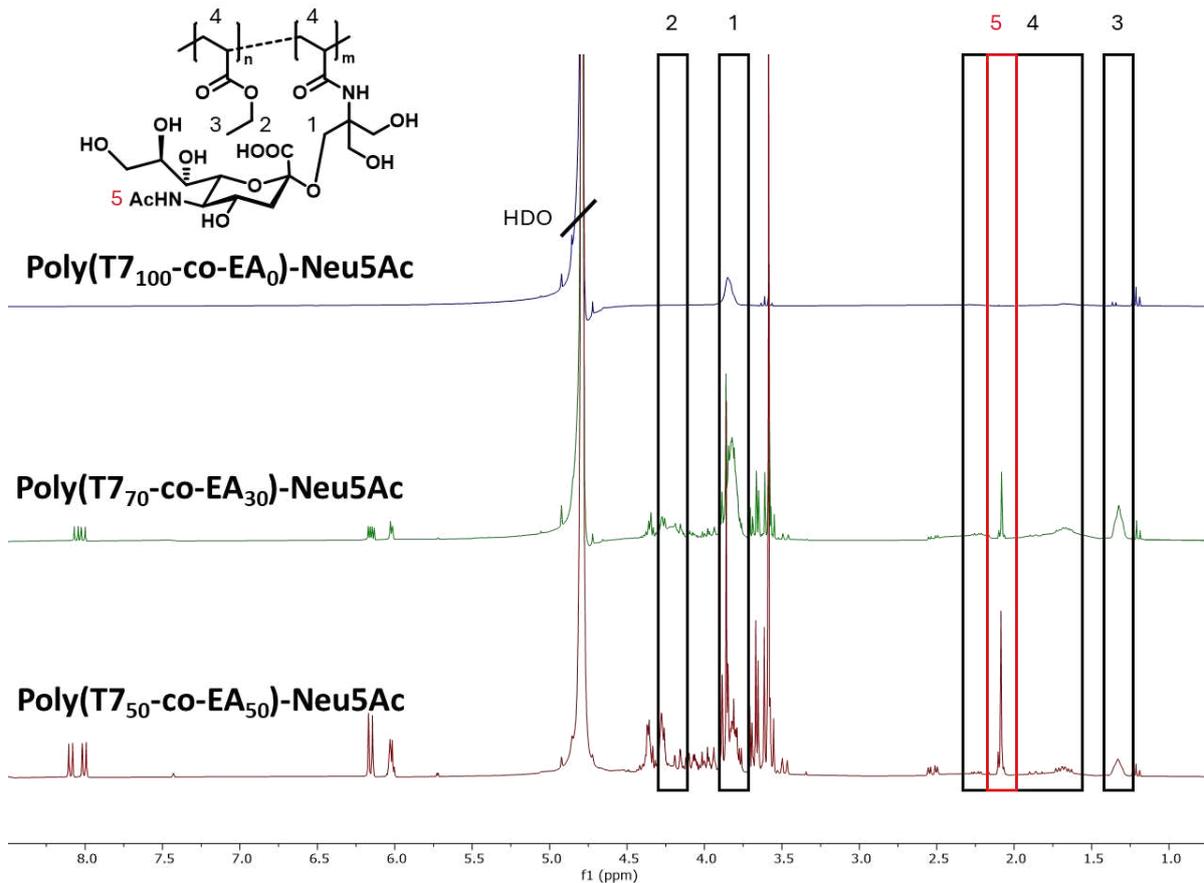


Abbildung 33 Gestapelte $^1\text{H-NMR}$ -Spektren zu Bestimmung des Sialylierungsgrads der Copolymere **Poly(T7_xco-EA_{100-x})-Neu5Ac** ($x=100;70;50$).

Eine Erklärung für den höheren Sialylierungsgrad ist, dass durch den **EA**-Anteil hydrophobe Wechselwirkungen mit der PmST1 ausgeübt werden. Diese Wechselwirkungen können dazu führen, dass der Abstand des aktiven Zentrums des Enzyms und dem Tris-Motiv des Polymers verringert wird, wodurch eine Sialylierung begünstigt wird. Ebenso besteht die Möglichkeit, dass die PmST1 durch das **EA** nebenstehende sialylierte Tris-Motive nicht als sialyliert erkennt, wodurch ein weiteres nahes Tris-Motiv sialyliert werden kann.

Aufgrund eines Defektes der Wasser-GPC konnten die sialylierten Polymere nicht nach der enzymatischen Sialylierung untersucht werden.

Es konnte allerdings erstmals gezeigt werden, dass es möglich ist, nicht natürliche Polyolpolymere enzymatisch zu sialylieren. Ebenso konnte gezeigt werden, dass der Anteil des Comonomers einen Einfluss auf den Sialylierungsgrad hat. In zukünftigen Projekten kann dieses Synthesekonzept in Bezug auf die Wahl des Comonomers, den Sialylierungsgrad oder die Änderung des Polymergerüsts untersucht werden. Ein unter physiologischen Bedingungen abbaubares Polymer würde beispielsweise eine medizinische oder biologische Anwendung ermöglichen.

3.2. Synthese von Azid funktionalisierten Präzisionsoligomeren

Neben Polymeren besteht die Möglichkeit, Oligomere zur Präsentation von Liganden wie Neu5Ac oder Oligonukleotiden zu verwenden. Eine Möglichkeit ist die von *Hartmann* entwickelte Festphasen-Polymer-Synthese (SPPoS) zur Synthese von sequenzdefinierten monodispersen Oligo(amidoaminen). Die verwendeten Bausteine können in Spacer- und funktionelle Bausteine eingeteilt werden. Zu den bereits im Arbeitskreis *Hartmann* etablierten Bausteinen gehören der Spacerbaustein EDS und der funktionelle Baustein BADS, welcher mit einem Azid funktionalisiert ist. Mit diesem Azid ist es möglich, CuAAC durchzuführen, um Neu5Ac, Oligonukleotide oder andere Liganden an die Oligomere anzubringen. Um die Baustein-Bibliothek zu erweitern und ein möglichst optimales Gerüst für die Funktionalisierung mit Oligonukleotiden und Neu5Ac zu finden, wurden Lys-N₃ und DAP-N₃ als Azid funktionalisierte Bausteine und PEG8 als Spacerbaustein auf PEG-Basis auf ihre Kompatibilität mit der Festphasensynthese untersucht.

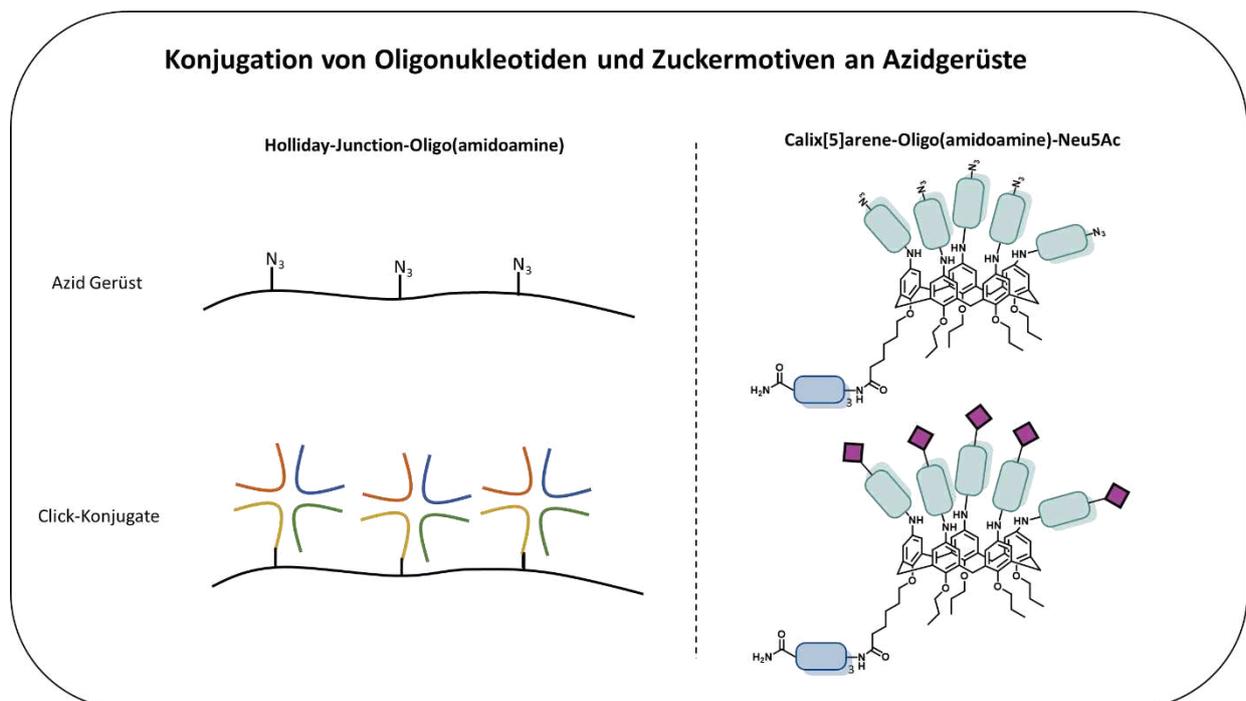


Abbildung 34 Schematische Darstellung der Konjugation von Oligonukleotiden (links) und Neu5Ac(rechts) an ein Oligo(amidoamin)-Gerüst mittels Kupfer-Click-Chemie.

3.2.1 Untersuchung von PEG- und Azid-Bausteinen zur Synthese von Präzisionsoligo(amidoaminen)

Hierfür wurden fünf Oligomere mit verschiedenen Kombinationen aus Spacer- und Funktionellen-Bausteinen synthetisiert. In einem zweiten Schritt wurde untersucht, ob die Bausteine einen Einfluss auf das CuAAC-Verhalten haben. Hierfür wurden die synthetisierten Oligomere mit Mannose funktionalisiert. Die Synthese der Oligomere **AO-O1-O5** und **AO-G1-G5** wurde von der Bachelorstudentin Ayla Yaman nach dem Standardprotokoll für

Festphasensynthese des Arbeitskreises *Hartmann* durchgeführt (Abbildung 35). Für die Synthese der **AO-G1-G5** wurde die Hälfte des Festphasenharzes der Oligomere **AO-O1-O5** entnommen und mit Mannose funktionalisiert.

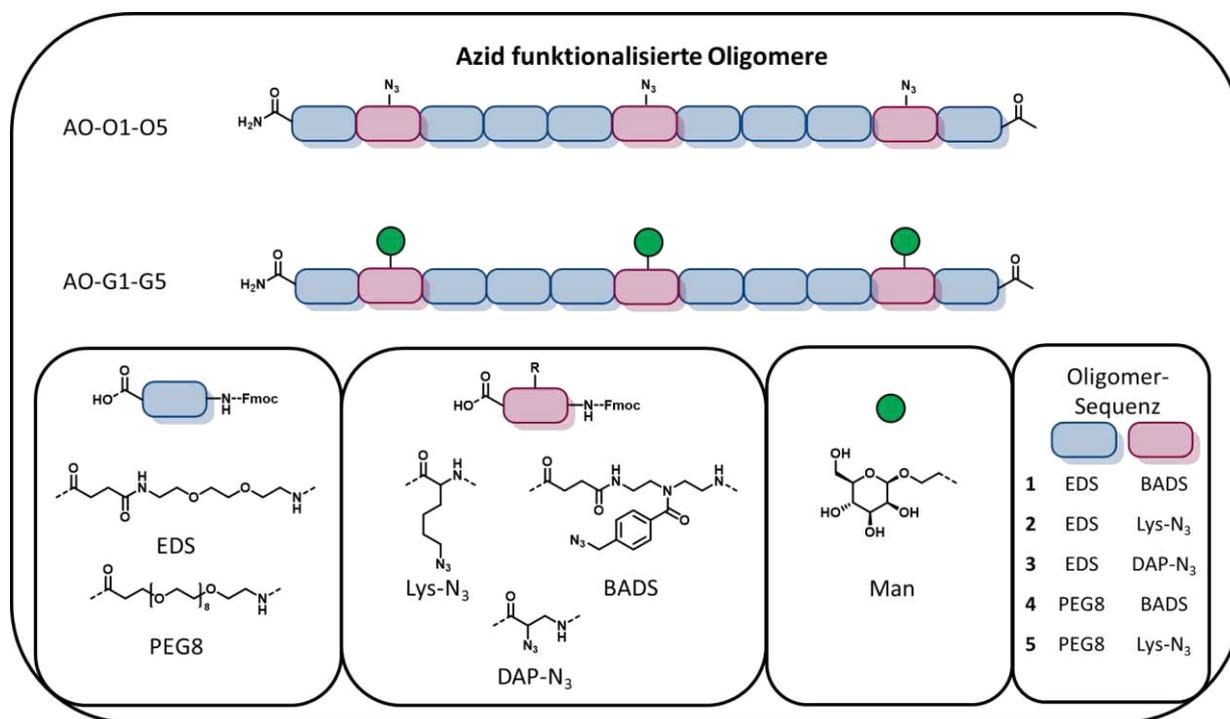


Abbildung 35 Schematische Übersicht über die synthetisierten Oligo(amidoamine) **AO-O1-O5** und deren Funktionalisierung mit Mannose **AO-G1-G5**.

Tabelle 7 Ausbeute und Reinheit der Oligomere **AO-O1-O5** und **AO-G1-G5** wurde mittel RP-HPLC-MS(ESI) bestimmt. (Die Werte in Klammern geben die Menge an Umlagerungsprodukt an)

Oligomer		Reinheit [%]		Ausbeute [%]	
AO-O1	AO-G1	70 (8,4)	62	54	21
AO-O2	AO-G2	73	82	42	48
AO-O3	AO-G3	-	-	-	-
AO-O4	AO-G4	73 (16)	81	62	52
AO-O5	AO-G5	68	70	24	69

Die Synthese der Oligomere aus elf Bausteinen konnte für die vier Kombinationen aus **EDS**, **PEG8**, **BADS** und **Lys-N₃** erfolgreich synthetisiert werden. Die Oligomere wurden mittels ¹H-NMR-Analyse (Abbildung 65-Abbildung 72), RP-HPLC-MS(ESI) (Abbildung 204-Abbildung 219) und MALDI-TOF (Abbildung 266-Abbildung 273) analysiert. Die Ausbeuten betragen zwischen 24 % und 62 % bei einer Reinheit von 68-73 %. Das Oligomer **AO-O3** mit **DAP-N₃** als azidhaltigen Baustein konnte, nicht synthetisiert werden. Für die Oligomere mit dem BADS-Baustein kann es nach der Entschützung der Fmoc-Schutzgruppe zu einer Umlagerung der 4-(Azidomethyl)benzoesäure an das freie primäre Amin kommen. Im nächsten Kupplungsschritt

erfolgt die Kupplung des Bausteins an das sekundäre Amin des BADS-Bausteins.¹⁰⁹ Der prozentuale Anteil des umgelagerten Produktes ist in Tabelle 7 in den Klammern angegeben. Beim Vergleich der Reinheiten der Oligomere ist kein signifikanter Unterschied weder zwischen den unterschiedlichen Spacer-Bausteinen noch zwischen den funktionellen Bausteinen zu erkennen. Die signifikant geringere Ausbeute von **AO-O5** mit 24 % im Gegensatz zu den anderen Oligomeren mit einer Ausbeute zwischen 42 % und 62 % kann auf zwei mögliche Gründe zurückgeführt werden. Da bei der Fällung von **AO-G5** die geringste Ausbeute bestimmt werden konnte, ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um ein Isolationsproblem handelt. Bei der Isolation besteht einerseits die Möglichkeit, dass bei der Abspaltung mit TFA nicht alle Oligomere vom Harz abgespalten wurden und eine Doppelabspaltung nötig ist. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass das Oligomer nur langsam in Ether ausfällt. Um den Produktverlust beim Ausfällen zu verringern, kann der Ether, in dem das Oligomer gefällt wurde über längere Zeit bei -20 °C gelagert werden. Durch die längere Standzeit bei tiefen Temperaturen kann mehr Oligomer aus der Lösung ausfallen.

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob **Lys-N₃** und **PEG8** einen Einfluss auf den Umsatz der CuAAC haben. Hierfür wurden an die Oligomere **AO-O1**, **O2**, **O4**, **O5** Mannose-Alkin konjugiert. Hierbei konnte kein signifikanter Unterschied im CuAAC-Verhalten mittels ¹H-NMR-Analyse, RP-HPLC-MS(ESI) und MALDI-TOF festgestellt werden. Dadurch können die Bausteine **PEG8** und **Lys-N₃** dem Werkzeugbaukasten für die Festphasensynthese hinzugefügt werden. Besonders **Lys-N₃** hat gegenüber dem BADS-Baustein den Vorteil, dass das **Lys-N₃** nicht umlagern kann. Dadurch wird die Synthese von monodispersen Oligomeren bei gleicher Kupplungseffizienz erleichtert, da keine Oligomere mit umgelagerten Bausteinen synthetisiert werden, welche eventuell je nach Anwendungsbereich mit chromatographischen Methoden abgetrennt werden müssen. Der Vorteil, den **Lys-N₃** im Gegensatz zu BADS nicht bieten kann, ist das π-System. Das π-System ermöglicht π-π-Wechselwirkungen, wodurch die Bindungsaffinität des Ligandensystems mit dem Bindungsmotiv erhöht werden kann. Der PEG8-Baustein bietet gegenüber dem EDS-Baustein den Vorteil, dass dieser durch die acht Ethylenglycoleinheiten andere Abstände zwischen Liganden eingestellt werden können.

*3.2.1.1 Optimierung der Kupplungsbedingungen zur Kupplung des **DAP-N₃**-Bausteins.*

Das Oligomer **AO-O3** konnte nicht anhand des Standardprotokolls hergestellt werden. Nach der Kupplung des zweiten **DAP-N₃**-Bausteins wurde eine Umsatzkontrolle durchgeführt. Hierbei wurde festgestellt, dass in der RP-HPLC-MS(ESI) und in der ¹H-NMR-Analyse nur ein Tetramer aus vier EDS-Bausteinen detektiert werden konnte und die Kupplungsreaktion des **DAP-N₃**-Bausteins nicht erfolgreich war. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass im Gegensatz zu **BADS** oder **Lys-N₃** der Abstand vom Azid zur Carbonsäure deutlich geringer ist, wodurch einerseits ein elektronischer Einfluss auf die Carbonsäure ausgeübt werden könnte. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass durch den ionischen Charakter des Azids

eine sterische Abschirmung der Carbonsäure erfolgt, wodurch eine Aktivierung mittels PyBOP nicht möglich ist.

Um zu untersuchen, ob **DAP-N₃** mit den handelsüblichen Kupplungsreagenzien gekuppelt werden kann oder einzelne Kupplungsreagenzklassen nicht für die Kupplung geeignet sind, wurde ein Testoligomer aus drei EDS-Bausteinen hergestellt. Für die Kupplung von **DAP-N₃** an das Testoligomer wurden sieben Kupplungsreagenzien untersucht. Darunter sind vier Carbodiimide (N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), Diisopropylcarbodiimid (DIC), Azodicarbonsäurediethylester (DEAD) und Hydroxyiminocyanessigsäureethylester (OximaPure)), ein Phosphoniumsalz (PyOxim), ein Aminiumsalz (HATU) und ein Uroniumsalz (COMU). Das Kupplungsverhalten wurde mittels RP-HPLC-MS(ESI) überprüft (Anhang, Tabelle 9). Hierbei hat sich gezeigt, dass alle Kupplungsreagenzien die Kupplung von **DAP-N₃** katalysieren. Allerdings konnten Reste des Testoligomers im Injektionspeak mittels MS(ESI) nachgewiesen werden. Eine vollständige Kupplung des **DAP-N₃**-Bausteins kann durch Mehrfachkupplungen erzielt werden. Aufgrund der geringeren Kupplungseffizienz von **DAP-N₃** als **Lys-N₃** ist die Verwendung für die Festphasensynthese nur dann zu empfehlen, wenn genau dieses kurze Motiv benötigt wird.

3.2.2 Synthese von azidhaltigen Oligomeren für DNA-Konjugation

Die im Arbeitskreis *Hartmann* synthetisierten Präzisionsoligomere werden für eine Vielzahl von Anwendungen verwendet. Zu diesen Anwendungen gehören vor allem die Präsentation von Liganden zur Inhibition von viralen oder bakteriellen Pathogenen.³¹ Hierfür wurden auch bereits verzweigte Strukturen verwendet.¹³⁷ In der Regel wurden kurze Oligomerseitenketten mit einzelnen Mono- und Disacchariden präsentiert. Im Arbeitskreis von Prof. *Jørgen Kjems* vom iNANO der Universität Aarhus werden Holliday Junctions (HJ) als ein sequenzdefiniertes Gerüst verwendet. Hierbei kann jeder der einzelnen vier DNA-Stränge nach den jeweiligen Anforderungen funktionalisiert werden. Die vier DNA-Stränge können sich selbstassemblieren und die HJ ausbilden.

Im Folgenden wurde die Synthese eines Kamm-Systems zur multivalenten Präsentation von mehreren HJ an einem sequenzdefinierten Gerüst untersucht (Abbildung 36). Hierfür wurde von *Simon Vinther* der DNA-Strang **Q2** mit einem DBCO-Linker versehen, wodurch eine kupferfreie Clickreaktion mit einem Azidgerüst durchgeführt werden kann. Es wurde sich für ein Click-System entschieden, da es ein bereits sehr gut etabliertes bioorthogonales System mit sehr hohen Umsätzen ist. Die funktionalisierten DNA-Stränge (**Q1-4**) werden mittels RP-HPLC und UREA-PAGE auf ihren Umsatz untersucht. Hierfür werden die spezifischen UV-Signale der DNA-Stränge bei 260 nm, die des DBCO-Linkers bei 310 nm, sowie von SYBR-Gold, welches zum Einfärben von DNA-Strängen verwendet wird, bei einer Extinktion von 500 nm und Emission von 540 nm untersucht. Um den Umsatz mit dem Oligomer sowie ein

Tracking in Zellen und Organismen zu ermöglichen, sollte das Oligomer mit einem kompatiblen Fluoreszenzfarbstoff funktionalisiert werden. Aufgrund der in der Biologie und Medizin bereits etablierten Alexa™ Farbstoffen wurde sich für Alexa 647 entschieden.

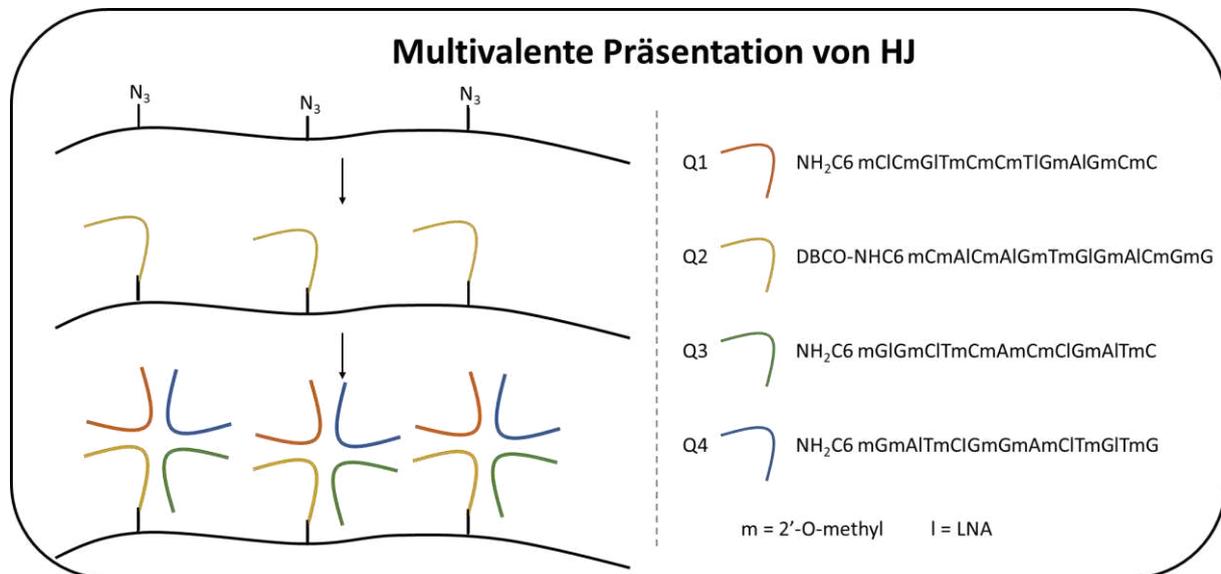


Abbildung 36 Schematische Darstellung des Kamm-Systems aus einem azidhaltigen Oligo(amidoamin)-Gerüsts und konjugierter Holliday Junction(links). Sequenz der vier verschiedenen DNA-Stränge der verwendeten Holliday Junction(rechts).

Für die erste Generation an Oligomeren wurde sich an den Ergebnissen der Azid-Oligomere **AO-O1-O5** orientiert. Hierfür wurden zunächst zwei Oligomere synthetisiert, wobei **HJ-O1** mit zwei Aziden und **HJ-O2** mit drei Aziden ausgestattet ist (Abbildung 37). Aufgrund der Größe und des hohen Molekulargewichts von $4542,23 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ von **Q2** wurden zwischen den Azidbausteinen zwei Spacerbausteine in das Oligomer eingeführt, um eine sterische Abschirmung zu verringern. Der Alexa 647 Farbstoff wurde aufgrund des hohen Preises und der geringen verfügbaren Menge erst nach vollständiger Synthese und Abspaltung der Oligomere angebracht. Die Synthese der Oligomere wurde bis einschließlich der Kupplung der Bernsteinsäure an der Festphase nach dem Standardprotokoll durchgeführt. Nach Fertigstellung der Oligomere wurden mit einer Prep-HPLC aufgereinigt, um Fehlsequenzen zu entfernen. Die Synthese der Oligomere wurde mittels RP-HPLC-MS (Abbildung 222-Abbildung 223) und MALDI-TOF bestätigt. Im nächsten Schritt wurde Alexa 647 an die freie Carbonsäure gekuppelt. Die Oligomere wurden mittels eines Vivaspins mit einem Cutoff von $3000 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ so lange gewaschen, bis kein Farbstoff mehr im Filtrat nachgewiesen werden konnte. Die Alexa 647 gelabelten Oligomere wurden mittels RP-HPLC-(MS) und MALDI-(TOF) auf ihren Umsatz untersucht.

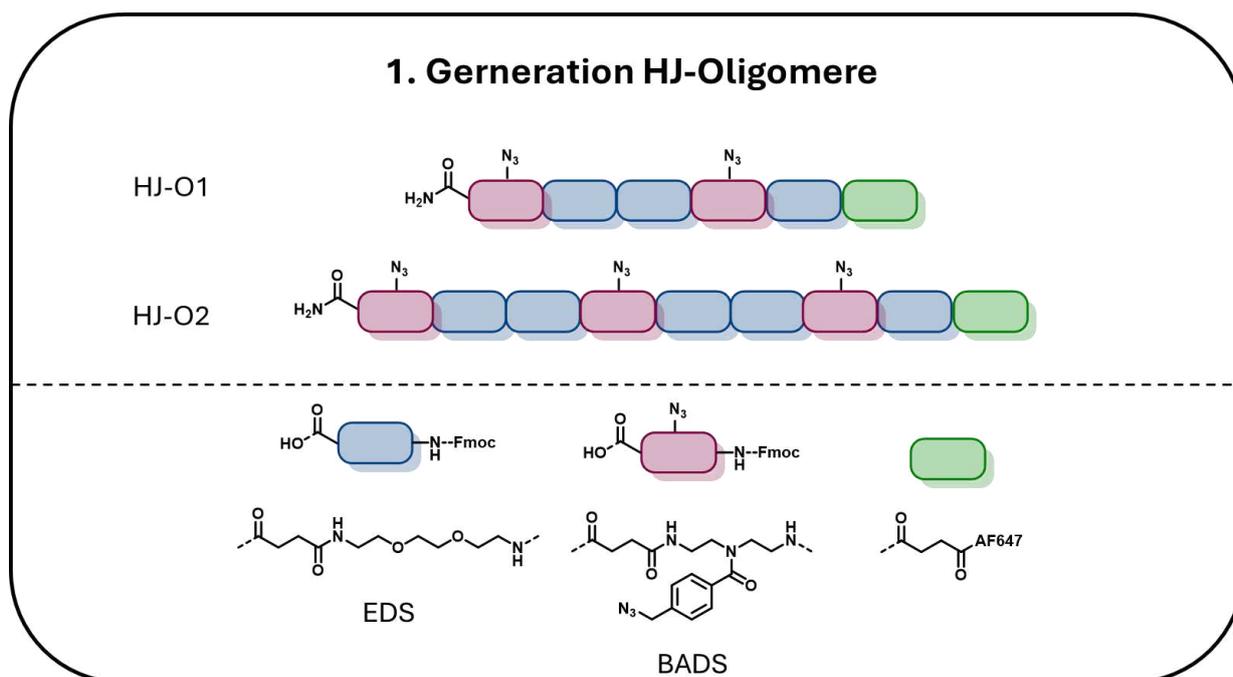


Abbildung 37 Schematische Darstellung der 1. Generation an Holliday-Junction-Oligomere (oben) und deren verwendete Bausteine (unten).

Hierbei hat sich gezeigt, dass weder mittels der RP-HPLC-MS(ESI) noch mittels MALDI-TOF ein Signal detektiert werden konnte. Da allerdings sowohl RP-HPLC-MS(ESI) als auch MALDI-TOF der Oligomere ohne den Farbstoff möglich gewesen sind, wurde versucht, nur vom Alexa 647 eine RP-HPLC-(MS)-Analyse und MALDI-(TOF) zu messen. Hierbei stellte sich heraus, dass für keine der beiden Messungen ein Signal detektiert werden konnte. Eine mögliche Erklärung ist, dass Alexa 647 nicht ionisiert und dadurch auch nicht detektiert werden kann. Da allerdings der Cutoff des Vivaspins bei der Aufreinigung bei $3000 \frac{g}{mol}$ gewählt wurde, ist davon auszugehen, dass die Oligomere **HJ-O1** mit $1496,65+2000-2400 \frac{g}{mol}$ bzw. **HJ-O2** mit $2301,55+2000-2400 \frac{g}{mol}$ vom Alexa 647 mit $2000 - 2400 \frac{g}{mol}$ und den nicht konjugierten Oligomeren abgetrennt wurden. Nach der Lyophilisierung wurde ein Feststoff erhalten, welcher die charakteristische Farbe von Alexa 647 aufweist. In Lösung zeigen die Oligomere die charakteristischen Fluoreszenzeigenschaften von Alexa 647. Daraufhin wurden die Oligomere **HJ-O1** und **HJ-O2** zur Funktionalisierung mit **Q2** an *Simon Vinther* übergeben.

3.2.3 Konjugation des DNA-Strangs Q2 an die Oligomergerüste

Die Funktionalisierung der Oligomere **HJ-O1** und **HJ-O2** mit **Q2** wurde in 0,1 M pH 7,4 HEPES-Puffer mit 30 % DMSO über Nacht bei 30 °C durchgeführt. Die Reaktionslösung wurde mittels einer PD-10 Gracuity Column (G25, Mr 5000) getrennt. Die einzelnen Fraktionen wurden auf Fluoreszenz bei 260 nm, 310 nm und 640 nm untersucht. Die Fraktionen mit Fluoreszenzeigenschaften wurden auf eine 12 % Urea-PAGE aufgetragen und getrennt (Abbildung 38).

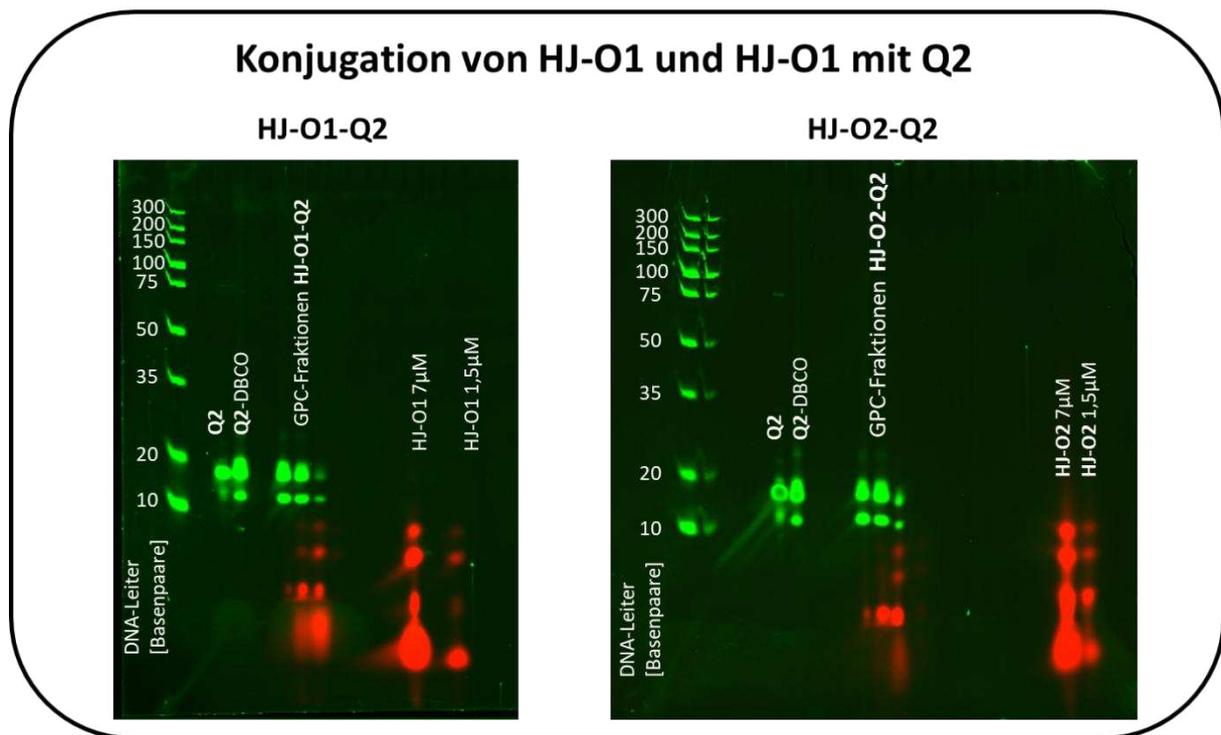


Abbildung 38 Urea-Page von den mit **Q2** konjugierten Oligomeren **HJ-O1** und **HJ-O2** Fraktionen durchgeführt von Simon Vinther. (DNA-Staining mit SYBR-Gold)

Für die Konjugation von **HJ-O1** und **HJ-O2** ist das gleiche Ergebnis zu erkennen. Hierbei handelt es sich bei den grün fluoreszierenden Banden um mit SYBR-Gold angefärbte DNA und die rot fluoreszierenden Banden um den Alexa-Farbstoff. Bei der ganz linken Spalte handelt es sich um den reinen DNA-Strang **Q2**, der nicht weiter funktionalisiert ist. Bei der nächsten Spalte handelt es sich um das mit dem DBCO-Linker funktionalisierte **Q2**. Hierbei ist oberhalb der Bande für das unfunktionalisierte **Q2** eine weitere Bande zu erkennen. Diese Bande kann dem mit DBCO-funktionalisierten **Q2** zugeordnet werden. Dadurch, dass sowohl eine Bande für **Q2** und **Q2-DBCO** in der Probe zu erkennen ist, ist anzunehmen, dass die Funktionalisierung von **Q2** mit DBCO nicht vollständig abgelaufen ist. Da allerdings **Q2** ohne DBCO nicht mit den Oligomeren konjugieren kann, können die nicht funktionalisierten **Q2** vernachlässigt werden. In den beiden rechten Spalten sind die Alexa 647 gelabelten Oligomere aufgetragen. Bei geringer Konzentration sind zwei Banden zu erkennen. Hierbei ist anzunehmen, dass bei der Trennung mit dem Vivaspin nicht alles an nicht konjugierten Alexa 647 aus der Lösung entfernt werden konnte. Eine mögliche Erklärung hierfür sind π - π -Wechselwirkungen von Alexa 647 mit den Aromaten der BADS-Bausteine sowie dem π -System von bereits an Oligomer konjugierten Alexa 647-Farbstoffmoleküle. Ebenso wie die unfunktionalisierten **Q2** haben die unfunktionalisierten Alexa 647 Farbstoffmoleküle keinen Einfluss auf die Konjugation. Bei den Fraktionen in der Mitte handelt es sich um Mischfraktionen aus der Reaktionslösung. Diese Mischfraktionen bestehen nach der Aufreinigung mittels einer Säule sowohl aus **Q2** als auch die Oligomere **HJ-O1** und **HJ-O2**.

Allerdings ist zu erkennen, dass es bei der Trennung durch die Urea-PAGE nicht zur Bildung neuer Banden für die Konjugate aus **Q2** und den Oligomeren kommt, sondern dass dieselbe Aufspaltung wie für die nicht konjugierten **Q2** und Oligomere. Das ist ein Indiz dafür, dass die Konjugation nicht erfolgreich war. Da es sich hierbei um eine für DNA optimierte Trennungsmethode handelt, könnte es dennoch sein, dass es zu einer erfolgreichen Konjugation gekommen ist, da sowohl **Q2** als auch die Oligomere bei der Größenauftrennung in derselben Fraktion gesammelt wurden, obwohl **Q2** ein erheblich größeres Molekulargewicht als die Oligomere hat. Aufgrund dieses nicht eindeutigen Ergebnisses wurde der Umsatz mit einer für DNA optimierten RP-HPLC untersucht.

Für die RP-HPLC-Untersuchung (Abbildung 241) wurde zunächst **Q2**, das Oligomer **HJ-O2** und die Konjugation der beiden untersucht. Hierbei wurde **Q2** bei 260 nm für das charakteristische DBCO-Signal und **HJ-O2** bei 640 nm für das Alexa 647 Signal untersucht. Hierbei konnte festgestellt werden, dass **Q2** eine Retentionszeit von 27 min und **HJ-O2** eine Retentionszeit von 21 min hat. Bei einer erfolgreichen Konjugation sollte das Produktsignal bei einer Retentionszeit zwischen den beiden Edukten zu finden sein. Allerdings konnten nur die Eduksignale für die Konjugation detektiert werden.

Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Konjugation nicht erfolgreich war. Eine Erklärung dafür, dass sowohl **Q2** als auch die Oligomere bei der Größenauftrennung zusammen eluieren, ist, dass die beiden Moleküle stark miteinander wechselwirken, allerdings nicht kovalent gebunden sind.

Dieses Ergebnis ist aufgrund der Zuverlässigkeit der DBCO-Azid-Click-Reaktion unerwartet gewesen. Insbesondere weil nicht einmal eine einfache Konjugation von einem **Q2** mit dem Oligomer detektiert werden konnte. Da allerdings der Alexa-Farbstoff schon bei der Synthese der Oligomere zu erheblichen Problemen geführt hat, wurde in Betracht gezogen, dass der Alexa-Farbstoff die Konjugation verhindert. Um das genauer zu untersuchen, wurde von *Simon Vinther* **Q2** zur Verfügung gestellt.

In einem ersten Versuch wurde getestet, ob eine Konjugation der Oligomere mit **Q2** mittels MALDI-TOF nachgewiesen werden kann. Hierfür wurden **HJ-O1**, **HJ-O2** und **HJ-O1** ohne Alexa 647 (**HJ-O1.1**) mit **Q2** für 48 h bei 37°C inkubiert. Für die Oligomere **HJ-O1** und **HJ-O2** konnte keine Konjugation mit **Q2** detektiert werden. Es konnten lediglich die Massen des nicht konjugierten Oligomers sowie **Q2** detektiert werden. Dies spiegelt die Ergebnisse der UREA-PAGES sowie die zugehörigen HPLC-Spektren, die von *Simon Vinther* vermessen wurden, wider. Bei der Konjugation von **HJ-O1.1** mit **Q2** konnte neben den **HJ-O1.1** und **Q2** ebenfalls die Massen der Konjugate aus **HJ-O1.1** mit zwei **Q2** sowie ein kleines Signal für die Masse mit nur einem **Q2** Strang detektiert werden. Daraus kann geschlossen werden, dass eine

Konjugation grundsätzlich möglich ist, allerdings die mit Alexa 647 gelabelten Oligomere nicht in der Lage, sind, diese Konjugation einzugehen.

Auf Basis dieser Ergebnisse wurde ein neuer Fluoreszenzfarbstoff gesucht, der eine Nachverfolgung der multivalent präsentierten Oligomere ermöglicht. Hierbei sind in Abbildung 39 die Absorption und Emissionsspektren von CYBR-Gold in Grün und Alexa 647 in Rot aufgetragen. Die DNA-Stränge haben eine Fluoreszenz durch die Aromaten der Nukleotidbasen bei 280 nm und durch den DBCO-Linker bei 310 nm. Somit steht der Wellenlängenbereich von 330 – 480 nm für einen anderen Fluoreszenzfarbstoff zur Verfügung (Abbildung 39).

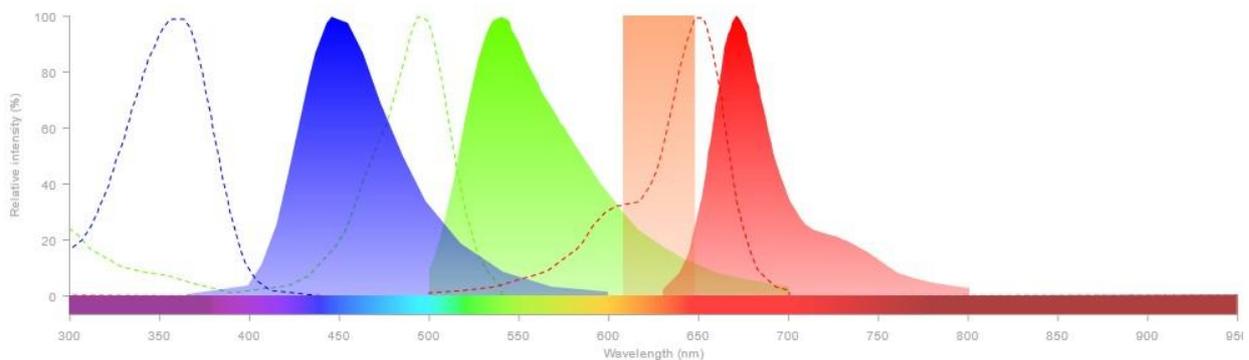


Abbildung 39 Absorption (gestrichelt) und Emissionsspektren (gefüllt) von Cumarin- (blau), SYBR-GOLD (grün) und Alexa 647 (rot). Darstellung wurde erstellt vom Fluorescence Spectra Viewer von Thermo Fisher Scientific.¹³⁸

Eine Farbstoffklasse, die in diesem Bereich absorbiert und emittiert, ist die Klasse der Cumarine. Im Gegensatz zu anderen Fluoreszenzfarbstoffen, die zum Markieren von biologischen Substraten (z.B. Alexafarbstoffe) verwendet werden, sind Cumarin- farbstoffe weitaus weniger komplex und in großen Mengen kommerziell erhältlich. Eines der kommerziell erhältlichen Cumarine ist das bifunktionelle 7-Amino-4-essigsäure-cumarin. Aufgrund der Bifunktionalität mit einer Carbonsäure und einem Amin besteht die Möglichkeit, durch die Einführung einer Fmoc-Schutzgruppe den Cumarin- farbstoff als Fluoreszenzfarbstoff-Baustein für die Festphasensynthese zu verwenden.

3.2.3.1. Synthese Cumarinbaustein

Die Synthese des Cumarinbausteins wurde nach der Vorschrift von *Maly et al.* durchgeführt.¹³⁹ Der Umsatz wurde mittels ¹H-NMR-Analyse untersucht (Abbildung 40).

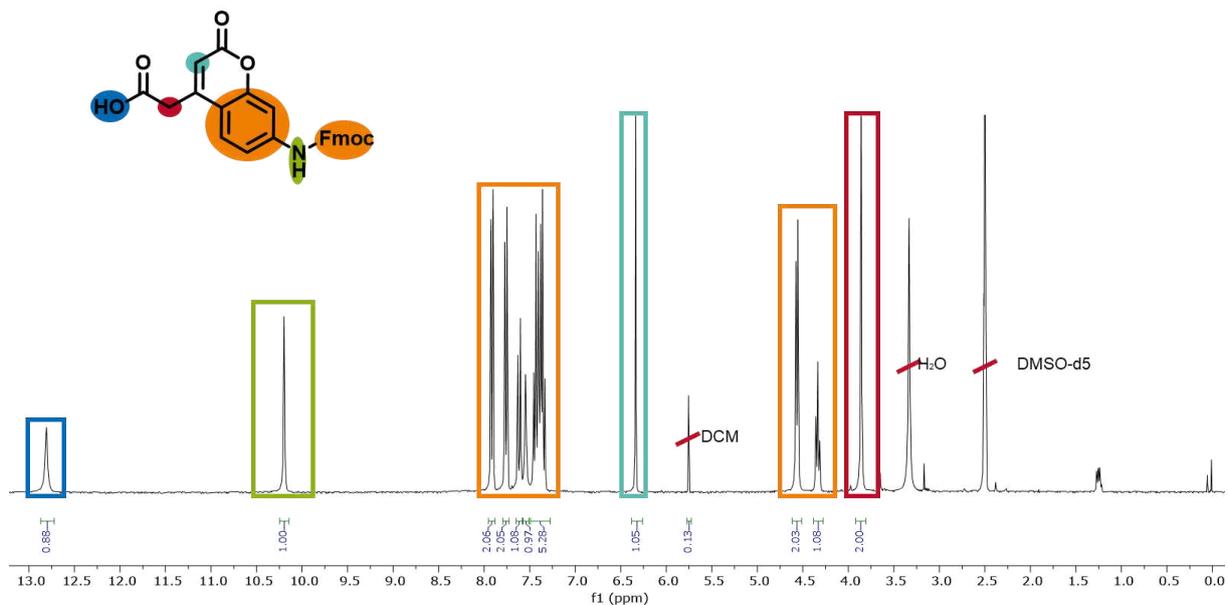


Abbildung 40 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Cumarinbausteins für die Festphasensynthese in DMSO-d_6 (600MHz).

Durch die Verwendung von DMSO als Lösungsmittel können sowohl die Carbonsäure bei einer Verschiebung von 12,7 ppm und das Proton des Carbamates bei einer Verschiebung von 10,2 ppm detektiert werden. Das Singulett bei einer Verschiebung von 3,8 ppm kann der CH_2 -Gruppe zugeordnet werden. Das Proton des ungesättigten Lactons kann dem Signal bei einer Verschiebung von 6,3 ppm zugeordnet werden. Die aromatischen Signale der Fmoc-Schutzgruppe und des Phenylrings des Cumarinfarbstoffs können den Signalen im Bereich von 7,3 – 8 ppm zugeordnet werden. Die zwei Signale bei 4,3 ppm und 4,5 ppm können dem Ethyllinker der Fmoc-Schutzgruppe zugeordnet werden.

Um die Kompatibilität des Cumarinbausteins mit dem Tentagel SRAM und den Oligo(amidoaminen) zu untersuchen, wurde die Kupplung an einem Testoligomer aus drei EDS-Bausteinen untersucht. Dieses wurde zunächst nach dem Standardprotokoll mit PyBOP und DIPEA als Kupplungsreagenzien durchgeführt. Hierbei hat sich gezeigt, dass nicht das gewünschte Produkt mit einer Masse von $1130,52 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$, sondern ein Produkt mit der Masse von $819,42 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$, detektiert wird. Da die Synthese der Oligo(amidoamine) gut erforscht ist und nie ein solches Verhalten beobachtet wurde, ist davon auszugehen, dass es bei der Kupplung des Cumarinbausteins zu einer Fehlkupplung kommt. Ein gängiges Nebenprodukt eines Fmoc geschützten Oligomers ist die entschützte Variante. Da allerdings die Fmoc-Schutzgruppe ein Molekulargewicht von nur $223,8 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ hat und die Massedifferenz zwischen dem erhaltenen und dem Zielprodukt $311,1 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ ist, muss ein größeres Fragment bei der Kupplung des Bausteines abgespalten worden sein.

Da die Kupplung mit dem Standardprotokoll nicht erfolgreich war, wurden die Kupplungsbedingungen optimiert. Als Kupplungsreagenzien wurden HATU, DIC und PyBOP

verwendet. Bei der Kupplung mit PyBOP und HATU wurde anstatt von DIPEA 2,4,6-Trimethylpyridin als nicht nucleophile Base verwendet. Bei der Kupplung mit DIC wurde HOBt als Hilfsreagenz zur Ausbildung des Aktivesters verwendet. Für die drei Kupplungen konnte das gewünschte Produkt erhalten werden. Hierbei wurde nicht das um $311,1 \frac{g}{mol}$ kleinere Nebenprodukt gebildet, wodurch angenommen werden kann, dass DIPEA für die Nebenreaktion verantwortlich ist. Beim Vergleich der Umsätze ist ebenfalls zu erkennen, dass PyBOP mit 57 % Umsatz das am wenigsten für die Kupplung geeignete System ist. Bei der Kupplung mit HATU konnte ein Umsatz von 75 % erreicht werden und für die Kupplung mit DIC ein Umsatz von 85 %. Da DIC den höchsten Umsatz zeigt, wurde DIC als Kupplungsreagenz für den Cumarinbaustein verwendet. Mit Hilfe einer Doppelkupplung des Cumarinbausteins wurde ein Umsatz von über 95 % erreicht.

3.2.4 Synthese der 2. Generation von azidhaltigen Oligomeren und Konjugation mit **Q2**

Es wurden drei Oligomere mit dem Cumarinbausteins synthetisiert. Hierbei wurden **HJ-O4** und **HJ-O5** analog zu den Oligomeren **HJ-O1** und **HJ-O2** aufgebaut, mit dem Unterschied, dass der Bernsteinsäureanhydridbaustein für die Kupplung des Cumarinfarbstoffs nicht benötigt wird und darauf verzichtet wurde. Für das dritte Oligomer **HJ-O3** wurde sich an der Struktur der anderen Oligomere orientiert, mit der Ausnahme, dass dieses nur ein Azid trägt (Abbildung 41). Die erhaltenen Oligomere wurden mittel RP-HPLC-MS(ESI) (Abbildung 214-222) und MALDI-TOF (Abbildung 239, 242-245) untersucht. Im Gegensatz zu den Alexa 647 gelabelten Oligomere war nun eine Auswertung möglich.

Die Oligomere **HJ-O3-O5** wurden daraufhin mit **Q2** für 24 h bei 37 C inkubiert. Die erhaltenen Produkte wurden mittels MALDI-TOF auf einen Umsatz überprüft. Hierbei konnten für alle drei Oligomere **HJ-O3-O5** Signale mit geringer Intensität für eine erfolgreiche Konjugation mit **Q2** nachgewiesen werden. Für **HJ-O4** und **HJ-O5** konnten jeweils zu den vollständig konjugierten Oligomeren ebenfalls die nur einfach bzw. zweifach mit **Q2** konjugierten Oligomerkonjugate detektiert werden.

2. Generation an HJ-Oligomeren

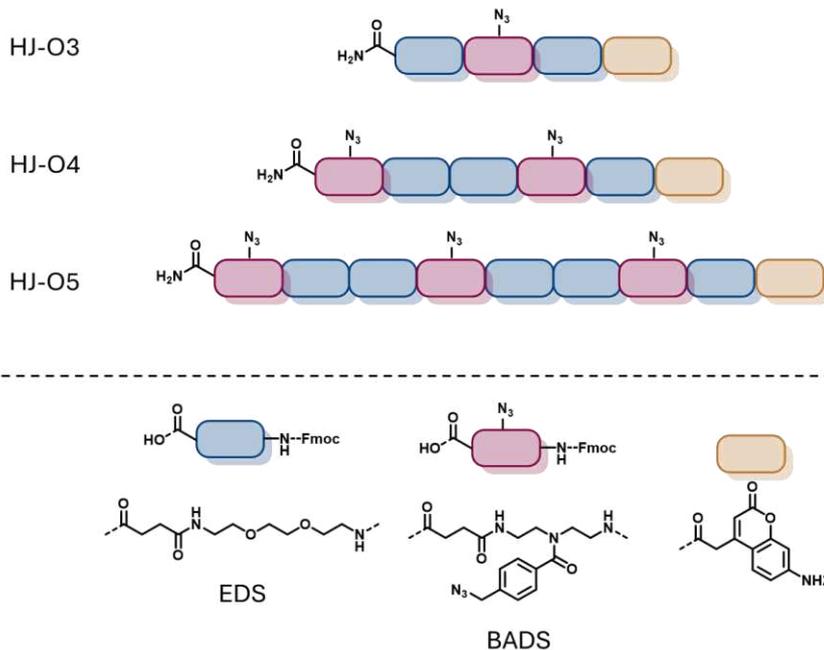


Abbildung 41 Schematische Darstellung der 2. Generation an Holliday-Junction Oligomeren **HJ-O3-O5**.

Aufgrund der Komplexität der Messung von DNA mittels MALDI-TOF wurde die Messung für **Q2** mit 3-Hydroxypicolinsäure (3-HPA) durchgeführt. 3-HPA ist eine für Nucleinsäuren optimierte Matrix und nicht für die Messung von Peptidomimetika geeignet. Durch die Konjugation von **Q2** mit den Oligomeren werden Mischstrukturen aus Nucleinsäureteilen und Peptidmimetikteilen erzeugt. Die nur schwachen Signale der **Q2**-Oligomer-Konjugate können dadurch erklärt werden, dass das Überführen der Konjugate in die Gasphase durch den Oligo(amidoamin)anteil in der 3-HPA Matrix nur eingeschränkt möglich ist. Um neben einer chemischen Analyse mittels MALDI-TOF, ebenfalls eine biologische Analyse mittels PAGE-Assays durchzuführen, wurden die Oligomere **HJ-O3-O5** an *Simon Vinther* übergeben. Die Konjugation der Oligomere mit **Q2** wurde über Nacht bei 4 °C, 25 °C und 37 °C durchgeführt. Hierbei konnte kein Unterschied im Umsatz mittels einer UREA-PAGE oder einer Nativen PAGE identifiziert werden (Abbildung 42).

Temperaturabhängige Konjugation der Oligomere mit Q2

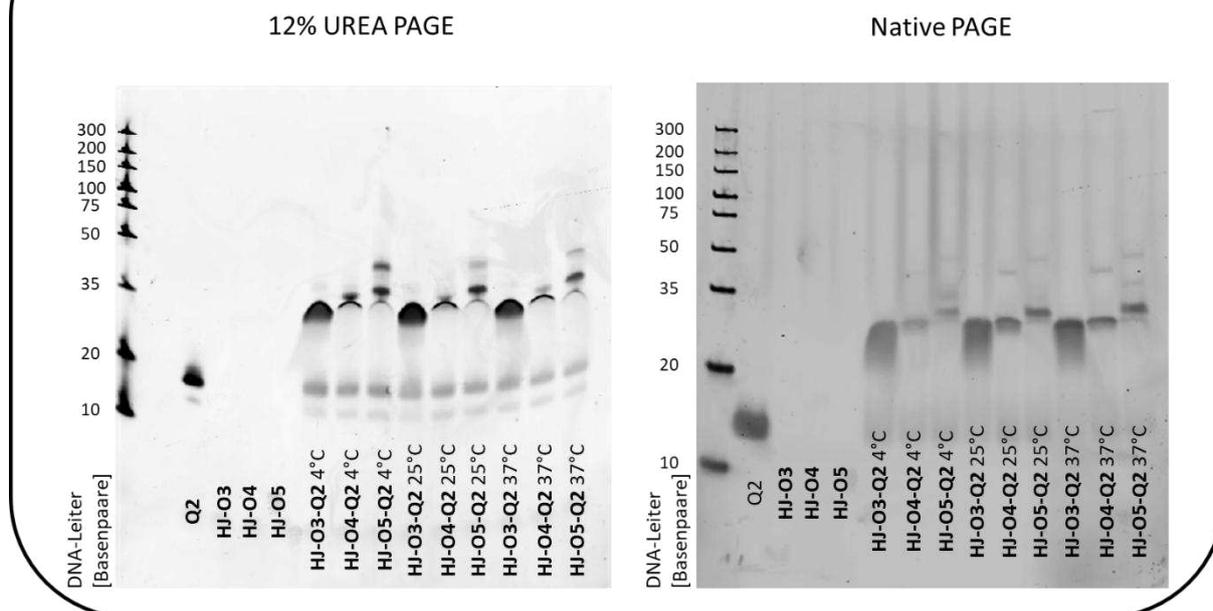


Abbildung 42 UREA-(links) und NATIV-PAGE (rechts) der mit **Q2** konjugierten **HJO3-O5** bei einer Reaktionstemperatur von 4°C, 25°C und 37°C durchgeführt von Simon Vinther.

Bei allen Konjugationen konnten Rückstände an **Q2** detektiert werden. Dies liegt daran, dass **Q2** für die Konjugationen im Überschuss eingesetzt wird. Beim Vergleich der **Q2** Bande mit den **Q2**-Oligomerkonjugaten ist zu erkennen, dass die Intensitäten ähnlich sind. Dadurch kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den restlichen **Q2**-Banden lediglich um überschüssiges **Q2** handelt. Analog zu den MALDI-TOF Ergebnissen ist zu erkennen, dass eine Mischung aus einfach für **HJ-O3-O5**, zweifach für **HJ-O4-O5** bzw. dreifach für **HJ-O5** konjugierten Oligomeren entstanden ist. Die Intensität der Banden für die Produkte im PAGE-Assay sind deutlich stärker ausgebildet als die Signalintensität der Produkte in den MALDI-TOF Messungen. Allerdings muss bei den PAGE-Analysen auch beachtet werden, dass es sich bei den **Q2**-Oligomer-Konjugaten um Mischstrukturen aus DNA und Oligo(amidoaminen) handelt. Das führt dazu, dass die kürzere Laufdistanz der einzelnen Banden nicht proportional zu der in Basenpaaren umgerechneten Größe der Oligo(amidoamine) ist. Beim Vergleich der Banden des Standards mit den Banden der **Q2**-Oligomerkonjugate ist zu erkennen, dass gerade für die Konjugation des ersten **Q2** mit den Oligomeren, die Anzahl der Basenpaare des Standards nicht mit der Anzahl im Konjugat übereinstimmt. Außerdem hat die unterschiedliche Größe der Oligomere kaum einen sichtbaren Einfluss auf die Laufdistanz, obwohl **HJ-O5** mit einem Molekulargewicht von $2402,66 \frac{g}{mol}$ eine fast 2,5 fach größere Masse hat als **HJ-O3** mit einem Molekulargewicht von $1023,12 \frac{g}{mol}$. Dadurch entsprechen die Banden der einfach mit **Q2** konjugierten Oligomere **HJ-O3-O5** einer Größe von ungefähr 30 Basenpaaren. Wird lediglich die Masse der Oligomere betrachtet, so entspräche **HJ-O3** ungefähr drei

Basenpaaren, **HJ-O4** ungefähr fünf Basenpaaren und **HJ-O5** ungefähr sieben Basenpaaren. **Q2** besteht aus 12 Basenpaaren, wodurch die **Q2**-Oligomer-Konjugate einer Größe von 15-20 Basenpaaren entsprechen würden. Kommt es zu einer Konjugation von mindestens einem weiteren **Q2**, so überwiegen die Eigenschaften der Nukleinsäuren und die Position der Banden entspricht ungefähr der Anzahl der Basenpaare der **Q2**-Oligomer-Konjugate.

Die in den PAGEs sichtbare Konjugation wurde auch mittels einer HPLC untersucht, um eine Einschätzung darüber treffen zu können, wie gut der Umsatz ist. In Abbildung 43 sind die RP-HPLC-Spektren der unkonjugierten Edukte **Q2** und **HJ-O3-O5** (oben links) und die jeweils konjugierten Produkte aus **Q2** mit den Oligomeren **HJ-O3-O5**. Hierbei sind die Produktspektren mit den jeweiligen Eduktspektren überlagert. In den Spektren ist zu erkennen, dass die Retentionszeiten mit der Kettenlänge zunehmen. Beim Übereinanderlegen der **Q2**-Oligomerkonjugate mit den Spektren der Kontrollsubstanzen ist zu erkennen, dass die **Q2**-Oligomerkonjugate zwischen dem jeweiligen Oligomer und **Q2** eluieren. Dadurch kann daraus geschlossen werden, dass die Konjugation erfolgreich ist.

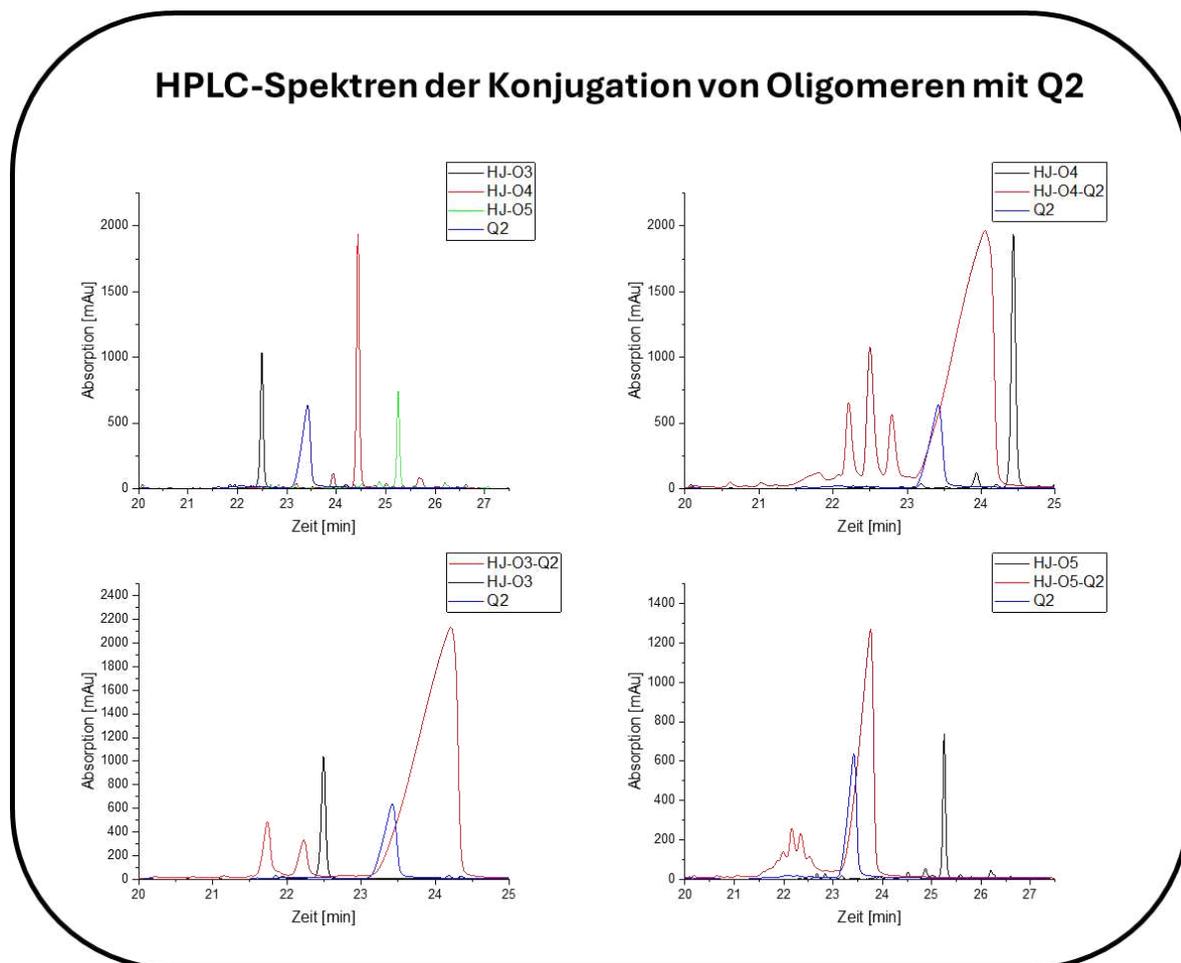


Abbildung 43 RP-HPLC-Spektren der Kontrolle aus den nicht konjugierten **Q2** und **HJ-O3-O5** (oben links). Gestackte RP-HPLC-Spektren aus den nicht konjugierten Edukten und den konjugierten Produkten (unten links= **HJ-O3**, oben rechts= **HJ-O4**, unten rechts **HJ-O5**) (durchgeführt von Simon Vinther).

3.2.5 Selbstassemblierung der DNA-Stränge **Q1**, **Q3** und **Q4** an die Oligo(amidoamin)-**Q2**-Konjugate.

Für die Selbstassemblierung der HJ wurden die **Q2**-Oligomerkonjugate mittels einer HPLC aufgereinigt. Die erhaltenen **Q2**-Oligomerkonjugate wurden über Nacht im äquimolaren Verhältnis mit den restlichen DNA-Strängen **Q1**, **Q3** und **Q4** bei Raumtemperatur inkubiert. Die Selbstassemblierung wurde mit einer UREA-PAGE untersucht (Abbildung 44).

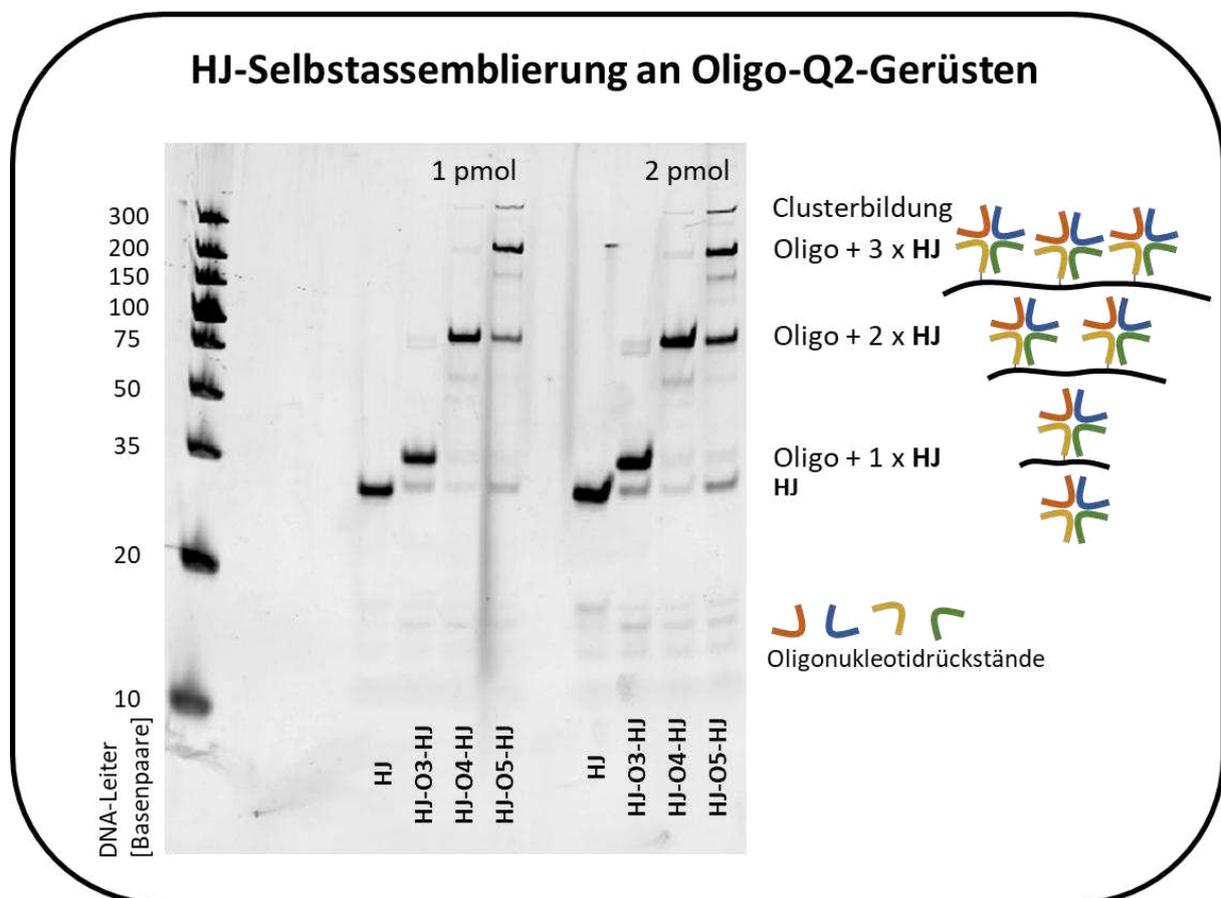


Abbildung 44 UREA-PAGE der selbstassemblierten Holliday Junction an den Oligomeren **HJ-O3-O5** (links). Schematische Darstellung der selbstassemblierten Kamm-Strukturen aus den Oligomeren **HJ-O3-O5** und den Holliday Junction. (durchgeführt von Simon Vinther)

Als Kontrolle wurde eine HJ verwendet, die nicht an ein Oligomer konjugiert wurde. In allen HJ-Konjugationen sind schwache Banden für die unkonjugierten HJ zu erkennen. Diese bilden sich aufgrund von nichtkonjugierten **Q2** aus, welches nicht mittels der RP-HPLC entfernt werden konnte. Für die Selbstassemblierung der HJ mit den Oligomeren **HJ-O3-O5** ist für alle drei Oligomergerüste eine Bande für ein vollständig mit HJ assembliertes Oligomer zu erkennen. Neben den Banden für eine vollständige Assemblierung ist für **HJ-O4** ebenfalls eine Bande mit nur einer HJ und für **HJ-O5** eine Bande für eine HJ und eine für zwei HJ sichtbar. Bei Betrachten der Intensität der Banden ist zu erkennen, dass die jeweils vollständig mit HJ assemblierten Oligomere am stärksten ausgeprägt sind. Für das Oligomer **HJ-O5** ist oberhalb der Bande für drei assemblierte HJ eine weitere Bande zu erkennen. Diese kann auf

Aggregation durch das Verknoten einzelner HJ-Oligomer-Konjugate miteinander zurückgeführt werden.

In diesem Modellversuch konnte erstmals gezeigt werden, dass HJ multivalent präsentiert werden können, und in der Lage sind Selbstassemblierung durchzuführen. Für eine weitere Syntheseoptimierung können der Abstand und die Anzahl der Azide vergrößert werden, um einerseits mehr HJ zu präsentieren und andererseits die Selbstassemblierung zu erleichtern. Ebenso können die verwendeten **Q1**, **Q3** und **Q4** Stränge durch funktionalisierte Stränge ersetzt werden. Wodurch eine multivalente HJ-Struktur mit bis zu drei unterschiedlich funktionalisierten DNA-Strängen hergestellt werden kann. Dadurch besteht die Möglichkeit, drei verschiedene Liganden gleichzeitig zu präsentieren. Es besteht die Möglichkeit die Multivalenz durch eine Art Kamm-Kamm-System zu erhöhen. Hierfür könnten die synthetisierten Oligomere mittels einer Grafting-Methode an ein Polymer angebracht werden. Ebenso besteht die Möglichkeit an die Enden der Oligomergerüste weitere DNA-Stränge anzubringen, die durch Selbstassemblierung lange Ketten oder durch Verzweigung eine Art Hydrogel ausbilden.

3.3. Synthese von Neu5Ac-haltigen Calix[5]arenen zur Bindung an das VP1 des MCPyV

Der Merkelzell-Polyomavirus (MCPyV) gehört zu der Klasse der Onkoviren und ist damit der erste für Menschen bekannte Onkovirus der Polyomaviren.¹⁴⁰ Er wird in Verbindung mit dem Merkelzellkarzinom gebracht. Bei ca. 80 % aller Merkelzellkarzinome konnte eine Infektion mit dem MCPyV nachgewiesen werden. Das Merkelzellkarzinom ist ein seltener, sehr aggressiver Hautkrebs mit einer Sterblichkeitsrate von 50 % nach 5 Jahren.^{141, 142} Je nach Altersgruppe können bei bis zu 80 % der gesunden Probanden Antikörper gegen den MCPyV nachgewiesen werden.^{143, 144} Die Infektion von Zellen erfolgt über das Kapsidprotein VP1.¹⁴⁵ Im ersten Bindungsevent bindet der MCPyV an sulfatierte Glykosaminoglykane. Allerdings sind Zellen, die keine mit Neu5Ac tragende Glykane besitzen, resistent gegen eine Infektion.¹⁴⁶ Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Neu5Ac nicht am ersten Bindungsevent beteiligt ist, allerdings für eine Infektion essenziell ist. Anhand einer Kristallstruktur des VP1 konnte bestimmt werden, dass es sich bei dem VP1 um ein symmetrisches, ringförmiges Homopentamer aus fünf VP1 Subeinheiten handelt. Die Bindungstaschen für die Neu5Ac sind hierbei auf der Oberseite des VP1 Pentamers angeordnet.

In der Vergangenheit wurden divalente Neu5Ac-Oligomere synthetisiert, welche erfolgreich an das VP1 von Polyomaviren binden kann.³¹ Bei den getesteten Oligomeren handelt es sich um lineare Oligomere. Um die Bindung der Neu5Ac an das VP1 zu verbessern, muss die Geometrie des Ligandensystems an das VP1 angepasst werden. Durch eine gewisse Rigidität und ein cyclisches System mit fünf Neu5Ac wird das Ansteuern von oben an alle fünf Bindungstaschen des VP1 erleichtert. Ein gut erforschtes rigides cyclisches System sind die Calix[n]arene.

Calix[n]arene sind makrozyklische Kondensate aus p-Alkylphenolen und Formaldehyd.¹⁴⁷ Die Synthese wird in einem Eintopfverfahren durchgeführt, wobei die Größe der Ringe durch die Reaktionsführung eingestellt werden kann.^{148, 149} Auffällig ist, dass bei der Synthese vermehrt Makrozyklen mit einer geraden Anzahl an Wiederholungseinheiten entstehen.¹⁵⁰ Bis heute ist der Mechanismus zur Synthese nicht vollständig geklärt.¹⁵¹ Bei Calix[n]arenen wird zwischen dem Upper und Lower Rim unterschieden. Beim Upper Rim handelt es sich um den aromatischen Rest und die Funktionalisierung in Parastellung der Phenole. Als Lower Rim werden die Hydroxygruppen und deren Funktionalisierung bezeichnet. Je nach Substitutionsmuster des Upper und Lower Rims sowie die Calix[n]arene Größe sind die Phenole in ihrer Position fixiert oder können durch den Kern hindurchschwingen und andere Konformationen einnehmen. Die Funktionalisierung des Upper und Lower Rims ist sehr gut untersucht.¹⁵²⁻¹⁵⁵ Hierbei wurden unter anderem Funktionalisierungen mit Zuckern untersucht. Diese Glykocalixarene haben zahlreiche medizinische Anwendungen als zielgerichtete

Liganden und als Transportmittel für Wirkstoffe.¹⁵¹ Eine Möglichkeit Glykocalixarene herzustellen, ist die Festphasensynthese. Die Syntheseroute von Calix[4]arenen wurde von *Alisa Kayser* im Arbeitskreis *Hartmann* optimiert.

Ziel dieses Projektes ist die physikalischen Eigenschaften der Calix[n]arene zu nutzen, um ein gezielteres Ansteuern des VP1 zu ermöglichen. Hierfür wurden sequenzdefinierte Calix[n]arene-Oligo(amidoamine) (n= 4 oder 5) mittels klassischer Kupfer-Click-Chemie mit Neu5Ac funktionalisiert. Hierbei wurden die Valenz und der Abstand zwischen die Neu5Ac-Liganden variiert.

3.3.1 Synthese der Neu5Ac haltigen Calix[4]arene und Calix[5]arene

Im Zuge dieses Projektes wurden die von *Alisa Kayser* synthetisierten Calix[4]arene und Calix[5]arene an der Festphase mit Neu5Ac funktionalisiert, um diese auf die Bindung an das VP1-Pentamer des MCPyV zu testen. Hierfür wurden drei verschiedene Neu5Ac funktionalisierte Calix[5]arene mit unterschiedlichen Abständen der Neu5Ac-Einheiten zueinander und variierender Valenz synthetisiert. Außerdem wurde ein Neu5Ac funktionalisiertes Calix[4]aren als Vergleichsstruktur synthetisiert (Abbildung 45). Die Synthese des Calix[5]aren-Bausteins musste neu im Arbeitskreis *Hartmann* von *Alisa Kayser* etabliert werden. Diese wurde analog zur bereits etablierten Synthese des Calix[4]aren-Bausteins durchgeführt, mit dem Unterschied, dass bei Calix[5]arenen eine selektive Alkylierung von vier von fünf Alkoholen nicht durchgeführt werden kann. Dadurch muss ein zusätzlicher Reaktionsschritt mit der selektiven Schützung eines Alkohols mittels einer Benzylschutzgruppe durchgeführt werden. Diese wird in einem weiteren Schritt entfernt und durch einen Hexansäurerest ersetzt.

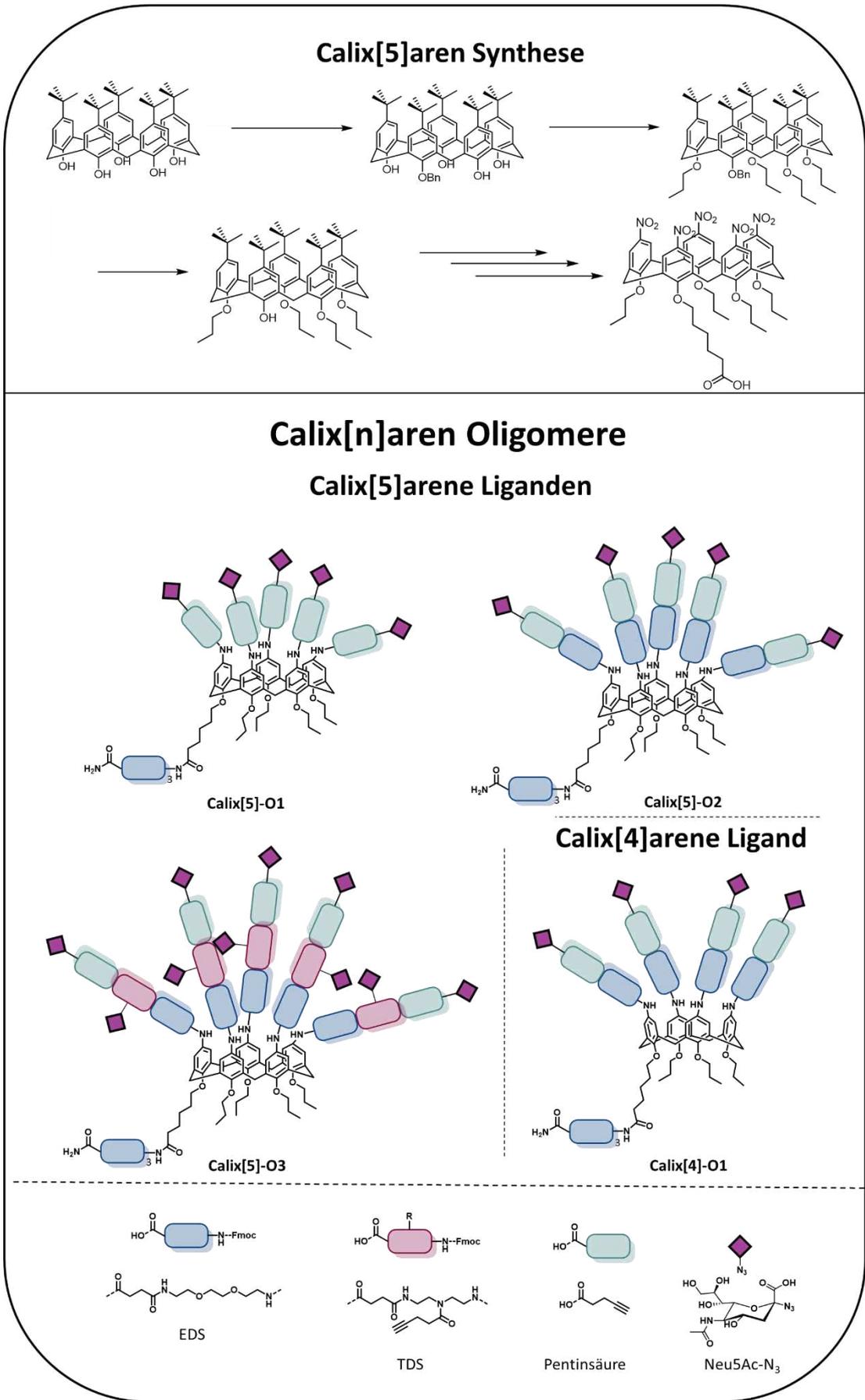


Abbildung 45 Syntheseroute des Calix[5]arene-Bausteins (oben). Schematische Darstellung der synthetisierten Neu5Ac funktionalisierten Calix[n]arene (n=4 und 5) Oligomere (unten).

Die Synthese der Oligomere wurde bis auf die Kupplung und Reduktion der Nitrogruppen zu Amininen von mir durchgeführt. Durch die Säurelabilität der Neu5Ac kann die Entschützung und Abspaltung der Oligomere nicht nach dem Standardprotokoll des Arbeitskreises *Hartmann* durchgeführt werden, da sonst die Neu5Ac vom Oligomer abgespalten werden würde. Um das Abspalten der Neu5Ac zu verhindern, wurden die Oligomere mit geschützter Neu5Ac von der Festphase abgespalten und anschließend mit LiOH in Methanol|Wasser entschützt. Aufgrund der thermischen Labilität der Neu5Ac konnte das Lösungsmittelgemisch nicht mit Hilfe eines Rotationsverdampfers entfernt werden, wodurch die Entfernung des Lösungsmittels mittels Lyophilisierung erfolgen musste. Die Oligomere wurden mittels RP-HPLC-MS(ESI) und ¹H-NMR untersucht. In den RP-HPLC-Spektren ist neben den Signalen für die gewünschten Oligomere eine Schulter zu erkennen. In den zugehörigen MS(ESI)-Analysen ist zu erkennen, dass in den Schultern Oligomere mit partiell hydrolysierten Neu5Ac zu finden sind. Die partielle Abspaltung kann entweder während der Entschützung und der Lyophilisierung oder auf der RP-HPLC-Säule erfolgen, da die Säule mit 0,1 vol.% Ameisensäure betrieben wird. Da in den ¹H-NMR-Analysen der Oligomere nicht das Proton des Triazols bei einer Verschiebung von mehr als 10 ppm nachgewiesen werden kann, ist davon auszugehen, dass die Oligomere vollständig funktionalisiert sind und die Hydrolyse auf der HPLC-Säule passiert.

3.3.2 NMR-Studien der Calix[5]arene

In der ¹H-NMR-Analyse der Calix[5]aren-Oligomere ist eine deutliche Verbreiterung der Signale zu erkennen. Diese Verbreiterung der Signale ist neben den Oligomeren auch bei dem Calix[5]arenBaustein sichtbar, allerdings nicht bei den mit *tert.*-Butyl funktionalisierten Calix[5]aren-Derivaten. Das liegt daran, dass der *tert.*-Butylrest sowie die Wasserstoffbrückenbindungen die Calix[5]arene in ihrer Position fixieren. Durch das Entfernen der *tert.*-Butyl-Gruppe ist die Rotation um die eigene Achse nicht mehr eingeschränkt, wodurch eine Vielzahl an Konformationsisomeren vorliegen. Um die Verbreiterung der Signale zu minimieren, kann die Temperatur, bei der die Messungen durchgeführt werden, variiert werden. Hierbei besteht die Möglichkeit, die Temperatur zu erhöhen, wodurch die Rotation der Calix[5]arene angeregt wird. Die erhöhte Rotation führt zur Koaleszenz der Signale, wodurch scharfe Signale entstehen. Hierfür wurde der Calix[5]aren-Baustein bei RT, 50 °C, 75 °C und 90 °C vermessen (Abbildung 46). Bei RT spalten die Wasserstoffatome durch verschiedenen eingenommenen Konformationen nur breite Signale aus. Daraus resultiert, dass die Basislinie nicht eindeutig vermessen werden kann und dadurch negative Werte entstehen. Mit steigender Temperatur nehmen die breiten Signale ab und die Schärfe der Signale nimmt zu. Daraus resultiert, dass bei 90 °C ein fast vollständig koalesziertes Spektrum zu erkennen ist. Ebenso besteht die Möglichkeit, die Rotation durch Absenken der Temperatur zu verringern, was zu einer Fixierung der verschiedenen Konformationsisomere führt. Dabei bildet jedes einzelne Konformationsisomer ein scharfes Signal aus.

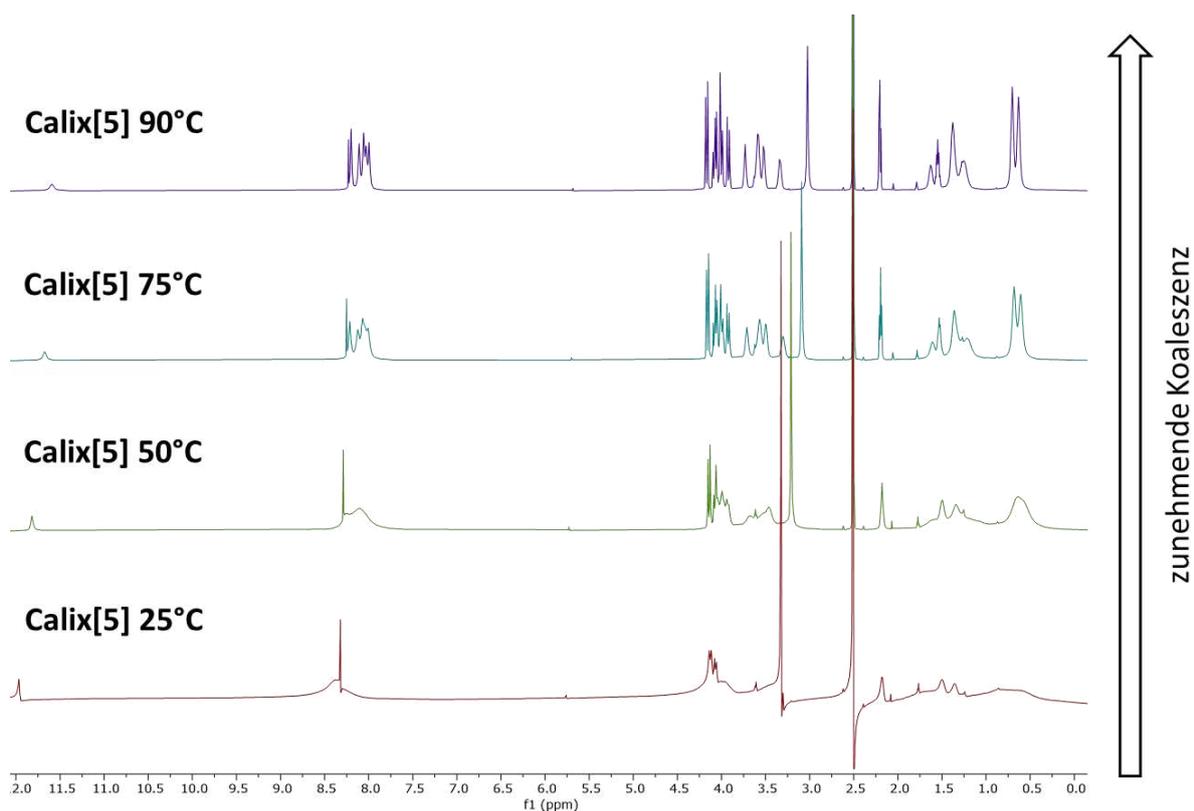


Abbildung 46 ¹H-NMR-Spektrum des Calix[5]-Bausteins bei RT, 50°C, 75°C und 90°C (600 MHz).

Neu5Ac funktionalisierte Oligomere können allerdings nicht auf über 40 °C erhitzt werden, da die Neu5Ac bei höheren Temperaturen nicht mehr stabil ist und zerfällt. Da allerdings durch die nicht funktionalisierten Calix[5]arene bekannt ist, dass für die Koaleszenz Temperaturen von 90 °C nötig sind, können für die sialylierten Oligomere keine koaleszierten Spektren aufgenommen werden. Aus diesem Grund, wurde versucht analysierbare Spektren durch Tieftemperaturmessungen zu erhalten. Beim Vergleich der ¹H-NMR-Spektren am Beispiel von Calix[5]short (Abbildung 47) ist zu erkennen, dass bei -40 °C viele sehr scharfe Signale zu erkennen sind. Dadurch, dass die Oligomere durch ihre Größe aus mehreren hundert Wasserstoffatomen bestehen, die chemisch sehr ähnlich sind, überlagern sich die einzelnen Signale zu Multipletts. Über die Protonen der N-Acetylgruppe der Neu5Ac und die Arylprotonen konnte eine vollgeständige Funktionalisierung nachgewiesen werden.

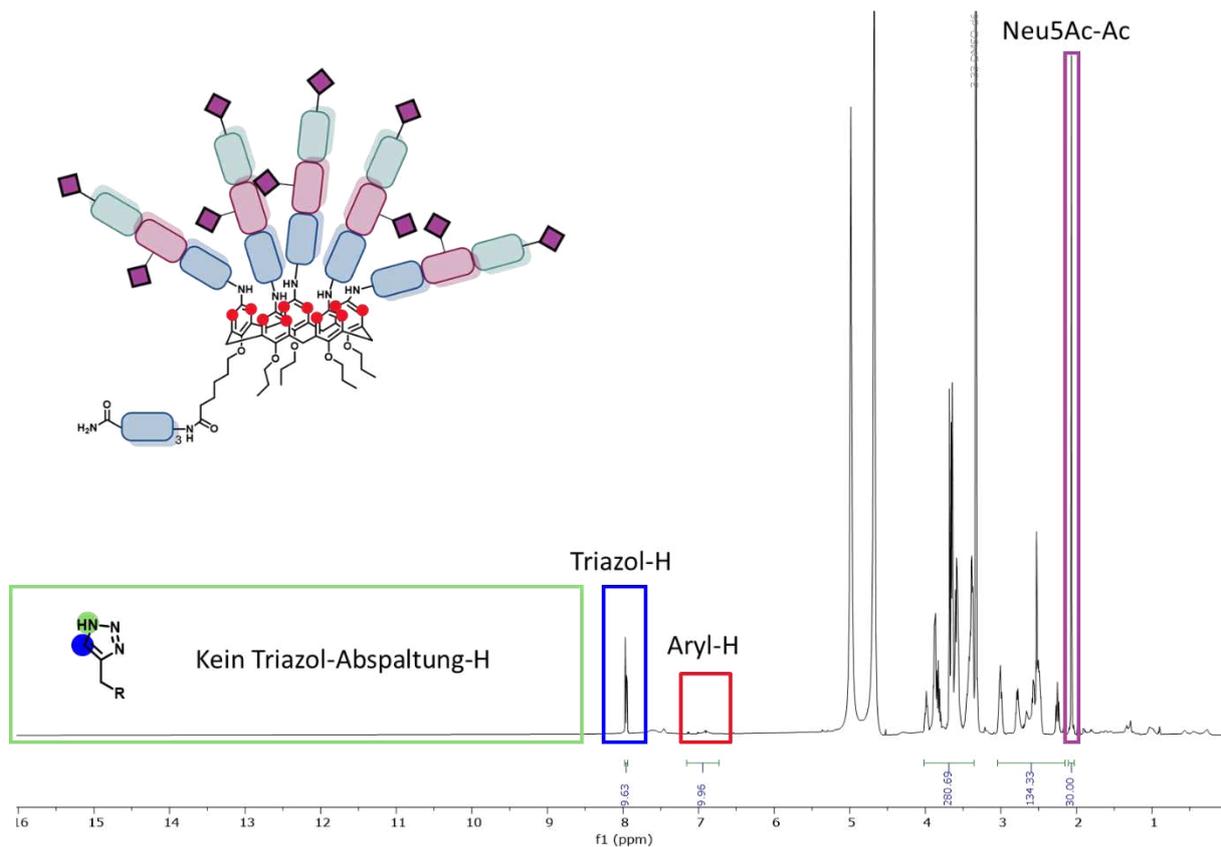


Abbildung 47 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zur Überprüfung der vollständigen Funktionalisierung der Calix[n]arene Oligomere mit Neu5Ac am Beispiel von Calix[5]-O3 in DMSO-d_6 600 MHz. (Lila Neu5Ac-Ac, 30H; Rot Aryl-H, 10H; Blau Triazol-H, 10H; Keine Triazol-Abspaltung-H)

Die synthetisierten Calix[n]aren-Oligomere wurden an *Jasmin Kuhn* aus der Gruppe von *Thilo Stehle* übergeben, um Bindungsstudien mit dem VP1-Protein durchzuführen. Um die Bindung der Calix[n]aren-Oligomere zu untersuchen, wurden Cokristallisationen aus den Oligomeren mit den VP1 durchgeführt. Die erhaltenen Kristalle wurden mit einem Synchrotron vermessen. Hierbei hat sich gezeigt, dass es zur Bindung einzelner Neu5Ac kommt, allerdings keine Aussagen über die Bindungsaffinität gemacht werden können. Dadurch, dass eine Bindung von Neu5Ac an das VP1 vereinzelt nachgewiesen werden konnte, und eine Kontamination der Oligomere mit Neu5Ac durch Festphasensynthese ausgeschlossen werden kann, ist es am wahrscheinlichsten, dass die Cokristallisationen des VP1 mit den Calix[n]aren-Oligomeren nicht erfolgreich gewesen ist. Eine Möglichkeit hierfür ist, dass die Flexibilität der Systeme trotz der Verwendung von Calix[n]arenen für eine Kristallisation zu groß ist, wodurch keine Kristallstruktur bestimmt werden kann. Da selbst bei dem Calix[4]aren-Oligomer keine Cokristallisation erzielt werden konnte, ist davon auszugehen, dass für die weniger rotationseingeschränkten Calix[5]aren-Oligomere ebenfalls keine Cokristalle mit dem VP1 ausgebildet werden können.

In zukünftigen Arbeiten können die synthetisierten Neu5Ac-Calix[n]aren-Oligomere (n=4 und 5) mittels anderer Methoden, z.B. SPR auf ihre Bindungsaffinität untersucht werden. Ebenso

besteht die Möglichkeit, die Neu5Ac-funktionalisierten Oligomere gegen andere Viren wie z.B. das Influenzavirus zu testen oder das Grundgerüst beizubehalten und mit anderen Liganden zu funktionalisieren.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde drei Methoden zur Konjugation von Sialinsäuren an multivalenten Gerüsten etabliert. Im ersten Teil der Arbeit lag der Fokus auf der Verwendung der enzymatischen Sialylierung zur Synthese von neuartigen Neu5Ac tragenden Liganden auf Basis von nicht glykanbasierten, natürlichen und nicht natürlichen Substraten. Im zweiten Teil wurde die multivalente Präsentation von Liganden mittels einer DNA-vermittelten Konjugation an sequenzdefinierten Oligo(amidoaminen) untersucht. Im dritten Teil wurde die Konjugation von Sialinsäure an cyclischen Präzisionsoligomeren mittels klassischer Click-Chemie untersucht.

Für die enzymatische Sialylierung wurde das Exo-Enzymatischen-Labeling-System aus NmCSS und PmST1 zur Sialylierung von Polyolmotiven genutzt. Die Enzyme wurden von *Robb de Vries* aus der Universität Utrecht zur Verfügung gestellt. Hierfür wurden zunächst das Puffersystem und die Kinetik bestimmt. Dabei konnte gezeigt werden, dass für ein Screening der beste getestete Puffer das Glycinamid ist, da hier die größte Anzahl an verschiedenen Substraten mit gutem Umsatz sialyliert werden können. Der Umsatz variiert allerdings zwischen den verschiedenen Puffern, sodass für eine Syntheseoptimierung für verschiedene Substrate unterschiedliche Puffer für einen maximalen Umsatz getestet werden müssen. In der Kinetik wurde gezeigt, dass nach 18 h ein Umsatz zwischen 53 % und 74 % des maximalen Umsatzes und ein Umsatz von 90 % des maximal Umsatzes nach 40 h – 64 h erreicht werden konnte. Im Screening wurden Tris-, Glycerin-, (P)EG- und Polyol-basierte Substrate untersucht.

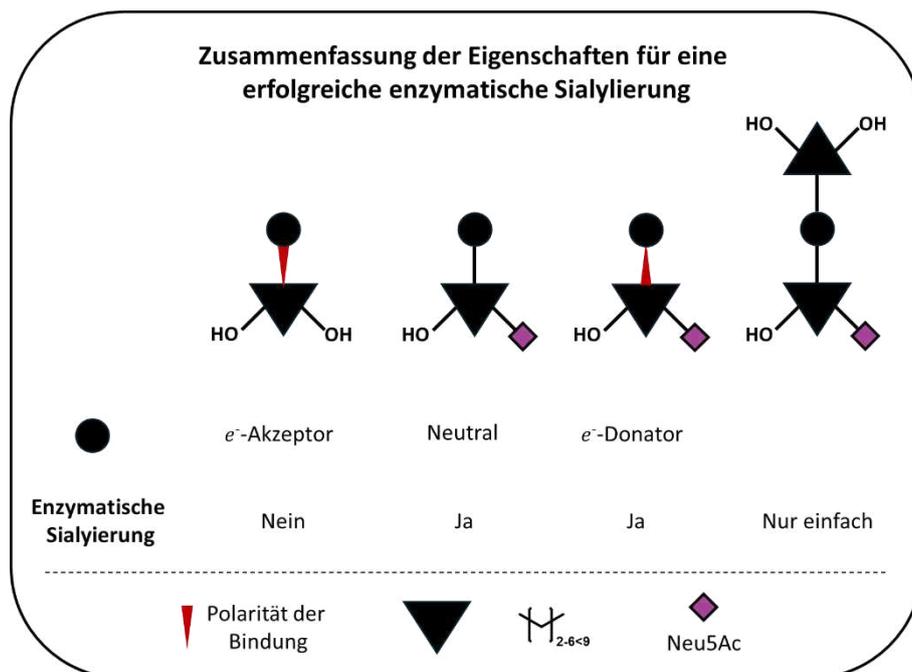
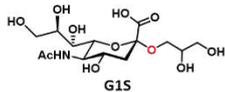
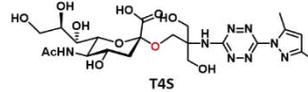
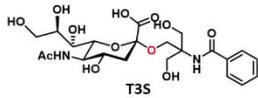
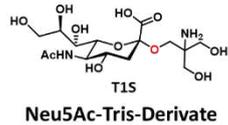
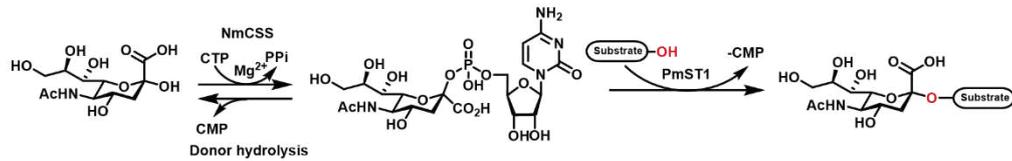


Abbildung 48 Schematische Darstellung der Eigenschaften der Substrate die für eine enzymatische Sialylierung begünstigend sind.

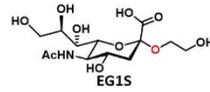
Es wurde gezeigt, dass für eine Sialylierung mindestens zwei Hydroxygruppen nötig sind, die maximal sechs bis neun Bindungen voneinander entfernt sein dürfen. Elektronendonierende und elektronenreiche funktionelle Seitenketten begünstigen eine Sialylierung. Ebenso konnte für keines der gescreenten Substrate, einschließlich für **T8**, welches aus zwei mit einem Propyllinker verknüpften Tris-Motiven besteht, eine Sialylierung von zwei Hydroxygruppen nachgewiesen werden. Die Sialylierung der Substrate wurde mittels RP-HPLC-MS(ESI) sowie mittels Permethylierung von **T1**, **T3**, **T4**, **G1**, **EG1** und **P2** nachgewiesen. Für dieselben Substrate konnte eine Separation und Isolierung mittels SEC für niedermolekulare Substanzen erfolgreich durchgeführt werden. Anschließend wurden erste Versuche zur multivalenten Präsentation von sialylierten Tris-Derivaten durchgeführt. Hierfür wurde **T7** mit Ethylacrylat copolymerisiert. Bei der anschließenden Sialylierung konnte gezeigt werden, dass je höher der Ethylacrylatanteil ist, eine Sialylierung begünstigt wird.

In zukünftigen Projekten können verschiedene Schwerpunkte verfolgt werden. Hierbei besteht die Möglichkeit, weitere Polyol basierte Stoffklassen auf eine Sialylierung zu untersuchen. Ebenso besteht die Möglichkeit, Zuckerhybride bestehend aus Glykanen und Polyolmotiven herzustellen (Abbildung 49). Außerdem können verschiedene Copolymere mit unterschiedlichen Comonomeren auf den Sialylierungsgrad, die Biokompatibilität und die Bioabbaubarkeit sowie deren biologischen Eigenschaften untersucht werden. Alle synthetisierten Neu5Ac funktionalisierten Derivate können auf ihre biologischen Eigenschaften im Vergleich zu den natürlichen Derivaten untersucht werden.

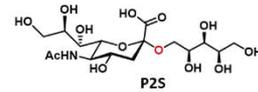
Projekt 1
Enzymatische Sialylierung von Polyolmotiven



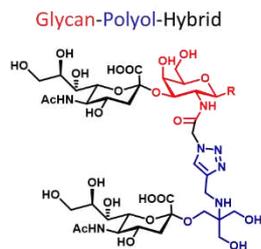
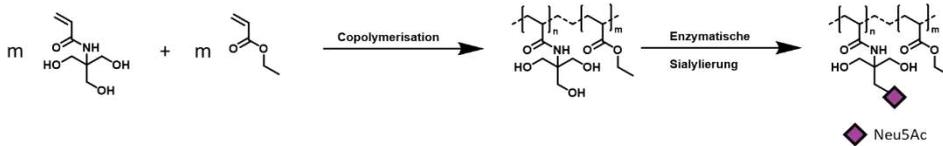
Neu5Ac-Glycerin-Derivate



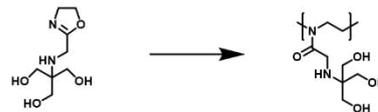
Neu5Ac-Ethylenglycol-Derivate



Neu5Ac-Polyol-Derivate



Oxazolin-Gerüst mit Tris-Motiv



Biobasierte Comonomere



Solketalacrylat



Tetrahydrofuranfurylacrylat



Tulipalin A

Abbildung 49 Schematische Darstellung der enzymatischen Sialylierung von nieder-(**T1S**, **T3S**, **T4S**, **G1S**, **EG1S** und **P2S**) und makromolekularen Polyolen (oben). Mögliche neuartige Anwendungen der enzymatischen Sialylierung für Glykan-Polyol-Hybride und Polyol-Polymere durch andere Monomersysteme (unten).

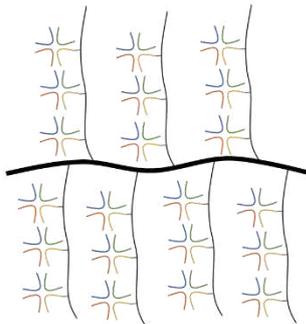
In Projekt 2 konnte ein neuartiges Kamm-System zur multivalenten Präsentation von Liganden aus der Konjugation von Oligo(amidoaminen) und Holliday Junction entwickelt werden. Hierfür wurden Oligo(amidoamine) mit ein bis drei Aziden synthetisiert. An die Oligomere wurde mittels meinem DBCO funktionalisierten DNA-Strang (**Q2**) eine kupferfreie CuAAC durchgeführt. Die Synthese der DNA-Stränge sowie deren biologische Auswertung wurde von *Simon Vinther* aus iNANO der Universität Aarhus durchgeführt. Um ein Verfolgen des Systems zu ermöglichen, wurden Fluoreszenzfarbstoffe an das Oligo(amidoamin)-Gerüst angebracht. In der ersten Generation wurde Alexa 647 verwendet. Hierbei konnte keine Konjugation des Oligo(amidoamin)-Gerüsts mit **Q2** nachgewiesen werden. Allerdings konnte für ein Gerüst ohne Alexa 647 eine Konjugation mittels MALDI(TOF) gezeigt werden. Daraufhin wurde für eine zweite Generation an Oligomeren ein Cumarinbaustein hergestellt. Dieser Baustein erleichterte die Synthese der Oligomere, da dieser mit der Festphasensynthese leicht an das Oligo(amidoamin)-Gerüst angebracht werden kann. Die Konjugation des Oligo(amidoamin)-Gerüsts mit **Q2** konnte mittels Nativer- und Urea-PAGE, RP-HPLC sowie MALDI(TOF) nachgewiesen werden. Die Selbstassemblierung der Holliday Junction an die DNA-Oligo(amidoamin)-Konjugate wurde durch Zugabe der drei anderen DNA-Stränge (**Q1**, **Q3**, **Q4**) erfolgreich durchgeführt. *Simon Vinther* vom iNANO der Universität Aarhus stellte die DNA-Stränge zur Verfügung und führte die Selbstassemblierung und PAGE-Assays durch. Die Synthese des Kamm-System aus Oligo(amidoaminen) und Holliday Junction konnte mittels UREA-PAGE nachgewiesen werden.

In zukünftigen Arbeiten können die einzelnen DNA-Stränge durch funktionalisierte Stränge ersetzt werden und auf spezielle Ziele und Eigenschaften getestet werden. Ebenso kann das System erweitert werden. Hierfür können entweder die Oligomer-HJ-Konjugate mit einer Grafting-Methode multivalent an ein Polymergerüst angebracht werden, wodurch ein Kamm-Kamm-System gebildet werden würde, oder das weitere DNA-Stränge an die Enden des Oligo(amidoamin)-Gerüst angebracht werden, wodurch durch Selbstassemblierung von langen linearen oder verzweigten hydrogelartige Oligo(amidoamine)-Holliday Junction-Konjugate synthetisiert werden können.

Projekt 2
Multivalente Kamm-Systeme aus Oligo(amidoaminen)
und Holliday Junctions



Kamm-Kamm-System



Selbstassemblierung mittels weiterer DNA-Stränge

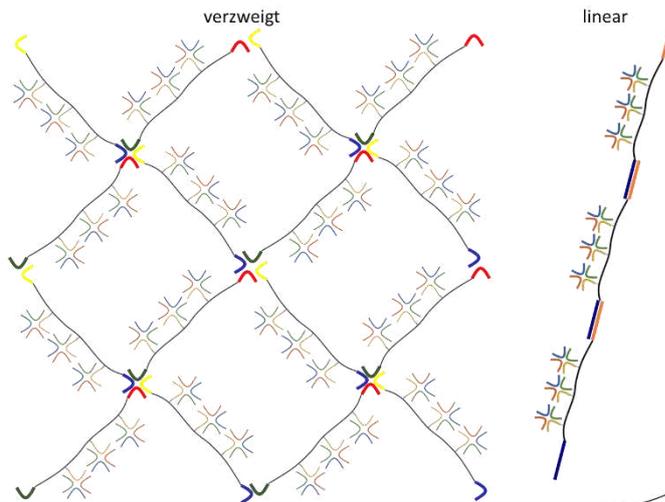


Abbildung 50 Schematische Darstellung möglicher zukünftiger Erweiterungen des multivalenten Kamm-System aus Oligo(amidoaminen) und Holliday Junction. Links ist ein Kamm-Kamm-System bei dem die Oligo(amidoamin)-Holliday Junction-Konjugate an eine langkettigen Polymermatrix konjugiert werden. Rechts wurden die Oligo(amidoamin)-Holliday Junction-Konjugate mittels weiterer anderer Selbstassemblierenden DNA-Strängen entweder verzweigt (hydrogelartig) oder linear erweitert.

Im dritten Projekt dieser Arbeit wurde ein Ligandensystem für symmetrische und cyclische Kapsidproteine mit fünf Bindungstaschen entwickelt. Ein Beispiel für ein Kapsidprotein ist das VP1 des Merkelzell-Polyomavirus. Hierfür wurden drei Oligomere synthetisiert, bei denen die Valenz und Bindungsabstände zwischen den Neu5Ac-Liganden variiert. Diese wurden mittels HPLC-MS(ESI), MALDI-(TOF) und $^1\text{H-NMR}$ (RT, Tieftemperatur) auf ihre Struktur und Reinheit untersucht. Die Calix[n]aren-Oligomere ($n = 4$ und 5) wurden mit dem VP1 des Merkelzell-Polyomavirus von Jasmin Freytag kokristallisiert und am Synchrotron vermessen. Hierbei konnte die Kristallstruktur des VP1 mit vereinzelt Neu5Ac aufgelöst werden. Die Calix[n]aren-Oligomere konnten nicht kristallisiert werden. Gründe hierfür sind einerseits die Rotationseigenschaften der Calix[5]arene sowie die Flexibilität des Oligo(amidoamin)-Gerüsts.

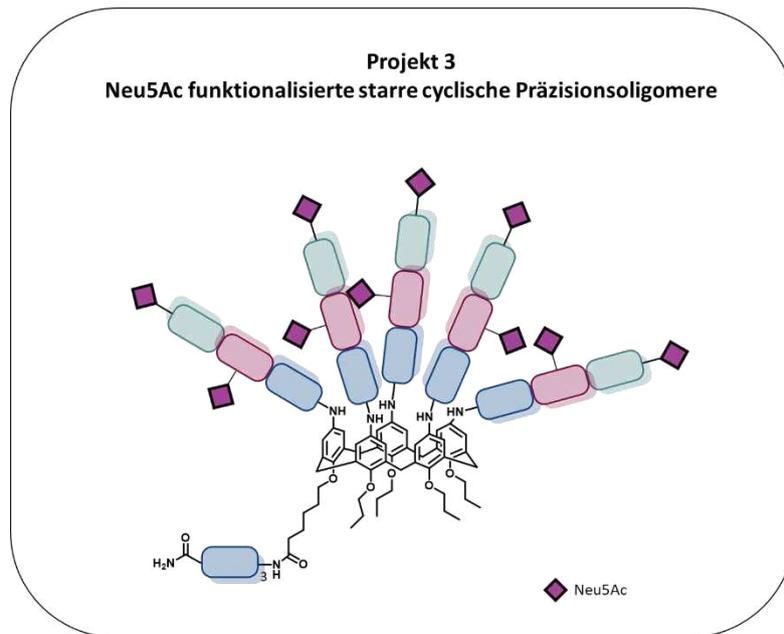


Abbildung 51 Schematische Darstellung eines exemplarischen Neu5Ac funktionalisierten Calix[5]arene-Oligomers.

In zukünftigen Arbeiten können die synthetisierten Neu5Ac-Calix[n]aren-Oligomere ($n=4$ und 5) gegen andere Viren wie z.B. das Influenzavirus getestet werden. Ebenso kann das Grundgerüst beibehalten werden und mit Liganden für andere Zielmoleküle funktionalisiert und getestet werden.

5. Experimentalteil

5.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften und Analytik

Alle durchgeführten Reaktionen mittels der Festphasensynthese wurden in Polypropylen Chromabond Spritzen durchgeführt. In diese sind am Boden mit Polypropylen Fritten und B7 Septen eingelegt. Das verwendete Tentagel SRam wurde bei Rapp Polymere mit einer Beladung von $0,23 \frac{mmol}{g}$ oder $0,27 \frac{mmol}{g}$ erworben.

Alle käuflich erworbenen Chemikalien wurden von den Herstellern Iris Biotech [Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat (PyBOP), N₂-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)-N₆-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)acetyl)-L-lysine (Lys-N₃) (99%), 1-Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylidenaminoxy)dimethylamino-morpholinocarbenium hexafluorophosphate (CUMO) (98%)], Roth [2-Mercaptoethanol (99%), Benzoylchlorid (99%)], Carbolution [Bernsteinsäureanhydrid, N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]glycin (Tricin) (99%)], Bio Basic [N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(4-butanesulfonic acid) (HEPBS)], Merck [Acetylchlorid (98%)], TCI [1,2-Bis(2-aminoethoxy)ethan (98%), meso-Erythritol (99%), 2-(Hydroxymethyl)-2-nitro-1,3-propanediol (99%)], Thermo Fisher Scientific [Oxalylchlorid (98%), Pentinsäure (95%), Triphenylmethylchlorid (98%), Trifluoressigsäure (99,5%), 2-Bromoethylprop-2-enoat (94%), Piperidin (99%), 2-Amino-2-methylpropan-1,3-diol (99%), Alexa Fluor™ 647 Hydrazide], J&K [3-Chlor-1-Propanol(99%)], Alfa Aeser [Methacryloylchlorid (97%)], Fluka [PEG], Applichem [N, N'-Dicyclohexylcarbodiimid (98%), (+)-Natrium-L-ascorbat (98%)], Ali Chem[3-(Prop-2-yn-1-yloxy)propane-1,2-diol (50%)], Aldrich [α,α' -Azo-isobutyronitril (AIBN) (98%), 1,5,7-Triazabicyclo[4.4.0]dec-5-en (98%), 2,2'-Diamindiethylamin (99%), Triisopropylsilane (99%), N,N'-Diisopropylcarbodiimide (99%)], abcr [Silbercarbonat (99%), [Bis(hydroxymethyl)phosphanyl]methanol (95%)], Fisher Chemical [Natriumazid (99%)], Cabrosynth [N-Acetylneuraminsäure (95%), 1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridinium 3-Oxide Hexafluorophosphat (98%)] und BLDpharm [Cytidin-5'-triphosphat Dinatriumsalz (CTP)(97%), 1-(9H-Fluoren-9-yl)-3-oxo-2,7,10,13,16,19,22,25,28-nonaoxa-4-azahentriacontan-31-säure (97%), 2-([6-(3,5-Dimethyl-1*H*-pyrazol-1-yl)-1,2,4,5-tetrazin-3-yl]amino)-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol (95%), (R)-(-)-3-Chloro-1,2-propanediol (99,82%), 9-Fluorenylmethoxycarbonylchlorid (98,34%), 2,3-Butanediol (98%), 3-(Prop-2-yn-1-yloxy)propane-1,2-diol (61,47%), 2-Amino-1,3-propanediol (98%), 2-(Cyclohexylamino)-ethansulfonsäure (98%), 1,3-Diamino-2-hydroxy-propan (98%), Glycinamide Hydrochloride (98%)] erworben.

Lösungsmittel und andere Chemikalien wurden dem Bestand des Arbeitskreises entnommen. Hierbei wurden nur Lösungsmittel, welche mindestens destillativ gereinigt wurden, verwendet. Die Reinheit wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ -Analyse untersucht.

Das verwendete Kieselgeld mit einer Korngröße von 0,04 mm bis 0,063 mm wurden von den Herstellern Macherey–Nagel und Fluka erworben. Die DC-Platten (60 F254) wurden von der Firma Merck erworben und entweder mittels UV bei 254 nm, einer „Sugarstaining“-Lösung mit Anisaldehyd oder Zimtaldehyd oder mit Kaliumpermanganat ausgewertet.

Für die GPC wurde das Biogel P-2 extra fine (<45 μm wet bead size, 100-1800 MW) von BioRad verwendet.

Alle $^1\text{H-NMR}$ -Spektren wurden auf einem Spektrometer Avance III 300 oder 600 der Firma Bruker bei 25°C durchgeführt. Alle $^{13}\text{C-NMR}$ - und $^{19}\text{F-NMR}$ -Spektren wurden auf dem Avance III 600 durchgeführt.

RP-HPLC-MS(ESI)-Analysen wurden an einem Agilent 1260 Infinity Gerät durchgeführt. Dieses ist mit einem Wellenlängendetektor (VWD, 214 nm) ausgestattet und einer 6120 Quadrupole LC/MS Elektronenspray Ionisierungsquelle (ESI) ($\frac{m}{z} = 200 \text{ bis } 2000$) gekoppelt. Als Säulen wurden eine MZ-AquaPerfekt C18 RP Säule (3.0 x 50 mm, 3 μm) von Mz-Analysetechnik und eine VDSpher 100 HILICOH (250 x 4.6 mm, 5 μm) verwendet. Die Säulen wurden mit einem Wasser/Acetonitril- Gemisch mit 0,1 vol% Ameisensäure bei 25°C betrieben.

Zur Lyophilisierung von wässrigen Proben wurde ein Alpha 1-4 LD plus Instrument der Firma Christ Freeze Dryers GmbH mit -52°C und 0,1 mbar verwendet. Proben mit anderen Lösungsmittelgemischen wurden an einer Schlenklinie lyophilisiert.

Prep-RP-HPLC

Die C18-Prep-RP-HPLC-Analysen wurden auf einem Agilent Technologies 1260 Infinity Instrument mit einem variablen Wellenlängendetektor durchgeführt. Als Säule wurde eine CAPCELL PAK C18 (20 mm I.D. x 250 mm, 5 μM) verwendet.

Die HILIC-Prep-RP-HPLC-Analysen wurden auf einem Agilent Technologies 1260 Infinity Instrument durchgeführt.

Thermoschüttler

Die Reaktionen im Thermoschüttler wurden in einem Thermo Scientific MaxQ 4450 Tischorbitalschüttler bei 37 °C durchgeführt.

MALDI-TOF

Die MALDI-TOF-Analysen wurden entweder an einem MALDI-TOF/Tof UltrafleXtreme (durchgeführt von Dr. Peter Tommes, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) oder autoflexTOF/TOF (durchgeführt von Dr. Ralf Hanselmann, Universität Freiburg) der Firma Bruker Daltonics durchgeführt.

HR-ESI

Die HR-MS(ESI)-Spektren wurden entweder an einem UHR-QTOF maXis 4G von Bruker Daltonics (durchgeführt von Dr. Peter Tommes, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) oder an einem Agilent QTOF 6530 C gekuppelt mit Agilent HPLC1260 Infinity II durchgeführt. Alle Proben der Agilent QTOF 6530 C wurden auf einer Zorbax Eclipse-Analysesäule (1,8 µm, 2,1 x 50 mm) mit einer Flussrate von 0,4 mL gemessen, wobei eine Abstufung von 2 % Acetonitril, 98 % Wasser bis 98 % Acetonitril, 2 % Wasser über 17 min erfolgte. Allen Lösungsmitteln wurde zur Verbesserung der Ionisierung 0,1 % Ameisensäure zugesetzt. Die Detektion erfolgte im negativen Ionenmodus mit einer Quellenspannung von 3,5 kV und einer Gastemperatur von 250 °C.

UV-Vis

Die UV-Vis-Analyseaufnahmen wurden auf einem Zweistrahlenspektrometer Specord 210 Plus von Analytik Jena AG bei 25 °C aufgenommen. Die Proben wurden in Quarzküvetten vermessen.

MilliQ Wasser

Das MilliQ Wasser (ultrareines Wasser) mit einer Leitfähigkeit von 18.20 MΩ*cm wurde mit einem Thermo Scientific Barnstead Micropure ST erzeugt.

Microplate Reader

Am CLARIOstar Microplatereader von BMG LABTECH wurden für Absorptions- und Fluoreszenzmessungen in 384 well microliter plates von Greiner Bio-One durchgeführt.

Enzymatische Sialylierung

Screening

Die Edukt- und Komponentenlösungen wurden mit MQ-Wasser hergestellt und zusätzlich mit einem Acrodisc 32 mm Syringe Filter mit 0,1 µm Supor Membrane filtriert.

Alle Screeningreaktionen wurden in 50 µl Totalvolumen synthetisiert. Dem Reaktionsvial wurden 10 µL 1 M Puffer (pH 8,8, 200 mM, 200 mM MgCl₂(40 mM)), 5 µL einer 165 mM Neu5Ac Lösung (16.5 mM), 17.2 µl Wasser, 10 µL einer 165 mM CTP Lösung (33 mM), 5 µl der 110 mM Substratlösung (11 µM) und 0,5 µl NmCSS hinzugeführt und bei 37 °C geschüttelt. Nach einer Stunde wurden 2,3 µL der PmST1-Variante hinzugegeben und für weitere 19 h reagieren gelassen. Während der Reaktion fällt, weißes Magnesium Pyrophosphat aus der Reaktionslösung aus.

Als Puffer wurden CHES, HEPBS, Glycinamid und Bicin verwendet.

Aufgrund der geringeren Löslichkeit von **T4** wurde eine 24,4 mM Lösung hergestellt. 22,5 µl dieser Lösung wurden anstelle der Zugabe von Wasser der Reaktionslösung hinzugefügt, wodurch dieselbe Konzentration erzielt wurde.

Für die GPC-Trennungen und die Permethylierungen wurden die Enzymatischen Sialylierungen in einem Totalvolumen von 1 ml durchgeführt. Dies entspricht 200 µl Puffer, 100 µl Substratlösung, 100 µl Neu5Ac-Lösung, 200 µl CTP-Lösung, 46 µl NmCSS 344 µl Wasser und 46 µl PmST1 P34H M144L.

Analog zum Screening wurde **T4** in 444 µl Wasser gelöst und es wurde auf die Zugabe von Wasser verzichtet.

Entfernung der Enzyme aus der Reaktionslösung

Aus der Reaktionslösung der enzymatischen Sialylierung können die Enzyme mit einem Vivaspin 2 (SARTORIS, Membran 1000 MWCO) entfernt werden, da sonst nach der Lyophilisierung der erhaltene Feststoff nicht mehr löslich ist. Hierfür wird Vivaspin dreimal mit dem Füllvolumen gespült, um Verunreinigungen aus der Membran zu entfernen. Anschließend wird die Reaktionslösung in den Vivaspin eingefüllt und so lange zentrifugiert bis dreimal das Füllvolumen durch die Membran gelaufen ist. Das Filtrat wird gesammelt und lyophilisiert. Die lyophilisierte Probe wird bei -20 °C gelagert.

Permethylierung

Die Synthese wurde nach einer Vorschrift des Carbohydrate Reserach Center in Georgia durchgeführt und adaptiert.

Herstellung des NaOH-DMSO-Gels

In einem Falcontube werden 100 µl einer 50 %NaOH-Lösung mit 200 µL Methanol versetzt und mit einem Vortexer vermischt. Anschließend wird 4 ml wasserfreies DMSO hinzugegeben und erneut mit einem Vortexer vermengt. Hierbei fällt Natriumhydrogencarbonat als weißer Feststoff aus. Die Reaktionslösung wird bei 3000 rpm für 5 min zentrifugiert. Hierbei entsteht ein farbloses Gel am Boden des Falcontubes. Auf diesem Gel lagert sich das Natriumhydrogencarbonat ab. Der Überstand sowie das Natriumhydrogencarbot werden vorsichtig entfernt. Dieser Waschzyklus wird so lange wiederholt, bis kein Natriumhydrogencarbonat mehr aus der Lösung ausfällt. Das erhaltene Gel wird mit 1 ml wasserfreiem DMSO versetzt.

Das erhaltene Gel kann so für die Permethylierung verwendet werden oder unter wasserfreien Bedingungen gelagert werden. Nach der Lagerung muss das Gel erneut mit wasserfreiem DMSO gewaschen werden.

Methylierung

Die lyophilisierte Probe wird in einem Glasreaktor mit 200 µl wasserfreiem DMSO gelöst und zu 300 µl des NaOH-DMSO-Gels hinzugegeben. Nach der Zugabe von 100 µl Methyljodid wird die Reaktion für 15 min geschüttelt. Durch die Zugabe von 2 ml MQ-Wasser wird die Reaktion abgebrochen. Hierbei wird die Reaktionslösung trüb. Der nicht reagierte Methyljodidrückstand wird mit durchblubbern mit Stickstoff entfernt. Das permethylierte Produkt wird mit DCM extrahiert (30 sek.). Zur Phasentrennung wird das Gemisch bei 3000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Anschließend wird die Wasserphase entfernt und die organische Phase wird mit 2 ml Wasser gewaschen und zentrifugiert. Dieser Waschzyklus wird dreimal wiederholt. Nach dem letzten Waschzyklus wird die wässrige Phase vollständig entfernt und die organische Phase wird in ein Falcontube überführt. Das DCM wird im Stickstoffstrom entfernt. Das erhaltene Produkt wurde in Acetonitril gelöst und mittels RP-HPLC-MS(ESI) vermessen.

GPC

Die lyophilisierte Probe wird in 0,5 ml gelöst filtriert und auf eine 7 cm x 2 cm gepackte Säule aufgetragen. Die Flussrate wurde mit einer Pumpe auf 0,3 ml die Minute eingestellt. Es wurden 0,75 ml Fraktionen gesammelt. Die erhaltenen Fraktionen wurden lyophilisiert und mittels RP-HPLC-MS(ESI) vermessen.

5.2 Oligo(amidoamin)-Synthese

Die Synthese der Oligomere wird in Reaktorspritzen durchgeführt. Das Festphasenharz wird vor der ersten Nutzung und nach jeder Lagerung für 15 min mit DCM gequollen. Anschließend wird durch fünfmaliges Spülen auf das gewünschte Lösungsmittelmedium gewechselt. Die Zielstruktur wird durch abwechselnde Kupplungs- und Entschützungszyklen synthetisiert. Die Reaktorspritze wird während der Kupplungs- und Entschützungszyklen geschüttelt. Die Kupplungseffizienz wird mittels RP-HPLC-MS(ESI)-Analyse überprüft. Sollte keine vollständige Kupplung erfolgt sein wurde eine Doppelkupplung durchgeführt.

Bausteinkupplung

Die Fmoc-Schutzgruppe wird zweimal für 15 min mit einer 25 vol.% Piperidinlösung in DMF entfernt. Zwischen jedem Kupplungs- und Entschützungszyklus wird die Reaktorspritze mit zehnmal DMF gewaschen. Für die Kupplung wird der Baustein (5 Äq.) mit PyBOP (5 Äq) und DIPEA (20 Äq.) in DMF gelöst. Nach 3 min Präaktivierung wird die Reaktionslösung in der Reaktorspritze mit Harz überführt. Die Kupplung wird für 1 h durchgeführt. Ab der Kupplung des siebten Bausteins werden Doppelkupplungen durchgeführt. Hierfür werden zweimal 2,5 Äq. des Bausteins und PyBOP mit 10 Äq. DIPEA für 45 min gekuppelt.

N-Terminus Capping

Nach der Kupplung des letzten Bausteins des Oligomers kann optional der N-Terminus mit einer Acetyl-Gruppe abgeschlossen werden. Hierfür wird das Oligomer mit Essigsäureanhydrid für 30 min geschüttelt.

Kupfer katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition

Das geschützte Neu5Ac-Azid (2,5 Äq. Pro Alkin) wird in DMF gelöst. In jeweils separaten Vials werden 2 Äq. Natriumascorbat und 2,5 Äq. Kupfersulfat-Pentahydrat pro Alkin in Wasser gelöst, sodass nach dem Mischen der drei Lösungen ein DMF-Wasserverhältnis von 9:1 entsteht. Die Lösungen werden nacheinander in die Reaktorspritze mit dem Festphasenharz aufgezogen. Die Reaktorspritze wird lichtgeschützt über Nacht geschüttelt. Anschließend wird die Reaktionslösung entfernt und gesammelt, da das Neu5Ac-Azid in einer 10 gew. % Zitronensäurelösung gefällt und zurückgewonnen wird. Das Festphasenharz wird dreimal mit DMF gereinigt. Anschließend wird mit einer 0,2 M Natriumdiethyldithiocarbamatlösung in DMF/Wasser (1:1) die restlichen Kupferionen auf der Festphasen komplexiert und entfernt. Hierfür wird das Festphasenharz für 10 min mit der Natriumdiethyldithiocarbamatlösung inkubiert. Hierbei entsteht ein brauner Kupferkomplex, der mit iterativem Waschen mit Wasser und DMF von der Festphase entfernt werden kann. Nach vollständigen entfernen des Komplexes wird erneut Natriumdiethyldithiocarbamatlösung aufgezogen und inkubiert. Dies wird so lange wiederholt bis keine braune Färbung durch die Zugabe der Natriumdiethyldithiocarbamatlösung erfolgt.

Abspaltung des Oligomers von der Festphase

Für die Abspaltung des Oligomers von der Festphase wird eine Abspalllösung aus 95 vol% TFA, 2,5 vol.% TIPS und 2,5 vol.% DCM verwendet. Das Harz wird zweimal für 45 min mit der Abspalllösung inkubiert und anschließend in zwei separaten Gefäßen mit dem 20fachen Volumen an kaltem Diethylether gefällt. Das gefällte Oligomer wird zentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert und das Oligomer wird mit Diethylether gewaschen und erneut zentrifugiert und abdekantiert. Das Oligomer wird im Stickstoffstrom getrocknet. Anschließend wird das Oligomer in MQ-Wasser gelöst und für 20 min mit Stickstoff gespült. Die erhaltene Lösung wird eingefroren und mit Lyophilisiert.

Entschützung Neu5Ac

Das lyophilisiert Oligomer wird in einer 1:1 Wasser/Methanol mit 0,1 M LiOH entschützt. Nach 3 h wird die Reaktionslösung mit Amberlite IR 120 H⁺ auf pH von 4-5 eingestellt. Im Anschluss wird das Amberliteharz abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Die Lösung wird an einer Schlenklinie lyophilisiert, da Temperaturen von über 25 °C aufgrund der Hydrolyse der Neu5Ac vermieden werden sollten.

Präparative Aufreinigung

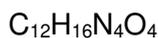
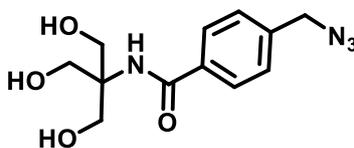
Die präparative Aufreinigung wird auf demselben Säulenmaterial wie die RP-HPLC durchgeführt. Die Probe wird hochkonzentriert in einem Gemisch aus 75/25 Wasser/Acetonitril auf die präparative Säule aufgetragen und Mithilfe der zuvor über die RP-HPLC bestimmten Laufmittelverhältnisse getrennt.

TFA Entfernung

Die TFA-Ionen werden mit Acetationen ausgetauscht. Hierfür wird das AG1-X8 Ionentauscherharz (quarternary ammonium, 100-200mesh, Acetatform, von BioRad) verwendet. Es wird ein hoher Überschuss an Ionentauscherharz verwendet, um einen vollständigen Austausch zu garantieren. Das Harz wird durch das dreimalige Waschen mit einer 1.6 M Essigsäurelösung und anschließendem dreimaligen Waschen mit 0,16 M Essigsäurelösung in einer Spritze mit Fritte aktiviert. Das lyophilisierte Oligomer wird in MQ-Wasser gelöst und in die Spritze mit dem Ionentauscher aufgezogen und für 1 h inkubiert. Die Lösung wird in einem Falcontube abgelassen und das Harz wird mit MQ-Wasser nachgespült. Das Wasser wird an einem Freezedryer entfernt.

5.3 Synthesen

4-(Chloromethyl)benzoesäure-TRIS-amid **T2**

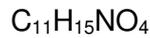
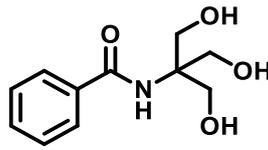


Die Synthese wurde nach der Vorschrift von Patrick Konietzny durchgeführt.

In einem Kolben werden 4 g Tris (33 mmol, 1 äq.) mit 8,7 ml TEA (6,34 g, 62,7 mmol, 1,9 äq.) in 40 ml DMF gelöst. Die Reaktionslösung wird für 30 min mit Argon entgast. Nach dem Entgasen wird die Lösung in einem Trockeneis-Aceton-Bad gekühlt und portionsweise eine Lösung aus 6,24 g 4-(Chloromethyl)benzoylchlorid (33,0 mmol, 1 äq.) in 10 ml DMF unter Schutzgas zugetropft. Nach vollständiger Zugabe der 4-(Chloromethyl)benzoylchlorid-Lösung wird das Trockeneis-Aceton-Bad entfernt und über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt. Um DMF-Rückstände zu entfernen, wird dest. Wasser zur Coevaporation verwendet.

5g des erhaltenen 4-(Chloromethyl)benzoesäure-TRIS-amid (18,3 mmol, 1 äq.) werden in 20 ml DMF gelöst und mit 5,95 g Natriumazid (91,5 mmol, 5 äq.) für 24 h bei 80 °C ungesetzt. Nach Abschluss der Reaktion wird die Reaktionslösung auf 5 - 10 ml eingeeengt. Die Reste an Natriumazid werden durch die Zugabe von 30 ml ACN ausgefällt. Der Feststoff wird bei 4400 rpm abzentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Der Überstand wird einrotiert. Abhängig von der Reinheit muss eine säulenchromatographische Aufreinigung erfolgen.

N-(1,3-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)propan-2-yl)benzamide **T3**



Die Synthese wurde an die Arbeiten von *Kosuke Yamamoto et.al.* angelehnt ist bereits publiziert.

3,64 g Tris (30 mmol) wird in 20 ml DMF und 5,6 ml TEA (40 mmol) gelöst. 2,32 ml Benzoylchlorid wird portionsweise der Reaktionslösung hinzugegeben und über Nacht gerührt. Die Reaktion wird mit 1 M Salzsäure gequencht und mit EE extrahiert. Die kombinierten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und mit einer 5 gew. % LiCl-Lösung werden DMF-Reste aus der EE Phase entfernt. Die Lösung wird mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Rohprodukt wurde mit einer Prep-HPLC gereinigt und lyophilisiert. Es wurde eine weißer Feststoff.

¹H NMR: (D₂O, 600 MHz): δ(ppm) 7.67 (d, 2H, **2**), 7.53 (t, 1H, **4**), 7.43(t, 2H, **2**), 3.82 (s, 6H, **1**)

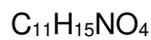
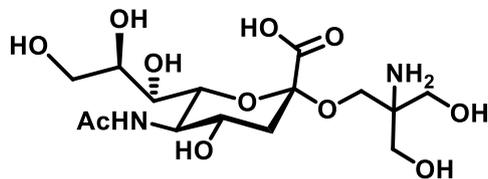
HRMS (ESI) m/z: [M+H]¹⁺ berechnet C₁₁H₁₆NO₄:226,1074; gefunden 226,1076

RP-HPLC: t_R = 3,59 min, Reinheit = 99 % (linearer Gradient von 5-95 % Acetonitril in H₂O (0,1 % Ameisensäure)).

Screening

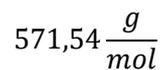
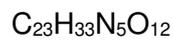
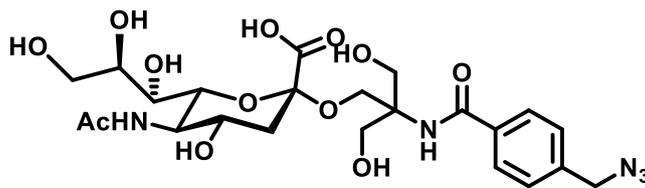
Die Synthese der gescreenten Substrate wurde nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift für die enzymatische Sialylierung durchgeführt.

T1S



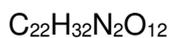
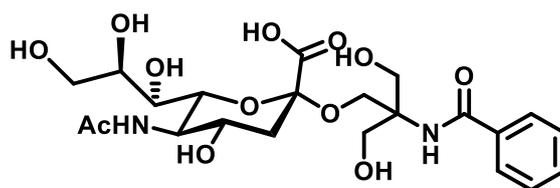
ESI MS: Berechnet für $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{NO}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 413,2; gefunden 413,2

T2S



ESI MS: Berechnet für $\text{C}_{23}\text{H}_{33}\text{N}_5\text{O}_{12}$ $[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$ 572,2; gefunden 572,2; $[\text{M}+\text{H}-\text{Sia}]^+$ 281,12
gefunden 281,05.

T3S

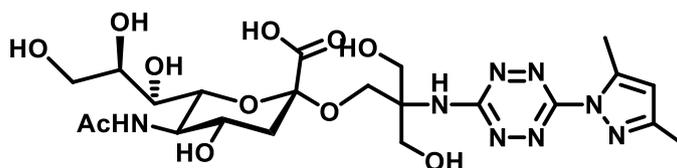


$$516,20 \frac{g}{mol}$$

ESI MS: Berechnet für $C_{22}H_{32}N_2O_{12}$ $[M+Na]^+$;, gefunden 539,2; $[M+H]^+$ 517,2; gefunden 517,2; $[M+H-Sia]^+$ 226,2; gefunden 226,2.

HR-ESI MS: Berechnet für $C_{22}H_{32}N_2O_{12}$ $[M+H]^+$ 515,1882, gefunden 515,1839

T4S

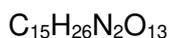
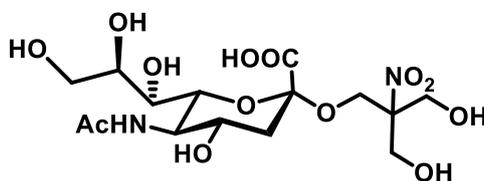


$$586,23 \frac{g}{mol}$$

ESI MS: Berechnet für $C_{22}H_{32}N_2O_{12}$ $[M+Na]^+$ 609,2; gefunden 609,2; $[M+H]^+$ 587,2; gefunden 587,2

HR ESI MS: Berechnet für $C_{22}H_{32}N_2O_{12}$ $[M+H]^+$ 585,2274; gefunden 585,2332

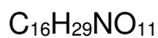
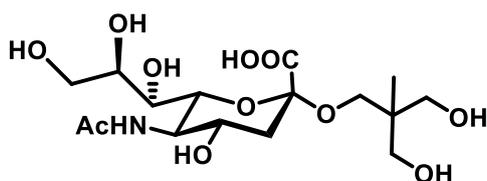
T5S



$$442,14 \frac{g}{mol}$$

ESI MS: Berechnet für $C_{15}H_{26}N_2O_{13}$ $[M+H]^+$ 443,14 gefunden -

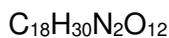
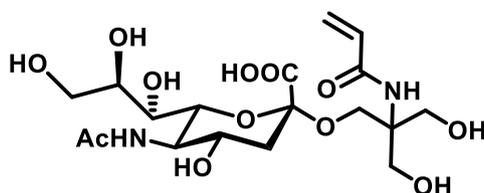
T6S



$$411,40 \frac{g}{mol}$$

ESI MS: Berechnet für $C_{16}H_{29}NO_{11}$ $[M+Na]^+$ 434,4; gefunden 434; $[M+H]^+$ 412,4; gefunden 412

T7S

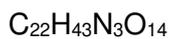
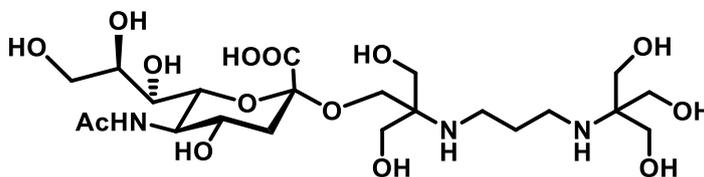


$$466,44 \frac{g}{mol}$$

ESI MS: Berechnet für $C_{130}H_{209}N_{35}O_{42}$ $[M+Na]^+$ 489,4; gefunden 489,3

T8S

(2R,4S,5R,6R)-5-acetamido-2-(2-((3-((1,3-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)propan-2-yl)amino)propyl)amino)-3-hydroxy-2-(hydroxymethyl)propoxy)-4-hydroxy-6-((1R,2R)-1,2,3-trihydroxypropyl)tetrahydro-2H-pyran-2-carboxylic acid

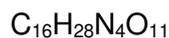
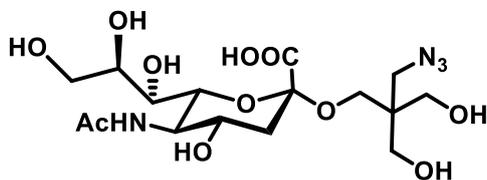


$$573,59 \frac{g}{mol}$$

ESI MS: Berechnet für $C_{22}H_{43}N_3O_{14}$ $[M+H]^+$ 574,6; gefunden 574,2

T9S

(2R,4S,5R,6R)-5-acetamido-2-(3-azido-2,2-bis(hydroxymethyl)propoxy)-4-hydroxy-6-((1R,2R)-1,2,3-trihydroxypropyl)tetrahydro-2H-pyran-2-carboxylic acid

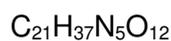
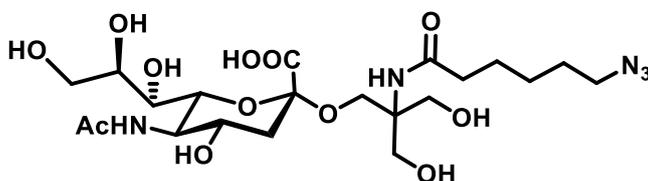


$$452,42 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

ESI MS: Berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_{11}$ $[\text{M}+\text{H}]^{6+}$ 453,4; gefunden -.

T10S

(2R,4S,5R,6R)-5-acetamido-2-(2-(6-azidohexanamido)-3-hydroxy-2-(hydroxymethyl)propoxy)-4-hydroxy-6-((1R,2R)-1,2,3-trihydroxypropyl)tetrahydro-2H-pyran-2-carboxylic acid

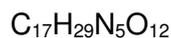
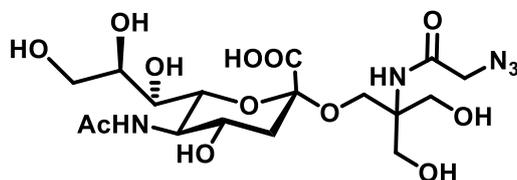


$$551,55 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

ESI MS: Berechnet für $\text{C}_{21}\text{H}_{37}\text{N}_5\text{O}_{12}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 574,5; gefunden 574,2.

T11S

(2R,4S,5R,6R)-5-acetamido-2-(2-(2-azidoacetamido)-3-hydroxy-2-(hydroxymethyl)propoxy)-4-hydroxy-6-((1R,2R)-1,2,3-trihydroxypropyl)tetrahydro-2H-pyran-2-carboxylic acid



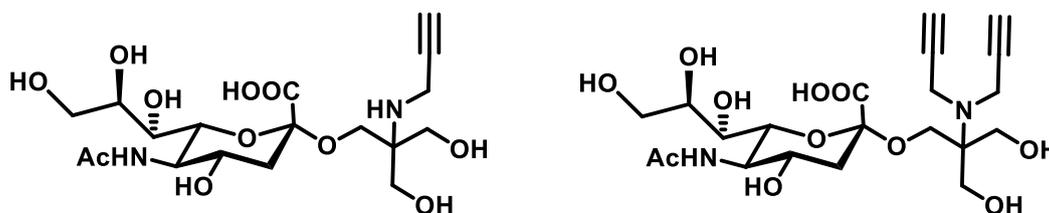
$$495,44 \frac{g}{mol}$$

ESI MS: Berechnet für $C_{17}H_{29}N_5O_{12}$ $[M+Na]^+$ 518,4; gefunden 518,15.

T12S

(2R,4S,5R,6R)-5-acetamido-4-hydroxy-2-(3-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-2-(prop-2-yn-1-ylamino)propoxy)-6-((1R,2R)-1,2,3-trihydroxypropyl)tetrahydro-2H-pyran-2-carboxylic acid

(2R,4S,5R,6R)-5-acetamido-2-(2-(di(prop-2-yn-1-yl)amino)-3-hydroxy-2-(hydroxymethyl)propoxy)-4-hydroxy-6-((1R,2R)-1,2,3-trihydroxypropyl)tetrahydro-2H-pyran-2-carboxylic acid



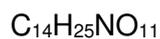
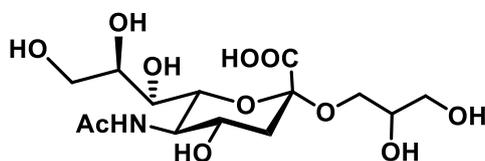
$$450,44 \frac{g}{mol} \quad 488,49 \frac{g}{mol}$$

ESI MS: Berechnet für $C_{18}H_{30}N_2O_{11}$ $[M+Na]^+$ 473,4; gefunden 474.

ESI MS: Berechnet für $C_{21}H_{32}N_2O_{11}$ $[M+H]^+$ 489,4; gefunden 489.

G1S

(2R,4S,5R,6R)-5-acetamido-2-(2,3-dihydroxypropoxy)-4-hydroxy-6-((1R,2R)-1,2,3-trihydroxypropyl)tetrahydro-2H-pyran-2-carboxylic acid



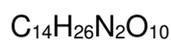
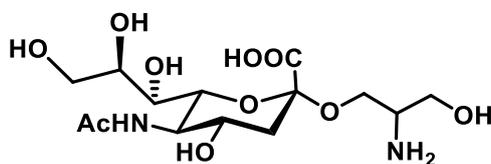
$$383,35 \frac{g}{mol}$$

ESI MS: Berechnet für $C_{14}H_{25}NO_{11}$ $[M+Na]^+$ 406,4, gefunden 406.

HR ESI MS: Berechnet für $C_{14}H_{25}NO_{11}$ $[M+H]^+$ 382,1355, gefunden 382,1355.

G2S

(2R,4S,5R,6R)-5-acetamido-2-(2,3-dihydroxypropoxy)-4-hydroxy-6-((1R,2R)-1,2,3-trihydroxypropyl)tetrahydro-2H-pyran-2-carboxylic acid

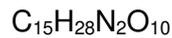
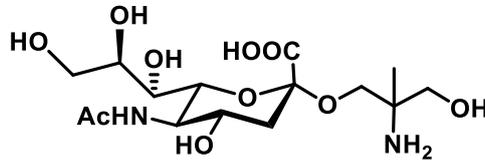


$$382,37 \frac{g}{mol}$$

ESI MS: Berechnet für $C_{14}H_{26}N_2O_{10}$ $[M+Na]^+$ 405,4; gefunden 405; $[M+H]^+$ 383,4; gefunden 383,2.

G3S

(2R,4S,5R,6R)-5-acetamido-2-(2-amino-3-hydroxy-2-methylpropoxy)-4-hydroxy-6-((1R,2R)-1,2,3-trihydroxypropyl)tetrahydro-2H-pyran-2-carboxylic acid

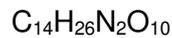
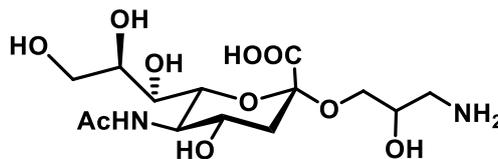


$$396,39 \frac{g}{mol}$$

ESI MS: Berechnet für $C_{15}H_{28}N_2O_{10}$ $[M+Na]^+$ 397,4 gefunden 397,2.

G4S

(2R,4S,5R,6R)-5-acetamido-2-(3-amino-2-hydroxypropoxy)-4-hydroxy-6-((1R,2R)-1,2,3-trihydroxypropyl)tetrahydro-2H-pyran-2-carboxylic acid

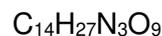
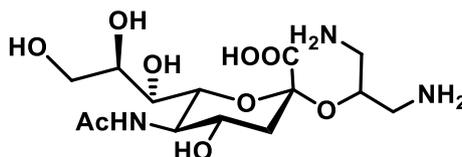


$$382,37 \frac{g}{mol}$$

ESI MS: Berechnet für $C_{14}H_{26}N_2O_{10}$ $[M+Na]^+$ 405,4; gefunden 405,95; $[M+H]^+$ 383,4; gefunden 382,8.

G5S

(2R,4S,5R,6R)-5-acetamido-2-((1,3-diaminopropan-2-yl)oxy)-4-hydroxy-6-((1R,2R)-1,2,3-trihydroxypropyl)tetrahydro-2H-pyran-2-carboxylic acid

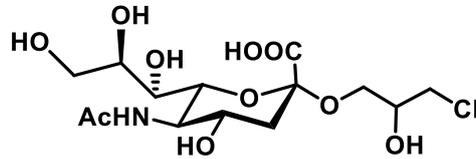


$$381,38 \frac{g}{mol}$$

ESI MS: Berechnet für $C_{14}H_{27}N_3O_9$ $[M+H]^+$ 382,4; gefunden -.

G6S

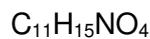
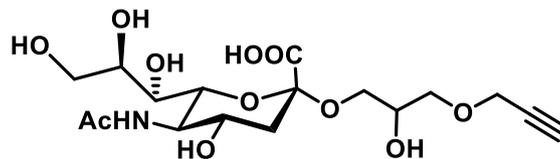
(2R,4S,5R,6R)-5-acetamido-2-(3-chloro-2-hydroxypropoxy)-4-hydroxy-6-((1R,2R)-1,2,3-trihydroxypropyl)tetrahydro-2H-pyran-2-carboxylic acid



$$401,79 \frac{g}{mol}$$

ESI MS: Berechnet für $C_{14}H_{24}ClNO_{10}$ $[M+Na]^+$ 424,8; gefunden 424,2.

G7S

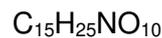
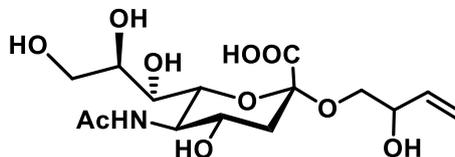


$$421,4 \frac{g}{mol}$$

ESI MS: Berechnet für $C_{11}H_{15}NO_4$ $[M+Na]^+$ 444,4; gefunden 444.

G8S

(2R,4S,5R,6R)-5-acetamido-4-hydroxy-2-(2-hydroxy-3-(prop-2-yn-1-yloxy)propoxy)-6-((1R,2R)-1,2,3-trihydroxypropyl)tetrahydro-2H-pyran-2-carboxylic acid

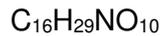
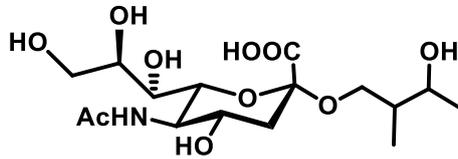


$$379,36 \frac{g}{mol}$$

ESI MS: Berechnet für $C_{15}H_{25}NO_{10}$ $[M+Na]^+$ 402,4; gefunden 402,2.

G9S

(2R,4S,5R,6R)-5-acetamido-4-hydroxy-2-(3-hydroxy-2-methylbutoxy)-6-((1R,2R)-1,2,3-trihydroxypropyl)tetrahydro-2H-pyran-2-carboxylic acid

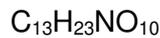
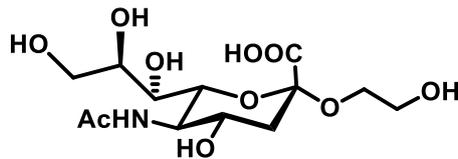


$$395,41 \frac{g}{mol}$$

ESI MS: Berechnet für $C_{16}H_{29}NO_{10}$ $[M+H]^+$ 396,4; gefunden -.

EG1S

(2R,4S,5R,6R)-5-acetamido-4-hydroxy-2-(2-hydroxyethoxy)-6-((1R,2R)-1,2,3-trihydroxypropyl)tetrahydro-2H-pyran-2-carboxylic acid

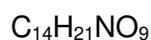
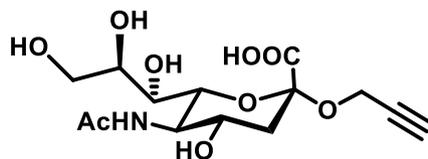


$$353,32 \frac{g}{mol}$$

ESI MS: Berechnet für $C_{13}H_{23}NO_{10}$ $[M+H]^+$ 354,3; gefunden 354.

EG2S

(2R,4S,5R,6R)-5-acetamido-4-hydroxy-2-(prop-2-yn-1-yloxy)-6-((1R,2R)-1,2,3-trihydroxypropyl)tetrahydro-2H-pyran-2-carboxylic acid

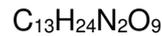
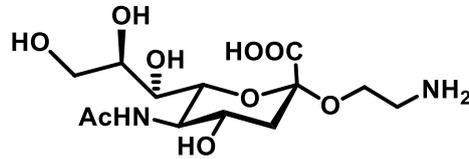


$$347,12 \frac{g}{mol}$$

ESI MS: Berechnet für $C_{14}H_{21}NO_9$ $[M+H]^+$ 348,1; gefunden -.

EG3S

(2R,4S,5R,6R)-5-acetamido-2-(2-aminoethoxy)-4-hydroxy-6-((1R,2R)-1,2,3-trihydroxypropyl)tetrahydro-2H-pyran-2-carboxylic acid

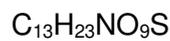
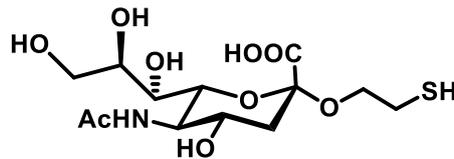


$$352,34 \frac{g}{mol}$$

ESI MS: Berechnet für $C_{13}H_{24}N_2O_9$ $[M+H]^+$ 353,3 gefunden -.

EG4S

(2R,4S,5R,6R)-5-acetamido-4-hydroxy-2-(2-mercaptoethoxy)-6-((1R,2R)-1,2,3-trihydroxypropyl)tetrahydro-2H-pyran-2-carboxylic acid

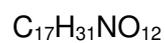
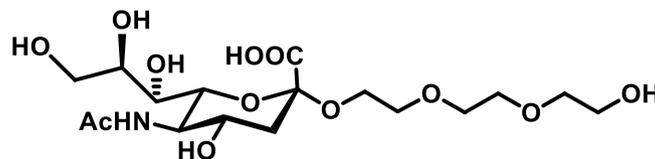


$$369,39 \frac{g}{mol}$$

ESI MS: Berechnet für $C_{13}H_{23}NO_9S$ $[M+H]^+$ 370,4, gefunden -.

EG5S

(2R,4S,5R,6R)-5-acetamido-4-hydroxy-2-(2-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)-6-((1R,2R)-1,2,3-trihydroxypropyl)tetrahydro-2H-pyran-2-carboxylic acid

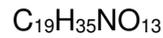
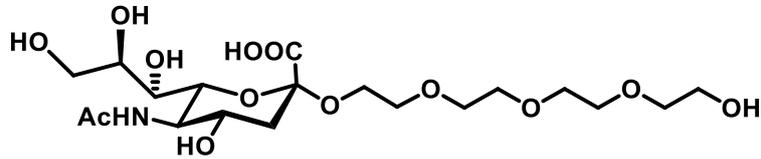


$$441,43 \frac{g}{mol}$$

ESI MS: Berechnet für $C_{17}H_{31}NO_{12}$ $[M+Na]^+$ 464,42; gefunden 463,85.

EG6S

(2R,4S,5R,6R)-5-acetamido-4-hydroxy-2-(2-(2-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)-6-((1R,2R)-1,2,3-trihydroxypropyl)tetrahydro-2H-pyran-2-carboxylic acid

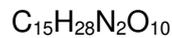
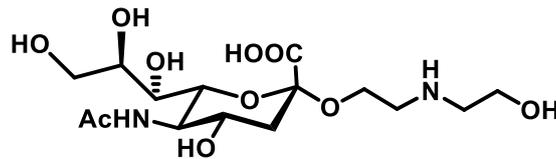


$$485,48 \frac{g}{mol}$$

ESI MS: Berechnet für $C_{19}H_{35}NO_{13}$ $[M+H]^+$ 486,5; gefunden -.

EG7S

(2R,4S,5R,6R)-5-acetamido-4-hydroxy-2-(2-((2-hydroxyethyl)amino)ethoxy)-6-((1R,2R)-1,2,3-trihydroxypropyl)tetrahydro-2H-pyran-2-carboxylic acid

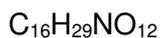
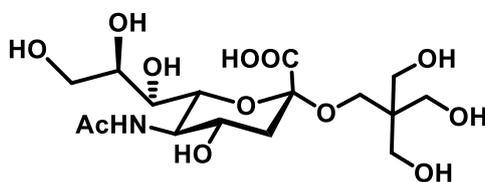


$$396,39 \frac{g}{mol}$$

ESI MS: Berechnet für $C_{15}H_{28}N_2O_{10}$ $[M+Na]^+$ 419,38; gefunden 419,95; $[M+H]^+$ 397,4; gefunden 397.

P1S

(2R,4S,5R,6R)-5-acetamido-4-hydroxy-2-(3-hydroxy-2,2-bis(hydroxymethyl)propoxy)-6-((1R,2R)-1,2,3-trihydroxypropyl)tetrahydro-2H-pyran-2-carboxylic acid

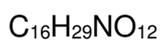
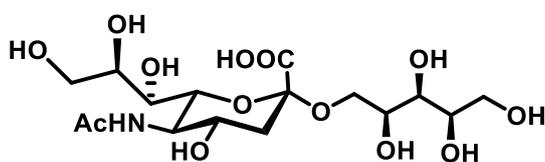


$$427,40 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

ESI MS: Berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{29}\text{NO}_{12}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 450,4; gefunden 450,2; $[\text{M}+\text{H}]^+$ 428,4; gefunden 427,8.

P2S

(2R,4S,5R,6R)-5-acetamido-4-hydroxy-2-(((2S,3S,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)oxy)-6-((1R,2R)-1,2,3-trihydroxypropyl)tetrahydro-2H-pyran-2-carboxylic acid



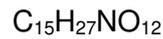
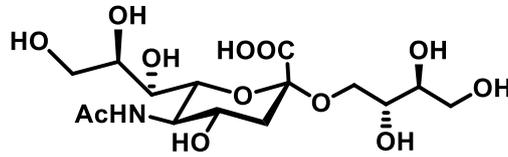
$$443,40 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

ESI MS: Berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{29}\text{NO}_{12}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 466,4; gefunden 466.

HR-ESI MS: Berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{29}\text{NO}_{12}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 442,1566; gefunden 442,1506.

P3S

(2R,4S,5R,6R)-5-acetamido-4-hydroxy-2-((2R,3S)-2,3,4-trihydroxybutoxy)-6-((1R,2R)-1,2,3-trihydroxypropyl)tetrahydro-2H-pyran-2-carboxylic acid

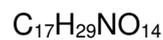
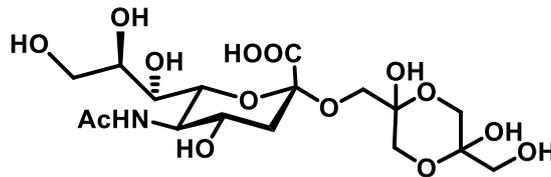


$$413,38 \frac{g}{mol}$$

ESI MS: Berechnet für $C_{15}H_{27}NO_{12}$ $[M+Na]^+$ 436,4; gefunden 436,2; $[M+H]^+$ 414,4; gefunden 414.

P4S

(2R,4S,5R,6R)-5-acetamido-2-((2,5-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)-1,4-dioxan-2-yl)methoxy)-4-hydroxy-6-((1R,2R)-1,2,3-trihydroxypropyl)tetrahydro-2H-pyran-2-carboxylic acid

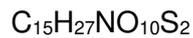
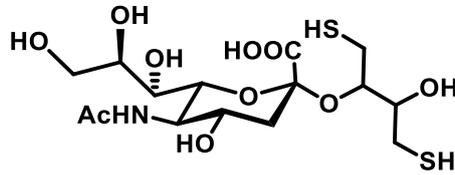


$$471,41 \frac{g}{mol}$$

ESI MS: Berechnet für $C_{17}H_{29}NO_{14}$ $[M+H]^+$ 472,4; gefunden 472,9.

P5S

(2S,4S,5R,6R)-5-acetamido-4-hydroxy-2-((3-hydroxy-1,4-dimercaptobutan-2-yl)oxy)-6-((1R,2R)-1,2,3-trihydroxypropyl)tetrahydro-2H-pyran-2-carboxylic acid

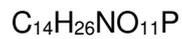
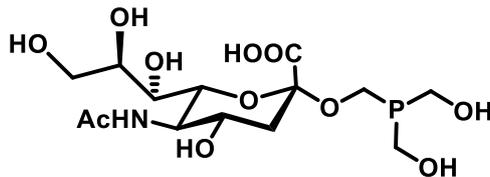


$$445,50 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

ESI MS: Berechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{27}\text{NO}_{10}\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 446,5; gefunden -.

P6S

(2S,4S,5R,6R)-5-acetamido-2-((bis(hydroxymethyl)phosphanyl)methoxy)-4-hydroxy-6-((1R,2R)-1,2,3-trihydroxypropyl)tetrahydro-2H-pyran-2-carboxylic acid

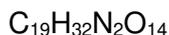
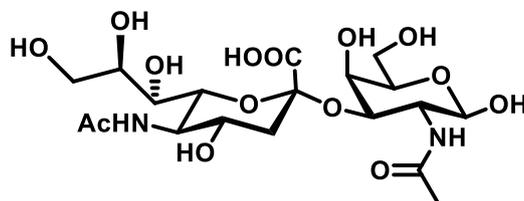


$$415,33 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

ESI MS: Berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{NO}_{11}\text{P}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 416,3; gefunden-.

P7S

(2S,4S,5R,6R)-5-acetamido-2-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-acetamido-2,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-4-yl)oxy)-4-hydroxy-6-((1R,2R)-1,2,3-trihydroxypropyl)tetrahydro-2H-pyran-2-carboxylic acid

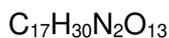
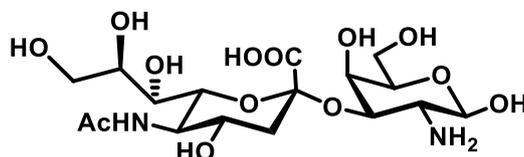


$$512,47 \frac{g}{mol}$$

ESI MS: Berechnet für $C_{19}H_{32}N_2O_{14}$ $[M+Na]^+$ 535,5; gefunden 535,2; $[M+H]^+$ 513,5; gefunden 513,1.

P8S

(2R,4S,5R,6R)-5-acetamido-2-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-amino-2,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-4-yl)oxy)-4-hydroxy-6-((1R,2R)-1,2,3-trihydroxypropyl)tetrahydro-2H-pyran-2-carboxylic acid



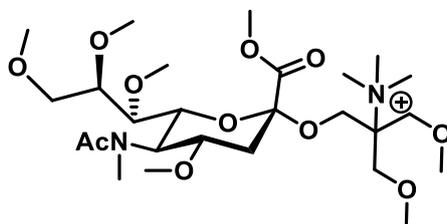
$$470,43 \frac{g}{mol}$$

ESI MS: Berechnet für $C_{17}H_{30}N_2O_{13}$ $[M+Na]^+$ 493,4; gefunden 493,2; $[M+H]^+$ 471,4; gefunden 471.

Permethylierung

T1S_{Per}

1,3-dimethoxy-2-(((2R,4S,5R,6R)-4-methoxy-2-(methoxycarbonyl)-5-(N-methylacetamido)-6-((1S,2R)-1,2,3-trimethoxypropyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)methyl)-2-(trimethyl-14-azaneyl)propan-1-ylum



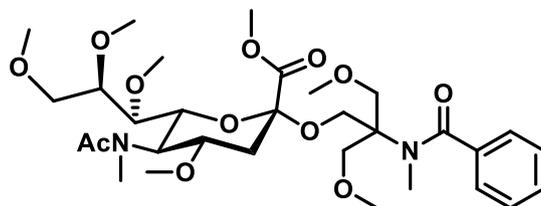
$$566,69 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

ESI MS: Berechnet für $\text{C}_{26}\text{H}_{50}\text{N}_2\text{O}_{11}^+$ $[\text{M}]^+$ 566,69 gefunden 567,4.

RP-HPLC-MS: $t_R = 8\text{-}10$ min (linearer Gradient von 5-95 % Acetonitril in H_2O (0,1 % Ameisensäure) in 30 min).

T3S_{Per}

methyl (2R,4S,5R,6R)-4-methoxy-2-(3-methoxy-2-(methoxymethyl)-2-(N-methylbenzamido)propoxy)-5-(N-methylacetamido)-6-((1S,2R)-1,2,3-trimethoxypropyl)tetrahydro-2H-pyran-2-carboxylate



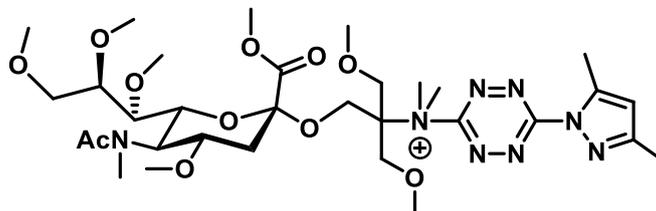
$$642,74 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

ESI MS: Berechnet für $\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{N}_2\text{O}_{12}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 665,7; gefunden 665,35; $[\text{M}+\text{H}-\text{Sia}]^+$ 282,2; gefunden 282,2.

RP-HPLC-MS: $t_R = 15,2$ min (linearer Gradient von 5-95 % Acetonitril in H_2O (0,1 % Ameisensäure) in 30 min).

T4S_{Per}

N-(1,3-dimethoxy-2-(((2R,4S,5R,6R)-4-methoxy-2-(methoxycarbonyl)-5-(N-methylacetamido)-6-((1S,2R)-1,2,3-trimethoxypropyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)methyl)propan-2-yl)-6-(3,5-dimethyl-1H-pyrazol-1-yl)-N,N-dimethyl-1,2,4,5-tetrazin-3-aminium



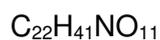
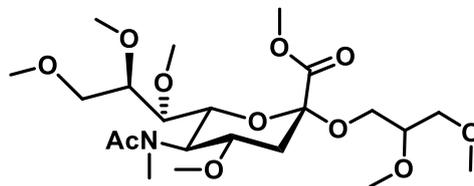
$$727,84 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

ESI MS: Berechnet für $\text{C}_{32}\text{H}_{55}\text{N}_8\text{O}_{11}^+$ $[\text{M}]^+$ 727,4 gefunden 727,4.

RP-HPLC-MS: $t_R = 10$ min (linearer Gradient von 5-95 % Acetonitril in H_2O (0,1 % Ameisensäure) in 30 min).

G1S_{Per}

methyl (2R,4S,5R,6R)-2-(2,3-dimethoxypropoxy)-4-methoxy-5-(N-methylacetamido)-6-((1S,2R)-1,2,3-trimethoxypropyl)tetrahydro-2H-pyran-2-carboxylate



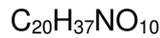
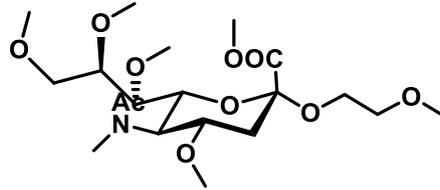
$$495,57 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

ESI MS: Berechnet für $\text{C}_{22}\text{H}_{41}\text{NO}_{11}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 518,6; gefunden 518,2; $[\text{M}+\text{H}]^+$ 496,6; gefunden 496,2.

RP-HPLC-MS: $t_R = 10$ min (linearer Gradient von 5-95 % Acetonitril in H_2O (0,1 % Ameisensäure) in 30 min).

EG1S_{PER}

methyl (2R,4S,5R,6R)-4-methoxy-2-(2-methoxyethoxy)-5-(N-methylacetamido)-6-((1S,2R)-1,2,3-trimethoxypropyl)tetrahydro-2H-pyran-2-carboxylate



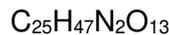
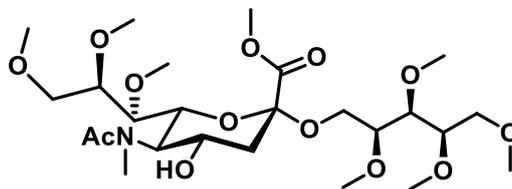
$$451,24 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

ESI MS: Berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{37}\text{NO}_{10}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 474,2; gefunden 474,2; $[\text{M}+\text{H}]^+$ 452,2; gefunden 452,2.

RP-HPLC-MS: $t_R = 10,2$ min (linearer Gradient von 5-95 % Acetonitril in H_2O (0,1 % Ameisensäure) in 30 min).

P2S_{Per}

methyl (2R,4S,5R,6R)-4-hydroxy-5-(N-methylacetamido)-2-(((2S,3S,4R)-2,3,4,5-tetramethoxypentyl)oxy)-6-((1S,2R)-1,2,3-trimethoxypropyl)tetrahydro-2H-pyran-2-carboxylate

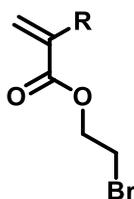


$$569,65 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

ESI MS: Berechnet für $\text{C}_{25}\text{H}_{47}\text{N}_2\text{O}_{13}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 570,7; gefunden 569,2.

RP-HPLC-MS: $t_R = 10,7$ min (linearer Gradient von 5-95 % Acetonitril in H_2O (0,1 % Ameisensäure) in 30 min).

Synthese von 2-Bromoethylacrylat **TM1** und 2-Bromoethylmethacrylat **TM2**



$$\mathbf{TM1} \text{ R} = \text{H C}_5\text{H}_7\text{BrO}_2 \quad 179,01 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

$$\mathbf{TM2} \text{ R} = \text{CH}_3 \text{C}_6\text{H}_9\text{BrO}_2 \quad 193,04 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

Unter Argonschutzgas wird das Säurechlorid (57,3 mmol, 1äq.) in 10 ml THF gelöst und in einem Eisbad gekühlt. In 50 ml THF werden 12,5 ml TEA (90,4 mmol) und 4,21 ml 2-Bromethanol (59,8 mmol, 1,05 Äq.) gelöst und über 30 min zur Reaktionslösung unter Schutzgas getropft. Das Eisbad wird nach vollständiger Zugabe entfernt und für 4 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wird mit DCM verdünnt und mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wird mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

Tabelle 8 Ansatzgrößen zur Synthese von **TM1** und **TM2**.

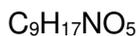
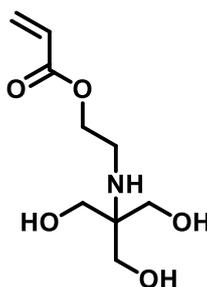
Ansatz	Säurechlorid	Volumen
TM1	Acryloylchlorid	4,7 ml
TM2	Methacryloylchlorid	5,5 ml

TM1 wurde mit einer Ausbeute von 70 % als gelbe stechend riechende Flüssigkeit isoliert. **TM2** wurde als gelb-braune Flüssigkeit mit stechendem Geruch mit einer Ausbeute von 80% isoliert.

TM1 ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 6,47 (dd, ³J = 17,30 Hz, ²J = 1,43 Hz, 1H, H-1 oder H-1'); 6,15 (dd, ³J = 17,3 Hz, ³J = 10,43 Hz, 1H, H-2); 5,89 (dd, ³J = 10,41 Hz, ²J = 1,42 Hz, 1H, H-1' oder H-1); 4,47 (t, ³J = 6,17 Hz, 2H, H-3); 3,55 (t, ³J = 6,14 Hz, 2H, H-4).

TM2 ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 6,17 (s, 1H, H-1 oder H-1'); 5,62 (s, 1H, H-1' oder H-1); 4,45 (t, ³J = 6,34 Hz, 2H, H-3); 3,55 (t, ³J = 6,09, 2H, H-4); 1,96 (s, 3H, H-5).

2-((1,3-Dihydroxy-2-(hydroxymethyl)propan-2-yl)amino)ethylacrylat **TM3**



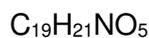
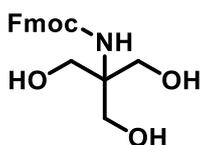
$$219,24 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

0,134 g Tris (1,10 mmol, 2 Äq.) wird in 40 ml Ethanol gelöst und mit 0,4 g Kaliumcarbonat unter Rühren suspendiert. 69 μl **TM1** (0,55 mmol, 1 Äq.) wird der Reaktionslösung portionsweise hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wird bei RT für 22 h gerührt. Die Reaktionslösung wird mit 40 ml Wasser versetzt und mit zweimal 100 ml Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und *in vacuo* entfernt. Es wurde ein Produkt mit einer Ausbeute von 48,2 % (0,27 mmol, 59,16 mg) erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 3,70 (t, $^3\text{J} = 5,85$ Hz, $^3\text{J} = 5,44$ Hz, 2H, H-3); 3,69 (s, 6H, H-1); 3,54 (q, $^3\text{J} = 7,02$ Hz, 2H, H-6); 2,53 (t, $^3\text{J} = 5,88$ Hz, $^3\text{J} = 5,42$ Hz, 2H, H-4); 1,21 (t, $^3\text{J} = 6,99$ Hz, 3H, H-7).

RP-HPLC-MS: $t_{\text{R}} = 12,07$ min, Reinheit = 98 % (linearer Gradient von 5-95 % Acetonitril in H_2O (0,1 % Ameisensäure)).

(9H-Fluoren-9-yl)methyl (1,3-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)propan-2-yl)carbamate **TM6**



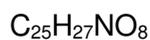
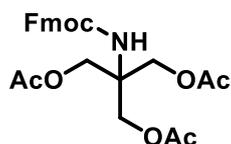
$$219,24 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

5,01 g Tris (40 mmol, 1 Äq.) **1** werden in einem Einhalskolben in 150 ml gesättigter Kaliumcarbonatlösung gelöst. Mit 150 ml THF wird ein Zweiphasensystem ausgebildet. Unter kräftig gerührt, wird 10,9 g Fmoc-Chlorid (42 mmol, 1,05 Äq.) hinzugegeben und für 18 h weiter gerührt. Die organische Phase wird *in vacuo* entfernt und die verbleibende wässrige Phase wird mit 300 ml Ethylacetat gewaschen. Die enthaltende organische Phase wird zweimal mit 100 ml einer gesättigten Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird bei vermindertem Druck reduziert. Bei der Konzentration fällt ein weißer Feststoff aus. Das Ethylacetat mit dem Feststoff wird in Diethylether umgefällt. Der zurückbleibende Feststoff wird abfiltriert und die organische Phase wird bei -20 °C rekristallisiert. **TM6** konnte mit einer Ausbeute von 39 % (5,28 g, 15,4 mmol) isoliert werden.

¹H-NMR (300 MHz, *d*₆-Aceton): δ (ppm) = 7,86 (d, ³J = 7,43 Hz, 2H, H-2); 7,70 (d, ³J = 7,43 Hz, 2H, H-5); 7,37 (m, 4H, ³J = 7,33 Hz, H-3 und H-4); 4,33 (d, 2H, ³J = 6,79 Hz, H-8); 4,24 (t, 1H, ³J = 6,81 Hz, H-7); 3,75 (s, 6H, H-11).

2-((((9H-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-2-(acetoxymethyl)propane-1,3-diyldiacetat

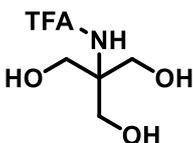
TM8



1 g **TM6** (4,6 mmol, 1 Äq.) wird in einem Einhalskolben vorgelegt und auf 0°C gekühlt. Dazu werden 10 ml Acetylchlorid (138 mmol, 30 Äq.) portionsweise hinzugetropft. Die Reaktion wird über Nacht auftauen gelassen. Das Acetylchlorid wird unter verringerten Druck entfernt. Das Produkt ist ein wachsartiger, weißer Feststoff. TM8 konnte mit einer Ausbeute von 99 % (1,6 g, 4,6 mmol) isoliert werden.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7,04 (s, 1H, N-H); 4,45 (s, 6H, H-4); 2,11 (s, 9H, H-6).

N-(1,3-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)propan-2-yl)-2,2,2-trifluoroacetamide **TM7**

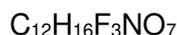
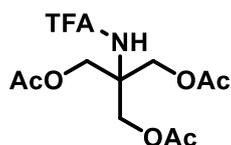


$$217,14 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

2,78 g Tris (23 mmol, 1. Äq) werden in 100 ml THF gelöst und durch ein Eisbad gekühlt. Unter Kühlung werden 3 ml Ethyltrifluoroacetat (25,3 mmol, 1,1 Äq.) hinzugegeben. Nach vollständiger Zugabe wird die Reaktion über Nacht bei RT gerührt. THF wird unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt ist eine wachsartige, weißer Feststoff isoliert werden. **TM7** konnte mit einer Ausbeute von 99% (5,11 g, 23 mmol) isoliert werden.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 3,84 (s, 6H, H-4).

2-(Acetoxymethyl)-2-(2,2,2-trifluoroacetamido)propane-1,3-diyldiacetat **TM9**



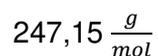
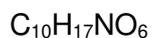
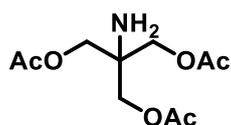
$$343,26 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

3,5 g (10,2 mmol, 1 Äq.) **TM7** wird in 38 ml Pyridin gelöst und mit einem Eisbad gekühlt. Unter Rühren werden mit einem Tropftrichter 4,33 ml (46 mmol, 4,5 Äq.) Essigsäureanhydrid über 1 h zugetropft. Nach vollständiger Zugabe wird das Eisbad entfernt. Nach 5 Stunden werden weitere 1,44 ml (15 mmol, 1,5 Äq.) Essigsäureanhydrid dazugegeben und für weitere 60 h gerührt. Der Kolbeninhalt wird in eine eiskalte Natriumhydrogencarbonat-Lösung gegeben und weiter mit Natriumhydrogencarbonat neutralisiert. Das Produkt fünfmal mit 50 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigte organische Phase wird zweimal mit 100 ml Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, abfiltriert und unter verminderten Druck konzentriert. Das Produkt wird fünfmal mit Ethylacetat coevaporiert. **TM9** konnte mit einer Ausbeute von 92 % (4,41 g, 9,4 mmol) isoliert werden.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7,77 (d, ³J = 7,57 Hz, 2H, H-2); 7,58 (d, ³J = 7,56 Hz, 2H, H-5); 7,41 (t, ³J = 7,46 Hz, 2H, H-3 oder H-4); 7,32 (t, ³J = 7,5 Hz, 2H, H-4 oder H-3); 5,16 (s, 1H, N-H); 4,38 (m, 8H, H-8 und H-11); 4,22 (t, ³J = 6,37 Hz, 1H, H-7); 2,07 (s, 9H, H-13).

RP-HPLC-MS: t_R = 13 min, Reinheit = 72 % (linearer Gradient von 5-95 % Acetonitril in H₂O (0,1 % Ameisensäure)).

2-(Acetoxymethyl)-2-aminopropane-1,3-diyldiacetat **TM10**



Synthese aus **TM8**

0,69 g **TM8** (1,47 mmol, 1 Äq.) wird in 2,4 ml Dichlormethan gelöst und es werden 0,76 ml Piperidin hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 1 h bei RT gerührt und DCM wird unter verminderten Druck konzentriert. Das Konzentrat wird mit Diethylether versetzt und bei -20 C gekühlt. Der Rückstand wird filtriert und mit wenig kaltem Diethylether gewaschen. Die Feststoff wird abfiltriert und die organische Phase unter vermindertem Druck entfernt. **TM10** konnte nicht isoliert werden.

Poly(T7_x-EA_{100-x})

In einem sekutierten Schlenkkolben werden die Monomere (**T7** und **EA**) mit 18,75 mg (0,114 mmol, 0,01 Äq.) AIBN in 15 ml DMF gelöst und für 4 h bei 70°C polymerisiert. Das Polymer wird entweder in Aceton oder Isopropanol gefällt, zentrifugiert und abdekantiert. Die Monomere werden mit einem Vivaspin mit 1 kDa abgetrennt. Die erhaltenen Polymere werden lyophilisiert.

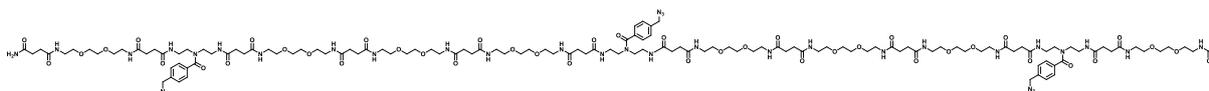
Polymer	T7	EA	Fällungsmittel	Ausbeute	M _n	Dispersität	Einbauverhältnis
Poly(T7₁₀₀-EA₀)	2,0 g (10,46 mmol, 1 Äq.)	-	Aceton	1,63 g (82 %)	30 kDa	1,72	-
Poly(T7₇₀-EA₃₀)	1,4 g (8 mmol, 0,7 Äq.)	0,37 ml (3,43 mmol, 0,3 Äq.)	Isopropanol	1,52 g (87 %)	71 kDa	1,37	64:36
Poly(T7₅₀-EA₅₀)	1 g (5,71 mmol, 0,5 Äq.)	0,6 ml (5,71 mmol, 0,5 Äq.)	Isopropanol	0,87 g (55 %)	27 kDa	1,27	51:49
Poly(T7₂₀-EA₈₀)	0,4 g (2,284 mmol, 0,2 Äq.)	1 ml (9,136 mmol, 0,8 Äq.)	Aceton	0,81 g (81 %)	-	-	-

Poly(T7₁₀₀-EA₀): ¹H-NMR (300 MHz, D₂O): δ (ppm) = 3,82 (s, 6H, H-5); 2,5-1,25 (m, 3H, H-1 und H2).

Poly(T7₇₀-EA₃₀): ¹H-NMR (300 MHz, D₂O): δ (ppm) = 4,19 (s, 1,28 H, H-4); 3,80 (s, 6H, H-10); 2,5- 1,3 (m, H-1,2,6,7); 1,3 (s, 1,74 H, H-5).

Poly(T7₅₀-EA₅₀): ¹H-NMR (300 MHz, D₂O): δ (ppm) = 4,19 (s, 1,92 H, H-4); 3,80 (s,6H, H-10); 2,5-1,3 (m, H-1,2,6,7) 1,3 (s, 2,84 H, H-5).

AO-01



$$2934,31 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

Die Verbindung **AO-01** wurden nach dem beschriebenen allgemeinen Kupplungsprotokoll am Tentagel S Ram Harz (0,26 mmol/g) synthetisiert.

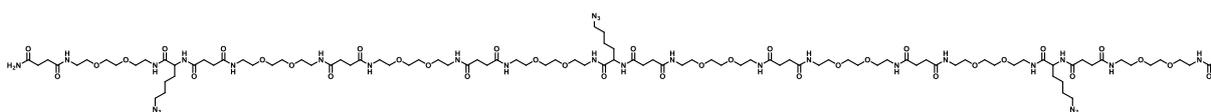
AO-01 wurde mit einer Ausbeute von 24 % (26,49 mg) und einer Reinheit von 70 % synthetisiert.

¹H-NMR (600 MHz, D₂O): δ (ppm) = 7.5 (d, ³J_{HH} = 7.95 Hz, 6H, Aryl-H); 7.4 (d, ³J_{HH} = 7.95 Hz, 6H, Aryl-H), 4.9 (s, 6H, N₃-CH₂), 3.71-3.50 (m, 100H, O-CH₂, N-H, CH₂-N-CH₂), 3.40-3.22 (m, 44H, (CO)-NH-CH₂), 2.57-2.38 (m, 44H, NH-CO-CH₂), 1.98 (d, 3H, -CH₃).

ESI MS: Berechnet für C₁₃₀H₂₀₉N₃₅O₄₂ [M+6H]⁶⁺ 478,8; gefunden 479,0; [M+5H]⁵⁺ 587,5; gefunden 578,8; [M+4H]⁴⁺ 734,2; gefunden 734,4; [M+3H]³⁺ 978,5, gefunden 979,0.

RP HPLC: (linearer Gradient von 0-50 vol.% MeCN in H₂O in 30 min bei 25 °C) t_R = 10,482 min.

AO-O2



$$2363,70 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

Die Verbindung **AO-O2** wurden nach dem beschriebenen allgemeinen Kupplungsprotokoll am Tentagel S Ram Harz (0,26 mmol/g) synthetisiert.

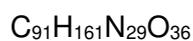
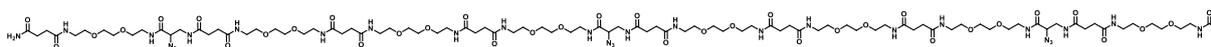
AO-O2 wurde mit einer Ausbeute von 42 % (16,82 mg) und einer Reinheit von 73 % synthetisiert.

¹H-NMR (600 MHz, D₂O): δ (ppm) = 4.25-4.22 (s, 3H, CO-CH-NH), 3.72-3.66 (m, 64H, O-CH₂), 3.64-3.60 (m, 21H, -NH), 3.45-3.30 (m, 32H, CO-NH-CH₂), 2.57-2.52 (m, 32H, NH-CO-CH₂), 2.0 (s, 3H, CO-CH₃), 1.84-1.38 (m, 24H, -CH₂ (Lys)).

ESI MS: Berechnet für C₁₀₀H₁₇₉N₂₉O₃₆ [M+5H]⁵⁺ 473,5; gefunden 473,6; [M+4H]⁴⁺ 591,6; gefunden 591,8; [M+3H]³⁺ 788,4; gefunden 788,6.

RP HPLC: (linearer Gradient von 0-50 vol.% MeCN in H₂O in 30 min bei 25 °C) t_R = 10,843 min.

AO-O3



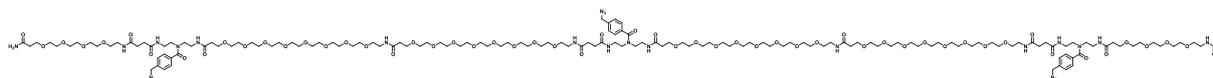
$$2237,46 \frac{g}{mol}$$

Die Verbindung **AO-O3** wurden nach dem beschriebenen allgemeinen Kupplungsprotokoll am Tentagel S Ram Harz (0,26 mmol/g) synthetisiert. Nach dem 6. Baustein wurde die Synthese abgebrochen, da die Analytik nicht die erwartete Struktur zeigte.

ESI MS: Berechnet für $C_{46}H_{83}N_{17}O_{18}$ $[M+H]^+$ 1162,6; gefunden 469,8.

RP HPLC: (linearer Gradient von 0-50 vol.% MeCN in H_2O in 17 min bei 25 °C) $t_R = 1,027$ min.

AO-O4



$$3280,79 \frac{g}{mol}$$

Die Verbindung **AO-O4** wurden nach dem beschriebenen allgemeinen Kupplungsprotokoll am Tentagel S Ram Harz (0,26 mmol/g) synthetisiert.

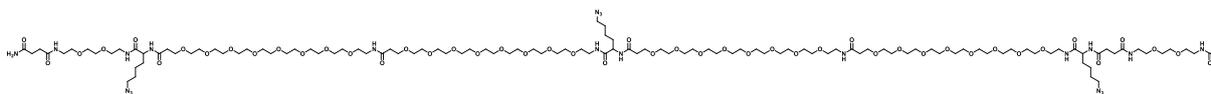
AO-O4 wurde mit einer Ausbeute von 62 % (33,51 mg) und einer Reinheit von 73 % synthetisiert.

¹H-NMR (600 MHz, D₂O): δ (ppm) = 7.50 (d, ³J_{HH} = 7.95 Hz, 6H, Aryl-H), 7.41 (d, ³J_{HH} = 7.95 Hz, 6H, Aryl-H), 4.49 (s, 6H, N₃-CH₂), 3.82-3.75 (m, 12H, CH₂-NH-CH₂), 3.72-3.50 (m, 172H, -O-CH₂, CO-NH-CH₂), 3.41-3.34 (m, 16H, -NH), 2.55-2.38 (m, 28H, NH-CO-CH₂), 1,98 (s, 3H, CO-CH₃)

ESI MS: Berechnet für C₁₄₆H₂₄₉N₂₇O₅₄ [M+6H]⁶⁺ 541,8; gefunden 542,0; [M+5H]⁵⁺ 650,0; gefunden 650,2; [M+4H]⁴⁺ 812,2; gefunden 812,6.

RP HPLC: (linearer Gradient von 0-50 vol.% MeCN in H₂O in 30 min bei 25 °C) t_R = 12,433 min.

AO-O5



$$2676,13 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

Die Verbindung **AO-O5** wurden nach dem beschriebenen allgemeinen Kupplungsprotokoll am Tentagel S Ram Harz (0,26 mmol/g) synthetisiert.

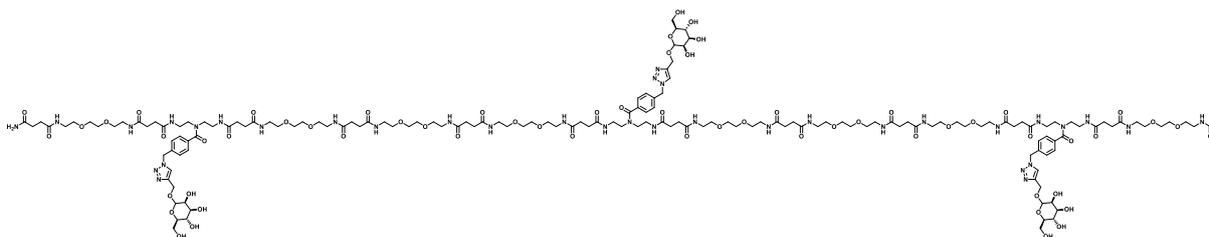
AO-O5 wurde mit einer Ausbeute von 24 % (10,77 mg) und einer Reinheit von 68 % synthetisiert.

¹H-NMR (600 MHz, D₂O): δ (ppm) = 4.30-4.22 (m, 3H, CO-CH₂-NH), 3.85-3.76 (m, 13H, NH), 3.74-3.56 (m, 144H, O-CH₂), 3.48-3.33 (m, 16H, CO-NH-CH₂), 2.65-2.53 (m, 16H, NH-CO-CH₂), 1.99 (s, 3H, CO-CH₃), 1.85-1.36 (m, 24H, -CH₂(Lys)).

ESI MS: Berechnet für C₁₁₆H₂₁₉N₂₁O₄₈ [M+5H]⁵⁺ 535,9; gefunden 536,2; [M+4H]⁴⁺ 669,6; gefunden 669,8; [M+3H]³⁺ 892,5; gefunden 892,8.

RP HPLC: (linearer Gradient von 0-50 vol% MeCN in H₂O in 30 min bei 25 °C) t_R = 13,014 min.

AO-G1



$$3588,92 \frac{g}{mol}$$

Die Verbindung **AO-G1** wurden nach dem beschriebenen allgemeinen Kupplungsprotokoll am Tentagel S Ram Harz (0,26 mmol/g) synthetisiert.

AO-G1 wurde mit einer Ausbeute von 21 % (13,05 mg) und einer Reinheit von 62 % synthetisiert.

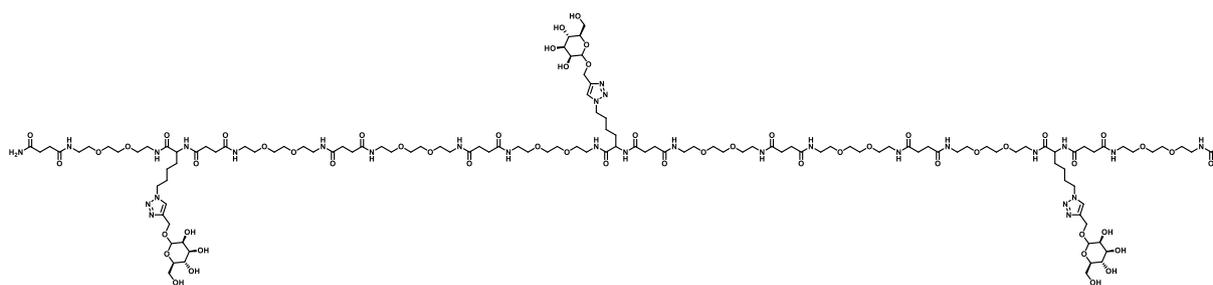
¹H-NMR (600 MHz, D₂O): δ (ppm) = 8.14 (s, 3H, Triazol-Ring), 7,44 (d, $^3J_{HH} = 7.95$ Hz, 6H, Aryl-H), 7.39 (d, $^3J_{HH} = 7.95$ Hz, 6H, Aryl-H), 5.70 (s, 6H, Triazol-CH₂), 3.80-3.44 (m, 118H, Man-CH, Man-CH₂, -NH, CH₂-NH-CH₂, O-CH₂), 3.40-3.19 (m, 44H, CO-NH-CH₂), 2.57-2.33 (m, 44H, NH-CO-CH₂), 1.98 (s, 3H, CO-CH₃).

ESI MS: Berechnet für C₁₅₇H₂₅₁N₃₅O₆₀ [M+6H]⁶⁺ 598,8; gefunden 599,0; [M+5H]⁵⁺ 718,4; gefunden 718,6; [M+4H]⁴⁺ 897,7; gefunden 898,0.

RP HPLC: (linearer Gradient von 0-50 vol.% MeCN in H₂O in 30 min bei 25 °C) $t_R = 7,570$ min.

MALDI-TOF: Berechnet für C₁₅₇H₂₅₁N₃₅O₆₀ [M+Na]⁺ 3609,76; gefunden 3610,807.

AO-G2



$$3018,31 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

Die Verbindung **AO-G2** wurden nach dem beschriebenen allgemeinen Kupplungsprotokoll am Tentagel S Ram Harz (0,26 mmol/g) synthetisiert.

AO-G2 wurde mit einer Ausbeute von 48 % (24,73 mg) und einer Reinheit von 81 % synthetisiert.

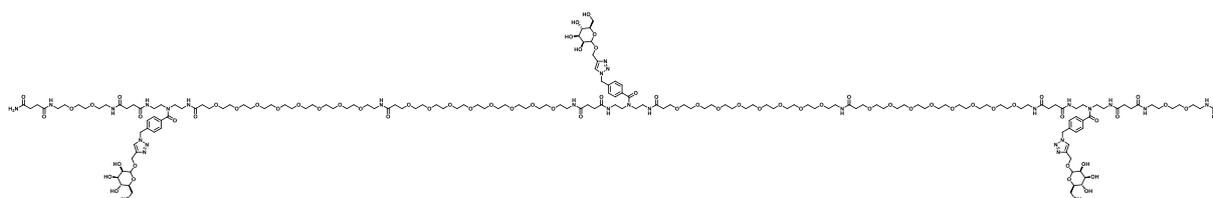
¹H-NMR (600 MHz, D₂O): δ (ppm) = 8.00 (s, 3H, Triazol-Ring-H), 4.45 (m, 3H, CO-CH₂-NH), 3.79-3.55 (m, 85H, O-CH₂, NH), 3.42-3.33 (m, 32H, CO-NH-CH₂), 2.60-2.50 (m, 32H, NH-CO-CH₂), 1.99 (s, 3H, CO-CH₃), 1.90-1.24 (m, 24H, -CH₂ (Lys))

ESI MS: Berechnet für C₁₂₇H₂₂₁N₂₉O₅₄ [M+5H]⁵⁺ 604,3; gefunden 604,6; [M+4H]⁴⁺ 755,1; gefunden 755,4; [M+3H]³⁺ 1006,5; gefunden 1006,8.

RP HPLC: (linearer Gradient von 0-50 vol.% MeCN in H₂O in 30 min bei 25 °C) t_R = 7,464 min.

MALDI-TOF: Berechnet für C₁₂₇H₂₂₁N₂₉O₅₄ [M+Na]⁺ 3039,53 ; gefunden 3040,16.

AO-G4



$$3901,35 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

Die Verbindung **AO-G4** wurden nach dem beschriebenen allgemeinen Kupplungsprotokoll am Tentagel S Ram Harz (0,26 mmol/g) synthetisiert.

AO-G4 wurde mit einer Ausbeute von 52 % (34,90 mg) und einer Reinheit von 81 % synthetisiert.

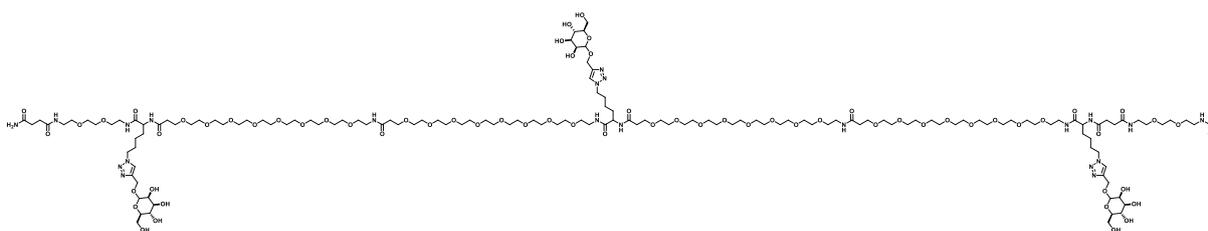
¹H-NMR (600 MHz, D₂O): δ (ppm) = 8.16 (s, 3H, Triazol-Ring-H), 7.44 (d, ³J_{HH} = 7.95 Hz, 6H, Aryl-H), 7.38 (d, ³J_{HH} = 7.95 Hz, 6H, Aryl-H), 5.70 (s, 6H, Triazol-Ring-CH₂), 3.82-3.47 (m, 193H, Man-CH, Man-CH₂, -NH, O-CH₂, CH₂-NH-CH₂), 3.42-3.19 (m, 28H, CO-NH-CH₂), 2.57-2.32 (m, 28, NH-CO-CH₂), 1.98 (s, 3H, CO-CH₃).

ESI MS: Berechnet für C₁₇₃H₂₉₁N₂₇O₇₂ [M+6H]⁶⁺ 650,8; gefunden 651,2; [M+5H]⁵⁺ 780,8; gefunden 781,2; [M+4H]⁴⁺ 975,8; gefunden 976,2.

RP HPLC: (linearer Gradient von 0-50 vol.% MeCN in H₂O in 30 min bei 25 °C) t_R = 9,513 min.

MALDI-TOF: Berechnet für C₁₇₃H₂₉₁N₂₇O₇₂ [M+Na]⁺ 3921,98; gefunden 3922,56.

AO-G5



$$3330,74 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

Die Verbindung **AO-G5** wurden nach dem beschriebenen allgemeinen Kupplungsprotokoll am Tentagel S Ram Harz (0,26 mmol/g) synthetisiert.

AO-G5 wurde mit einer Ausbeute von 69 % (39,08 mg) und einer Reinheit von 70 % synthetisiert.

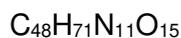
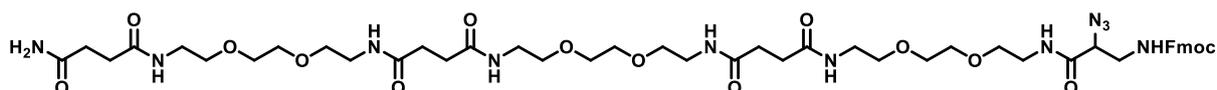
¹H-NMR (600 MHz, D₂O): δ (ppm) = 8,09 (s, 3H, Triazol-Ring-H), 4,27-4,19 (m, 3H, CO-CH-NH), 3,87-3,55 (m, 144H+, Man-CH, Man-CH₂, -O-CH₂), 3,48-3,33 (m, 28H, NH, CO-NH-CH₂), 2,61-2,50 (m, 28, NH-CO-CH₂), 1,99 (s, 3H, CO-CH₃), 1,92-1,25 (m, 24H, -CH₂ (Lys)).

ESI MS: Berechnet für C₁₄₃H₂₆₁N₂₁O₆₆ [M+6H]⁶⁺ 555,8; gefunden 556,0; [M+5H]⁵⁺ 666,8; gefunden 667,0; [M+4H]⁴⁺ 833,2; gefunden 833,4.

RP HPLC: (linearer Gradient von 0-50 vol.% MeCN in H₂O in 30 min bei 25 °C) t_R = 9,528 min.

MALDI-TOF: Berechnet für C₁₄₃H₂₆₁N₂₁O₆₆ [M+Na]⁺ 3351,76; gefunden 3352,448.

Synthese des Testoligomers mit DAP



$$1042,15 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

Die Testoligomer wurden nach dem beschriebenen allgemeinen Kupplungsprotokoll am Tentagel S Ram Harz (0,26 mmol/g) synthetisiert. Für die Kupplung des DAP-N₃-Bausteins wurden die in der Tabelle aufgelisteten Bedingungen getestet.

Tabelle 9 Verschiedene Kupplungsbedingungen zur Kupplung des DAP-N₃-Bausteins an das Testoligomer.

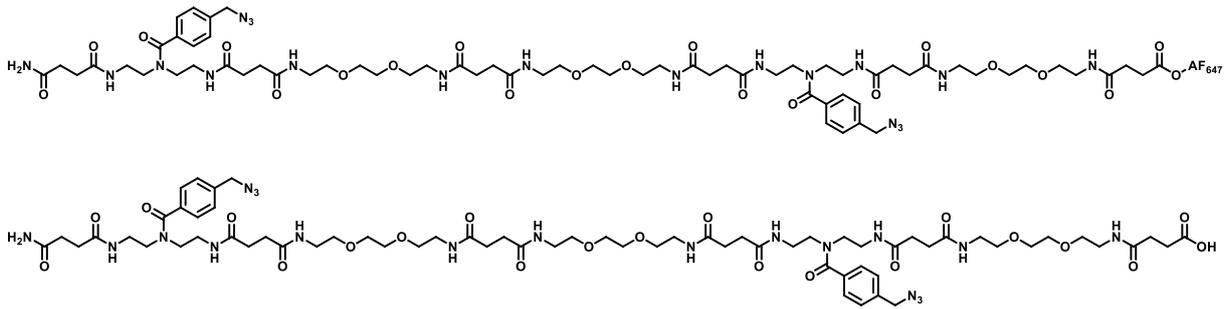
Kupplungsreagenz
5 Äq. COMU, 20 Äq. DIPEA
5 Äq. HATU, 20 Äq. DIPEA
5 Äq. DCC, 5 Äq. HOBt, 20 Äq. DIPEA
5 Äq. PyOxim, 20 Äq. DIPEA
5 Äq. OxymaPure, 20 Äq. DIPEA
5 Äq. DIC, 5 Äq. HOBt, 20 Äq. DIPEA
5 Äq. DEAD, 5. Äq. HOBt, 20 Äq. DIPEA

Es konnte für die angegeben Bedingungen eine Kupplung erzielt werden.

ESI MS: Berechnet für C₄₈H₇₁N₁₁O₁₅ [M+Na]⁺ 1064,98; gefunden 1064,5; [M+H]⁺ 1043,00; gefunden 1042,6; [M+2H]²⁺ 522,1; gefunden 521,8.

RP HPLC: (linearer Gradient von 0-50 vol.% MeCN in H₂O in 15 min bei 25 °C) t_R = 9,55 min.

HJ-O1 und HJ-O1.1

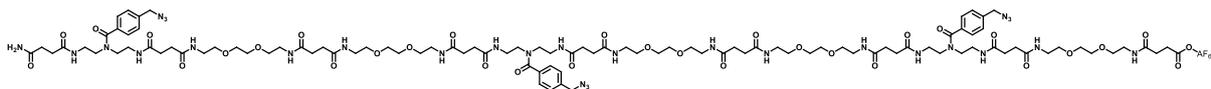


$$1496,65 \frac{\text{g}}{\text{mol}} + \text{AF647} (\sim 2000-2400 \frac{\text{g}}{\text{mol}})$$

Das Oligomergerüst von **HJ-O1** wurden nach dem beschriebenen allgemeinen Kupplungsprotokoll am Tentagel S Ram Harz (0,26 mmol/g) synthetisiert. Die Kupplung der Bernsteinsäure wurde mit Bernsteinsäureanhydrid (10 Äq.) und DIPEA (20 Äq.) durchgeführt. Das Oligomer wurde von der Festphase abgespalten und präparativ aufgereinigt. Alexa 647-Hydrazid (1,1 Äq.) wird an das Oligomer (1 Äq.) mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid (10 Äq.) und N-Hydroxysuccinimid (10 Äq.) gekuppelt. Die Reaktionslösung wird mit einem Vivaspin 2,5 kDa aufgereinigt, bis kein Alexa 647 Farbstoff mehr im Filtrat nachgewiesen werden kann. Für HJ-O1.1 wurde auf die Kupplung des Alexa 647 Farbstoffs verzichtet.

HJ-O1.1 RP HPLC: (linearer Gradient von 0-50 vol.% MeCN in H₂O in 30 min bei 25 °C) t_R = 9,821 min.

HJ-O2

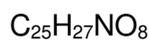
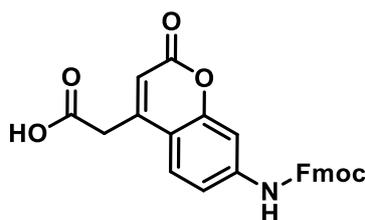


$$2300,55 \frac{\text{g}}{\text{mol}} + (\sim 2000 - 2400 \frac{\text{g}}{\text{mol}})$$

Das Oligomergerüst von **HJ-O2** wurden nach dem beschriebenen allgemeinen Kupplungsprotokoll am Tentagel S Ram Harz (0,26 mmol/g) synthetisiert. Die Kupplung der Bernsteinsäure wurde mit Bernsteinsäureanhydrid (10 Äq.) und DIPEA (20 Äq.) durchgeführt. Das Oligomer wurde von der Festphase abgespalten und präparativ aufgereinigt. Alex 647-Hydrazid (1,1 Äq.) wird an das Oligomer (1 Äq.) mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid (10 Äq.) und *N*-Hydroxysuccinimid (10 Äq.) gekuppelt. Die Reaktionslösung wird mit einem Vivaspin 2,5 kDa aufgereinigt, bis kein Alexa 647 Farbstoff mehr im Filtrat nachgewiesen werden kann.

HJ-O2 (ohne Alexa 647) **RP HPLC:** (linearer Gradient von 0-50 vol.% MeCN in H₂O in 30 min bei 25 °C) $t_R = 10.787$ min.

Cumarinbaustein



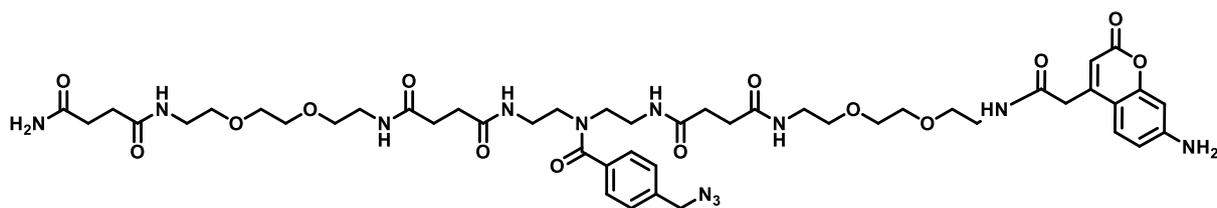
$$469,49 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

1 g 7-Aminocoumarin-4-Essigsäure (4,5 mmol, 1 Äq.) werden in 10 ml DCM suspendiert. Zur Reaktionslösung werden 1,3 ml frisch destilliertes Trimethylsilylchlorid (10 mmol, 2,2 Äq.) und 1,7 ml DIPEA (10 mmol, 2,2Äq.) hinzugegeben. Die Reaktion rückflusserhitzt und nach 3 h in einem Eisbad abgekühlt. Fmoc-Chlorid wird portionsweise hinzugegeben und über 11 h unter rühren auf RT aufwärmen gelassen. Unter starkem Rühren wird der Reaktionslösung 25 ml Methanol hinzugegeben. Hierbei fällt ein leicht gelblicher Feststoff aus. Der Feststoff wird abfiltriert und zweimal mit Methanol und Diethylether gewaschen.

Das Produkt konnte mit einer Ausbeute von 66% (1,3 g, 3 mmol) erhalten werden.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 12,81 (s, 1H, COOH), 10,20 (s, 1, C-NH-CO), 7,91 (d, 2H, Aryl-H), 7,76 (d, 2H, Aryl-H), 7,62 (d, 1H, Aryl-H), 7,55 (s, 1H, Aryl-H), 7,39 (m, 5H, Aryl-H), 6,34 (s, 1H, -CH-CH-COO-), 4,56 (d, 2H, CH₂-Fmoc), 4,34 (t, 1H, CH-Fmoc), 3,86 (s, 2H, C-CH₂-COOH).

HJ-O3



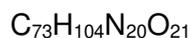
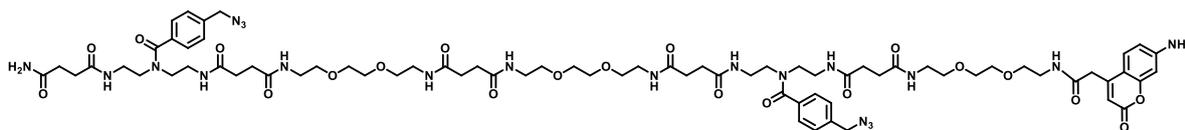
$$1023,12 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

Das Oligomergerüst von **HJ-O3** wurden nach dem beschriebenen allgemeinen Kupplungsprotokoll am Tentagel S Ram Harz (0,26 mmol/g) synthetisiert. Der Coumarinbaustein wurde mit DIC (5 Äq.) und HOBt (5 Äq.) an der Festphase gekuppelt.

RP HPLC: (linearer Gradient von 0-50 vol.% MeCN in H₂O in 30 min bei 25 °C) $t_R = 5,97$ min.

MALDI-TOF: Berechnet für C₄₇H₆₆N₁₂O₁₄ [M+K]⁺ 1062,083; gefunden 1062,218 [M+Na]⁺ 1041,154; gefunden 1046,345; [M+H]⁺ 1024,127; gefunden 1024,952

HJ-O4



$$1597,75 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

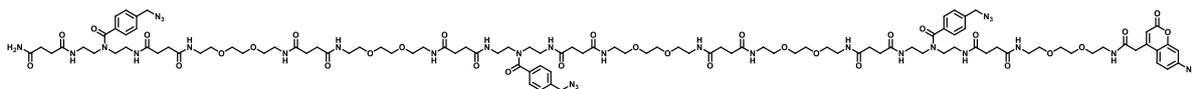
Das Oligomergerüst von **HJ-O4** wurden nach dem beschriebenen allgemeinen Kupplungsprotokoll am Tentagel S Ram Harz (0,26 mmol/g) synthetisiert. Der Coumarinbaustein wurde mit DIC (5 Äq.) und HOBt (5 Äq.) an der Festphase gekuppelt.

ESI MS: Berechnet für $\text{C}_{73}\text{H}_{104}\text{N}_{20}\text{O}_{21}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1598,7; gefunden 1597,6; $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 799,9; gefunden 799,5; $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 533,6; gefunden 533,4; $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ 400,4; gefunden 400,4.

RP HPLC: (linearer Gradient von 0-50 vol.% MeCN in H₂O in 30 min bei 25 °C) $t_R = 6,012$ min.

MALDI-TOF: Berechnet für $\text{C}_{73}\text{H}_{104}\text{N}_{20}\text{O}_{21}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1620,739; gefunden 1620,929.

HJ-O5



$$2402,66 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

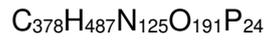
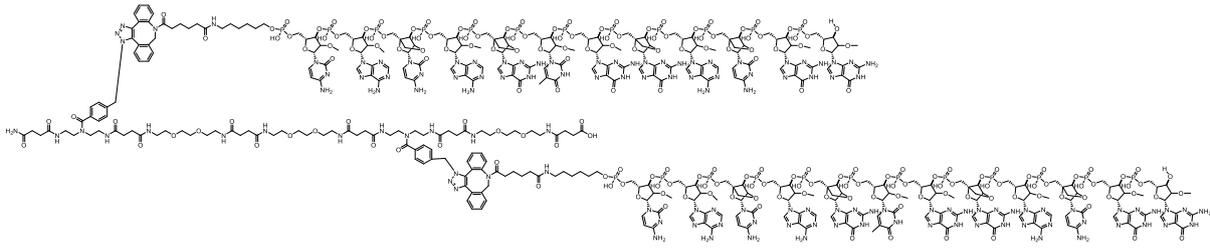
Das Oligomergerüst von **HJ-O5** wurden nach dem beschriebenen allgemeinen Kupplungsprotokoll am Tentagel S Ram Harz (0,26 mmol/g) synthetisiert. Der Cumarinbaustein wurde mit DIC (5 Äq.) und HOBt (5 Äq.) an der Festphase gekuppelt.

ESI MS: Berechnet für $\text{C}_{109}\text{H}_{160}\text{N}_{30}\text{O}_{32}$ $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 1202,34; gefunden 1201,95; $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 801,89; gefunden 801,65; $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$; gefunden 601,4; $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ 481,5; gefunden 481,4.

RP HPLC: (linearer Gradient von 0-50 vol.% MeCN in H₂O in 30 min bei 25 °C) $t_{\text{R}} = 10,85$ min.

MALDI-TOF: Berechnet für $\text{C}_{109}\text{H}_{160}\text{N}_{30}\text{O}_{32}$ $[\text{M}+\text{Na}]^{+}$ 2425,649; gefunden 2423,698; $[\text{M}+\text{H}]^{+}$ 1620,739; gefunden 2399,110.

HJ-O1.1-Q2

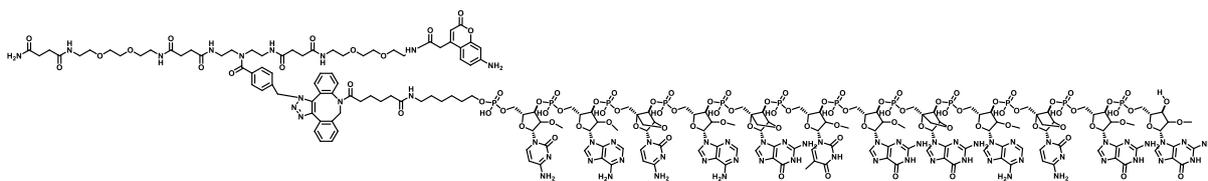


$$10581,11 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

3 μl einer 300 μM **HJ-O1.1**-Lösung (1 \AA q.) werden mit 9 μl einer 300 μM **Q2**-Lösung gemischt und über Nacht bei 37 °C geschüttelt.

MALDI-TOF: Berechnet für $\text{C}_{378}\text{H}_{487}\text{N}_{125}\text{O}_{191}\text{P}_{24}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 10598,579; gefunden 10604,274.

HJ-O3-Q2

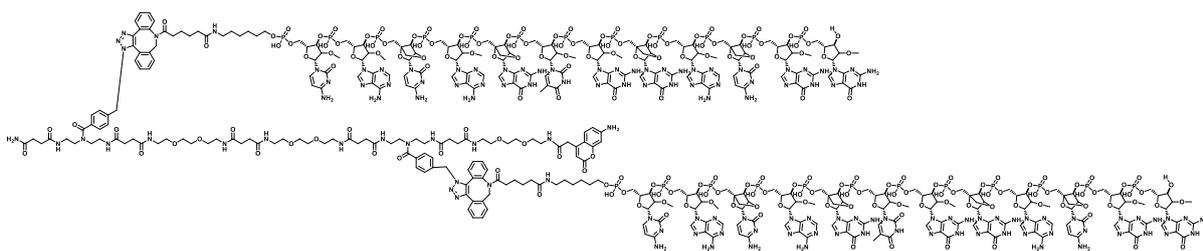


$$5565,35 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

3 μl einer 300 μM **HJ-O3**-Lösung (1Äq.) werden mit 9 μl einer 300 μM **Q2**-Lösung gemischt und über Nacht bei 37 °C geschüttelt.

MALDI-TOF: Berechnet für $\text{C}_{203}\text{H}_{259}\text{N}_{65}\text{O}_{99}\text{P}_{12}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 5585,399; gefunden 5582,511.

HJ-O4-Q2

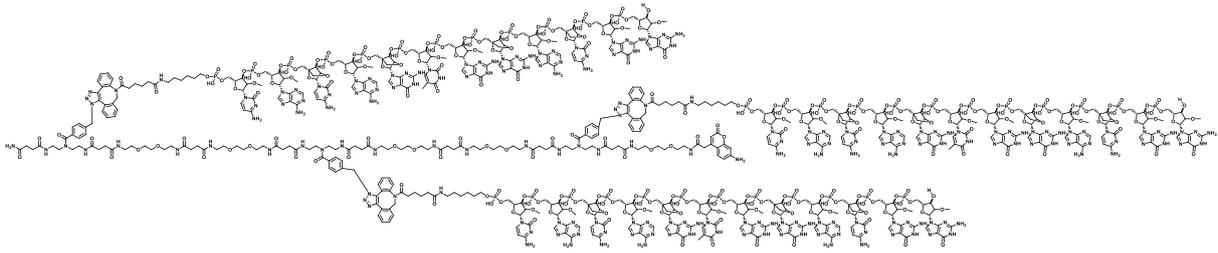


$$10682,22 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

3 μl einer 300 μM **HJ-O3**-Lösung (1Äq.) werden mit 9 μl einer 300 μM **Q2**-Lösung gemischt und über Nacht bei 37 °C geschüttelt.

MALDI-TOF: Berechnet für $\text{C}_{385}\text{H}_{490}\text{N}_{126}\text{O}_{191}\text{P}_{24}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 10699,609; gefunden 10706,945.

HJ-O5-Q2

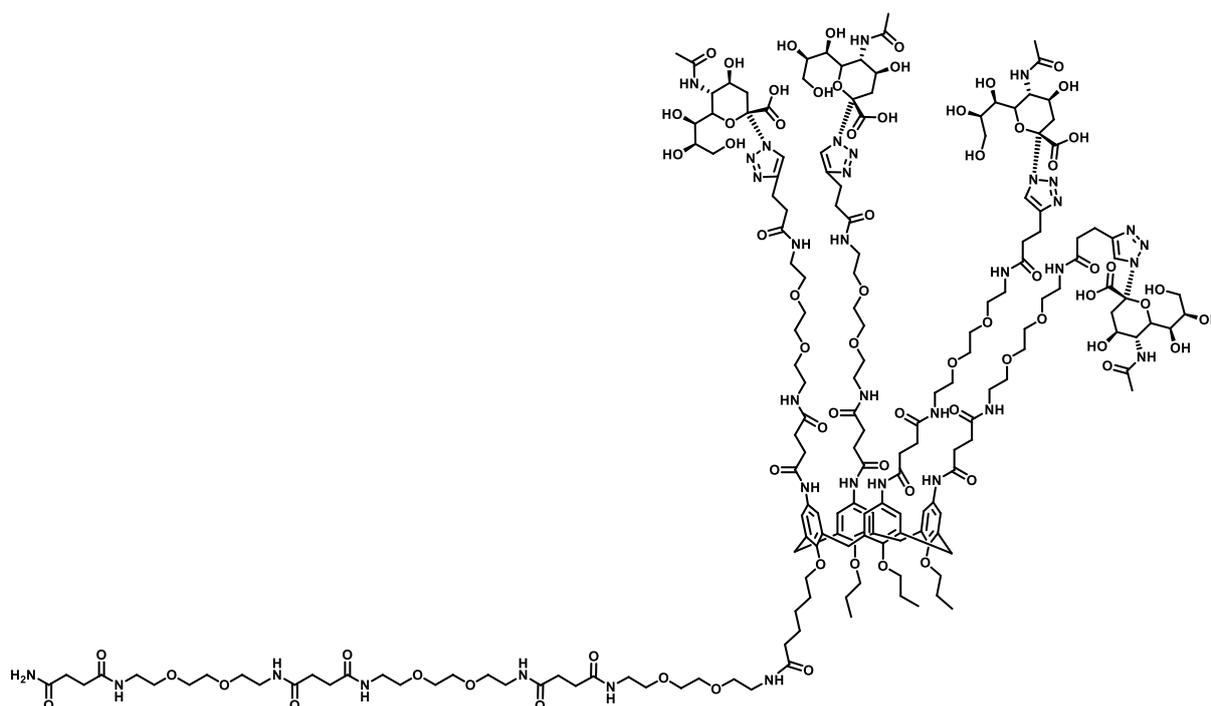


$$16029,35 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

3 μl einer 300 μM **HJ-O5-Lösung** (1Äq.) werden mit 9 μl einer 300 μM **Q2**-Lösung gemischt und über Nacht bei 37 °C geschüttelt.

MALDI-TOF: Berechnet für $\text{C}_{577}\text{H}_{739}\text{N}_{189}\text{O}_{287}\text{P}_{36}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 16052,949; gefunden 16056,186.

Calix[4]-O1



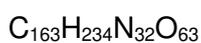
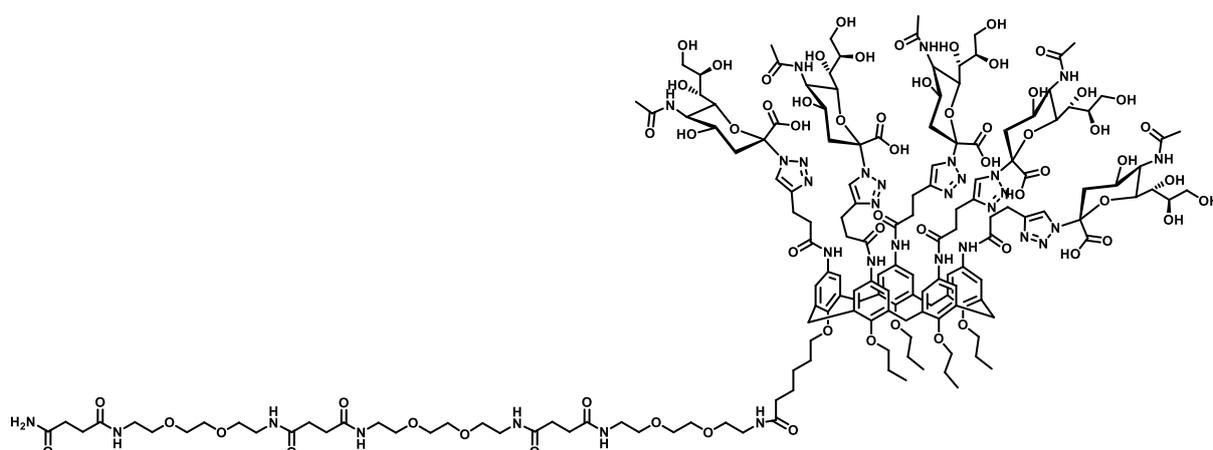
$$3993,29 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

Die Synthese von **Calix[4]-O1** nach dem Standardprotokoll für die Festphasensynthese synthetisiert. Die Reduktion der Nitrogruppen auf dem Festphasenharz wurde mit 20 Äquivalenten Zinn(II)chlorid Dihydrat in DMF für 15 h bei 24 °C bis 28 °C durchgeführt. Das restliche Zinn(II)chlorid Dihydrat wird durch zehnmal Waschen mit DMF, Methanol, DMF und DCM entfernt.

ESI MS: Berechnet für $\text{C}_{213}\text{H}_{311}\text{N}_{35}\text{O}_{85}$ $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 1332,1; gefunden 1331,6; $[\text{M-Sia}+2\text{H}]^{2+}$ 1852,0; gefunden 1851,4; $[\text{M-Sia}+3\text{H}]^{3+}$ 1235,0; gefunden 1235,0, $[\text{M-2Sia}+3\text{H}]^{3+}$ 1040,6; gefunden 1040,5

RP HPLC: (linearer Gradient von 0-95 vol.% MeCN in H_2O in 15 min bei 25 °C) $t_{\text{R}} = 8,0$ min

Calix[5]-O1

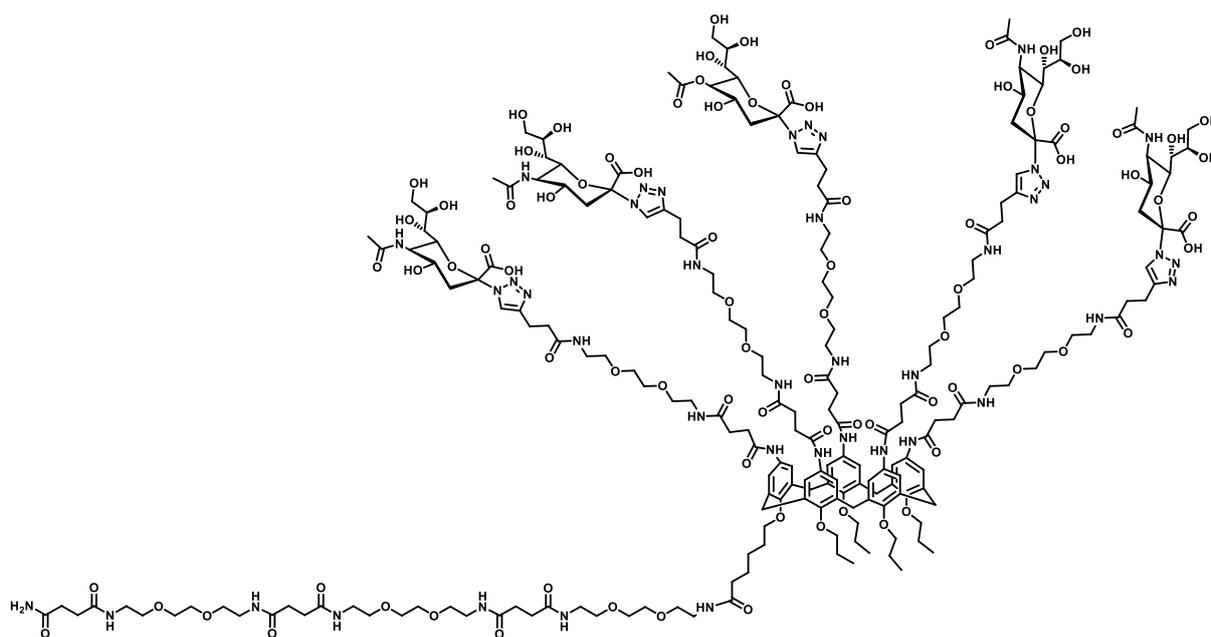


$$3649,83 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

Die Synthese von **Calix[5]-O1** nach dem Standardprotokoll für die Festphasensynthese synthetisiert. Die Reduktion der Nitrogruppen auf dem Festphasenharz wurde mit 20 Äquivalenten Zinn(II)chlorid Dihydrat in DMF für 15 h bei 24 °C bis 28 °C durchgeführt. Das restliche Zinn(II)chlorid Dihydrat wird durch zehnmal Waschen mit DMF, Methanol, DMF und DCM entfernt.

RP HPLC: (linearer Gradient von 0-95 vol.% MeCN in H₂O in 30 min bei 25 °C) $t_R = 18,11$ min

Calix[5]-O2

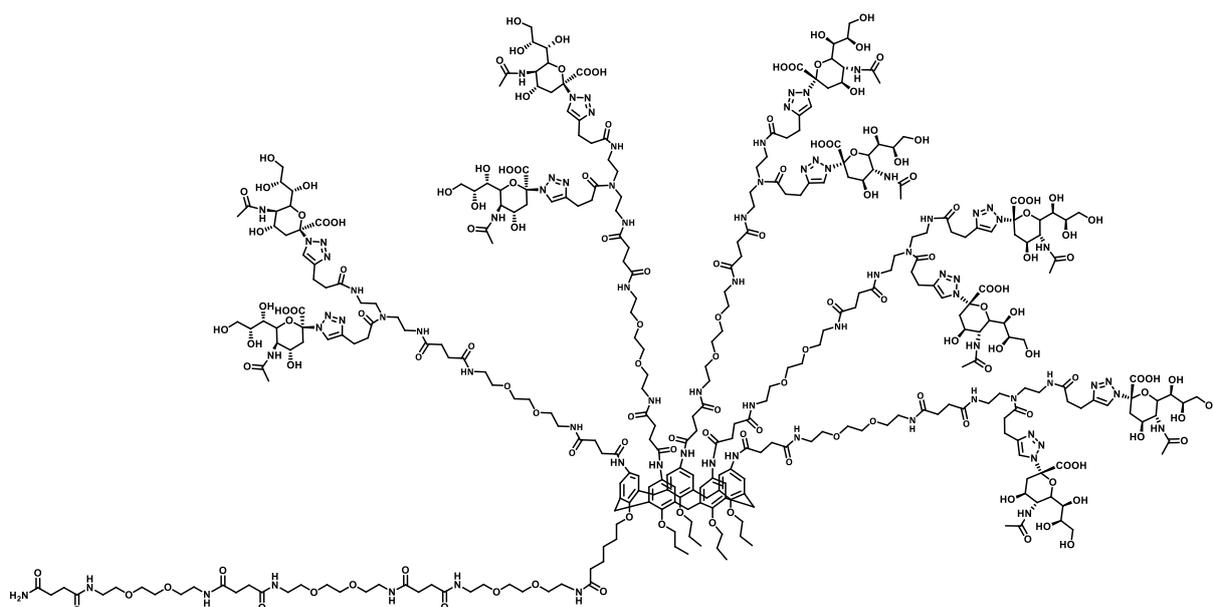


$$4802,13 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

Die Synthese von **Calix[5]-O2** nach dem Standardprotokoll für die Festphasensynthese synthetisiert. Die Reduktion der Nitrogruppen auf dem Festphasenharz wurde mit 20 Äquivalenten Zinn(II)chlorid Dihydrat in DMF für 15 h bei 24 °C bis 28 °C durchgeführt. Das restliche Zinn(II)chlorid Dihydrat wird durch zehnmal Waschen mit DMF, Methanol, DMF und DCM entfernt.

RP HPLC: (linearer Gradient von 0-95 vol.% MeCN in H₂O in 30 min bei 25 °C) $t_R = 11,02$ min

Calix[5]-O3



$$7799,14 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

Die Synthese von **Calix[5]-O3** nach dem Standardprotokoll für die Festphasensynthese synthetisiert. Die Reduktion der Nitrogruppen auf dem Festphasenharz wurde mit 20 Äquivalenten Zinn(II)chlorid Dihydrat in DMF für 15 h bei 24 °C bis 28 °C durchgeführt. Das restliche Zinn(II)chlorid Dihydrat wird durch zehnmal Waschen mit DMF, Methanol, DMF und DCM entfernt.

ESI MS: Berechnet für $\text{C}_{333}\text{H}_{509}\text{N}_{77}\text{O}_{138}$ $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ 1950,79; gefunden 1948,3; $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ 1560,83; gefunden 1558,5; $[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$ 1300,86; gefunden 1295,55, $[\text{M}+7\text{H}]^{7+}$ 1115,17; gefunden 1113,1

RP HPLC: (linearer Gradient von 0-95 vol.% MeCN in H_2O in 30 min bei 25 °C) $t_{\text{R}} = 9,34$ min

6. Anhang

NMR-Spektren

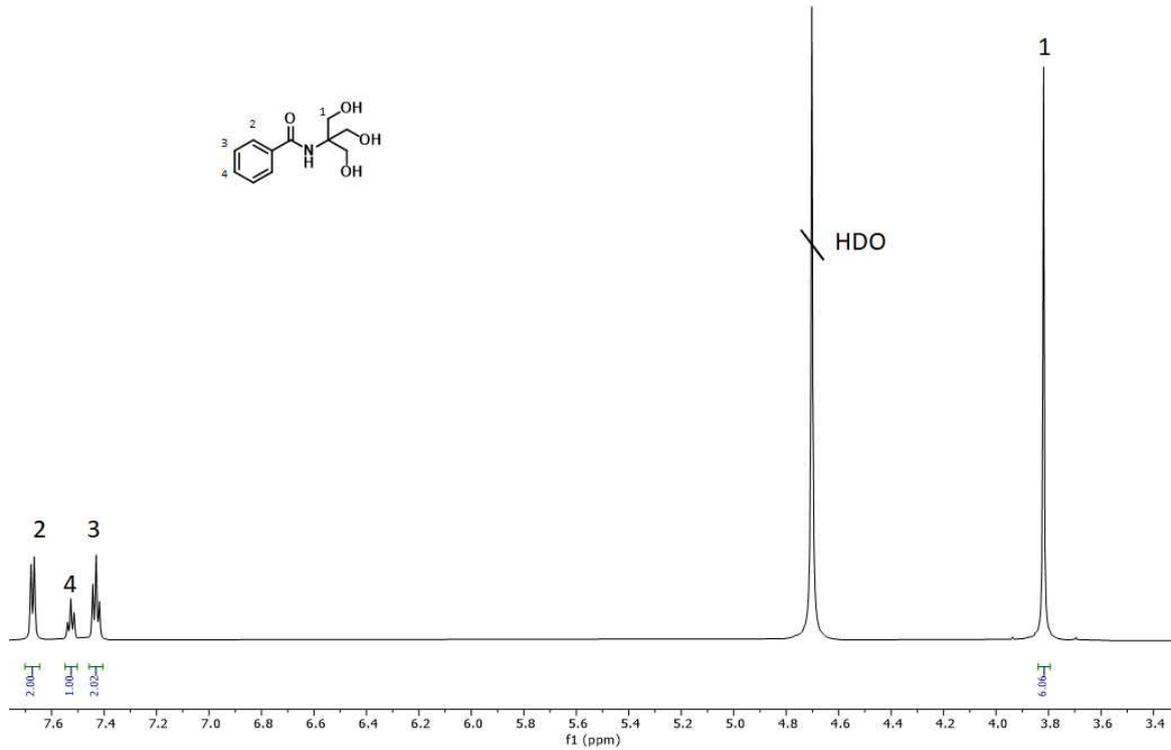


Abbildung 52 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von T4 in D_2O (600 MHz).

TM1

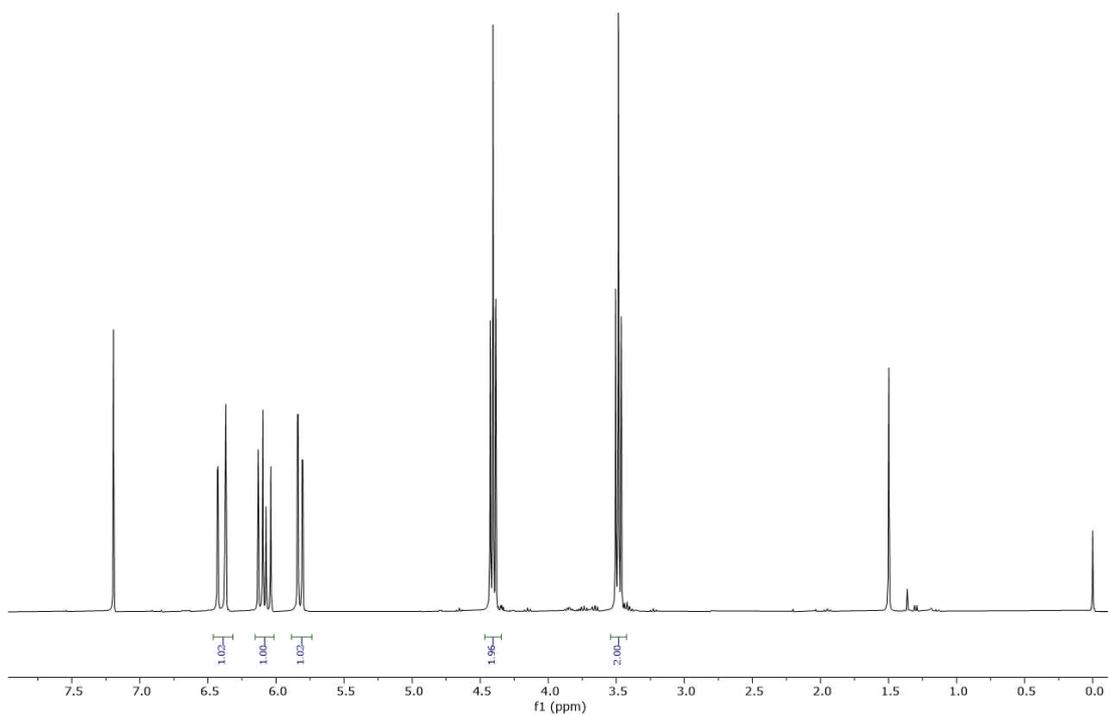


Abbildung 53 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum in CDCl_3 von TM1 (300 MHz).

7.26 (0.03)

TM2

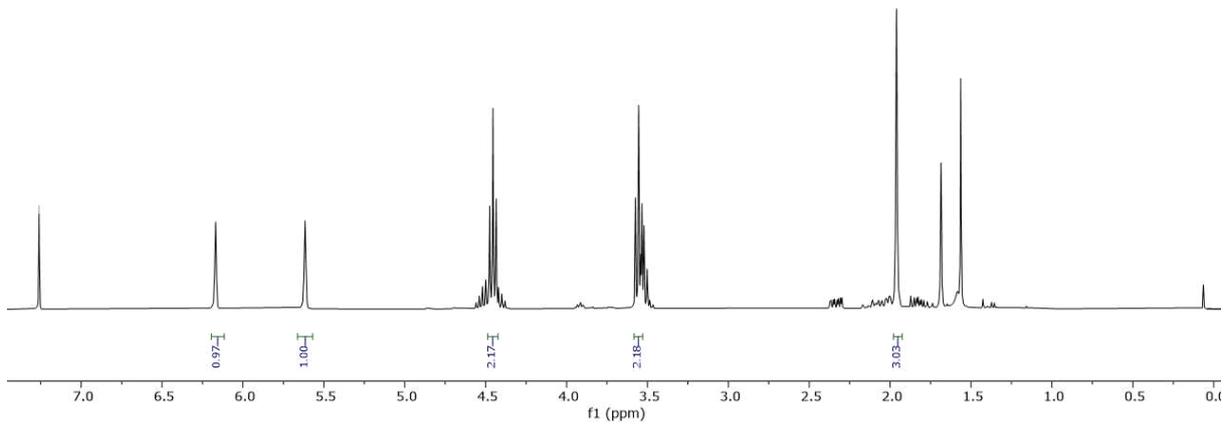


Abbildung 54 ¹H-NMR-Spektrum in CDCl₃ von **TM2** (300MHz).

TM6

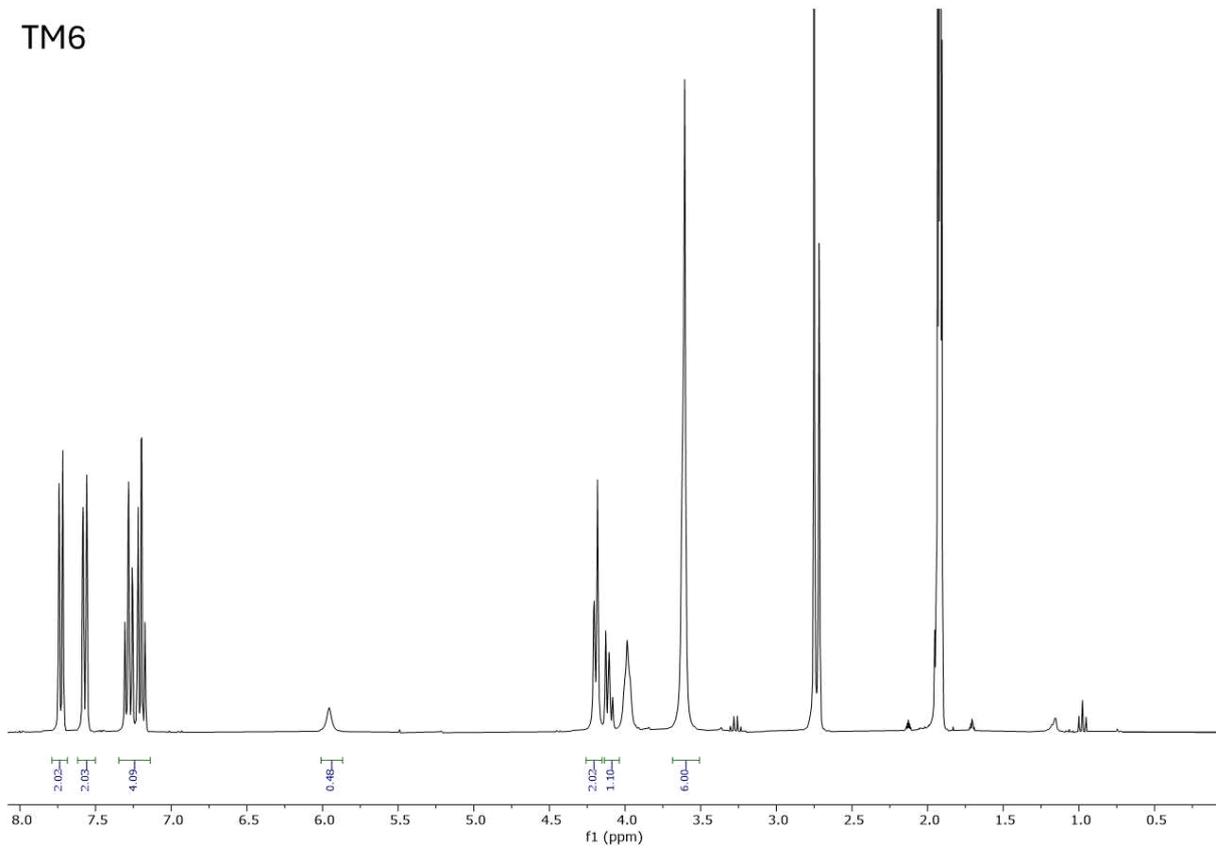


Abbildung 55 ¹H-NMR-Spektrum in CDCl₃ von **TM6** (300MHz).

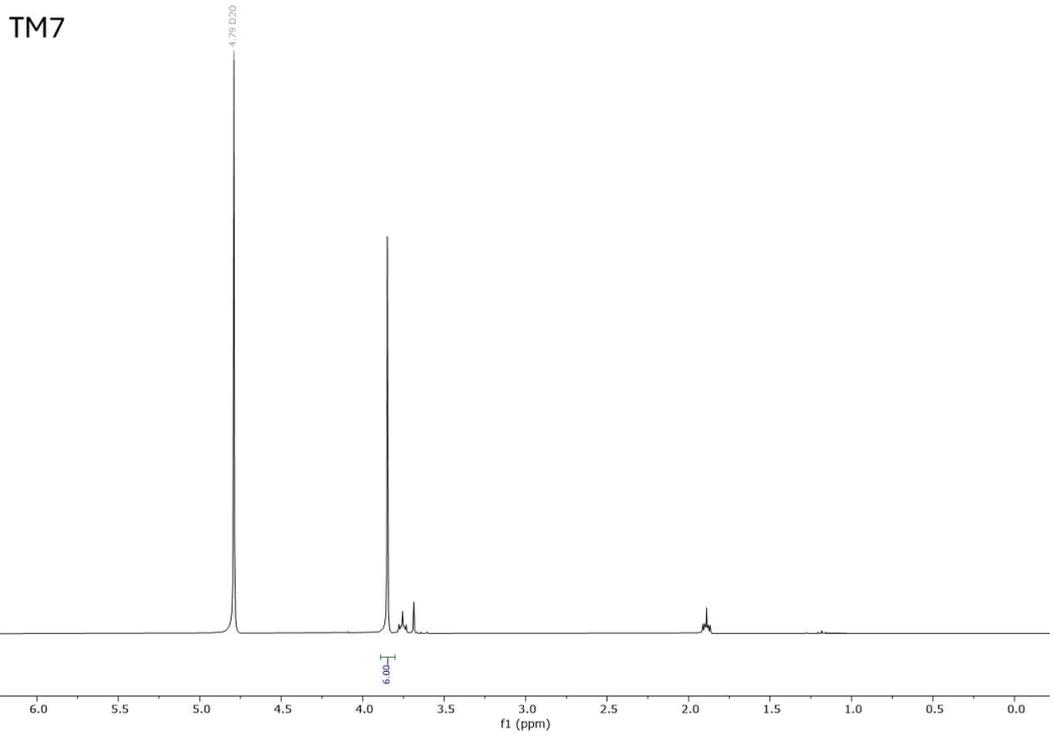


Abbildung 56 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum in CDCl_3 von **TM7** (300MHz).

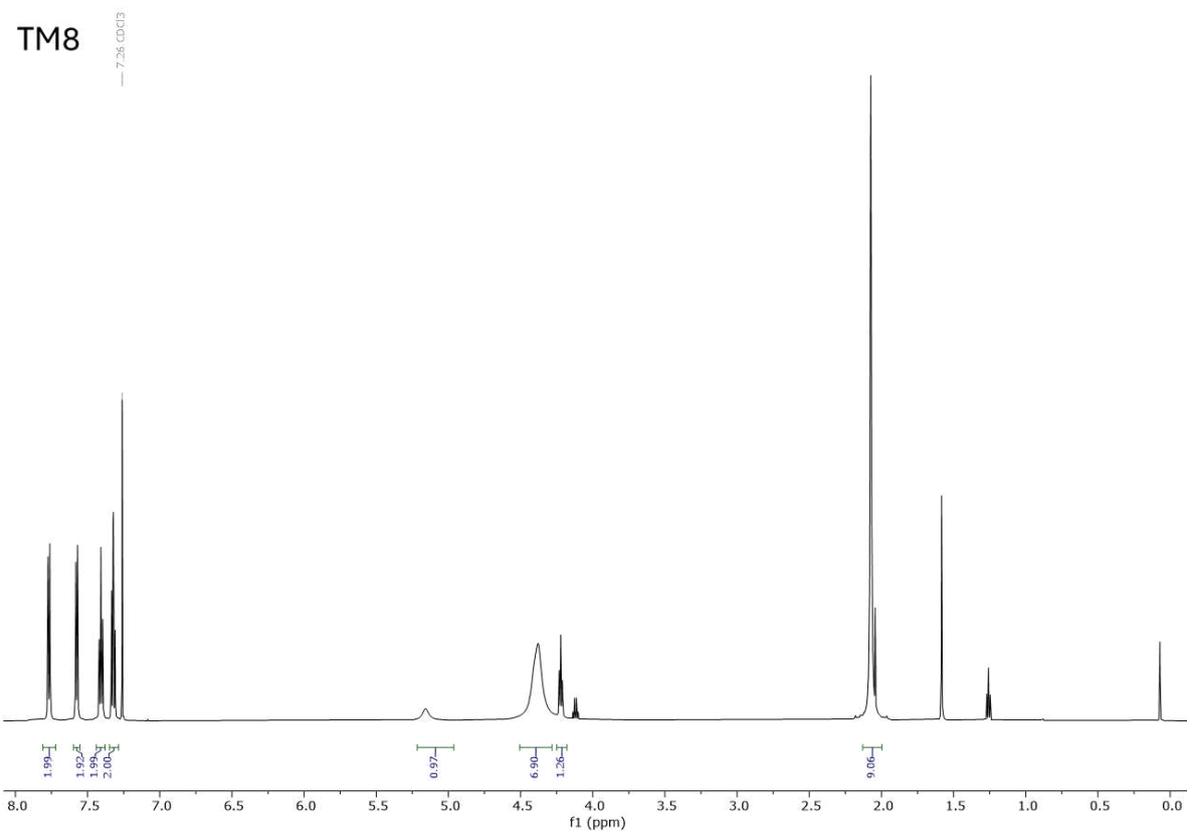


Abbildung 57 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum in CDCl_3 von **TM8** (300MHz).

TM9

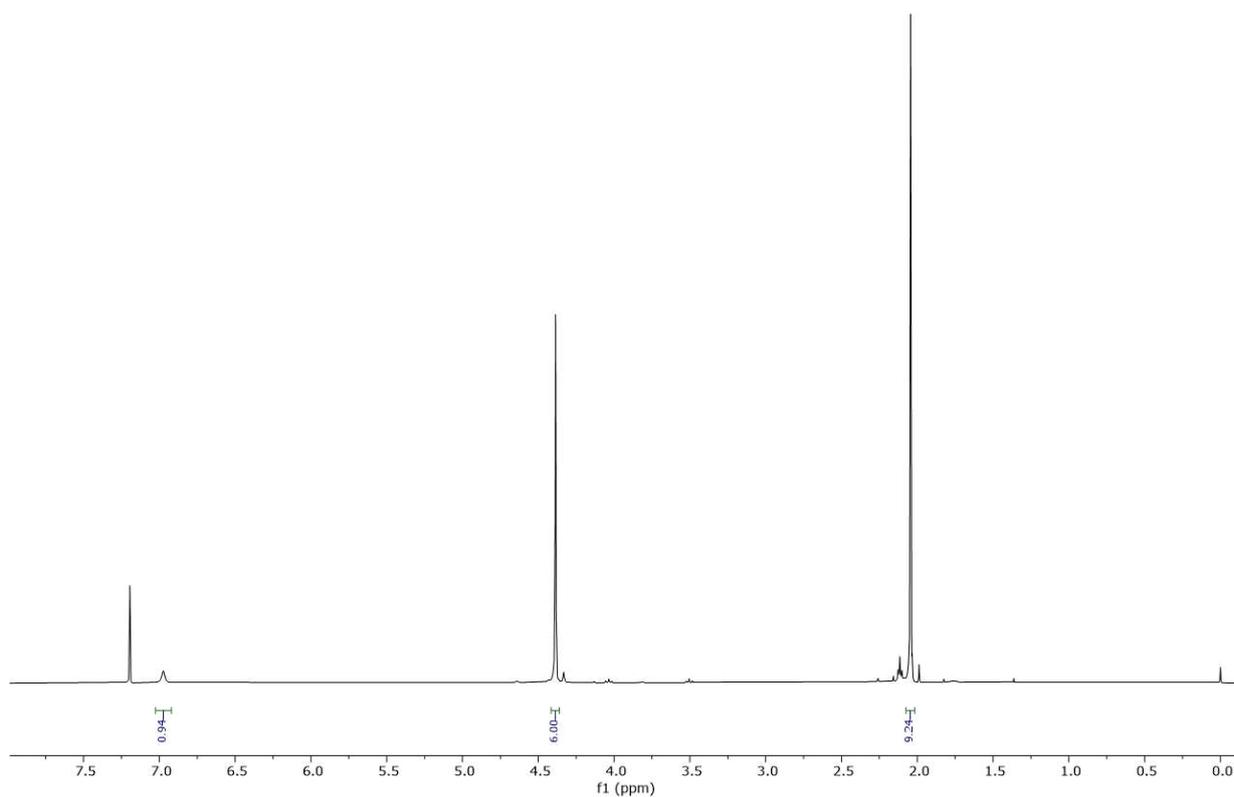


Abbildung 58 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum in CDCl_3 von **TM9** (300MHz).

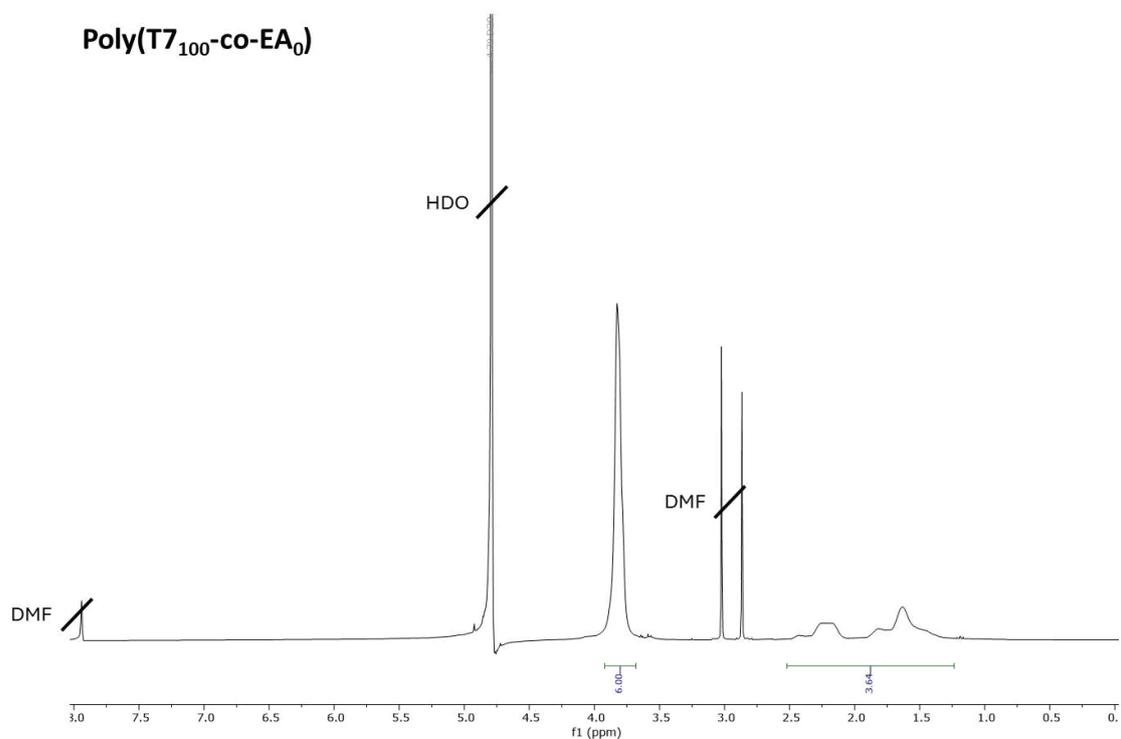


Abbildung 59 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **Poly(T7₁₀₀coEA₀)** in D_2O (300 MHz).

Poly(T7₇₀-co-EA₃₀)

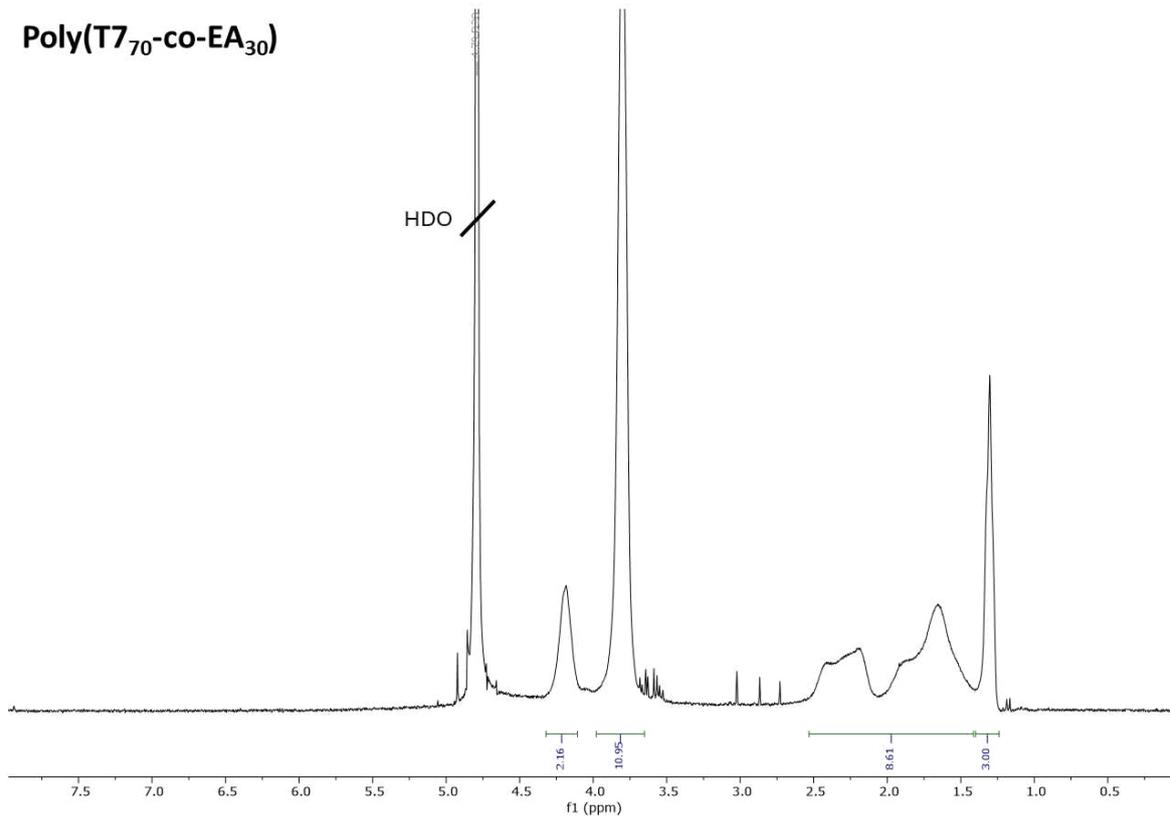


Abbildung 60 ¹H-NMR-Spektrum von **Poly(T7₇₀coEA₃₀)** in D₂O (300 MHz).

Poly(T7₅₀-co-EA₅₀)

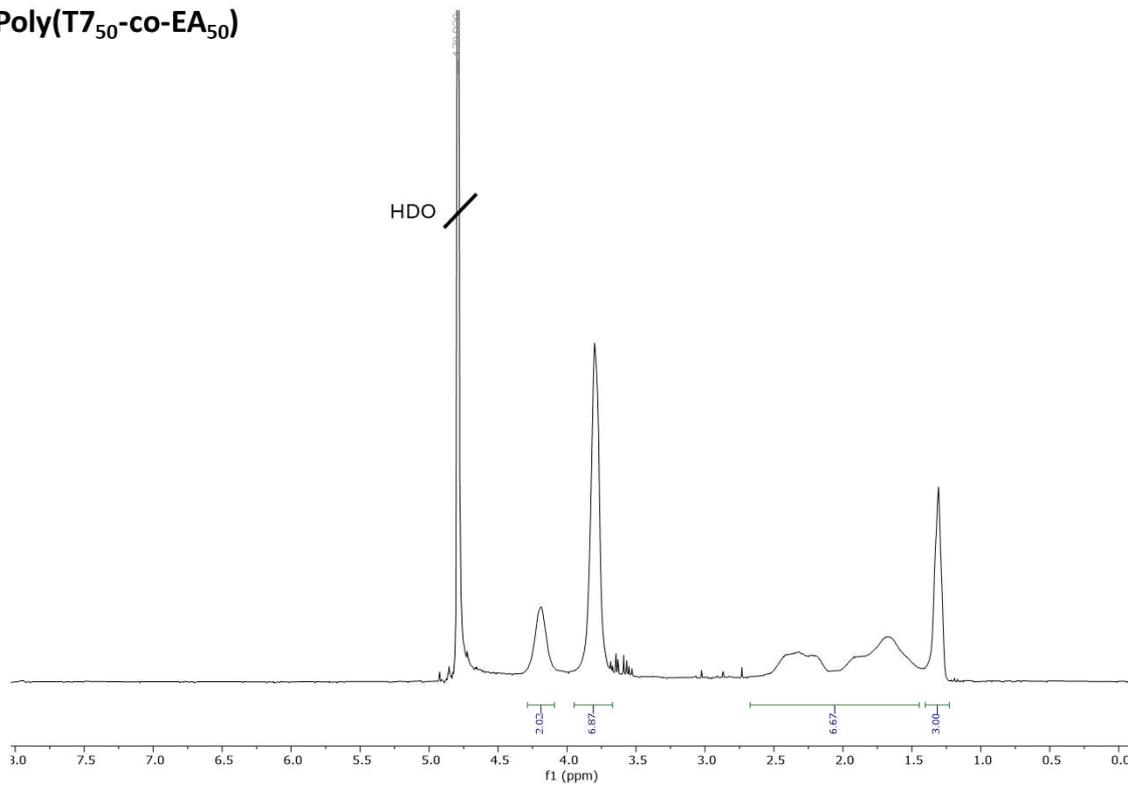


Abbildung 61 ¹H-NMR-Spektrum von **Poly(T7₅₀coEA₅₀)** in D₂O (300 MHz).

Poly(T7₁₀₀-co-EA₀)-Neu5Ac

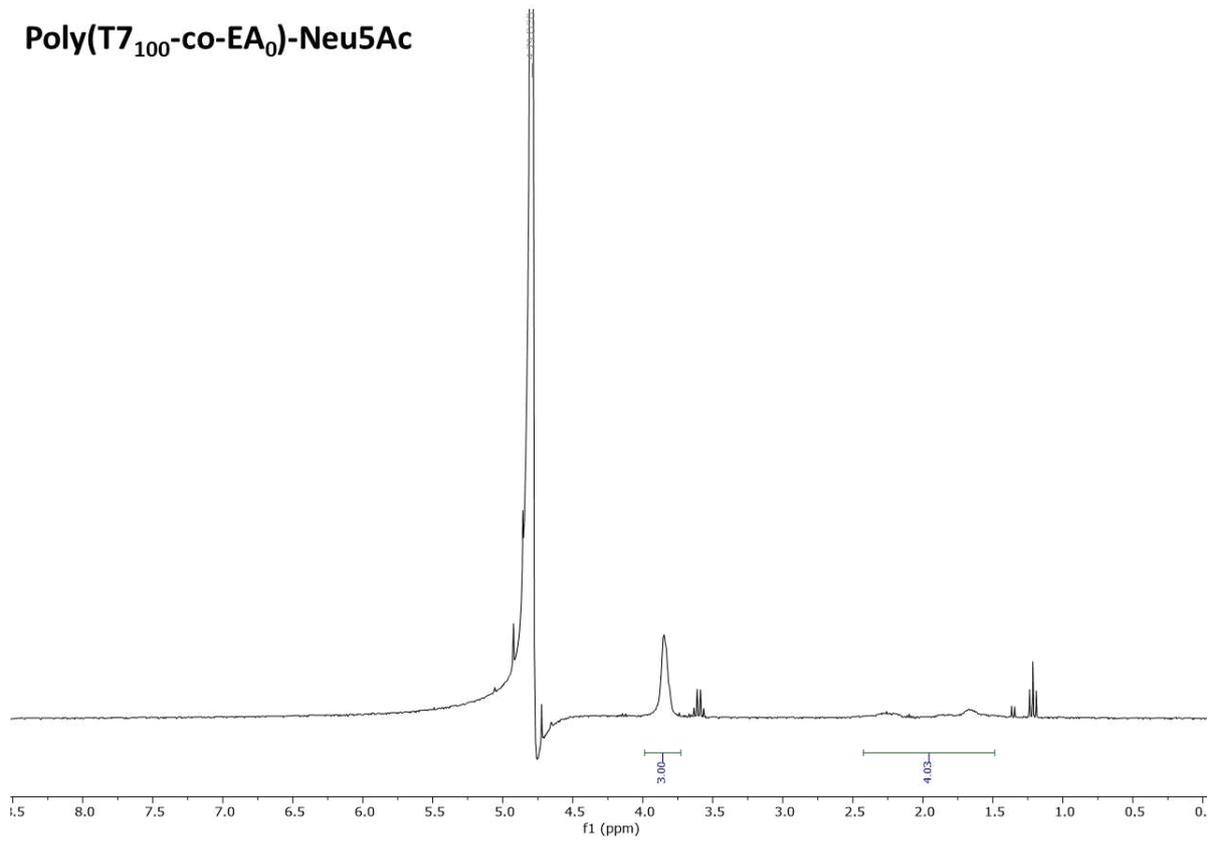


Abbildung 62 ¹H-NMR-Spektrum von **Poly(T7₁₀₀coEA₀)-Neu5Ac** in D₂O (300 MHz).

Poly(T7₇₀-co-EA₃₀)-Neu5Ac

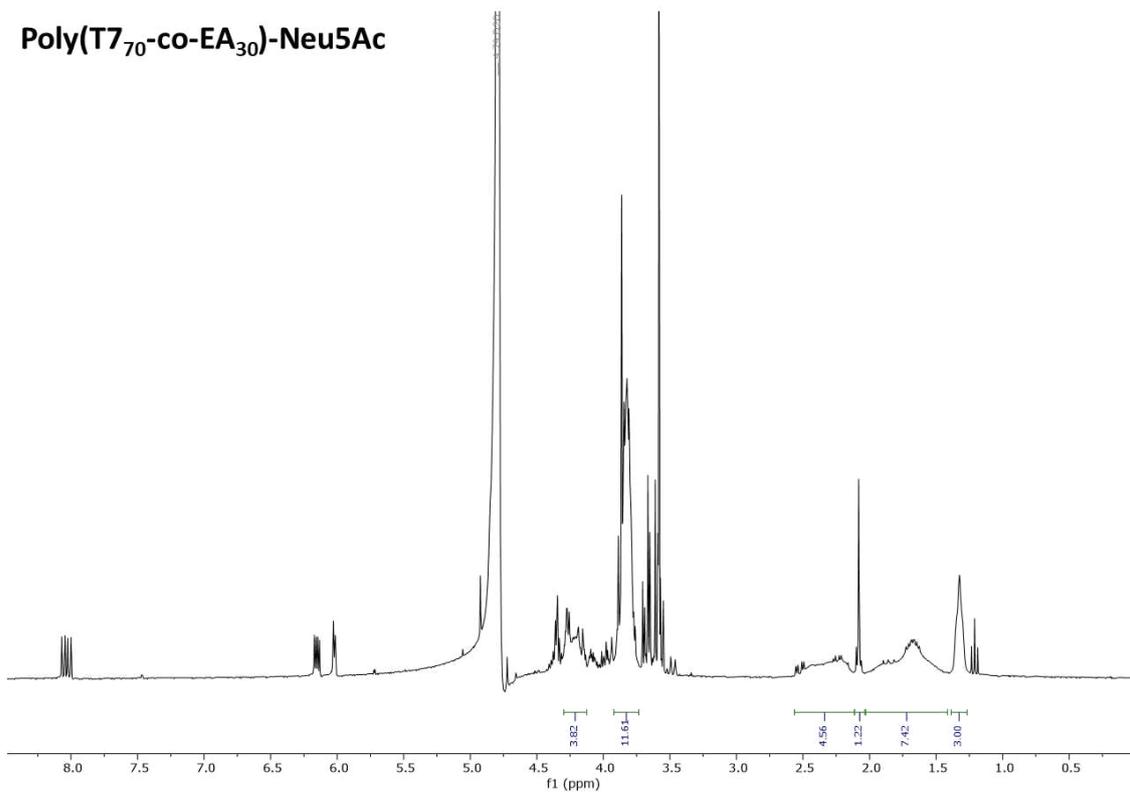


Abbildung 63 ¹H-NMR-Spektrum von **Poly(T7₇₀coEA₃₀)-Neu5Ac** in D₂O (300 MHz).

Poly(T7₅₀-co-EA₅₀)-Neu5Ac

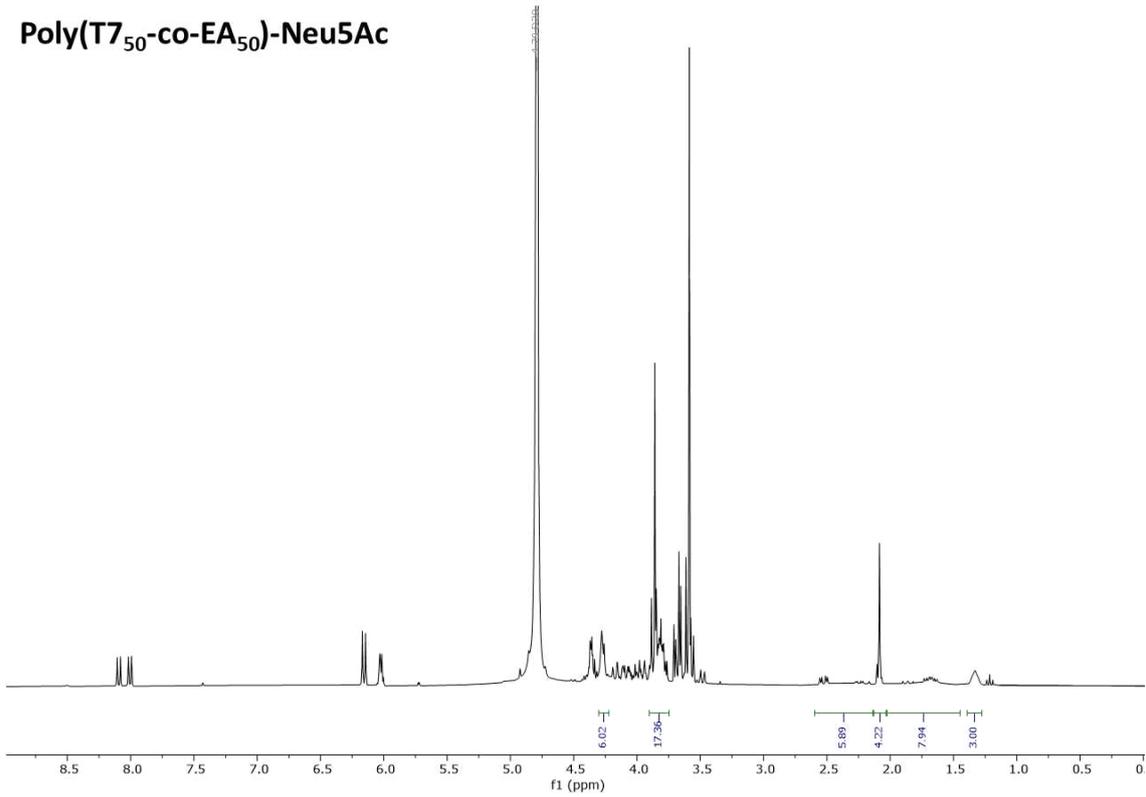


Abbildung 64 ¹H-NMR-Spektrum von **Poly(T7₅₀coEA₅₀)-Neu5Ac** in D₂O (300 MHz).

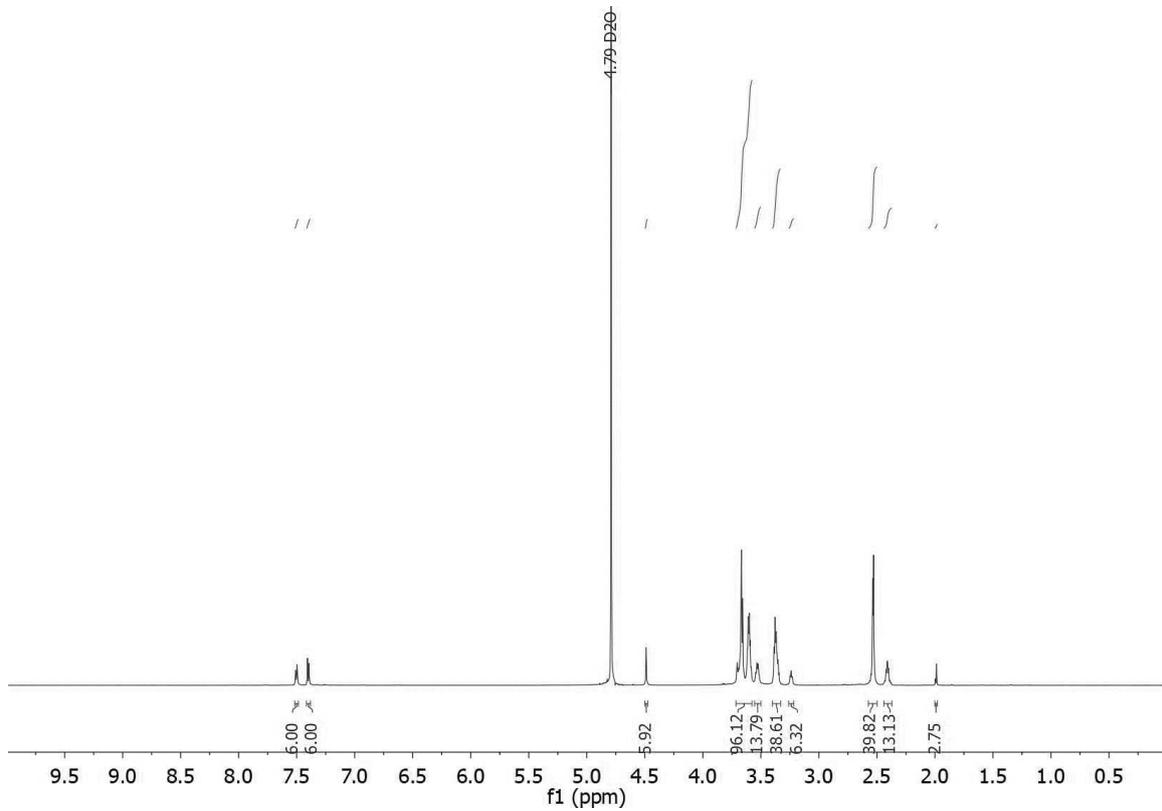


Abbildung 65 ¹H-NMR-Spektrum von **AO-01** in D₂O (600 MHz). (Entnommen aus Ayla Yamans Bachelorarbeit)¹⁵⁶

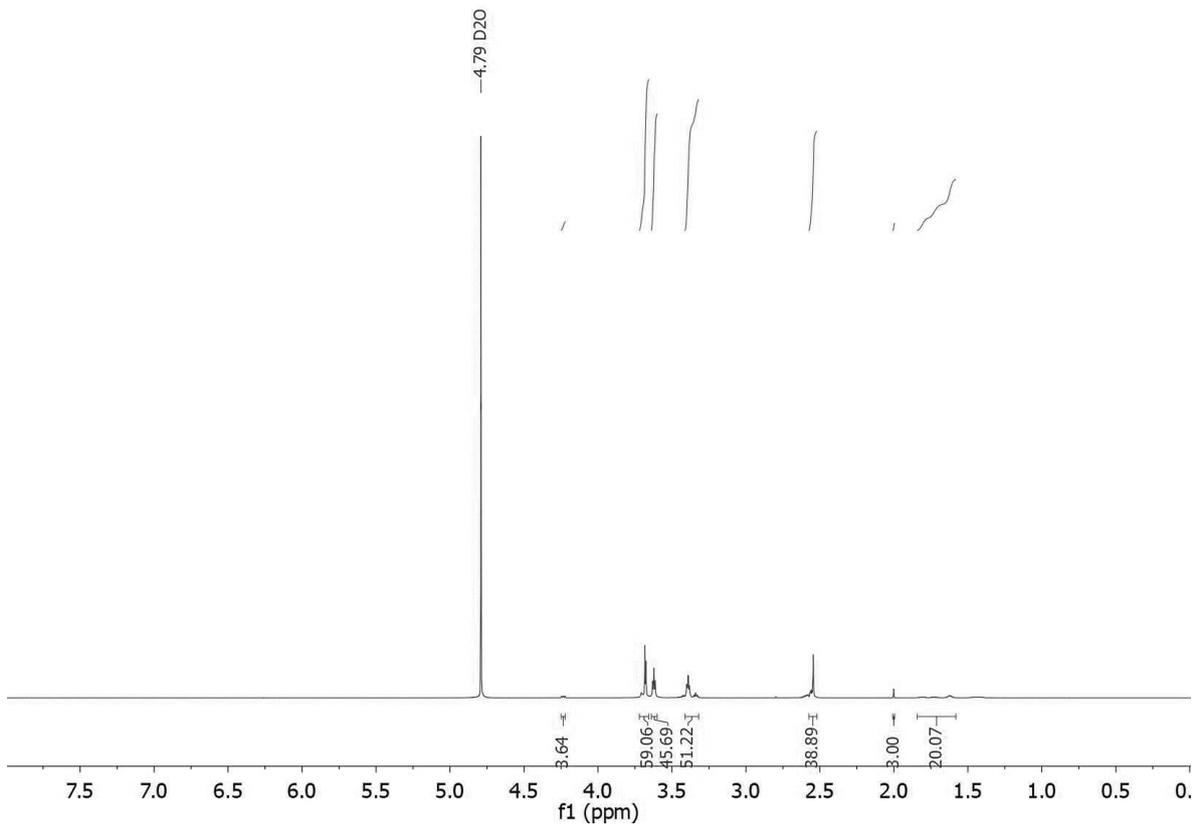


Abbildung 66 ¹H-NMR-Spektrum von **AO-O2** in D₂O (600 MHz). (Entnommen aus Ayla Yamans Bachelorarbeit)¹⁵⁶

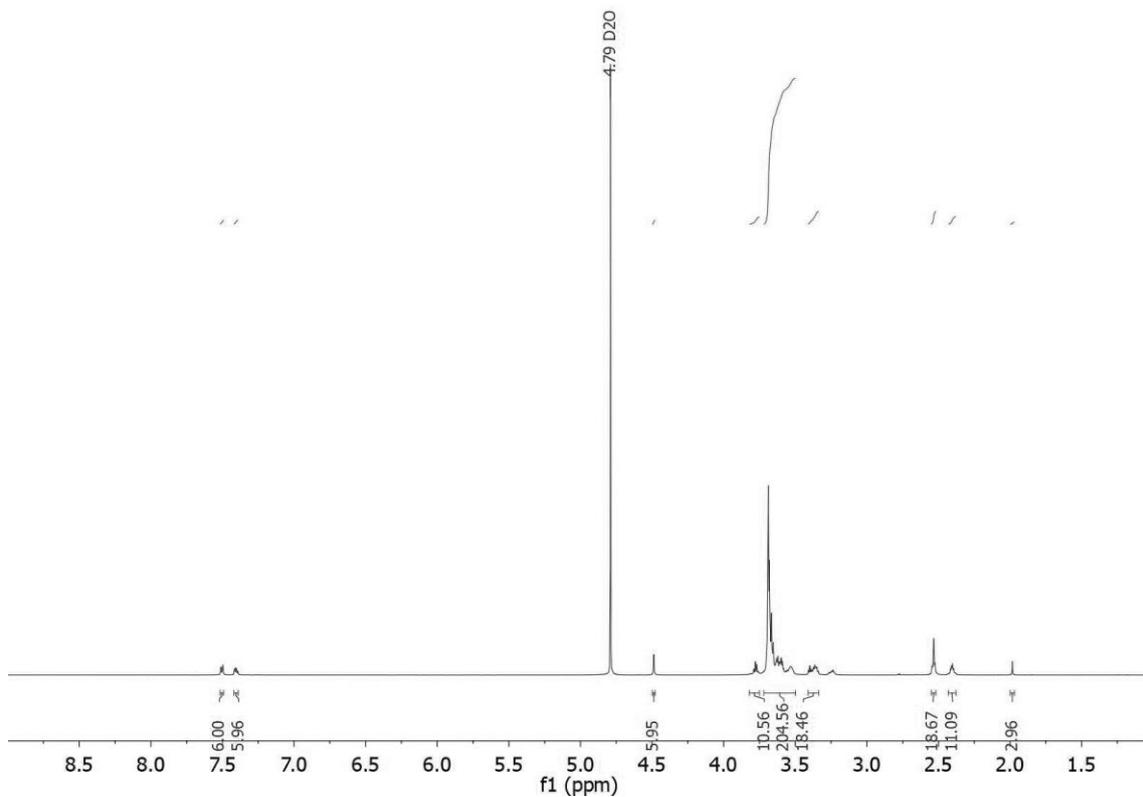


Abbildung 67 ¹H-NMR-Spektrum von **AO-O4** in D₂O (600 MHz). (Entnommen aus Ayla Yamans Bachelorarbeit)¹⁵⁶

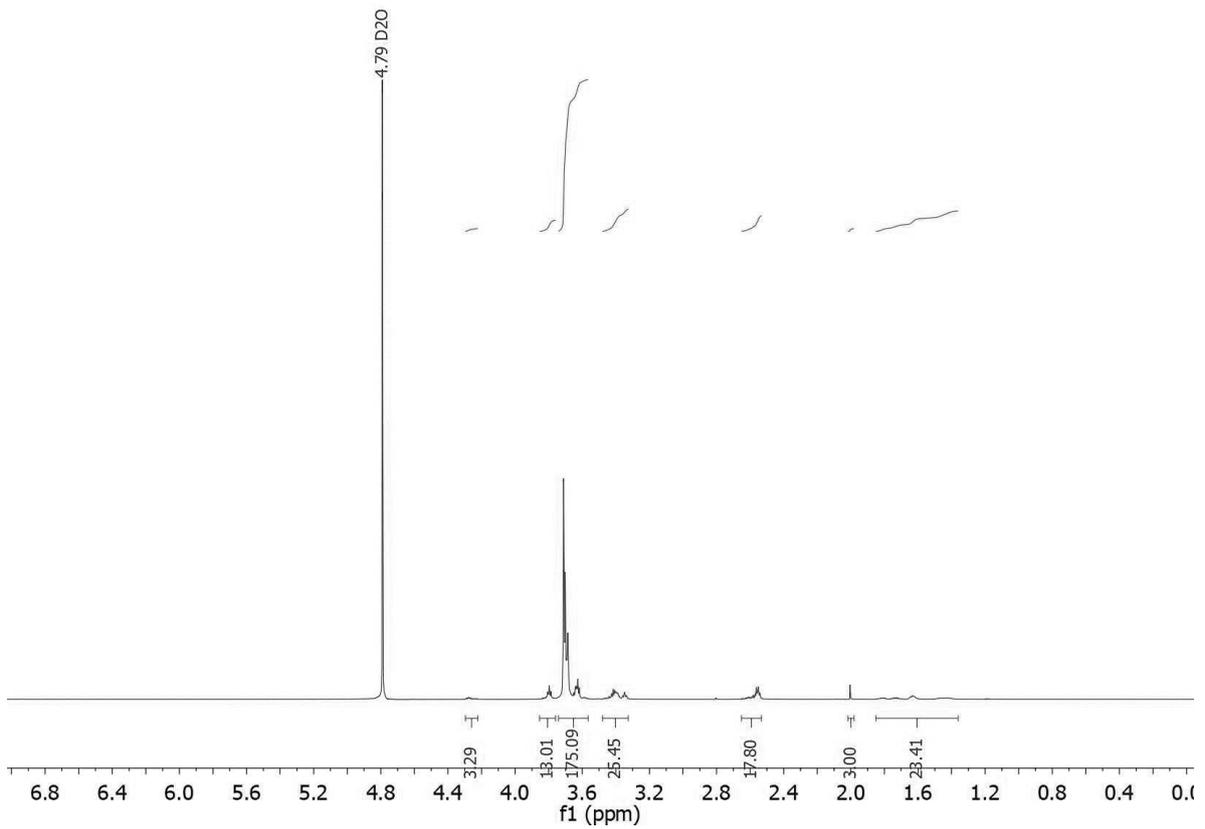


Abbildung 68 ^1H -NMR-Spektrum von **AO-O5** in D_2O (600 MHz). (Entnommen aus Ayla Yamans Bachelorarbeit)¹⁵⁶

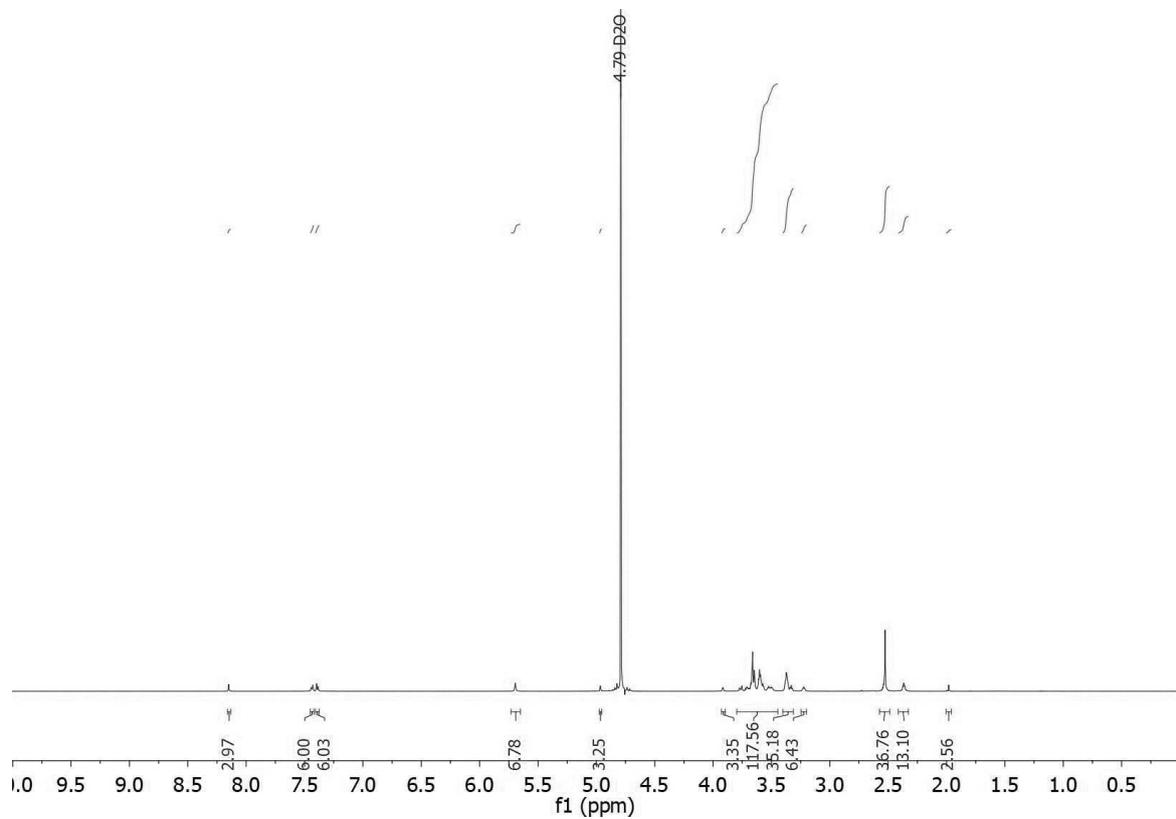


Abbildung 69 ^1H -NMR-Spektrum von **AO-G1** in D_2O (600 MHz). (Entnommen aus Ayla Yamans Bachelorarbeit)¹⁵⁶

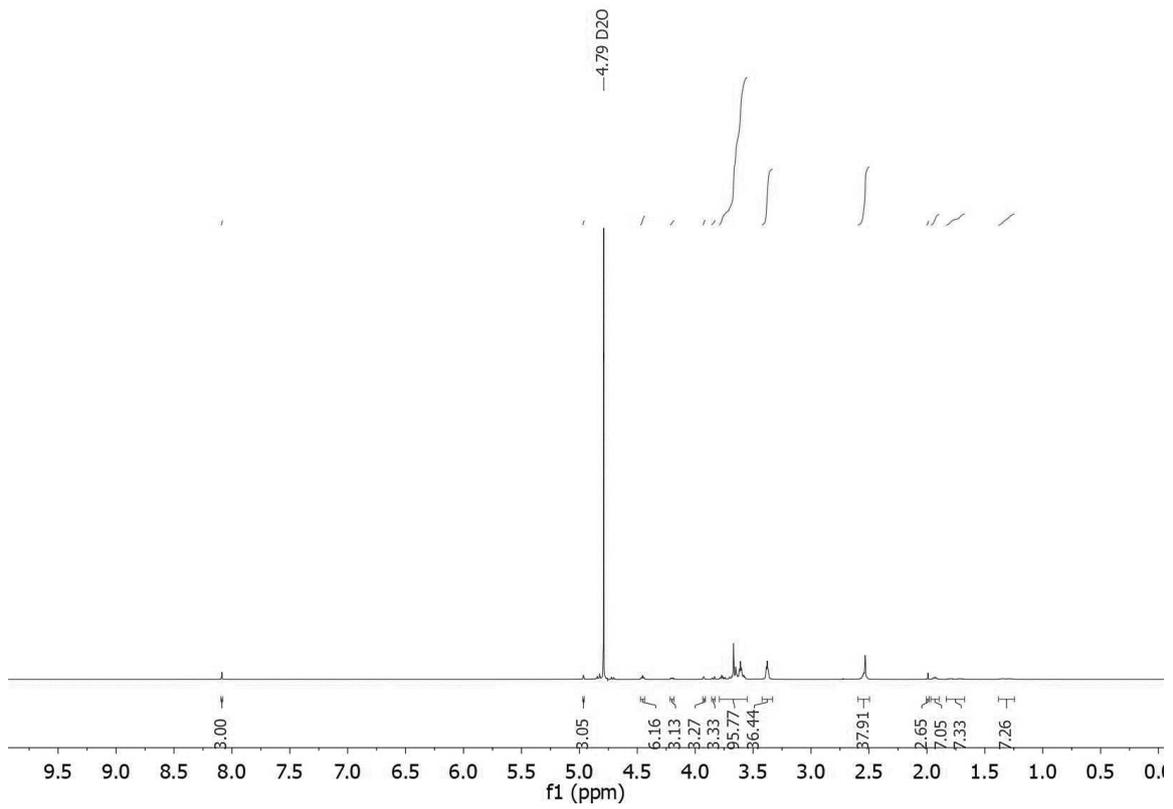


Abbildung 70 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **AO-G2** in D_2O (600 MHz). (Entnommen aus Ayla Yamans Bachelorarbeit)¹⁵⁶

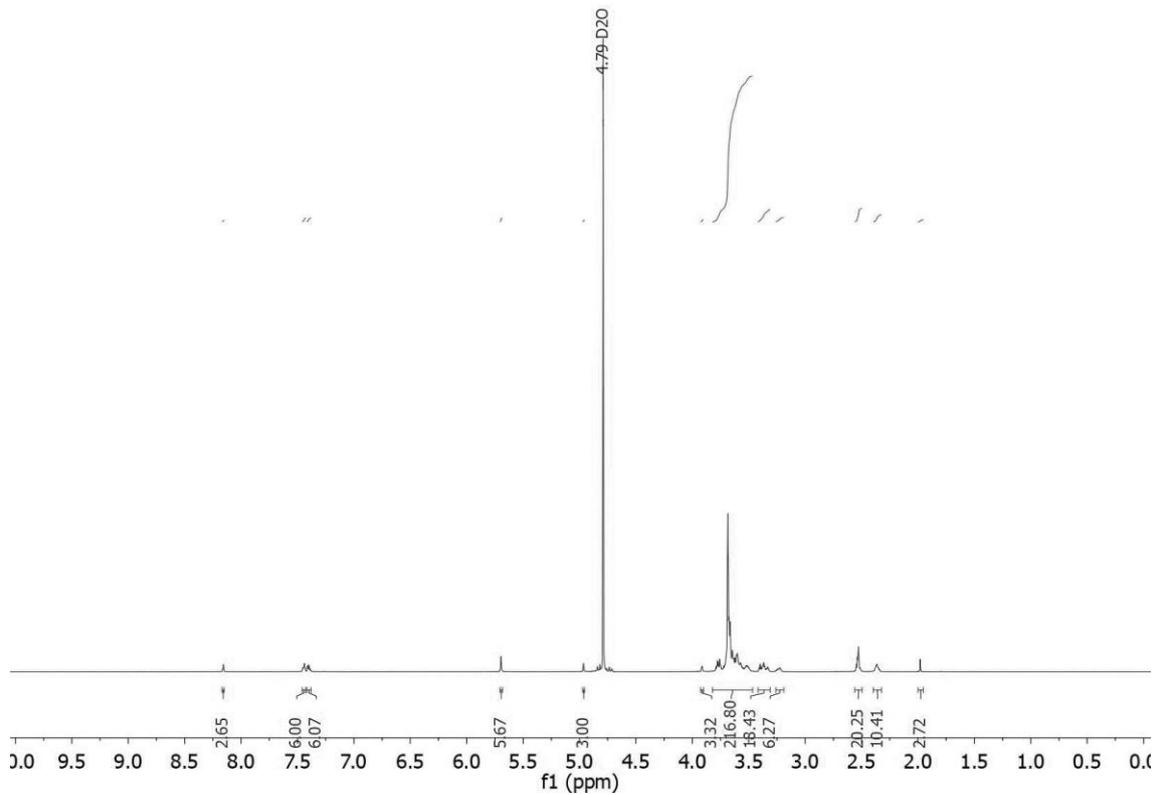


Abbildung 71 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **AO-G4** in D_2O (600 MHz). (Entnommen aus Ayla Yamans Bachelorarbeit)¹⁵⁶

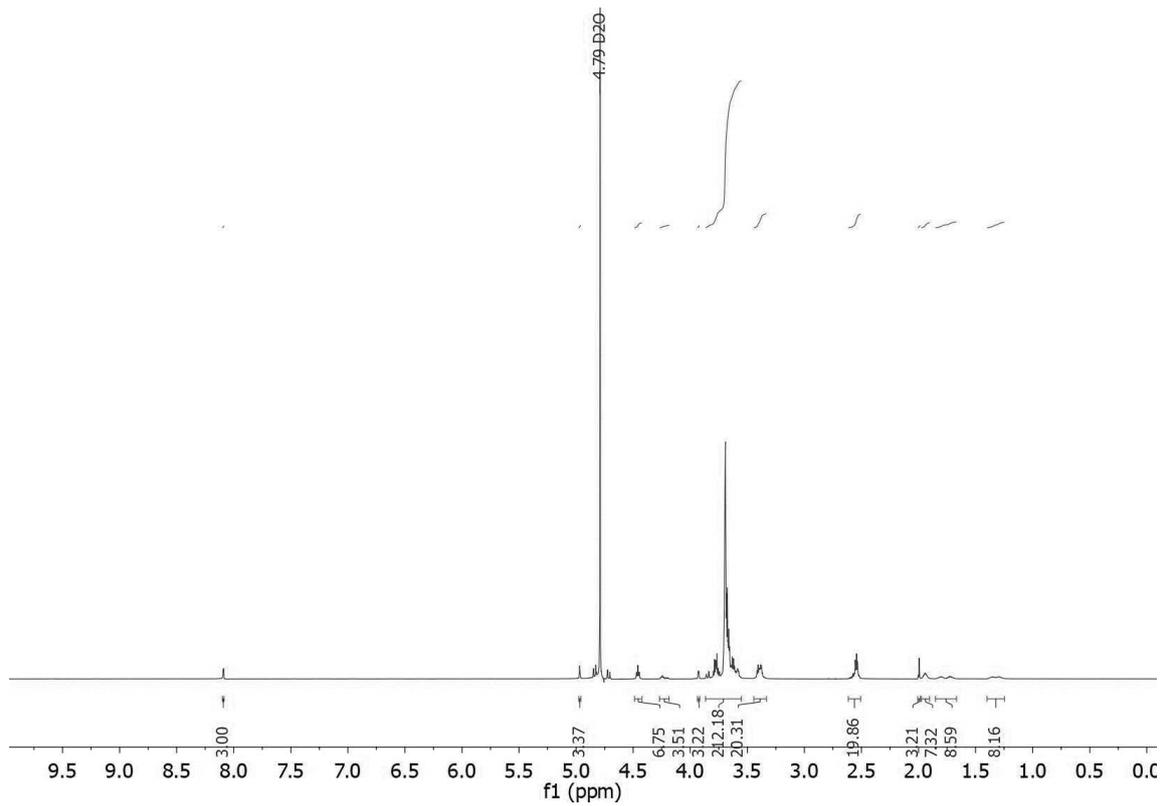


Abbildung 72 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **AO-G5** in D_2O (600 MHz). (Entnommen aus Ayla Yamans Bachelorarbeit)¹⁵⁶

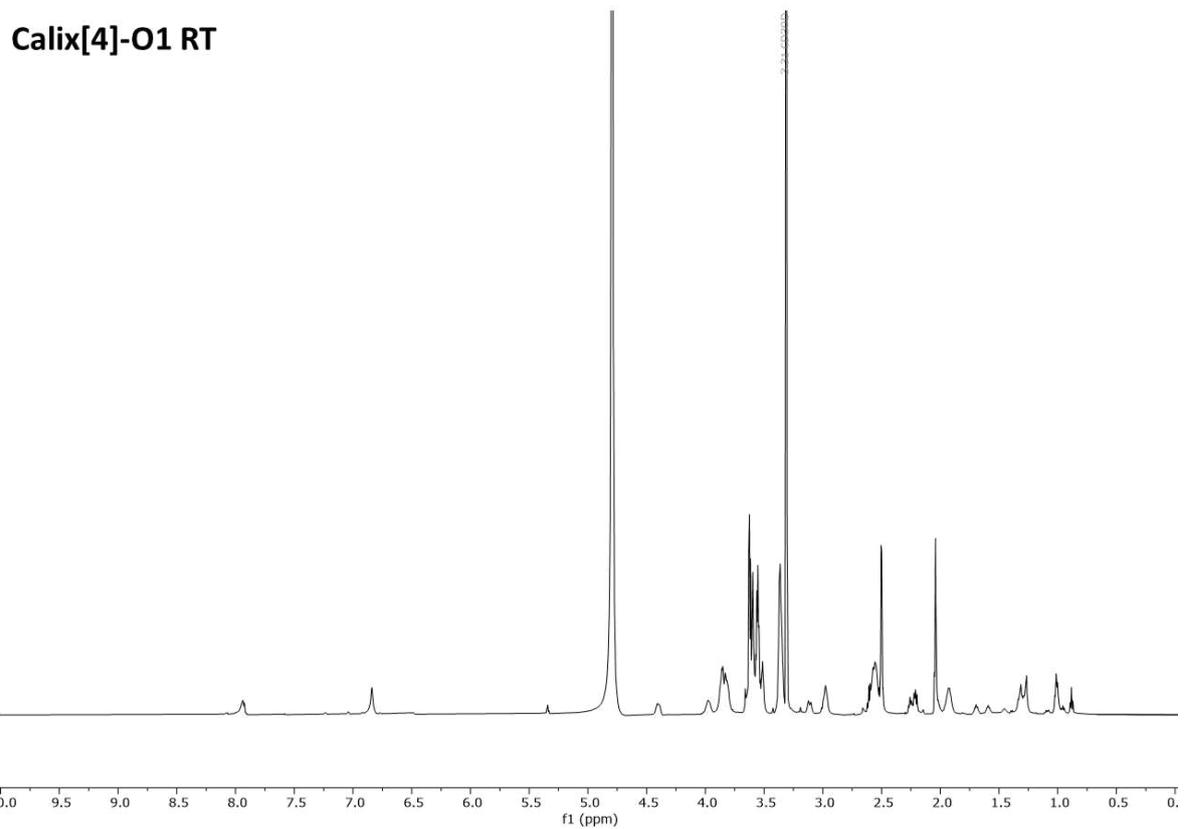


Abbildung 73 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **Calix[4]-O1** in $\text{D}_2\text{O}/\text{Methanol}$ bei RT (600 MHz).

Calix[4]-O1 -40°C

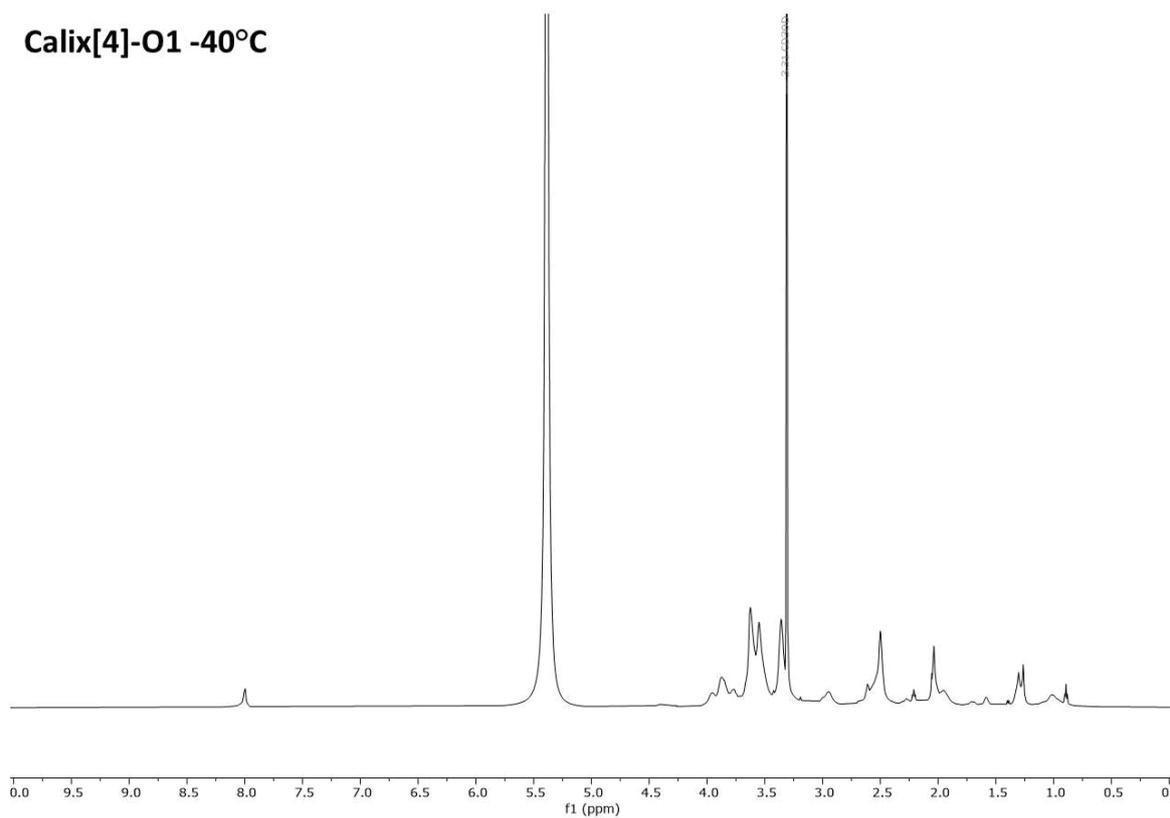


Abbildung 74 ¹H-NMR-Spektrum von **Calix[4]-O1** in D₂O/Methanol bei -40°C (600 MHz).

Calix[5]-O1 RT

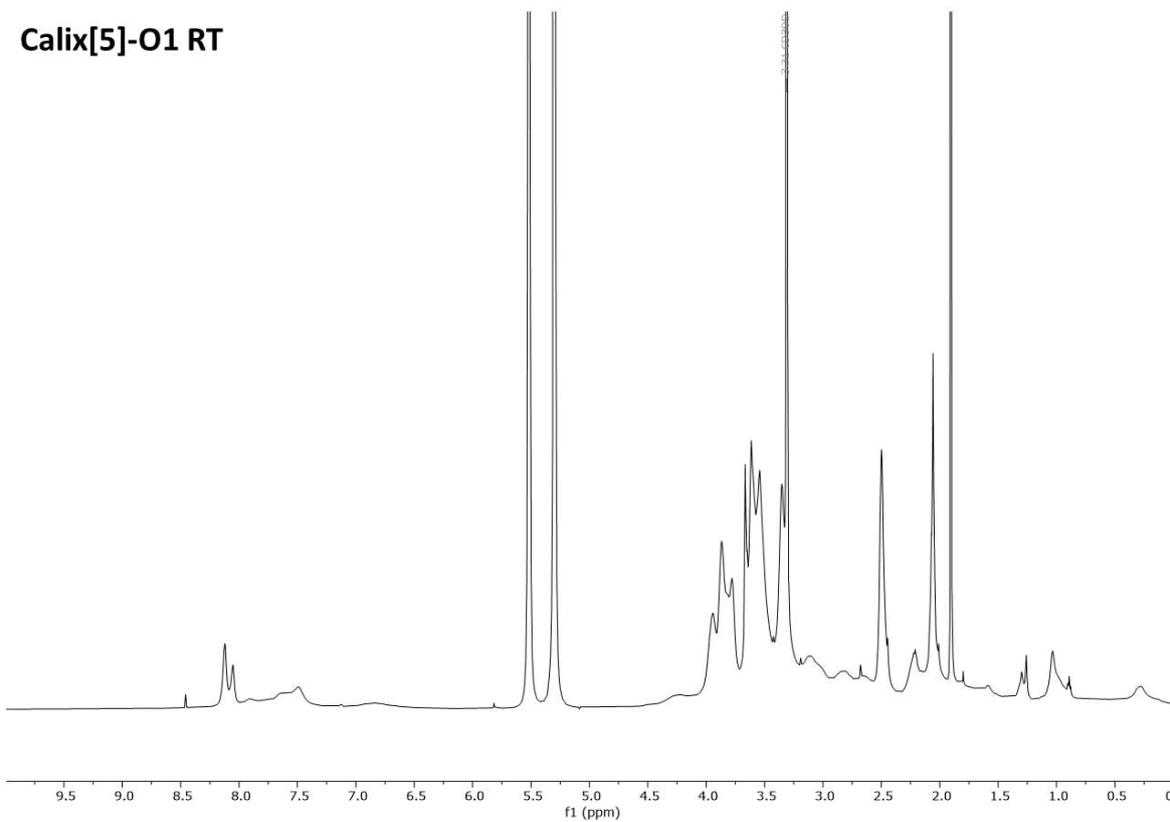


Abbildung 75 ¹H-NMR-Spektrum von **Calix[5]-O1** in D₂O/Methanol bei RT (600 MHz).

Calix[5]-O1 -40°C

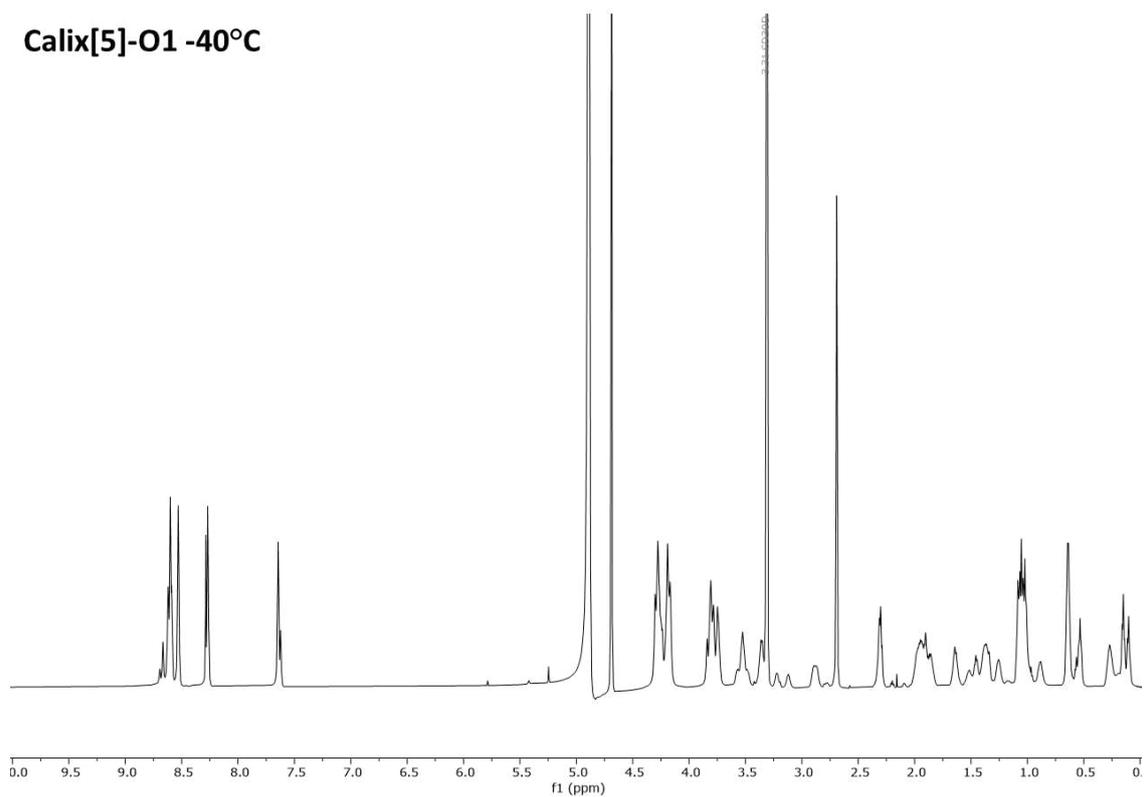


Abbildung 76 ¹H-NMR-Spektrum von **Calix[5]-O1** in D₂O/Methanol bei -40°C (600 MHz).

Calix[5]-O2 RT

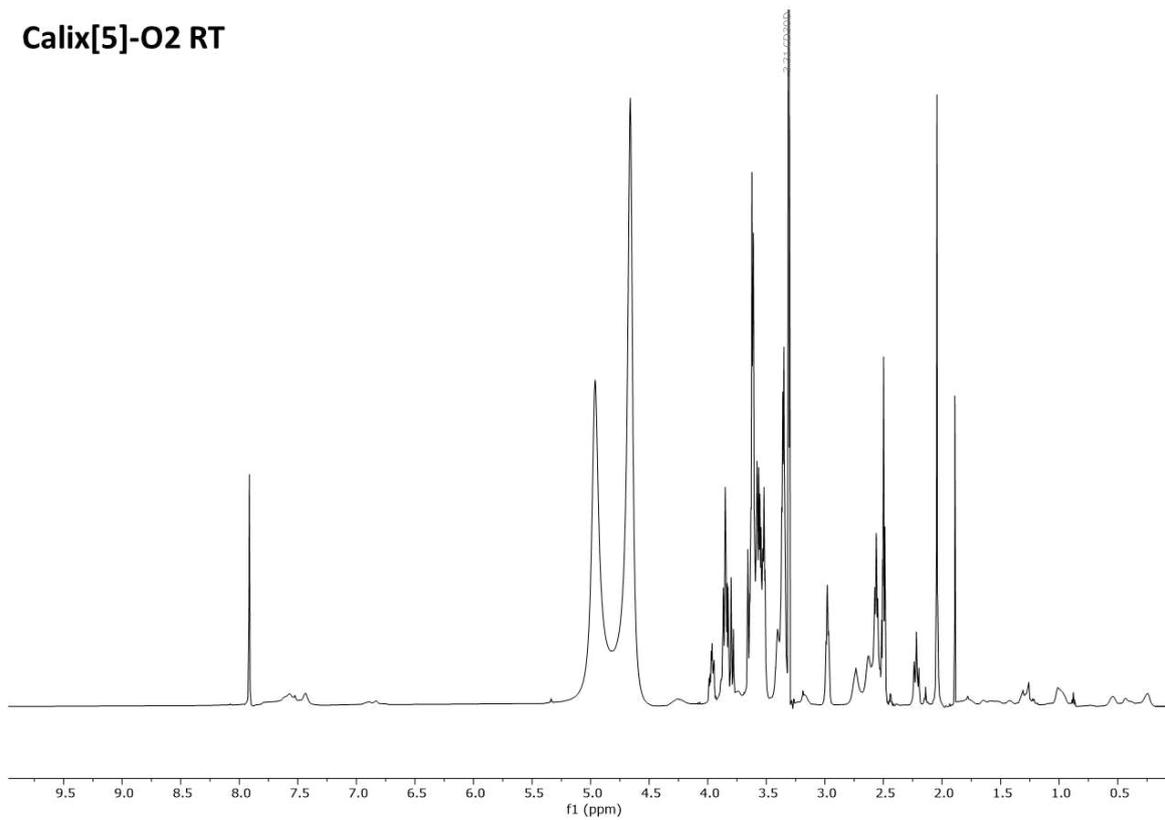


Abbildung 77 ¹H-NMR-Spektrum von **Calix[5]-O2** in D₂O/Methanol bei RT (600 MHz).

Calix[5]-O2 -40°C

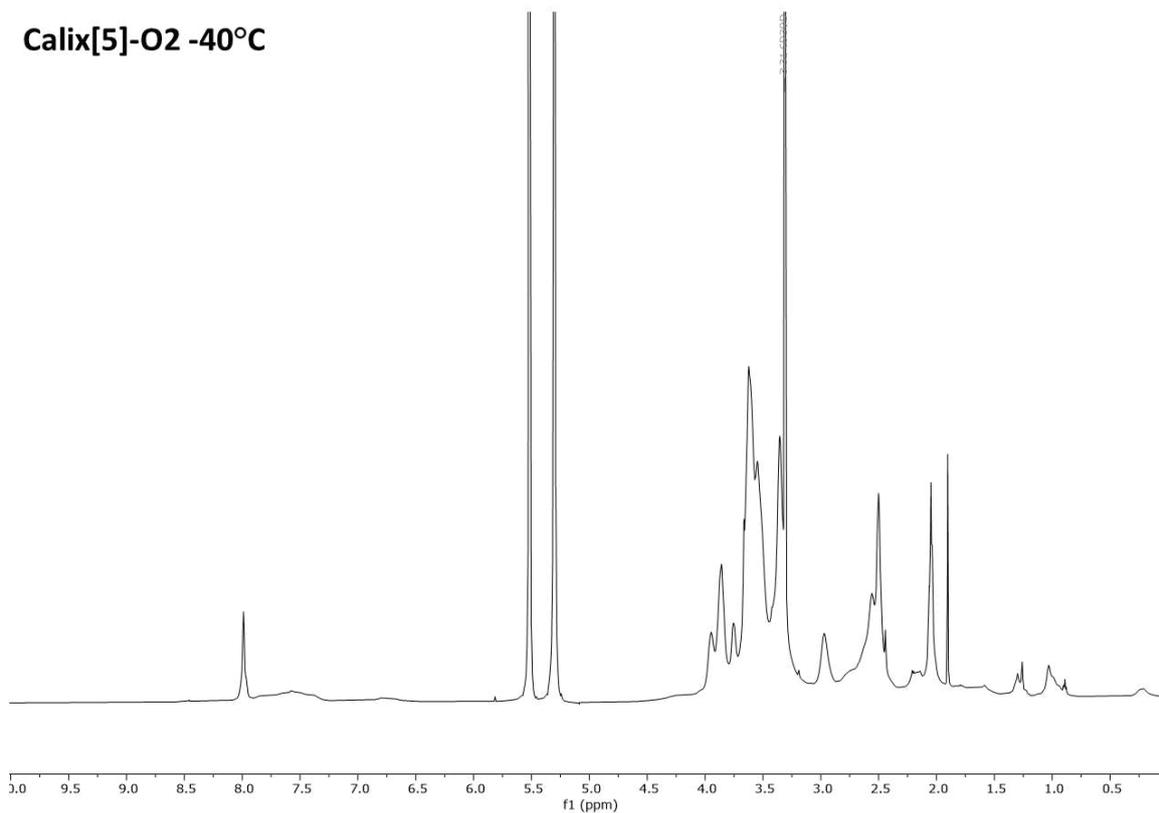


Abbildung 78 ¹H-NMR-Spektrum von **Calix[5]-O2** in D₂O/Methanol bei -40°C (600 MHz).

Calix[5]-O3 RT

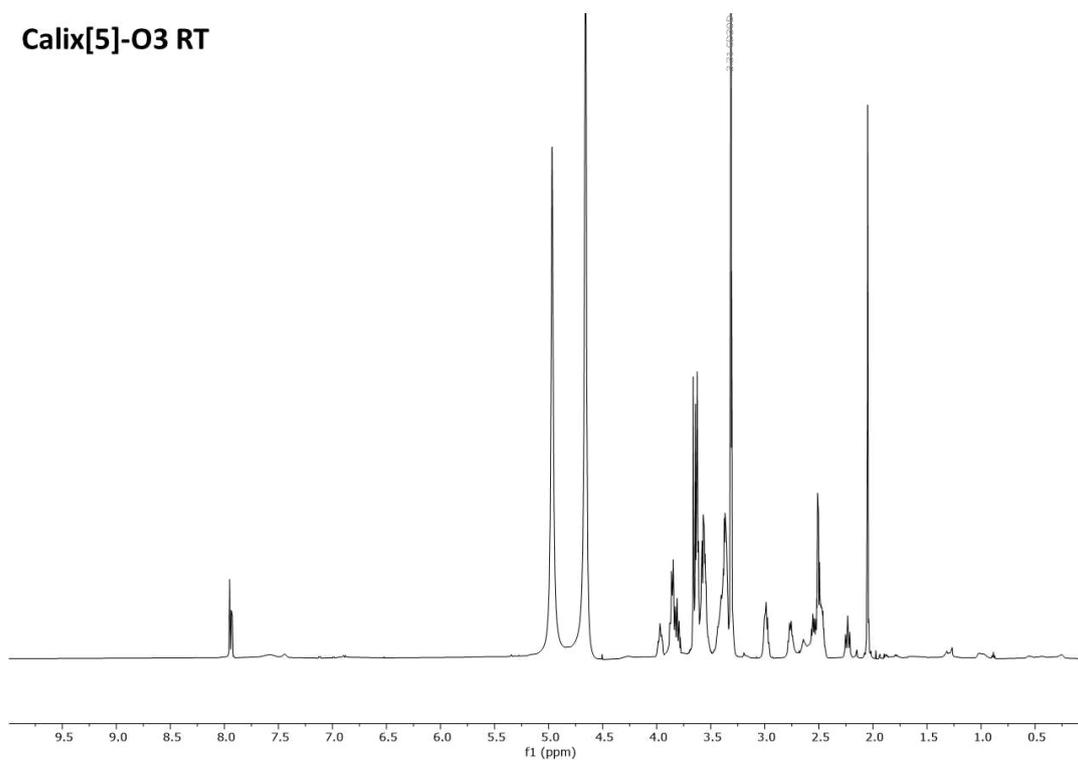


Abbildung 79 ¹H-NMR-Spektrum von **Calix[5]-O3** in D₂O/Methanol bei RT (600 MHz).

Calix[5]-O3 -40°C

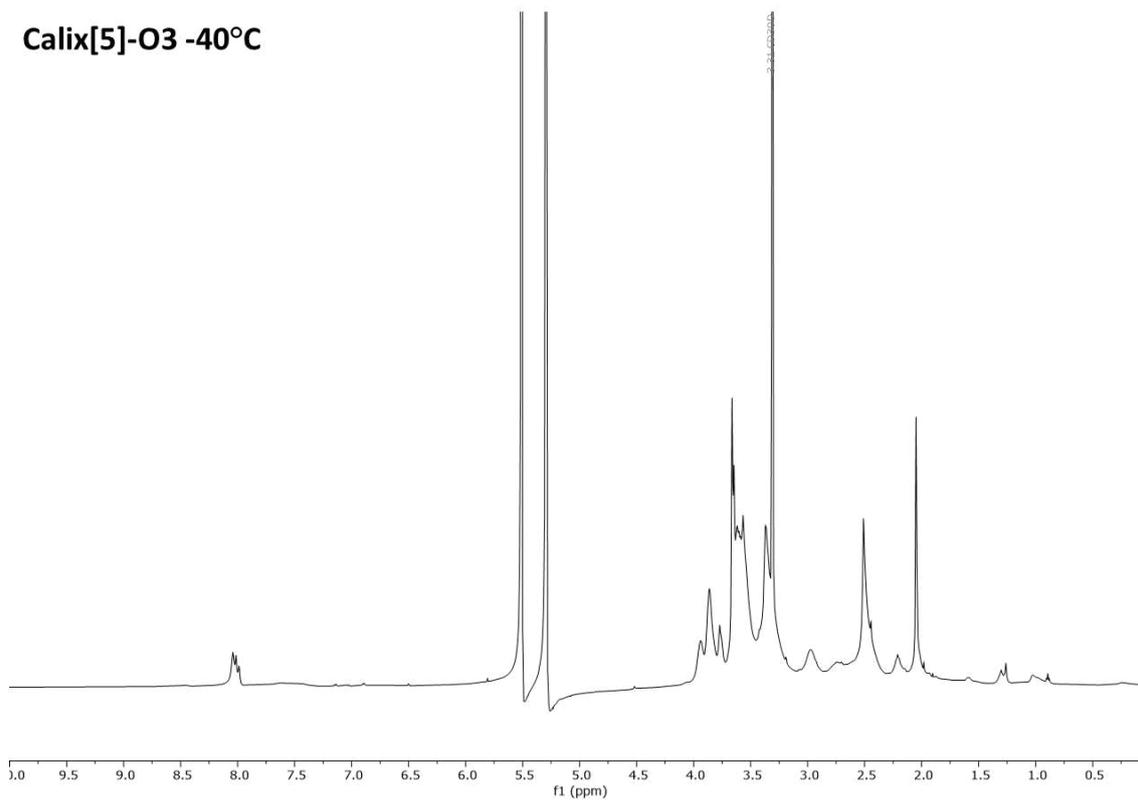


Abbildung 80 ¹H-NMR-Spektrum von **Calix[5]-O3** in D₂O/Methanol bei -40°C (600 MHz).

Calix[5] RT

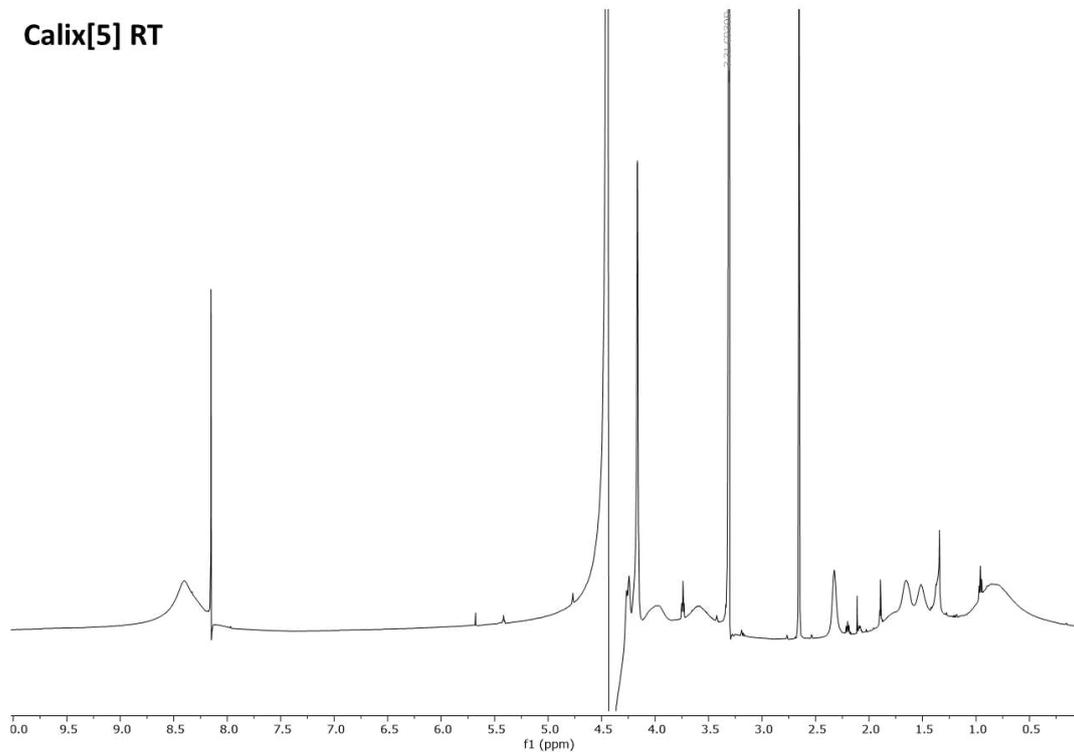


Abbildung 81 ¹H-NMR-Spektrum von **Calix[5]** in D₂O/Methanol bei RT (600 MHz).

Calix[5] -40°C

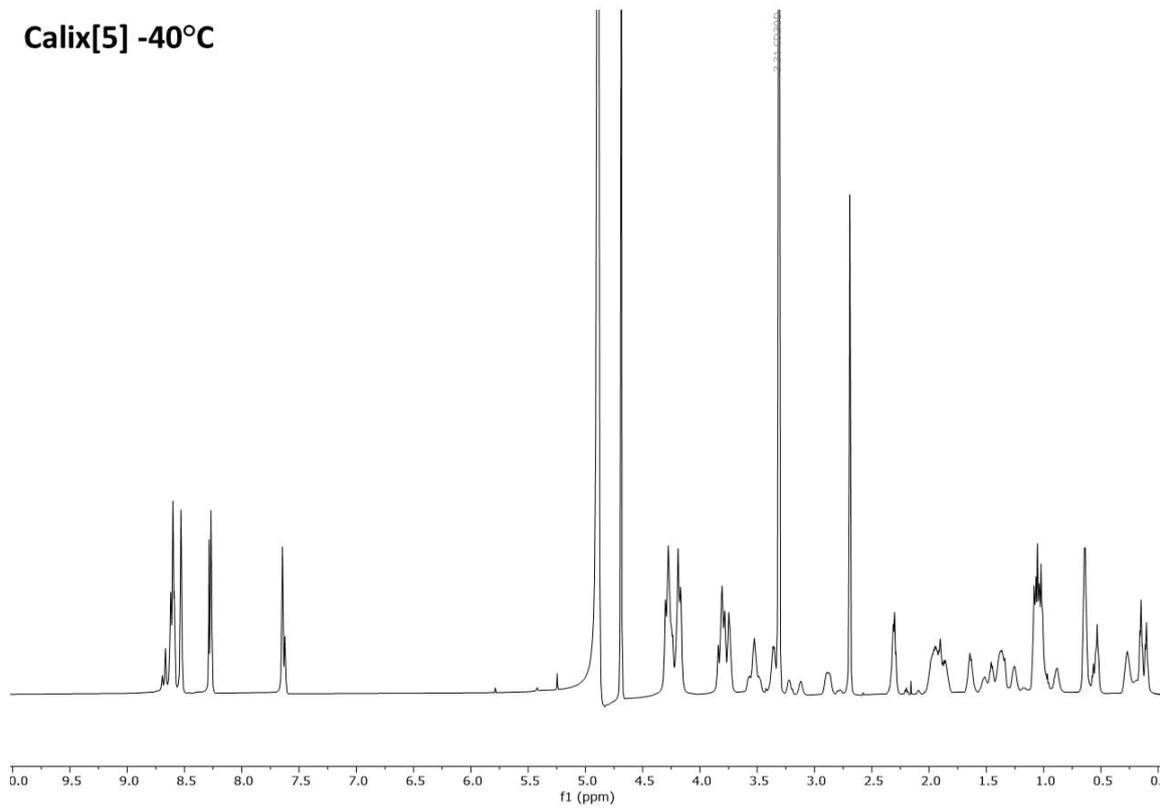


Abbildung 82 ^1H -NMR-Spektrum von **Calix[5]** in D_2O /Methanol bei RT (600 MHz).

RP-HPLC- und ESI-Spektren

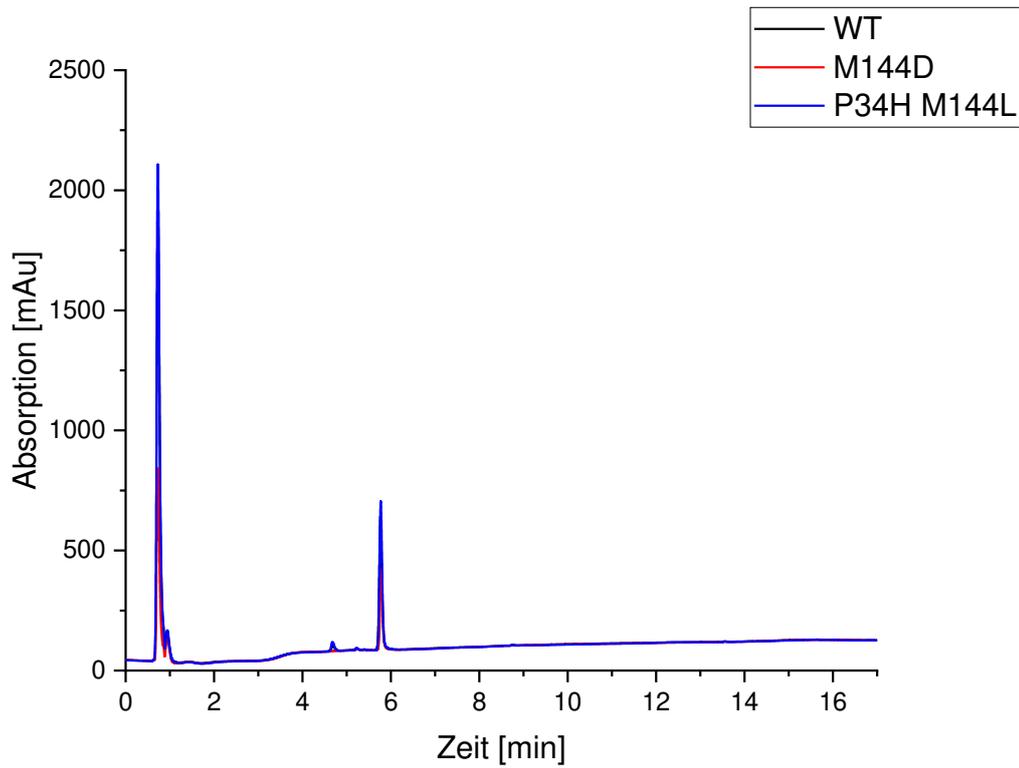


Abbildung 83 RP-HPLC-Spektrum von T2 mit den verschiedenen PmST1-Varianten.

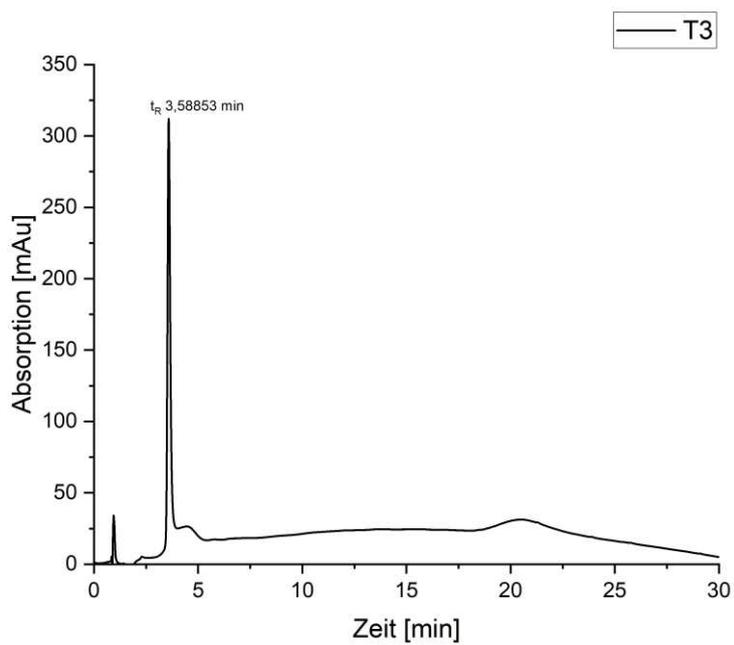
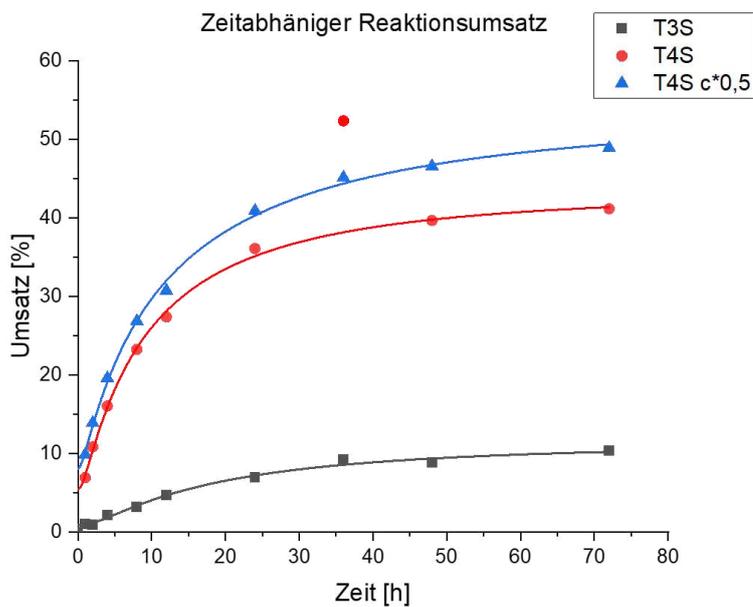


Abbildung 84 HPLC-Spektrum von T3 (linearer Gradient von 5-95 % Acetonitril in H₂O (0,1 % Ameisensäure) in 30 min).



Modell	LognormalCDF
Gleichung	$y=y_0+A*\text{normcdf}(\frac{\ln(x)-x_c}{w})$
Zeichnen	D
y0	8,07437 ± 1,65891
A	45,71091 ± 3,81476
x _c	2,39961 ± 0,1002
w	1,44273 ± 0,18789
Chi-Quadr Reduziert	0,6729
R-Quadrat (COD)	0,99808
Kor. R-Quadrat	0,99692

Modell	LognormalCDF
Gleichung	$y=y_0+A*\text{normcdf}(\frac{\ln(x)-x_c}{w})$
Zeichnen	C
y0	5,45501 ± 1,37193
A	37,85651 ± 2,42437
x _c	2,16012 ± 0,07592
w	1,29624 ± 0,14869
Chi-Quadr Reduziert	0,49843
R-Quadrat (COD)	0,99836
Kor. R-Quadrat	0,99713

Modell	LognormalCDF
Gleichung	$y=y_0+A*\text{normcdf}(\frac{\ln(x)-x_c}{w})$
Zeichnen	B
y0	0,86806 ± 0,41118
A	10,42288 ± 1,52725
x _c	2,87543 ± 0,21293
w	1,11557 ± 0,25705
Chi-Quadr Reduziert	0,20455
R-Quadrat (COD)	0,99058
Kor. R-Quadrat	0,98492

Abbildung 85 Grafische Darstellung des zeitabhängigen Reaktionsumsatzes der enzymatischen Reaktionskinetik von T3 und T4 über 72h mit logarithmischen Fit. Die Umsätze wurden mittels RP-HPLC-MS(ESI) (linearer Gradient von 5-95 vo.-% MeCN in H₂O in 30 min bei 25 °C) bestimmt.

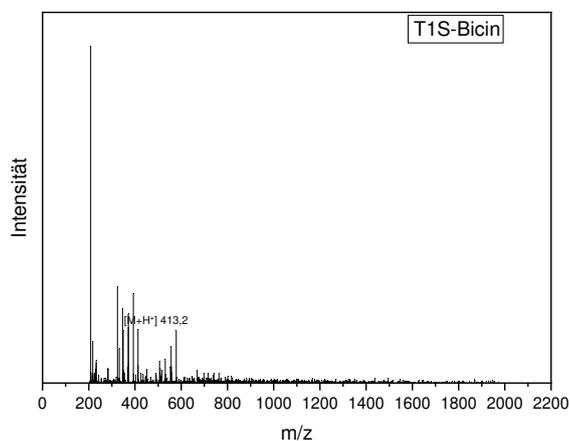


Abbildung 86 ESI-Spektrum von T1S in Bicin.

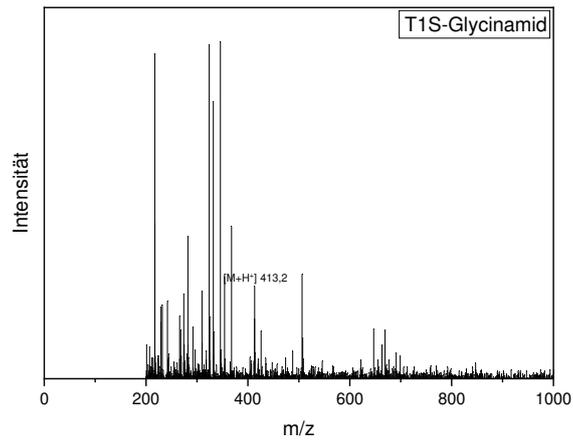


Abbildung 87 ESI-Spektrum von **T1S** in Glycinamid

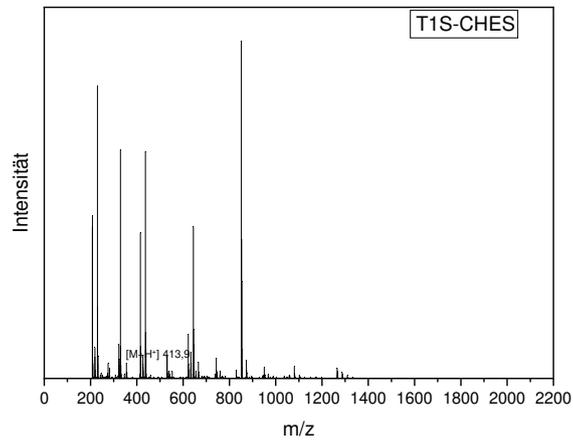


Abbildung 88 ESI-Spektrum von **T1S** in CHES

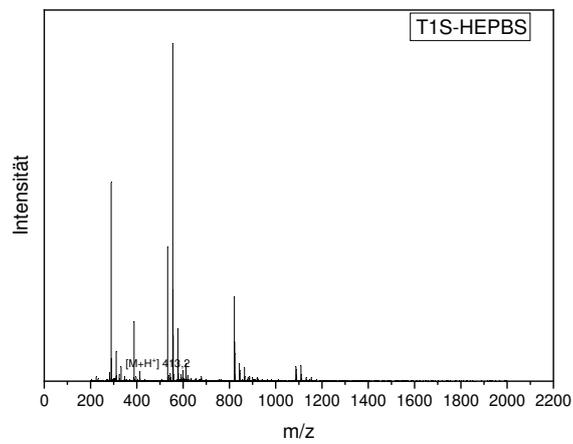


Abbildung 89 ESI-Spektrum von **T1S** in HEPBS

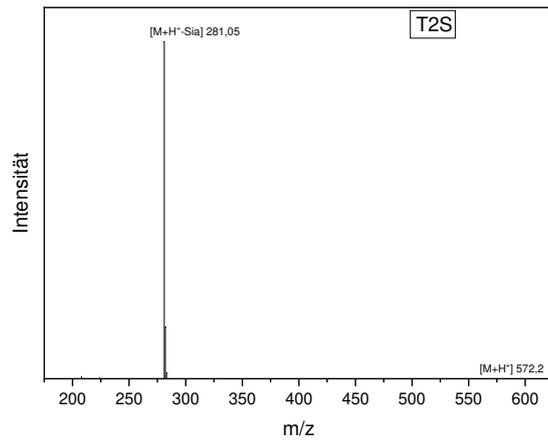


Abbildung 90 ESI-Spektrum von T2S bei einer Retentionszeit.

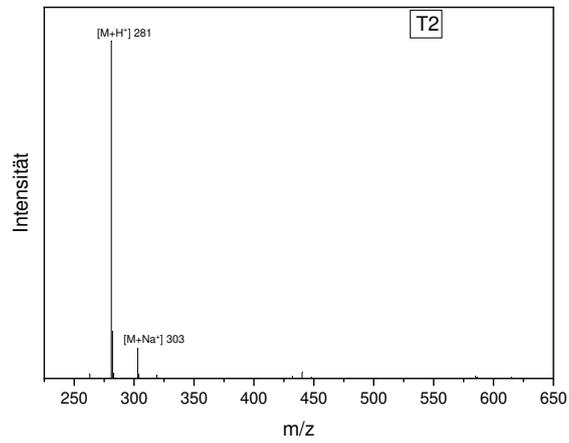


Abbildung 91 ESI-Spektrum von T2 bei einer Retentionszeit.

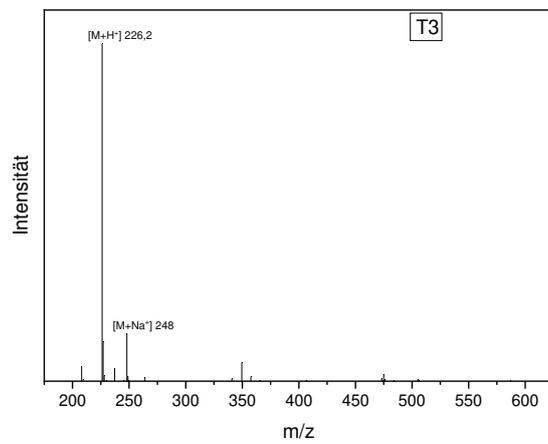


Abbildung 92 ESI-Spektrum von T3 bei einer Retentionszeit.

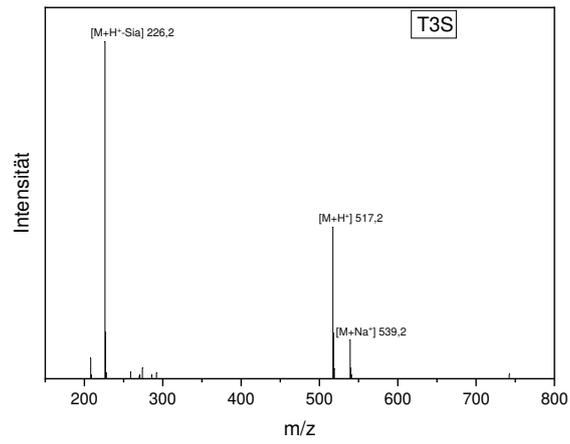


Abbildung 93 ESI-Spektrum von **T3S** bei einer Retentionszeit.

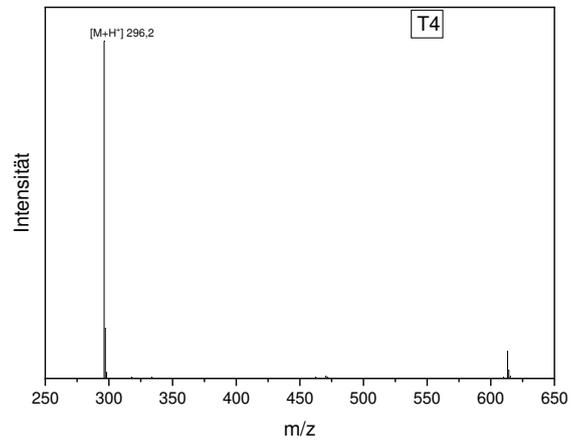


Abbildung 94 ESI-Spektrum von **T4** bei einer Retentionszeit.

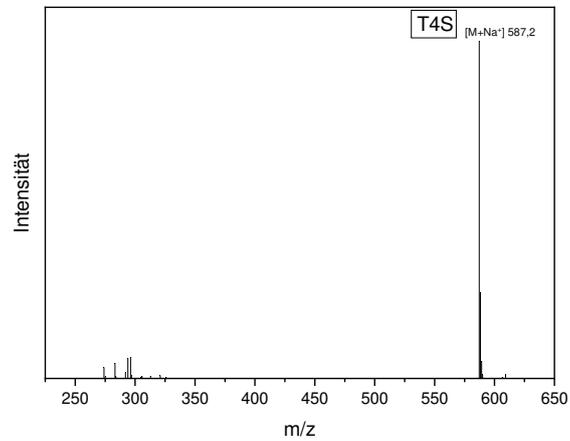


Abbildung 95 ESI-Spektrum von **T4S** bei einer Retentionszeit.

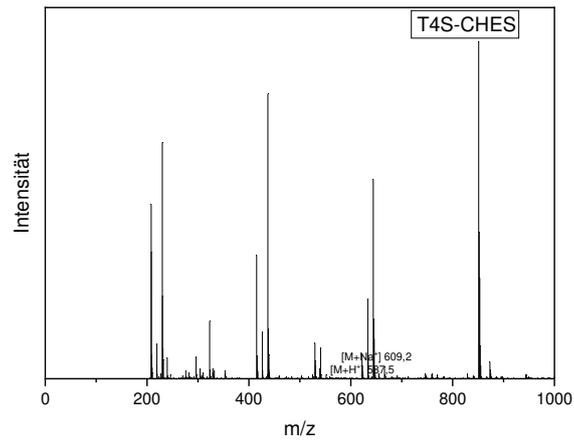


Abbildung 96 ESI-Spektrum von **T4S** in CHES.

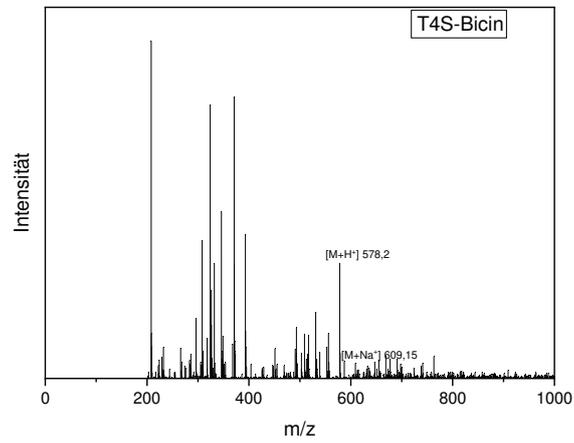


Abbildung 97 ESI-Spektrum von **T4S** in Bicin.

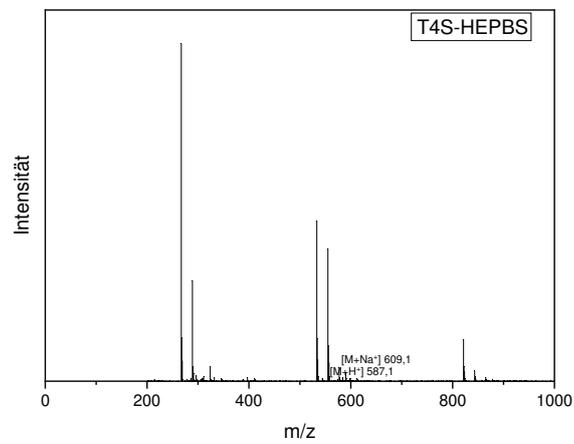


Abbildung 98 ESI-Spektrum von **T4S** in HEPBS.

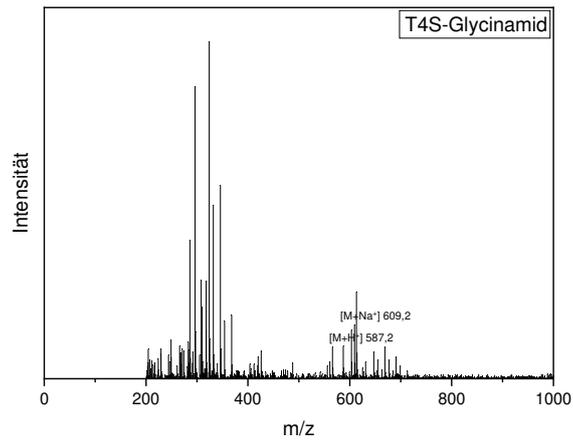


Abbildung 99 ESI-Spektren von **T4S** in Glycinamid.

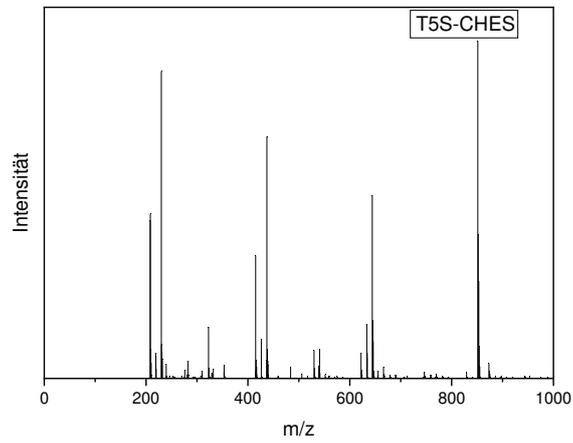


Abbildung 100 ESI-Spektrum von **T5S** in CHES.

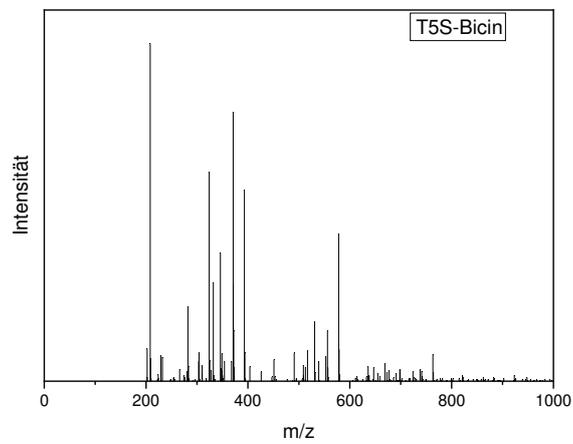


Abbildung 101 ESI-Spektrum von **T5S** in Bicin.

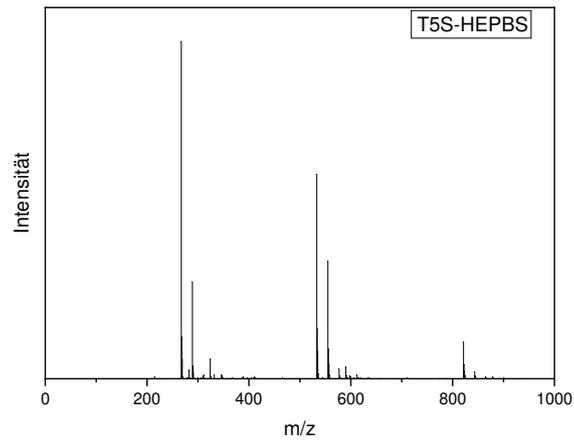


Abbildung 102 ESI-Spektrum von **T5S** in HEPBS.

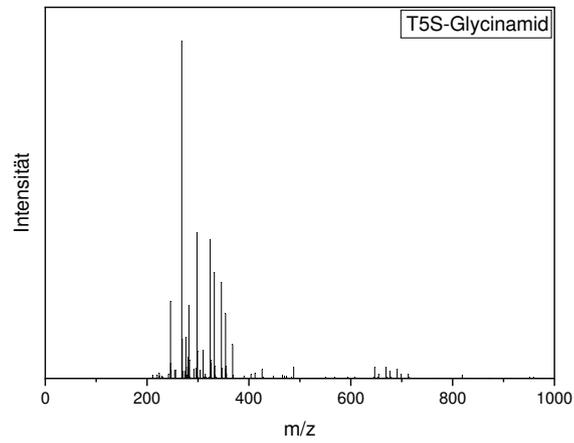


Abbildung 103 ESI-Spektrum von **T5S** in Glycinamid.

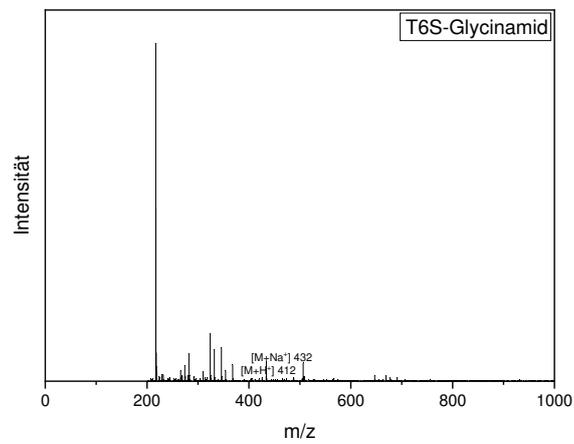


Abbildung 104 ESI-Spektrum von **T6S** in Glycinamid.

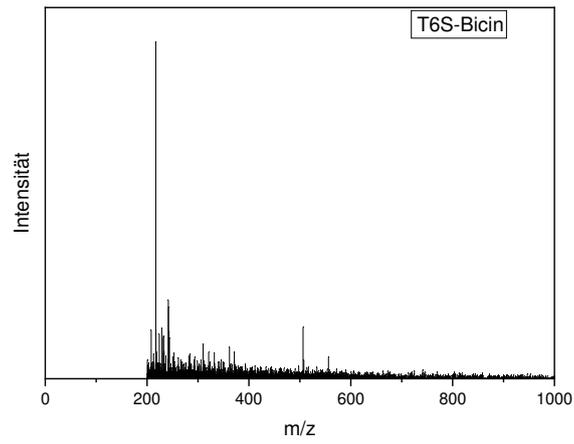


Abbildung 105 ESI-Spektrum von **T6S** in Bicin.

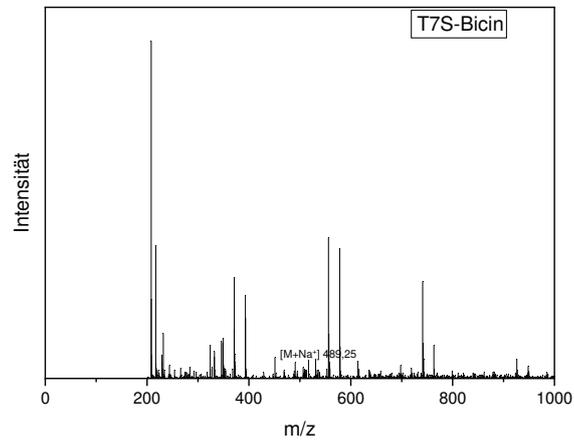


Abbildung 106 ESI-Spektrum von **T7S** in Bicin.

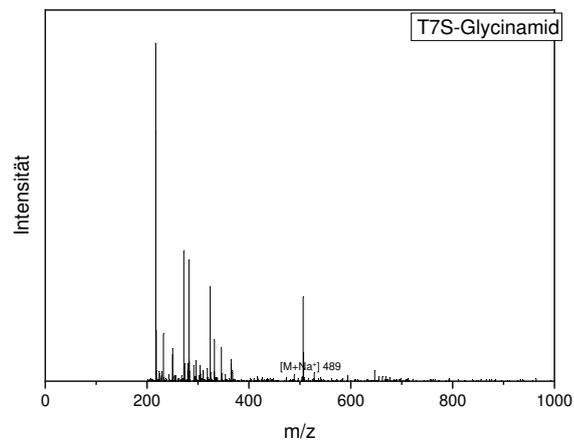


Abbildung 107 ESI-Spektrum von **T7S** in Glycinamid.

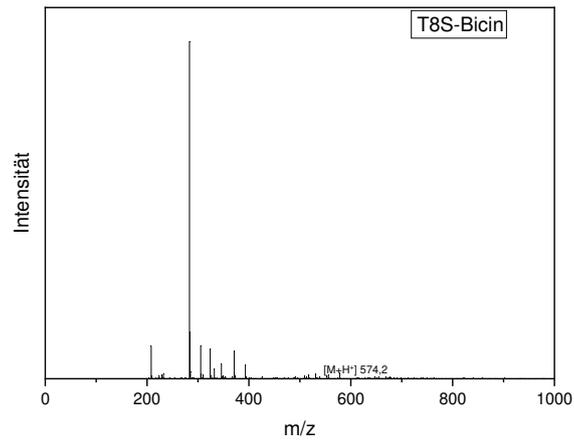


Abbildung 108 ESI-Spektrum von **T8S** in Bicin.

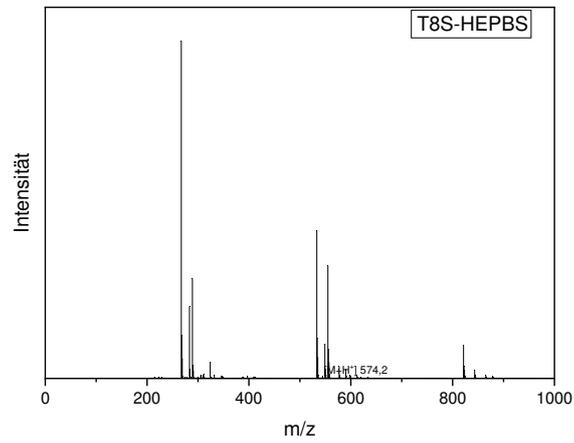


Abbildung 109 ESI-Spektrum von **T8S** in HEPBS.

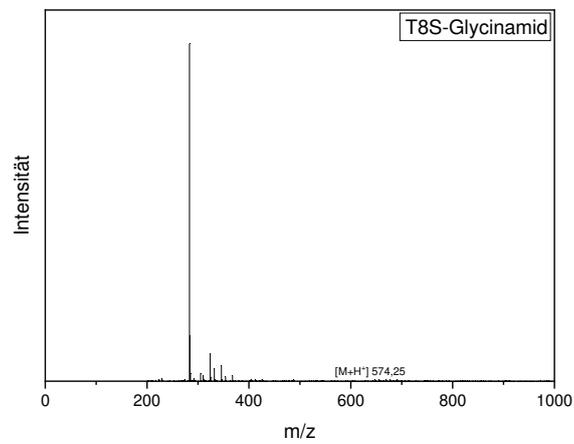


Abbildung 110 ESI-Spektrum von **T8S** in Glycinamid.

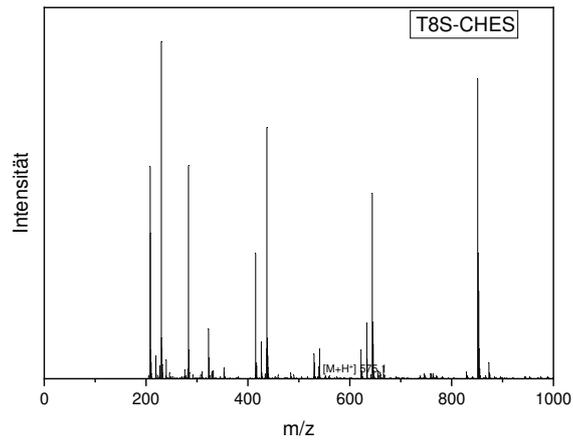


Abbildung 111 ESI-Spektrum von **T8S** in CHES.

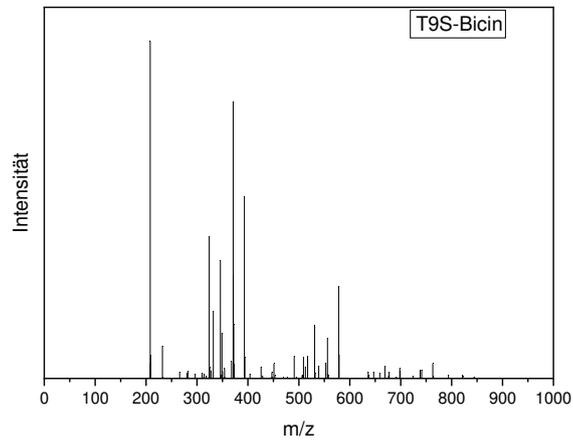


Abbildung 112 ESI-Spektrum von **T9S** in Bicin.

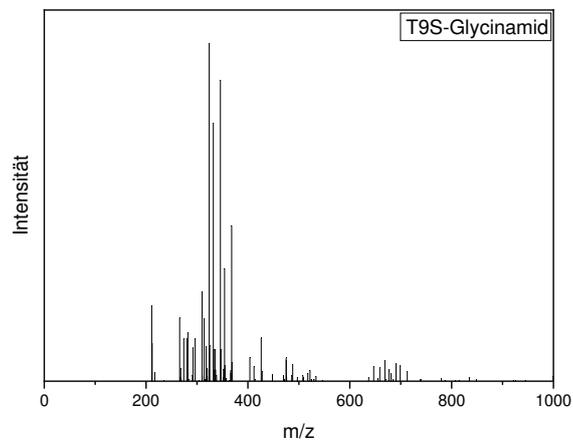


Abbildung 113 ESI-Spektrum von **T9S** in Glycinamid.

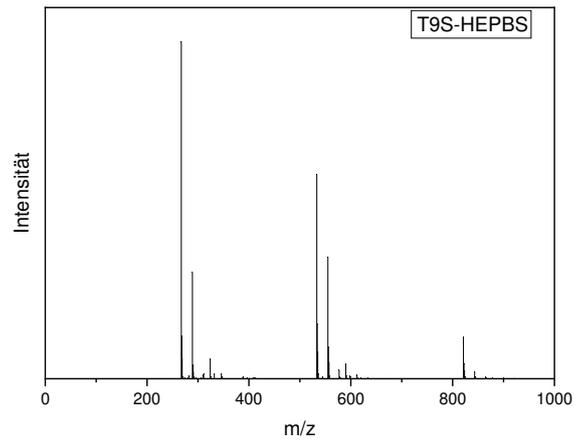


Abbildung 114 ESI-Spektrum von **T9S** in HEPBS.

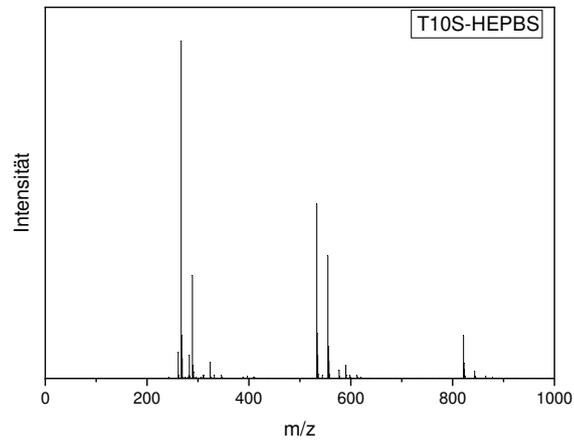


Abbildung 115 ESI-Spektrum von **T10S** in HEPBS.

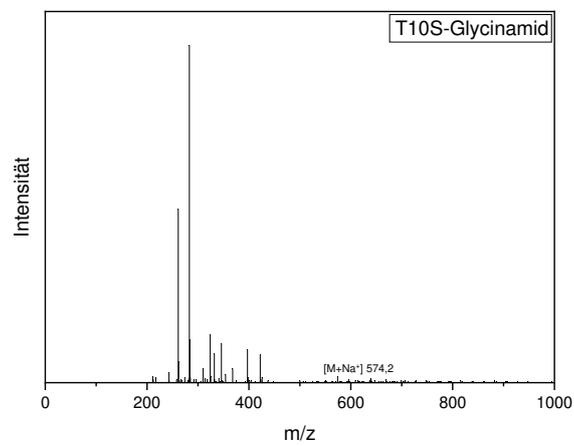


Abbildung 116 ESI-Spektrum von **T10S** in Glycinamid.

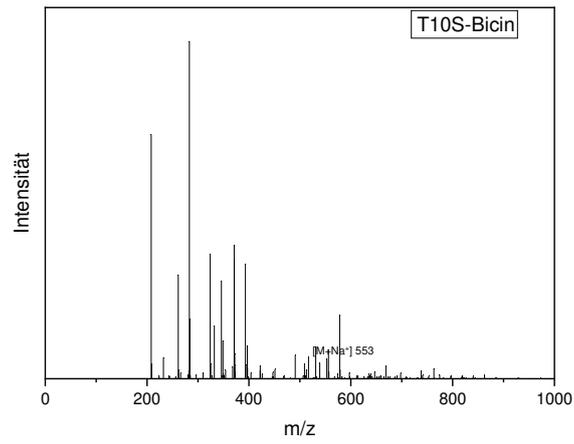


Abbildung 117 ESI-Spektrum von **T10S** in Bicin.

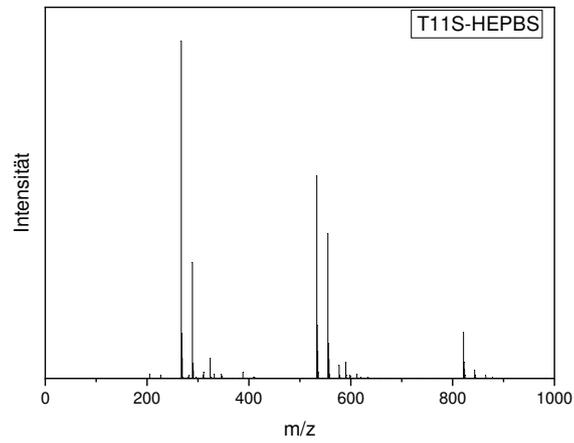


Abbildung 118 ESI-Spektrum von **T11S** in HEPBS.

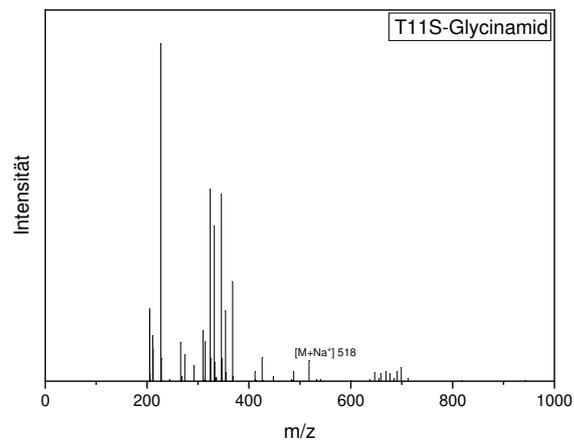


Abbildung 119 ESI-Spektrum von **T11S** in Glycinamid.

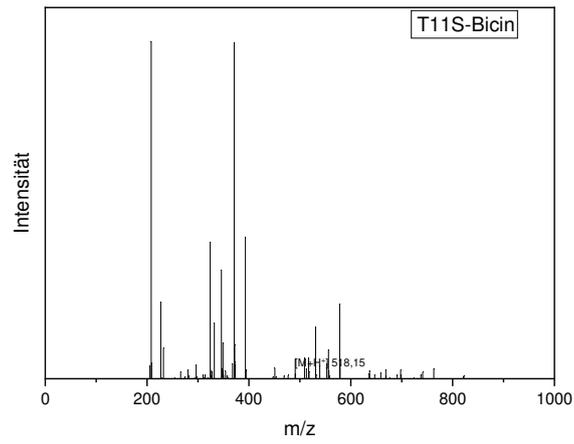


Abbildung 120 ESI-Spektrum von **T11S** in Bicin.

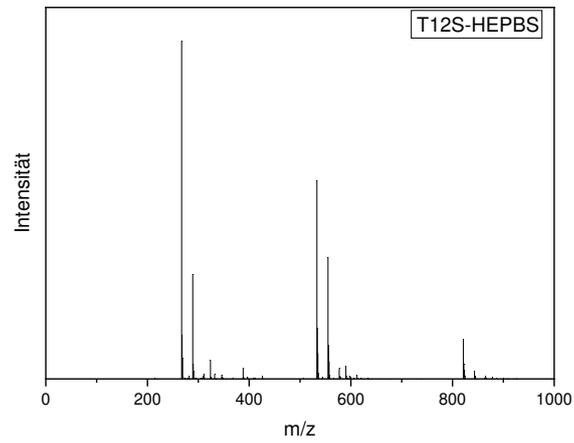


Abbildung 121 ESI-Spektrum von **T12S** in HEPBS.

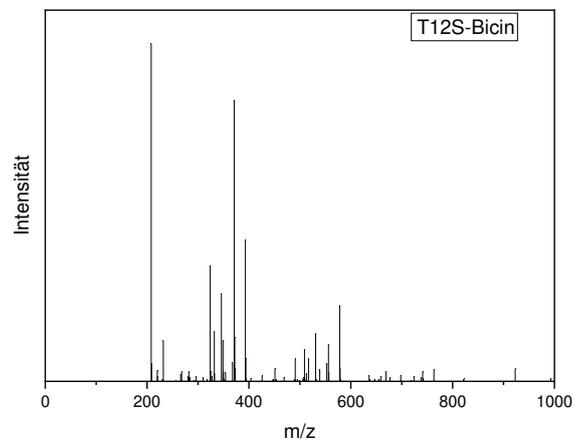


Abbildung 122 ESI-Spektrum von **T12S** in Bicin.

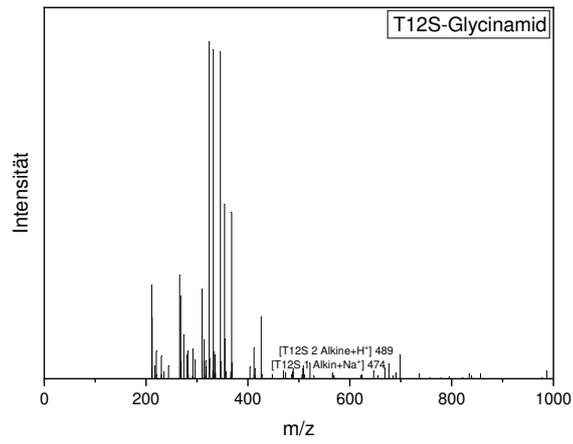


Abbildung 123 ESI-Spektrum von **T12S** in Glycinamid.

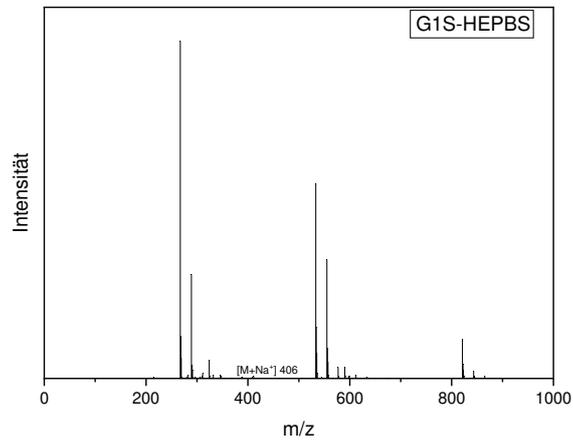


Abbildung 124 ESI-Spektrum von **G1S** in HEPBS.

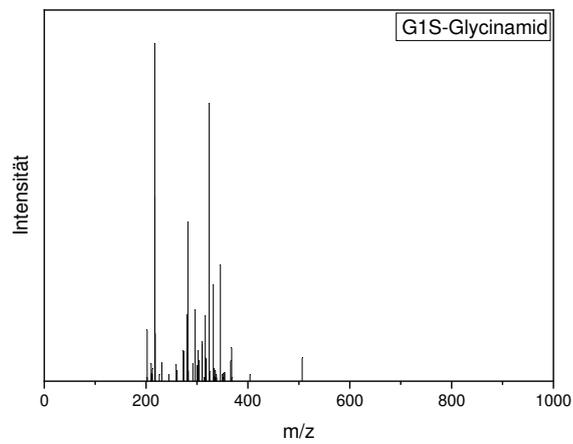


Abbildung 125 ESI-Spektrum von **G1S** in Glycinamid.

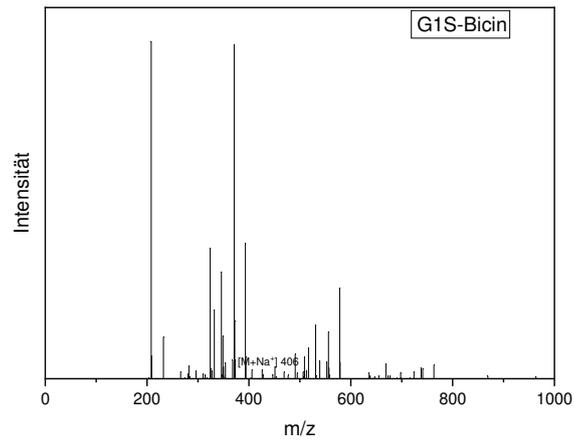


Abbildung 126 ESI-Spektrum von **G1S** in Bicin.

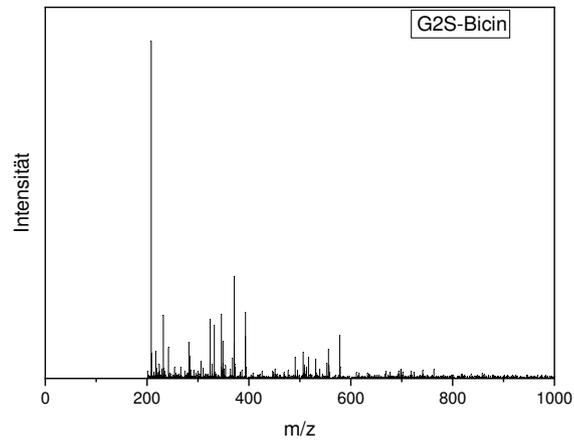


Abbildung 127 ESI-Spektrum von **G2S** in Bicin.

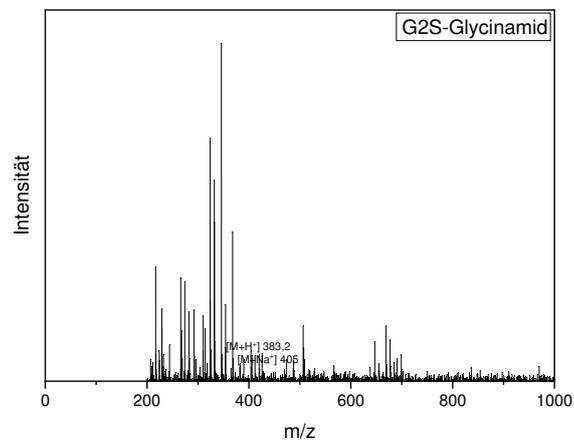


Abbildung 128 ESI-Spektrum von **G2S** in Glycinamid.

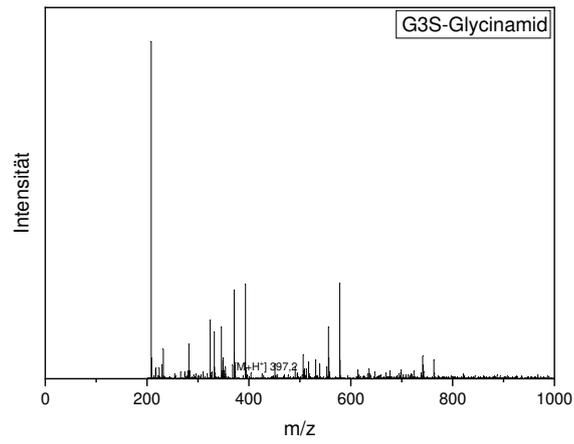


Abbildung 129 ESI-Spektren von **G3S** in Glycinamid.

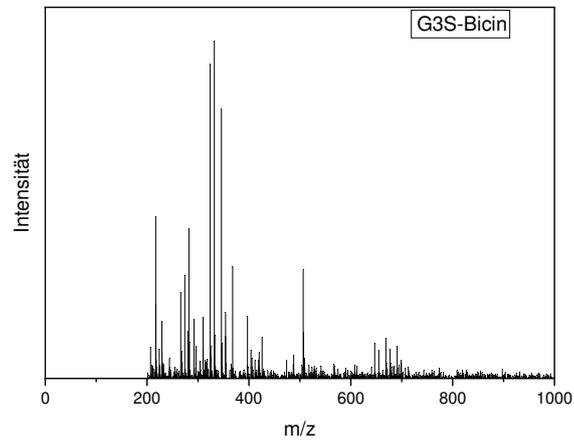


Abbildung 130 ESI-Spektren von **G3S** in Bicin.

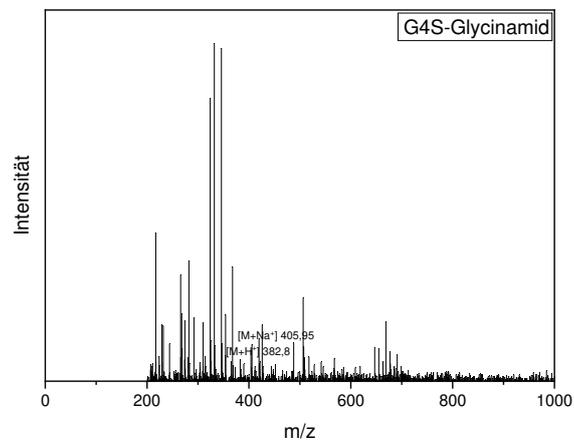


Abbildung 131 ESI-Spektrum von **G4S** in Glycinamid.

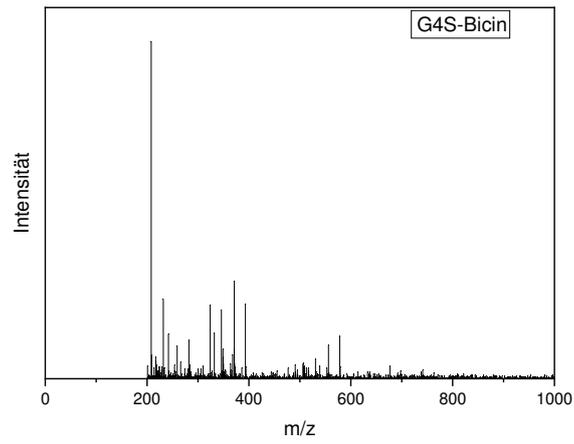


Abbildung 132 ESI-Spektrum von **G4S** in Bicin.

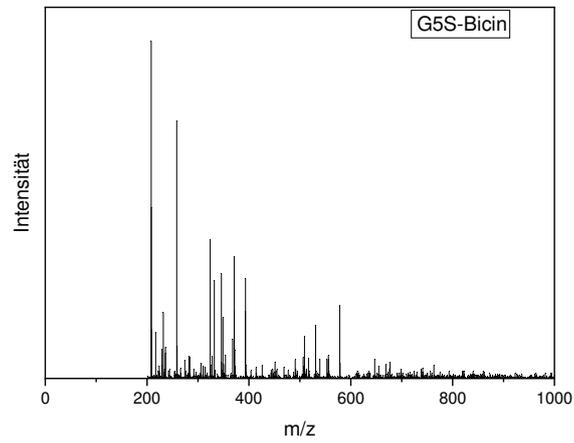


Abbildung 133 ESI-Spektrum von **G5S** in Bicin.

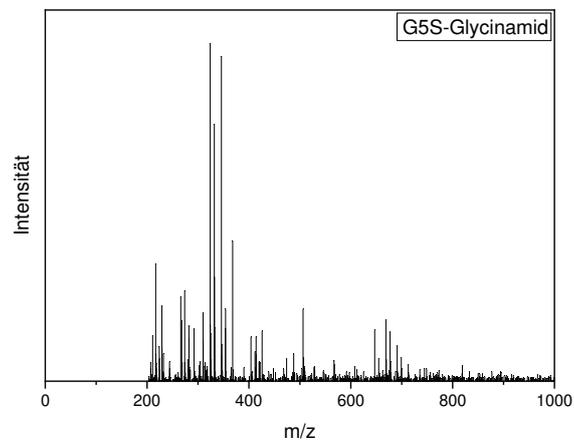


Abbildung 134 ESI-Spektrum von **G5S** in Glycinamid.

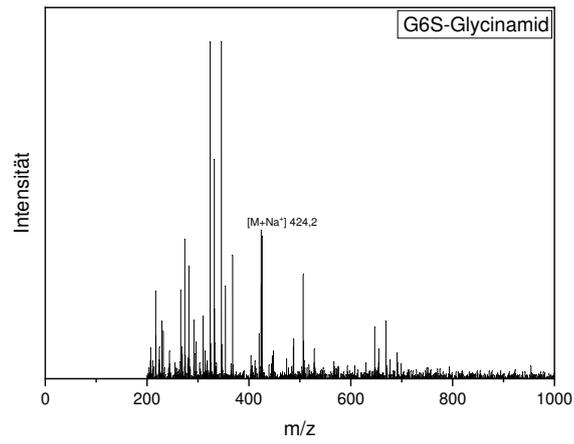


Abbildung 135 ESI-Spektrum von **G6S** in Glycinamid.

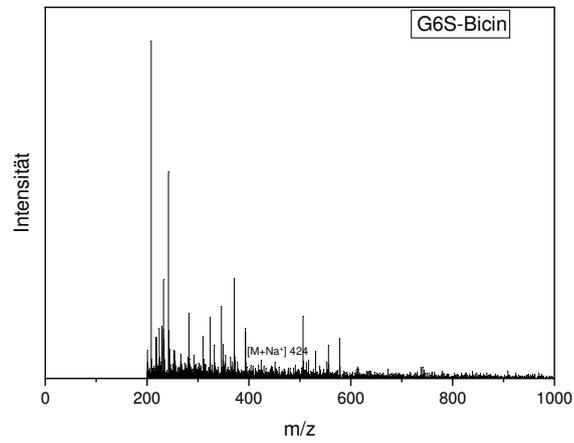


Abbildung 136 ESI-Spektrum von **G6S** in Bicin.

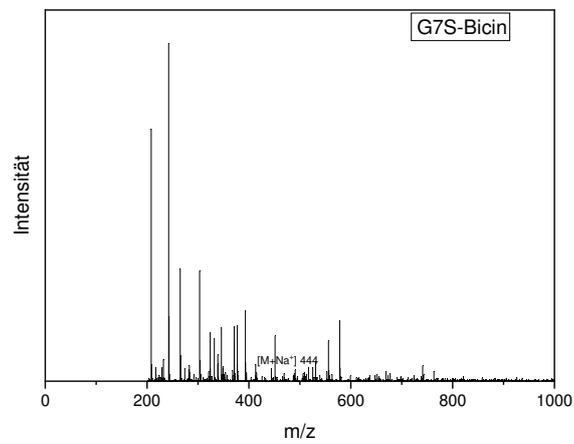


Abbildung 137 ESI-Spektrum von **G7S** in Bicin.

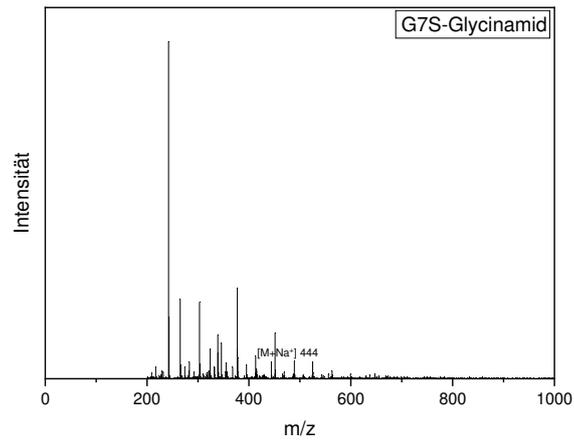


Abbildung 138 ESI-Spektrum von **G7S** in Glycinamid.

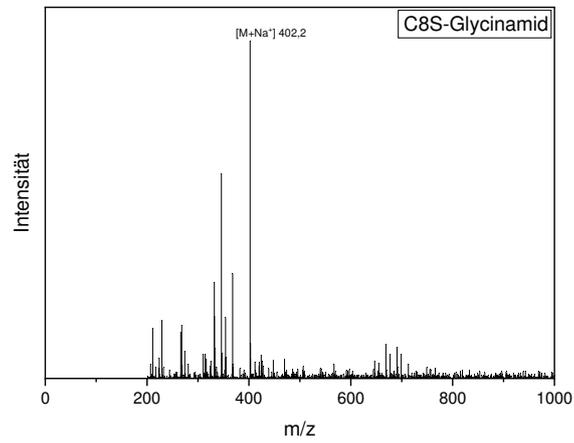


Abbildung 139 ESI-Spektrum von **G8S** in Glycinamid.

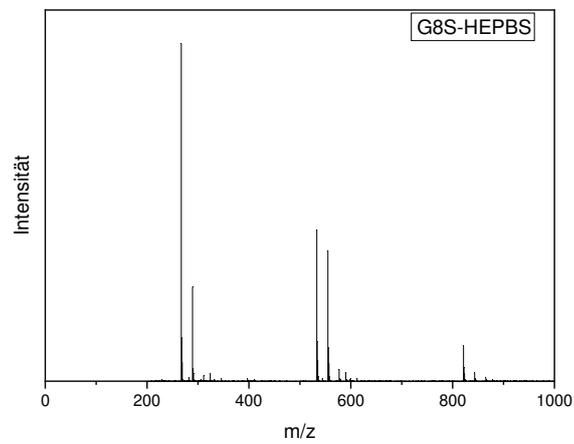


Abbildung 140 ESI-Spektrum von **G8S** in HEPBS.

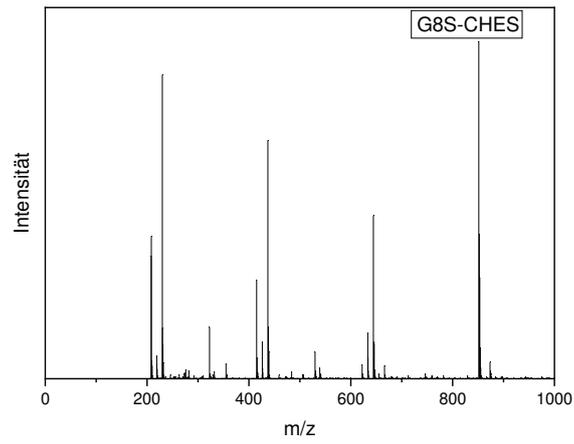


Abbildung 141 ESI-Spektrum von **G8S** in CHES.

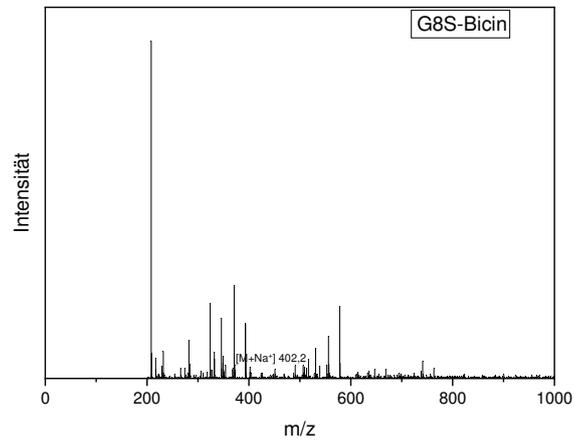


Abbildung 142 ESI-Spektrum von **G8S** in Bicin.

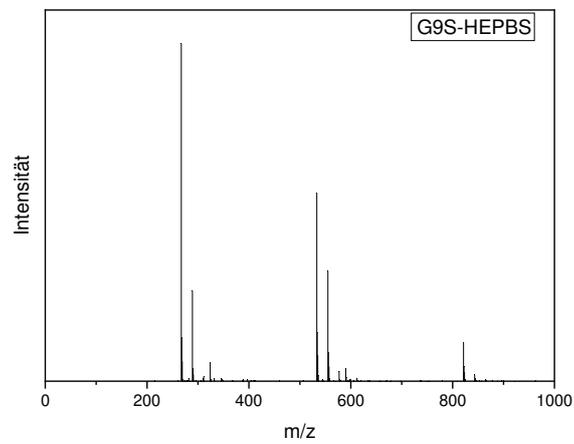


Abbildung 143 ESI-Spektrum von **G9S** in HEPBS.

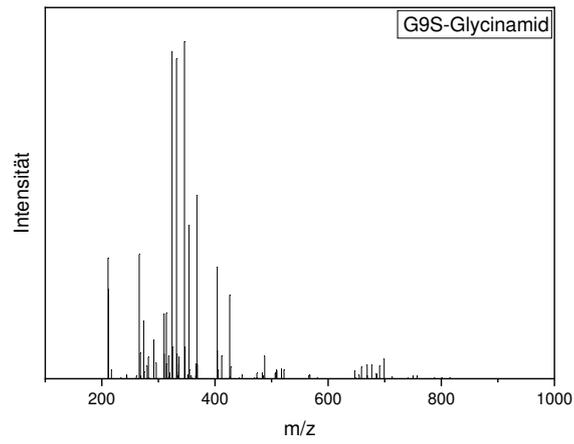


Abbildung 144 ESI-Spektrum von **G9S** in Glycinamid.

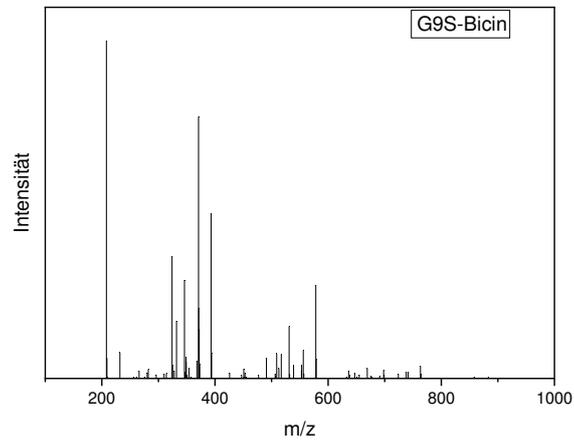


Abbildung 145 ESI-Spektrum von **G9S** in Bicin.

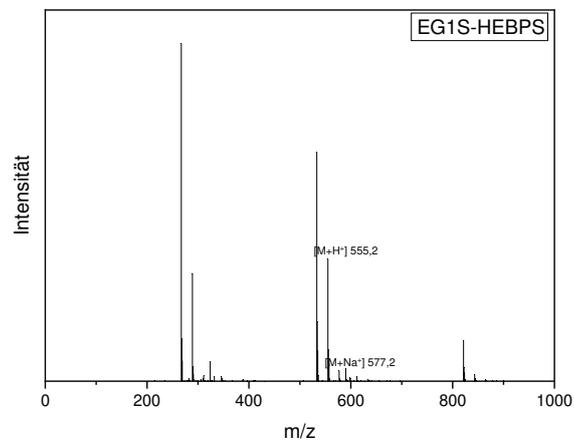


Abbildung 146 ESI- Spektrum von **EG1S** in HEPBS.

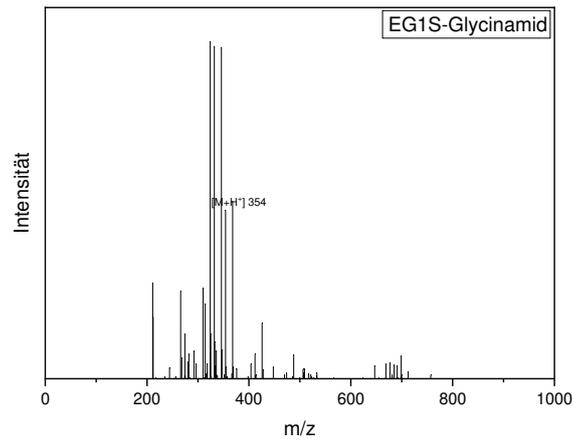


Abbildung 147 ESI-Spektrum von **EG1S** in Glycinamid.

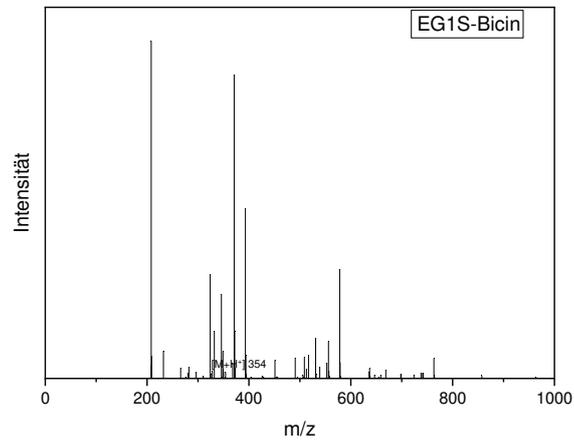


Abbildung 148 ESI-Spektrum von **EG1S** in Bicin.

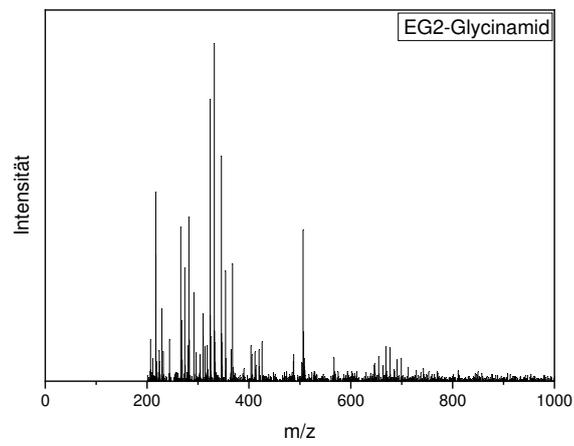


Abbildung 149 ESI-Spektrum von **ES2S** in Glycinamid.

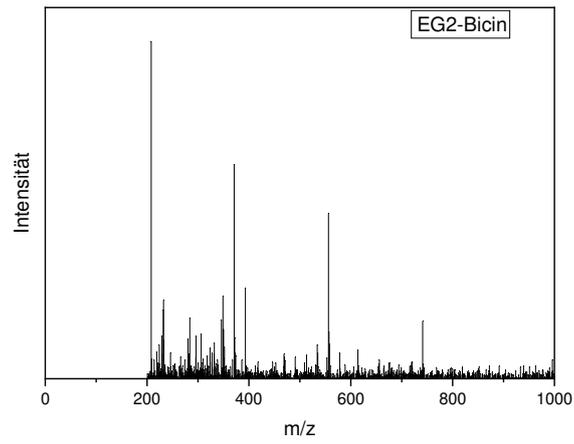


Abbildung 150 ESI-Spektrum von **ES2S** in Bicin.

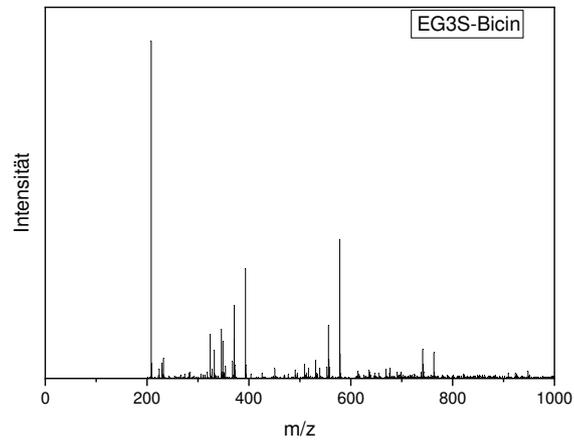


Abbildung 151 ESI-Spektrum von **EG3S** in Bicin.

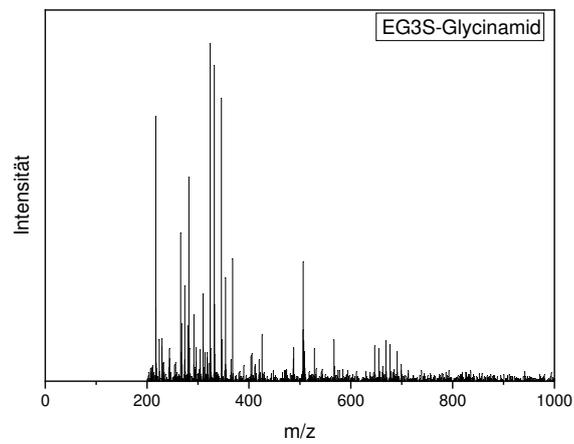


Abbildung 152 ESI-Spektrum von **EG3S** in Glycinamid.

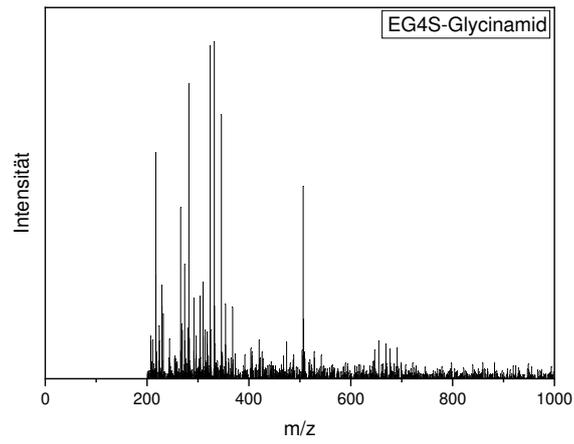


Abbildung 153 ESI-Spektrum von **EG4S** in Glycinamid.

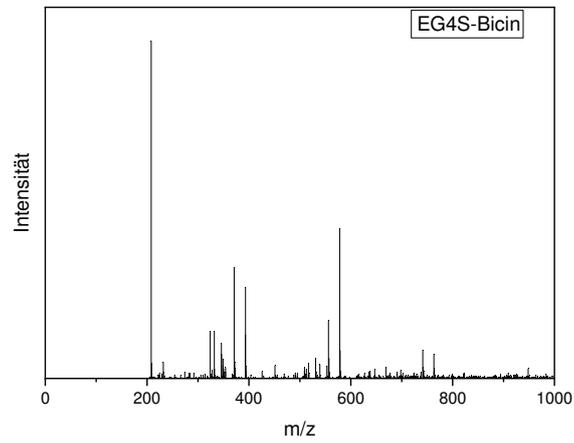


Abbildung 154 ESI-Spektrum von **EG4S** in Bicin.

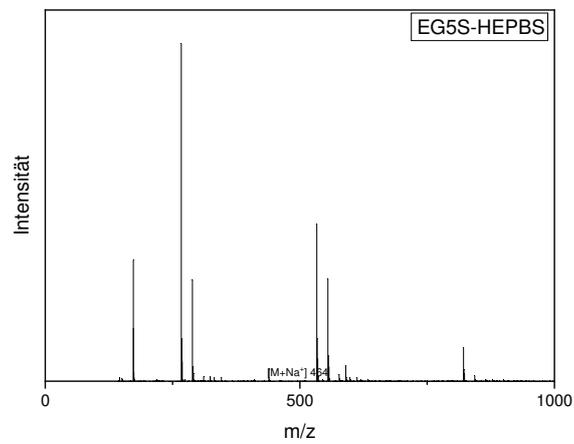


Abbildung 155 ESI-Spektrum von **EG5S** in HEPBS.

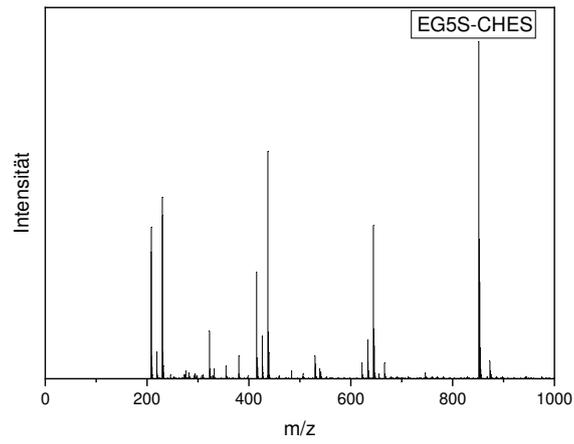


Abbildung 156 ESI-Spektrum von **EG5S** in CHES.

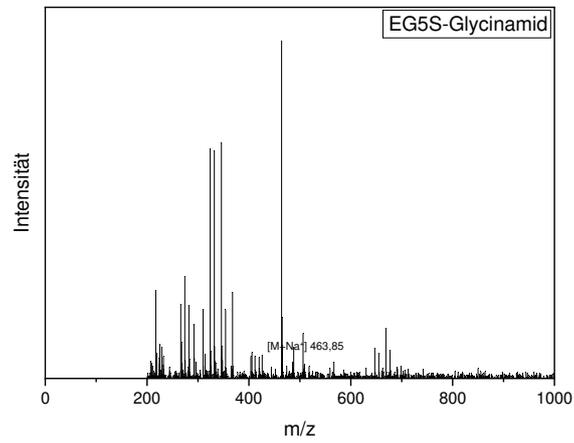


Abbildung 157 ESI-Spektrum von **EG5S** in Glycinamid.

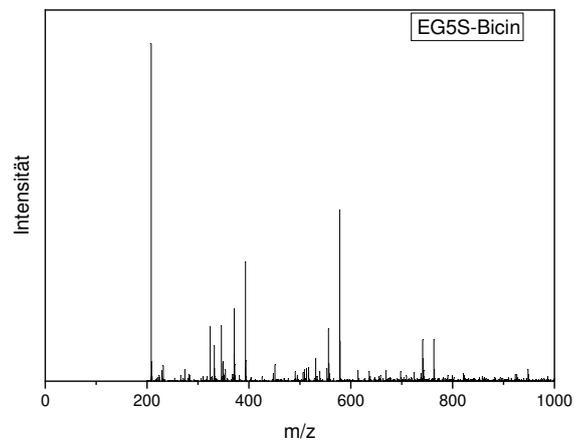


Abbildung 158 ESI-Spektrum von **EG5S** in Bicin.

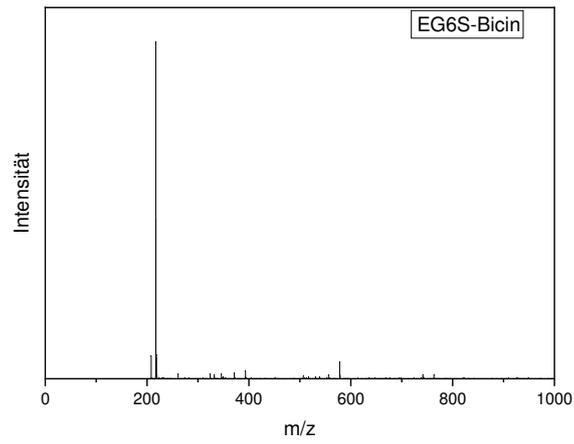


Abbildung 159 ESI-Spektrum von **EG6S** in Bicin.

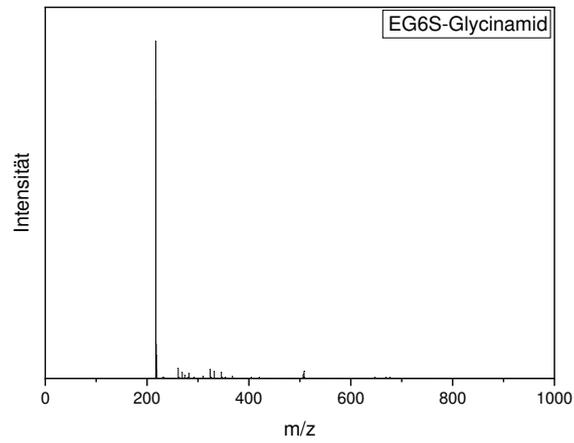


Abbildung 160 ESI-Spektrum von **EG6S** in Glycinamid.

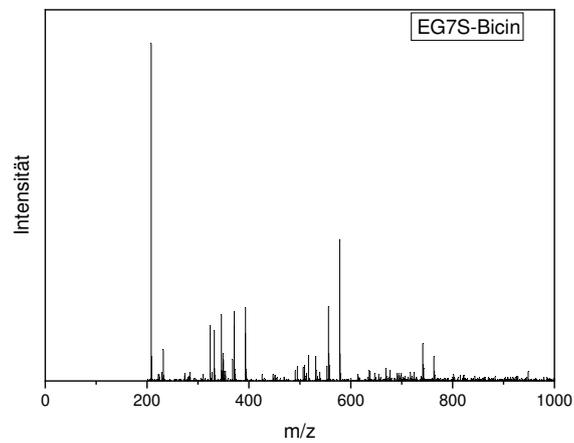


Abbildung 161 ESI-Spektrum von **EG7S** in Bicin.

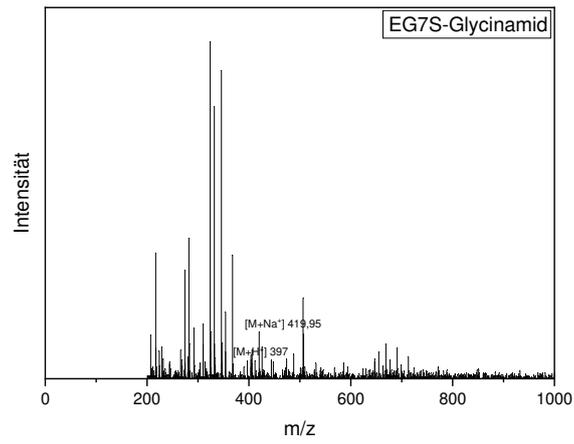


Abbildung 162 ESI-Spektrum von **EG7S** in Glycinamid.

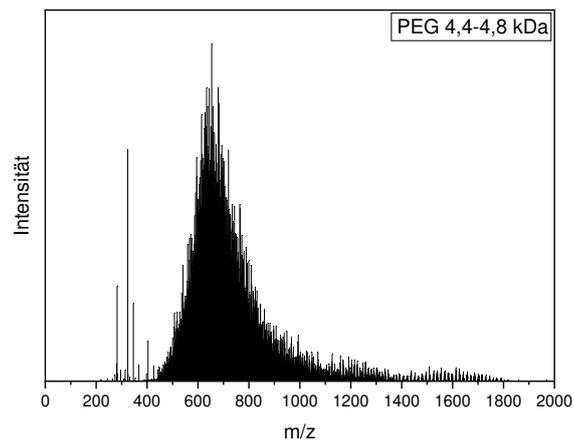


Abbildung 163 ESI-Spektrum von **PEG 4,4-4,8 kDa**.

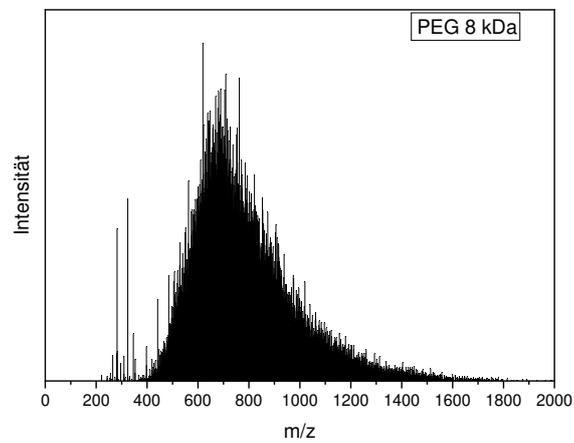


Abbildung 164 ESI-Spektrum von **PEG 8 kDa**.

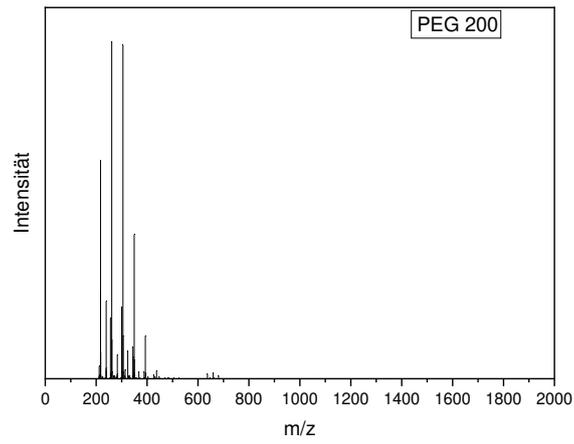


Abbildung 165 ESI-Spektrum von **PEG 200**.

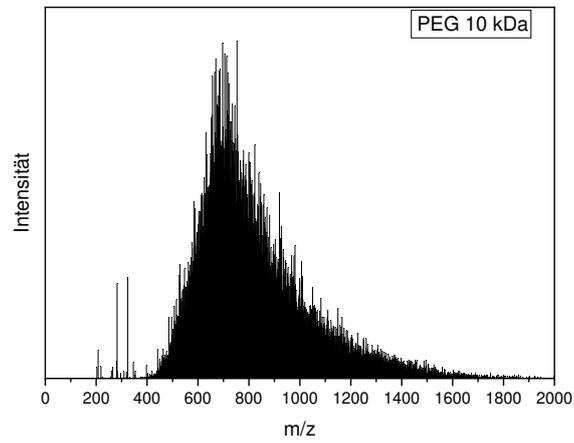


Abbildung 166 ESI-Spektrum von **PEG 10 kDa**.

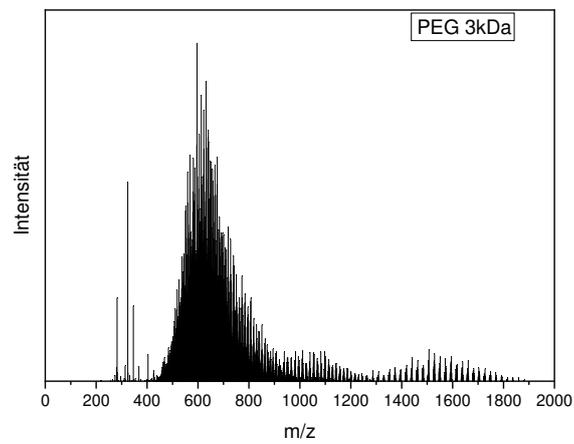


Abbildung 167 ESI-Spektrum von **PEG 3 kDa**.

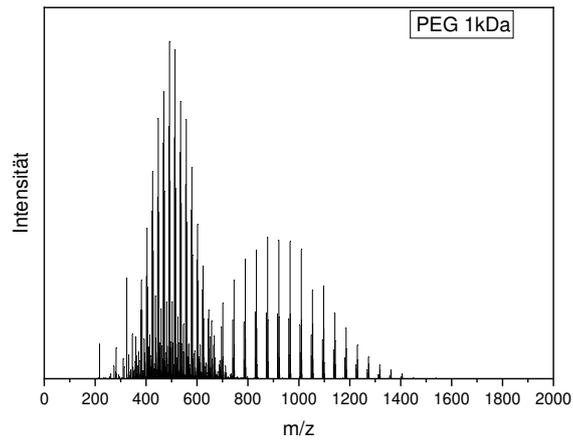


Abbildung 168 ESI-Spektrum von **PEG 1 kDa**.

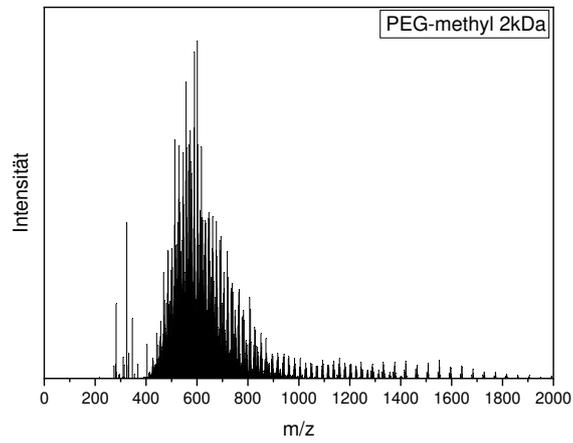


Abbildung 169 ESI-Spektrum von **PEG-Methyl 2 kDa**.

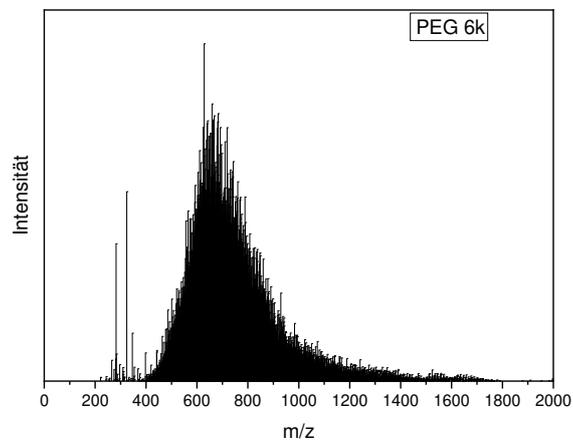


Abbildung 170 ESI-Spektrum von **PEG 6k**.

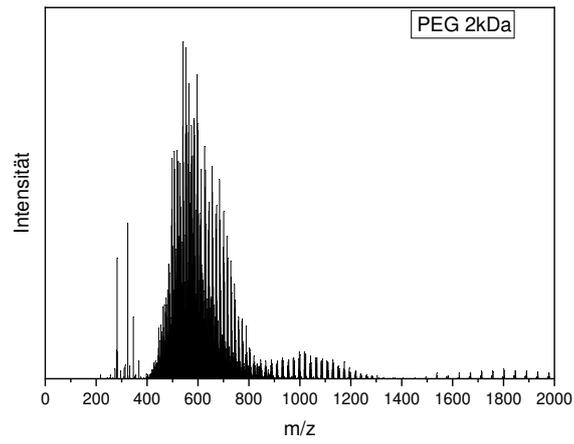


Abbildung 171 ESI-Spektrum von **PEG 2kDa**.

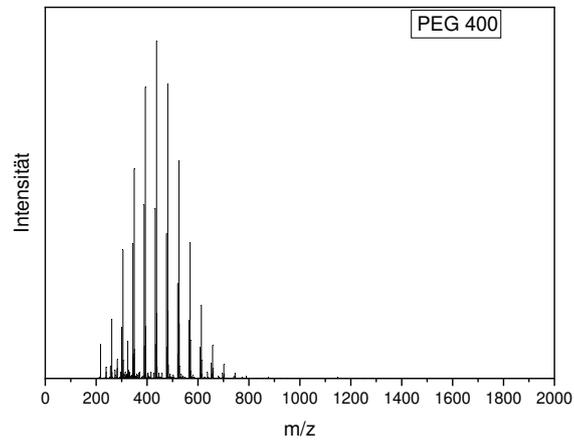


Abbildung 172 ESI-Spektrum von **PEG 400**.

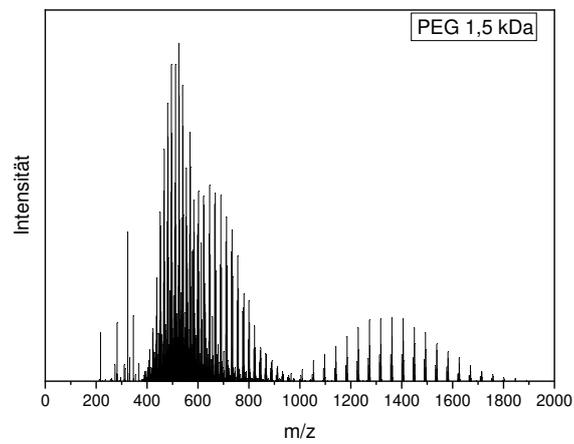


Abbildung 173 ESI-Spektrum von **PEG 1,5 kDa**.

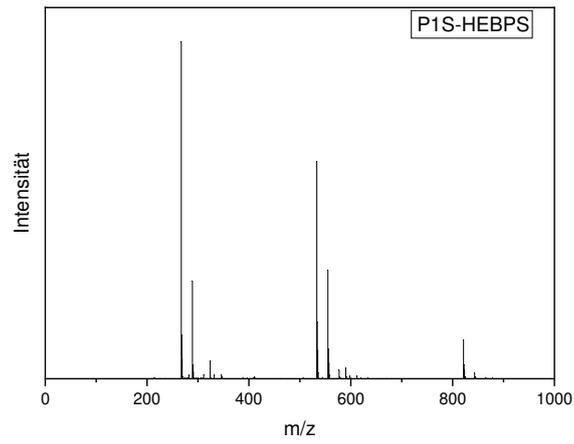


Abbildung 174 ESI-Spektrum von **P1S** in HEPBS.

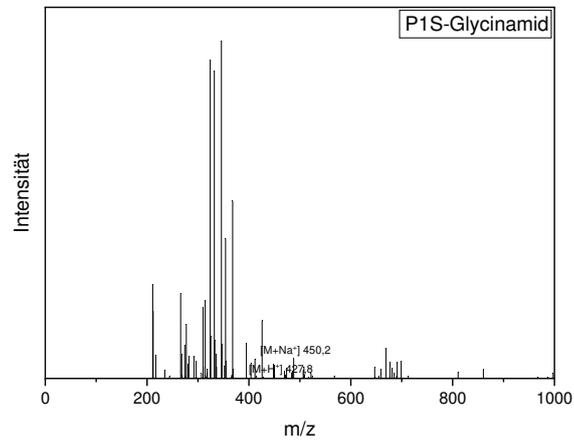


Abbildung 175 ESI-Spektrum von **P1S** in Glycinamid.

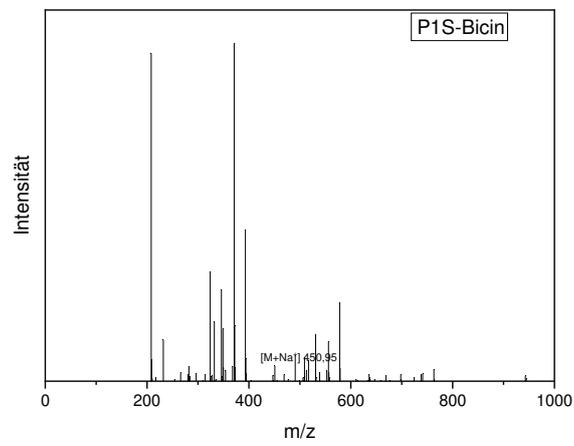


Abbildung 176 ESI-Spektrum von **P1S** in Bicin.

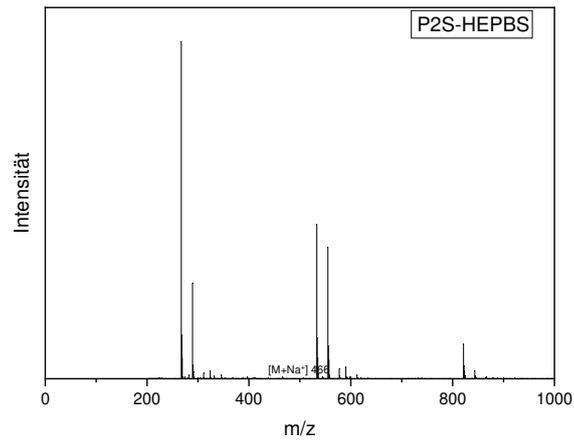


Abbildung 177 ESI-Spektrum von **P2S** in HEPBS.

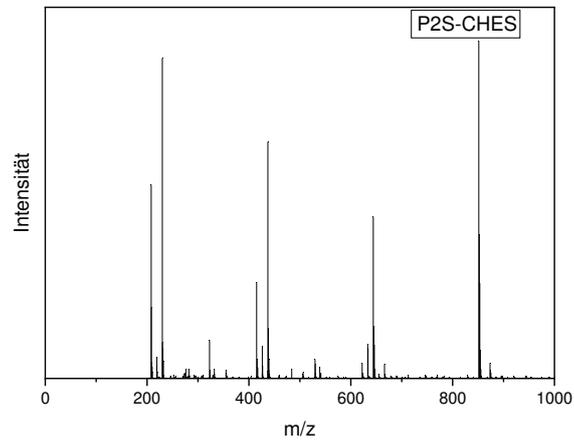


Abbildung 178 ESI-Spektrum von **P2S** in CHES.

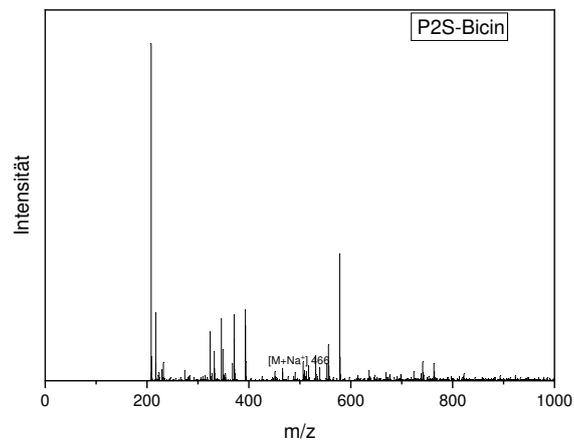


Abbildung 179 ESI-Spektrum von **P2S** in Bicin.

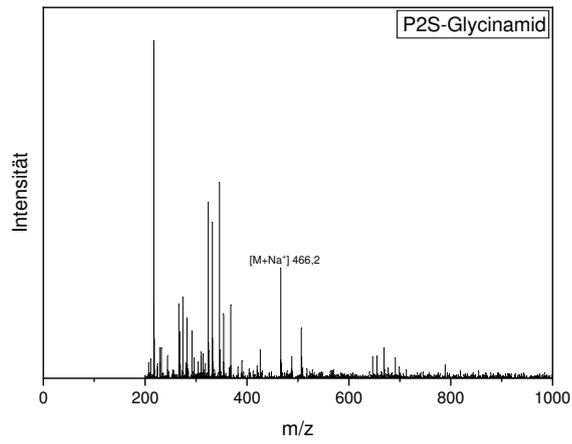


Abbildung 180 ESI-Spektrum von **P2S** in Glycinamid.

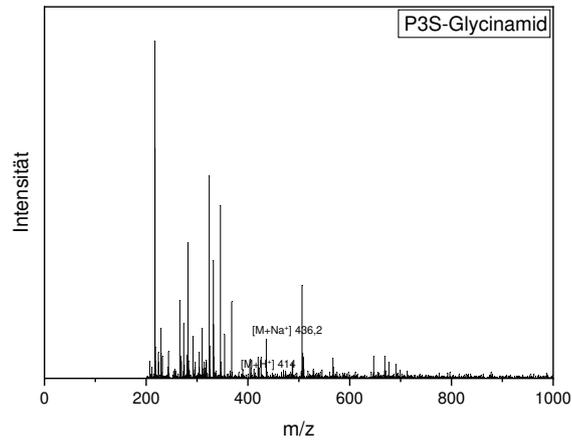


Abbildung 181 ESI-Spektrum von **P3S** in Glycinamid.

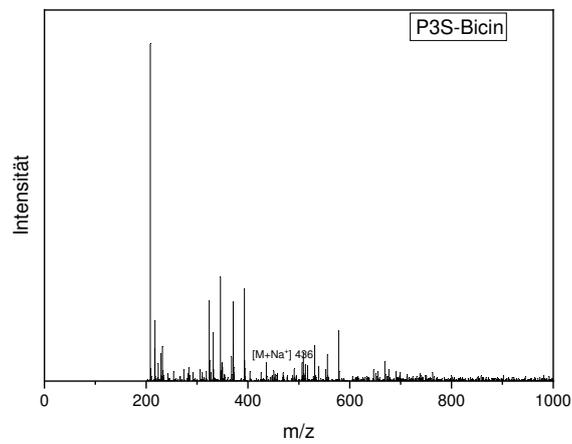


Abbildung 182 ESI-Spektrum von **P3S** in Bicin.

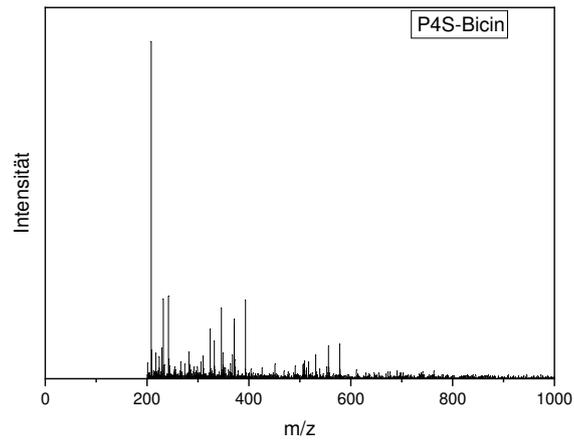


Abbildung 183 ESI-Spektrum von **P4S** in Bicin.

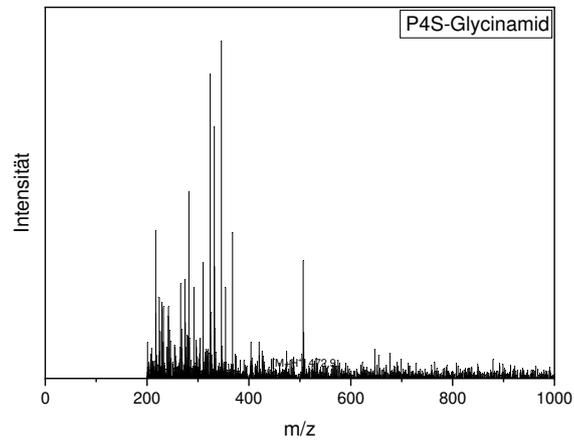


Abbildung 184 ESI-Spektrum von **P4S** in Glycinamid.

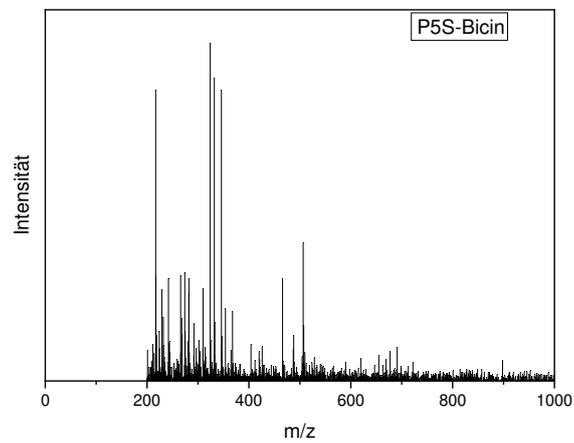


Abbildung 185 ESI-Spektrum von **P5S** in Bicin.

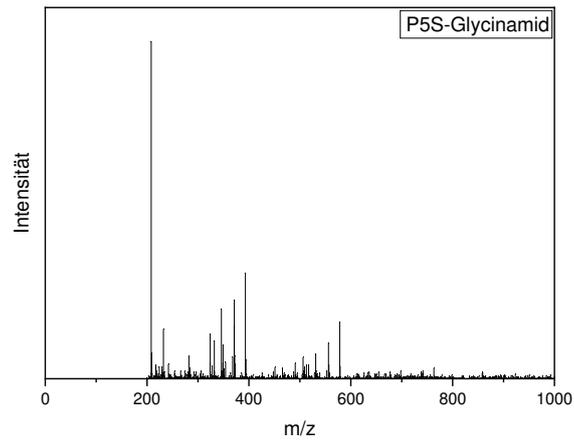


Abbildung 186 ESI-Spektrum von **P5S** in Glycinamid.

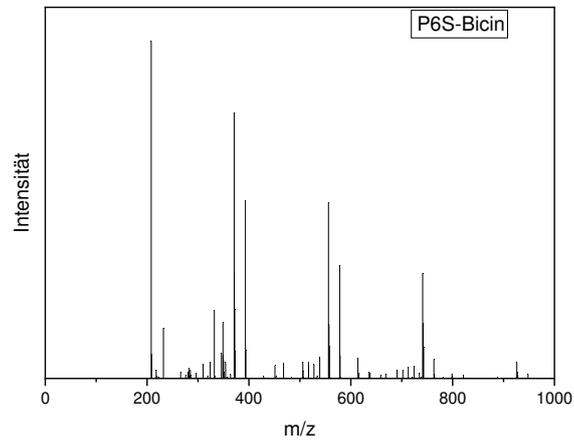


Abbildung 187 ESI-Spektrum von **P6S** in Bicin.

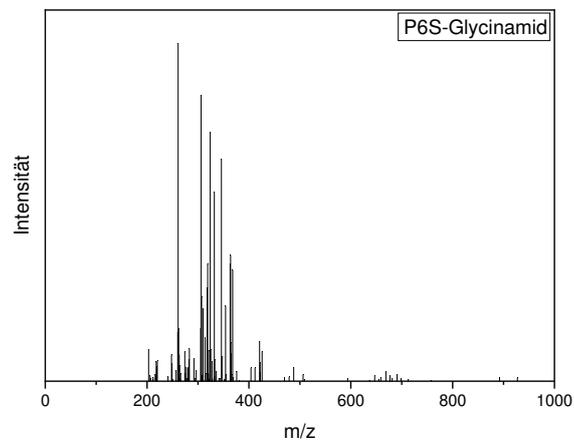


Abbildung 188 ESI-Spektrum von **P6S** in Glycinamid.

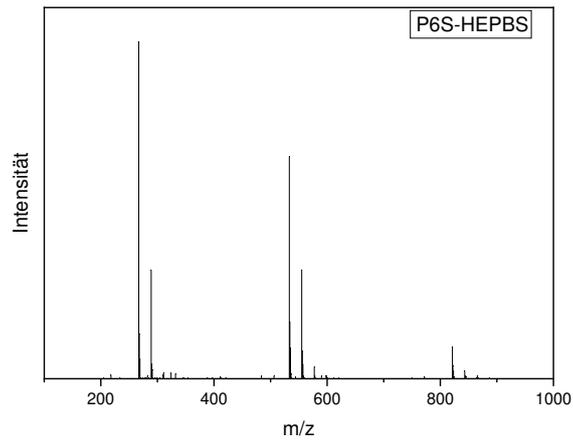


Abbildung 189 ESI-Spektrum von **P6S** in HEPBS.

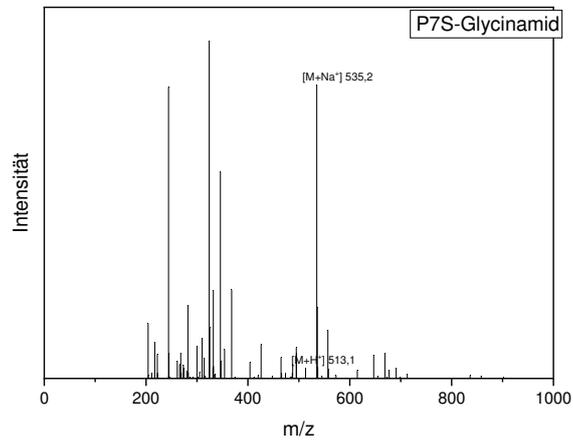


Abbildung 190 ESI-Spektrum von **P7S** in Glycinamid.

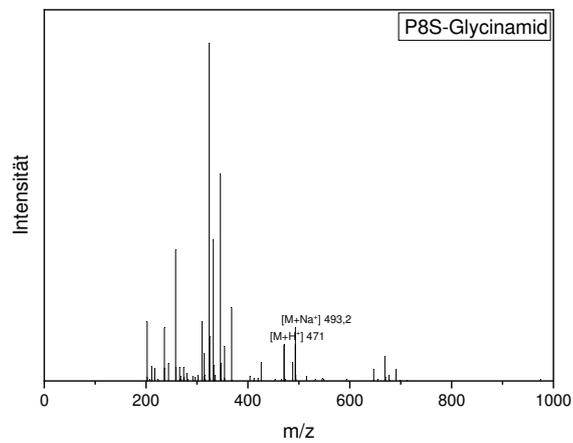


Abbildung 191 ESI-Spektrum von **P8S** in Glycinamid.

Spektren Permethylierung

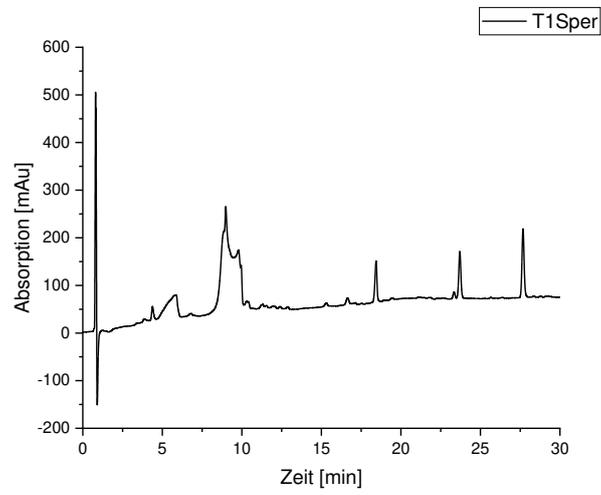


Abbildung 192 RP-HPLC-Spektrum von **T1S_{PER}** (linearer Gradient von 5-95 % Acetonitril in H₂O (0,1 % Ameisensäure) in 30 min)

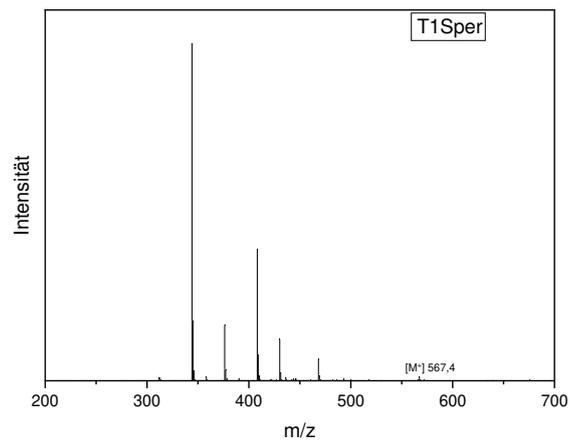


Abbildung 193 ESI-Spektrum von **T1S_{PER}**.

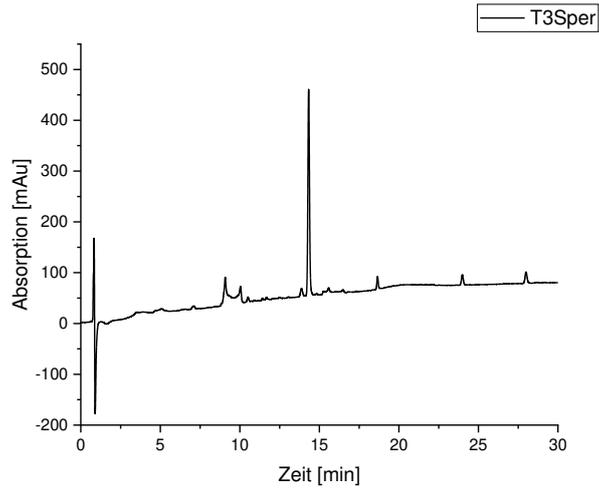


Abbildung 194 RP-HPLC-Spektrum von **T3SPER** (linearer Gradient von 5-95 % Acetonitril in H₂O (0,1 % Ameisensäure) in 30 min).

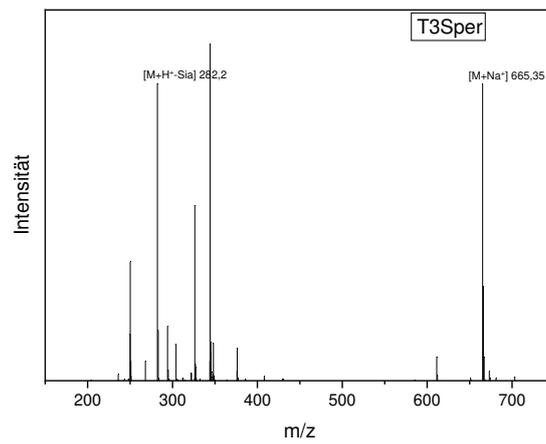


Abbildung 195 ESI-Spektrum von **T3SPER**.

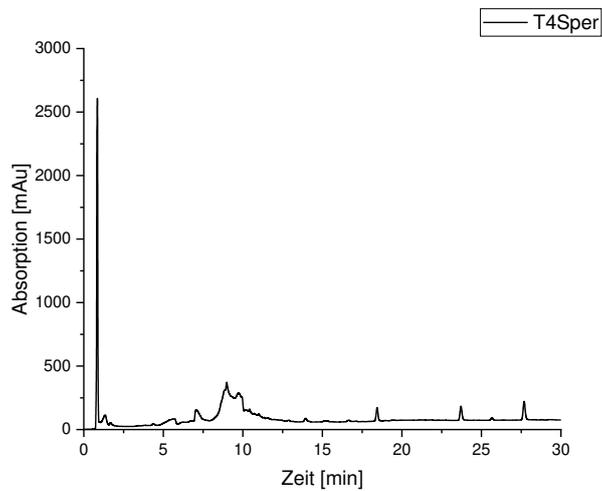


Abbildung 196 RP-HPLC-Spektrum von **T4SPER** (linearer Gradient von 5-95 % Acetonitril in H₂O (0,1 % Ameisensäure) in 30 min).

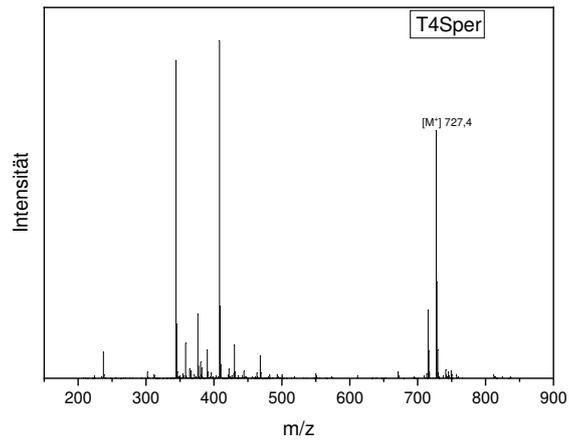


Abbildung 197 ESI-Spektrum von **T4S_{PER}**.

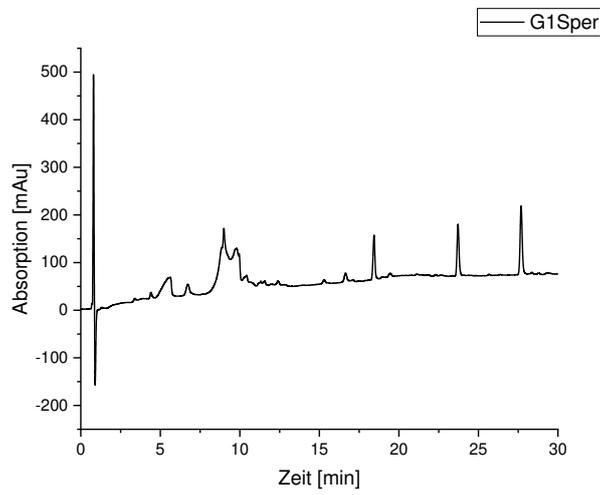


Abbildung 198 RP-HPLC-Spektrum von **G1S_{PER}** (linearer Gradient von 5-95 % Acetonitril in H₂O (0,1 % Ameisensäure) in 30 min).

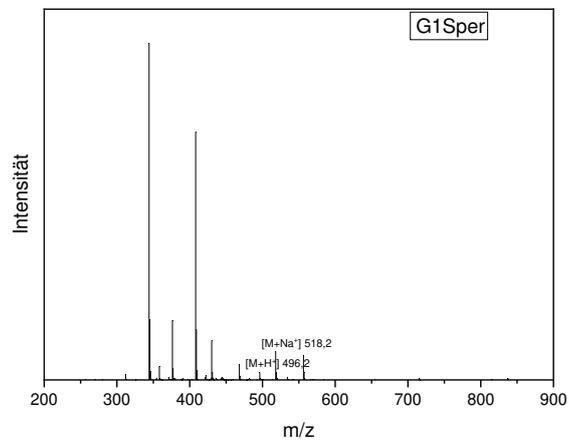


Abbildung 199 ESI-Spektrum von **G1S_{PER}**.

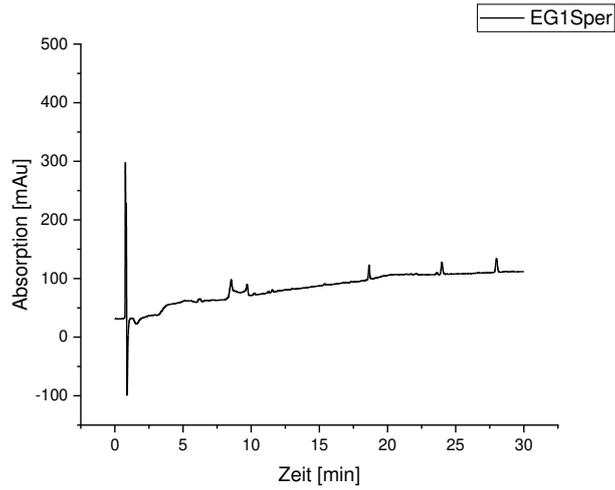


Abbildung 200 RP-HPLC-Spektrum von **EG1SPER** (linearer Gradient von 5-95 % Acetonitril in H₂O (0,1 % Ameisensäure) in 30 min).

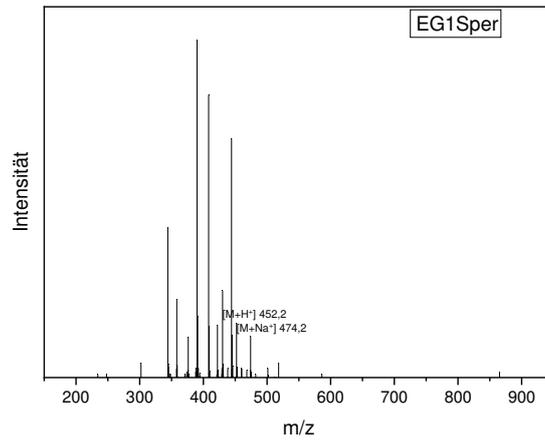


Abbildung 201 ESI-Spektrum von **EG1SPER**.

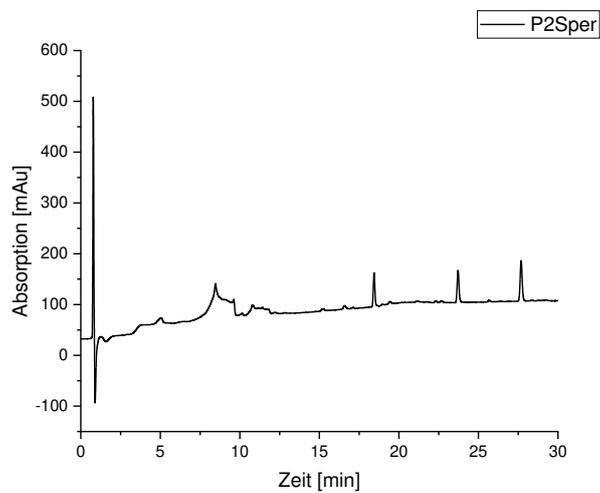


Abbildung 202 RP-HPLC-Spektrum von **P2SPER** (linearer Gradient von 5-95 % Acetonitril in H₂O (0,1 % Ameisensäure) in 30 min).

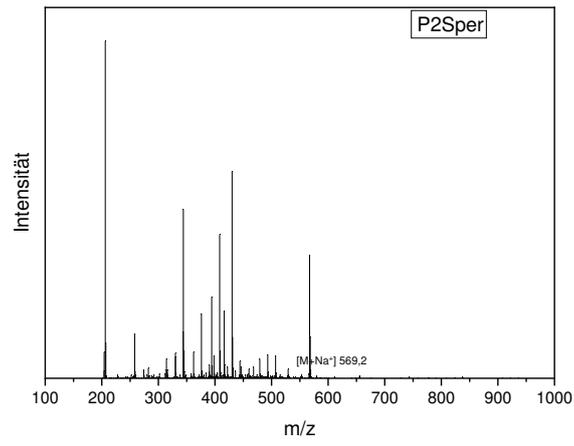


Abbildung 203 ESI-Spektrum von $P2S_{PER}$.

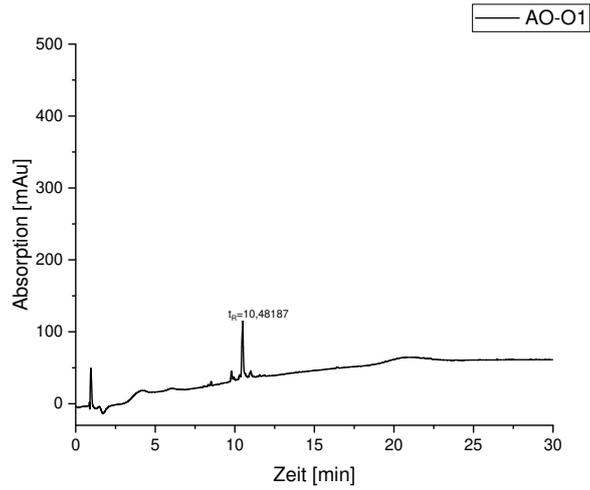


Abbildung 204 HPLC-Spektrum von **AO-O1** bei 15°C (linearer Gradient von 5-95 % Acetonitril in H₂O (0,1 % Ameisensäure) in 30 min).

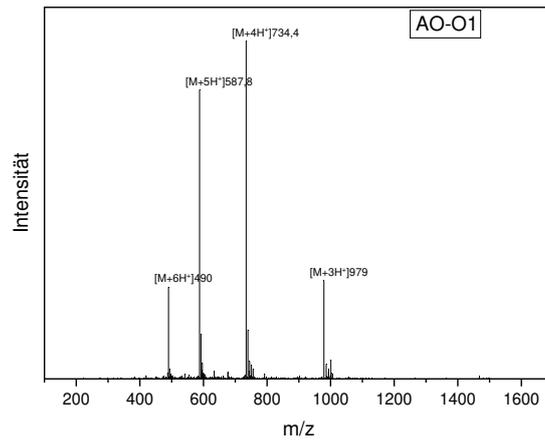


Abbildung 205 ESI-Spektrum von **AO-O1**.

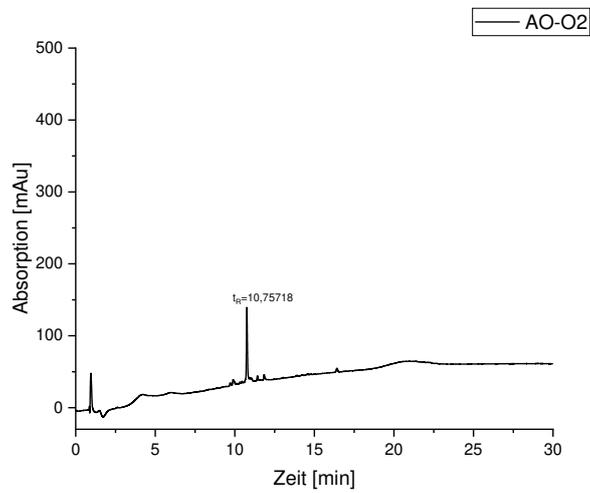


Abbildung 206 HPLC-Spektrum von **AO-O2** bei 15°C (linearer Gradient von 5-95 % Acetonitril in H₂O (0,1 % Ameisensäure) in 30 min).

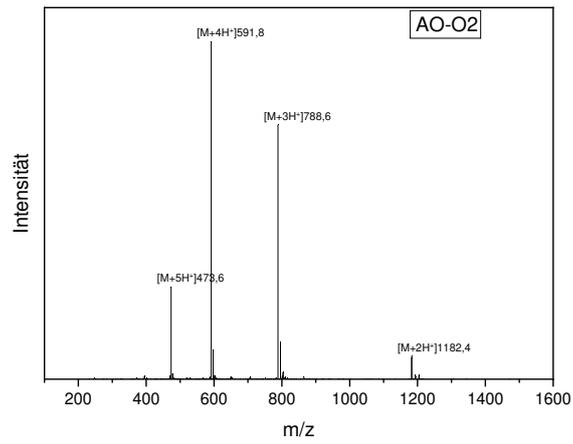


Abbildung 207 ESI-Spektrum von **AO-O2**.

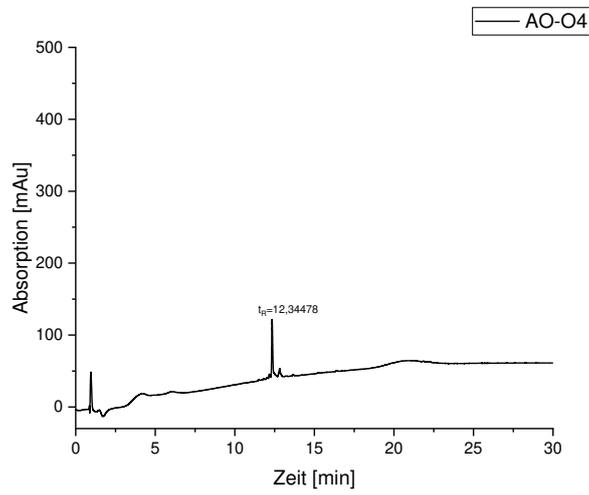


Abbildung 208 HPLC-Spektrum von **AO-O4** bei 15°C (linearer Gradient von 5-95 % Acetonitril in H₂O (0,1 % Ameisensäure) in 30 min).

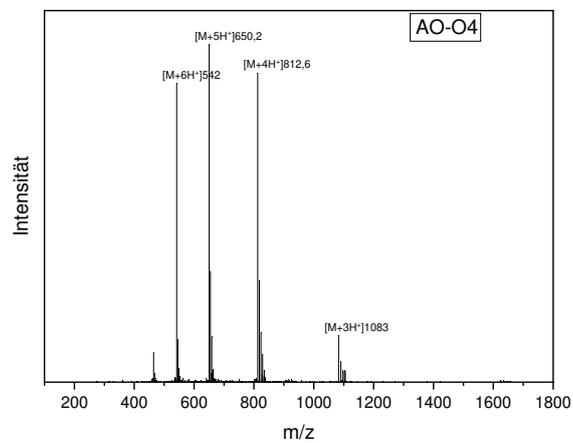


Abbildung 209 ESI-Spektrum von **AO-O4**.

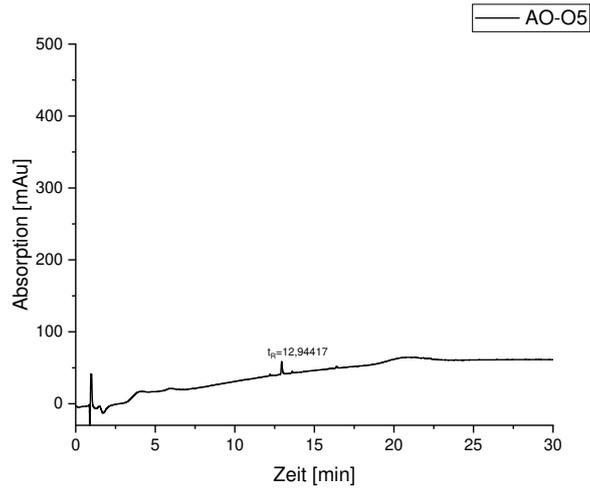


Abbildung 210 HPLC-Spektrum von **AO-O5** bei 15°C (linearer Gradient von 5-95 % Acetonitril in H₂O (0,1 % Ameisensäure) in 30 min).

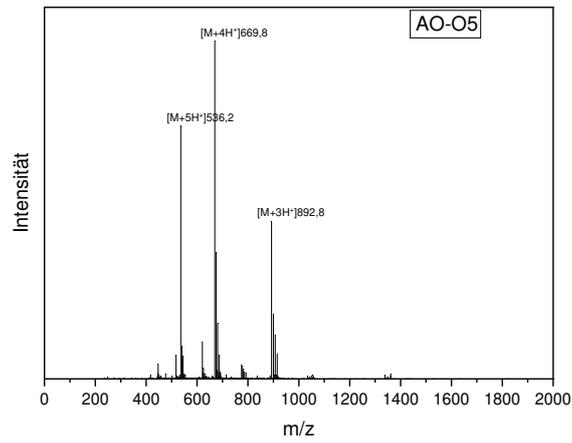


Abbildung 211 ESI-Spektrum von **AO-O5**.

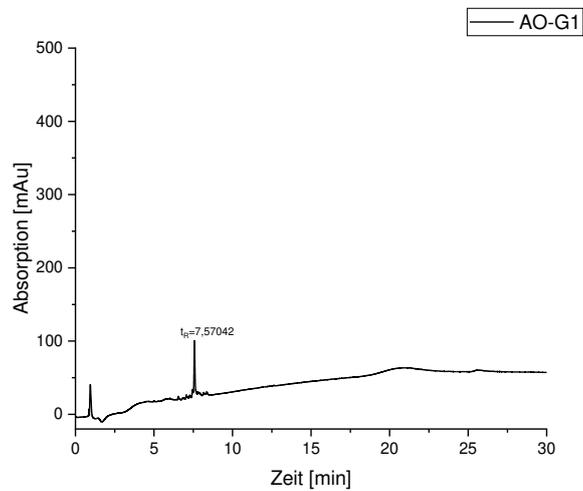


Abbildung 212 HPLC-Spektrum von **AO-G1** bei 15°C (linearer Gradient von 5-95 % Acetonitril in H₂O (0,1 % Ameisensäure) in 30 min).

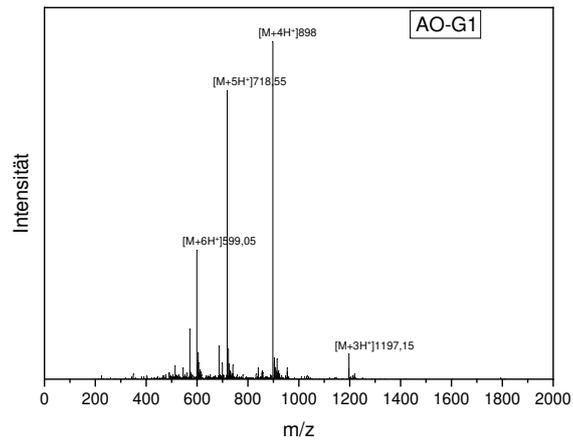


Abbildung 213 ESI-Spektrum von **AO-G1**.

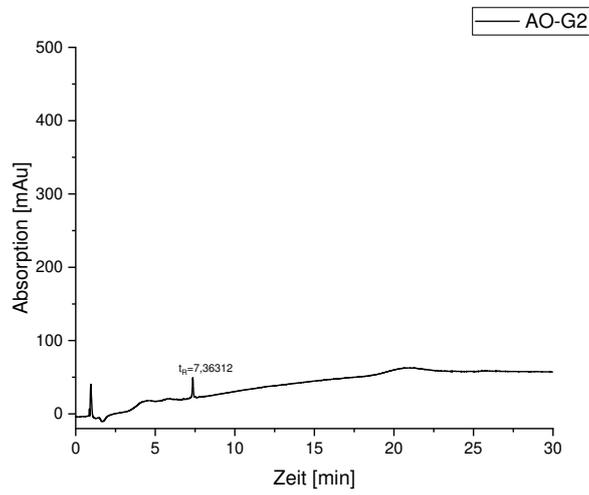


Abbildung 214 HPLC-Spektrum von **AO-G2** bei 15°C (linearer Gradient von 5-95 % Acetonitril in H₂O (0,1 % Ameisensäure) in 30 min).

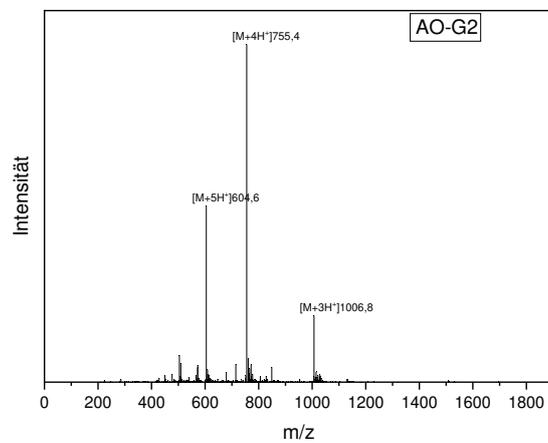


Abbildung 215 ESI-Spektrum von **AO-G2**.

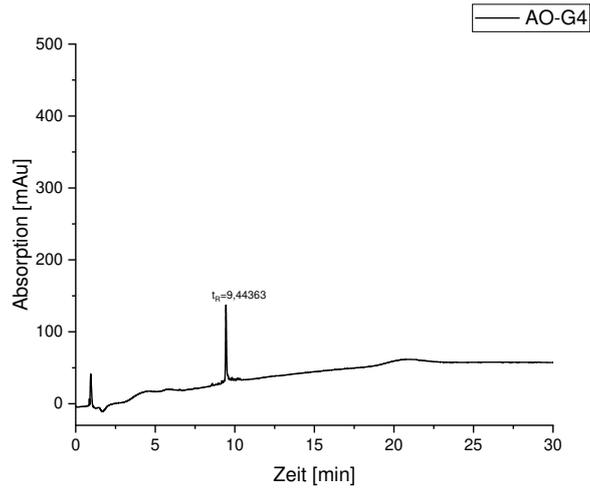


Abbildung 216 HPLC-Spektrum von **AO-G4** bei 15°C (linearer Gradient von 5-95 % Acetonitril in H₂O (0,1 % Ameisensäure) in 30 min).

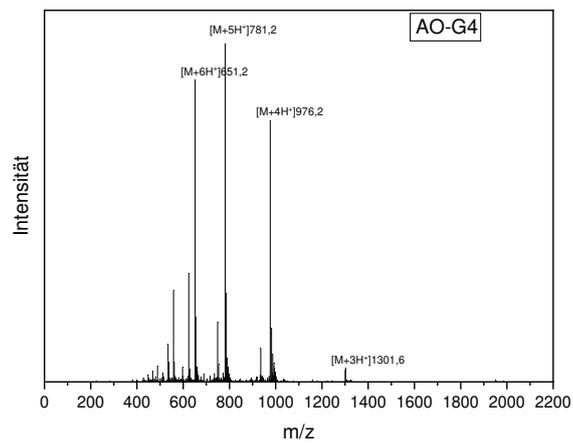


Abbildung 217 ESI-Spektrum von **AO-G4**.

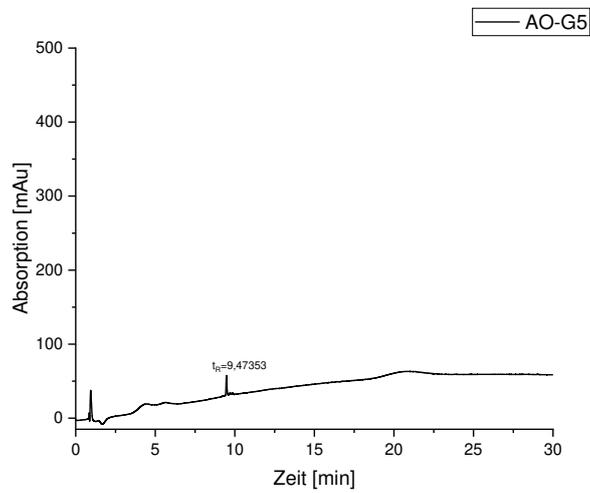


Abbildung 218 HPLC-Spektrum von **AO-G5** bei 15°C (linearer Gradient von 5-95 % Acetonitril in H₂O (0,1 % Ameisensäure) in 30 min).

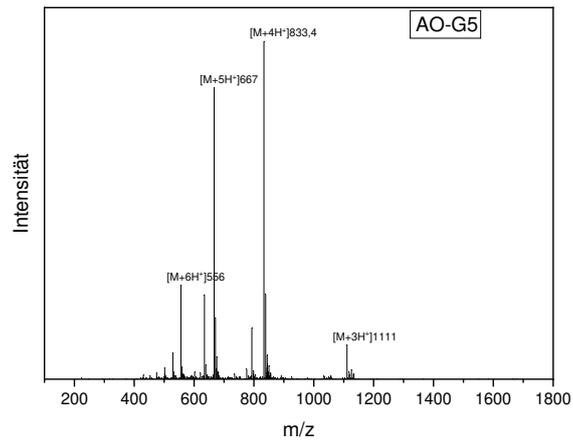


Abbildung 219 ESI-Spektrum von **AO-G5**

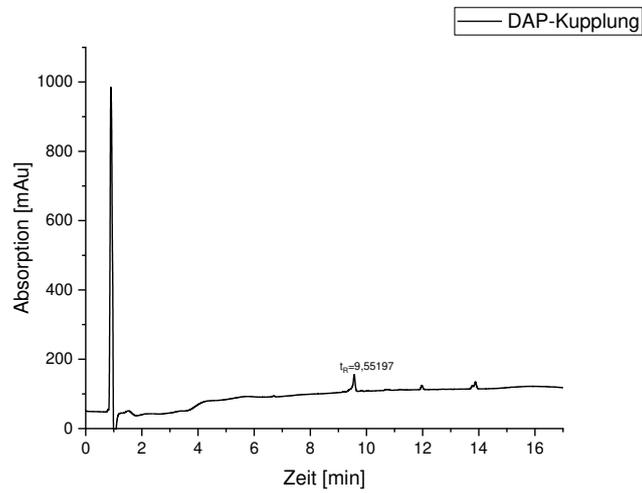


Abbildung 220 HPLC-Spektrum von **DAP-Kupplung** (linearer Gradient von 5-95 % Acetonitril in H₂O (0,1 % Ameisensäure) in 15 min).

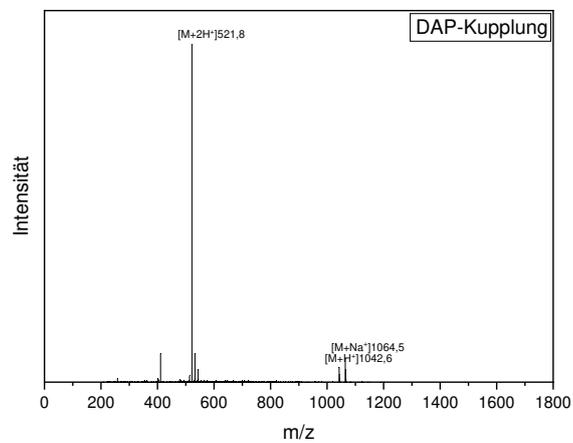


Abbildung 221 ESI-Spektrum von **DAP-Kupplung**.

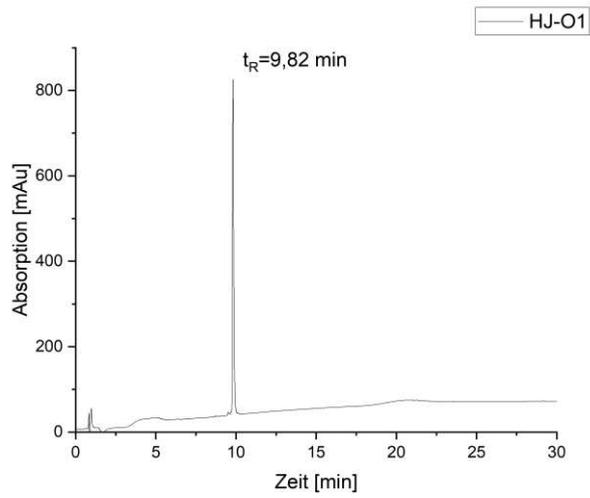


Abbildung 222 HPLC-Spektrum von **HJ-O1** (linearer Gradient von 5-95 % Acetonitril in H₂O (0,1 % Ameisensäure) in 30 min).

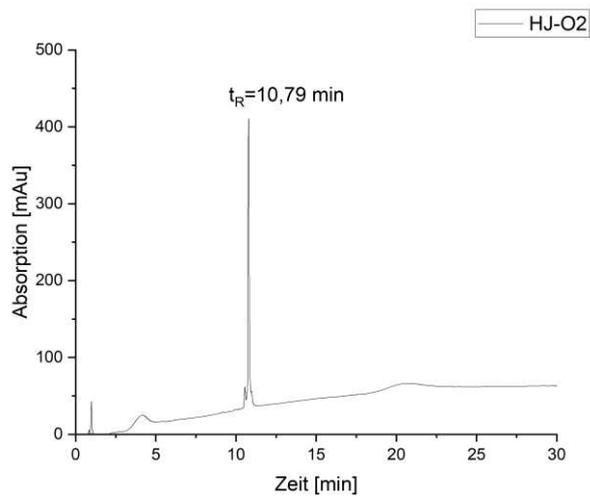


Abbildung 223 HPLC-Spektrum von **HJ-O2** (linearer Gradient von 5-95 % Acetonitril in H₂O (0,1 % Ameisensäure) in 30 min).

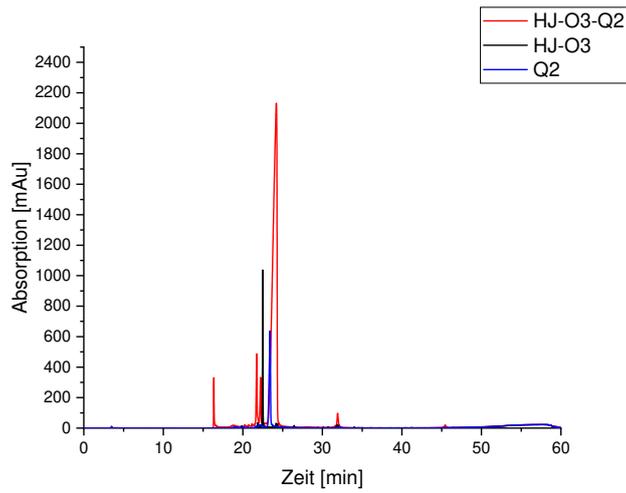


Abbildung 224 Gestapelte HPLC-Spektrum von **HJ-O3**, **HJ-O3-Q2** und **Q2**.

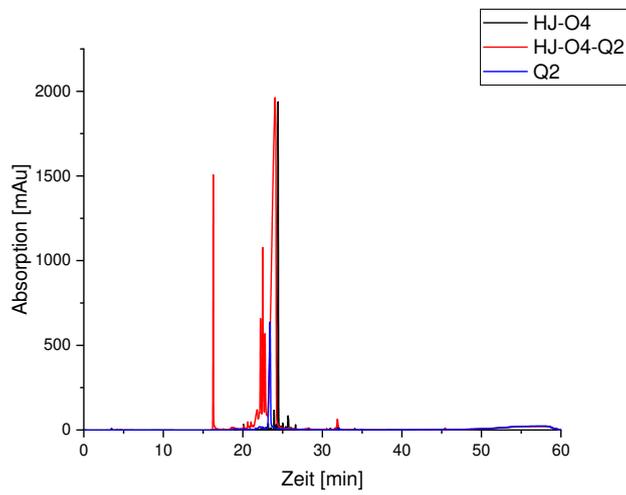


Abbildung 225 Gestapelte HPLC-Spektrum von **HJ-O4**, **HJ-O4-Q2** und **Q2**.

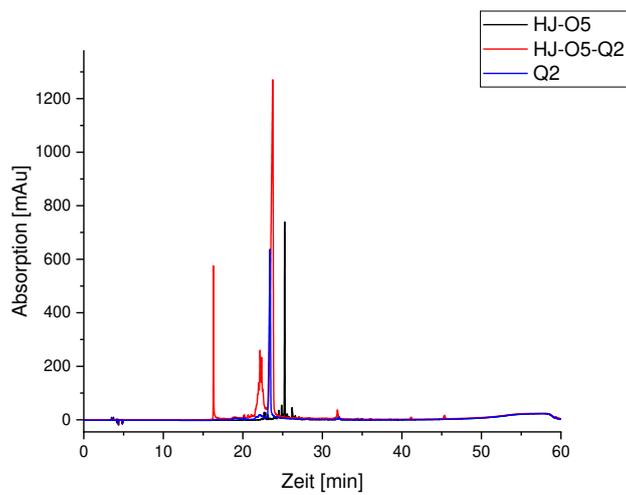


Abbildung 226 Gestapelte HPLC-Spektrum von **HJ-O5**, **HJ-O5-Q2** und **Q2**.

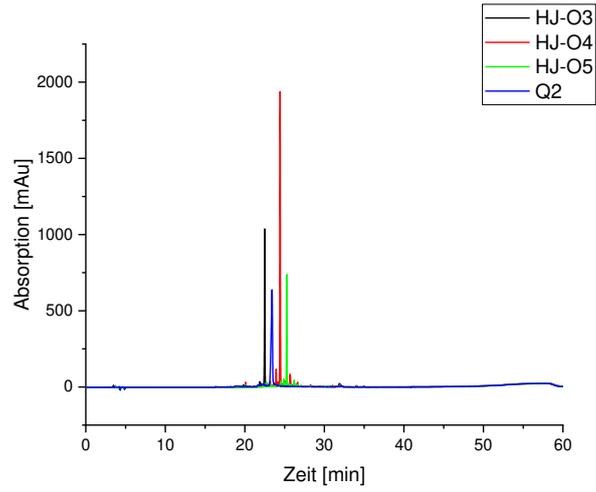


Abbildung 227 Gestapelte HPLC-Spektrum von HJ-O3, HJ-O4, HJ-O5 und Q2.

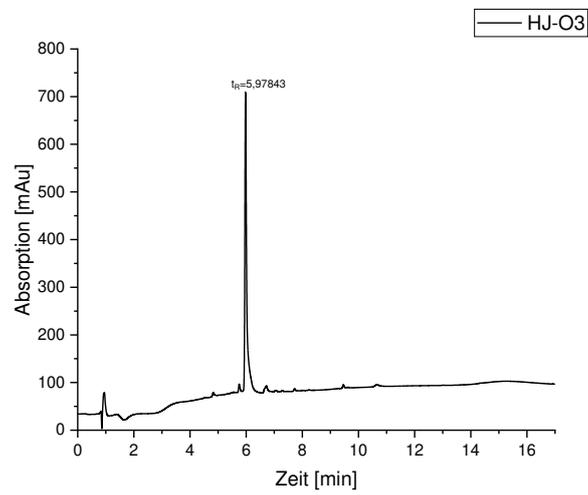


Abbildung 228 HPLC-Spektrum von HJ-O3 (linearer Gradient von 5-95 % Acetonitril in H₂O (0,1 % Ameisensäure) in 15 min).

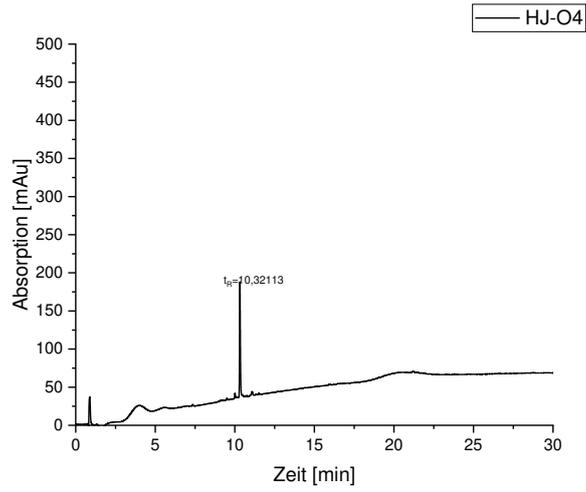


Abbildung 229 HPLC-Spektrum von **HJ-O4** (linearer Gradient von 5-95 % Acetonitril in H₂O (0,1 % Ameisensäure) in 30 min).

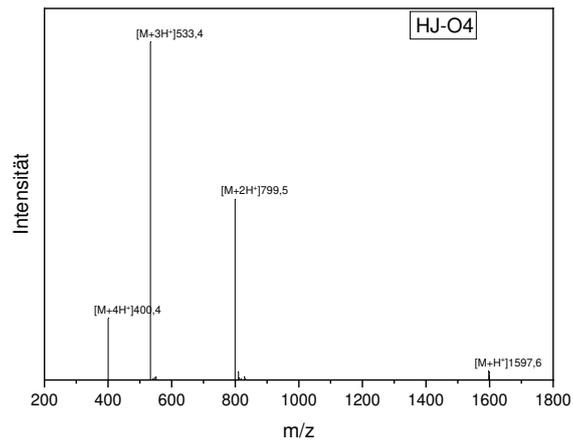


Abbildung 230 ESI-Spektrum von **HJ-O4**.

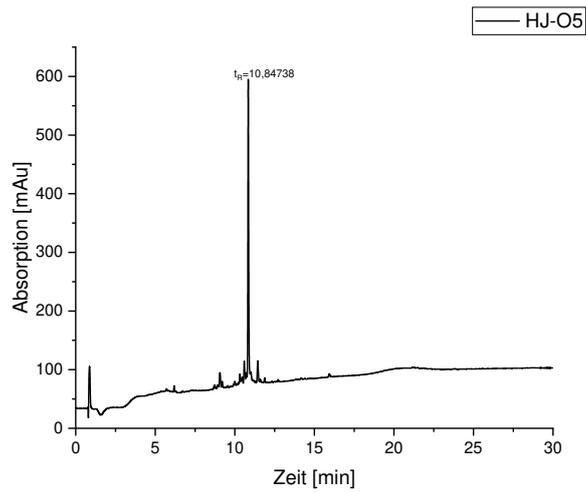


Abbildung 231 HPLC-Spektrum von **HJ-O5** (linearer Gradient von 5-95 % Acetonitril in H₂O (0,1 % Ameisensäure) in 30 min).

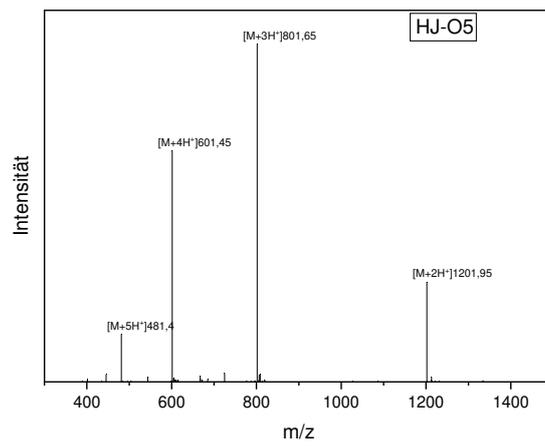


Abbildung 232 ESI-Spektrum von **HJ-O5**.

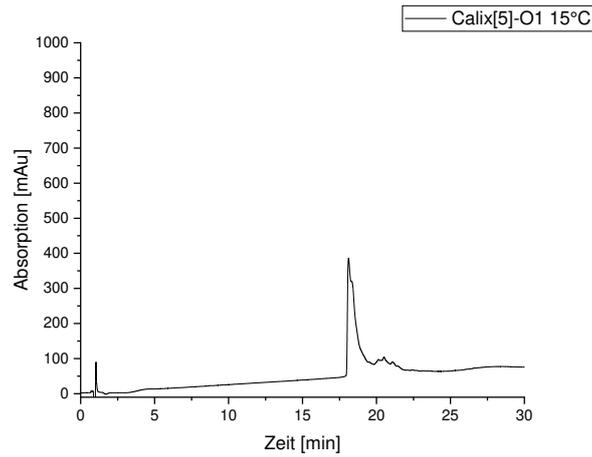


Abbildung 233 HPLC-Spektrum von **Calix[5]-O1** bei 15°C (linearer Gradient von 5-95 % Acetonitril in H₂O (0,1 % Ameisensäure) in 30 min).

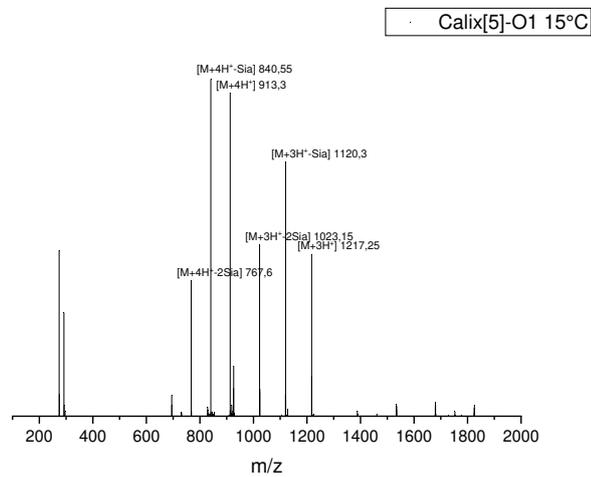


Abbildung 234 ESI-Spektrum von **Calix[5]-O1** bei 15°C.

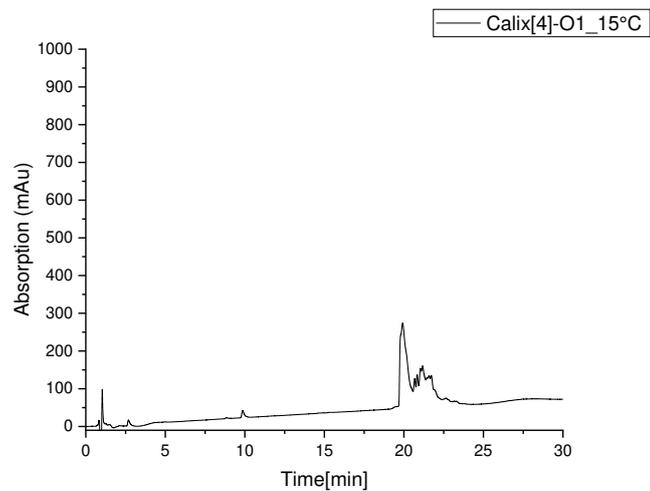


Abbildung 235 HPLC-Spektrum von **Calix[4]-O1** bei 15°C (linearer Gradient von 5-95 % Acetonitril in H₂O (0,1 % Ameisensäure) in 30 min).

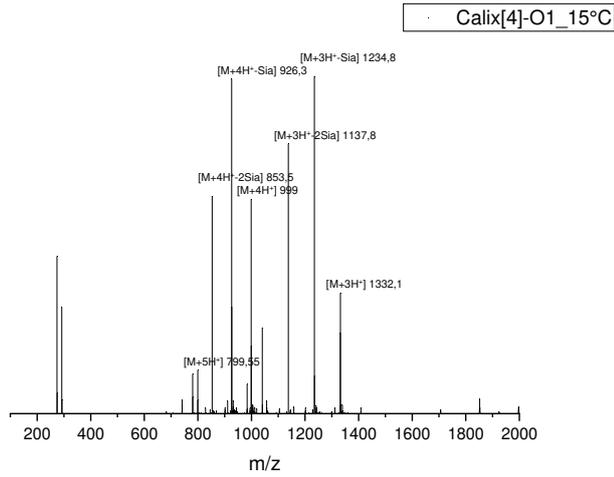


Abbildung 236 ESI-Spektrum von **Calix[4]-O1** bei 15°C.

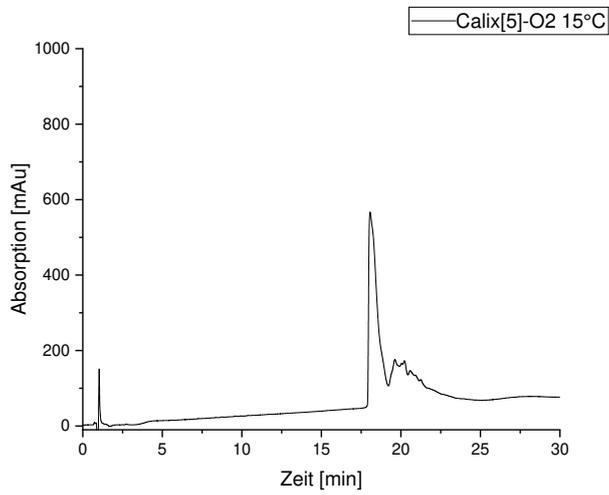


Abbildung 237 HPLC-Spektrum von **Calix[5]-O2** bei 15°C (linearer Gradient von 5-95 % Acetonitril in H₂O (0,1 % Ameisensäure) in 30 min).

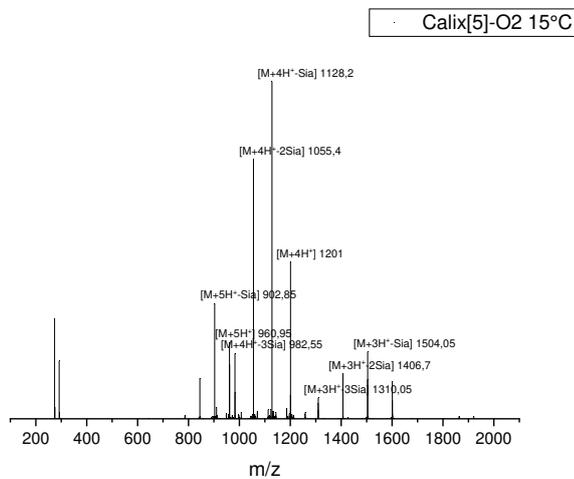


Abbildung 238 ESI-Spektrum von **Calix[5]-O2** bei 15°C.

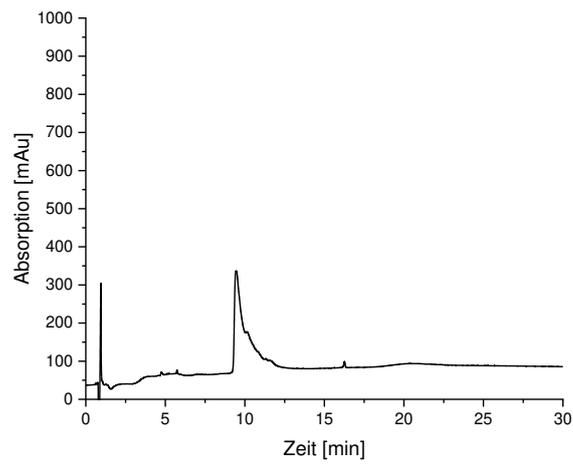


Abbildung 239 HPLC-Spektrum von **Calix[5]-O3** bei 15°C. (linearer Gradient von 5-95 % Acetonitril in H₂O (0,1 % Ameisensäure) in 30 min).

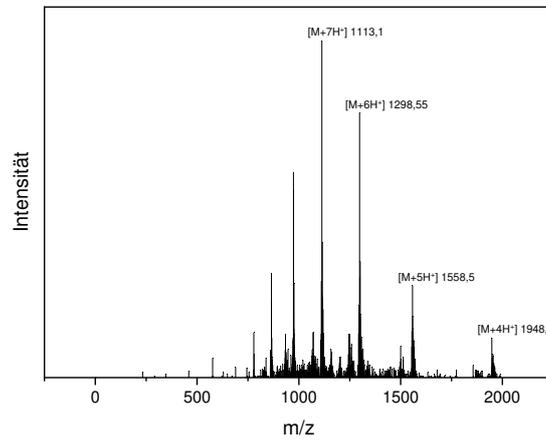


Abbildung 240 ESI-Spektrum von **Calix[5]-O3** bei 15°C.

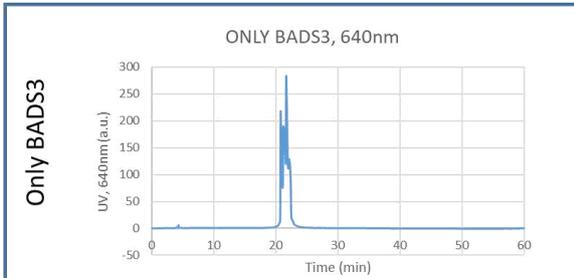
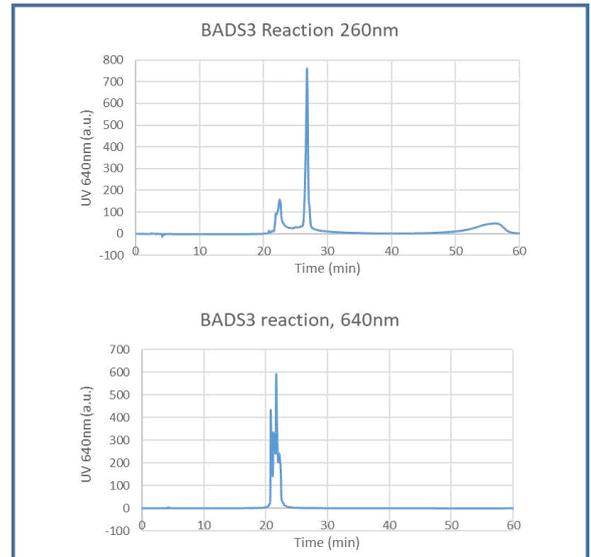
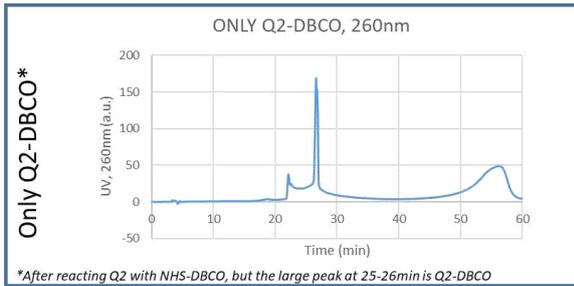


Abbildung 241 Exemplarische RP-HPLC-Spektren von HJ-O2 bei 640 nm und Q2-DBCO bei 260 nm (links).
Abbildung der RP-HPLC-Spektren nach der Konjugation von Q2 mit HJ-O2 bei 260 nm und 640 nm (rechts)
durchgeführt von Simon Vinther.

Maldi-Spektren

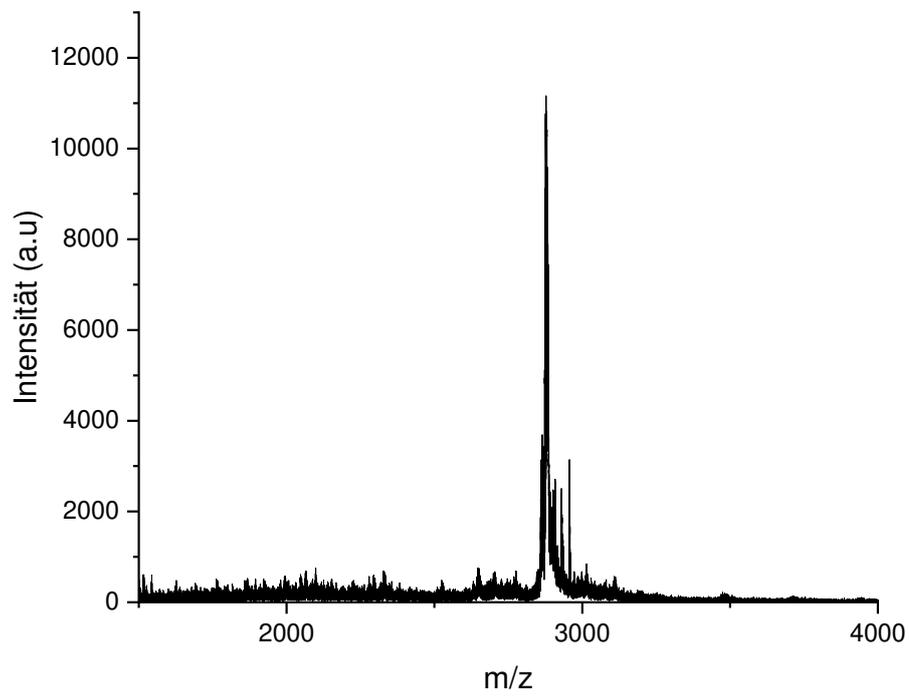


Abbildung 242 MALDI-TOF-Spektrum von A-O1. (Entnommen aus Ayla Yamans Bachelorarbeit)¹⁵⁶

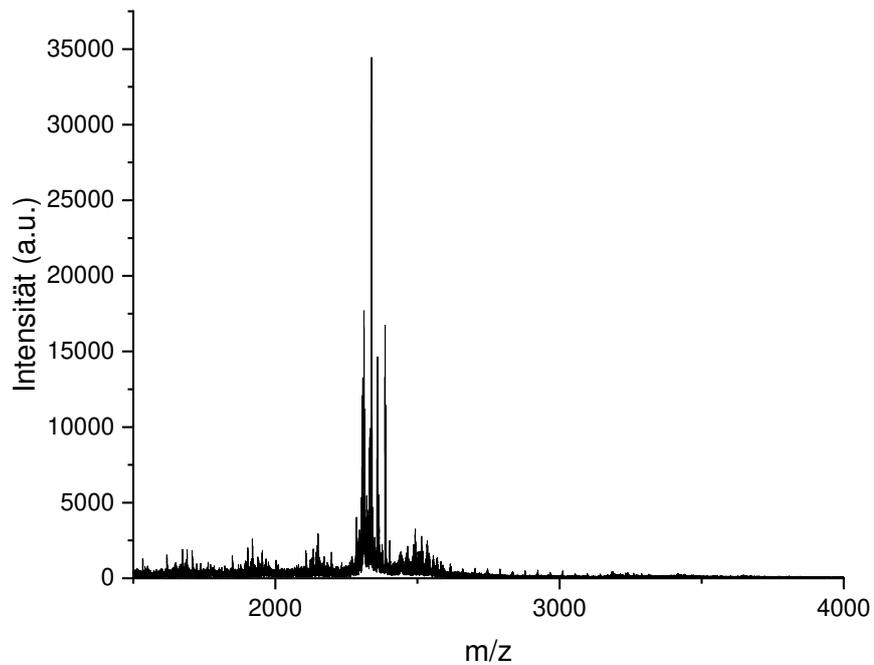


Abbildung 243 MALDI-TOF-Spektrum von AO-O2. (Entnommen aus Ayla Yamans Bachelorarbeit)¹⁵⁶

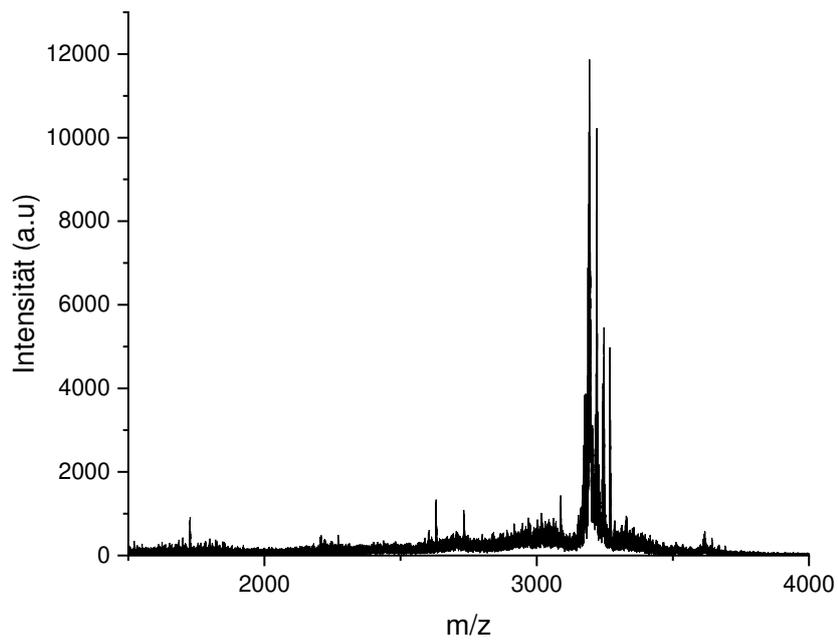


Abbildung 244 MALDI-TOF-Spektrum von AO-O4. (Entnommen aus Ayla Yamans Bachelorarbeit)¹⁵⁶

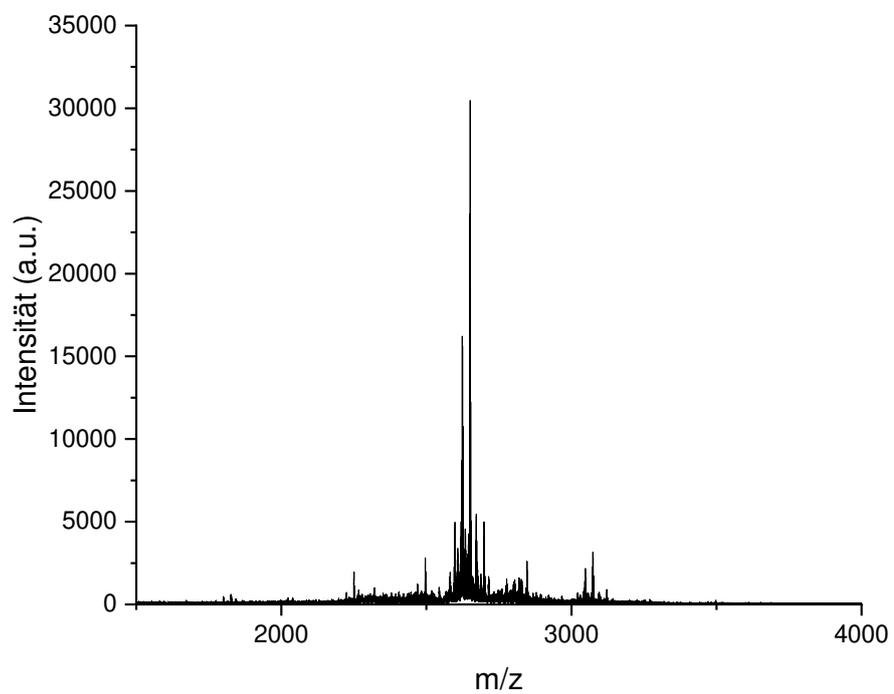


Abbildung 245 MALDI-TOF-Spektrum von AO-O5. (Entnommen aus Ayla Yamans Bachelorarbeit)¹⁵⁶

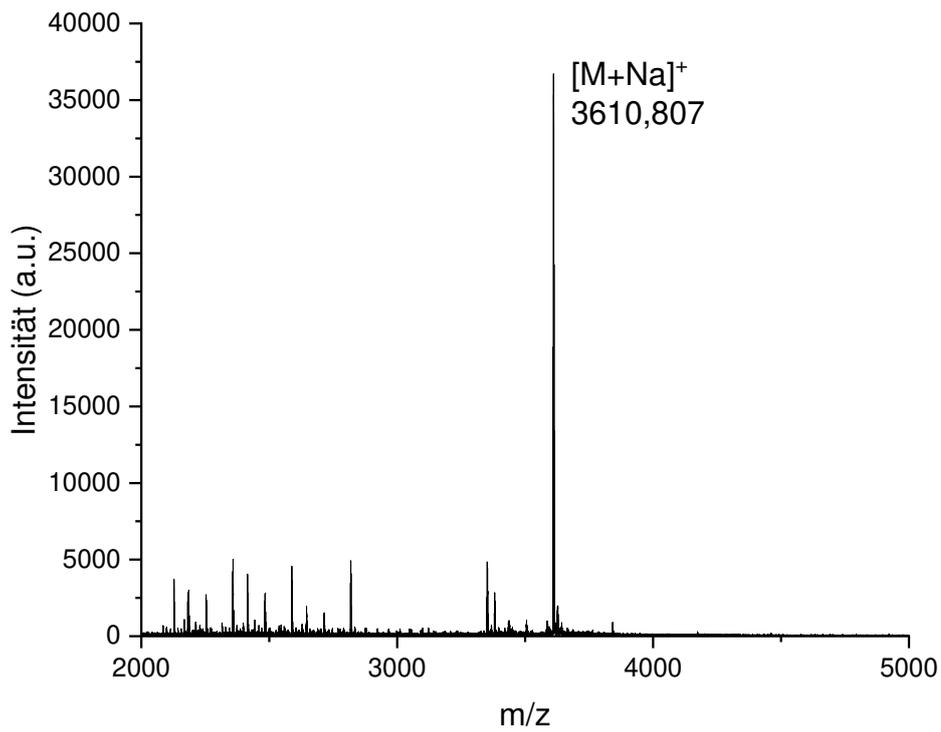


Abbildung 246 MALDI-TOF-Spektrum von AO-G1. (Entnommen aus Ayla Yamans Bachelorarbeit)¹⁵⁶

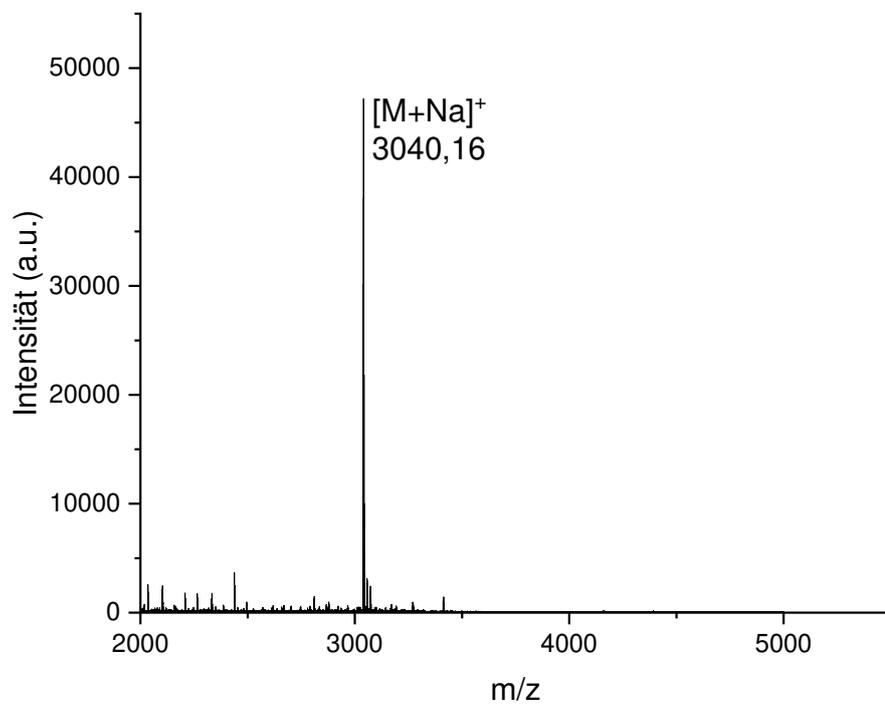


Abbildung 247 MALDI-TOF-Spektrum von AO-G2. (Entnommen aus Ayla Yamans Bachelorarbeit)¹⁵⁶

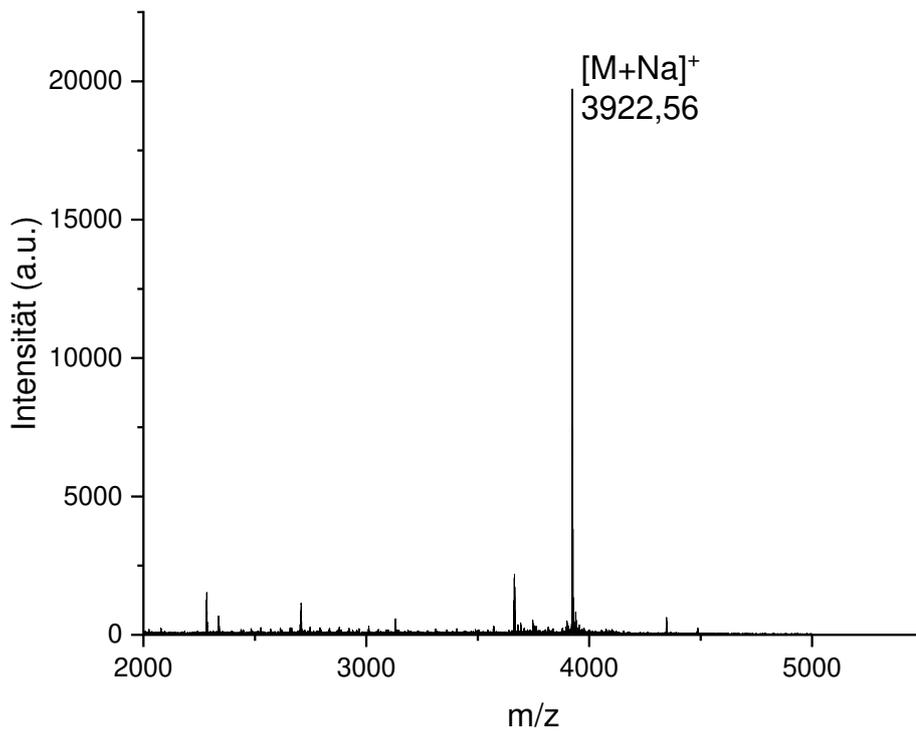


Abbildung 248 MALDI-TOF-Spektrum von AO-G4. (Entnommen aus Ayla Yamans Bachelorarbeit)¹⁵⁶

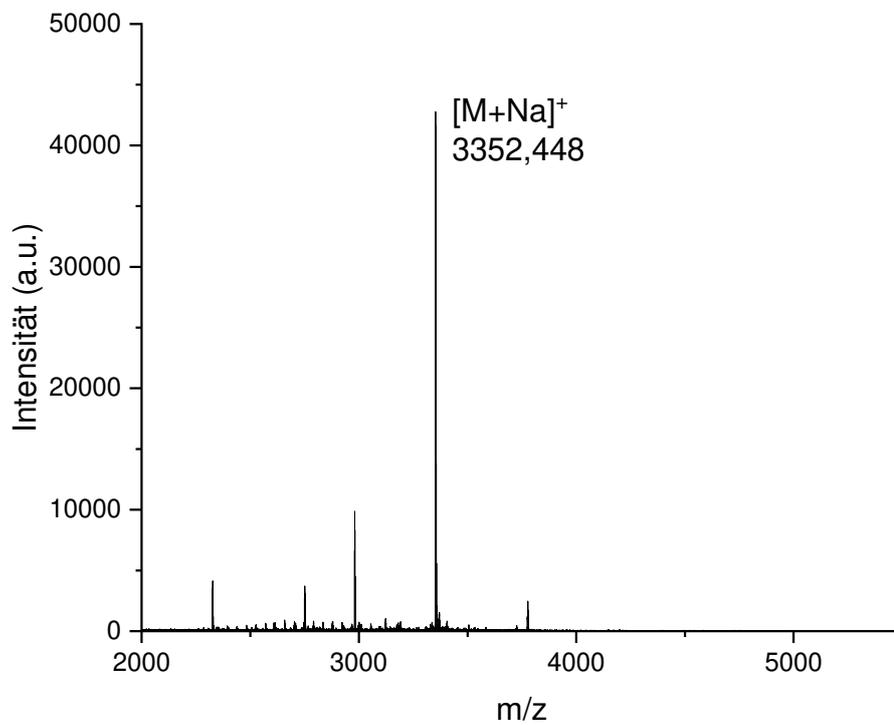


Abbildung 249 MALDI-TOF-Spektrum von AO-G5. (Entnommen aus Ayla Yamans Bachelorarbeit)¹⁵⁶

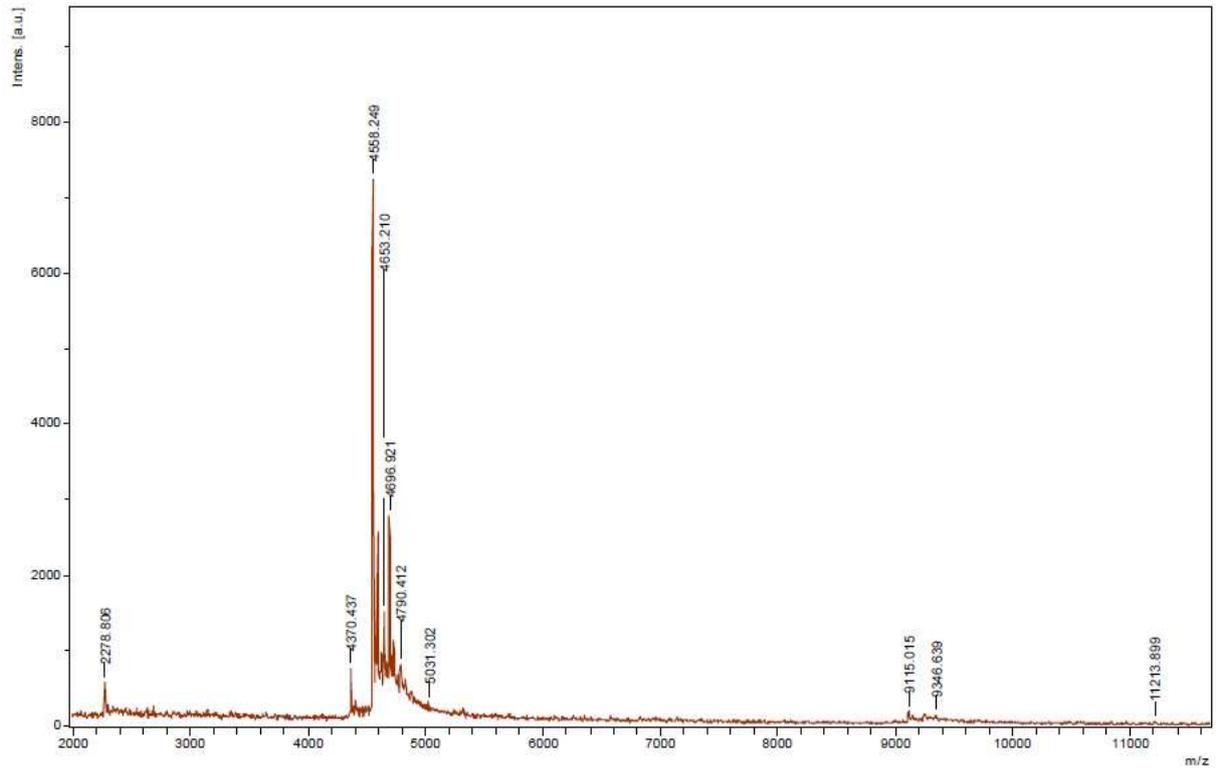


Abbildung 250 MALDI-TOF-Spektrum von **Q2** in einer HPA Matrix.

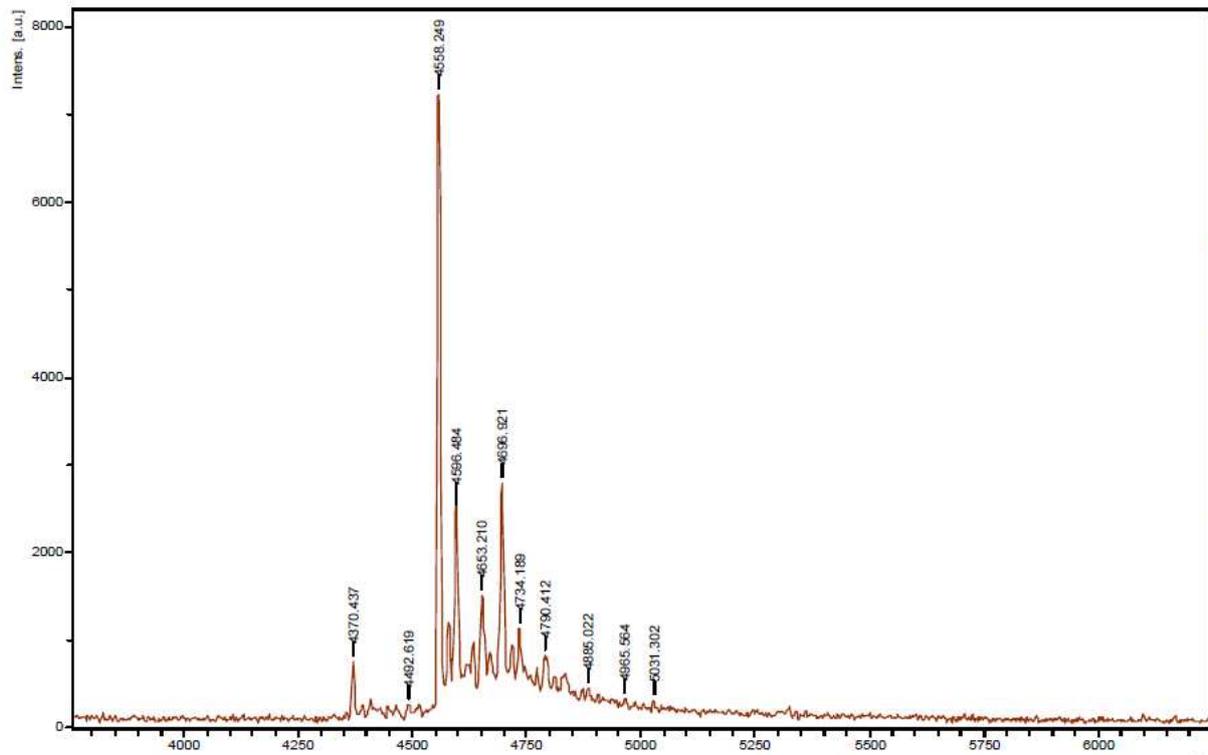


Abbildung 251 MALDI-TOF-Spektrum-Zoom von **Q2** in einer HPA-Matrix.

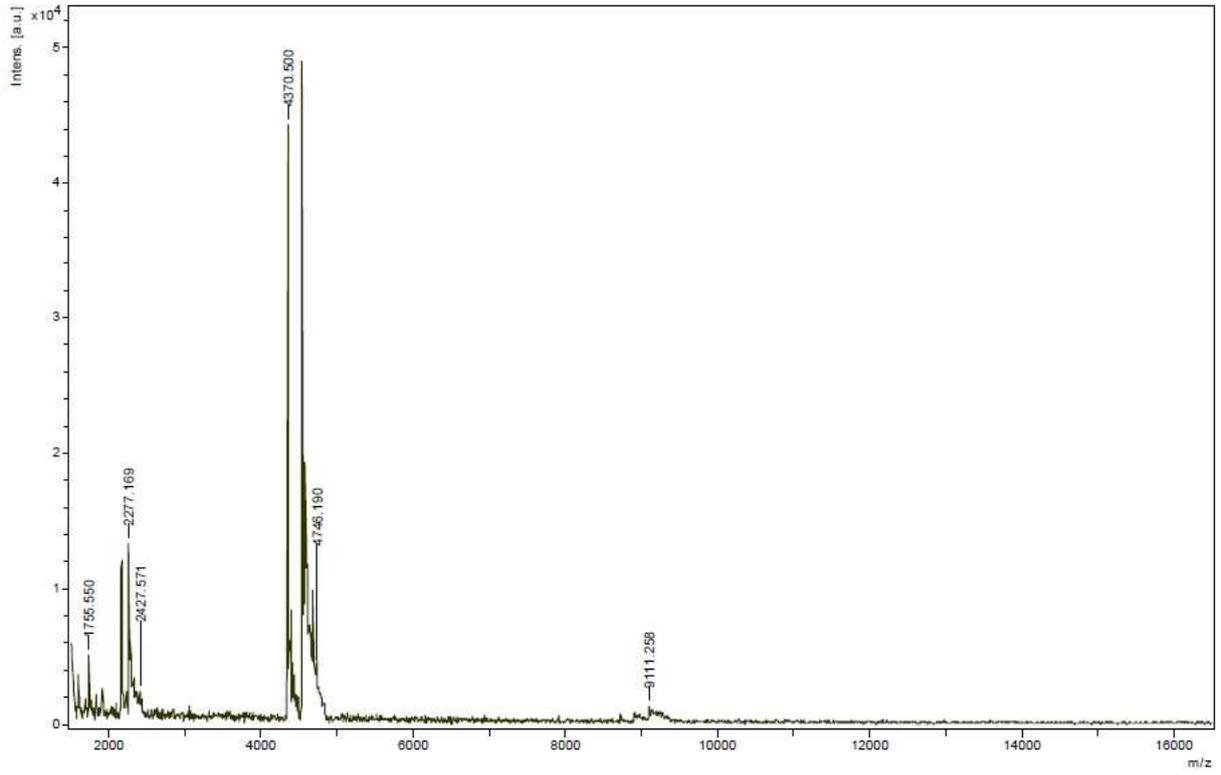


Abbildung 252 MALDI-TOF-Spektrum von **HJ-O1-Q2** in einer HPA Matrix.

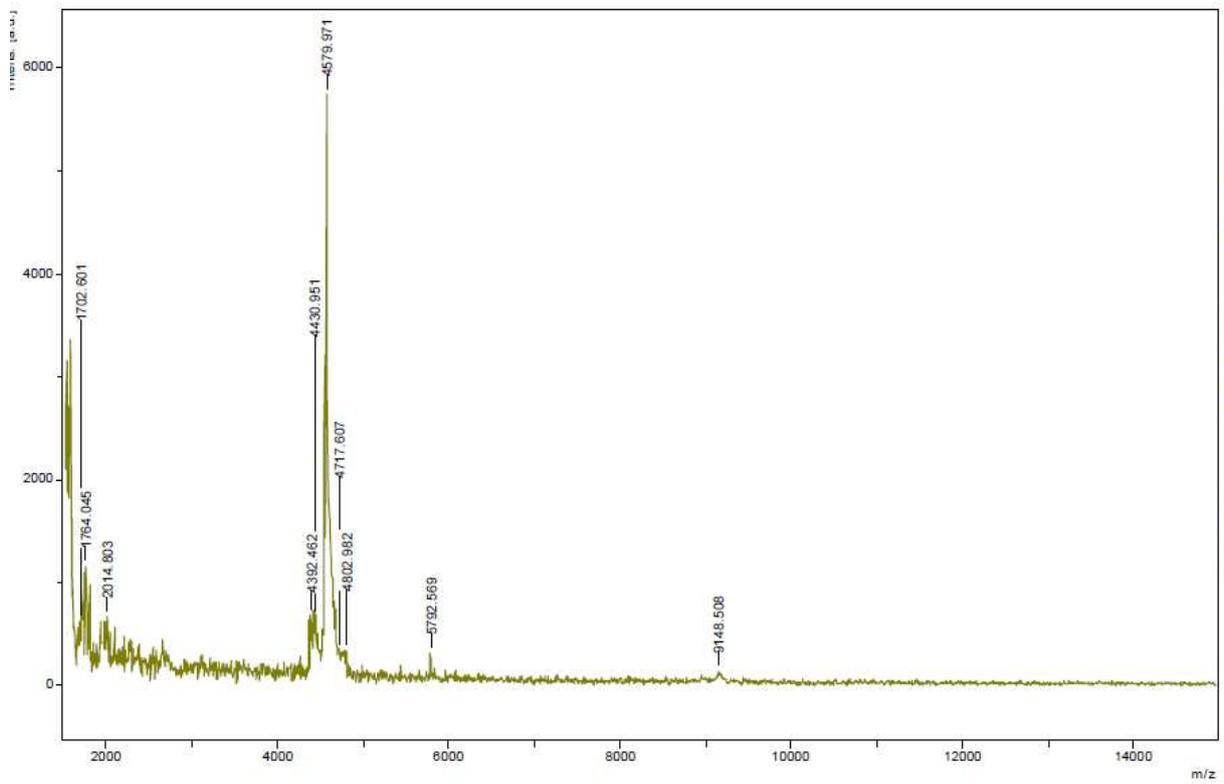


Abbildung 253 MALDI-TOF-Spektrum von **HJ-O1-Q2** in einer TA-Matrix.

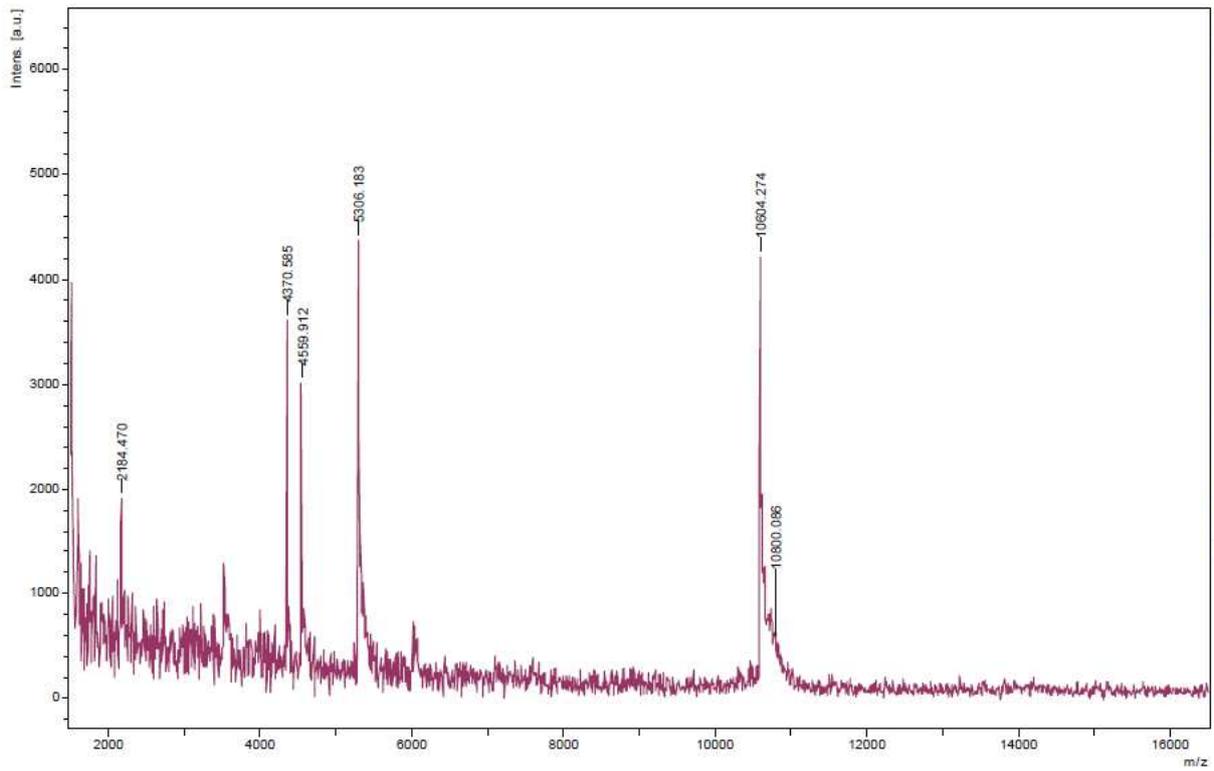


Abbildung 254 MALDI-TOF-Spektrum von **HJ-O1.1-Q2** in einer HPA-Matrix.

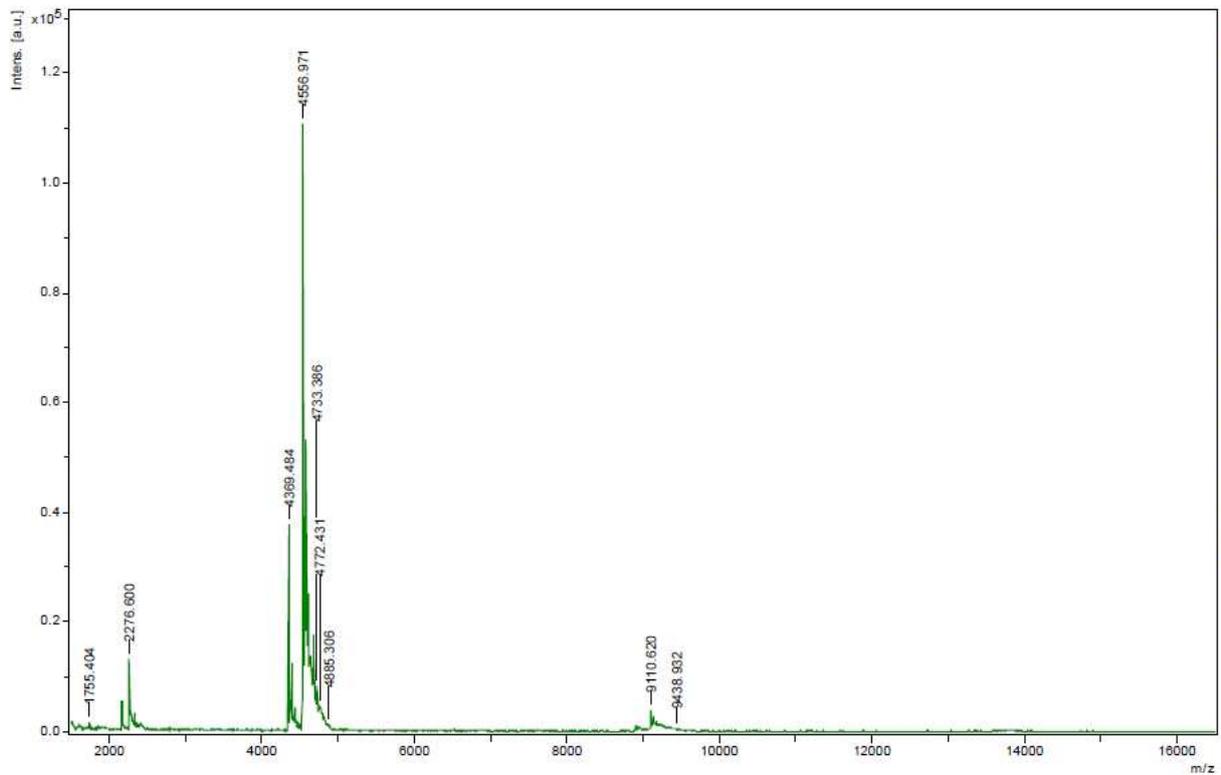


Abbildung 255 MALDI-TOF-Spektrum von **HJ-O2-Q2** in einer HPA-Matrix.

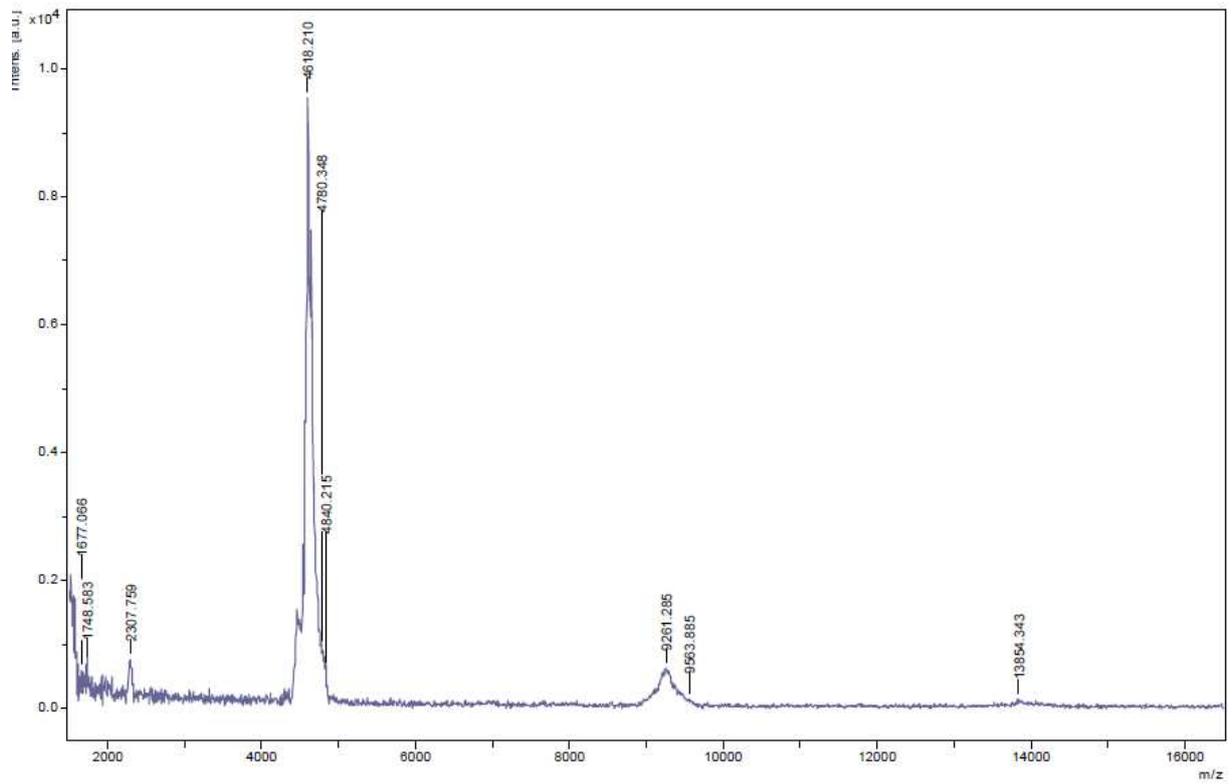


Abbildung 256 MALDI-TOF-Spektrum von **HJ-O2-Q2** in einer TA-Matrix.

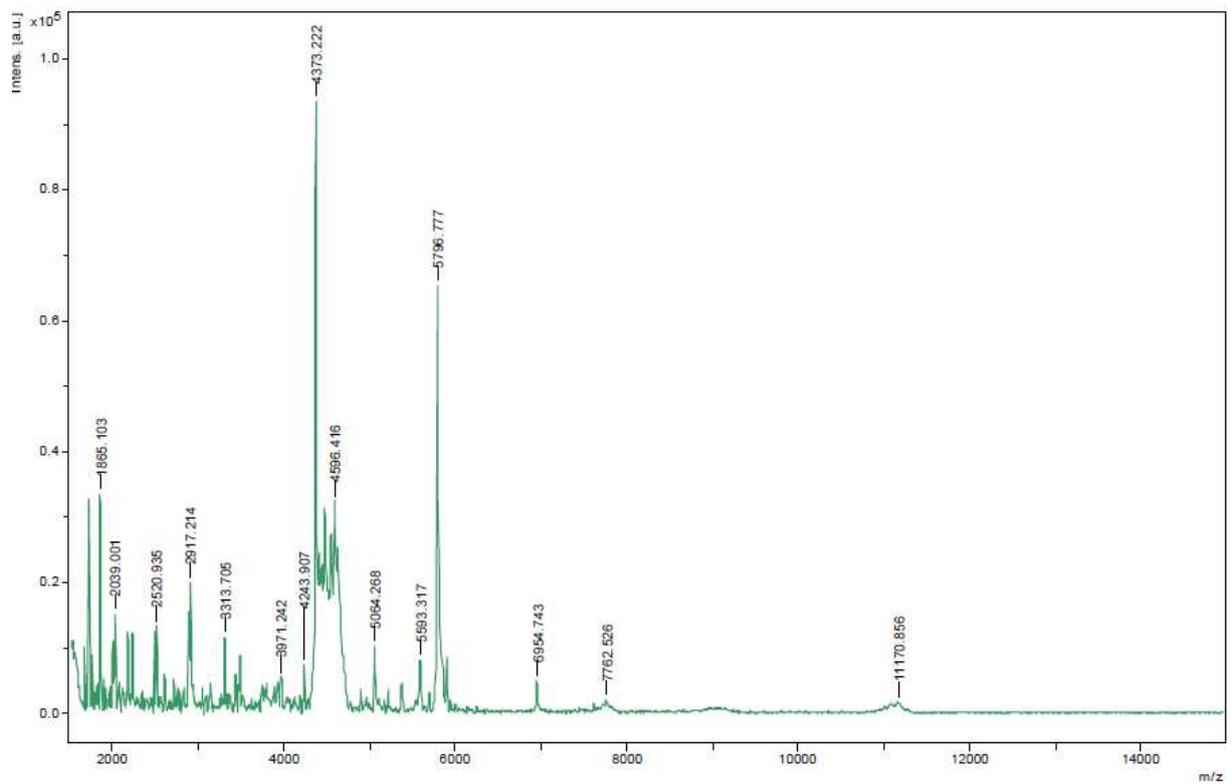


Abbildung 257 MALDI-TOF-Spektrum von **HJ-O2-Q2** in einer TA-CHZA-Matrix.

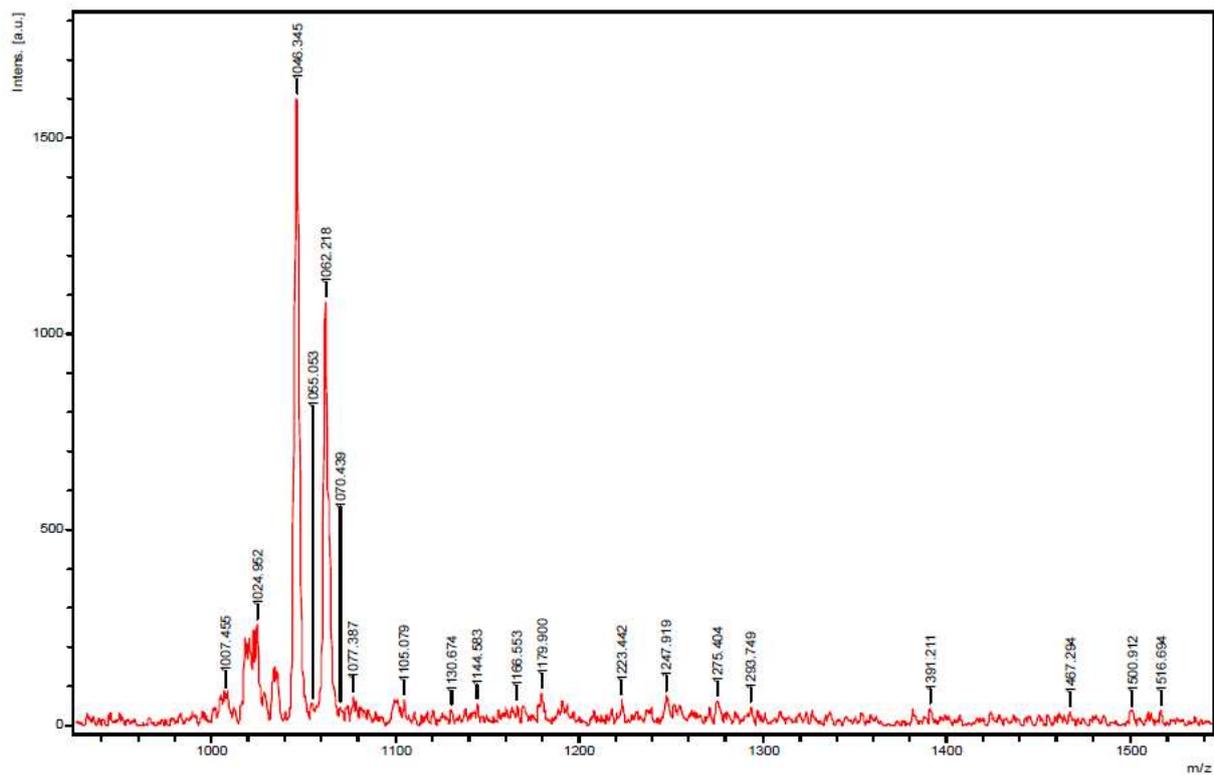


Abbildung 258 MALDI-TOF-Spektrum von **HJ-O3** in einer ACNTFA-CHZS-Matrix.

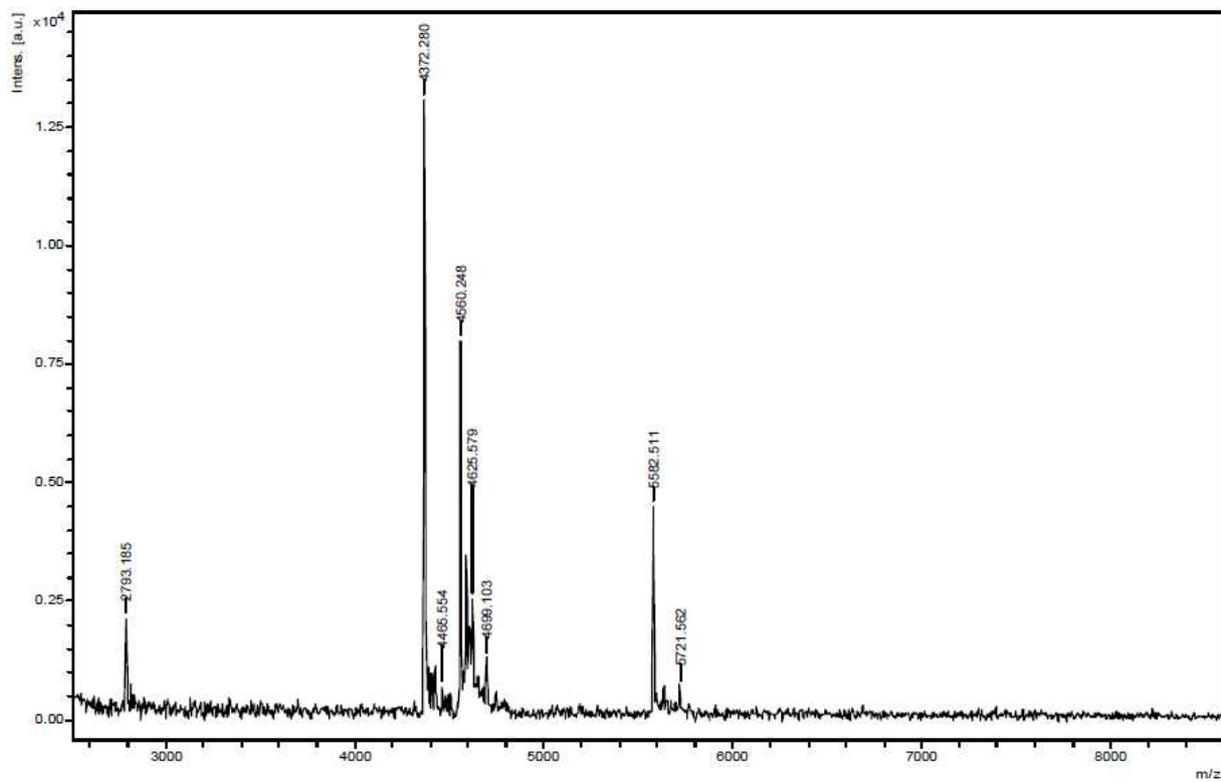


Abbildung 259 MALDI-TOF-Spektrum von **HJ-O3-Q2** in einer HPA-Matrix.

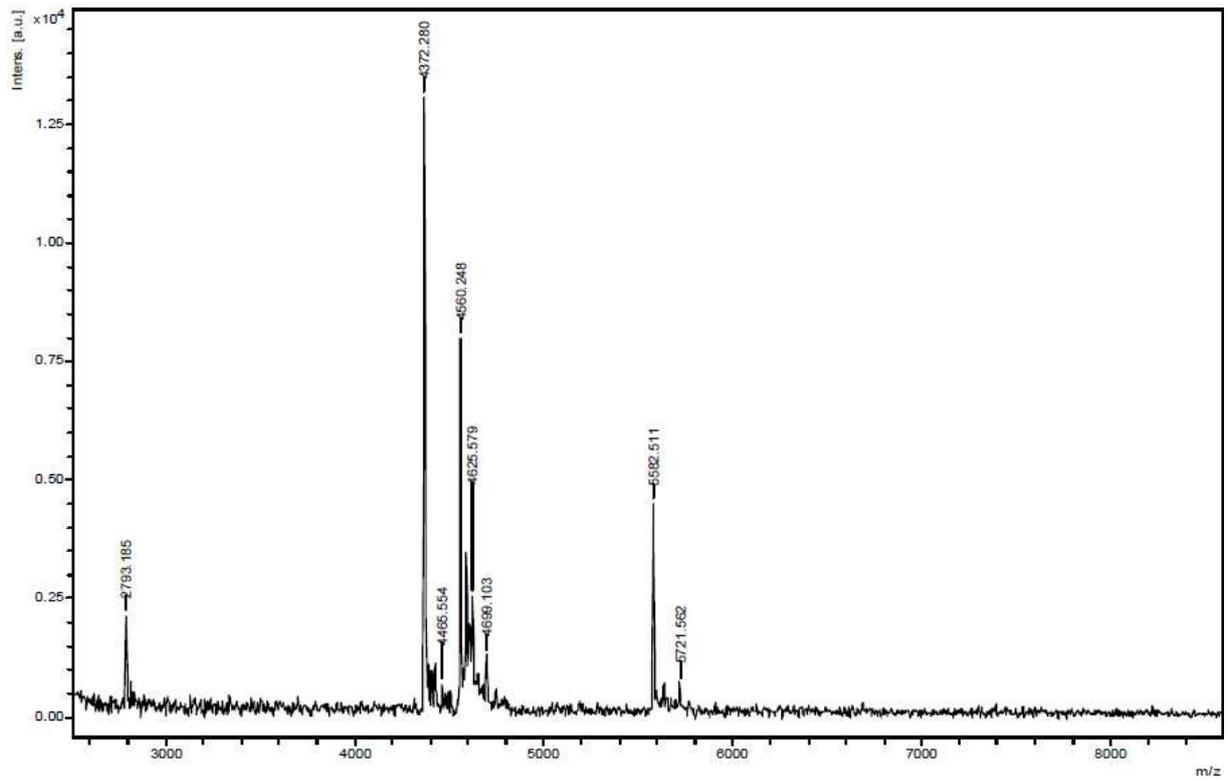


Abbildung 260 MALDI-TOF-Spektrum-Zoom von **HJ-O3-Q2** in einer HPA-Matrix

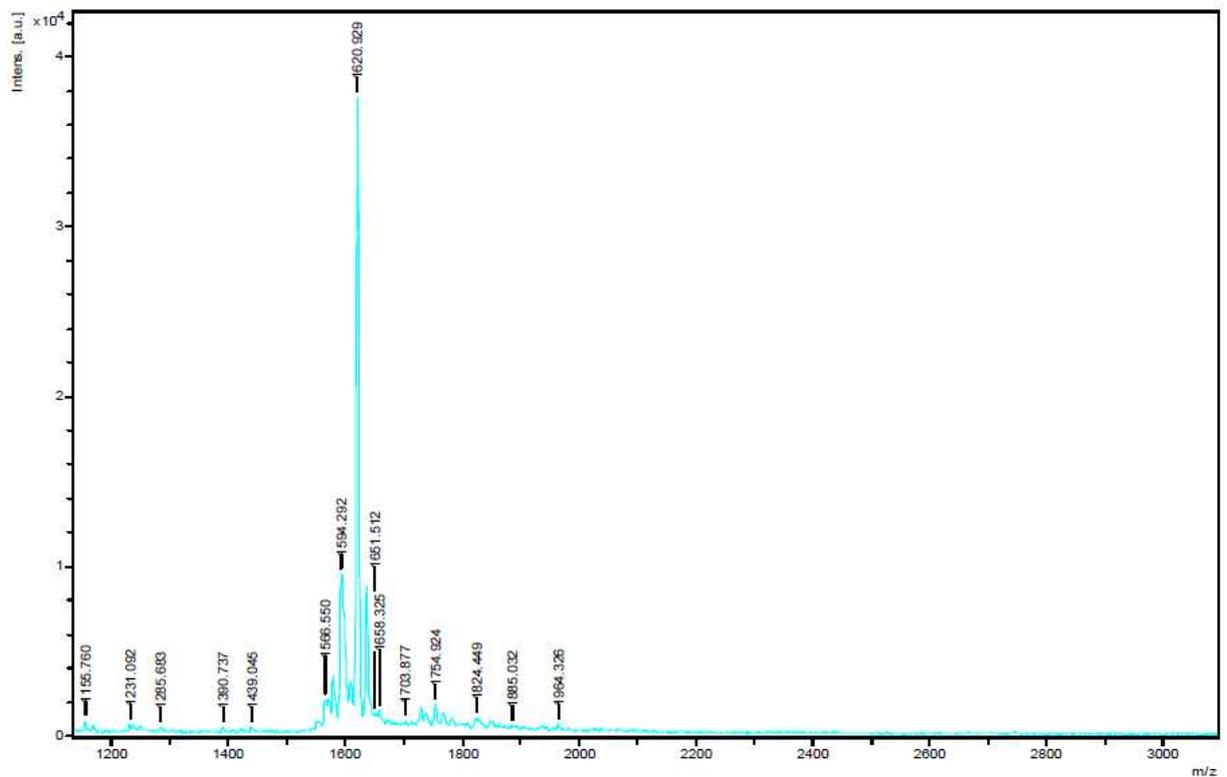


Abbildung 261 MALDI-TOF-Spektrum von **HJ-O4** in einer ACNTFA-CHZS-Matrix.

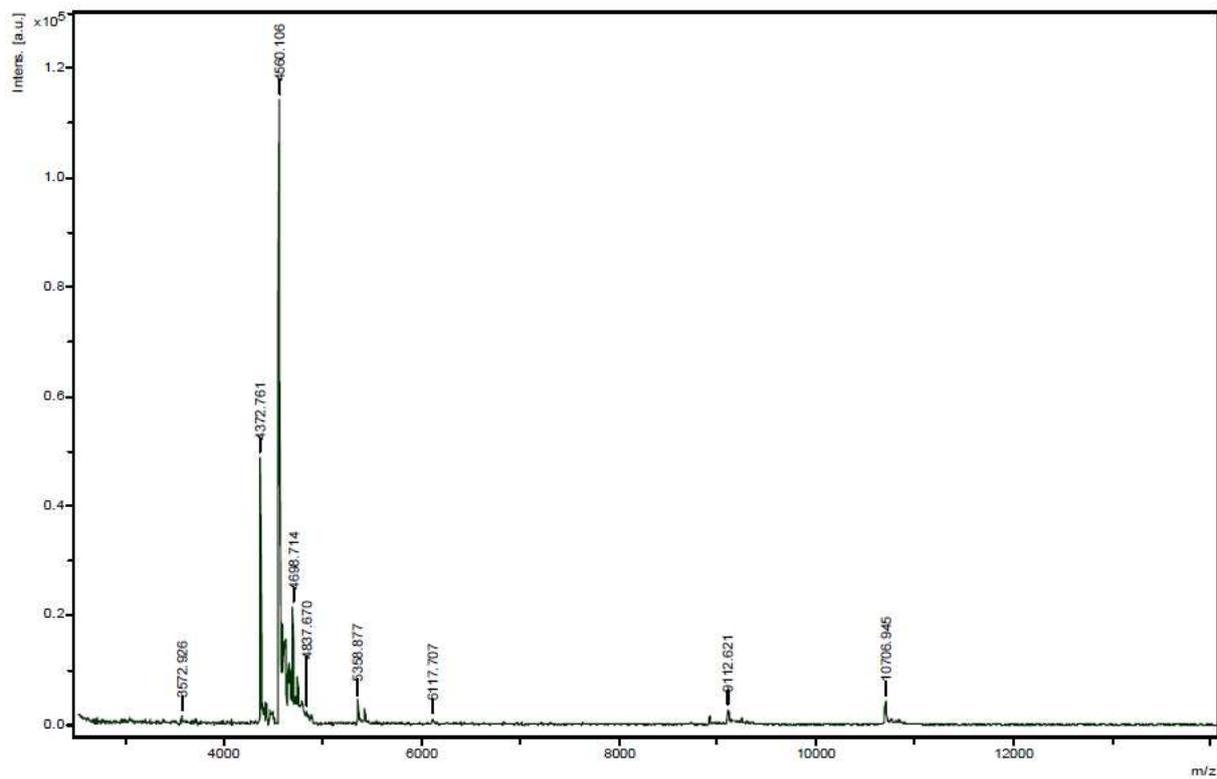


Abbildung 262 MALDI-TOF-Spektrum von **HJ-O4** in einer HPA-CA-Matrix.

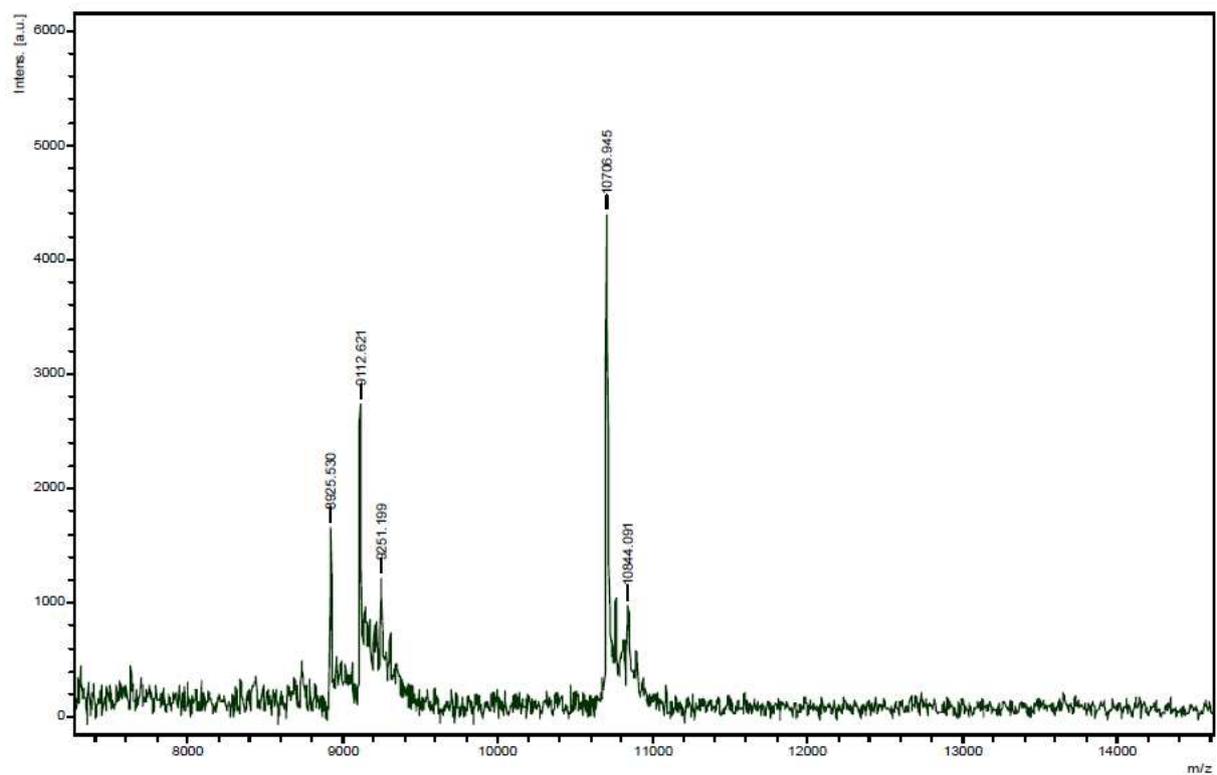


Abbildung 263 MALDI-TOF-Spektrum-Zoom von **HJ-O4** in einer HPA-CA-Matrix.

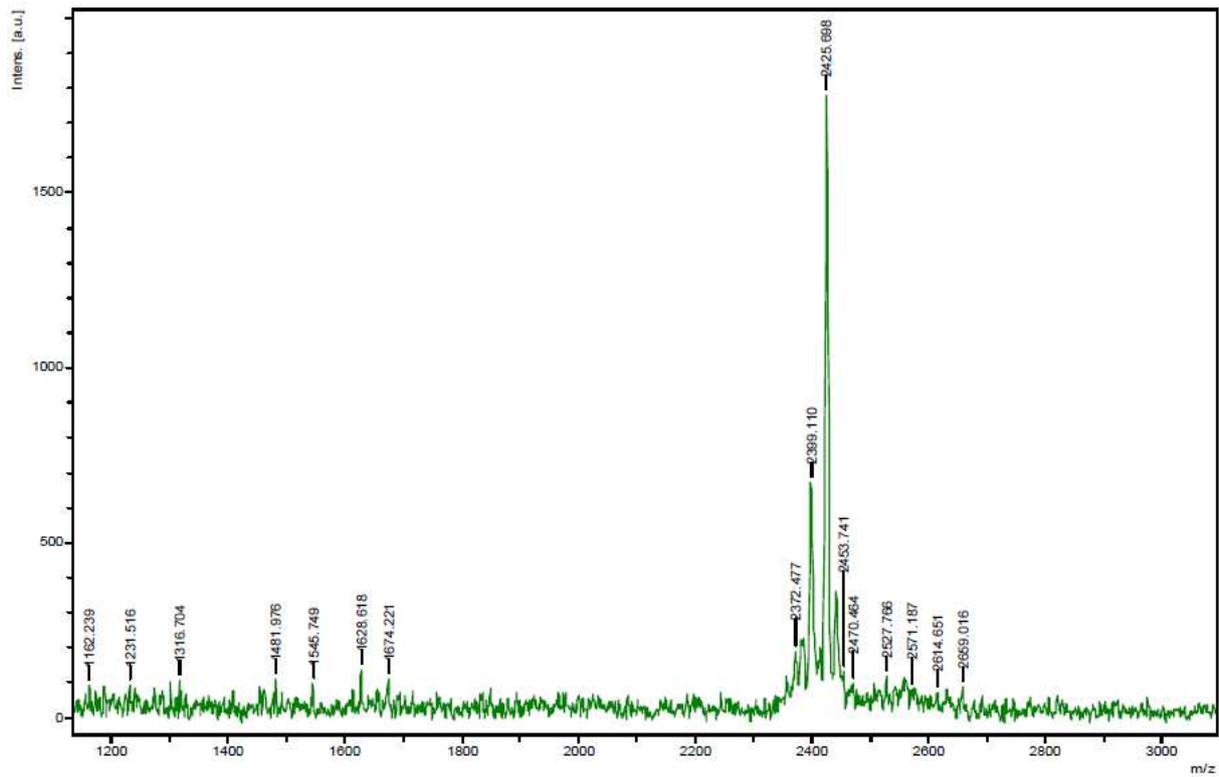


Abbildung 264 MALDI-TOF-Spektrum von **HJ-O5** in einer ACNTFA-CHZS-Matrix.

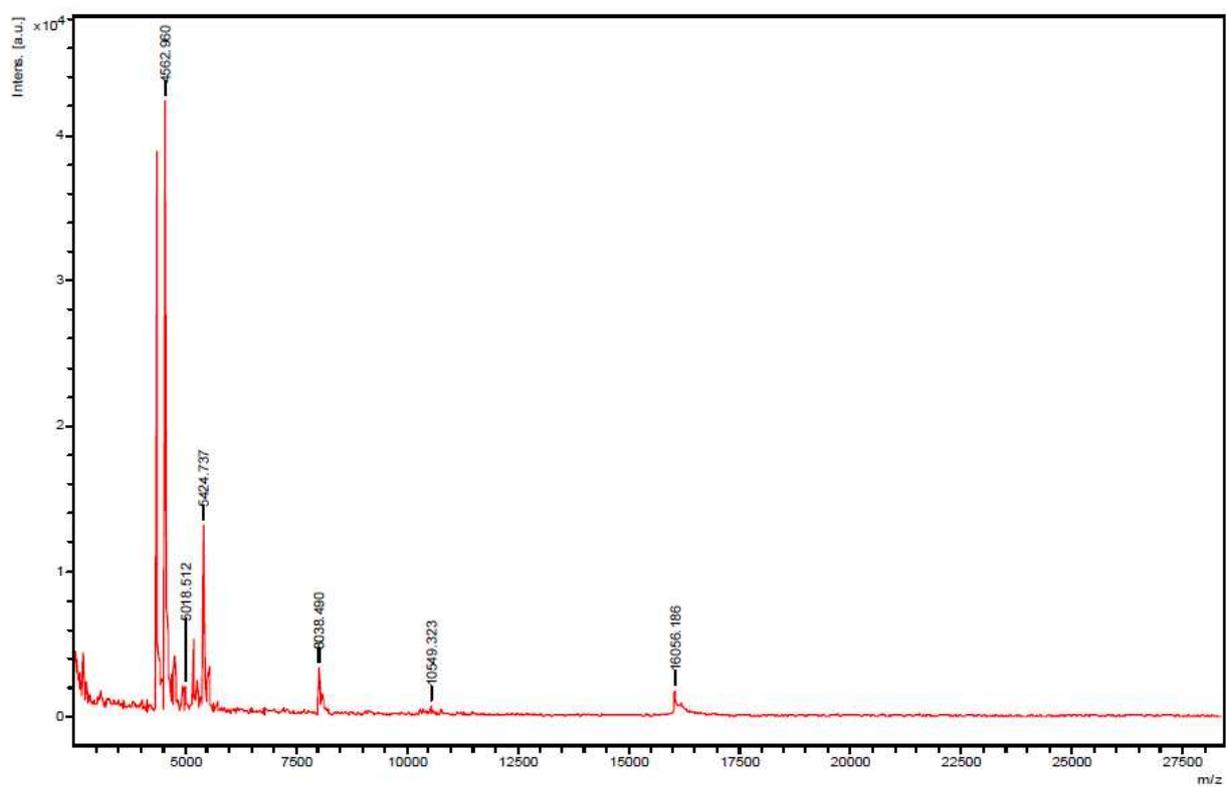


Abbildung 265 MALDI-TOF-Spektrum von **HJ-O5-Q2** in einer HPA-CA-Matrix.

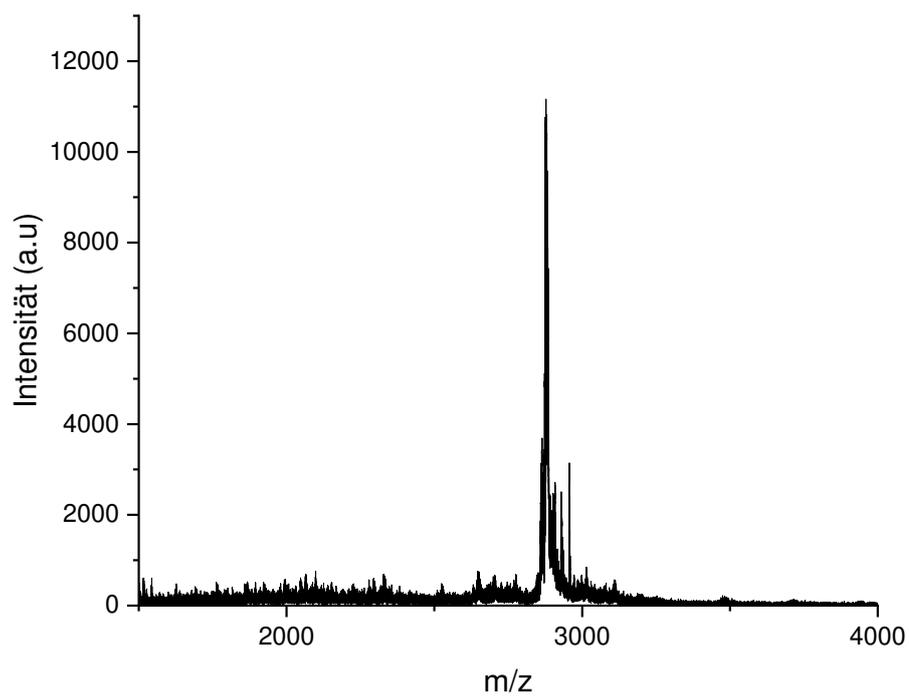


Abbildung 266 MALDI-TOF-Spektrum von **AO-O1**. (Entnommen aus Ayla Yamans Bachelorarbeit)¹⁵⁶

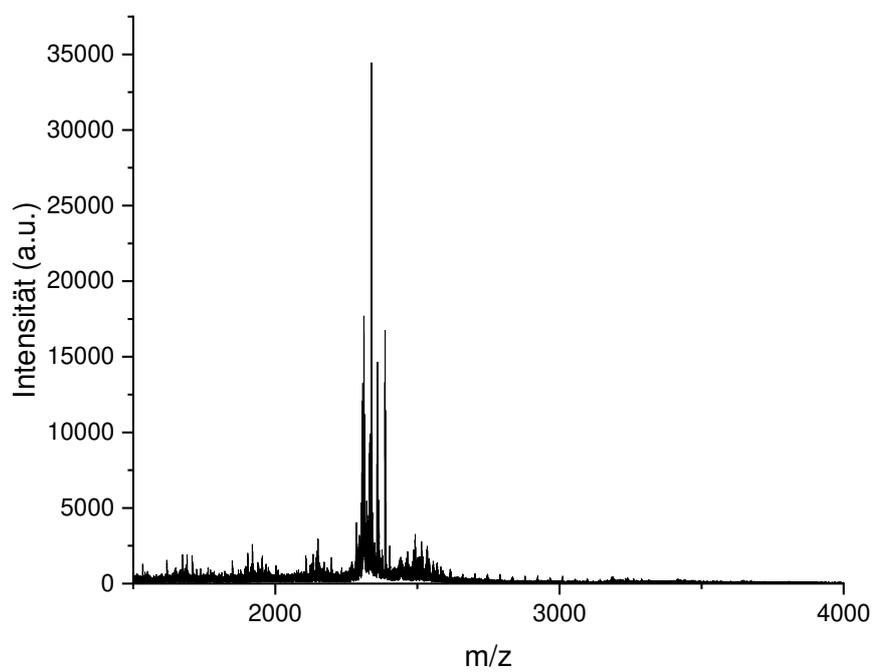


Abbildung 267 MALDI-TOF-Spektrum von **AO-O2**. (Entnommen aus Ayla Yamans Bachelorarbeit)¹⁵⁶

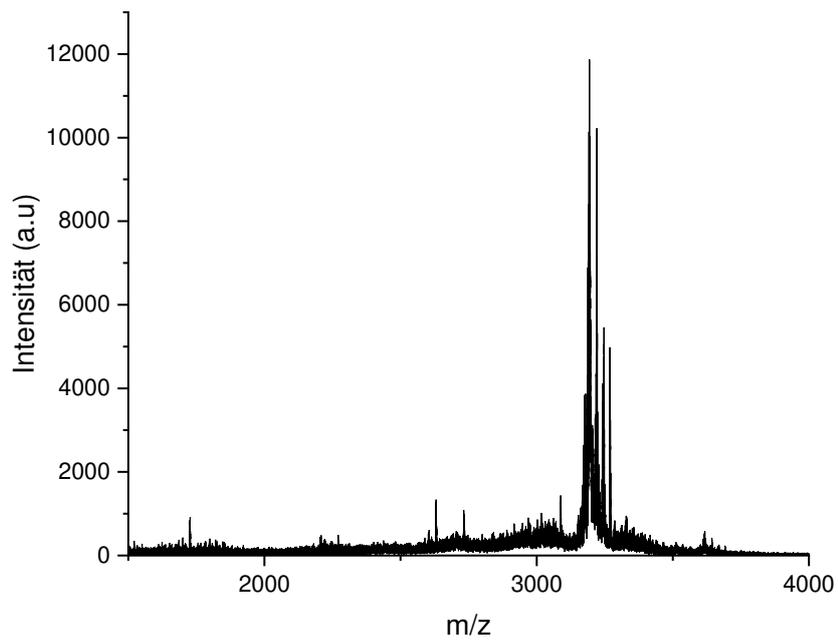


Abbildung 268 MALDI-TOF-Spektrum von **AO-O4**. (Entnommen aus Ayla Yamans Bachelorarbeit)¹⁵⁶

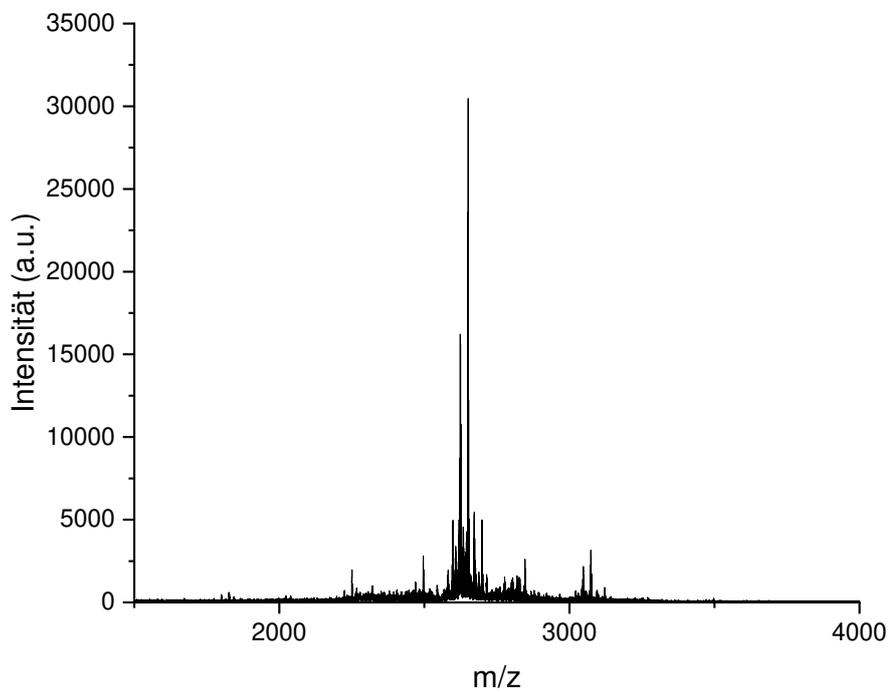


Abbildung 269 MALDI-TOF-Spektrum von **AO-O5**. (Entnommen aus Ayla Yamans Bachelorarbeit)¹⁵⁶

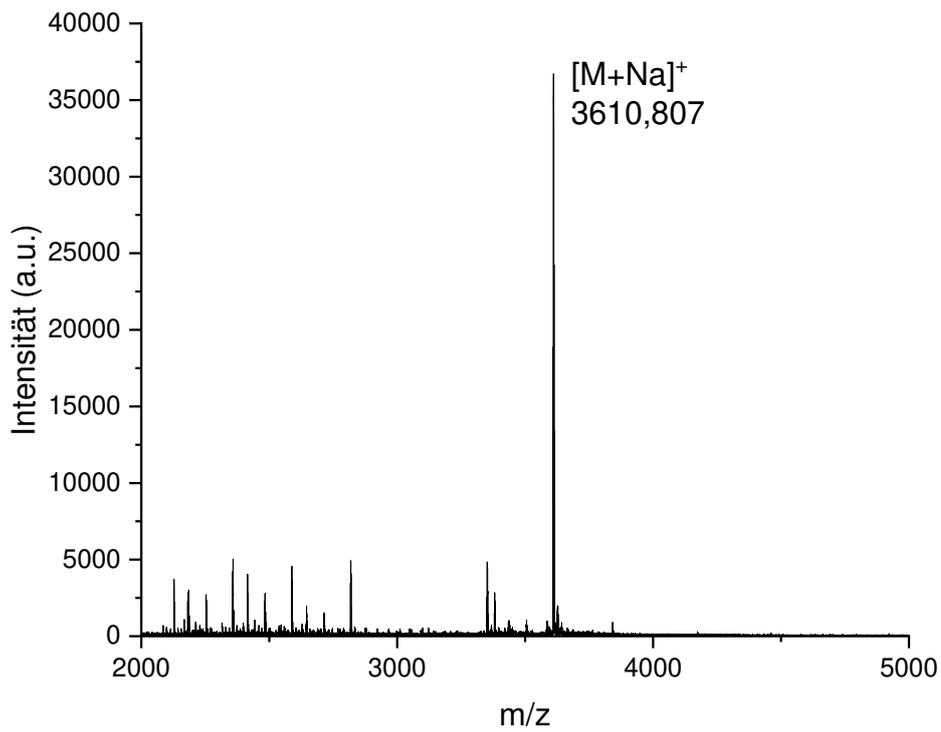


Abbildung 270 MALDI-TOF-Spektrum von **AO-G1**. (Entnommen aus Ayla Yamans Bachelorarbeit)¹⁵⁶

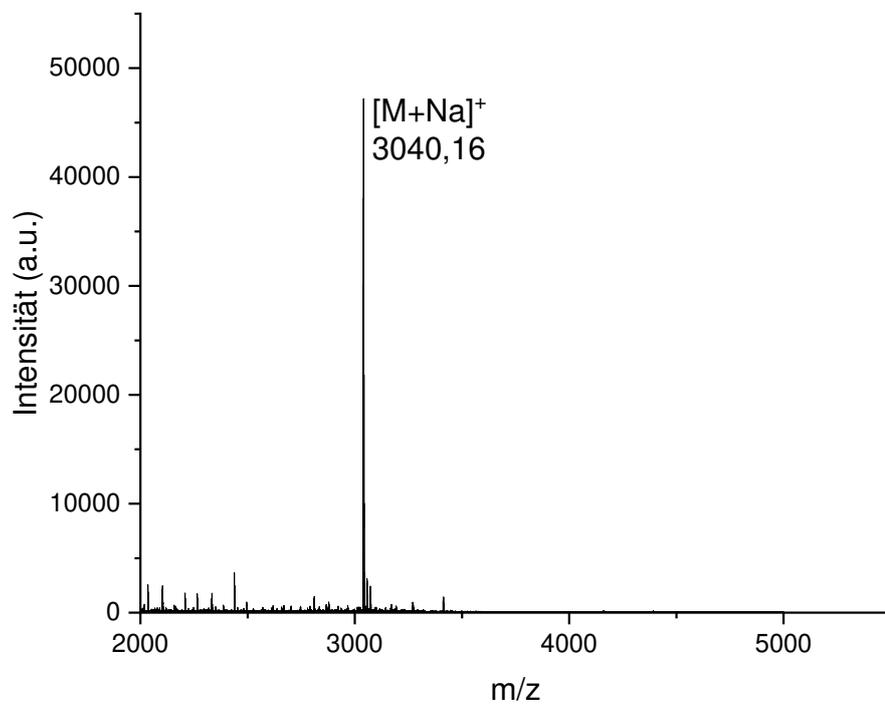


Abbildung 271 MALDI-TOF-Spektrum von **AO-G2**. (Entnommen aus Ayla Yamans Bachelorarbeit)¹⁵⁶

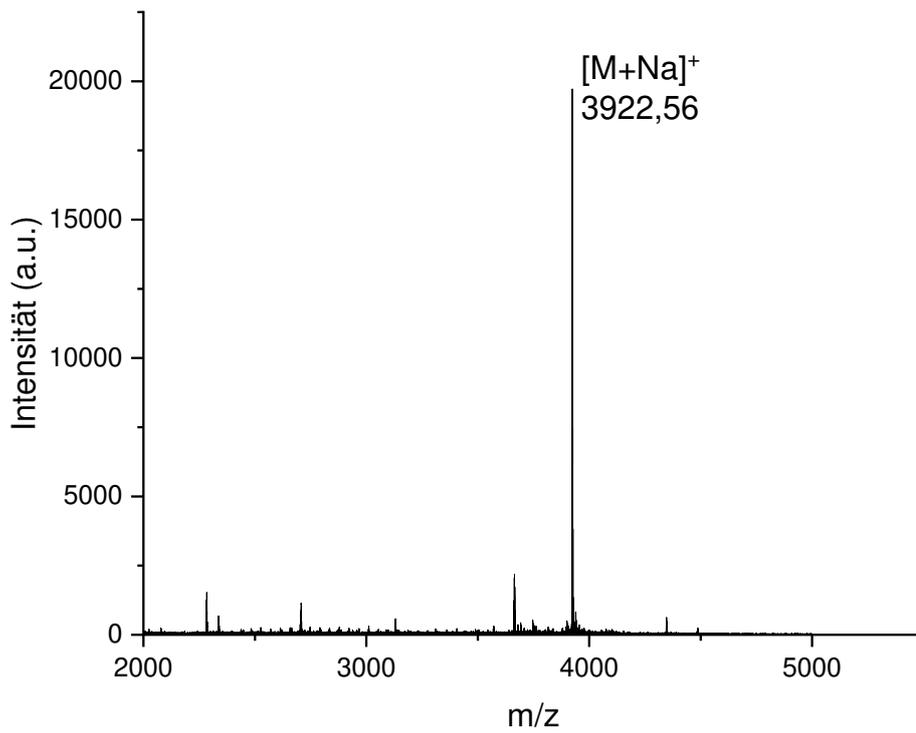


Abbildung 272 MALDI-TOF-Spektrum von **AO-G4**. (Entnommen aus Ayla Yamans Bachelorarbeit)¹⁵⁶

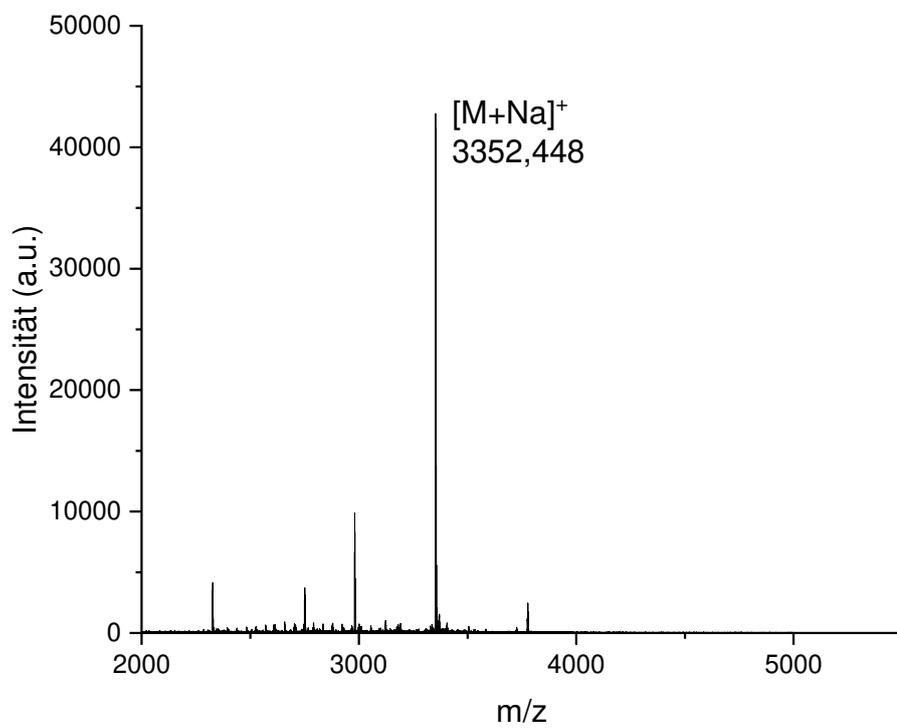


Abbildung 273 MALDI-TOF-Spektrum von **AO-G5**. (Entnommen aus Ayla Yamans Bachelorarbeit)¹⁵⁶

HR-ESI-Spektren

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	4000 V	Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1500 m/z	Set Collision Cell RF	600.0 Vpp	Set Divert Valve	Source

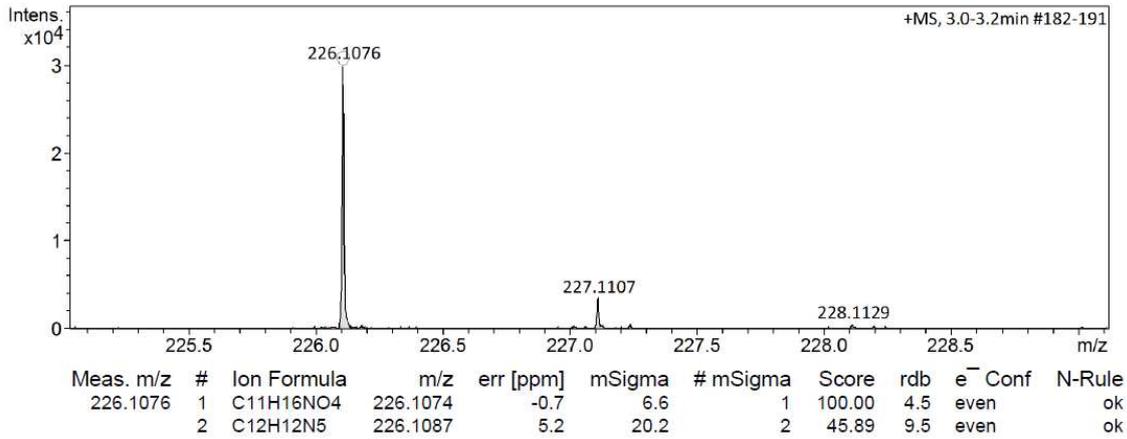


Abbildung 274 HR-ESI-Spektrum von T4.

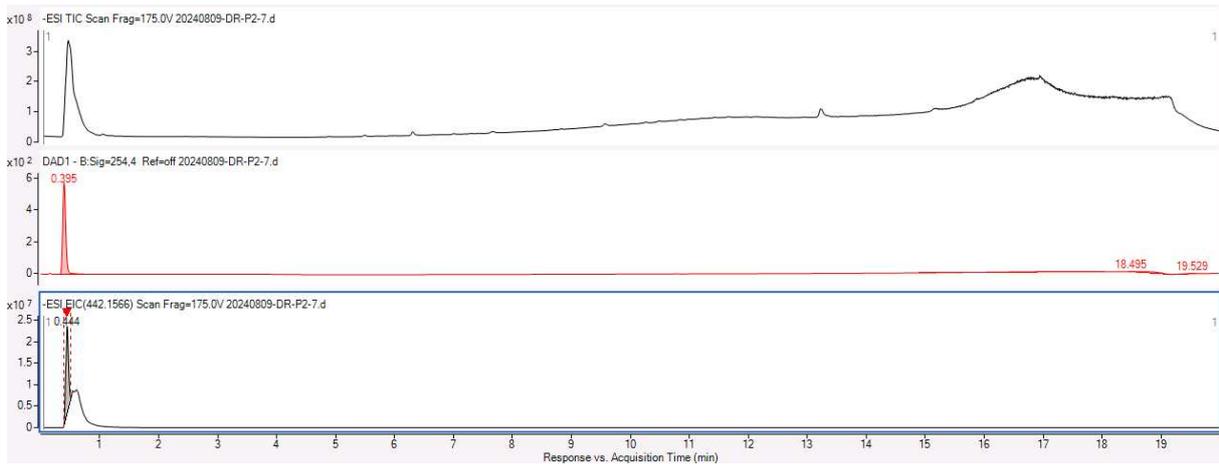


Abbildung 275 HPLC-Lauf von P2S Fraktion 7.

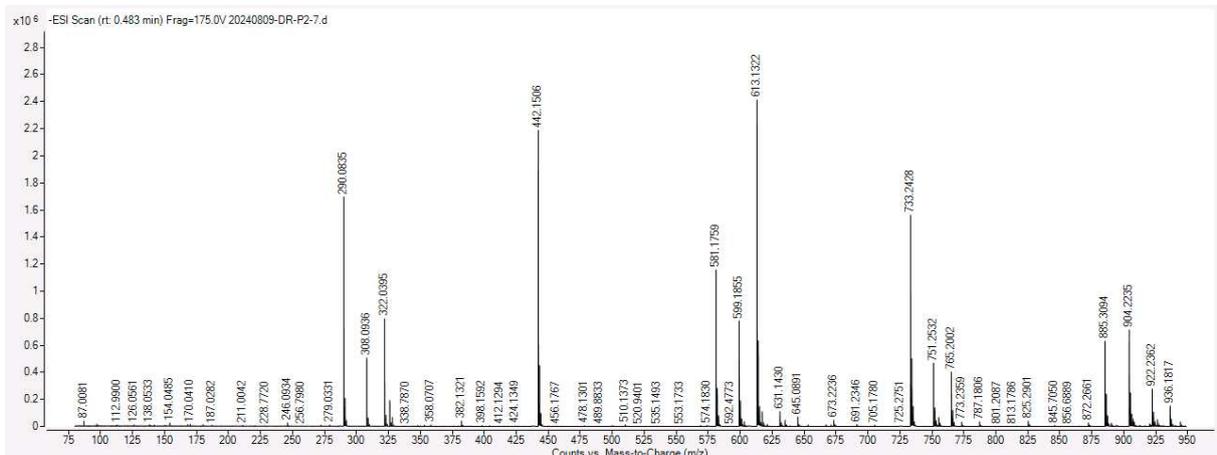


Abbildung 276 HR-ESI-Spektrum von P2S Fraktion 7.

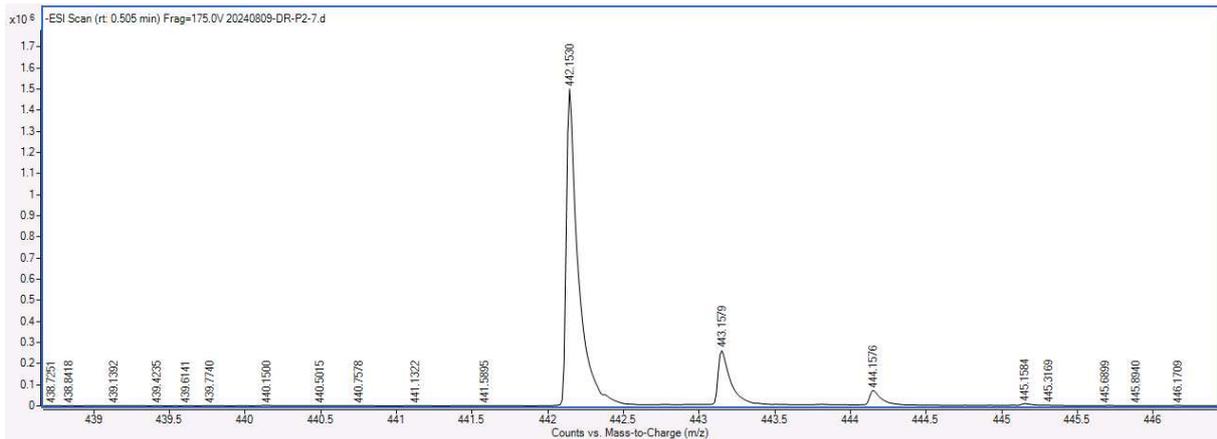


Abbildung 277 HR-ESI-Spektrum-Zoom von P2S Fraktion 7.

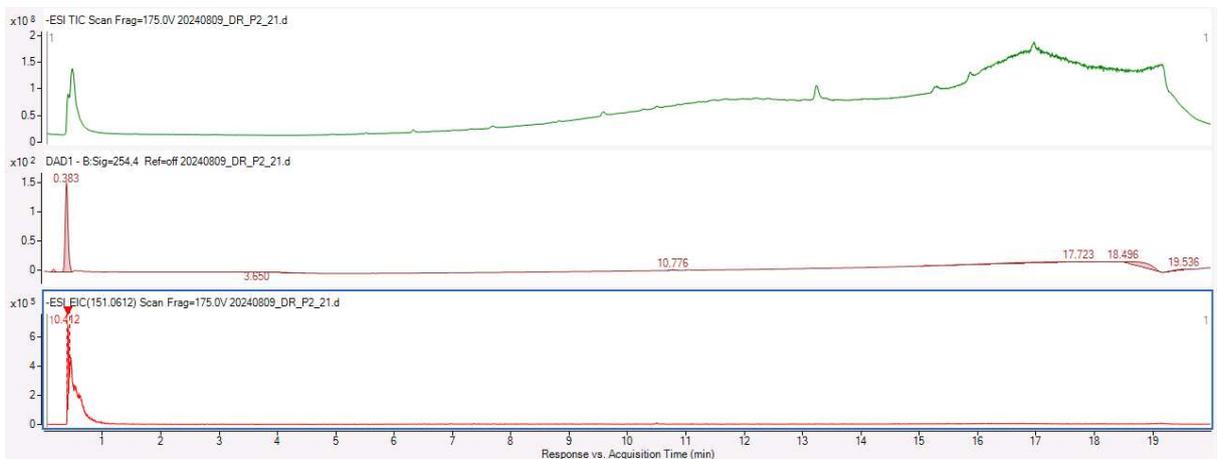


Abbildung 278 HPLC-Lauf von P2S Fraktion 21.

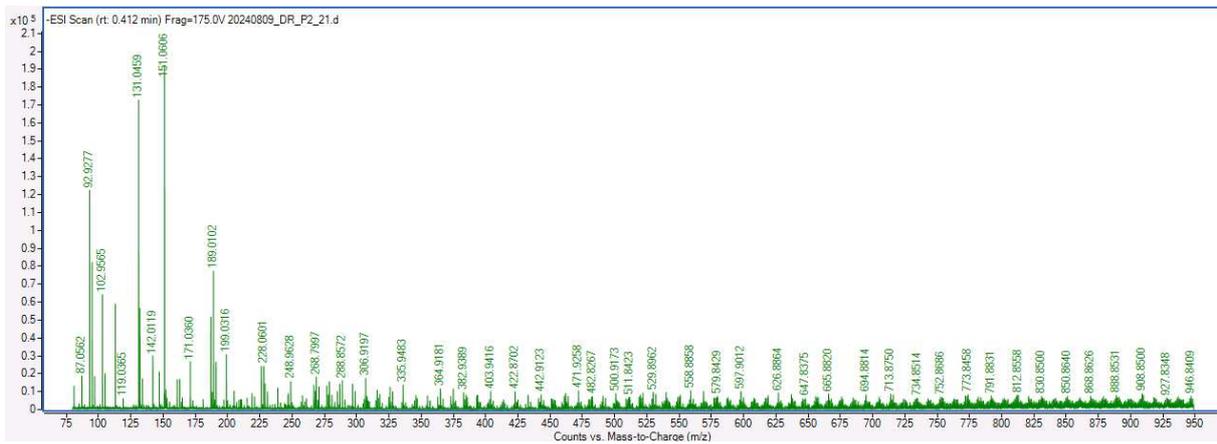


Abbildung 279 HR-ESI-Spektrum von P2S Fraktion 21.

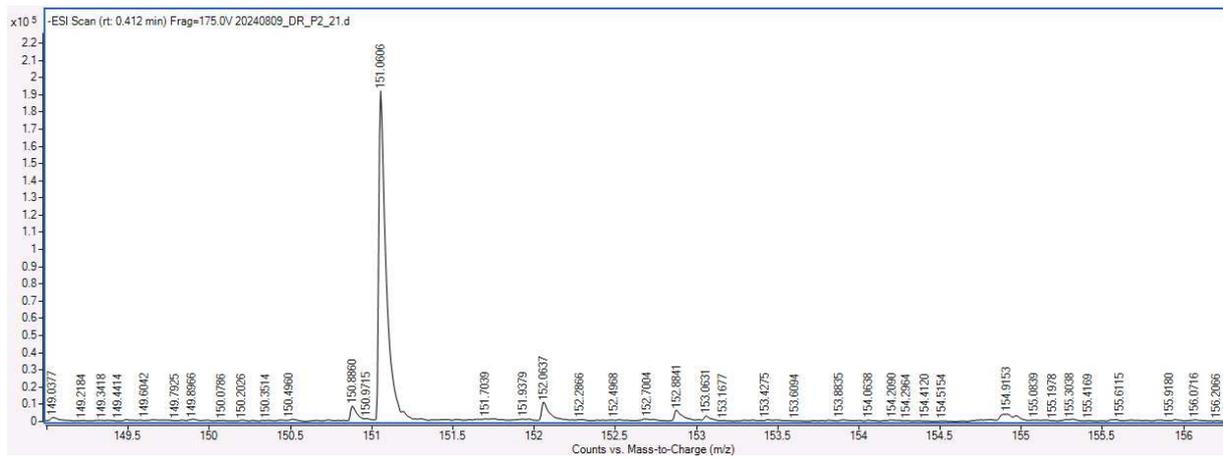


Abbildung 280 HR-ESI-Spektrum-Zoom von P2S Fraktion 21.

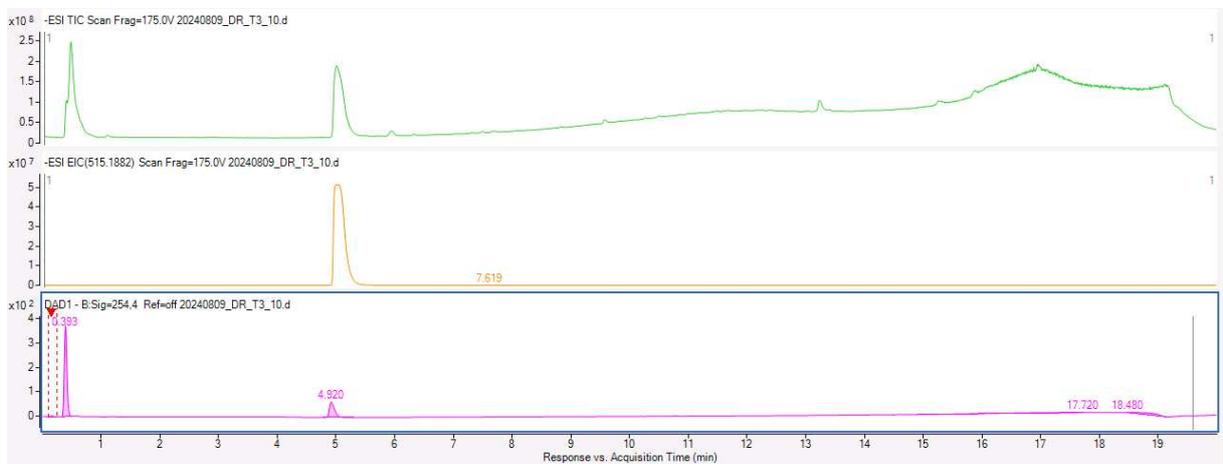


Abbildung 281 HPLC-Lauf von T3S Fraktion 10.

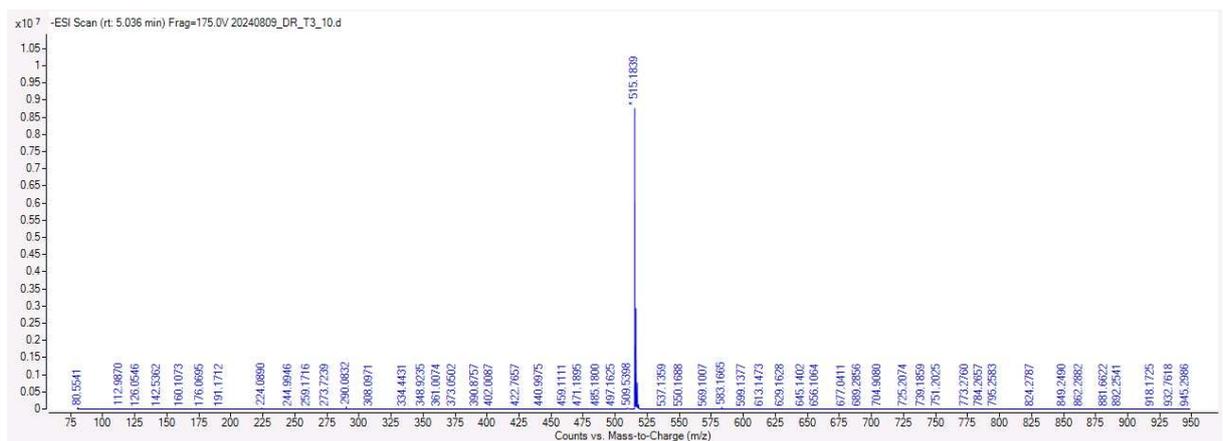


Abbildung 282 HR-ESI-Spektrum von T3S Fraktion 10.

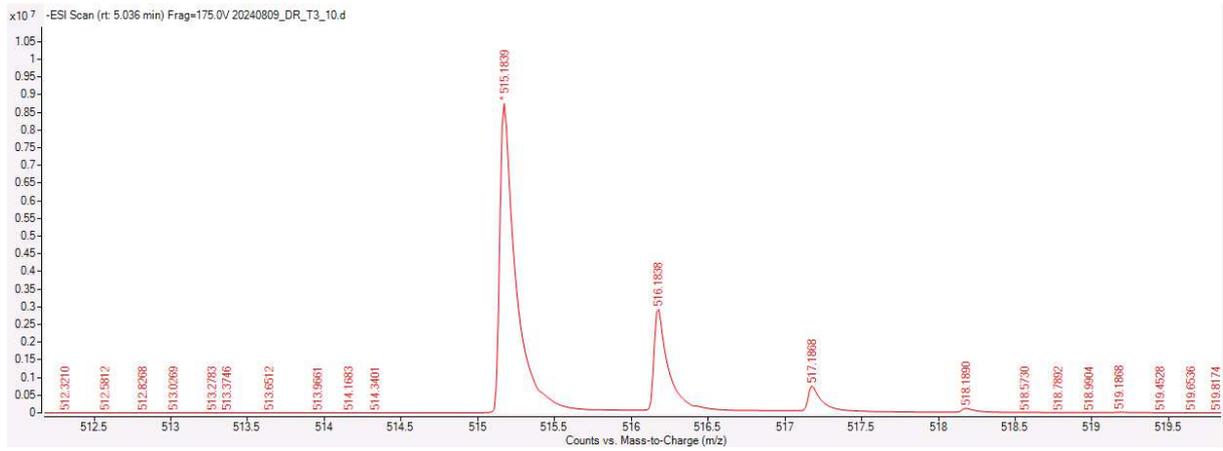


Abbildung 283 HR-ESI-Spektrum-Zoom von T3S Fraktion 10.

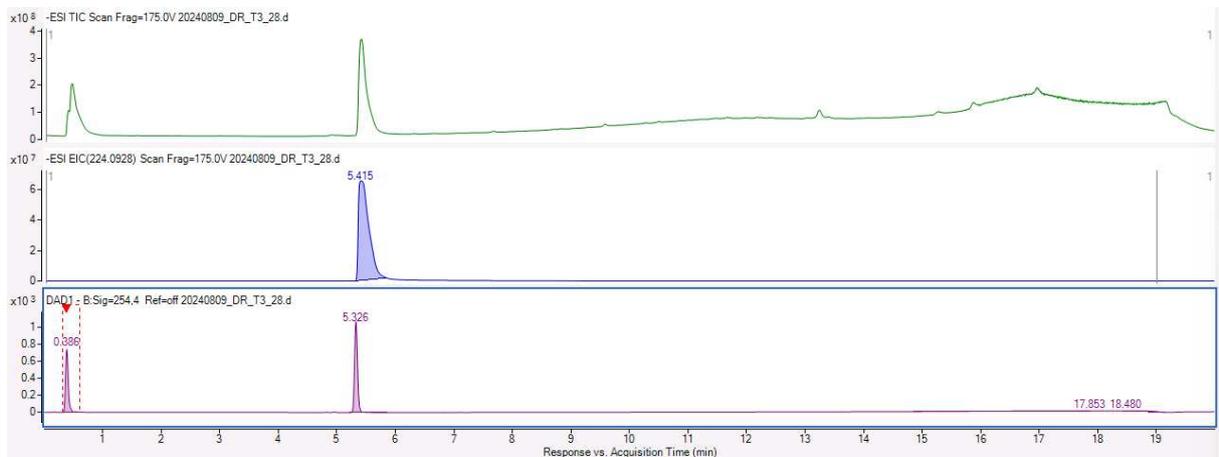


Abbildung 284 HPLC-Lauf von T3S Fraktion 28.

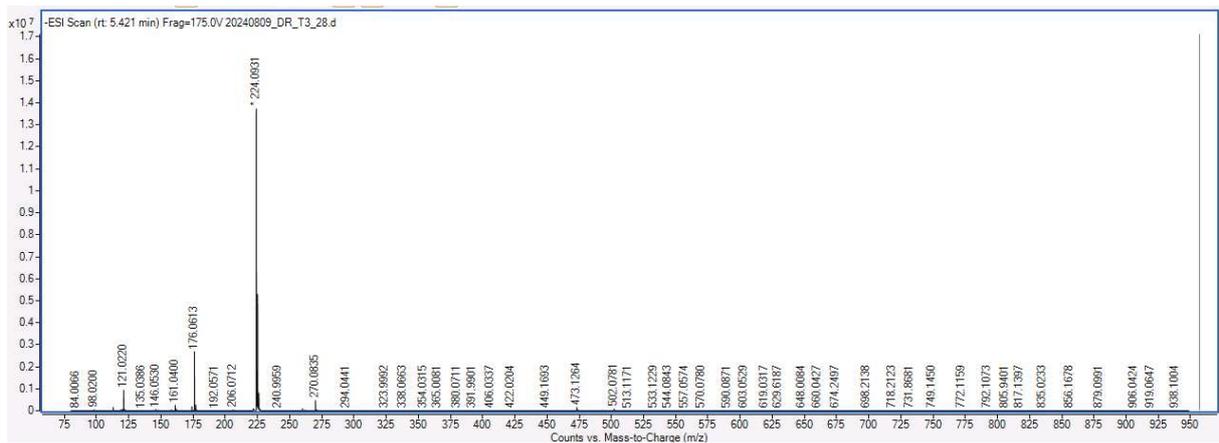


Abbildung 285 HR-ESI-Spektrum von T3S Fraktion 28.

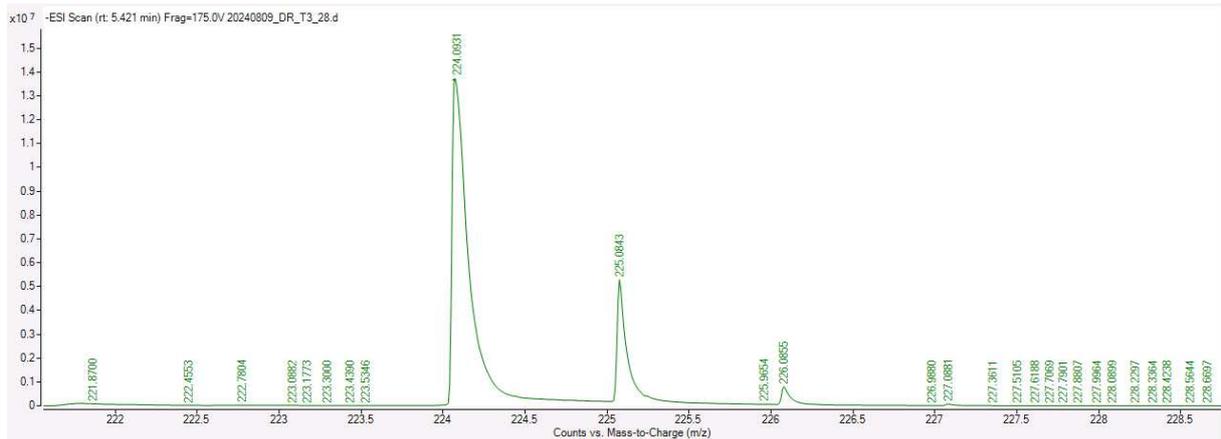


Abbildung 286 HR-ESI-Spektrum-Zoom von T3S Fraktion 28.

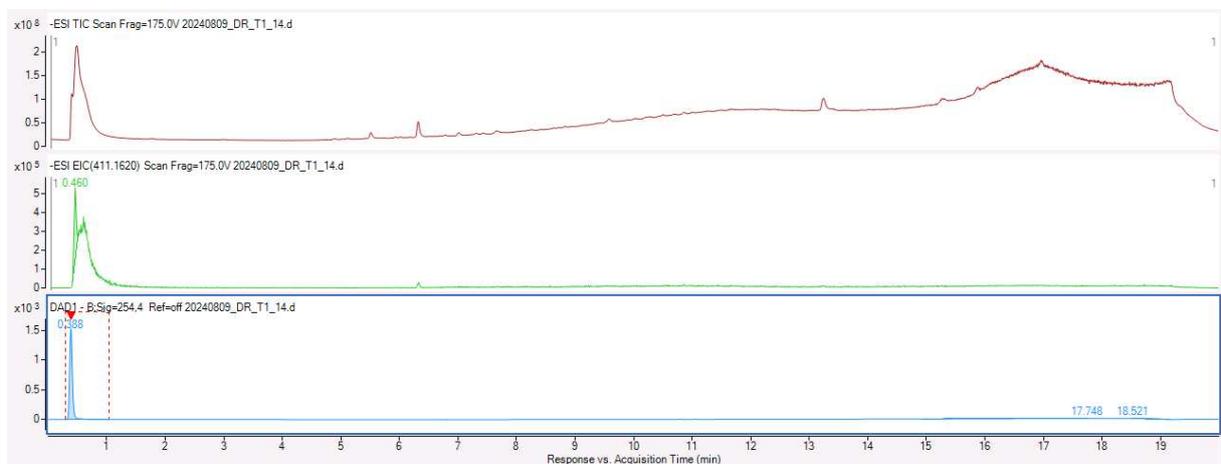


Abbildung 287 HPLC-Lauf von T1S Fraktion 14.

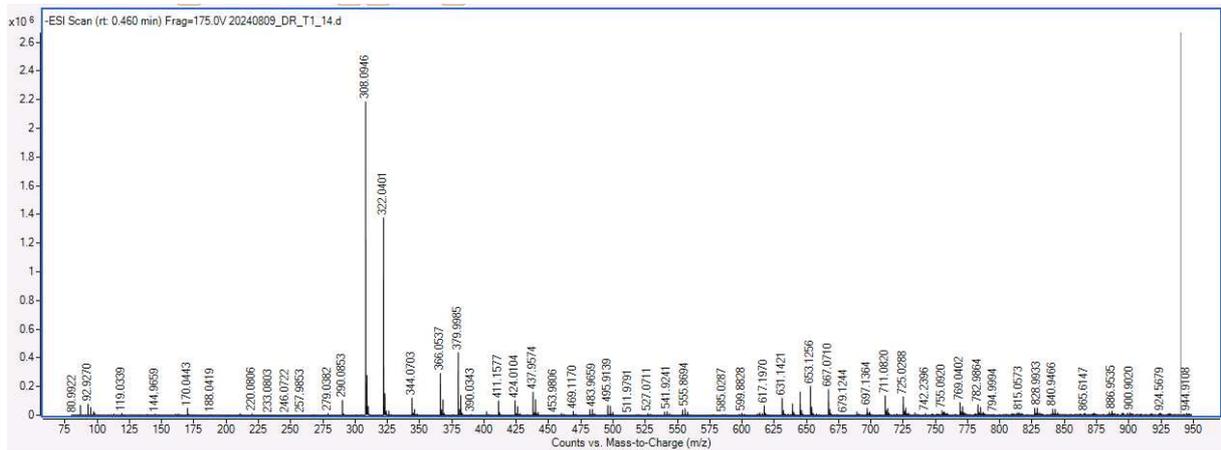


Abbildung 288 HR-ESI-Spektrum von T1S Fraktion 14.

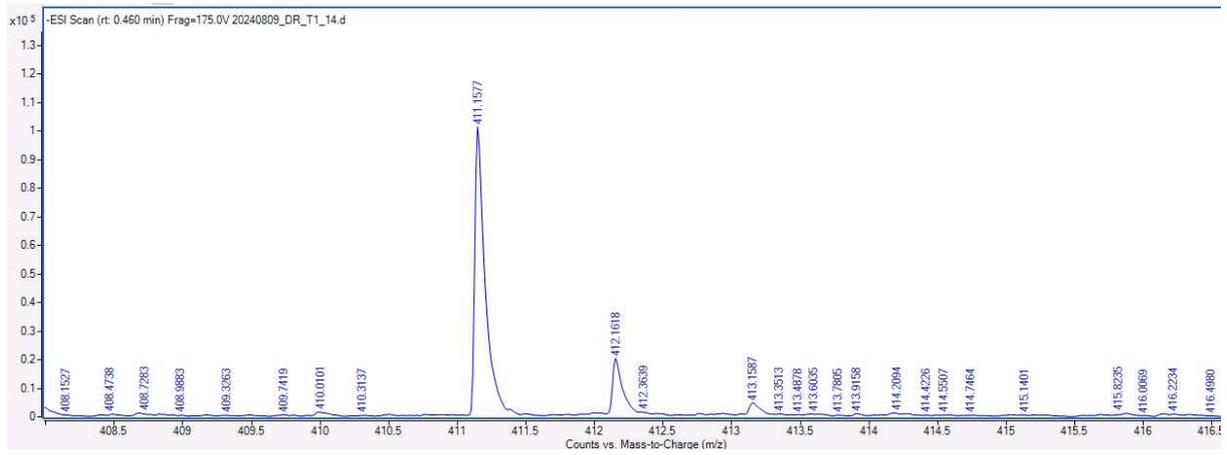


Abbildung 289 HR-ESI-Spektrum-Zoom von T1S Fraktion 14.

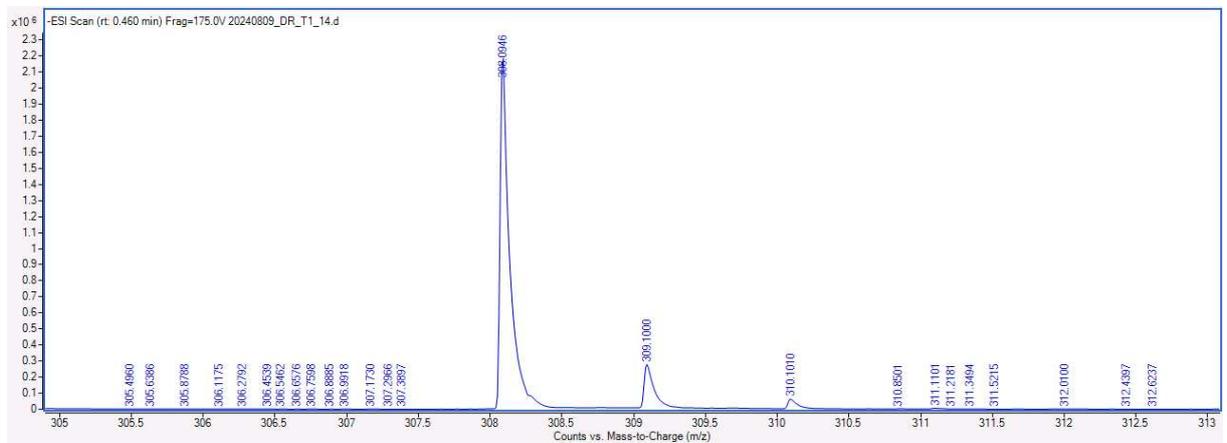


Abbildung 290 HR-ESI-Spektrum-Zoom von T1S Fraktion 14.

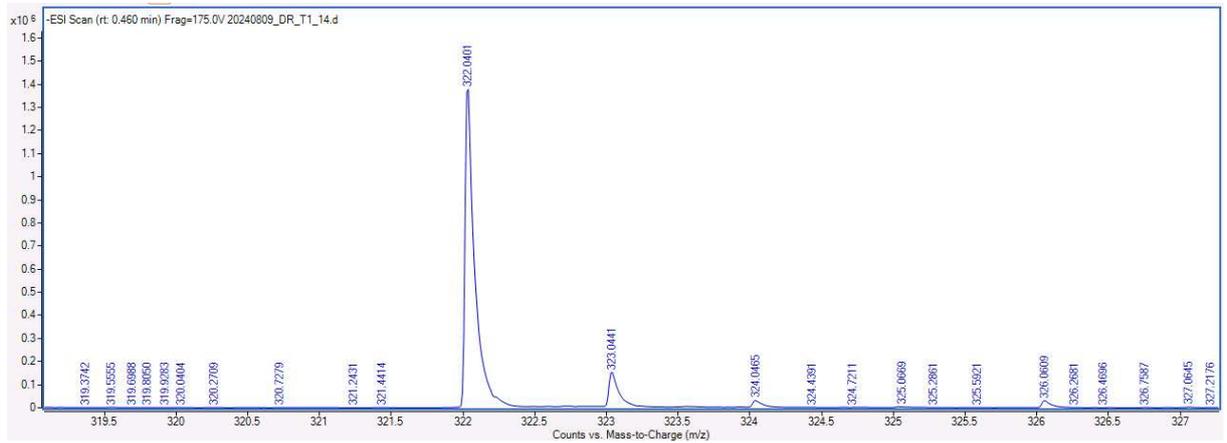


Abbildung 291 HR-ESI-Spektrum-Zoom von T1S Fraktion 21.

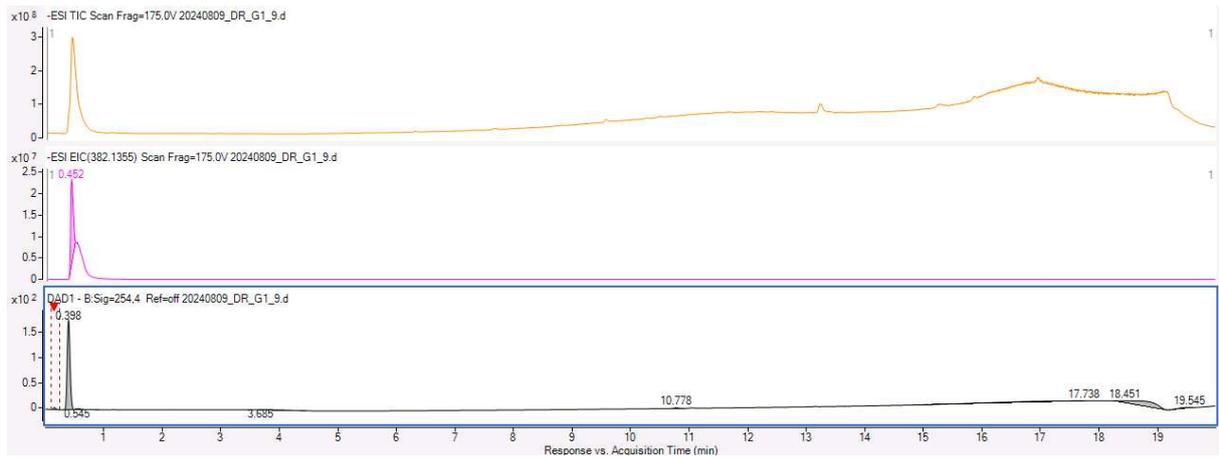


Abbildung 292 HPLC-Lauf von **G1S** Fraktion 9.

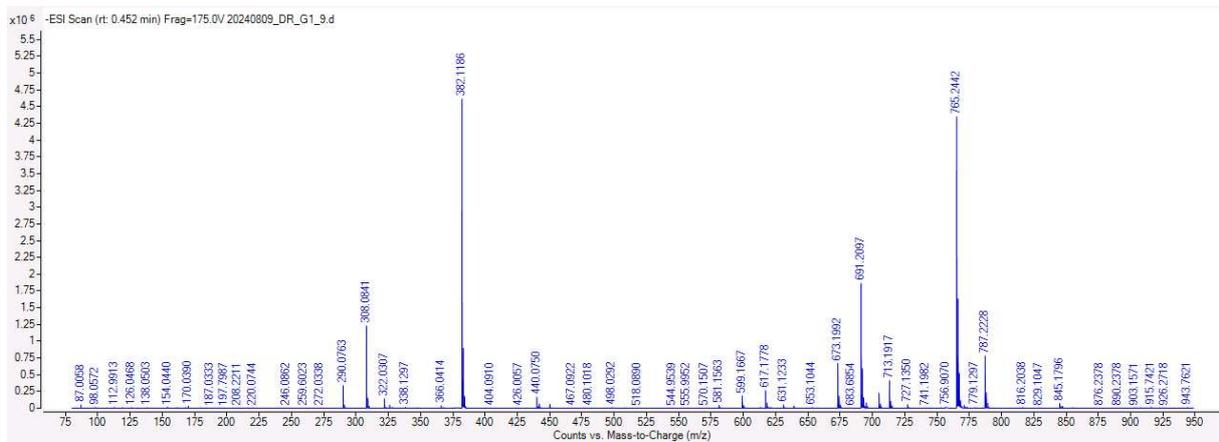


Abbildung 293 HR-ESI-Spektrum von **G1S** Fraktion 9.

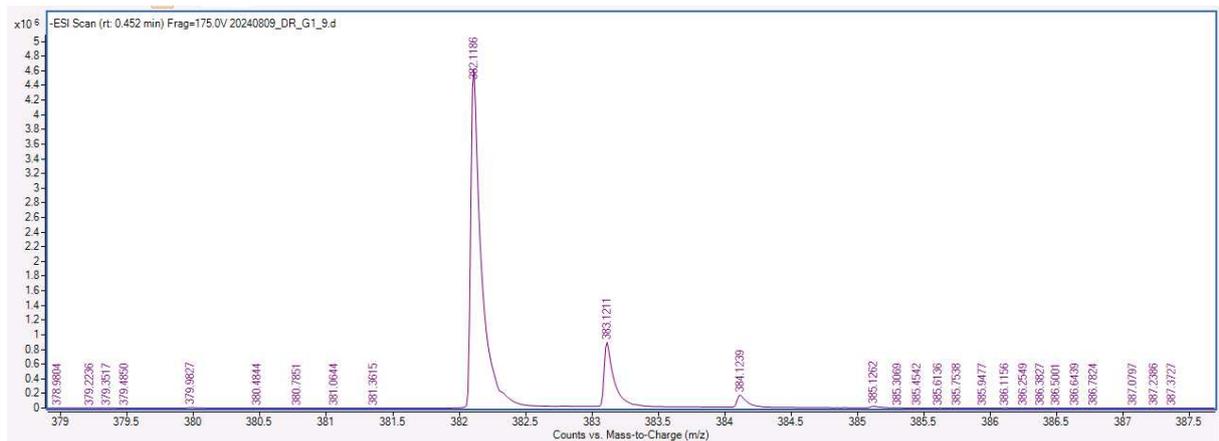


Abbildung 294 HR-ESI-Spektrum-Zoom von **G1S** Fraktion 9.

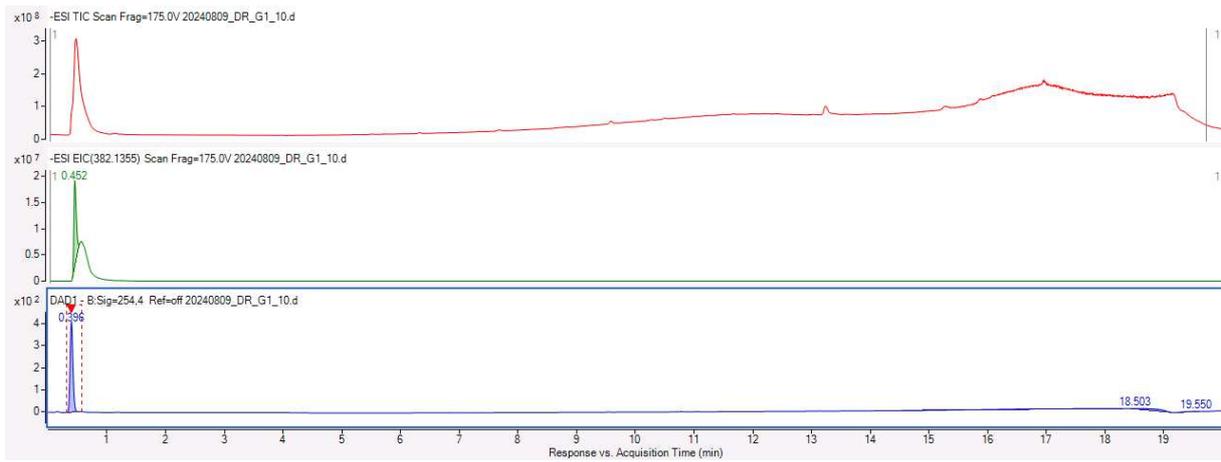


Abbildung 295 HPLC-Lauf von G1S Fraktion 10.

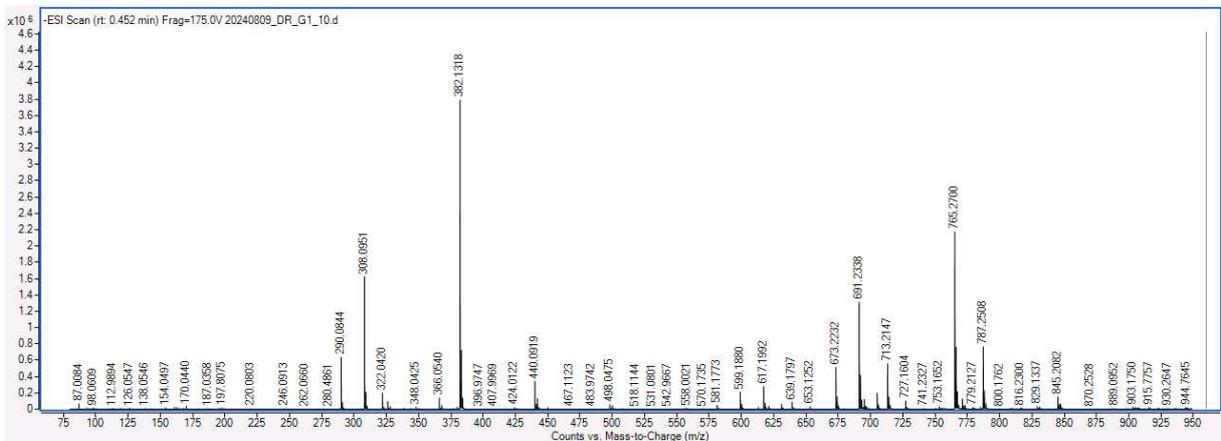


Abbildung 296 HR-ESI-Spektrum von G1S Fraktion 10.

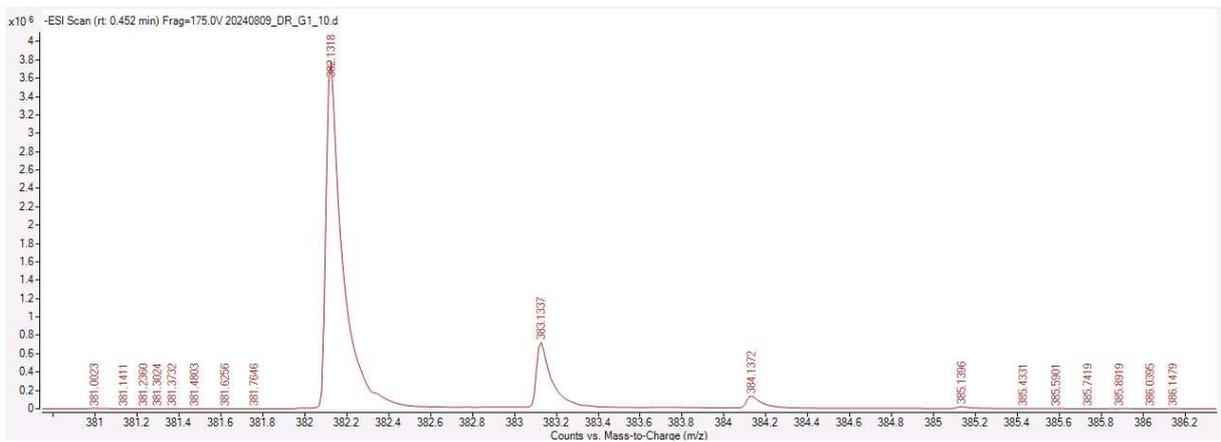


Abbildung 297 HR-ESI-Spektrum-Zoom von G1S Fraktion 10.

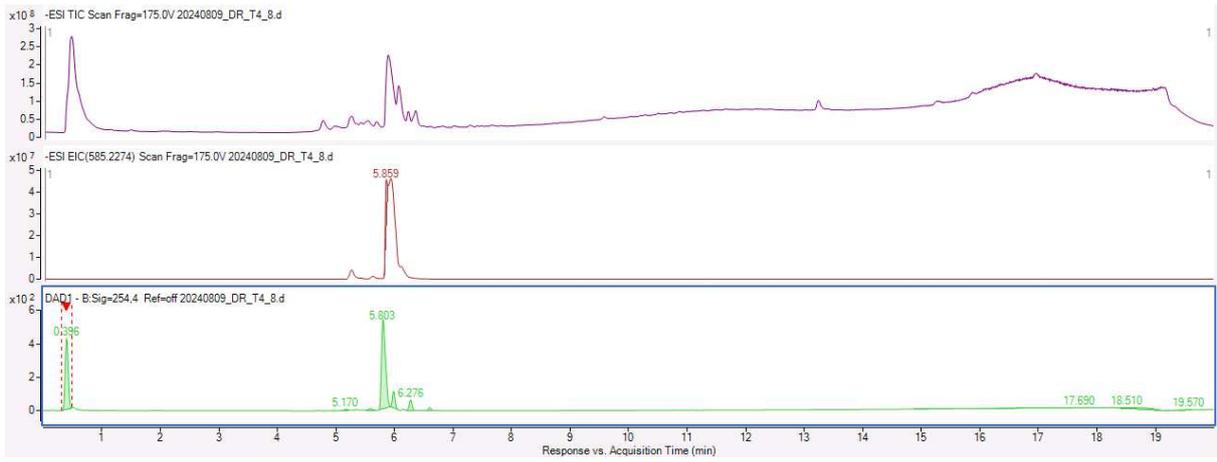


Abbildung 298 HPLC-Lauf von **T4S** Fraktion 8.

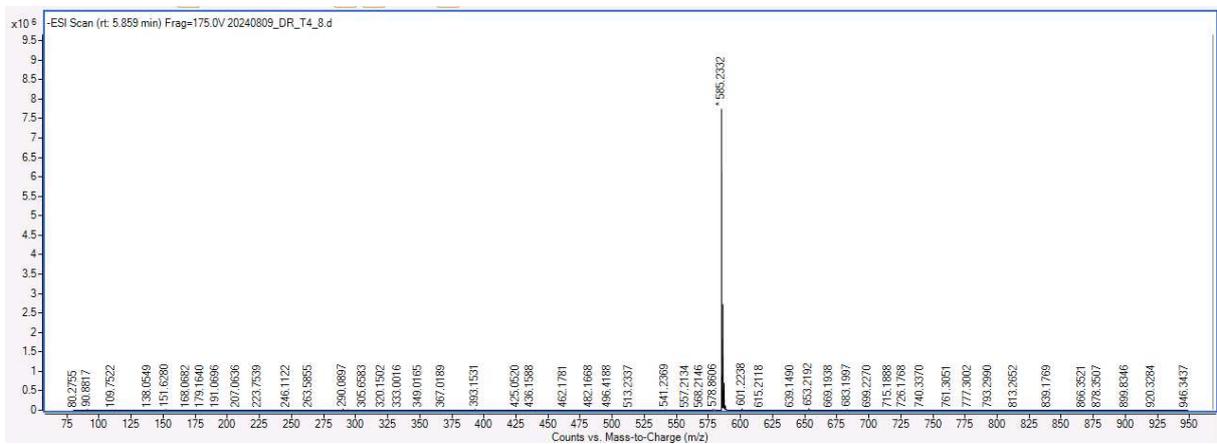


Abbildung 299 HR-ESI-Spektrum von **T4S** Fraktion 8.

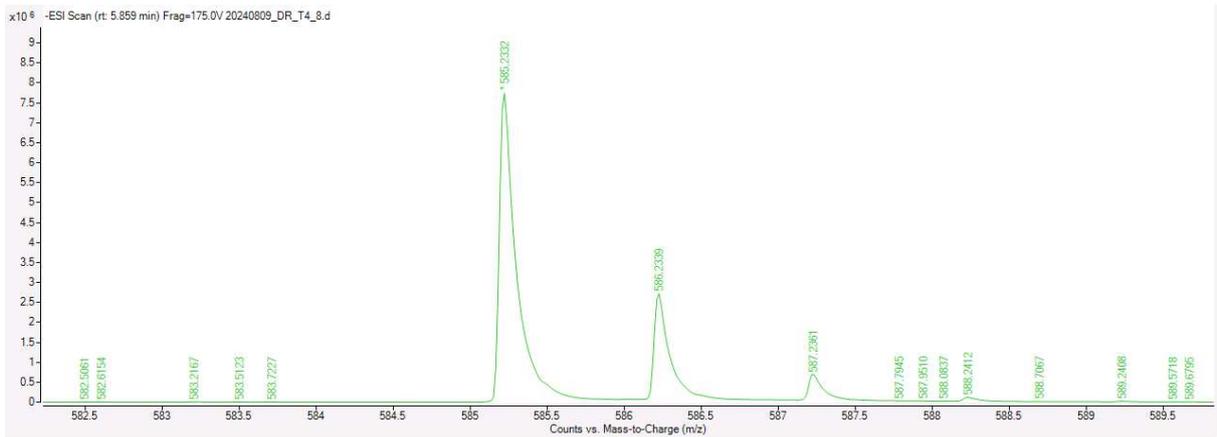


Abbildung 300 HR-ESI-Spektrum-Zoom von **T4S** Fraktion 8.

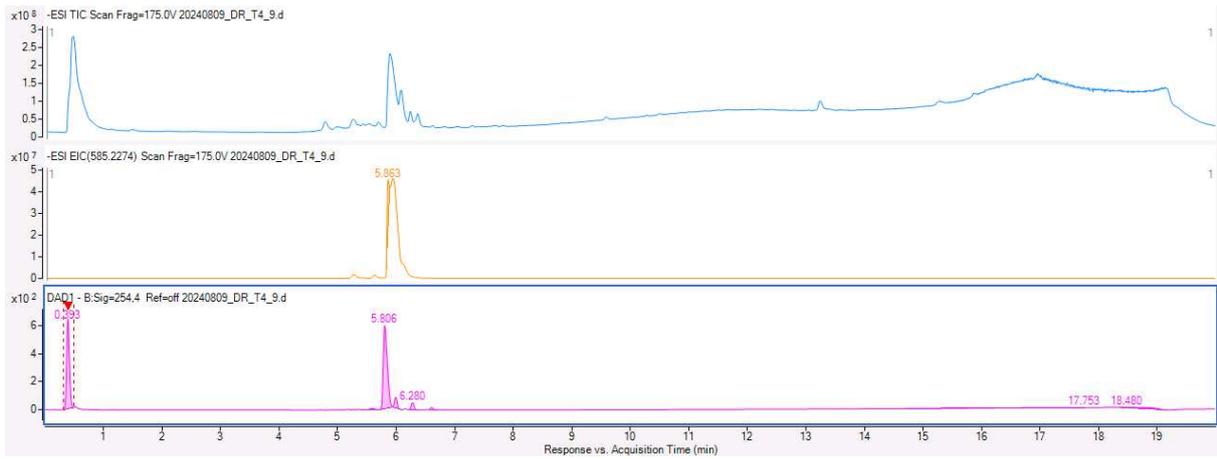


Abbildung 301 HPLC-Lauf von **T4S** Fraktion 9.

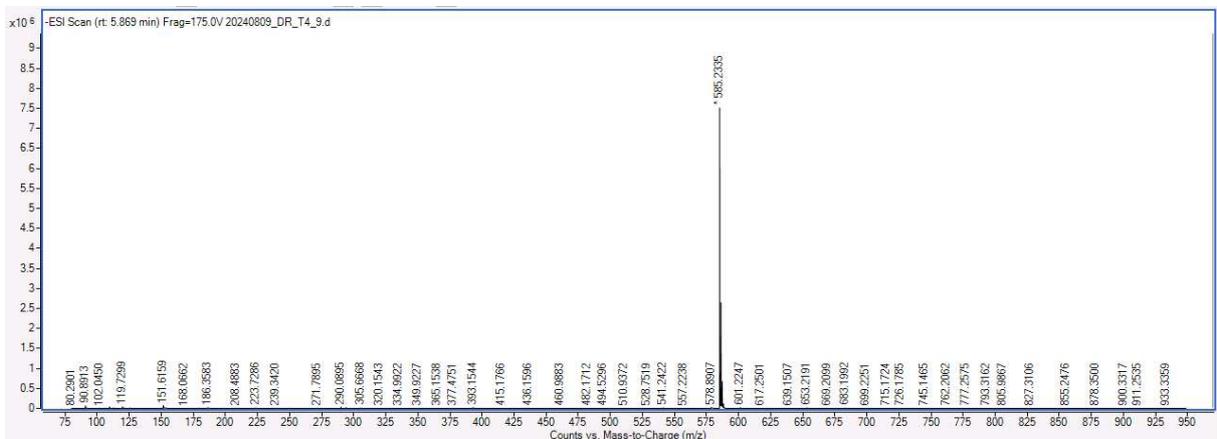


Abbildung 302 HR-ESI-Spektrum von **T4S** Fraktion 9.

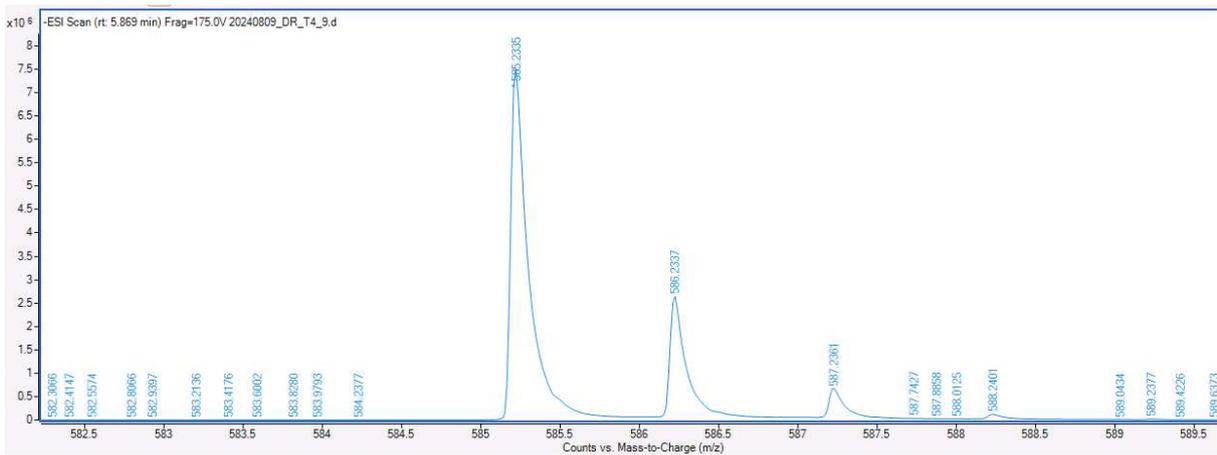


Abbildung 303 HR-ESI-Spektrum-Zoom von **T4S** Fraktion 9.

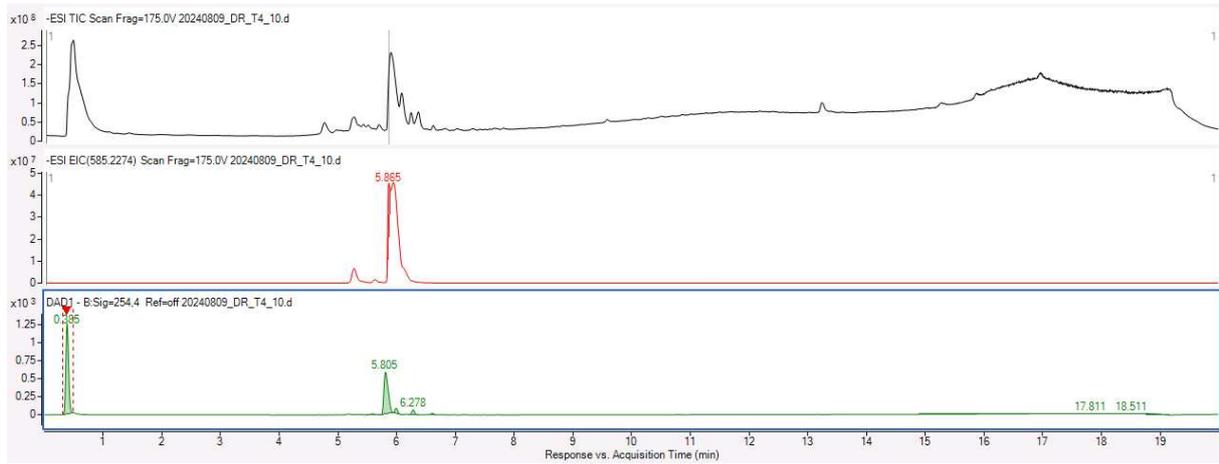


Abbildung 304 HPLC-Lauf von **T4S** Fraktion 10.

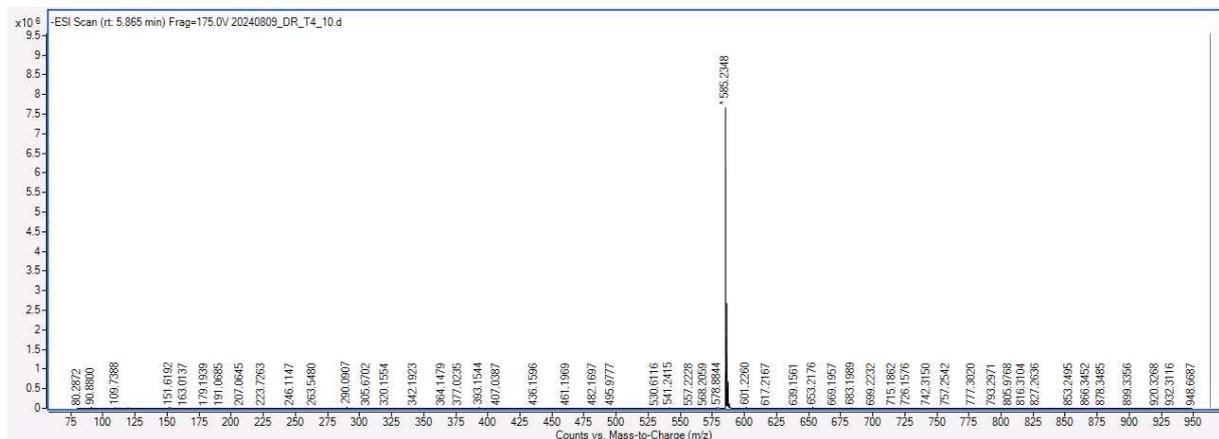


Abbildung 305 HR-ESI-Spektrum von **T4S** Fraktion 10.

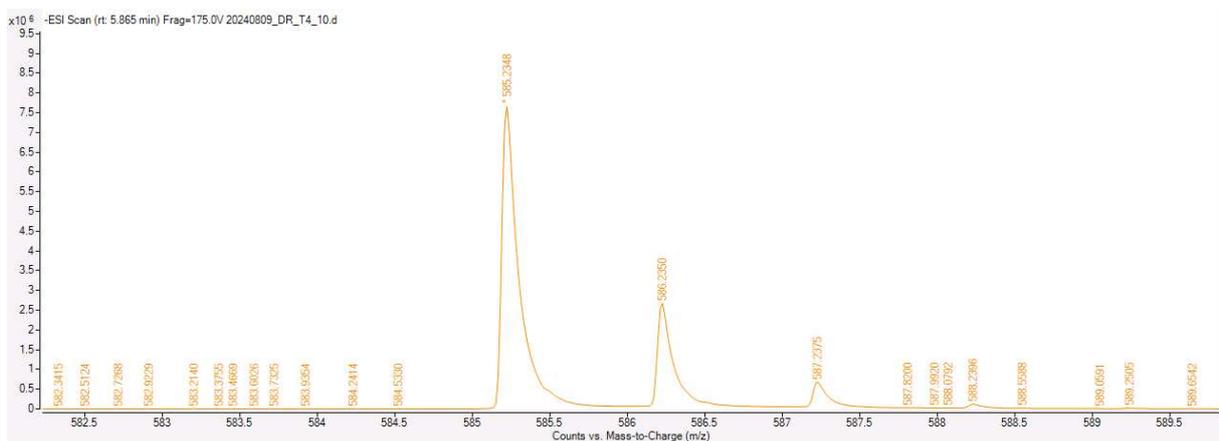


Abbildung 306 HR-ESI-Spektrum-Zoom von **T4S** Fraktion 10.

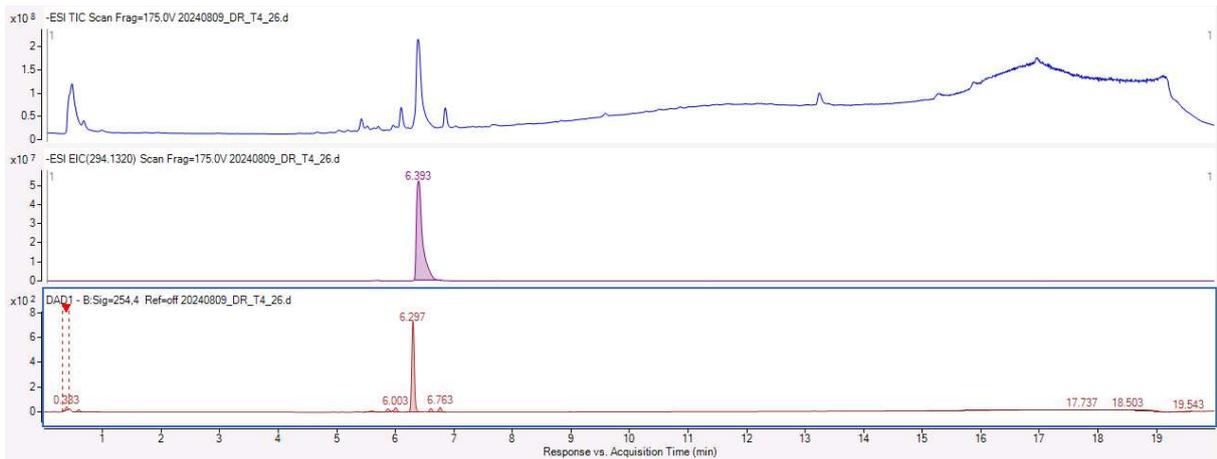


Abbildung 307 HPLC-Lauf von T4S Fraktion 26

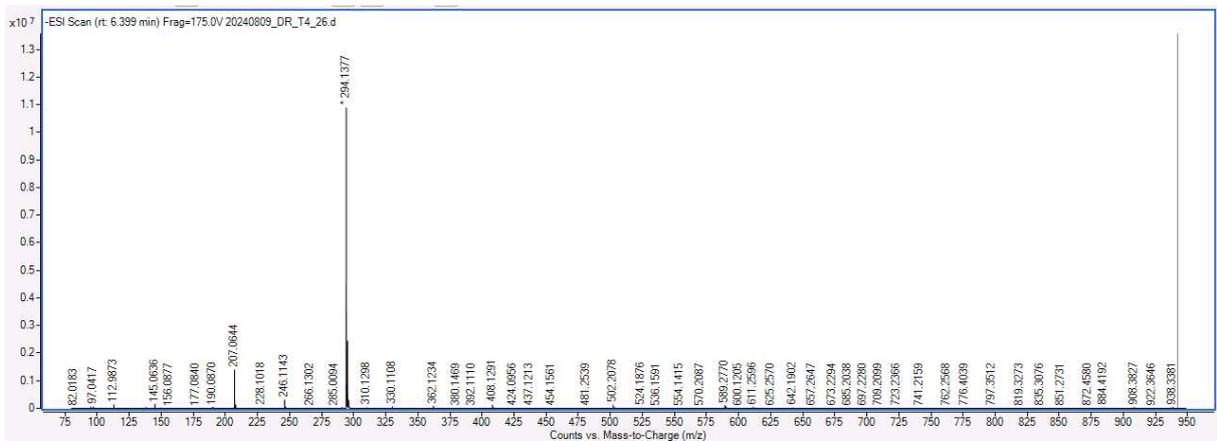


Abbildung 308 HR-ESI-Spektrum von T4S Fraktion 26.

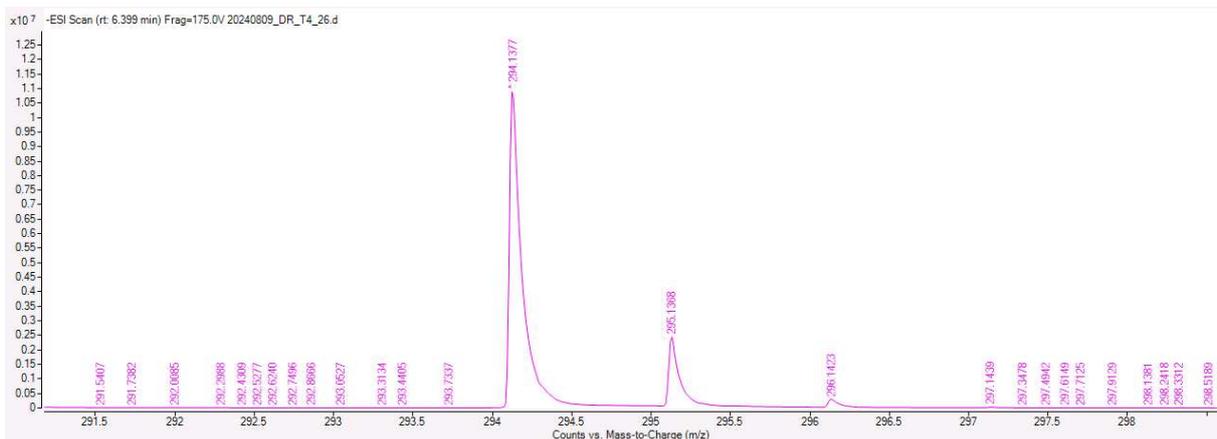


Abbildung 309 HR-ESI-Spektrum-Zoom von T4S Fraktion 26.

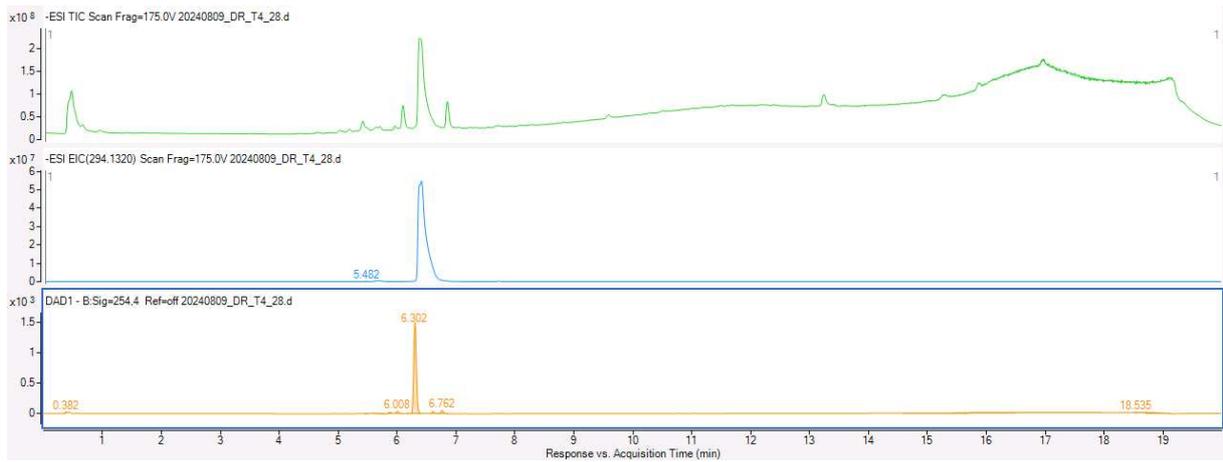


Abbildung 310 HPLC-Lauf von T4S Fraktion 28.

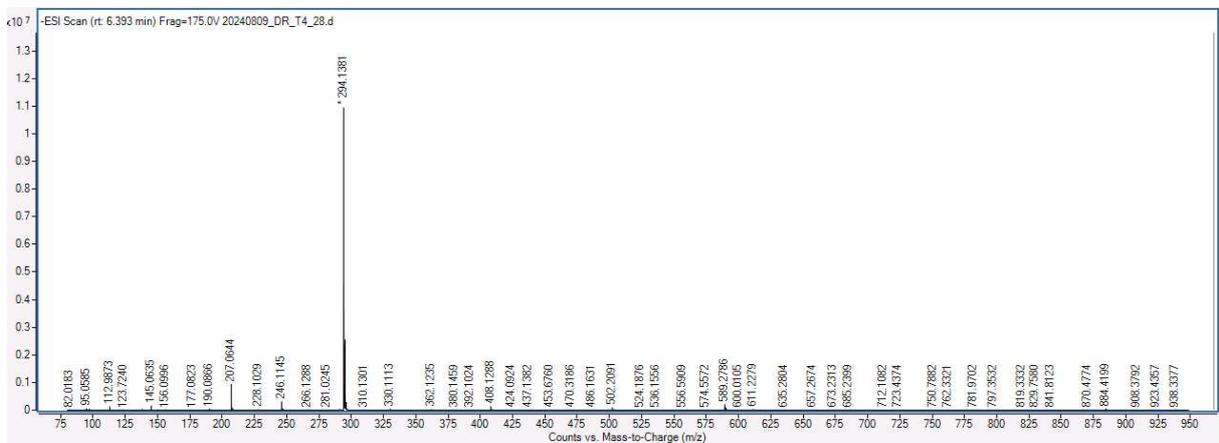


Abbildung 311 HR-ESI-Spektrum von T4S Fraktion 28.

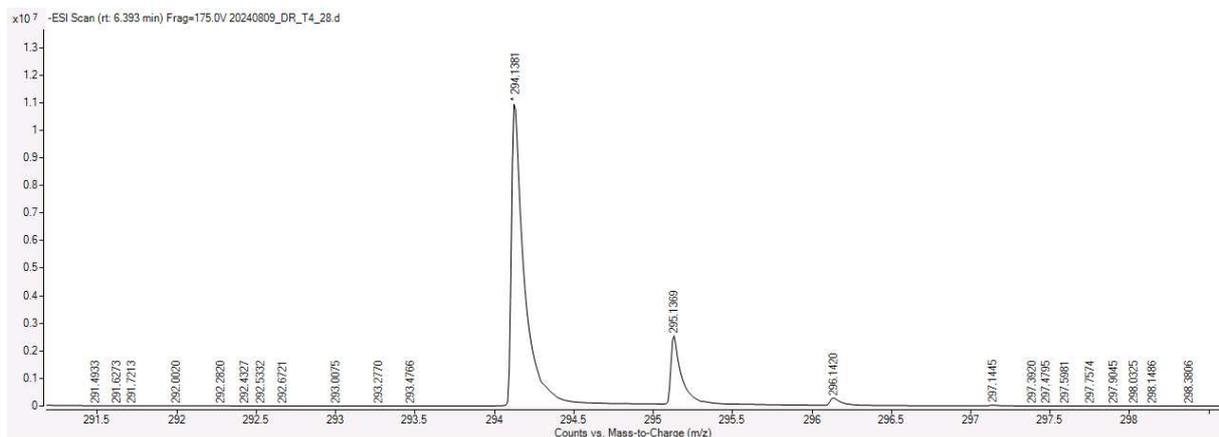


Abbildung 312 HR-ESI-Spektrum-Zoom von T4S Fraktion 28.

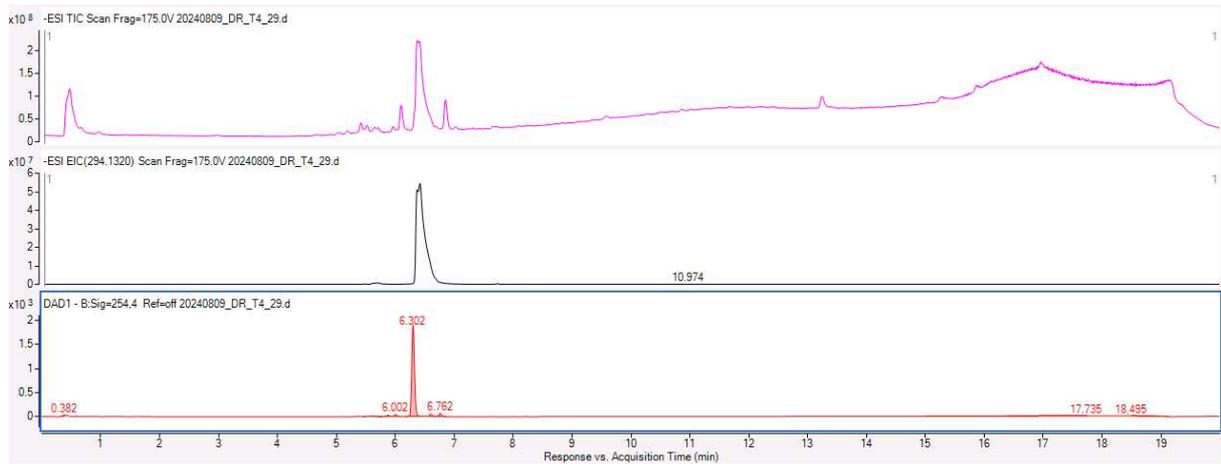


Abbildung 313 HPLC-Lauf von T4S Fraktion 29.

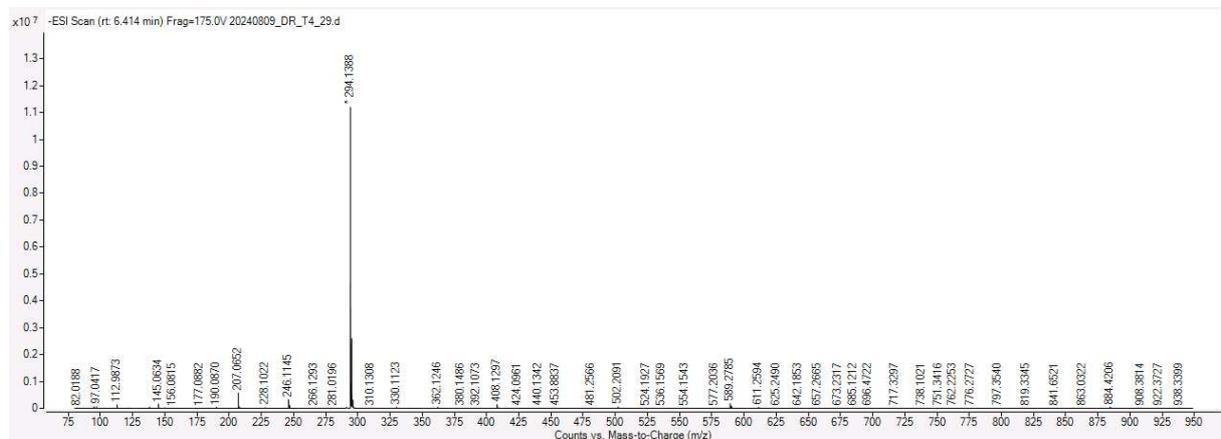


Abbildung 314 HR-ESI-Spektrum von T4S Fraktion 29.

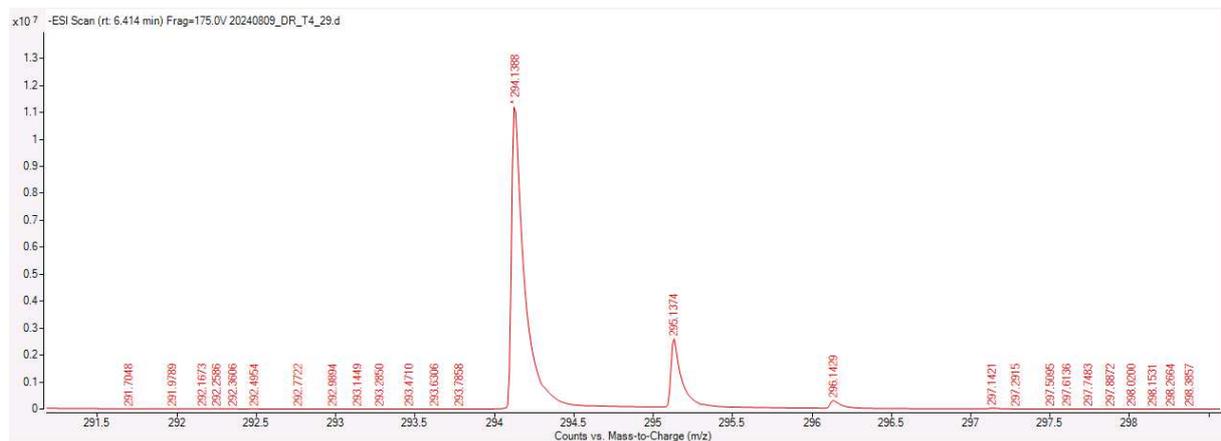


Abbildung 315 HR-ESI-Spektrum-Zoom von T4S Fraktion 29.

Fluoreszenz-Spektren

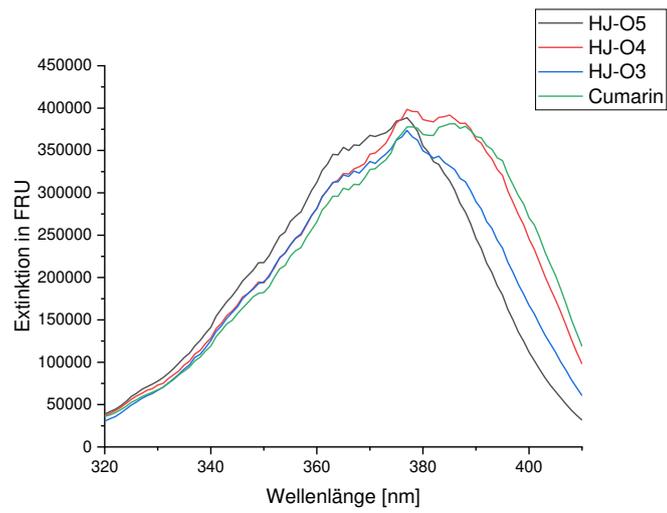


Abbildung 316 Extinctionsspektrum vom **Cumarin**farbstoff und **HJ-O3-O5**.

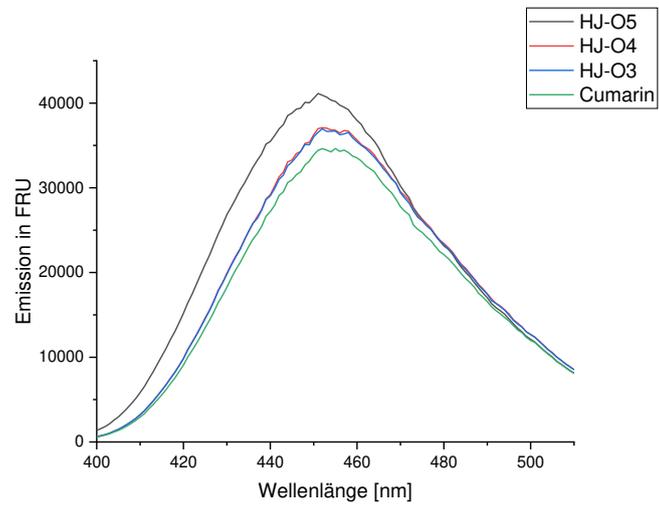


Abbildung 317 Emissionsspektrum vom **Cumarin**farbstoff und **HJ-O3-O5**.

7. Literaturverzeichnis

1. A. Martínez-Palomo, in *International Review of Cytology*, eds. G. H. Bourne, J. F. Danielli and K. W. Jeon, Academic Press, 1970, vol. 29, pp. 29-75.
2. A. Imberty and A. Varrot, *Current opinion in structural biology*, 2008, **18**, 567-576.
3. M. McKinley, M. MeKinley, E. Pennefather-O'Brien and V. D. O'Loughlin, *Human anatomy*, McGraw-Hill Education, New York, 5th edn., 2017.
4. B. Ernst and J. L. Magnani, *Nature Reviews Drug Discovery*, 2009, **8**, 661-677.
5. P. Sears and C.-H. Wong, *Angewandte Chemie International Edition*, 1999, **38**, 2300-2324.
6. S. Cecioni, A. Imberty and S. Vidal, *Chemical Reviews*, 2015, **115**, 525-561.
7. R. Schauer, *Glycoconjugate Journal*, 2000, **17**, 485-499.
8. C. Büll, M. H. den Brok and G. J. Adema, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 2014, **1846**, 238-246.
9. P. Both, M. Riese, C. J. Gray, K. Huang, E. G. Pallister, I. Kosov, L. P. Conway, J. Voglmeir and S. L. Flitsch, *Glycobiology*, 2018, **28**, 261-268.
10. A. Varki, *Trends in Molecular Medicine*, 2008, **14**, 351-360.
11. B. Wang and J. Brand-Miller, *European Journal of Clinical Nutrition*, 2003, **57**, 1351-1369.
12. U. Rutishauser, *Journal of Cellular Biochemistry*, 1998, **70**, 304-312.
13. B. E. Collins, O. Blixt, A. R. DeSieno, N. Bovin, J. D. Marth and J. C. Paulson, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004, **101**, 6104-6109.
14. B. Byrne, G. G. Donohoe and R. O'Kennedy, *Drug Discovery Today*, 2007, **12**, 319-326.
15. G. Dekan, C. Gabel and M. G. Farquhar, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991, **88**, 5398-5402.
16. H. Gelberg, L. Healy, H. Whiteley, L. A. Miller and E. Vimr, *Lab Invest*, 1996, **74**, 907-920.
17. S. Ghosh, in *Sialic Acids and Sialoglycoconjugates in the Biology of Life, Health and Disease*, ed. S. Ghosh, Academic Press, 2020, DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816126-5.00001-9>, pp. 1-61.
18. A. Varki, *Nature*, 2007, **446**, 1023-1029.
19. E. R. Vimr, K. A. Kalivoda, E. L. Deszo and S. M. Steenbergen, *Microbiol Mol Biol Rev*, 2004, **68**, 132-153.
20. T. Angata and A. Varki, *Chemical Reviews*, 2002, **102**, 439-470.
21. D. Ilver, P. Johansson, H. Miller-Podraza, P.-G. Nyholm, S. Teneberg and K.-A. Karlsson, in *Methods in Enzymology*, Academic Press, 2003, vol. 363, pp. 134-157.
22. X. Chen and A. Varki, *ACS Chemical Biology*, 2010, **5**, 163-176.
23. M. Baier, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, 2019.
24. M. J. Kiefel and M. von Itzstein, *Chemical Reviews*, 2002, **102**, 471-490.
25. I. M. E. t Hart, T. Li, M. A. Wolfert, S. Wang, K. W. Moremen and G.-J. Boons, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2019, **17**, 7304-7308.
26. R. J. Fair, H. S. Hahm and P. H. Seeberger, *Chemical Communications*, 2015, **51**, 6183-6185.
27. S. Tang, W. B. Puryear, B. M. Seifried, X. Dong, J. A. Runstadler, K. Ribbeck and B. D. Olsen, *ACS Macro Letters*, 2016, **5**, 413-418.
28. T. Matsushita, I. Nagashima, M. Fumoto, T. Ohta, K. Yamada, H. Shimizu, H. Hinou, K. Naruchi, T. Ito, H. Kondo and S.-I. Nishimura, *Journal of the American Chemical Society*, 2010, **132**, 16651-16656.
29. C. Fasting, C. A. Schalley, M. Weber, O. Seitz, S. Hecht, B. Kokschi, J. Dervedde, C. Graf, E.-W. Knapp and R. Haag, *Angewandte Chemie International Edition*, 2012, **51**, 10472-10498.
30. M. Baier, J. L. Ruppertz, M. M. Pfeleiderer, B. S. Blaum and L. Hartmann, *Chemical Communications*, 2018, **54**, 10487-10490.
31. M. Baier, N. H. Rustmeier, J. Harr, N. Cyrus, G. J. Reiss, A. Grafmüller, B. S. Blaum, T. Stehle and L. Hartmann, *Macromolecular Bioscience*, 2019, **19**, 1800426.
32. L. Bondioli, B. Ruozi, D. Belletti, F. Forni, M. A. Vandelli and G. Tosi, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2011, **8**, 921-937.
33. N. M. Varki and A. Varki, *Laboratory Investigation*, 2007, **87**, 851-857.

34. M. von Itzstein, W.-Y. Wu, G. B. Kok, M. S. Pegg, J. C. Dyason, B. Jin, T. Van Phan, M. L. Smythe, H. F. White, S. W. Oliver, P. M. Colman, J. N. Varghese, D. M. Ryan, J. M. Woods, R. C. Bethell, V. J. Hotham, J. M. Cameron and C. R. Penn, *Nature*, 1993, **363**, 418-423.
35. V. Zimmermann, H.-G. Hennemann, T. Daußmann and U. Kragl, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, **76**, 597-605.
36. A. L. Lewis, X. Chen, R. L. Schnaar and A. Varki, *Essentials of Glycobiology [Internet]. 4th edition*, 2022.
37. R. A Falconer, R. J Errington, S. D Shnyder, P. J Smith and L. H Patterson, *Current cancer drug targets*, 2012, **12**, 925-939.
38. C. Büll, T. Heise, G. J. Adema and T. J. Boltje, *Trends in Biochemical Sciences*, 2016, **41**, 519-531.
39. K. F. Boligan, C. Mesa, L. E. Fernandez and S. von Gunten, *Cellular and molecular life sciences*, 2015, **72**, 1231-1248.
40. H. Läubli and L. Borsig, *Frontiers in immunology*, 2019, **10**, 484841.
41. J. Munkley and D. J. Elliott, *Oncotarget*, 2016, **7**, 35478.
42. C. Büll, T. J. Boltje, N. Balneger, S. M. Weischer, M. Wassink, J. J. van Gemst, V. R. Bloemendal, L. Boon, J. van der Vlag, T. Heise, M. H. den Brok and G. J. Adema, *Cancer Research*, 2018, **78**, 3574-3588.
43. M. Mammen, S.-K. Choi and G. M. Whitesides, *Angewandte Chemie International Edition*, 1998, **37**, 2754-2794.
44. R. T. Lee and Y. C. Lee, *Glycoconjugate Journal*, 2000, **17**, 543-551.
45. G. Ashwell and A. G. Morell, in *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 1974, DOI: <https://doi.org/10.1002/9780470122860.ch3>, pp. 99-128.
46. Sreenath S. Andrali, Megan L. Sampley, Nathan L. Vanderford and S. Özcan, *Biochemical Journal*, 2008, **415**, 1-10.
47. R. Roy, *Current Opinion in Structural Biology*, 1996, **6**, 692-702.
48. L. L. Kiessling and N. L. Pohl, *Chemistry & biology*, 1996, **3**, 71-77.
49. S. M. Dimick, S. C. Powell, S. A. McMahon, D. N. Moothoo, J. H. Naismith and E. J. Toone, *Journal of the American Chemical Society*, 1999, **121**, 10286-10296.
50. J. J. Lundquist and E. J. Toone, *Chemical Reviews*, 2002, **102**, 555-578.
51. G. Schwarzenbach, *Helvetica Chimica Acta*, 1952, **35**, 2344-2359.
52. M. I. Page and W. P. Jencks, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1971, **68**, 1678-1683.
53. R. J. Pieters, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2009, **7**, 2013-2025.
54. T. K. Dam and C. F. Brewer, *Biochemistry*, 2008, **47**, 8470-8476.
55. W. J. Lees, A. Spaltenstein, J. E. Kingery-Wood and G. M. Whitesides, *Journal of Medicinal Chemistry*, 1994, **37**, 3419-3433.
56. G. B. Sigal, M. Mammen, G. Dahmann and G. M. Whitesides, *Journal of the American Chemical Society*, 1996, **118**, 3789-3800.
57. M. Mammen, G. Dahmann and G. M. Whitesides, *Journal of medicinal chemistry*, 1995, **38**, 4179-4190.
58. P. Compain, *Molecules*, 2018, **23**, 1658.
59. J. E. Gestwicki, C. W. Cairo, L. E. Strong, K. A. Oetjen and L. L. Kiessling, *Journal of the American Chemical Society*, 2002, **124**, 14922-14933.
60. C. R. Becer, *Macromolecular Rapid Communications*, 2012, **33**, 742-752.
61. L. L. Kiessling, J. E. Gestwicki and L. E. Strong, *Angewandte Chemie International Edition*, 2006, **45**, 2348-2368.
62. M. Okada, *Progress in Polymer Science*, 2001, **26**, 67-104.
63. S. Toraskar, M. Gade, S. Sangabathuni, H. V. Thulasiram and R. Kikkeri, *ChemMedChem*, 2017, **12**, 1116-1124.
64. L. L. Kiessling, T. Young, T. D. Gruber and K. H. Mortell, in *Glycoscience: Chemistry and Chemical Biology*, eds. B. O. Fraser-Reid, K. Tatsuta and J. Thiem, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2008, DOI: 10.1007/978-3-540-30429-6_64, pp. 2483-2523.

65. H. Staudinger, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)*, 1920, **53**, 1073-1085.
66. M. D. Lechner, K. Gehrke and E. H. Nordmeier, *Makromolekulare Chemie*, Springer, 2003.
67. P. C. Painter and M. M. Coleman, (*No Title*), 1997.
68. N. G. McCrum, C. P. Buckley and C. B. Bucknall, *Principles of polymer engineering*, Oxford University Press, 1997.
69. R. C. King, P. K. Mulligan and W. D. Stansfield, *A Dictionary of Genetics*, Oxford University Press, 2014.
70. I. W. Hamley, *Introduction to peptide science*, John Wiley & Sons, 2020.
71. P. Butterworth, *Cell Biochemistry and Function - CELL BIOCHEM FUNCT*, 2005, **23**, 293-294.
72. A. Saberi, H. R. Bakhsheshi-Rad, S. Abazari, A. F. Ismail, S. Sharif, S. Ramakrishna, M. Daroonparvar and F. Berto, *Coatings*, 2021, **11**, 747.
73. P. International Union of and C. Applied, DOI: 10.1351/goldbook.P04898.
74. V. Admiral, E. Melia and D. M. Haddleton, *European Polymer Journal*, 2004, **40**, 431-449.
75. B. Voit and D. Appelhans, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 2010, **211**, 727-735.
76. C. Gonnot, M. Scalabrini, B. Roubinet, C. Ziane, F. Boeda, D. Deniaud, L. Landemarre, S. G. Gouin, L. Fontaine and V. Montembault, *Biomacromolecules*, 2023, **24**, 3689-3699.
77. D. Ponader, F. Wojcik, F. Beceren-Braun, J. Dervede and L. Hartmann, *Biomacromolecules*, 2012, **13**, 1845-1852.
78. R. B. Merrifield, *Journal of the American Chemical Society*, 1963, **85**, 2149-2154.
79. S. A. Hill, R. Steinfort and L. Hartmann, *Polymer Chemistry*, 2021, **12**, 4439-4450.
80. F. Wojcik, S. Mosca and L. Hartmann, *The Journal of Organic Chemistry*, 2012, **77**, 4226-4234.
81. F. Wojcik, A. G. O'Brien, S. Götze, P. H. Seeberger and L. Hartmann, *Chemistry – A European Journal*, 2013, **19**, 3090-3098.
82. D. Ponader, S. Igde, M. Wehle, K. Märker, M. Santer, D. Bléger and L. Hartmann, *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 2014, **10**, 1603-1612.
83. T. Freichel, S. Eierhoff, N. L. Snyder and L. Hartmann, *The Journal of Organic Chemistry*, 2017, **82**, 9400-9409.
84. S. Boden, K. G. Wagner, M. Karg and L. Hartmann, *Polymers*, 2017, **9**, 716.
85. C. Gerke, M. F. Ebbesen, D. Jansen, S. Boden, T. Freichel and L. Hartmann, *Biomacromolecules*, 2017, **18**, 787-796.
86. M. D. Illmann, L. Schäfl, F. Drees, L. Hartmann and S. Schmidt, *Biomacromolecules*, 2023, **24**, 2532-2540.
87. P. Pasch, A. Höing, S. Ueclue, M. Killa, J. Voskuhl, S. K. Knauer and L. Hartmann, *Chemical Communications*, 2021, **57**, 3091-3094.
88. P. Pasch, M. Killa, H. L. Junghans, M. Schmidt, S. Schmidt, J. Voskuhl and L. Hartmann, *Chemistry – A European Journal*, 2021, **27**, 10186-10192.
89. B. Merrifield, in *Methods in Enzymology*, Academic Press, 1997, vol. 289, pp. 3-13.
90. B. Castro, J. R. Dormoy, G. Evin and C. Selve, *Tetrahedron Letters*, 1975, **16**, 1219-1222.
91. J. Coste, D. Le-Nguyen and B. Castro, *Tetrahedron Letters*, 1990, **31**, 205-208.
92. T. I. Al-Warhi, H. M. Al-Hazimi and A. El-Faham, *Journal of Saudi Chemical Society*, 2012, **16**, 97-116.
93. M. Bergmann and L. Zervas, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)*, 1932, **65**, 1192-1201.
94. R. Behrendt, P. White and J. Offer, *Journal of Peptide Science*, 2016, **22**, 4-27.
95. L. Cameron, M. Meldal and R. C. Sheppard, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1987, DOI: 10.1039/C39870000270, 270-272.
96. R. Holliday, *Genetical Research*, 1964, **5**, 282-304.
97. A. Mehta and J. E. Haber, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2014, **6**, a016428.
98. N. Sigal and B. Alberts, *Journal of Molecular Biology*, 1972, **71**, 789-793.
99. A. I. H. Murchie, R. M. Clegg, E. v. Krtzing, D. R. Duckett, S. Diekmann and D. M. J. Lilley, *Nature*, 1989, **341**, 763-766.
100. A. N. Elayadi, D. A. Braasch and D. R. Corey, *Biochemistry*, 2002, **41**, 9973-9981.

101. M. Frieden, H. F. Hansen and T. Koch, *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 2003, **22**, 1041-1043.
102. J. Kurreck, E. Wyszko, C. Gillen and V. A. Erdmann, *Nucleic Acids Research*, 2002, **30**, 1911-1918.
103. S. Obika, D. Nanbu, Y. Hari, K.-i. Morio, Y. In, T. Ishida and T. Imanishi, *Tetrahedron Letters*, 1997, **38**, 8735-8738.
104. R. N. Veedu, B. Vester and J. Wengel, *ChemBioChem*, 2007, **8**, 490-492.
105. V. L. Andersen, M. Vinther, R. Kumar, A. Ries, J. Wengel, J. S. Nielsen and J. Kjems, *Theranostics*, 2019, **9**, 2662-2677.
106. C. Mao, *PLoS Biology*, 2004, **2**, e431.
107. K. Pan, D.-N. Kim, F. Zhang, M. R. Adendorff, H. Yan and M. Bathe, *Nature Communications*, 2014, **5**, 5578.
108. C. R. Bertozzi, *Accounts of Chemical Research*, 2011, **44**, 651-653.
109. M. Baier, M. Giesler and L. Hartmann, *Chemistry – A European Journal*, 2018, **24**, 1619-1630.
110. X. Wang, F. Schmidt, D. Hanaor, P. H. Kamm, S. Li and A. Gurlo, *Additive Manufacturing*, 2019, **27**, 80-90.
111. L. Liang and D. Astruc, *Coordination Chemistry Reviews*, 2011, **255**, 2933-2945.
112. F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V. V. Rostovtsev, L. Noodleman, K. B. Sharpless and V. V. Fokin, *Journal of the American Chemical Society*, 2005, **127**, 210-216.
113. Y. Özkılıç and N. Ş. Tüzün, *Organometallics*, 2016, **35**, 2589-2599.
114. C. Iacobucci, S. Reale, J.-F. Gal and F. De Angelis, *Angewandte Chemie International Edition*, 2015, **54**, 3065-3068.
115. V. O. Rodionov, V. V. Fokin and M. G. Finn, *Angewandte Chemie International Edition*, 2005, **44**, 2210-2215.
116. W. S. Brotherton, H. A. Michaels, J. T. Simmons, R. J. Clark, N. S. Dalal and L. Zhu, *Organic Letters*, 2009, **11**, 4954-4957.
117. G.-C. Kuang, H. A. Michaels, J. T. Simmons, R. J. Clark and L. Zhu, *The Journal of Organic Chemistry*, 2010, **75**, 6540-6548.
118. K. Alder, G. Stein and H. Finzenhagen, *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 1931, **485**, 211-222.
119. G. Wittig and A. Krebs, *Chemische Berichte*, 1961, **94**, 3260-3275.
120. N. J. Agard, J. M. Baskin, J. A. Prescher, A. Lo and C. R. Bertozzi, *ACS Chemical Biology*, 2006, **1**, 644-648.
121. L. L. Lairson, B. Henrissat, G. J. Davies and S. G. Withers, *Annual Review of Biochemistry*, 2008, **77**, 521-555.
122. M. E. Taylor and K. Drickamer, *Introduction to glycobiology*, Oxford University Press, USA, 2011.
123. M. Gilbert, D. C. Watson and W. W. Wakarchuk, *Biotechnology Letters*, 1997, **19**, 417-420.
124. G. Samuel and P. Reeves, *Carbohydrate Research*, 2003, **338**, 2503-2519.
125. M. L. Sinnott, *Chemical Reviews*, 1990, **90**, 1171-1202.
126. P. B. Konietzny, H. Peters, M. L. Hofer, U. I. M. Gerling-Driessen, R. P. de Vries, T. Peters and L. Hartmann, *Macromolecular Bioscience*, 2022, **22**, 2200358.
127. H. Yu, S. Huang, H. Chokhawala, M. Sun, H. Zheng and X. Chen, *Angewandte Chemie International Edition*, 2006, **45**, 3938-3944.
128. H. Yu, J. Cheng, L. Ding, Z. Khedri, Y. Chen, S. Chin, K. Lau, V. K. Tiwari and X. Chen, *Journal of the American Chemical Society*, 2009, **131**, 18467-18477.
129. G. Sugiarto, K. Lau, J. Qu, Y. Li, S. Lim, S. Mu, J. B. Ames, A. J. Fisher and X. Chen, *ACS Chemical Biology*, 2012, **7**, 1232-1240.
130. J. B. McArthur, H. Yu, J. Zeng and X. Chen, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2017, **15**, 1700-1709.
131. Y. Xu, Y. Fan, J. Ye, F. Wang, Q. Nie, L. Wang, P. G. Wang, H. Cao and J. Cheng, *ACS Catalysis*, 2018, **8**, 7222-7227.
132. S.-I. HAKOMORI, *The Journal of Biochemistry*, 1964, **55**, 205-208.
133. I. Ciucanu and F. Kerek, *Carbohydrate research*, 1984, **131**, 209-217.

134. T. SCIENTIFIC, *Journal*, 2023.
135. A. Striegel, W. W. Yau, J. J. Kirkland and D. D. Bly, *Modern size-exclusion liquid chromatography: practice of gel permeation and gel filtration chromatography*, John Wiley & Sons, 2009.
136. H. A. Chokhawala, H. Cao, H. Yu and X. Chen, *Journal of the American Chemical Society*, 2007, **129**, 10630-10631.
137. K. Neuhaus, E.-C. Wamhoff, T. Freichel, A. Grafmüller, C. Rademacher and L. Hartmann, *Biomacromolecules*, 2019, **20**, 4088-4095.
138. T. F. SCIENTIFIC, Fluorescence Spectra Viewer, <https://www.thermofisher.com/order/fluorescence-spectraviewer/#/>, (accessed 16.09.2024, 2024).
139. D. J. Maly, F. Leonetti, B. J. Backes, D. S. Dauber, J. L. Harris, C. S. Craik and J. A. Ellman, *The Journal of Organic Chemistry*, 2002, **67**, 910-915.
140. H. Feng, M. Shuda, Y. Chang and P. S. Moore, *Science*, 2008, **319**, 1096-1100.
141. J. Kaae, A. V. Hansen, R. J. Biggar, H. A. Boyd, P. S. Moore, J. Wohlfahrt and M. Melbye, *Journal of the National Cancer Institute*, 2010, **102**, 793-801.
142. B. Lemos and P. Nghiem, *Journal of Investigative Dermatology*, 2007, **127**, 2100-2103.
143. J. M. Kean, S. Rao, M. Wang and R. L. Garcea, *PLoS Pathogens*, 2009, **5**, e1000363.
144. Y. L. Tolstov, D. V. Pastrana, H. Feng, J. C. Becker, F. J. Jenkins, S. Moschos, Y. Chang, C. B. Buck and P. S. Moore, *International Journal of Cancer*, 2009, **125**, 1250-1256.
145. M. Sapp and P. M. Day, *Virology*, 2009, **384**, 400-409.
146. R. M. Schowalter, D. V. Pastrana and C. B. Buck, *PLoS pathogens*, 2011, **7**, e1002161.
147. C. D. Gutsche and R. Muthukrishnan, *The Journal of Organic Chemistry*, 1978, **43**, 4905-4906.
148. H. N. Kwang and C. D. Gutsche, *The Journal of Organic Chemistry*, 1982, **47**, 2713-2719.
149. C. D. Gutsche, B. Dhawan, K. H. No and R. Muthukrishnan, *Journal of the American Chemical Society*, 1981, **103**, 3782-3792.
150. V. Böhmer, *Angewandte Chemie*, 1995, **107**, 785-818.
151. S. E. Matthews, *Calixarenes and Beyond*, 2016, 559-600.
152. C. D. Gutsche, J. A. Levine and P. Sujeeth, *The Journal of Organic Chemistry*, 1985, **50**, 5802-5806.
153. F. Arnaud-Neu, E. M. Collins, M. Deasy, G. Ferguson, S. J. Harris, B. Kaitner, A. J. Lough, M. A. McKerverey and E. Marques, *Journal of the American Chemical Society*, 1989, **111**, 8681-8691.
154. C. D. Gutsche and L.-G. Lin, *Tetrahedron*, 1986, **42**, 1633-1640.
155. A. Arduini and A. Pochini, *Tetrahedron*, 1986, **7**, 2089.
156. A. Yaman, Bachelorarbeit, HHU Düsseldorf, 2021.