

Untersuchungen über die molekularen  
Wechselwirkungen von Kohlenhydraten  
mit Lektinen am Beispiel des bakteriellen  
Lektins FimH



**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

**Oliver Sperling**

aus Hamburg

Kiel 2004

1. Gutachter: Prof. Dr. Th. K. Lindhorst
2. Gutachter: Prof. Dr. R. Herges

Tag der Abschlussprüfung: 09.02.2005

Zum Druck genehmigt: 09.02.2005, Prof. Dr. J. Grotemeyer, Dekan

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine außer den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln verwendet habe. Die Arbeit wurde von mir nicht an anderer Stelle eingereicht. Dies ist mein erster Promotionsversuch.

Oliver Sperling

Experience is the name everyone gives to their mistakes.

*Oscar Wilde*

Die vorliegende Arbeit wurde von Juni 2001 bis November 2004 im Institut für Organische Chemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Thisbe K. Lindhorst angefertigt.

Frau Prof. Dr. Thisbe K. Lindhorst möchte ich für die interessante Themenstellung danken, die mich im Laufe der Zeit immer neue Facetten der Kohlenhydrate sehen ließ. Außerdem danke ich ihr für viele Anregungen und Diskussionen sowie für ihre Offenheit gegenüber neuen Vorschlägen, die meiner Arbeit viel Platz zum Wachsen boten.



# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
<b>1. Einleitung</b>	<b>4</b>
1.1 Kohlenhydrate	4
1.2 Lektine	7
1.3 Kohlenhydrat-Lektin-Interaktionen	8
1.4 Wirkstoffe und Medikamente - eine Einführung	10
1.5 Kohlenhydrate als mögliche Wirkstoffe	12
<b>2. Liganden für das Typ-1-fimbriale Lektin</b>	<b>15</b>
2.1 Kohlenhydrat-Erkennung durch das Typ-1-fimbriale Lektin	15
2.2 Design optimierter Liganden für das Typ-1-fimbriale Lektin	19
2.2.1 Optimierte monovalente Liganden	20
2.2.2 Dockingstudien	26
2.2.3 Synthetische Glycocluster	29
2.2.4 Verbrückende Liganden	35
2.2.5 BSA-Konjugate	40
<b>3. Biologische Untersuchung der Liganden</b>	<b>42</b>
3.1 Fimbrien exprimierende Bakterien	42
3.2 Beschreibung der Testsysteme	43
3.3 Modifikation des ELISA	45
3.4 Testergebnisse	46
3.4.1 Testung von Glycoclustern	47
3.4.2 Testung eines auf 6-Amino-6-desoxy Methylmannosid basierenden Glycoclusters	50
3.4.3 Testung von monovalenten Liganden	54
3.4.4 Testung von verbrückenden Liganden	56
3.4.5 Testung der BSA-Konjugate	57
3.5 Interpretation der Testergebnisse	58

<b>4.</b>	<b>Der Einfluss von <i>N</i>-Glycosylierung auf Enzymaktivität</b>	<b>60</b>
4.1	Das Modellsystem RNase A / RNase B	60
4.1.1	Aufbau des Testsystems	62
4.1.2	Testergebnisse	63
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>67</b>
<b>6.</b>	<b>Summary</b>	<b>70</b>
<b>7.</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>72</b>
7.1	Allgemeine Methoden	72
7.2	Allgemeine Arbeitsvorschriften	75
7.3	Einzelvorschriften	76
<b>8.</b>	<b>Literatur</b>	<b>106</b>
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>111</b>
<b>10.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>114</b>

## Abkürzungen

abs.	absolut
ABTS	2,2-Azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)
Ac	Acetyl-
AK	Antikörper
BSA	Bovine Serum Albumin
CH	Cyclohexan
ConA	Concavalin A
COSY	Correlated Spectroscopy
CRD	Carbohydrate Recognition Domain
d (NMR)	Dublett
d	Tag
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DHB	Dihydroxybenzoesäure
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer
DES	Diethylsquarate (Quadratsäurediethylester)
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNS	Desoxyribonucleinsäure
EE	Ethylacetat (Essigester)
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ELLA	Enzyme Linked Lectin Assay
Äquiv.	Äquivalent
FT	Fourier-Transformation
ges.	gesättigt
GPC	Gelpermeationschromatographie
Gly	Glycin
h	Stunde
His	Histidin

HMQC	Hetero Multiple Quantum Coherence, Inverse $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -Korrelationspektroskopie
HOBt	Hydroxyenzotriazol
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
HRP	Horse Radish Peroxidase
HSQC	Hetero Single Quantum Coherence
IC	Inhibitions-Concentration
Ig	Immunglobulin
IT	Inhibitions-Titer
LPS	Lipopolysaccharid
m (NMR)	Multiplett
M	Molmasse
$m_c$ (NMR)	Multiplett centered
MALDI-ToF	Matrix Assisted Laser Desorption Time of Flight
Me	Methyl-
MeOH	Methanol
min	Minute
NmP	Nucleotidmonophosphat
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
OD	Optische Dichte
<i>p</i> NP-	<i>para</i> -Nitrophenyl-
PBSE	Phosphatpuffer mit Thimerosal
PBSET	Phosphatpuffer mit Thimerosal und Tween 20
PEG	Polyethylenglycol
q (NMR)	Quartett
QS	Quadratsäure
RIC	Relative Inhibitions-Concentration
RIT	Relativer Inhibitions-Titer
RNA / RNS	Ribonucleinsäure
RNAse	Ribonuclease
RT	Raumtemperatur
s (NMR)	Singulett
STDEV	Standardabweichung (-deviation)
t (NMR)	Triplett

TES	Triethylsilyl-
Tos	Tosylat
TFA	Trifluoressigsäure
U	Uridin
Ump	Uridinmonophosphat
UpU	Uridyl(3'→5')uridin

# **1. Einleitung**

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in drei thematische Abschnitte die sich der Untersuchung von Kohlenhydrat-Protein-Interaktionen widmen.

Nach einer allgemeinen Einführung in Themen der Glycobiologie werden die Ergebnisse des ersten Projektabschnittes in Kapitel 2 beschrieben, in dem es um die zielgerichtete Synthese hochaffiner Kohlenhydratliganden für das Typ-1-fimbriale Lektin FimH aus *Escherichia coli* geht. Der zweite Abschnitt dieser Dissertationsschrift, Kapitel 3, betrifft dann die Evaluation verschiedener Liganden bezüglich ihrer Bindungseigenschaften gegenüber FimH, während ein dritter Abschnitt über den bis dahin gesteckten thematischen Rahmen hinaus weist: Kapitel 4 beschreibt die Entwicklung eines Testsystems, mit dessen Hilfe der Einfluss von *N*-Glycosylierung auf die Aktivität von Enzymen am Beispiel der RNase B untersucht werden kann. Zur besseren Lesbarkeit erhielt jedes Oberkapitel eine eigene kurze Einführung.

## **1.1 Kohlenhydrate**

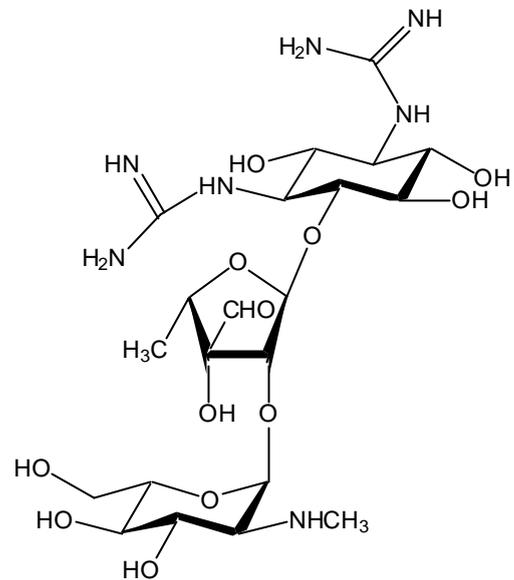
In der belebten Natur wird eine Vielzahl von Substanzen und Substanzklassen für eine fast unüberschaubare Vielfalt an Aufgaben verwendet<sup>1</sup>. Ihr Häufigkeit ist dabei mit ihrer biosynthetischen Verfügbarkeit verknüpft und richtet sich nach dem Anwendungsbereich des jeweiligen Naturstoffes. Das Vorkommen von Naturstoffen reicht daher von sehr großen Mengen<sup>2</sup> (z. B. Gerüststoffe) bis zu verschwindend geringen Mengen, in denen Stoffe bezogen auf die Gesamtmasse eines Individuums auftreten (z. B. Hormone, Toxine)<sup>3</sup>, dabei jedoch für das Überleben eines Organismus unabdingbar sind. Die Substanzklasse der Kohlenhydrate ist interessanterweise über das ganze Spektrum dieser Häufigkeitsskala verteilt. Am häufigsten treten Kohlenhydrate mit Sicherheit als Gerüstmaterial und Energiespeicher (Cellulose oder Chitin bzw. Stärke und Glycogen) auf. Mengenmäßig kleiner, jedoch von großer biologischer Bedeutung ist der Anteil an Kohlenhydraten in verschiedenen Wirkstoffen, die häufig mehr oder weniger kompliziert mit Zuckern konjugiert sind. Seltene Erscheinungsformen von Kohlenhydraten findet man z. B. in den 1944

entdeckten Aminoglycosid-Antibiotika wie dem Streptomycin (**Abb. 1**) aus *Streptomyces griseus*<sup>4</sup>. Diese Art von Stoffen erfordert einen erheblichen biosynthetischen Aufwand für einen Mikroorganismus, wird jedoch nur in verschwindend kleiner Menge benötigt und gewährleistet dabei einen großen evolutionären Vorteil.

Die unterschiedlichen natürlich wirksamen Oligo- und Polysaccharide, seien sie unkonjugiert oder in Glykokonjugaten gebunden, sind aus vielen verschiedenen Monomeren aufgebaut und kommen

in einer bisher nicht überschaubaren Vielfalt von Strukturen vor, die sowohl linear als auch verzweigt sein können. Dies ist auch ermöglicht durch die strukturelle Vielfalt der entsprechenden Monomeren, worin auch eine Erklärung für das Auftreten von Kohlenhydraten in den unterschiedlichsten Rollen und Funktionen zu suchen ist. Ein Monosaccharid besitzt mindestens eine Carbonyl- und mehrere Hydroxygruppen, die noch vielfältig derivatisiert sein können, z. B. mit Amin-, Amid-, Sulfat- oder Thiolgruppen<sup>5</sup>. Dabei treten Monosaccharide der gleichen Summenformel außerdem in Ringen unterschiedlicher Größe auf, so dass, abhängig von der Anzahl der vorliegenden Stereozentren, eine erhebliche Anzahl von Stereoisomeren gebildet werden kann. Durch jedes zusätzliche Monomer wird die Anzahl der möglichen Strukturen eines Poly-, bzw. Oligosaccharids und damit der mögliche Gehalt an molekularer Information dramatisch erhöht.

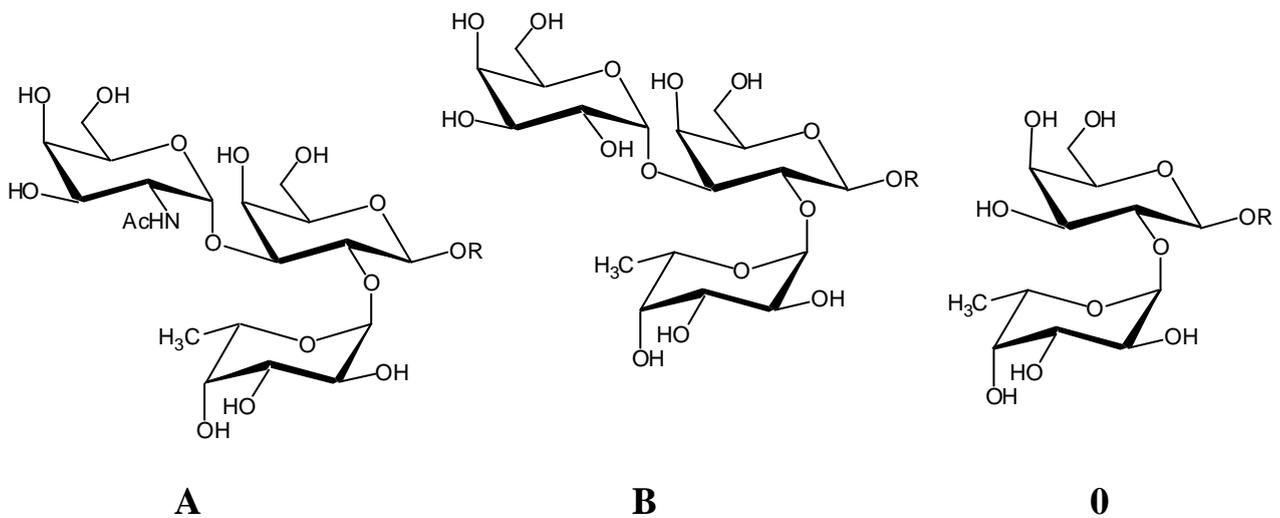
Dem gegenüber liegt in den Informationsspeichermolekülen DNS und RNS, in denen Kohlenhydrate als Teil des Moleküllrückgrades vorkommen, der molekularen Diversität die Sequenz der Nukleobasen zu Grunde. Bei der Doppelhelix der DNS nimmt bei vier unterschiedlichen monomeren Bausteinen und einer eindeutigen Basenpaarung der Informationsgehalt pro zusätzlichem Basenpaar um eine Zweierpotenz zu. Im Fall der Proteine, für deren Aufbau die Natur aus 21 proteinogenen Aminosäuren auswählt, ist die Abfolge der Aminosäuren in dem linearen Polymer (Primärstruktur) dafür entscheidend, wie das Protein in die aktive dreidimensionale Form gefaltet und ggf. noch posttranslational modifiziert wird (Aufbau der Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur). Dieses erhöht die Anzahl der möglichen



**Abb. 1:** Streptomycin

unterschiedlichen Produkte pro zusätzlichem Monomer um den Faktor 21 auf allen, der Primärstruktur übergeordneten Organisationsebenen.

Die naheliegende Frage, ob in Analogie zum genetischem Code ein „Kohlenhydrat-Code“<sup>6,7,8</sup> existiert, kann bis heute nicht beantwortet werden. Es sind zwar viele Fälle bekannt, in denen definierte biologische Informationen von Oligosacchariden codiert sind (z. B. im AB0 - Blutgruppensystem<sup>9</sup>, **Abb. 4**), den Informationsgehalt eines noch nicht biologisch evaluierten Oligosaccharides anhand des Verknüpfungsmusters seiner Monomere zu entschlüsseln, ist bisher aber nicht gelungen.



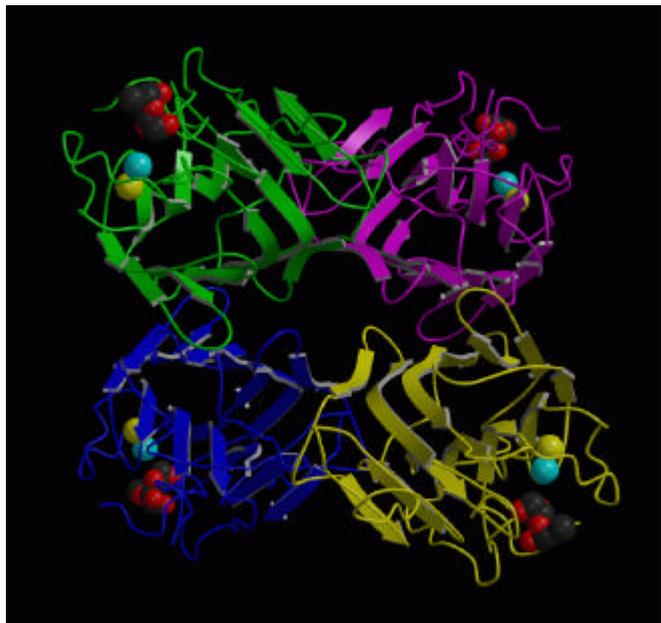
**Abb. 4:** Die Kohlenhydrat-Endgruppen auf Erythrocytenoberflächen, die das AB0-Blutgruppensystem determinieren; R = Oligosaccharidrest.

## 1.2 Lektine

Lektine stellen eine Klasse von Kohlenhydrat-bindenden Proteinen dar, die Saccharidomänen reversibel binden<sup>10</sup>, ohne die enzymatische Aktivität oder die Eigenschaften von Antikörpern, die im Optimalfall irreversibel an ein Antigen binden, aufzuweisen. (Die Abgrenzung zu Antikörpern fällt bei tierischen Lektinen allerdings oftmals schwer, da einige dieser Lektine - wie Antikörper - von Lymphocyten exprimiert werden und aufgrund ihres Aufbaus zur Ig - Familie gehören).

Am häufigsten treten Lektine in Pflanzen, hier speziell in den Speicherorganen wie Samen, Wurzeln, Knollen oder ähnlichen auf. Die erste phänomenologische Beschreibung einer Lektin-Ligand-Interaktion findet sich in einem Bericht des Jahres 1860, in dem die Coagulation von Taubenblut mit Klapperschlangengift beschrieben wird<sup>11</sup>. Dieser Effekt konnte später auf die Wechselwirkung zwischen einem im Schlangengift enthaltenen C-Typ-Lektin und den Taubenblut-Erythrocyten zurückgeführt werden.

Die Erforschung von Lektinen schritt nun über das Gebiet der toxischen Pflanzenagglutinine<sup>12</sup> voran zu Agglutininen in Rinderserum und nicht-toxischen Pflanzenagglutininen. Unter letzteren findet sich auch das erste in kristalliner Form erhaltene Lektin Concavalin A (**Abb. 5**<sup>13</sup>) aus *Canavalia ensiformis*<sup>14</sup>, dessen Aminosäuresequenz und dreidimensionale Struktur 1972 aufgeklärt wurde. Die Bezeichnung Lektin wurde, zusammen mit der oben genannten Definition erstmals 1954 von W. C. Boyd verwendet<sup>10</sup> und leitet sich von dem lateinischen Wort *legere* für binden ab.



**Abb. 5**<sup>13</sup>: Concavalin A: ein tetramers Lektin

Eine systematische Klassifizierung der Lektine erfolgt gemäß ihrer ausgeprägten Affinität gegenüber einem bestimmten Monosaccharid in die Gruppen 1 (Mannose), 2 (Galaktose und *N*-Acetyl-Galactosamin), 3 (*N*-Acetyl-Glucosamin), 4 (Fucose) und 5 (*N*-Acetyl-Neuraminsäure), wobei diese Einteilung keine Aussage darüber trifft, ob ein Lektin einer Gruppe ausschließlich dieses Saccharid erkennt oder ebenfalls, – dafür aber mit geringerer Affinität, andere Zucker bindet. Zudem sind oftmals nicht Monosaccharide, sondern komplexe Oligosaccharidstrukturen die Liganden höchster Affinität.

Die im Tierreich verbreiteten Lektine werden in die S-, C-, I und P-Typ-Lektine sowie die Pentraxine unterteilt<sup>15,16</sup>, wobei Lektine des S-Types auch als Galektine bezeichnet werden.

Der Aufbau der Lektine variiert sehr stark in Form, Größe und Anordnung ihrer Kohlenhydrat-erkennenden Domänen (CRD: engl.: 'carbohydrate recognition domain'). Es sind zwar Strukturen mit nur einer Kohlenhydrat-erkennenden Einheit bekannt, bei weitem die meisten Lektine liegen jedoch als Oligomere vor, die zumeist aus identischen Monomeren aufgebaut sind.

### 1.3 Kohlenhydrat-Lektin-Interaktionen

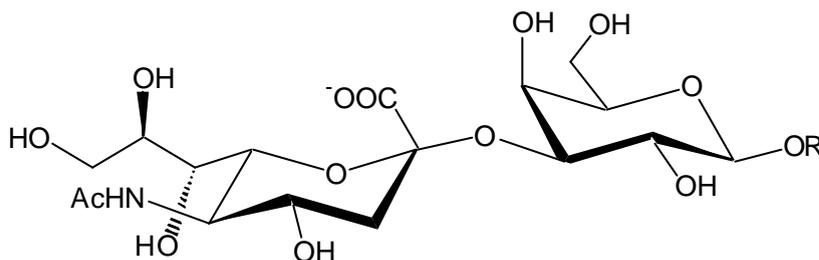
Analog zur Vielfalt der Lektine variieren auch die Modi der Interaktion mit Kohlenhydraten. Sowohl unterschiedliche Tiefen der Bindungstaschen als auch verschiedene zusätzlich benötigte Bindungspartner in einer Kohlenhydrat-erkennenden Domäne wie z. B. einzelne Wassermoleküle, Calcium- oder Magnesiumionen ermöglichen eine erhebliche Vielfalt von nicht-kovalenten Bindungsformen<sup>17,18</sup>.

Hierbei scheint es ein grundsätzliches Prinzip dieser Interaktionen zu sein, bevorzugt mehrere Bindungen mit schwächerer Affinität zu realisieren, die gemeinsam zu einer hohen Avidität führen. Die Ursache dieses Vorgehens muss in der Funktion der Lektine gesucht werden, da andere Proteinklassen wie z. B. Antikörper des IgG-Typs durchaus in der Lage sind, ein einziges Molekül (in diesem Fall das Antigen) mit einer extrem hohen Affinität (bis zu 0.1 nM) und Selektivität zu binden.

Da die Funktion der Antikörper in der Erkennung und Neutralisation von Fremdkörpern liegt, ist im Fall Kohlenhydrat-erkennender Antikörper die hochaffine

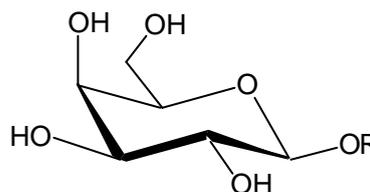
Interaktion sinnvoll. Für eine differenziertere biologische Antwort, wie sie im Zusammenhang mit einigen Lektinen bereits beschrieben ist<sup>19</sup>, wäre ein derart rigides Bindungsverhalten eher ungünstig. Sollen beispielsweise komplexere Informationen über den Zustand einer Zelle anhand des Glycosylierungsmusters ihrer Oberfläche ermittelt werden, muss anstelle eines Bindungsereignisses eine Vielzahl dieser Ereignisse eintreten, um biologische Vorgänge zuverlässig zu steuern. Zudem ist die Reversibilität des Bindungsereignisses für das Fortbestehen der Zelle notwendig.

Zwei Beispiele sollen die Bedeutung derartiger Steuerungsmechanismen verdeutlichen. Die Entfernung von gealterten Erythrocyten aus dem Blutstrom zeigt auf beeindruckende Weise, wie Lektine, in diesem Fall Asialoglycoproteinrezeptoren der Leber, zwischen Oligosaccharidstrukturen unterschiedlicher Zusammensetzung differenzieren können und durch multivalente Interaktionen mit Kohlenhydraten eine überalterte Zelle aussortieren (**Abb. 6**)<sup>20</sup>. An diesem Beispiel konnte von Y. C. Lee der Einfluss eines kooperativen (multivalenten) Bindungsverhaltens durch die Verwendung von synthetischen Glycoclustern demonstriert werden<sup>21,22,23</sup>.



a) Oberflächensaccharid eines jungen Erythrocyten; die Galactosylreste sind mit Neuraminsäuren maskiert.

b) Bei Alterung der Zelle werden immer mehr terminale Neuraminsäurereste abgespalten, es bleiben Galactosylreste als Termini zurück, die vom Asialoglycoproteinrezeptor der Leber erkannt und gebunden werden.



**Abb. 6:** Unterschiedliche Saccharidtermini auf den Oberflächen junger (a) und alter (b) Erythrocyten; R = Oligosaccharidrest.

Ein zweites, gut untersuchtes Beispiel biologisch signifikanter Wechselwirkungen zwischen Lektinen und Oligosaccharideinheiten ist die Leukocytenrekrutierung im frühen Stadium einer Entzündung. Werden Endothelzellen im frühen Verlauf eines Entzündungsprozesses von Botenstoffen aktiviert, beginnen sie P- und E-Selektine zu bilden, die eine als Sialyl-Lewis-X bezeichnete Tetrasaccharidstruktur auf der

Oberfläche von Leukocyten binden. Diese Wechselwirkung führt zunächst zu einer Verlangsamung der Leukocyten in den Blutgefäßen ('Rolling'), was die Expression von Zelladhäsionsproteinen anregt, wodurch dann Protein-Protein-Wechselwirkungen ermöglicht werden, die schließlich für ein erfolgreiches Durchtreten des Leukocyten durch das Endothel hin zum Ort der Entzündung notwendig sind<sup>24</sup>.

## **1.4 Wirkstoffe und Medikamente - eine Einführung**

Der Weg zu Substanzen, die den Körper bei der Bewältigung von Problemen in Form von Infektionen, Stoffwechselstörungen oder ähnlichem unterstützen, hat sich in den letzten Jahrzehnten dramatisch verändert. Entgegen vieler enthusiastischer Prognosen bezüglich der Informationen, die aus dem menschlichen Genom zu erhalten sind, ist die Entwicklung von Medikamenten einzig auf Grundlage des Wissens über die menschlichen Gene nicht möglich. Dennoch kann erwartet werden, dass in den kommenden Jahren dieses Wissens für die Neu- und Weiterentwicklungen von Verfahren genutzt werden wird, die zu neuen Medikamenten führen.

Zwei weitere Methodiken sind ebenfalls mit sehr großen Erwartungen bezüglich ihrer Leistungsfähigkeit verbunden worden, einerseits die kombinatorische Synthese und Evaluation von großen Substanzbibliotheken und andererseits die Nutzung computer-gestützter Modellierungen zum Drug Design. Beide Verfahren haben sich jedoch bisher für die Wirkstoffsynthese als nicht so effizient erwiesen, dass sie als Königsweg zu neuen Medikamenten angesehen werden könnten.

Im Falle der frühen kombinatorischen Substanzsuche lagen Schwächen vor allem in der Art und Zusammensetzung der Substanzbibliotheken, die oftmals lediglich eine immens große Anzahl allerdings sehr ähnlicher Moleküle enthielten und zudem schlecht charakterisierbar waren. Computer-gestützte Verfahren hingegen liefern oftmals wertvolle Vorschläge, wenn Liganden für eine kleine, tiefe Bindungstasche gesucht sind, im Falle größerer, ausgedehnterer Systeme, die über eine flache Topographie verfügen, versagen diese Methoden jedoch oftmals. Momentan verspricht man sich von der Kombination unterschiedlicher Verfahren, die sowohl das Wissen um die Expression eines Zielproteins nutzen, als auch verbesserte

kombinatorische Methoden sowie Docking- und/oder Modelling-Analysen für das Ligandendesign nutzen, die beste Aussicht auf Erfolg.

Historisch gesehen waren viele der wirksamen Medikamente des späten 19. und frühen 20. Jahrhunderts gereinigte oder derivatisierte Formen von Naturstoffen (z. B. Acetylsalicylsäure, Morphin, Digitalis), deren Wirksamkeit aus früheren Anwendungen abgeschätzt werden konnte. Zudem führten die fortschreitenden Untersuchungen auf den Gebieten der Mikrobiologie, Medizin und Biochemie zu (teilweise zufälligen) Beobachtungen, die dann die Entwicklung neuartiger Medikamente ermöglichten (Penicillin).

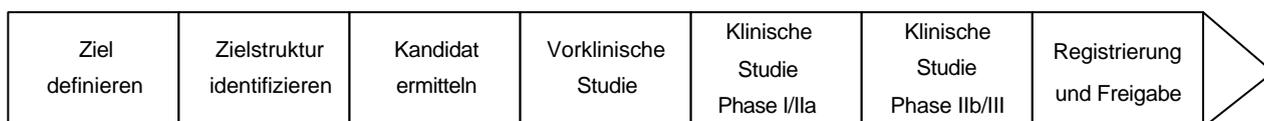
Die genaue Wirkungsweise dieser Substanzen blieb zunächst ungeklärt, da die heute gängigen Methoden zur Untersuchung molekularer Erkennung noch nicht zur Verfügung waren und der Metabolismus eines Wirkstoffes ebenfalls nicht verfolgt werden konnte (**Tabelle 1**).

<b>Substanz</b>	<b>Entdeckung</b>	<b>Strukturermittlung</b>	<b>Wirkungsweise</b>
Aspirin®	1897 Hoffmann <sup>25</sup>	1897 Hoffmann	1971 Vane / Ferreira <sup>26</sup>
Penicillin	1928 Flemming	1940 Chain / Florey <sup>27</sup>	1957 Strominger / Park <sup>28</sup>
Morphin	1806 Sertürner	1952 Gates / Tschudi <sup>29</sup>	1973 Simon / Snyder / Terenius <sup>30</sup>

**Tabelle 1:** Vergleich des Zeitpunktes der Entdeckung, Strukturermittlung und der Aufklärung der Wirkungsweise früherer Medikamente.

Auch der Weg von der Entdeckung des biologisch aktiven Wirkstoffs zum einsetzbaren Medikament hat sich stark verändert. Gab es Ende des 19. und Anfang des 20. Jahrhunderts nur einige wenige Tierversuche und Selbstversuche der Entdecker eines Wirkstoffes, bevor er als Medikament eingesetzt wurde, so steht heutzutage vor der Zulassung eines neuen Arzneimittels ein genau definierter Weg

von Studien (**Abb. 7**), die einen möglichst hohen Grad an Sicherheit vor Nebenwirkungen und Langzeitschäden gewährleisten sollen.



**Abb. 7:** Stationen der Entwicklung und Zulassung eines Medikamentes

## 1.5 Kohlenhydrate als mögliche Wirkstoffe

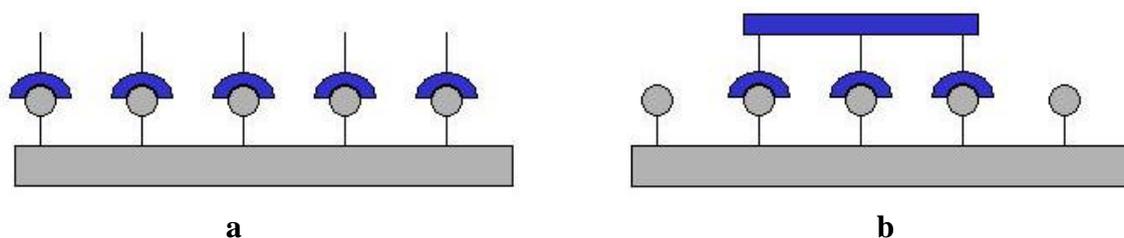
Für die Nutzung von Kohlenhydraten und ihren Derivaten als Wirkstoffe bieten sich mit Sicherheit, aufgrund ihrer Beteiligung an vielen biologischen Prozessen zahlreiche Chancen. Allerdings ist mit der strukturellen Vielfalt und Mikroheterogenität mit Sacchariden, ihren schwierigen Funktionsprinzipien, sowie ihrer eingeschränkten Stabilität im lebenden Organismus eine Anzahl von Problemen verbunden, für die es bisher generelle Lösung gibt und die die Verwendung und Attraktivität von Zuckern in der Pharmaindustrie bisher deutlich limitieren.

Die erheblichen synthetischen Aufgaben können heute teilweise mittels automatisierter Oligosaccharidsynthese<sup>31,32,33,34</sup> bewältigt werden, eine allgemein verfügbarer Syntheseroboter steht bisher aber nicht zur Verfügung. Die Funktion der natürlich vorkommenden Oligosaccharide ist zudem nicht in allen Fällen geklärt, was für die Entwicklung von Wirkstoffen, die gezielt in Interaktionen zwischen Organismen eingreifen sollen unabdingbar ist. Eine meistens geringe Affinität der einzelnen Oligosaccharide erschwert die Aufklärung des biologischen *modus operandi* erheblich, eine feste Bindung an einen Rezeptor wird oftmals erst durch ein Ensemble von Strukturen vermittelt. Potentiell interessante Wirkstoffmoleküle würden zudem in lebenden Organismen schnell enzymatischem Abbau unterliegen. Dieses Problem kann durch gezielte Modifikation der Strukturen (z. B. Synthese von C-Glycosiden<sup>35</sup>) umgangen werden, derartige Konzepte erschweren jedoch oftmals wiederum die Synthese der Zielstrukturen. Der Einsatz von synthetischen Oligosacchariden oder ihrer Derivate als Wirkstoffe steht daher noch vor einer

großen Hürde, ganz im Gegensatz zu synthetischen Peptiden, die gut zugänglich sind und als Wirkstoffe zum Einsatz kommen<sup>36</sup>.

Um die Problematik der Kohlenhydratsynthese zu vereinfachen und das hohe Potenzial synthetischer, Kohlenhydrat-basierter Wirkstoffe ausschöpfen zu können wurden unterschiedliche Strategien angewandt. Eine Herangehensweise geht davon aus, dass ein natürliches, hochverzweigtes Oligosaccharid von seinen endständigen Saccharideinheiten so mimikriert werden kann, dass ein Bindungspartner einen synthetischen Glycocluster mit endständigen Monosacchariden in geeigneten Abstand zueinander in analoger Weise erkennt wie seinen natürlichen Liganden. Auf diese Weise lässt sich das schwierigere Problem der Synthese eines komplexen Oligosaccharids auf die Darstellung eines geeigneten Kernmoleküls (z. B. eines Dendrimers<sup>37</sup>) und nachfolgendes 'Glycocoating' reduzieren.

Eine Variation dieser Strategie nutzt den bei vielen Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen auftretenden Cluster-Effekt<sup>38,39,21-23</sup>, der zustande kommen kann, wenn ein Protein darauf ausgelegt ist, grundsätzlich mehrere Kohlenhydratdomänen zu binden. Mittels einer geeigneten Architektur des Glycoclusters lässt sich dann eine exponentielle Steigerung des Bindungspotenzials verglichen mit dem Monomer erreichen (**Abb. 8**)<sup>40</sup>.



**Abb. 8:** Skizze zum Cluster-Effekt: gegenüber einem Bindungsereignis mit jeweils einzelnen Domänen (**a**) wird eine Ligand-Rezeptor-Interaktion durch Bindung eines multivalenten Liganden verstärkt (**b**).

Im Gegensatz zum Aufbau möglichst komplexer Strukturen, die ein Oligosaccharid oder ein Ensemble von Monosacchariden nachbilden sollen, steht die Synthese von Monosaccharidderivaten, die gezielt zur Inhibition von Rezeptor-Ligand-Interaktionen über *eine* Bindungsstelle eingesetzt werden. Dieser Ansatz ist typisch für die kompetitive Inhibition eines Enzyms und konnte mit der Entwicklung zweier Medikamente, die gegen die Neuraminidase des Influenza-Erregers gerichtet sind, eindrucksvoll demonstriert werden<sup>41,42,43,44,45</sup>.

Ein Vorteil kleiner Moleküle als Wirkstoffe liegt in ihren meist besseren pharmakokinetischen Eigenschaften, die mit Lipinskis 'Rule of Five' abgeschätzt werden können<sup>46</sup>. Ein Glycocluster verstößt zwangsläufig gegen Grundsätze dieser Überlegung, was jedoch nicht automatisch seinen pharmazeutischen Nutzen ausschließt, sondern nur darauf hinweist, dass die Anwendung dieser großen, sehr polaren Moleküle starken Einschränkungen unterliegt (keine orale Aufnahme möglich, schneller Abbau im Körper etc.). Kleine Moleküle entsprechen der 'Rule of Five' meist sehr gut, können aber den oben erwähnten Cluster-Effekt nicht nutzen.

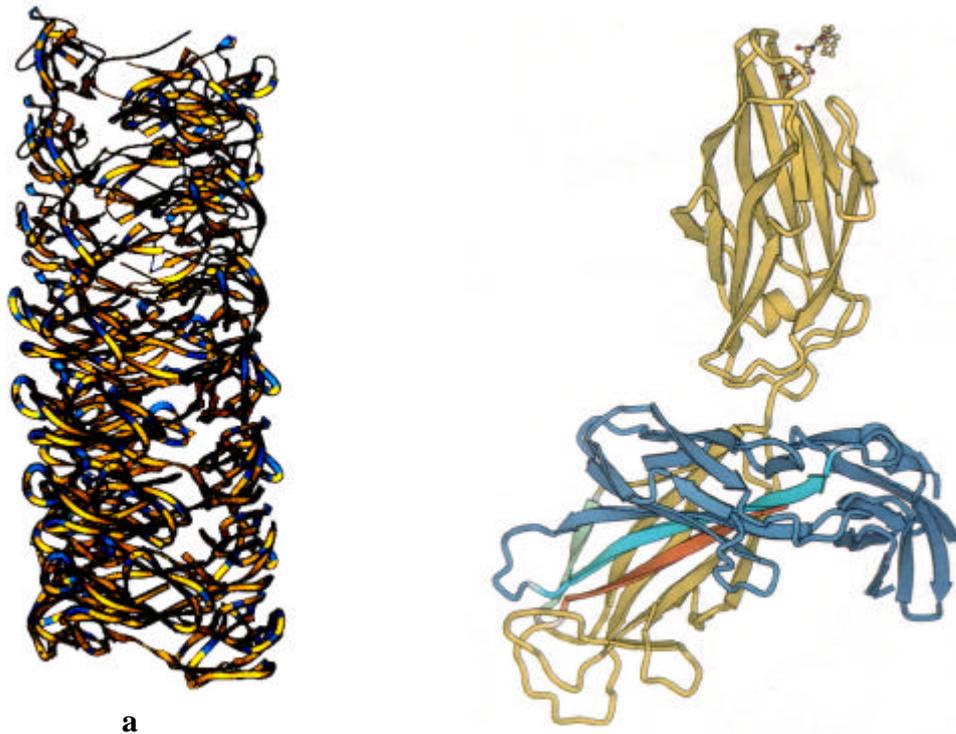
## 2. Liganden für das Typ-1-fimbriale Lektin

### 2.1 Kohlenhydrat-Erkennung durch das Typ-1-fimbriale Lektin

Frühe Wechselwirkungen zwischen einem Pathogen, das in einen Wirtsorganismus eindringt, und einer Zelle dieses Wirtes werden oftmals von mikrobiellen Lektinen vermittelt<sup>47,48</sup>. Diese binden zunächst an Saccharidstrukturen der Zielzelle und stellen durch den Aufbau von nicht-kovalenten Wechselwirkungen einen ersten Kontakt her. Eine Vielzahl uropathogener *E. coli*-Stämme exprimiert sogenannte Typ-1-Fimbrien, Proteinoligomere, die ein Mannose-spezifisches Lektin tragen. Tierversuche belegen, dass die Fähigkeit zur Fimbrienexpression ein Hauptfaktor für die Virulenz dieser Stämme darstellt, da sowohl die Persistenz der Bakterien als auch die Entzündungsreaktion des Körpers stark zunimmt, wenn diese Fimbrien exprimiert sind<sup>49,50</sup>. Die Stärke der Adhäsion kann hierbei anscheinend den Strömungsverhältnissen der Umgebung angepasst werden<sup>51</sup>.

Neuere Untersuchungen mit fimbrierten *E. coli*-Stämmen und menschlichen neutrophilen Leukocyten weisen darauf hin, dass die Interaktion zwischen den Fimbrien und der Glycocalix der neutrophilen Zellen nicht den Charakter einer reinen Verankerung des Pathogens auf seiner Wirtszelle hat, sondern, dass im Zusammenspiel mit bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS) die Sauerstoff-abhängige Apoptose dieser Zellen moduliert wird<sup>52,53</sup>. Dieses ist insofern ein interessanter Befund zum frühen Stadium eines Infektionsvorganges, da hier entweder ein Signal des Mikroorganismus über ein Oligosaccharid an die Wirtszelle gesandt wird oder, in einem umgekehrten Informationsfluss, eine Eigenschaft der Wirtszelle ausgelesen wird. Beides führt dann in Kombination mit den Einflüssen des LPS dazu, dass die Wirtszelle ein für das Pathogen vorteilhafteres Verhalten zeigt.

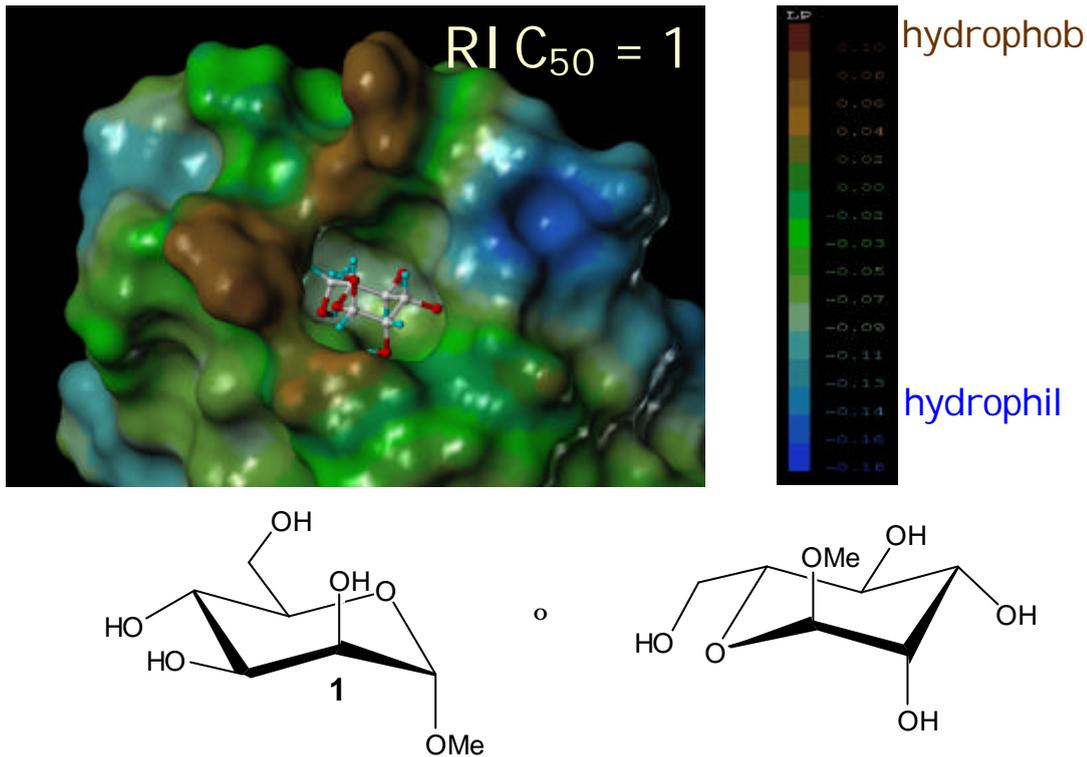
Typ-1-Fimbrien bestehen aus vier Proteinen. Den größten Teil hiervon stellt mit 98% das FimA-Protein, ein Gerüstprotein, das ein stabförmiges Anhängsel an der Außenmembran der Bakterien bildet. Das eigentliche Mannose-bindende Adhäsins, FimH, ist mittels zwei weiteren kleinen Proteinen, des so genannten FimG und FimF, an der Fimbrie verankert<sup>54</sup> (**Abb. 10**).



**Abb. 10:** Darstellung des oligomeren Aufbaus von Typ-1-Fimbrien (a) und Ribbon-Diagramm der adhäsiven Untereinheit FimH (gelb) mit dem Chaperone FimC (blau) (b).

Das FimH-Protein bindet terminale  $\alpha$ -Mannosylreste, wobei Oligomannoside gegenüber einem einzelnen Mannosylrest bevorzugt werden<sup>48</sup>. Betrachtet man die Röntgenstruktur von FimH<sup>55</sup> zeigt sich eine relativ tiefe Bindungstasche an der Spitze des Proteins, die lediglich ein Monosaccharid beherbergen kann. Eine Erklärung dafür, dass Oligomannoside bessere Bindungswerte mit FimH aufweisen als das Monosaccharid Mannose könnten Studien liefern, die neben einer tiefen Bindungstasche an der Spitze des FimH-Proteins eine oder mehrere weitere Bindungstaschen auf FimH postulieren, deren Größe die Wechselwirkung mit Trisacchariden erlaubt<sup>56,57</sup>.

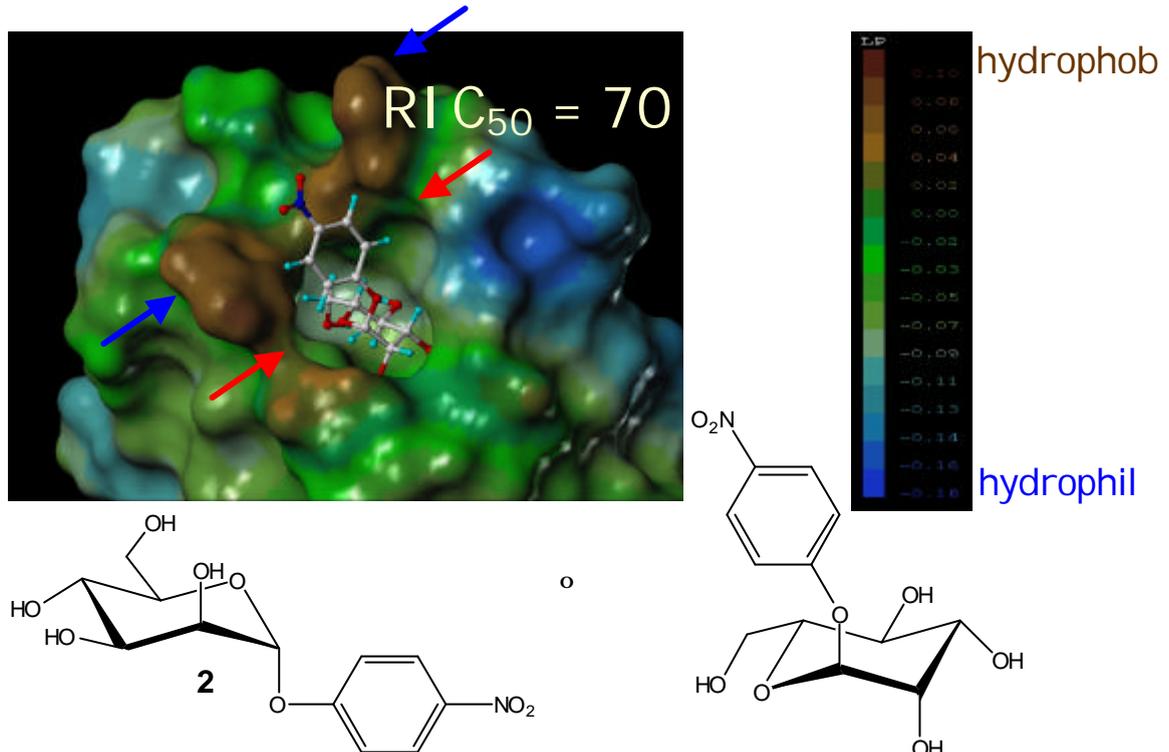
Die Bindung von Mannose bzw.  $\alpha$ -Methyl-mannosid in der, an der Spitze des Proteins befindlichen, tiefen Bindungstasche von FimH kann auf Grund der Röntgenstruktur heute recht genau verstanden werden. Alle vier freien OH-Gruppen des Glycosids Methylmannosid sowie ein Molekül Wasser sind an der Bindung beteiligt (**Abb. 11**).



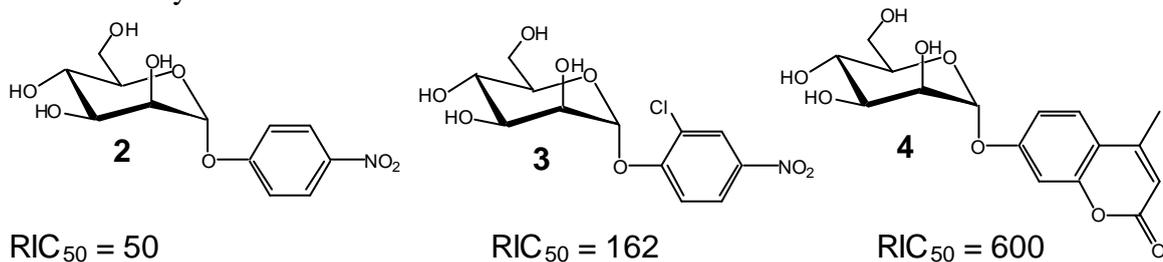
**Abb. 11:** Methylmannosid (**1**) in der tiefen Bindungstasche des FimH-Proteins<sup>44</sup>. Die Oberfläche des Proteins ist farblich in hydrophile und hydrophobe Bereiche eingeteilt.

Diese Ergebnisse der Strukturanalyse von FimH stehen im Einklang mit experimentellen Untersuchungen<sup>48,58,59,60,61</sup>, die weiter unten detailliert werden (vgl. **Kapitel 3**). Ein wichtiges Strukturelement des FimH-Proteins, welches für die Optimierung der Wechselwirkung zwischen der Kohlenhydrat-erkennenden Domäne des Proteins und synthetischen Liganden genutzt werden kann, ist das von den beiden Tyrosyl-Resten 48 und 137 geformte sogenannte Tyrosin-Tor, welches mit einem ausgedehnten Aglycon eine Wechselwirkung durch  $\pi$ -Stacking ausbilden kann. Weiterhin ist eine hydrophobe Region zwischen Bindungstasche und Tyrosin-Tor für die Optimierung von Kohlenhydratliganden zu beachten (**Abb. 12**).

Dieses spiegelte sich schon in den frühen Ergebnissen von Ofek, Sharon und Lis wieder, die eine Reihe unterschiedlicher Mannoside mit aromatischem Aglycon testeten (**Abb. 13**)<sup>48</sup>. Zum Vergleich des inhibitorischen Potenzials zweier Liganden wird der RIC<sub>50</sub>-Wert experimentell ermittelt. Hierbei handelt es sich um eine dimensionslose Größe die aussagt, wie viel besser eine Substanz die Interaktion fimbrierten Bakterien und Ligand im Verhältnis zu einem gewähltem Standard (hier Methylmannosid **1**) verhindert.



**Abb. 12:** *p*NP-Mannosid (**2**) bindet ca. 70 mal fester an FimH als MeMan (**1**). Die roten Pfeile markieren die hydrophobe Region vor dem Tyrosin-Tor, die blauen Pfeile das Tyrosin-Tor selbst.



**Abb. 13:** Vergleich des relativen inhibitorischen Potenzials dreier Mannoside mit unterschiedlichem aromatischem Aglycon, bezogen auf MeMan (**1**) mit  $RIC_{50} \equiv 1$ .

Der Nitrophenylrest des *p*NP-Mannosids **2** interagiert, zusätzlich zu den Wechselwirkungen des Kohlenhydratrestes in der Bindungstasche mit einer hydrophoben Region am Eingang der Bindungstasche. Diese Interaktion wird weiter durch die Anwesenheit eines Chlorsubstituenten in der *ortho*-Position des Aglykons verbessert (Mannosid **3**). Das höhere inhibitorische Potenzial dieses Liganden gegenüber Verbindung **2** erklärt sich folglich über eine optimierte hydrophobe Wechselwirkung; die Änderung der Elektronendichte im aromatischen System spielt in diesem Fall keine Rolle. Ein ausgedehntes hydrophobes Aglycon mit aromatischer Teilstruktur in Substanz **4** vorhanden ist schließlich in der Lage, sowohl mit den hydrophoben Bereichen vor dem Tyrosin-Tor als auch mit den Tyrosin-Seitenketten selbst zu interagieren und somit eine noch stärkere Wechselwirkung zu ermöglichen.

## 2.2 Design optimierter Liganden für das Typ-1-fimbriale Lektin

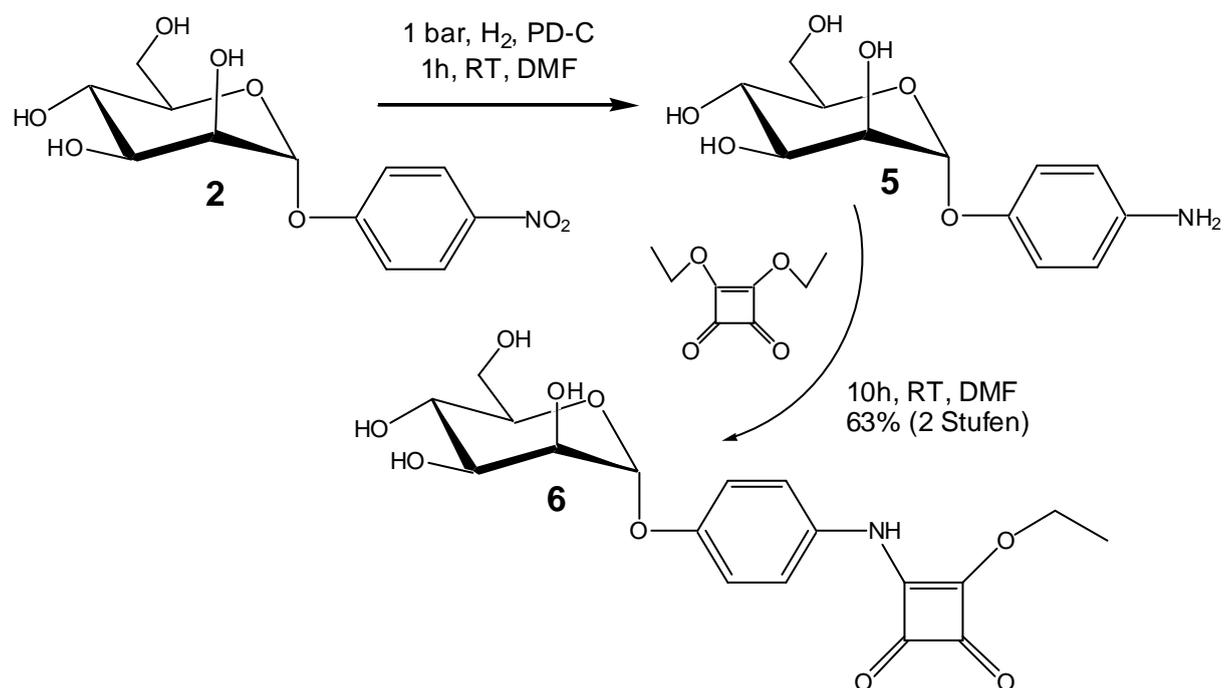
Beim Design neuer Liganden für das Typ-1-fimbriale Lektin wurden zwei unterschiedliche Strategien verfolgt, um zu einer Optimierung der Liganden bezüglich ihres Bindungsverhaltens zu gelangen. Einerseits wurden auf der Basis der Kenntnis der FimH-CRD für Manose und ihrer Umgebung eine Serie monovalenter Liganden synthetisiert, wobei die Leitstruktur ausgemacht und weiter optimiert werden konnte. Die Synthesen dieser monomeren Liganden werden in **Kapitel 2.2.1** beschrieben. Um die Wechselwirkung derartiger Liganden mit FimH möglichst genau zu verstehen, wurden sie mit Hilfe des FlexX-Algorithmus<sup>62</sup> in die Bindungstasche der verfügbaren Kristallstruktur von FimH<sup>55</sup> gedockt (**Kapitel 2.2.2**)<sup>63</sup>.

Weiterhin wurden, aufbauend auf früheren, in unserer Gruppe erhaltenen Ergebnissen Glycocluster hergestellt, multivalente Liganden für FimH mit denen sich möglicherweise Cluster-Effekte nutzen lassen (**Kapitel 2.2.3**). In **Kapitel 2.2.4** werden Arbeiten beschrieben, in denen es darum geht Liganden für FimH zu synthetisieren, die möglichst zwei Bindungstaschen, wie von Knight et al.<sup>56,57</sup> postuliert, auf FimH verbrücken. Schließlich werden in einem eher klassischen Ansatz optimierte monovalente Liganden an BSA zu multivalenten BSA-Konjugaten konjugiert (**Kapitel 2.2.5**).

## 2.2.1 Optimierte monovalente Liganden

Die Optimierung monovalenter Liganden basierte auf der weiter oben beschriebenen Kristallstruktur der CRD auf FimH und zielte darauf ab, einerseits  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zwischen dem aromatischem Aglycon eines Mannosids und dem Tyrosin-Tor vor der CRD zu nutzen und außerdem die hydrophoben Wechselwirkungen, die am Eingang der Bindungstasche möglich sind, zu optimieren. Ausgehend von der Vergleichssubstanz *p*NP-Mannosid (**2**) wurde das Quadratsäurederivat **6** als Zielstruktur formuliert, weil es mehrere Möglichkeiten zur Modifikation des Aglycons bietet wodurch außerhalb der Kohlenhydrat-erkennende Domäne zusätzliche Wechselwirkungen genutzt werden könnten.

Das Quadratsäurederivat **6** konnte ausgehend von kommerziell erhältlichem *p*NP-Mannosid (**2**) nach Reduktion zum *p*-Aminophenylmannosid (**5**) leicht in zwei Schritten erhalten werden (**Schema 1**).



**Schema 1:** Synthese des Mannose-funktionalisierten Quadratsäurederivates **6**.

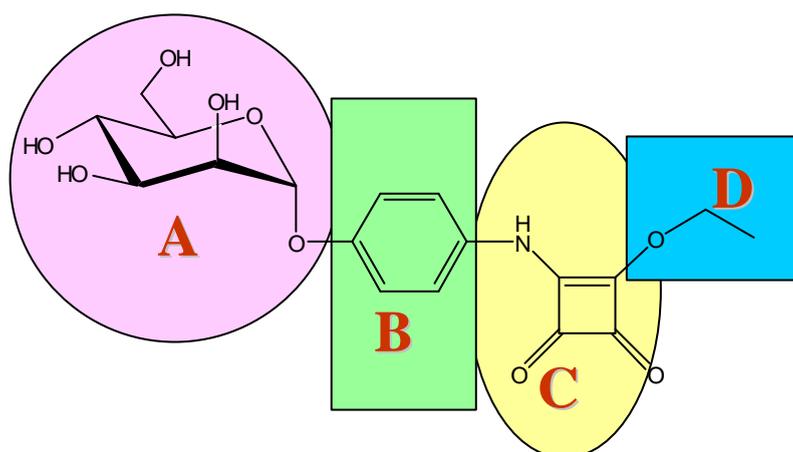
Der Quadratsäurediethylester (DES) wurde zuerst von Tietze et al. als asymmetrisch derivatisierbares Kupplungsreagenz eingeführt<sup>64</sup>. DES und ähnliche Quadratsäureester haben die Eigenschaft, mit primären und sekundären Aminen bei

Raumtemperatur sowohl in organischen Lösungsmitteln als auch in wässrigen Puffern bei pH 7 zunächst mit nur einem Äquivalent Amin zum Monoamid zu reagieren. Bei höheren pH-Werten (pH 9 oder höher) reagiert es mit einem zweiten Äquivalent Amin zum Diamid. Die Reaktion zum Monoamid erfolgt laut Tietze je nach Amin mit einer Ausbeute von 50 bis 100%, der Umsatz zum Diamid mit 50 bis 80%. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den hier beschriebenen Ausbeuten. In vielen weiteren Veröffentlichungen werden Quadratsäurekupplungen oftmals für beide Schritte mit quantitativen Ausbeuten berichtet, was im Rahmen der hier beschriebenen Arbeiten nicht bestätigt werden konnte.

Später wurden Quadratsäurelinker auch in der Kohlenhydratchemie eingesetzt<sup>65,66</sup> um mit Alkylaminospacern glycosidierte Kohlenhydratderivate an Proteine zu konjugieren.

Bei der NMR-spektroskopischen Untersuchung der synthetisierten Quadratsäure-Derivate fiel auf, dass die zum Cyclobutenring gehörenden Kohlenstoffatome zunächst nur sehr schlecht zu detektieren waren. Dies ist auf die durch die Quadrupolmomente der benachbarten Stickstoffatome veränderte Relaxationszeit der Kohlenstoffatome zurückzuführen. Dieses Problem konnte umgangen werden, wenn die Messung bei einer <sup>13</sup>C-Resonanzfrequenz von 50.32 MHz und einer Temperatur von 313 K durchgeführt wurde..

Die Verbindung **6** zeigte leider schlechte Löslichkeit in Wasser sowie anderen gängigen Lösungsmitteln. In deuteriertem Methanol, das für die NMR Vermessung von **6** verwendet wurde, löste sich die Substanz zunächst, fiel dann aber binnen weniger Minuten wieder aus. Später scheiterte auch das Vorhaben, mit **6** einen Glycocluster analog zu der trivalenten Verbindung **16** aufzubauen an der Unlöslichkeit des gebildeten Produktes, das zwar per MALDI-ToF-MS in der Reaktionslösung nachgewiesen, aber nicht isoliert werden konnte.



**Abb. 17:** Theoretische Zerlegung von **6** in vier Derivatisierungsdomänen A, B, C und D.

Vorteilhaft an dem Mannosid **6** ist, dass es sich vielseitig weiter derivatisieren lässt. Dazu wurde die Struktur theoretisch in vier Domänen zerlegt, die unabhängig voneinander modifiziert werden können (**Abb. 17**). Für die einzelnen Bereiche wurden folgende Veränderungen überlegt:

**A** - Ein Austausch von OH-Gruppen gegen andere funktionelle Gruppen, z.B. NH<sub>2</sub> (zum Mannosamin). Zudem wäre die Synthese eines C- Glycosides möglich.

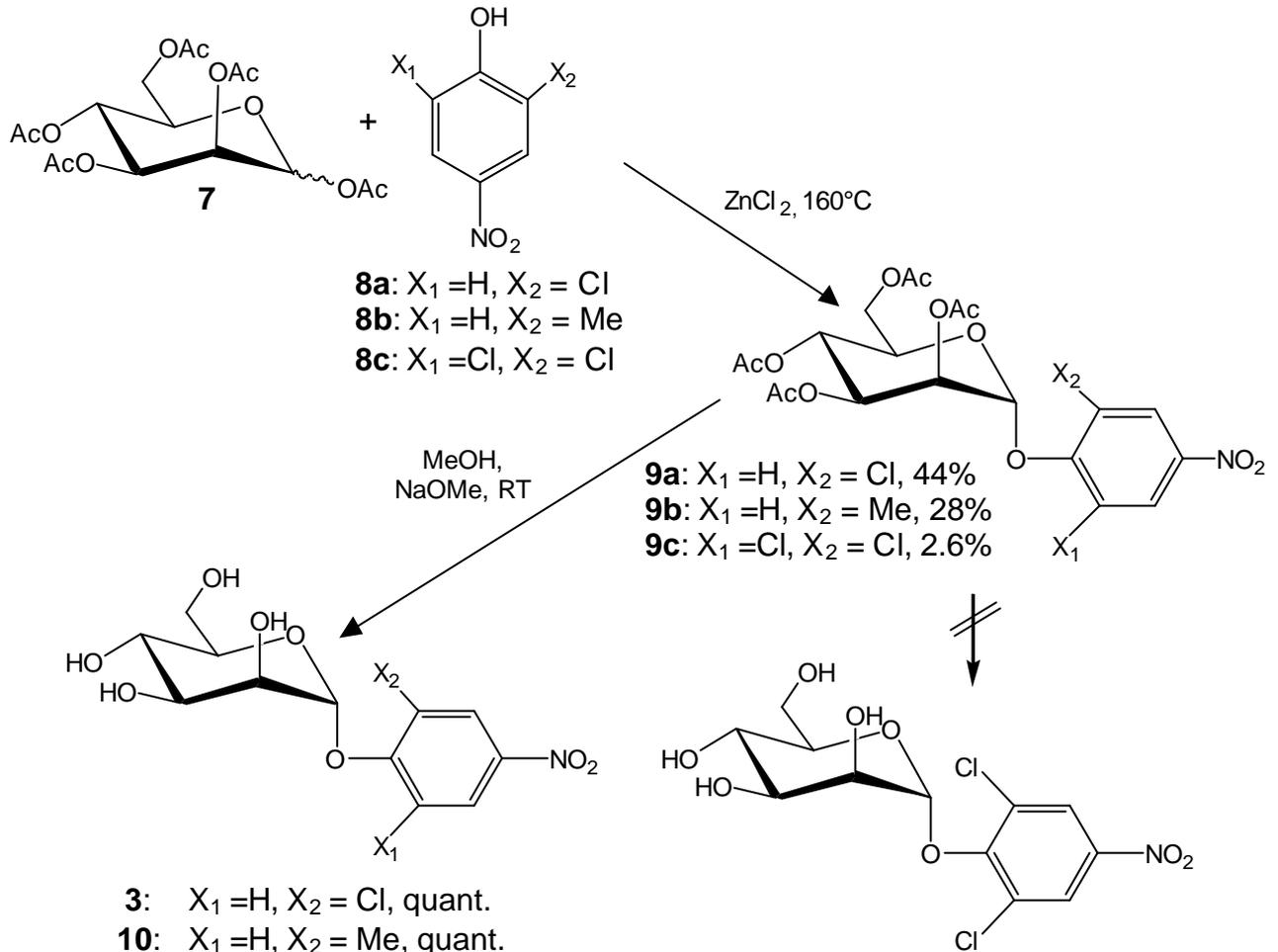
**B** - Substitution an einer oder mehreren Positionen des Phenylrings

**C** - Austausch des verbrückenden Quadratsäuresystems

**D** - Derivatisierung des Quadratsäuremonoesters mit unterschiedlichen Aminen, um Wechselwirkungen mit der Proteinoberfläche zu optimieren.

Unter all diesen Überlegungen wurde zunächst eine Derivatisierung im Mannosylrest (**A**) ins Auge gefasst. Es sollte Mannosamin verwendet werden, da ein Vergleich mit der Literatur zeigt, dass Mannosamin und seine Derivate höheres inhibitorisches Potential aufweisen können<sup>67</sup>, was jedoch nicht der Fall sein muss<sup>68</sup>. Dieses ist stark von den pH-Verhältnissen in der Bindungstasche abhängig, da eine protonierte 2-Aminogruppe nicht mehr als Wasserstoffbrückendonator fungieren kann. Aufgrund der relativ aufwändigen Synthese von Mannosaminderivaten mit aromatischem Aglycon<sup>69</sup>, wurde zunächst das inhibitorische Potenzial von Mannosamin getestet, das aber keinen Einfluss auf die Bindung von Typ-1-fimbrierten Bakterien an Mannan zeigte. Also wurde dieser Ansatz, trotz der vielversprechenden theoretischen Überlegungen nicht weiter verfolgt.

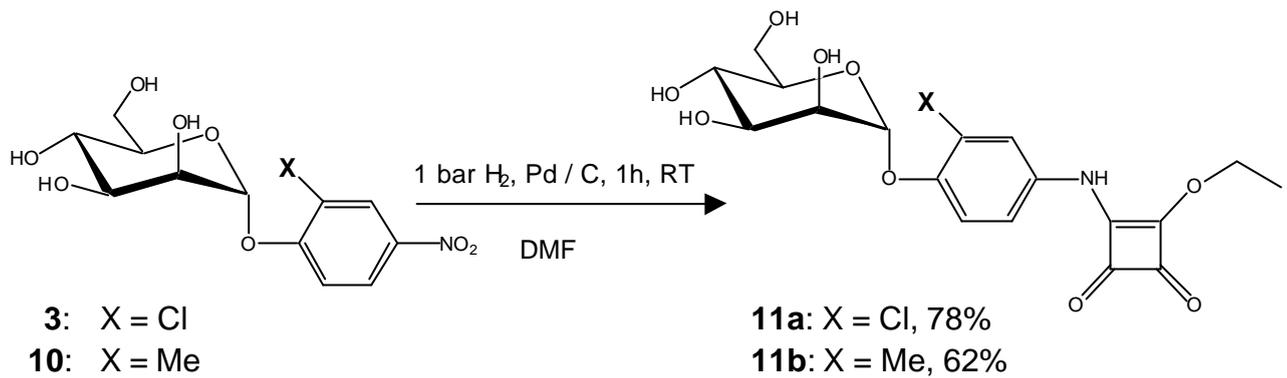
Substitutionen am Phenylring (**B**) konnten im gewissen Rahmen einfach eingeführt werden, indem die entsprechend substituierten *p*-Nitrophenole in einer Schmelzreaktion mit Mannosepentaacetat (**7**) und Zinkchlorid als Katalysator umgesetzt wurden (**Schema 4**). Eine derartige Modifikation des Liganden, welche die Wechselwirkung zwischen Ligand und dem hydrophoben Bereich der Bindungsregion optimieren soll, erschien auf Grund von literaturbekannten inhibitorischen Potenzen für beispielsweise 2-Chlor-4-Nitrophenylmannosid (**9a**) Erfolg versprechend<sup>37</sup>.



**Schema 2:** Synthese der im Phenylring substituierten Nitrophenylmannoside

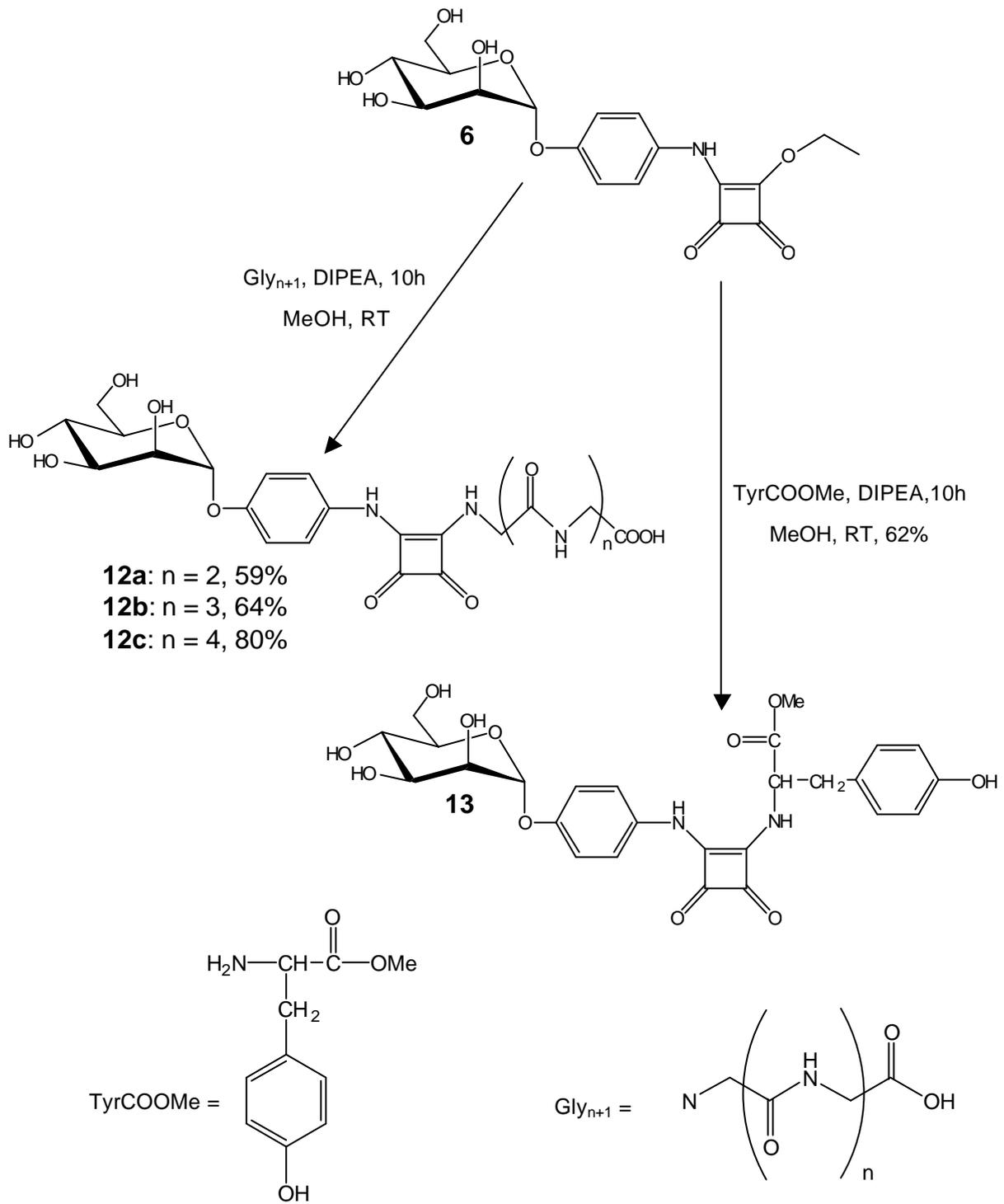
Mit der in **Schema 2** dargestellten Schmelzreaktion konnten die substituierten Nitrophenylmannoside **9a** und **9b** in moderater, **9c** in schlechter Ausbeute dargestellt werden. Zudem war es nicht möglich, Verbindung **9c** unzersetzt zu entschützen. Ebenfalls erfolglos blieb der Versuch, analog das 2,6-Dimethyl-4-nitrophenylmannosid darzustellen. Die Verbindungen **3** und **10** wurden als leicht gelbe Sirupe erhalten, die im Ölpumpenvakuum getrocknet wurden. Die moderaten Ausbeuten der Glycosylierung wurden durch die Verwendung von Mannose-pentaacetat (**6**) relativiert, das in dieser Reaktionsfolge nicht zu einem aktiveren Glycosyldonor (z.B. dem Trichloracetimidat) umgesetzt werden musste.

Die auf diese Weise erhaltenen Nitrophenylmannoside wurden dann durch Reduktion der Nitrogruppe und nachfolgende Umsetzung mit DES zu den Zielverbindungen **11a** und **11b** umgesetzt (**Schema 3**).



**Schema 3:** Synthese von **11a** und **11b**

Schließlich wurde, um Modifikationen der Partialstruktur **D** (Abb. 17) zu erreichen, der Quadratsäureester **6** mit unterschiedlichen Aminen umgesetzt, um ggf. eine verbesserte Wechselwirkung mit der Proteinoberfläche zu bewirken. Hierzu wurden einerseits Oligoglycine unterschiedlicher Länge ( $n = 3,4,5$ , Substanzen **12 a, b, c**) gewählt, um mit der freien Säurefunktion des C-Terminus eine kleine, basische Tasche in der Nähe des Tyrosin-Tors zu adressieren, andererseits ein Tyrosinmethylester, der mit Substanz **6** zur Zielverbindung **13** umgesetzt wurde, um hydrophobe Wechselwirkungen mit der Proteinoberfläche zu optimieren (**Schema 4**). Die gewünschten Produkte konnten durch Standard-Reaktionsbedingungen in mittlerer bis guter Ausbeute erhalten werden.

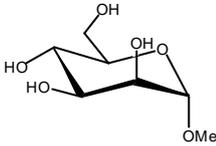
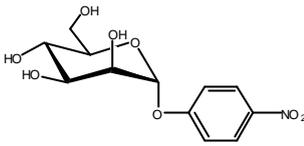
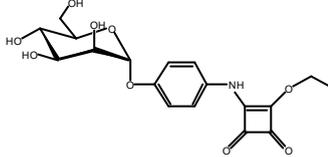


**Schema 4:** Derivatisierung der Quadratsäureesterpartialstruktur in dem Mannosid **6**.

## 2.2.2 Docking-Studien

Das erstaunlich gute inhibitorische Potential der Verbindung **6** gab Anlass, nach Erklärungen für die gute Interaktion zwischen der bekannten CRD des FimH-Proteins und diesem Liganden zu suchen. Um ein Bild der Protein-Ligand-Interaktionen zu erhalten, wurden die Vergleichsverbindungen **1** und **2** sowie die Verbindung **6** in die tiefe Bindungstasche des FimH-Proteins gedockt, die Interaktion mittels des FlexX-Algorithmus und Consensus Scoring (der Kombination der Resultate verschiedener Scoring-Funktionen) ausgewertet und eine auf den ermittelten Daten basierende Abbildung der Bindungsverhältnisse erstellt (die Ermittlung der Scoring-Werte erfolgte durch A. Fuchs<sup>63</sup>). Als Basis für diese Auswertungen wurde die von S. Knight et al. ermittelte Kristallstruktur von FimH mit gebundenen C-HEGA<sup>55</sup> zugrunde gelegt.

Der FlexX-Docking-Algorithmus geht von einer starren Bindungstasche aus und versucht die Interaktion mit einem flexiblen Liganden zu evaluieren, indem zunächst die Bindungstasche nach Plätzen für Protein-Ligand-Wechselwirkungen abgesucht wird, die im Folgenden als Dreiecke mit bestimmten Interaktionspotential betrachtet werden. Kann der betrachtete Ligand in einer seiner Konformationen dem Platzbedarf und den physikalisch-chemischen Bedürfnissen dieses Zieldreiecks entsprechen, so wird eine Übereinstimmung festgestellt und evaluiert. Hierbei werden neu gebildete Wasserstoffbrücken, ionische Wechselwirkungen, lipophile Wechselwirkungen sowie die Einschränkung von Freiheitsgraden im Molekül betrachtet. Mittels der Kombination aus FlexX-Docking-Untersuchungen und Consensus Scoring nach Sybyl 6.8 konnte eine Reihe von dimensionslosen, sogenannten Scoring-Werten erhalten werden, die den experimentell ermittelten Inhibitionspotentialen für die jeweiligen Verbindungen gegenübergestellt werden können. Da die berechneten Scoring-Werte im Optimalfall mit der freiwerdenden Bindungsenergie korreliert sind, weisen kleinere Scoring-Werte auf potentiell bessere Liganden hin.

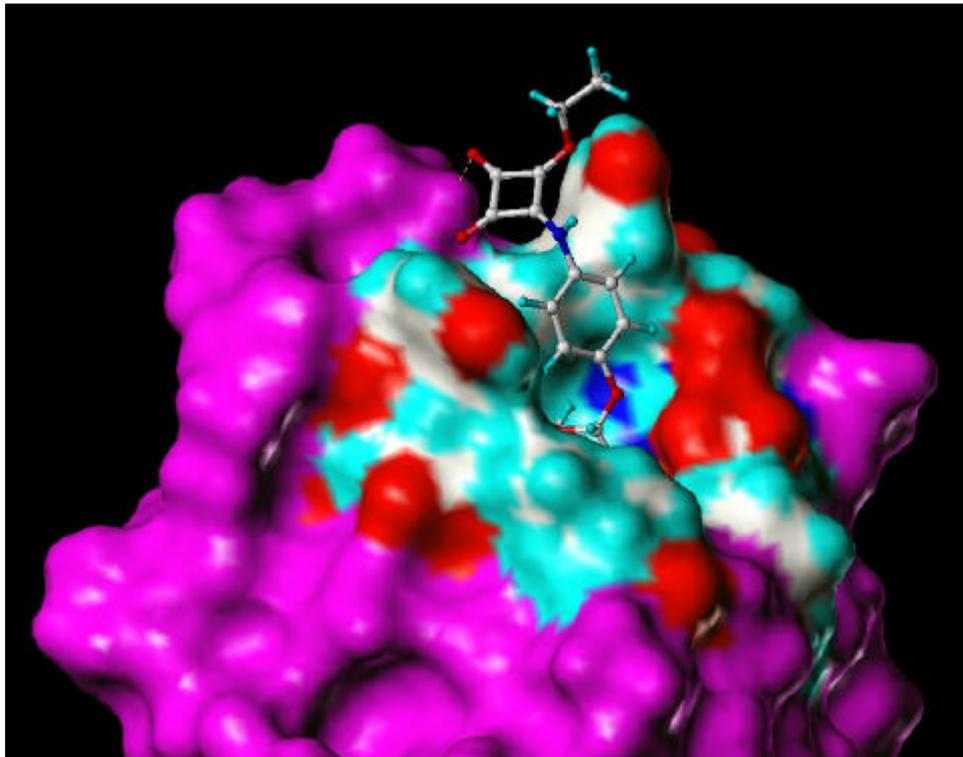
Substanz	Struktur	RIC <sub>50</sub>	Scoring-Wert <sup>70</sup>
1		1	-22.5
2		46	-24.4
6		1800	-29.2

**Tabelle 2:** Vergleich von Scoring-Werten und inhibitorischem Potenzial der Substanzen **1**, **2** und **6**.

In **Tabelle 2** werden die Scoring-Werte der Verbindungen **1**, **2** und **6** mit den im ELISA gemessenen RIC<sub>50</sub>-Werten verglichen. Innerhalb dieser Reihe kann festgestellt werden, dass das verwendete Dockingmodell gut in der Lage ist, eine Aussage über die Qualität eines Moleküls als Ligand für das Zielprotein zu machen. Das hierbei entstandene Bild der Interaktion zwischen Substanz **6** und dem FimH-Protein (**Abb. 11**) zeigt sehr gut, wie die unterschiedlichen Teilstrukturen des Liganden mit der Proteinoberfläche interagieren. Der Mannosylrest verschwindet in der tiefen Bindungstasche des Proteins, der Phenylrest interagiert mit der hydrophoben Region vor dem Tyrosin-Tor, welches mit der Quadratsäureeinheit wechselwirkt. Die Wechselwirkung von Substituenten des Phenylrings mit hydrophoben Bereichen der Proteinoberfläche deutet sich durch die Lage des Substituenten am Protein eine Interaktion an, die sich jedoch nicht in den errechneten Scoring-Werten widerspiegelt.

Diese computergestützte Evaluation von Liganden ist ein wertvolles Werkzeug um die Bindungsmodi von bekannten Liganden darzustellen und Ideen für weitere Optimierungen zu geben. Die ermittelten Scoring-Werte spiegeln aber nur in Einzelfällen die Messwerte des Bioassays wieder. Die durch Substitution des

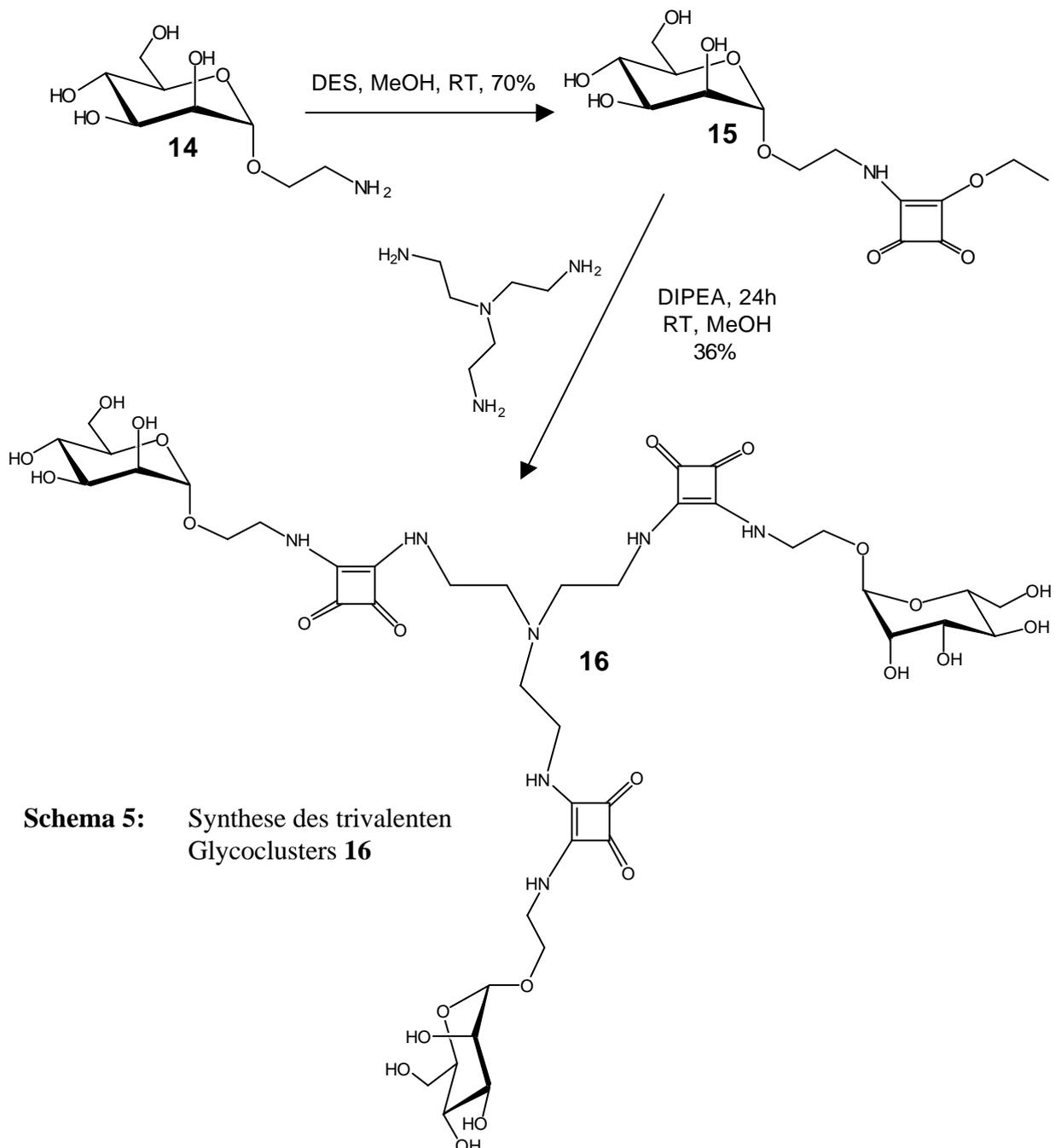
Phenylsystems in den Liganden **11a** und **11b** veränderte Wechselwirkung führt zu einem verbesserten Kontakt mit dem Rand der Bindungstasche, der zwar in Dockingstudien visualisiert werden kann, die Evaluation dieser zusätzlichen Wechselwirkung war jedoch nicht erfolgreich.



**Abb. 18:** Das Mannosederivat **6** gedockt an das FimH-Protein: es findet eine hydrophobe Wechselwirkung zwischen Protein und Phenylrest statt, zusätzlich interagiert das Quadratsäuresystem mit dem Tyrosin-Tor.

## 2.2.3 Synthetische Glycocluster

In den vergangenen Jahren wurden diverse synthetische Glycocluster als Liganden für das Typ-1-fimbriale Lektin z. B. in der Gruppe um Lindhorst<sup>71,72,73</sup> und von R. Roy et al.<sup>74</sup>, Fraser-Stoddart et al.<sup>75</sup> oder Ley et al.<sup>76</sup> dargestellt. Hierbei handelte es sich zumeist um verzweigte oder dendritische Moleküle, deren Oberflächen mit Mannosylresten modifiziert wurden. Zwar ist mit solchen Verbindungen bisher kein einheitliches Bild bei der Testung mit Typ-1-fimbrierten Bakterien im Sinne quantitativer

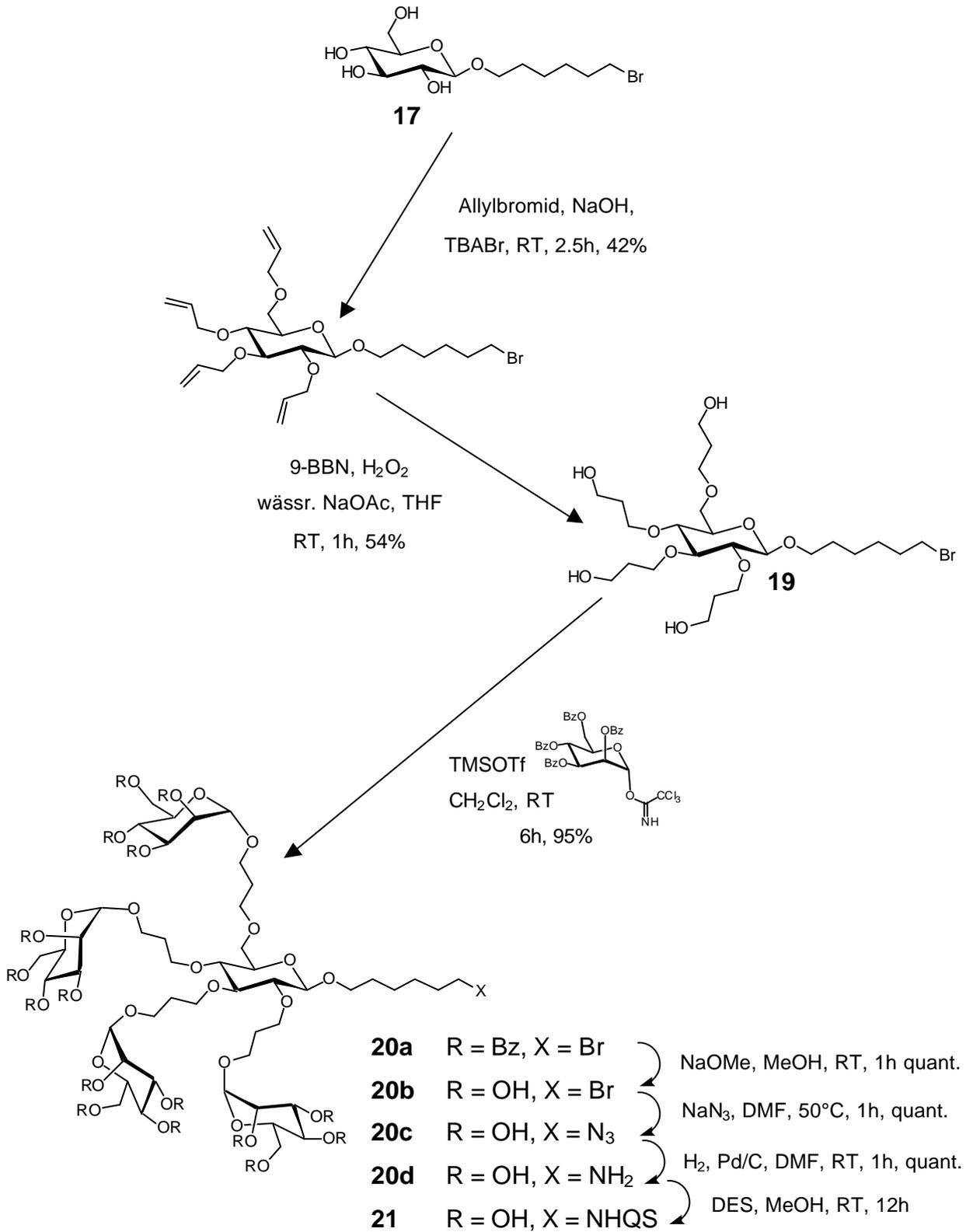


**Schema 5:** Synthese des trivalenten Glycoclusters **16**

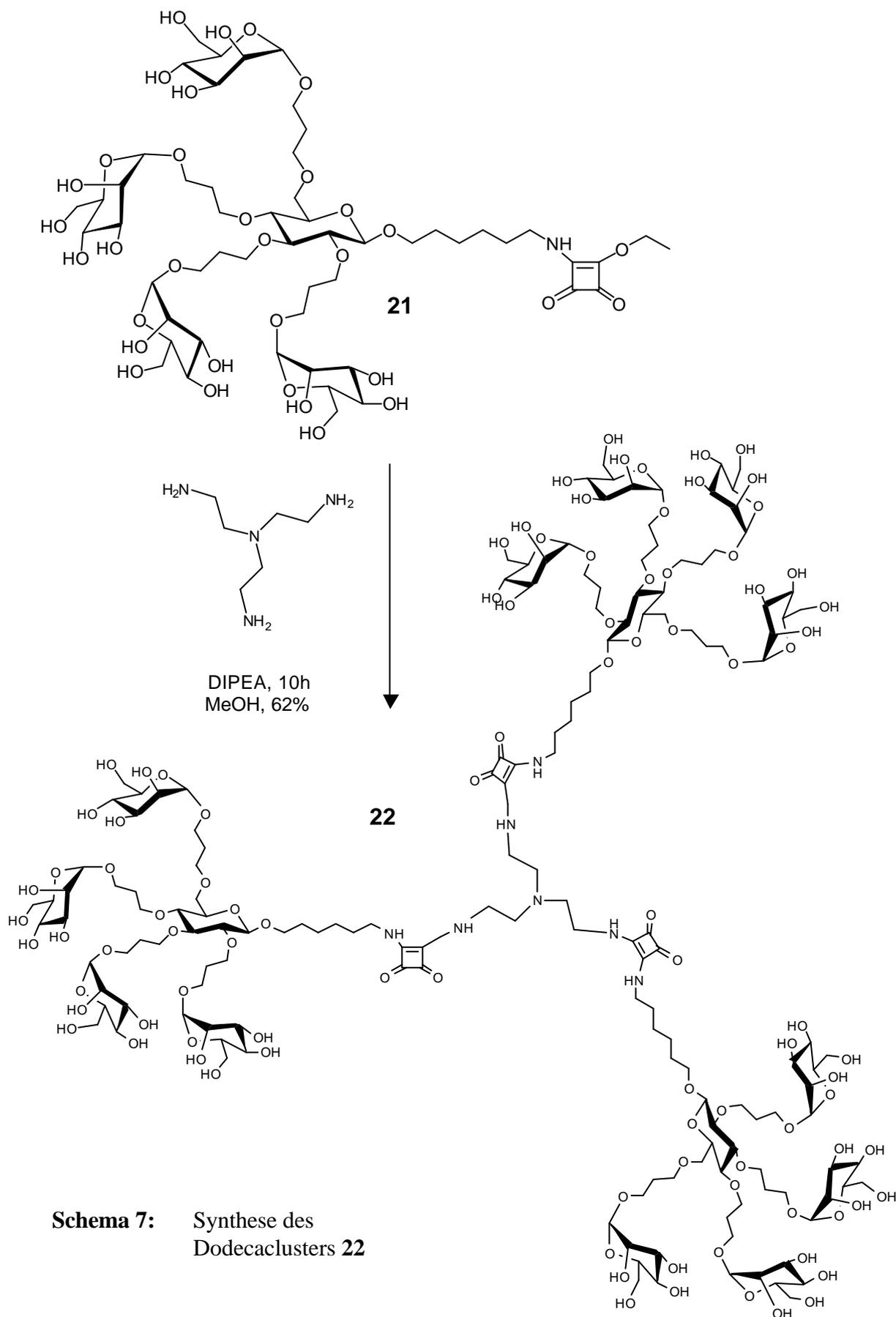
Struktur-Wirkungs-Beziehungen erhalten worden, da aber ein Reihe von Glycoclustern als Inhibitoren der Typ-1-Fimbrien vermittelten Adhäsion gute Werte zeigen, sollte die Quadratsäurechemie auch für die Synthese multivalenter Mannose-derivate eingesetzt werden.

Der nachfolgend beschriebenen Glycocluster basiert auf einem Tris-2-aminoethylamin-Kern, an den mittels eines Quadratsäure-Linkers der aminofunktionalisierte Spacer des Mannosids **14**<sup>71</sup> gebunden wurde. Im ersten Schritt der Synthese entsteht zunächst das Quadratsäureamid **15**, das dann mit Tris-2-aminoethylamin zum Glycocluster **16** umgesetzt werden kann, der mittels HPLC gereinigt werden muss (**Schema 5**).

Mit der Synthese des Clusters **16** konnte die Verwendung von Quadratsäure als Linker zur Darstellung eines kleinen, trivalenten Glycoclusters etabliert werden. Nun konnte die Synthese eines wesentlich größeren Systems, des dodecavalenten Clusters **22** angegangen werden, der zum ersten Mal in der Dissertationschrift von M. Dubber erwähnt ist<sup>77</sup>, bisher aber noch nie in ausreichender Menge für eine NMR-Untersuchung und anschließende ELISA-Tests zur Verfügung stand. Der Cluster **22** besteht wie **16** aus drei identischen Untereinheiten, die allerdings sehr komplex sind. Aufbauend auf dem Bromhexylglucosid **17** wird durch Perallylierung der Ring-OH-Gruppen und einer nachfolgenden Sequenz aus Hydroborierung/Oxidation und Glycosylierung das Spacerglucosid **20a** erhalten, das am Zuckerring vier  $\alpha$ -Mannosylreste präsentiert (**Schema 6**)<sup>78</sup>. Nach einigen weiteren Stufen und Entschützung kann man zum Quadratsäure-modifizierten Oligomannosidmimetikum **21** gelangen, das dann in Analogie zu der Synthese des Glycoclusters **16**, mit Tris-2-aminoethylamin in guter Ausbeute zu dem gewünschten Produkt **22** umgesetzt werden konnte (**Schema 7**). Der strukturperfekte Cluster **22** konnte von Edukten oder kleineren Nebenprodukten mittels GPC gereinigt werden. Die Synthese von Verbindung **22** verlief guter Ausbeute, aufgrund der sehr hohen Anzahl vorangehender Synthesestufen konnten jedoch nur 8 mg Produkt erhalten werden, was für die durchzuführenden Charakterisierungen und Tests jedoch ausreichte.

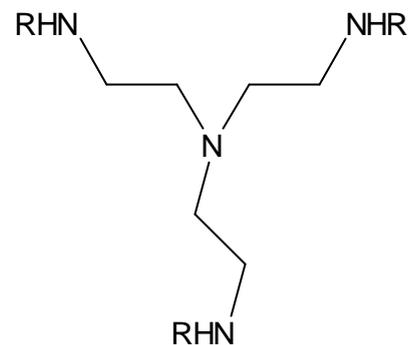


**Schema 6:** Synthese von **21** nach M. Dubber<sup>77,78</sup>

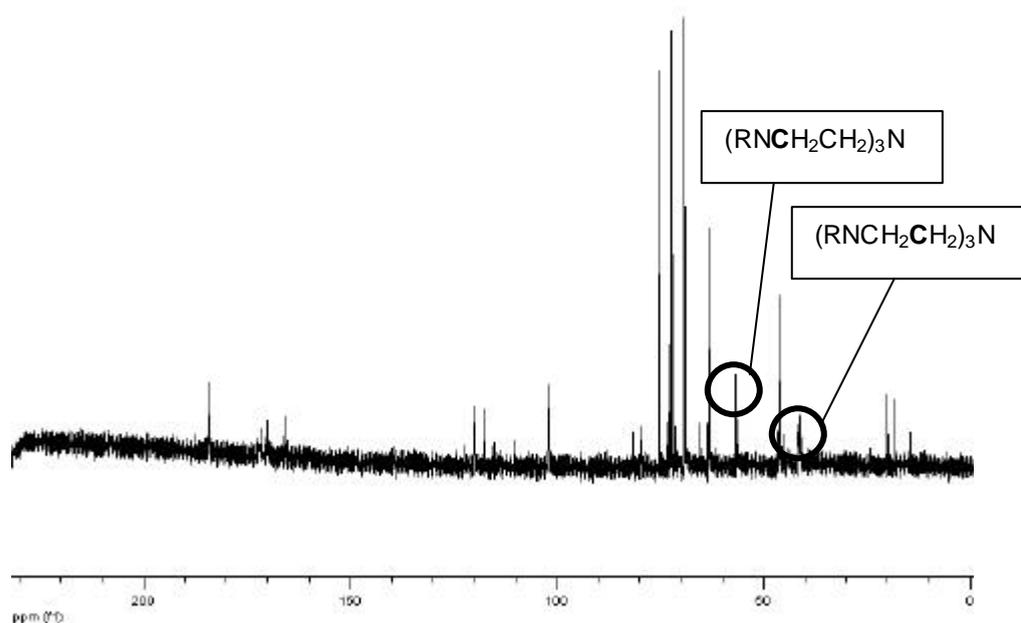


Durch an den Molekülen **16** und **22** durchgeführten NMR-Untersuchungen konnte die Kernregion des Dodecaclusters **22** vollständig charakterisiert werden. Anders als von M. Dubber beschrieben ließen sich beide Substanzen in D<sub>2</sub>O lösen. Dieser beobachtete Unterschied zum früher beschriebenen Löslichkeitsverhalten könnte ein Hinweis auf eine Verunreinigung sein, die auch im Zusammenhang mit der Vergleichbarkeit älterer und aktueller ELISA-Daten diskutiert werden muss (siehe Kapitel 3.4.1).

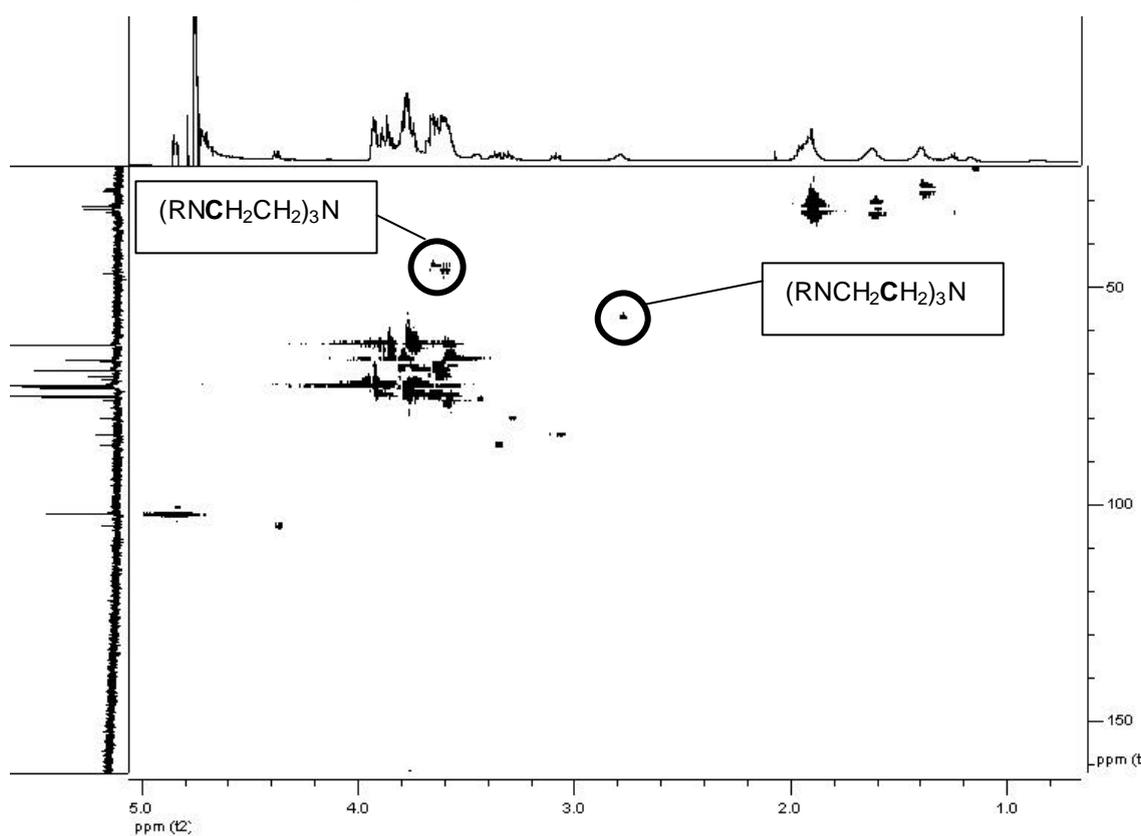
Die Protonen der Kernregion beider Cluster ließen sich in den jeweiligen <sup>1</sup>H-Spektren sowie im Falle von **22** in den 2-dimensionalen <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C-korrelierten Messungen des HSQC und HMBC detektieren. Im Falle der Kohlenstoffatome stellte sich die Analyse der Spektren als schwieriger dar, da die Relaxationszeiten der C-Atome in der Kernregion durch die Quattropolmomente der benachbarten Stickstoffatome verändert werden. Aufgrund der wesentlich geringeren Größe und besseren Zugänglichkeit von **16** konnten hier die <sup>13</sup>C-Signale noch direkt detektiert werden (**Abb. 15**), im Vergleich zu anderen <sup>13</sup>C-Signalen im gleichen Spektrum tritt hier jedoch eine deutliche Schwächung der Intensität der Signale auf. Im Falle von **22** gelang der direkte Nachweis nicht mehr, es konnten jedoch <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C-Korrelationssignale mit Protonen der Kernregion beobachtet werden, die bei den erwarteten chemischen Verschiebungen auf der <sup>13</sup>C-Achse auftraten (**Abb. 16**).



**Abb. 14:** Kernregion der Cluster **16** und **22**: 12 CH<sub>2</sub>-Protonen und 6 Kohlenstoffatome.



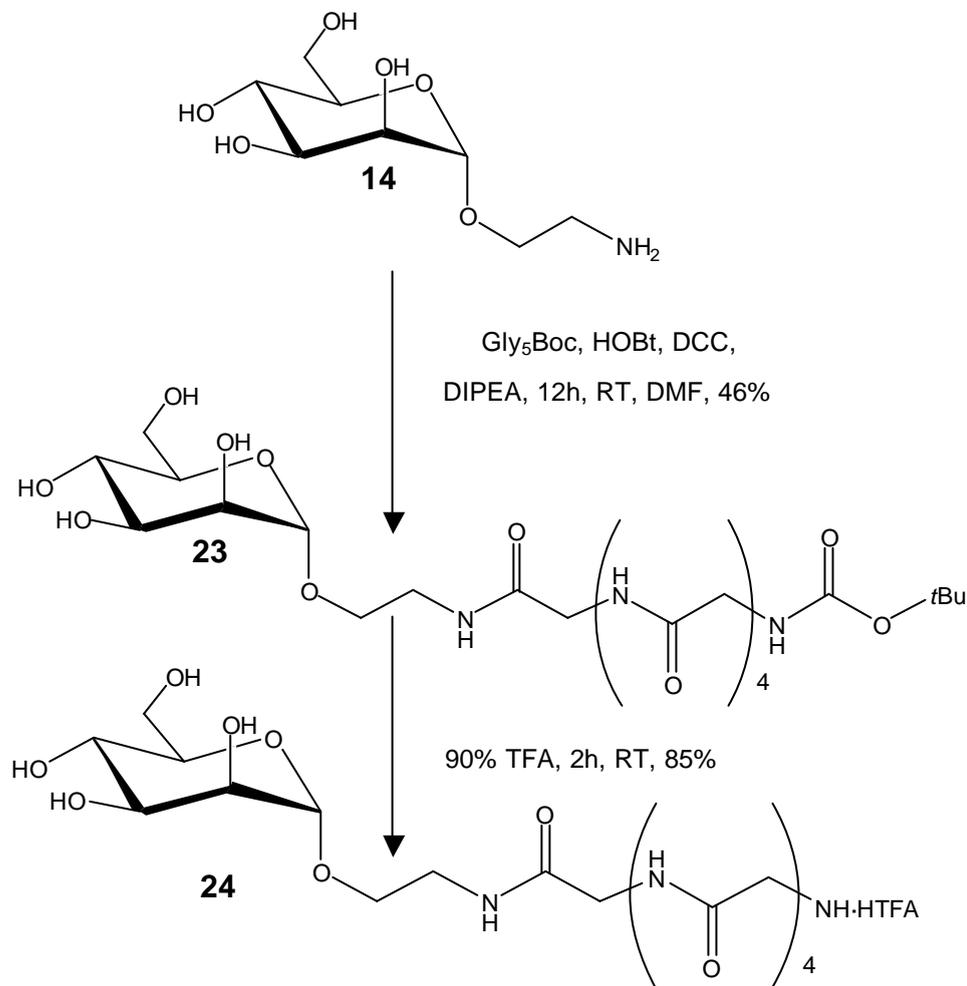
**Abb. 15:**  $^{13}\text{C}$ -Spektrum von **16**, markiert sind die Signale der Kernregion



**Abb. 16:** HSQC-Spektrum von **22**; markiert sind die Korrelationen der Kernregion; im  $^{13}\text{C}$ -Spektrum (Ordinate) ist kein korrelierendes Signal detektierbar.

## 2.2.4 Verbrückende Liganden

Dass sich möglicherweise mehrere Bindungstaschen auf dem Typ-1-fimbrialen Lektin, FimH, befinden wurde von Knight et al. postuliert<sup>57</sup> und ist auch mit Blick auf die bisher literaturbekannt Ergebnisse eine sinnvolle Vermutung. Um diese Hypothese zu überprüfen, galt es eine Liganden zu entwickeln, der mit zwei oder sogar mehreren Bindungstaschen wechselwirken, sie sozusagen verbrücken kann. Da eine der, zusätzlich zur tiefen CRD für Mannose postulierten Bindungstaschen des FimH-Proteins etwa die Größe eines Trisaccharids hat, wurde als verbrückender Ligand ein Zielmolekül bestehend aus einem Mannosylrest und dem (1→3),(1→6)-verknüpften Trisaccharid **25** gewählt.

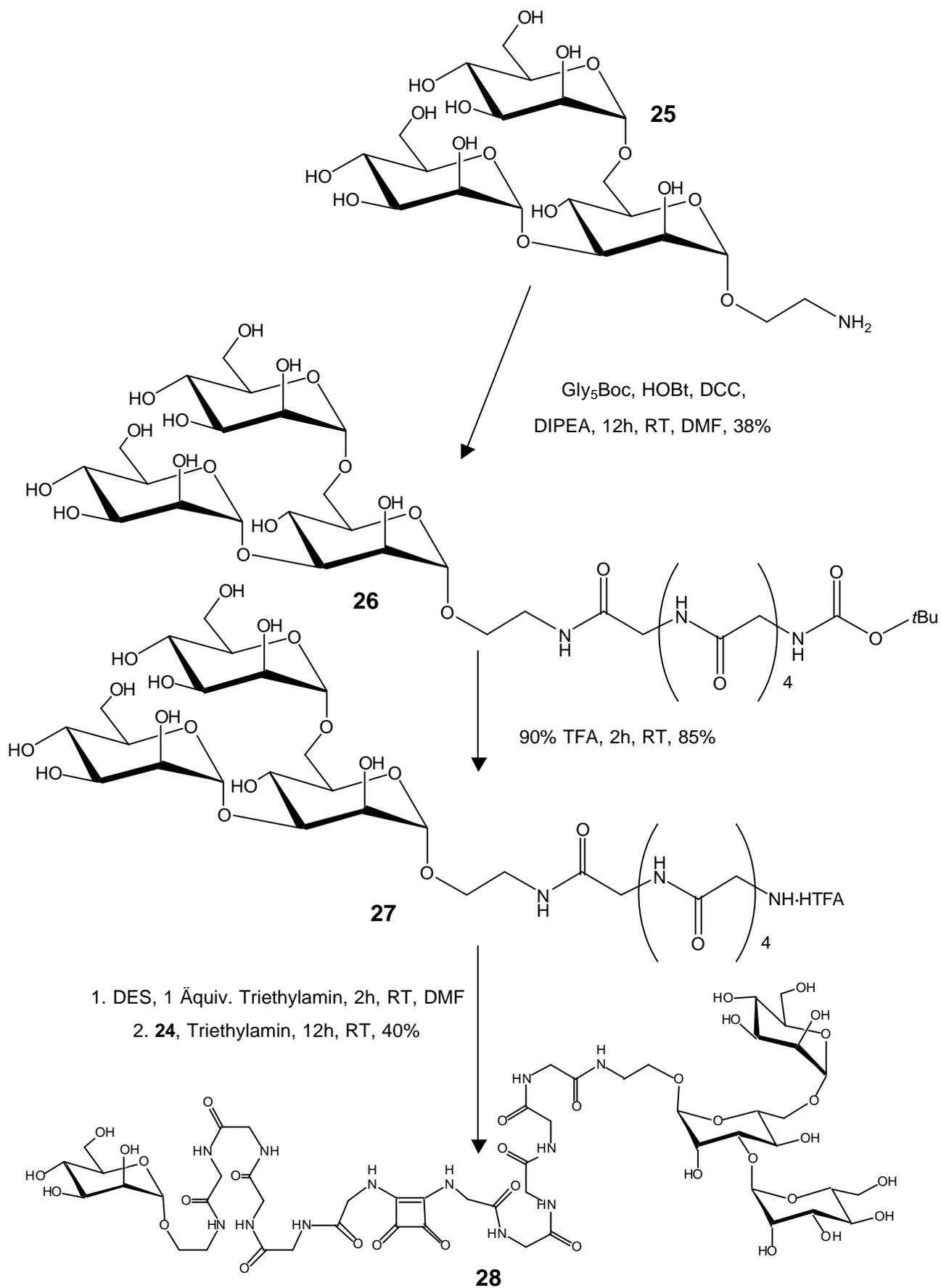


**Schema 8:** Synthese des Bausteins **24**

Die Verwendung eines aromatischen Aglycons für das Monosaccharid wurde zunächst bewusst vermieden, da die Topographie des Proteins hier eine Bindung durch Tyrosin-Tor zur zweiten Bindungstasche schlecht zulässt. Die zu überbrückende Distanz auf dem Protein wurde anhand der Kristallstruktur des Proteins mit 40 Å abgeschätzt, welche durch die Kombination der eingesetzten Bausteine überbrückt werden muss. Ausgenommen wurde bei der Problematik die Frage der Reaktionsentropie dieser Wechselwirkung, da bei einem flexiblen Liganden im Falle der Bindung der Entropieverlust durch Einschränkung der Flexibilität und Mobilität des Liganden durch freiwerdende Bindungsenergie überkompensiert werden muss. Die konvergente Synthese des Zielmoleküls **28**, die in Zusammenarbeit mit K. Döge begonnen wurde<sup>79</sup>, ist in **Schemata 8** und **9** dargestellt.

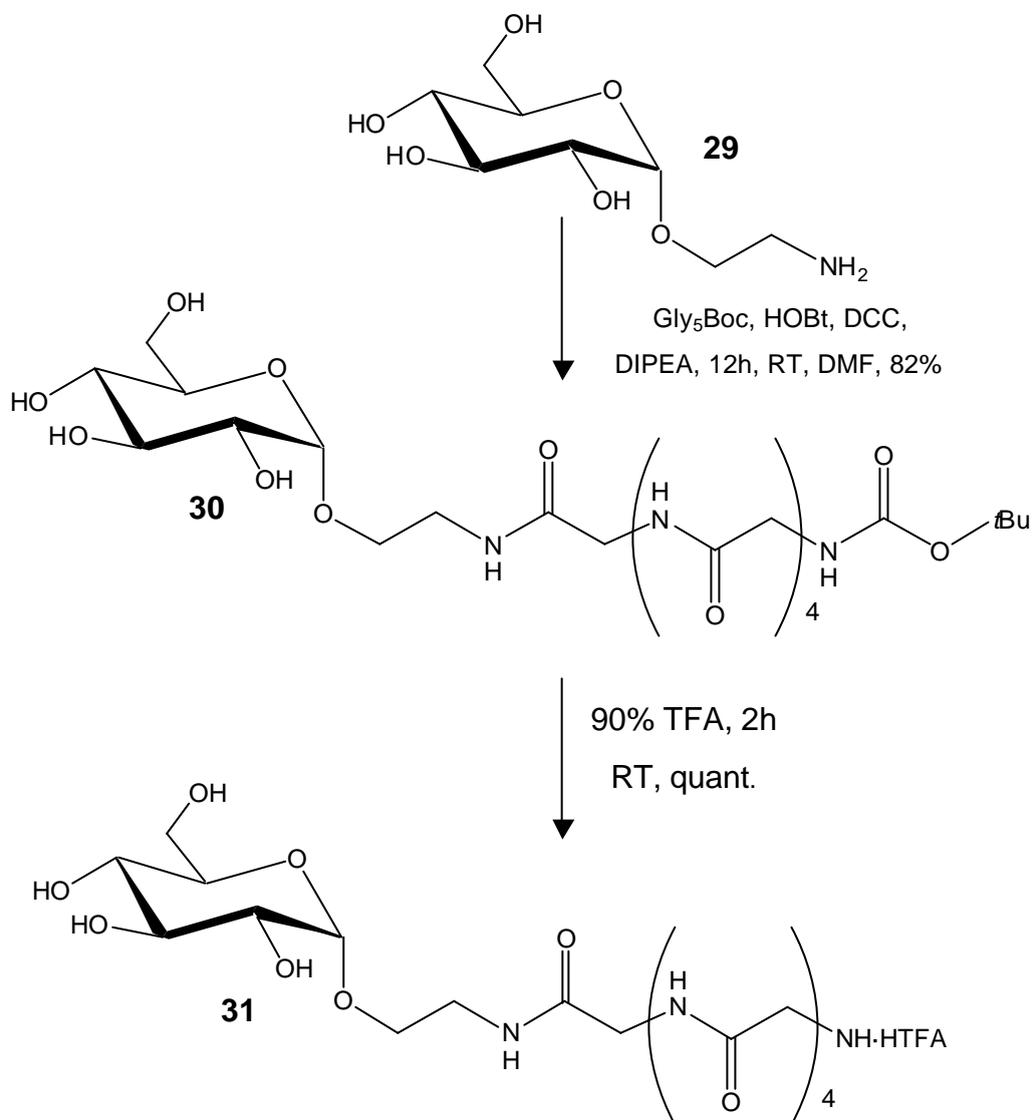
Die Synthese der jeweiligen Bausteine verlief mit mäßiger bis guter Ausbeute, wobei die Peptidkupplung ein Schlüsselproblem darstellte. Die abschließende Verknüpfung zweier Bausteine zu einem potenziell verbrückenden Liganden, wie bei Verbindung **28**, konnte nur in mäßiger Ausbeute realisiert werden. Ein Problem stellen offenbar die gewählten Pentaglycylspacer dar, deren N-Terminus nicht mehr nukleophil genug für eine schnelle und quantitative Reaktion mit dem Quadratsäureester ist. Als alternative Synthesebausteine können aminofunktionalisierte Polyethylenglycolspacer (PEG-Spacer) in Betracht gezogen werden, die jedoch noch flexibler als die eingesetzten Glycylspacer sind.

Im Zusammenhang mit der Synthese des Klammer-Moleküls **28** wurden auch ein Reihe alternativer Synthesewege besprochen, die zu weiteren interessanten Bausteinen für die Herstellung von verbrückender Liganden geführt haben. Dazu gehören die Mannoside **31** und **33**, die ausgehend vom Aminoethylmannosid **21** (**Schema 10**) und dem p-Aminophenylmannosid **5** (**Schema 11**) hergestellt werden konnten.

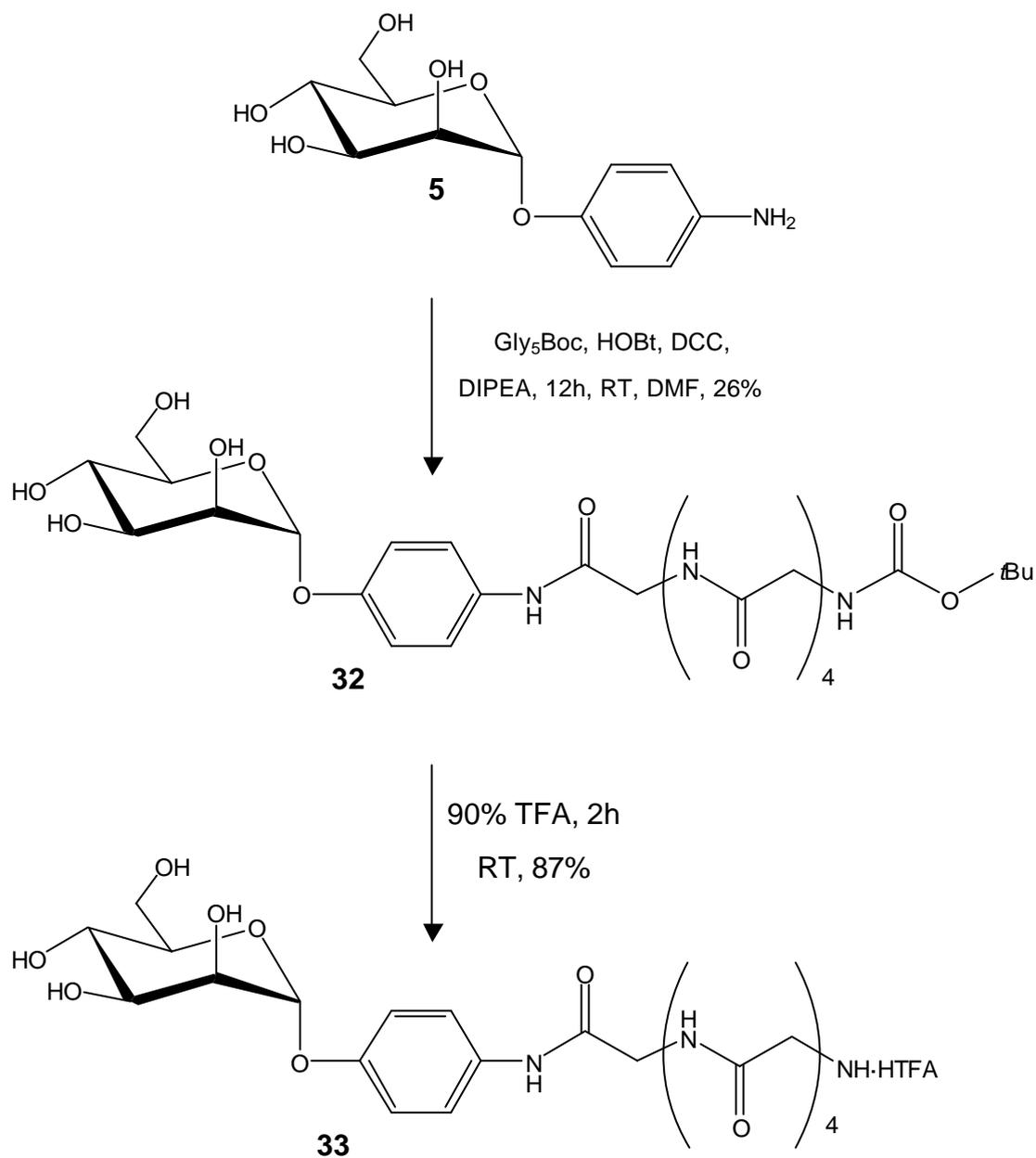


**Schema 9:** Konvergente Synthese des Liganden **28**

Da der verbrückende Ligand **28** für die Charakterisierung der Bindungstaschen auf FimH bisher aber leider nicht erfolgreich war (vgl. **Kap 3.4.4**), wurden im Rahmen dieser Arbeit mit **31** und **33** zunächst keine weiteren Synthesen durchgeführt.



**Schema 10:** Alternative Verbindungen als modulare Bausteine zur Ligandensynthese analog zu **28**



**Schema 11:** Alternative Verbindungen als modulare Bausteine zur Ligandensynthese analog zu **28**

## 2.2.5 BSA-Konjugate

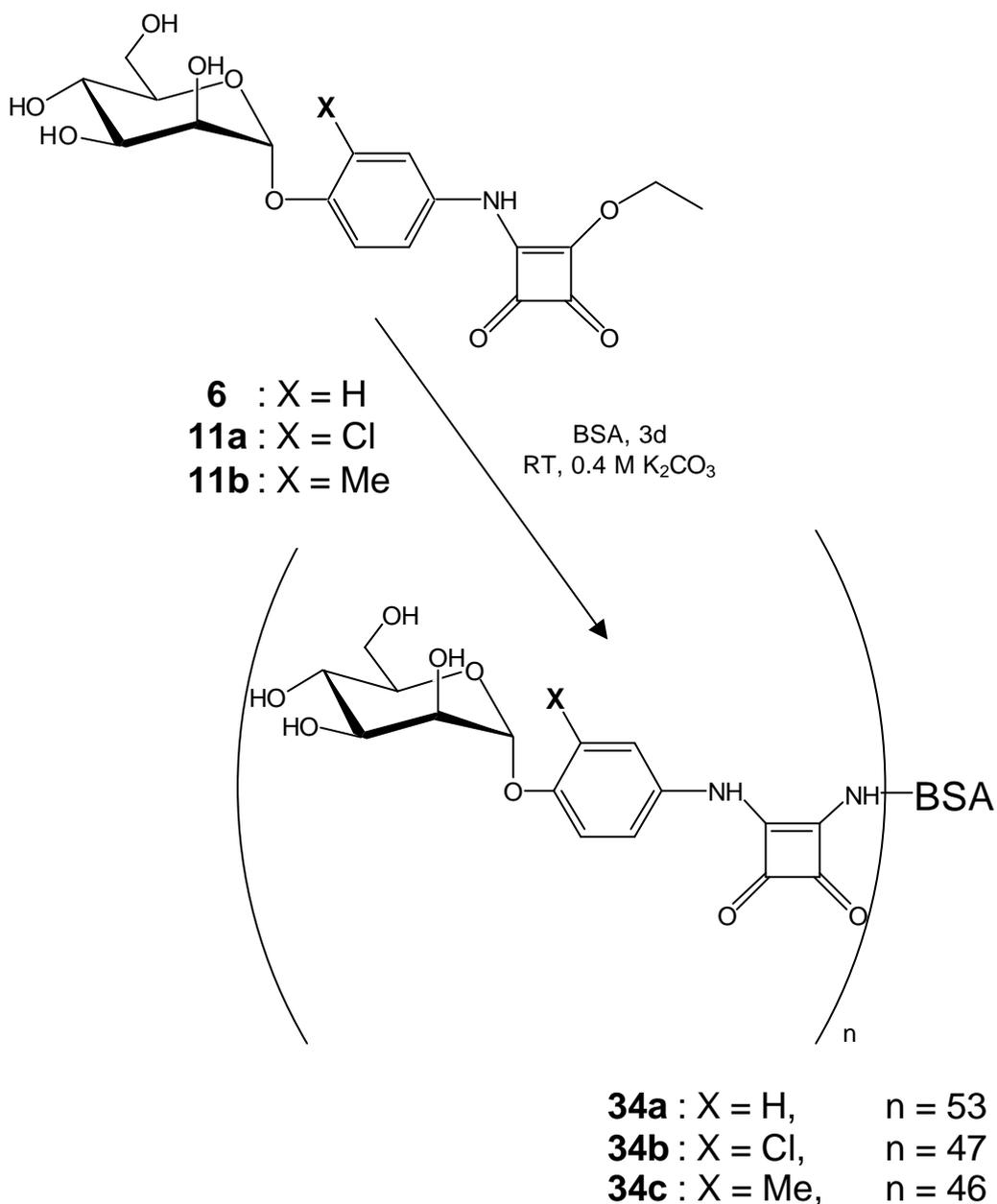
Eine bereits gut evaluierte Möglichkeit, quasi beliebige Monomere multivalent auf einer Proteinoberfläche zu präsentieren, ist die Konjugation an große, wasserlösliche Proteine<sup>80,81</sup>. Ein hierfür oft verwendetes Protein ist BSA. Für die Konjugation steht eine Vielfalt von Reagenzien bzw. Methoden zur Verfügung, um an freie funktionelle Gruppen auf der Proteinoberfläche zu binden<sup>82</sup>. Ein hoher Belegungsgrad des Proteins kann erreicht werden, wenn die freien Aminogruppen der Lysinseitenketten mittels eines geeigneten Reagenzes mit dem Monomer verbunden werden.

Für die vorliegende Arbeit bietet es sich an, die als Monomer dargestellten und bezüglich ihrer biologischen Aktivität evaluierten Mannosylquadratsäuremonoester **6**, **11a** und **11b** direkt mit BSA<sup>83</sup> umzusetzen, da in diesen Molekülen mit der Quadratsäurepartialstruktur bereits eine Einheit vorliegt, die direkt zur Konjugation genutzt werden kann. Die Anzahl der Monomere, die pro Proteineinheit konjugiert wird liegt bei hohem Überschuss an Monomer (ca. 100 Äquivalente) und langer Reaktionszeit (3 Tage) etwa bei 50 bis 60 Einheiten Monomer<sup>80</sup>.

Ein Nachteil dieser Form der Präsentation vieler Liganden auf einem großen Molekül liegt in der stark eingeschränkten Kontrolle über die Anzahl der gebundenen Monomere und in der mangelnden Homogenität bzw. Polydispersität der entstehenden Konjugate. Im Gegensatz zu Glycodendrimeren kann bei den Vorliegenden BSA-Konjugaten keine Aussage über die genaue Anzahl der gebundenen Kohlenhydrat-Einheiten und die Abstände dieser Einheiten zueinander gemacht werden. Die MALDI-ToF-Analyse<sup>84</sup> der erhaltenen BSA-Konjugate lieferte anhand der Masse der Konjugate nur einen durchschnittlichen Belegungsgrad, d.h. die durchschnittliche Anzahl an Einheiten Monomer, die pro Protein gebunden sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die drei Substanzen **6**, **11a** und **11b** mit BSA umgesetzt, was zu den BSA-Konjugaten **34a**, **34b** und **34c** führte (**Schema 12**). Der Belegungsgrad nahm von Verbindung **34a** mit  $n = 53$  zu den beiden Derivaten mit höher substituierten Phenylsystem mit **34b** und **34c** mit  $n = 46$  und  $47$  ab. Eine Interpretation dieser Unterschiede ist jedoch aufgrund der geringen Differenz im Belegungsgrad nicht sinnvoll.

Die Isolierung der BSA-Konjugate erfolgte durch den Transfer der Reaktionslösung in einen Dialyseschlauch mit einer Durchlässigkeit für Substanzen unter 12 bis 14kD. Eine dreitägige Dialyse und nachfolgende Gefriertrocknung lieferte dann die gewünschten Produkte.



**Schema 12:** BSA-Konjugation

### 3. Biologische Untersuchung der Liganden

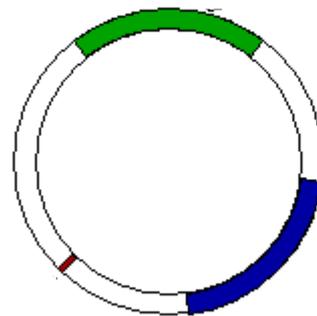
#### 3.1 Fimbrien exprimierende Bakterien

Um die antiadhäsiven Eigenschaften der synthetischen Substanzen mit dem Typ-1-fimbrialen Lektin evaluieren zu können, muss ein geeignetes Testsystem vorhanden sein. Zu diesem Zweck wurden gentechnisch veränderte Bakterien geschaffen, welche die Typ-1-Fimbrien überexprimieren und keine anderen Pili. Dieses wurde durch Isolierung des Typ-1-Fimbrien codierenden Gens, Subklonierung dieses Gens in ein geeignetes Plasmid (**Abb.20**<sup>85</sup>) und Einschleusung des Plasmides in einen unfimbrierten *E.-coli* K12 Stamm möglich<sup>86</sup>.

Als Plasmid wurde das sogenannte pPKI4-Plasmid (nach Per Klemm; das 4. Plasmid aus seinem Labor wurde in diesem Fall verwendet).

Die ebenfalls auf dem pPKI4-Plasmid vorhandenen Ampicillin Resistenz erfüllt in diesem Fall zwei Zwecke. Zum einen ist es möglich Bakterien, die dieses Gen nicht tragen, durch eine Zugabe von Ampicillin in das Nährmedium abzutöten, zum anderen kann der plasmidtragende Bakterienstamm nun dazu gezwungen werden, die gewünschten Fimbrien in ungewöhnlich hoher Menge zu exprimieren.

Auf diese Weise können je nach Verwendungszweck nun die ganzen Bakterien, die Fimbrien oder nur die FimH-FimC-Einheit isoliert und für Untersuchungen eingesetzt werden können<sup>87,88</sup>. Ferner kann das ganze Bakterium für die Evaluation neuer Liganden verwendet werden, wie es auch in den hier beschriebenen Tests erfolgte. Dabei wird generell die Bindung der Bakterien an eine Oberfläche mit der Bindung an einen Inhibitor verglichen.



**Abb. 20:**  
Schematischer Aufbau eines Plasmides<sup>85</sup>, grün und blau sind zwei eingefügte Gene dargestellt, z.B. eine Antibiotikaresistenz und ein Fimbrien codierendes Gen. Die rote Markierung stellt den Beginn der Ablesung dar.

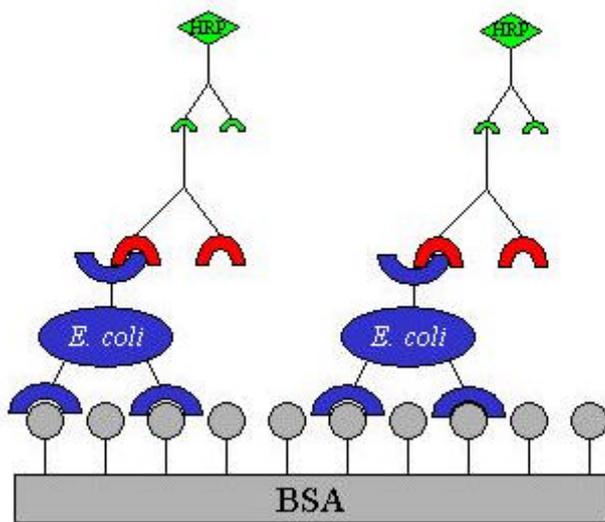
## 3.2 Beschreibung der Testsysteme

Um die inhibitorische Potenz der dargestellten Liganden zu bestimmen, wurden zwei unterschiedliche Testverfahren angewandt. Die einfachste und schnellste der beiden Methoden - der Hämagglutinations-Hemmtest - basiert auf dem Prinzip, dass eine Suspension von Teilchen instabil wird, wenn deren Einzelteile miteinander vernetzt werden<sup>89</sup>. Es bildet sich ein sogenanntes Agglutinat. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Meerschweinchenerythrocyten, die eine große Anzahl von Mannosylresten auf ihrer Oberfläche präsentieren, mit dem zu untersuchenden Inhibitor und Fimbrien exprimierenden Bakterien vermischt. Ohne Inhibitor führt die Wechselwirkung zwischen Bakterien und Erythrocyten einer Vernetzung, die Suspension wird instabil und ein fein verteiltes Präzipitat kann nach ca. 15 min. am Boden des Untersuchungsgefäßes (hier V-förmige Mikrotiterplatten) ausgemacht werden. Bei Anwesenheit eines Inhibitors wird bei ausreichender Konzentration die Agglutination verhindert und die Erythrocyten sinken in derselben Zeit einfach zu Boden und bilden eine punktförmige Zusammenballung. Die Auswertung dieses Tests erfolgt rein optisch, wobei diejenige Inhibitorkonzentration einer Verdünnungsreihe, die gerade noch zur erfolgreichen Inhibition der Agglutination von Bakterien und Erythrocyten führt als Inhibitionstiter (IT in mol / l) bezeichnet wird. Der relative Inhibitionstiter (RIT, dimensionslos) wird mittels Division des Inhibitionstiter eines Standards (hier Methylmannosid mit RIT = 1) durch den Inhibitionstiter der zu untersuchenden Substanz gebildet. Diese Größe ist, wie auch der vergleichbare RIC<sub>50</sub>-Wert im nachfolgend beschriebenen ELISA-Verfahren, besser reproduzierbar als der Inhibitionstiter, der von schlecht kontrollierbaren Einflüssen wie der Menge der exprimierten Fimbrien auf den Bakterien abhängig ist.

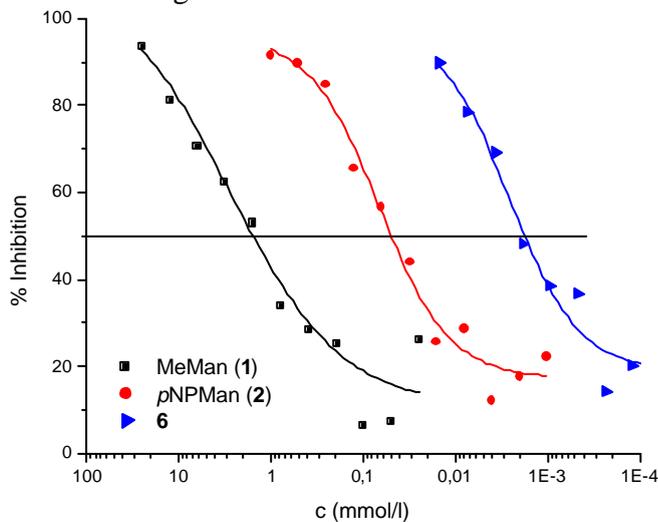
Das ebenfalls angewandte ELISA-Verfahren<sup>45</sup> (Enzyme Linked Immunsorbent Assay) liefert vergleichbare Aussagen wie der Hämagglutinations-Hemmtest, ist aber anders aufgebaut und bezüglich der erhaltenen Messwerte präziser. Es wurde ein kompetitiver ELISA verwendet und (**Abb. 21**) über ein gekoppeltes Antikörpersystem detektiert, ob fimbrierte Bakterien an eine auf der Mikrotiterplatte immobilisierte Mannanschicht binden oder die Adhäsion durch die zu testende Substanz erfolgreich verhindert wird. Ein kovalent an einen der Antikörper gebundenes Enzym leitet dann eine Farbreaktion (**Abb. 22**) ein, deren optischen Dichten (OD) am Ende des

Versuchs mit Blindwerten ( $OD_{\text{blind}}$ ) verglichen wird. Der Prozentsatz der Inhibition wird nach  $x = ((OD_{\text{blind}} - OD) / OD) * 100$  berechnet.

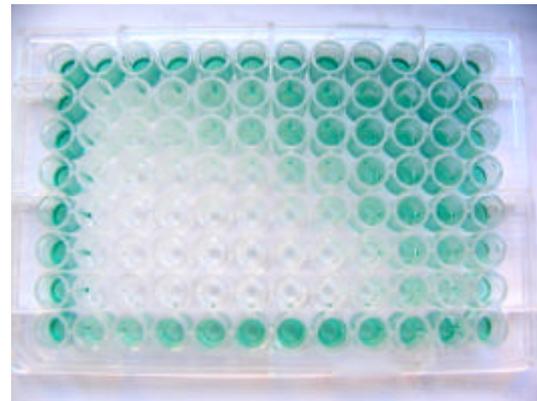
Aus den erhaltenen Werten für den Anteil der Inhibition der Bakterien-Mannan Wechselwirkung in Abhängigkeit von der Konzentration des Inhibitors kann eine sigmoide Kurve (**Abb. 23**) ermittelt werden, anhand deren bei 50%iger Inhibition der  $IC_{50}$ -Wert ermittelt wird, welcher der Inhibitionskonzentration entspricht. Wie oben beschrieben, kann auch hier ein gut reproduzierbarer relativer Vergleichswert ( $RIC_{50}$ ) mittels einer Vergleichssubstanz (MeMan,  $RIC_{50} = 1$ ) erhalten werden.



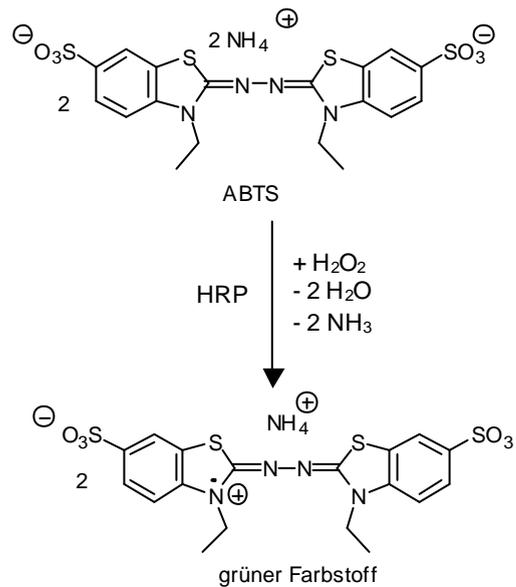
**Abb. 21:** Aufbau des Sandwich ELISA, die an eine Mannanoberfläche adhären Bakterien werden von einem Antikörper (rot) gebunden, der die Bindung eines zweiten, HRP-konjugierten Antikörpers (grün) ermöglicht.



**Abb. 23:** Beispiel der graphischen Auswertung, die beiden Standards MeMan (1) und pNP-Man (2) im Vergleich mit Verbindung 6.



**Abb. 22:** Entwickelte ELISA-Platte (Grünfärbung von Feldern mit schwacher Inhibition)



**Schema 13:** Farbreaktion von ABTS und  $H_2O_2$  unter Peroxidase-katalyse zu einem grünen Farbstoff (HRP = horse radish peroxidase).

### 3.3 Modifikation des ELISA

In allen durchgeführten ELISA-Experimenten wurde als Oberflächenbeschichtung der Mikrotiterplatte Mannan gewählt, an das sich die Bakterien im Falle einer nicht erfolgreichen Inhibition anhaften. Da Mannan ein sehr heterogenes Polysaccharid ist stellte sich die Frage, ob die Testergebnisse die mit immobilisiertem Mannan als Oberfläche erhalten wurden, die von der Zusammensetzung des Polysaccharids beeinflusst werden. Um eine eventuelle Verfälschung von Testergebnissen soweit wie möglich auszuschließen, wurden alternative, homogene Beschichtungssubstanzen getestet, und mit der Mannanoberflächen verglichen.

Als alternative Oberflächenmaterialien wurden die Glycoproteine RNaseB und Ovalbumin gewählt. Die Beschichtung erfolgte analog zum Verfahren mit Mannan (vgl. 7.2.2). In **Tabelle 3** werden die  $IC_{50}$ -Werte der Vergleichssubstanzen Methylmannosid (**1**) und *p*NP-Mannosid (**2**) bei Inhibitionsexperimenten auf unterschiedlichen Oberflächen gegenüber-gestellt.

Die gemessenen  $IC_{50}$ -Werte zeigen, dass die Verwendung von verschiedenen Mannose-präsentierenden Biopolymeren innerhalb der im System üblichen Abweichungen keine signifikanten Unterschiede ergibt.

Substanz	$IC_{50}$ ( $\mu\text{mol} / \text{l}$ )	$IC_{50}$ ( $\mu\text{mol} / \text{l}$ )	$IC_{50}$ ( $\mu\text{mol} / \text{l}$ )
	Mannan	Ovalbumin	RNaseB
<b>1</b>	1050	2500	2800
<b>2</b>	23	40	21

**Tabelle 3:** Vergleich von Inhibitionswerten der Vergleichssubstanzen MeMan (**1**) und *p*NPMan (**2**) auf unterschiedlichen Oberflächen.

### 3.4 Testergebnisse

Mittels Hämagglutinations-Hemmtest und ELISA wurden sowohl die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Substanzen, als auch eine Reihe weiterer Verbindungen bezüglich ihrer antiadhäsiven Eigenschaften mit Typ-1-fimbrierten Bakterien getestet. Der Hämagglutinations-Hemmtest spielte hierbei auch die Rolle einer Vorprobe. Nur die deutlich aktiven Substanzen wurden für einen folgenden ELISA ausgewählt, der mit höherem Zeit- und Materialaufwand verbunden ist.

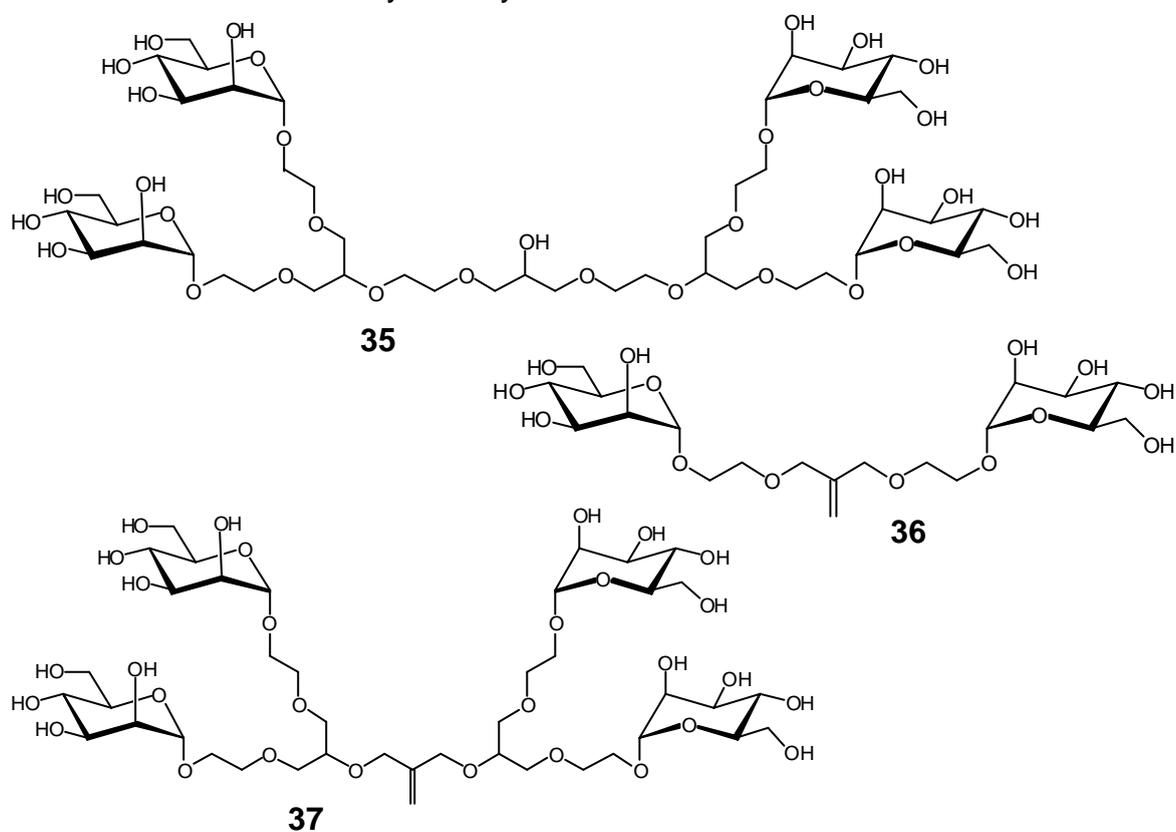
Alle getesteten Verbindungen werden nachfolgend in Gruppen unterteilt, die einen Zusammenhang zwischen der Architektur des jeweiligen Liganden und dem erhaltenen Testergebnis verdeutlichen sollen. Die Testergebnisse sind, soweit nicht anders vermerkt, Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen.

Für den Hämagglutinations-Hemmtest werden der Inhibitionstiter (IT, die kleinste Konzentration, bei der noch Inhibition stattfindet), die ermittelte Standardabweichung (STDEV) und der relative Inhibitionstiter (RIT) angegeben. Die RIT-Werte können aufgrund der unterschiedlichen Messwerte für den verwendeten Standard Methylmannosid bei gleichem Inhibitionstiter stark voneinander abweichen (z.B. bei den Substanzen **32** und **37**). Dieses resultiert aus den stark unterschiedlichen Eigenschaften der Bakterienpopulationen, die an verschiedenen Tagen erhalten wurden. Für Vergleiche zwischen Substanzen sind daher immer die relativen Werte heranzuziehen.

Analog wird im ELISA zunächst der  $IC_{50}$ -Wert ermittelt (Konzentration des Inhibitors, bei der 50% der Interaktionen zwischen Bakterien und Oberfläche unterbunden werden). Aus drei Messungen ergibt sich auch hier die Standardabweichung und der  $RIC_{50}$ -Wert bezogen auf Methylmannosid (**1**).

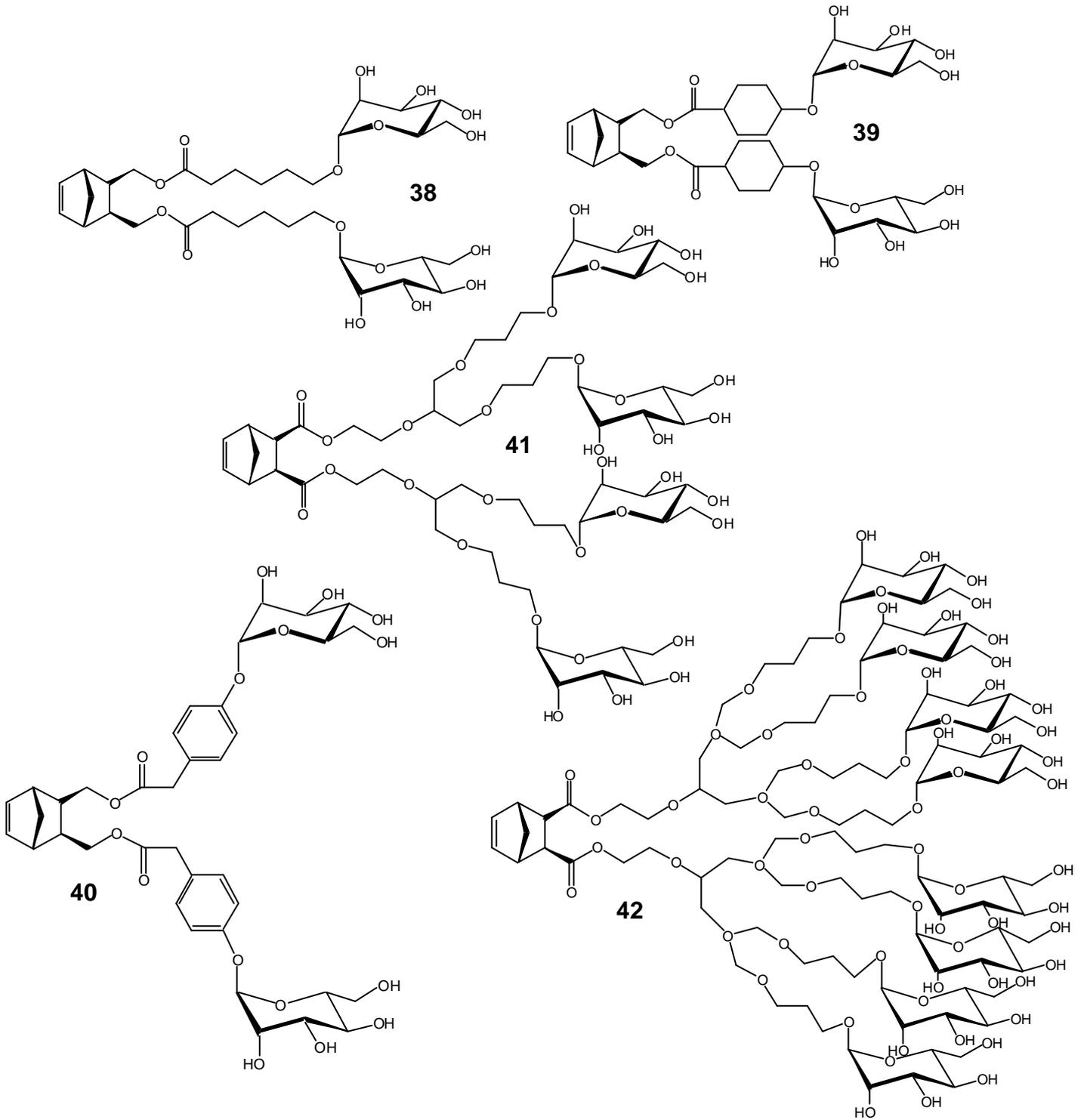
### 3.4.1 Testung von Glyoclustern

Die im Laufe dieser Arbeit getesteten Glyocluster unterscheiden sich grundlegend in ihrer Architektur und der Anzahl präsentierter Mannosylreste. Trotzdem bewegt sich die inhibitorische Potenz dieser Substanzen innerhalb von zwei Größenordnungen. Im folgenden (**Schemata 14 bis 16**)<sup>73</sup> werden einige Glyocluster und ihre Testergebnisse miteinander verglichen. Verbindungen **35 bis 37** sind erstmals von M. Boysen dargestellte Glyocluster auf Basis von Glycerin-Glycol-Dendrimern<sup>90</sup>, die Substanzen **38 bis 42** wurden von F. Thieme als Vorstufen für durch Ring-Öffnungs-Metathese zu erhaltende Polymere synthetisiert<sup>91</sup>.



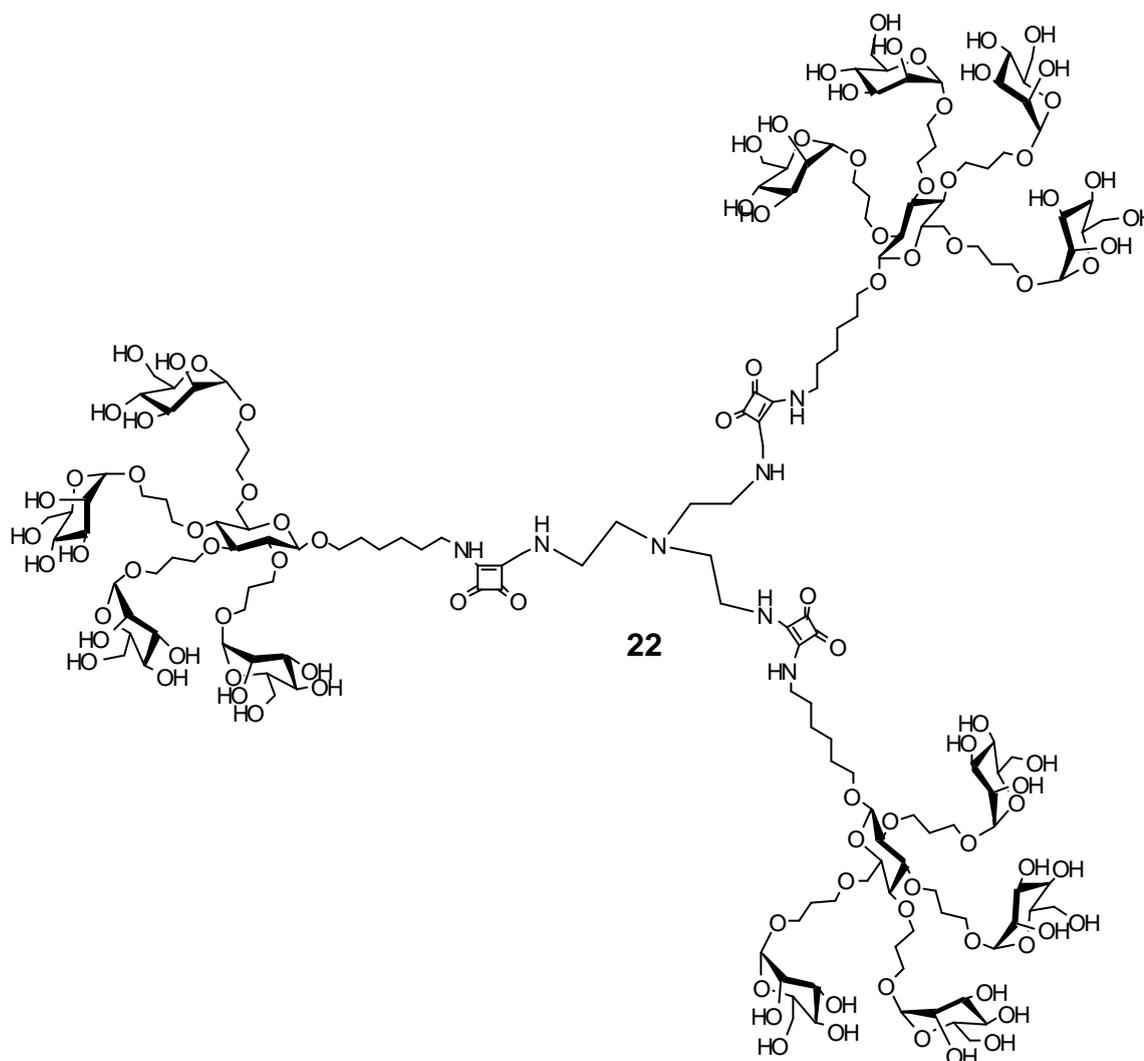
Substanz	IT [ $\mu\text{mol} / \text{l}$ ]	STDEV [ $\mu\text{mol} / \text{l}$ ]	RIT	IC <sub>50</sub> [ $\mu\text{mol} / \text{l}$ ]	STDEV [ $\mu\text{mol} / \text{l}$ ]	RIC <sub>50</sub>
<b>35</b>	4.7	1.6	11.6	82	17	13
<b>36</b>	6.8	2.8	7.9	118	43	6
<b>37</b>	3.5	1.5	15.6	187	3	10

**Schema 14:** Inhibitorisches Potential von Glyoclustern auf Basis von Glycerin- und Glycerin-Glycol-Dendrimern<sup>73,90</sup>



Substanz	IT [ $\mu\text{mol} / \text{l}$ ]	STDEV [ $\mu\text{mol} / \text{l}$ ]	RIT	IC <sub>50</sub> [ $\mu\text{mol} / \text{l}$ ]	STDEV [ $\mu\text{mol} / \text{l}$ ]	RIC <sub>50</sub>
38	2.1	1.3	232.5	51.3	39.5	111.6
39	5.2	4.6	91.8	24.0	9.3	205.1
40	9.8	8.5	48.6	329	317	24.9
41	2.8	1.8	169.8	89.6	67.1	65.0
42	3.8	1.3	124.8	-	-	-

Schema 15: Testung der für spätere Polymerisation synthetisierten Glycocluster<sup>91</sup>

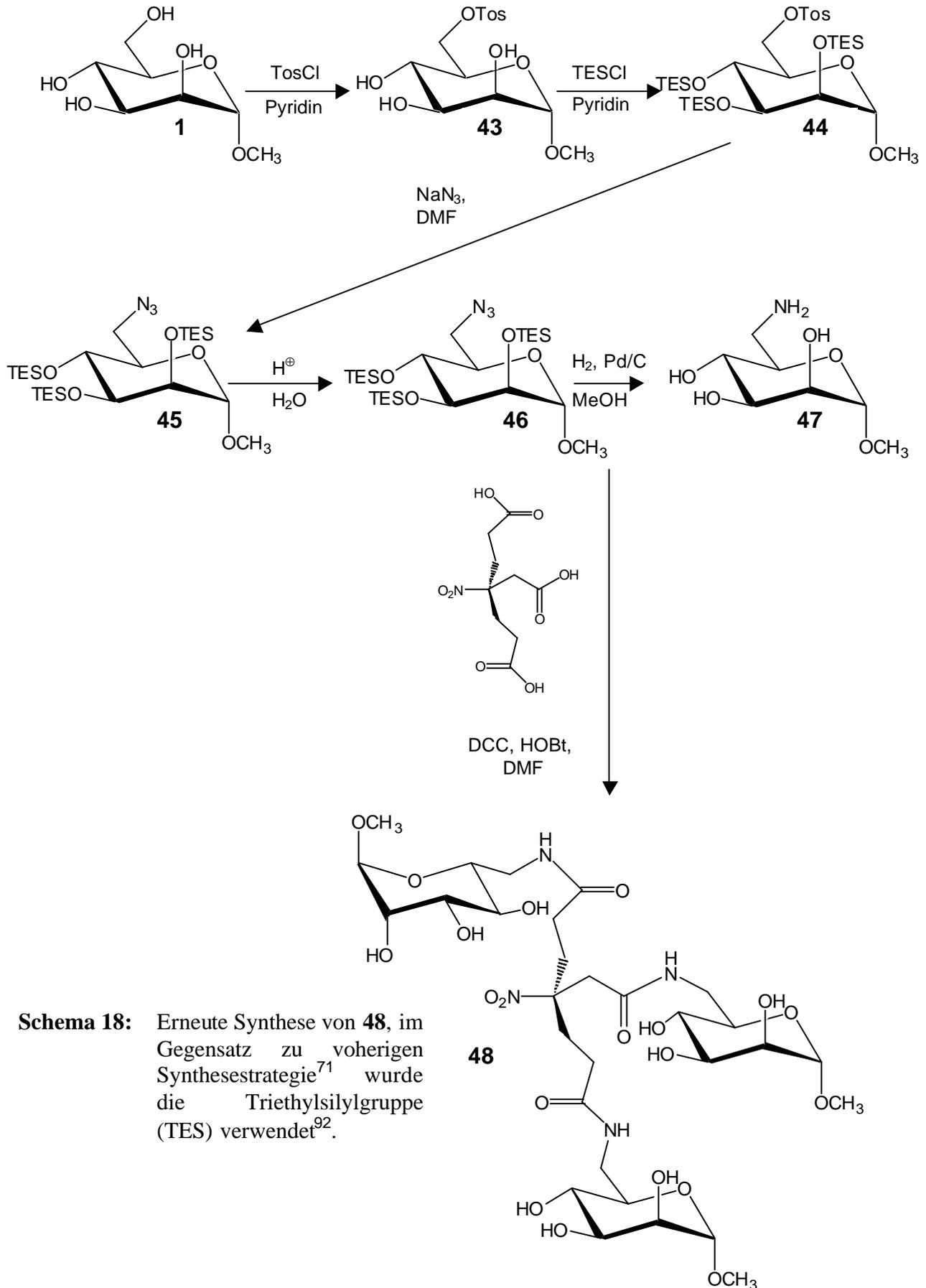


Substanz	IT [ $\mu\text{mol} / \text{l}$ ]	STDEV [ $\mu\text{mol} / \text{l}$ ]	RIT	IC <sub>50</sub> [ $\mu\text{mol} / \text{l}$ ]	STDEV [ $\mu\text{mol} / \text{l}$ ]	RIC <sub>50</sub>
<b>1</b>	130	-	1	1000	-	1
<b>2</b>	2.6	-	50	23	-	50
<b>22</b>	0.64	0.28	470	8.3	3.1	130

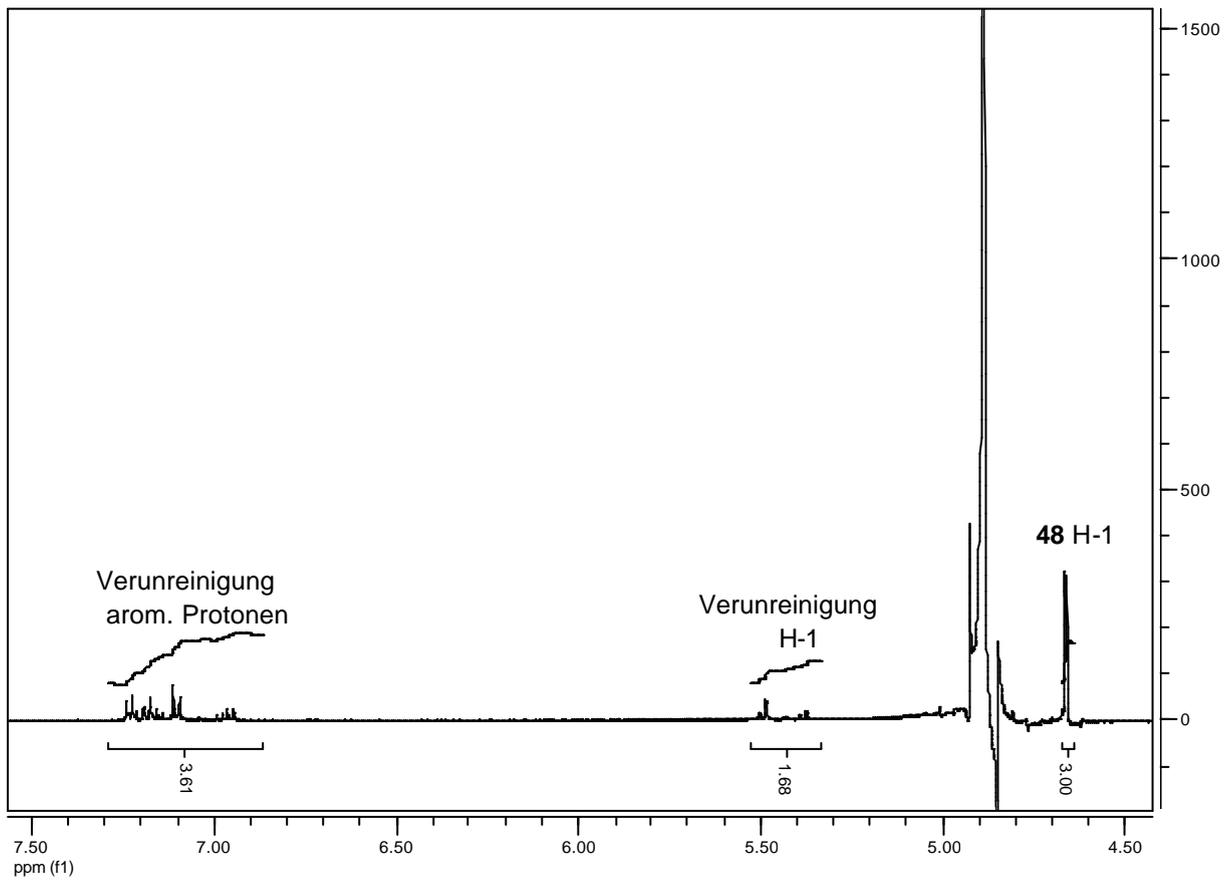
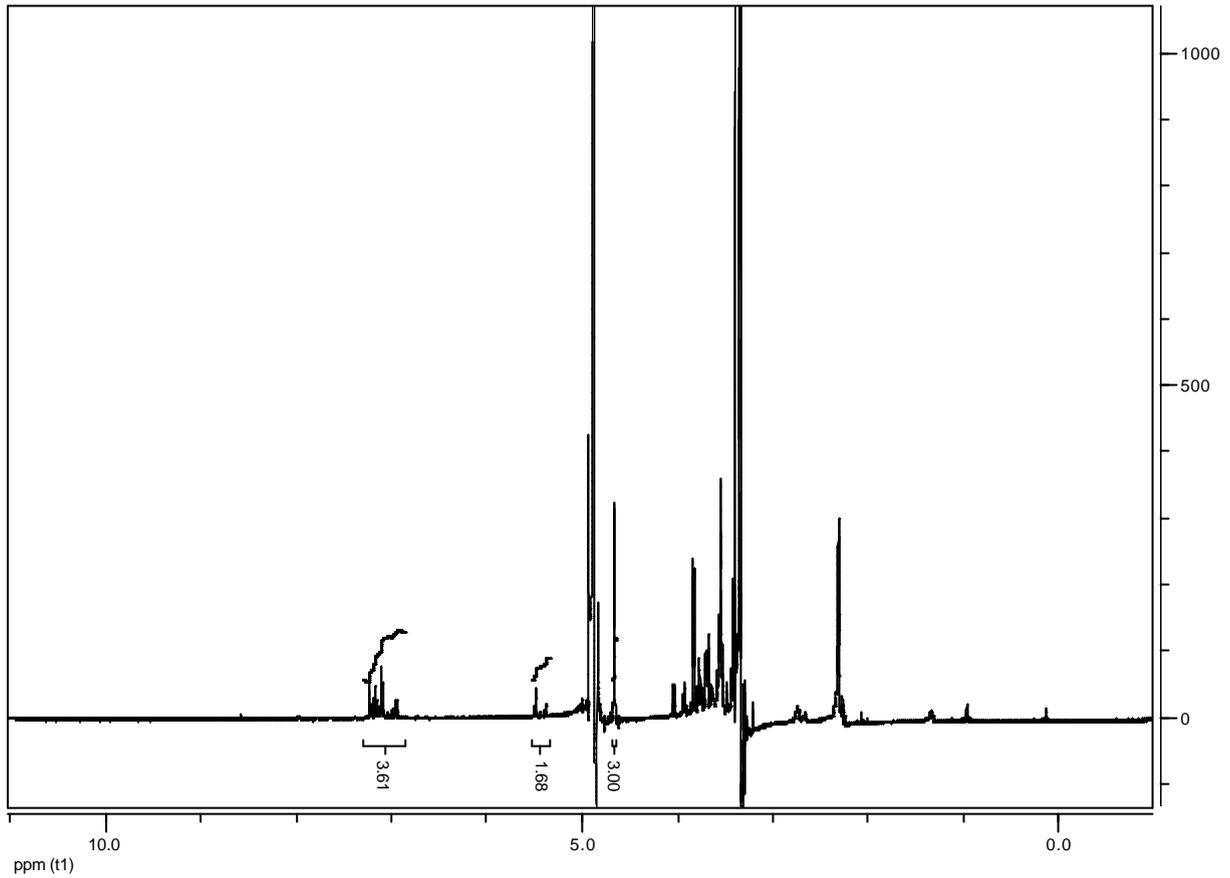
**Schema 16:** Inhibitonswert des Glycoclusters **22**<sup>73</sup> im Vergleich mit den Standards MeMan (**1**) und pNPMa (**2**)

### 3.4.2 Testung eines auf 6-Amino-6-desoxy-methylmannosid basierenden Glycoclusters

Ein zuvor durchgeführter Test bei dem ein im Rahmen einer anderen Arbeit<sup>71</sup> synthetisierte und später als Leitstruktur eingesetzte<sup>72</sup> Cluster **48** mit derivatisiertem 6-Amino-6-desoxy- $\alpha$ -D-Methylmannosid als Ligand fungieren sollte, ging von einem anderen Bindungsmodus mit invertiertem Mannosylrest in der Bindungstasche aus. Dieses Ergebnis muss aufgrund der neuen Erkenntnisse als nicht zutreffend angesehen werden. Die Verbindung wurde neu synthetisiert<sup>92</sup> (**Schema 17**) und auf ihre inhibitorische Potenz getestet. Glycocluster **48** zeigte in früheren Studien<sup>58,71</sup> eine erhebliche inhibitorische Potenz. Dieses Ergebnis musste jedoch aufgrund späterer Tests an Substanzen ähnlicher Struktur in Frage gestellt werden. Die erneute Synthese des Clusters und die Wiederholung der biologischen Tests führten zu dem Ergebnis, dass Verbindung **48** kein inhibitorisches Potential gegenüber FimH aufweist, was auch in Übereinstimmung mit dem Aufbau der Bindungstasche des Proteins steht, in der Wechselwirkungen zu vier freien OH-Gruppen eines Mannosylrestes aufgebaut werden. Die zuvor erhaltenen Testergebnisse können auf eine nicht eindeutig identifizierte Verunreinigung zurückgeführt werden, deren Masse nach MALDI-ToF 1047 D<sup>52</sup> beträgt. Diese Verunreinigung muss zudem ein oder, was wahrscheinlicher ist, mehrere Mannosylreste mit aromatischem Aglycon aufweisen, was anhand von NMR-Signalen mit entsprechender chemischer Verschiebung und Multiplizität erkennbar ist (**Schemata 18** und **19**).

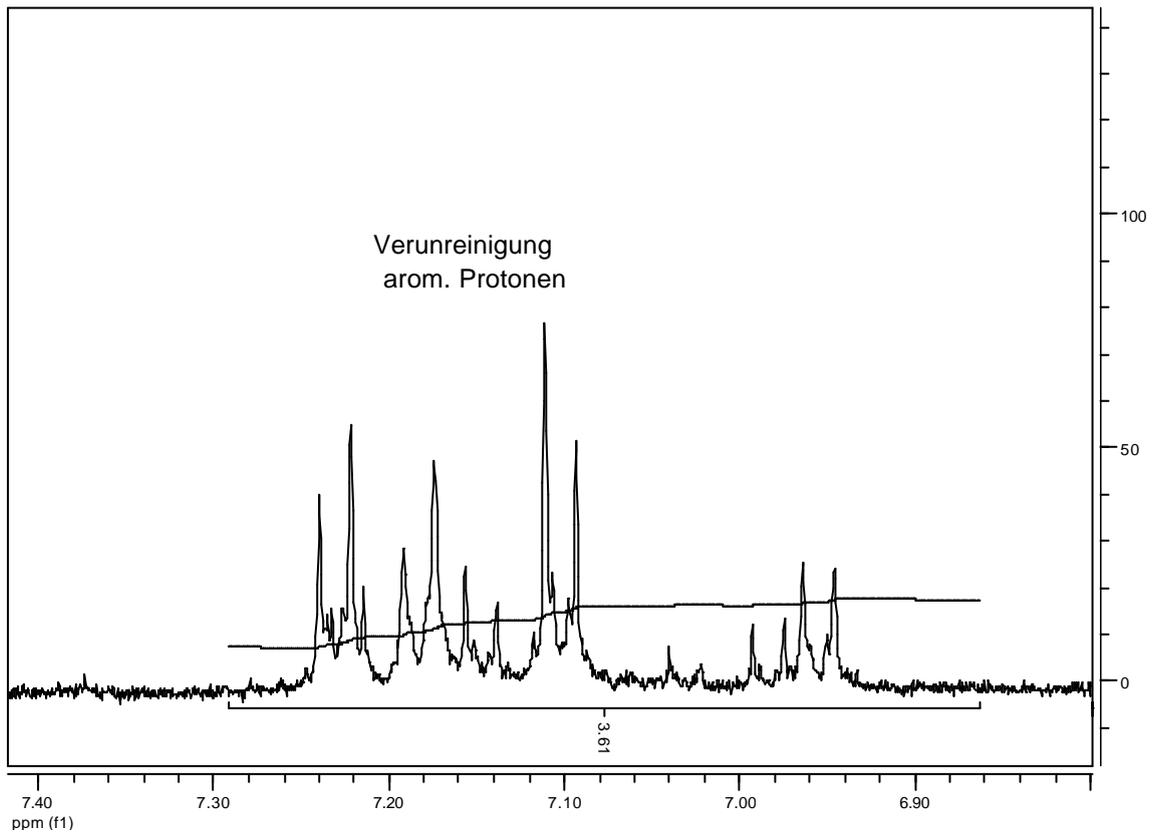
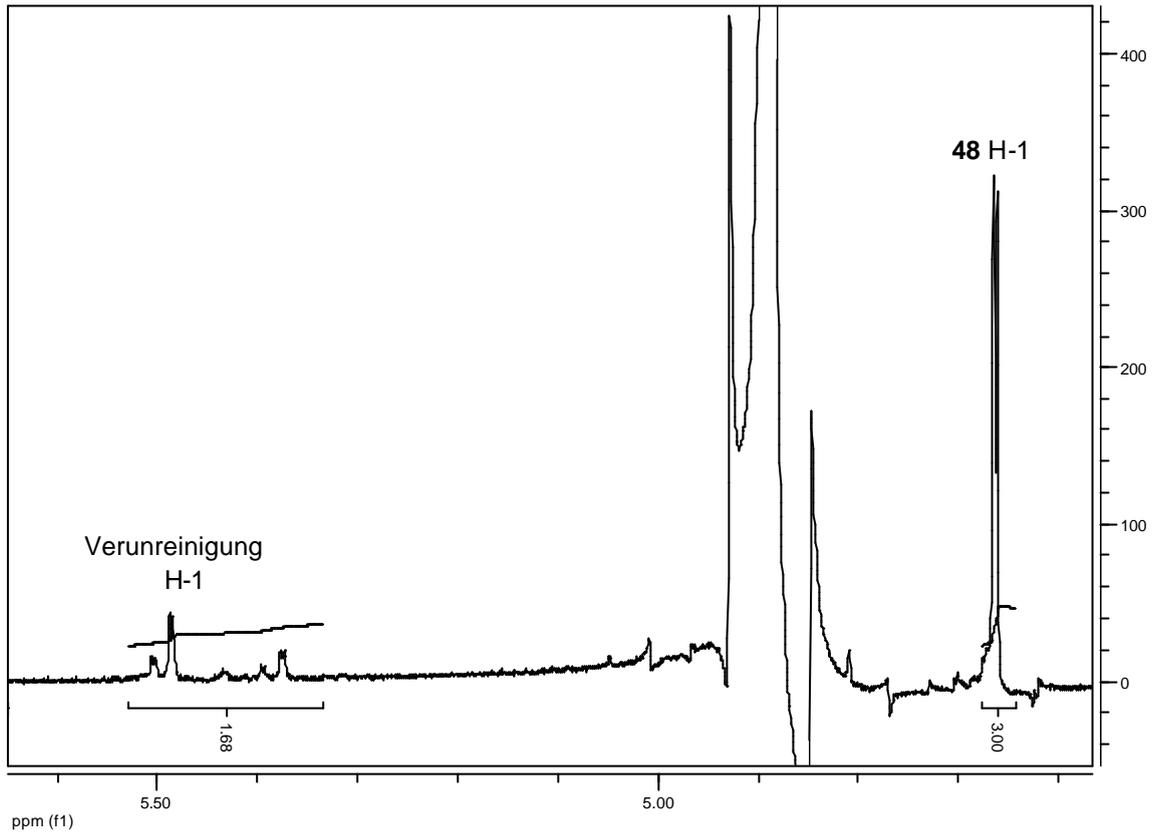


**Schema 18:** Erneute Synthese von **48**, im Gegensatz zu vorherigen Synthesestrategie<sup>71</sup> wurde die Triethylsilylgruppe (TES) verwendet<sup>92</sup>.



**Schema 18:**

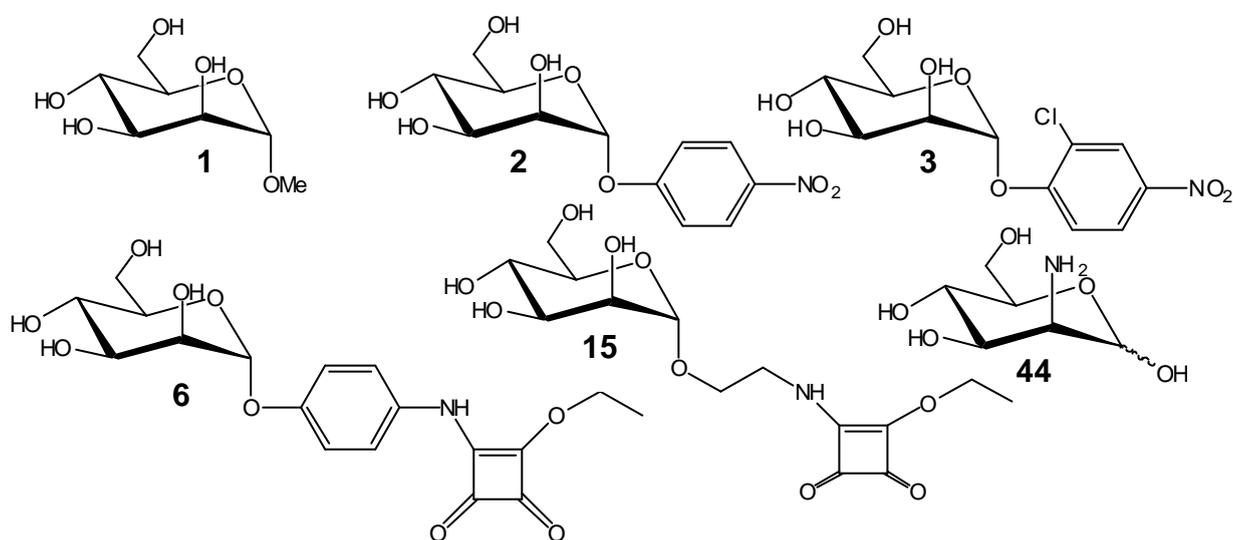
NMR-Spektrum der Verbindung **48**: Übersicht von 4.5 bis 7.5 ppm, bei 4.65 ppm sind 3 äquivalente H-1 Protonen der Verbindung **48** zu erkennen, ab 6.9 ppm die aromatischen Protonen der Verunreinigung



**Schema 19:** Dehnung der relevanten Bereiche, um 7 ppm sind mehrere Signalsätze aromatischer Protonen zu erkennen, bei 5.5 und 5.4 ppm ebenfalls mehrere Signale, die typisch für mannosidische H-1-Protonen mit benachbartem aromatischem Aglycon sind.

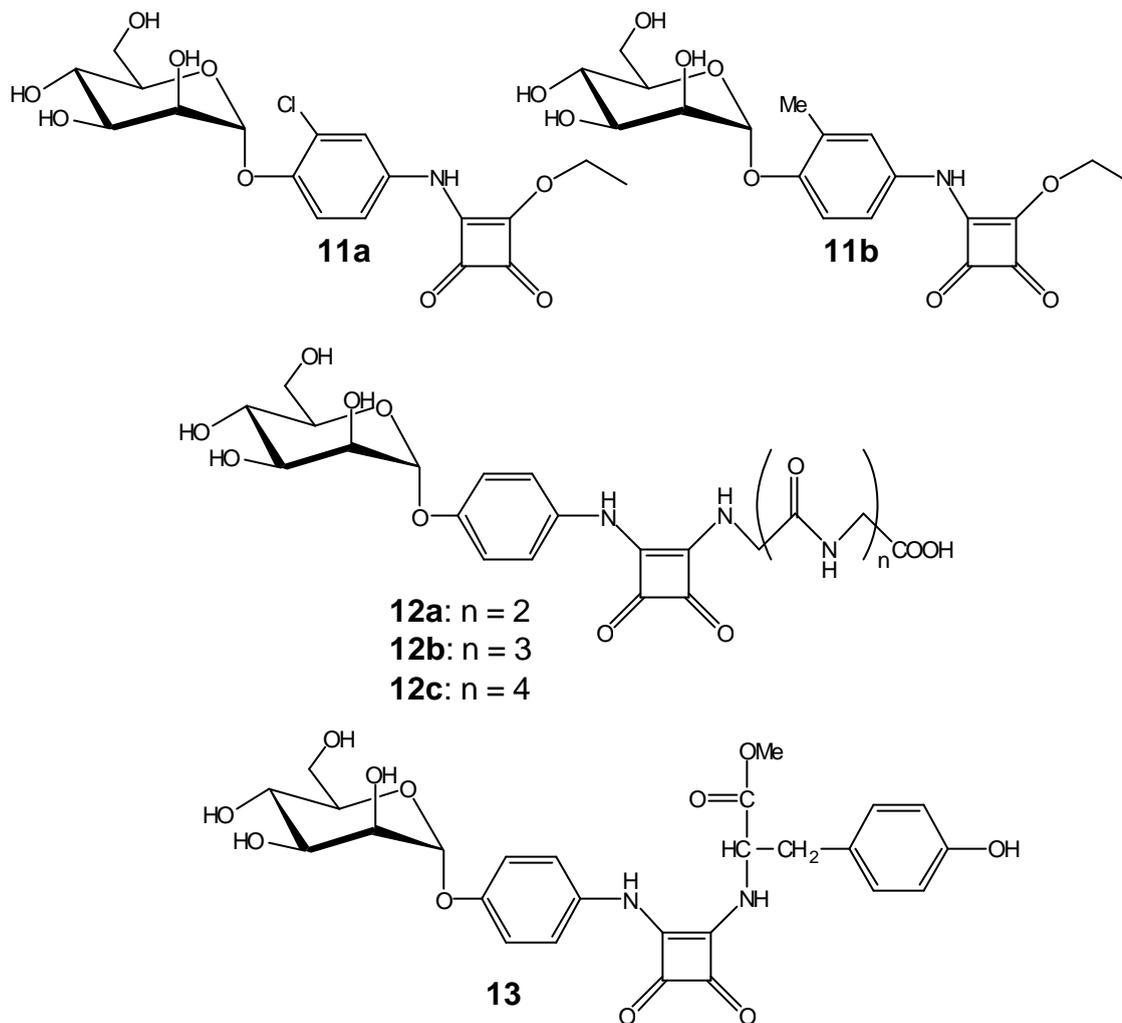
### 3.4.3 Testung von monovalenten Liganden

Die hier untersuchten monovalenten Liganden wurden alle im Zuge der Optimierung von **6** entwickelt bzw. stehen, im Falle des Mannosamins (**49**), im Zusammenhang mit anderen Überlegungen. Zudem wurde das für die Synthese von **16** benötigte Zwischenprodukt **15** getestet, um eine mögliche kovalente Bindung der Quadratsäure domäne von **6** in der Bindungstasche von FimH zu überprüfen. Als Vergleich werden wieder die Standards MeMan (**1**) und *p*NPMan (**2**) mit aufgeführt. Die angegebenen Testergebnisse für **1** und **2** stellen keine Mittelwerte dar, es sind typische Messwerte, für die hier keine Standardabweichungen ermittelt wurden.



Substanz	IT [ $\mu\text{mol} / \text{l}$ ]	STDEV [ $\mu\text{mol} / \text{l}$ ]	RIT	IC <sub>50</sub> [ $\mu\text{mol} / \text{l}$ ]	STDEV [ $\mu\text{mol} / \text{l}$ ]	RIC <sub>50</sub>
<b>1</b>	130	-	1	1000	-	1
<b>2</b>	2.6	-	50	23	-	50
<b>3</b>	0.78	0.22	170	6.5	0.12	160
<b>6</b>	0.091	0.060	530	1.4	0.64	1800
<b>15</b>	-	-	-	460	290	1.30
<b>49</b>	12000	7200	0.018	-	-	-

**Schema 19:** Inhibitorisches Potenzial monovalenter Liganden im Vergleich mit den Verbindungen **1** und **2**

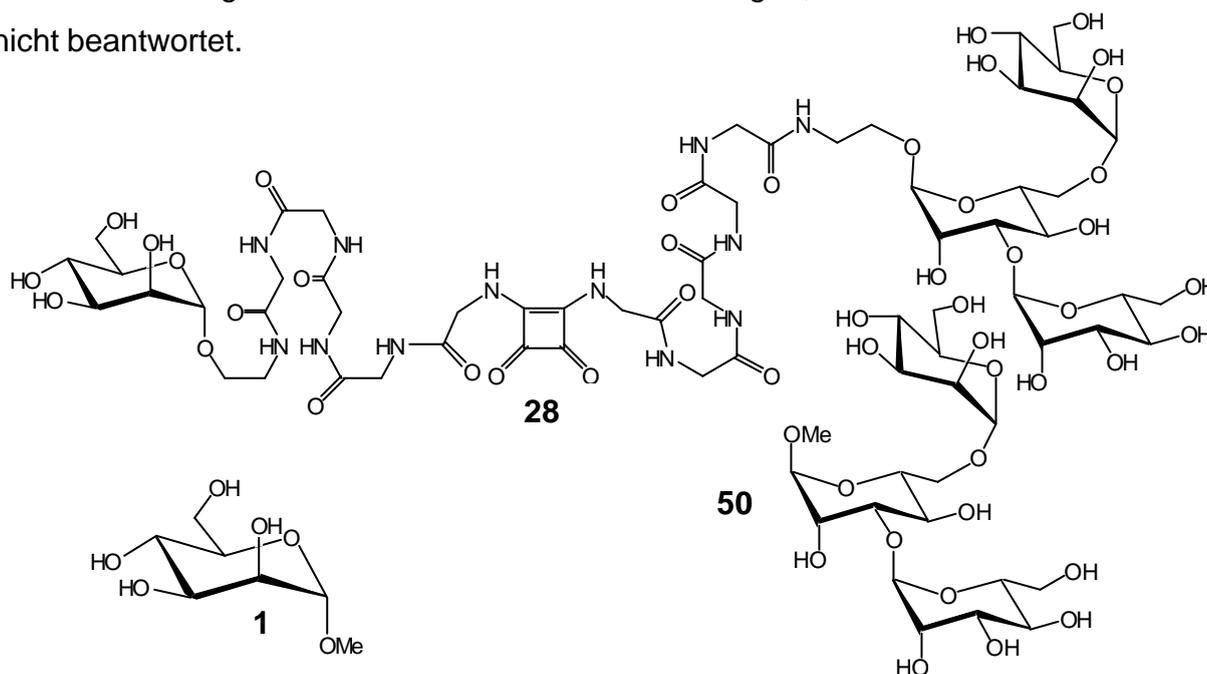


Substanz	IT [nmol / l]	STDEV [nmol / l]	RIT	IC <sub>50</sub> [μmol / l]	STDEV [μmol / l]	RIC <sub>50</sub>
<b>11a</b>	7.6	2.6	17200	0.16	0.060	6400
<b>11b</b>	6.1	1.7	42000	0.68	0.16	2600
<b>12a</b>	360	160	370	2.2	0.38	970
<b>12b</b>	970	840	140	-	-	-
<b>12c</b>	330	140	390	-	-	-
<b>13</b>	340	0	380	3.7	0.60	290

**Schema 20:** Messwerte für eine Klasse monovalenter Verbindungen, die ausgehend von Substanz der Substanz **6** optimiert wurden.

### 3.4.4 Testung von verbrückenden Liganden

Verbindung **28**, die mit dem Ziel dargestellt wurde, zwei auf dem FimH-Protein vorhandene Bindungstaschen zu verbrücken wurde im ELISA-System auf ihre inhibitorische Eigenschaften getestet. Da sowohl die inhibitorischen Potentiale von ähnlichen Monomannosiden (**1**) als auch des Trimannosides (**50**)<sup>93</sup>) bekannt sind, kann von einer Verbrückung der Bindungstasche ausgegangen werden, wenn diese Werte deutlich übertroffen werden. Ein weiterer Beweis könnte dann später z.B. durch eine kovalente Bindung mittels eines photoaktivierbaren Gruppe, die aufgrund der modularen Bauweise von **28** leicht in die Struktur einzufügen sein sollte, erbracht werden. Leider zeigt Verbindung **28** nur ein sehr schwaches inhibitorisches Potential, das in der Größenordnung von MeMan (**1**) lag. Daher ist kaum anzunehmen, dass eine Verbrückung zweier Bindungstaschen erreicht wurde. Die Frage, ob tatsächlich mehrere Bindungstaschen für Zucker auf FimH vorliegen, ist damit bisher leider auch nicht beantwortet.

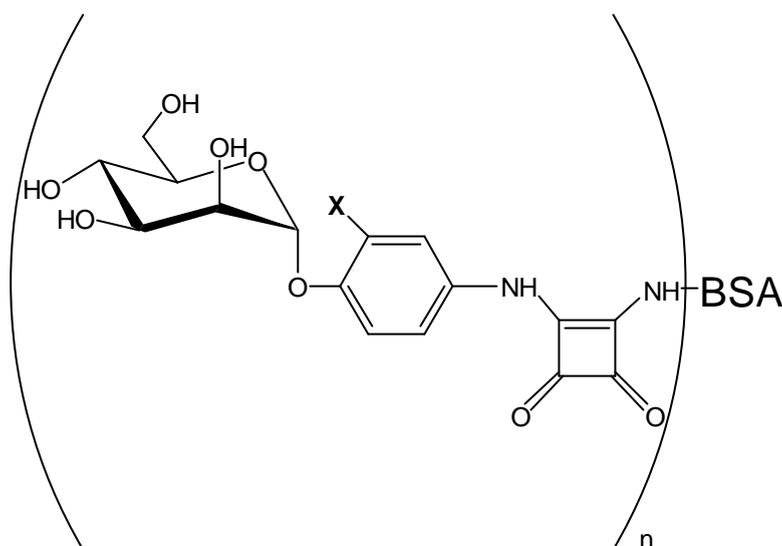


Substanz	IT [ $\mu\text{mol} / \text{l}$ ]	STDEV [ $\mu\text{mol} / \text{l}$ ]	RIT	IC <sub>50</sub> [ $\mu\text{mol} / \text{l}$ ]	STDEV [ $\mu\text{mol} / \text{l}$ ]	RIC <sub>50</sub>
<b>1</b>	130	-	1	2900	-	1
<b>28</b>	-	-	-	1500	360	1.94
<b>50</b> <sup>93</sup>	-	-	-	-	-	10.5

**Schema 21:** Testergebnisse des verbrückenden Liganden **28** im Vergleich mit den Verbindungen **1** und **50**

### 3.4.5 Testung der BSA-Konjugate

Die synthetisierten BSA-Konjugate wurden ebenfalls mittels beider Testsysteme evaluiert. Ihre inhibitorische Potenz übertrifft sowohl die der Glycocluster als auch die der optimierten monovalenten Liganden. Eine exponentielle Steigerung der Affinität bzw. Avidität, wie bei einem multivalenten Bindungsereignis zu erwarten wäre, trat nicht auf.



- 34a** : X = H  
**34b** : X = Cl  
**34c** : X = Me

Substanz	IT [nmol / l]	STDEV [nmol / l]	RIT	IC <sub>50</sub> [nmol / l]	STDEV [nmol / l]	RIC <sub>50</sub>
<b>34a</b>	43	18	6000	270	30	11000
<b>34b</b>	30	24	8700	200	160	15000
<b>34c</b>	3.5	1.5	75000	36	31	58000

**Schema 21:** Testergebnisse aus Hämagglutinations-Hemmtest und ELISA für die dargestellten BSA-Konjugate **34a** bis **34c**.

### 3.5 Interpretation der Testergebnisse

Die unterschiedlichen Gruppen getesteter Substanzen (Glycocluster, monovalente Liganden, verbrückender Ligand und BSA-Konjugate) führten zu einer großen Menge von Testergebnissen, wobei sich innerhalb der Gruppen nun gut Tendenzen feststellen und abschätzen lassen.

Als Erkenntnis aus dem Fehlen jeglicher inhibitorischer Potenz von Cluster **43** kann davon ausgegangen werden, dass eine Bindung des Liganden in einer Art umgekehrten Bindungsmodus, bei dem die 6-OH-Gruppe aus der Bindungstasche herauschaut, nicht auftritt. Cluster, an die 6-Amino-6-desoxy-funktionalisierte Mannosylreste gebunden sind, werden deshalb keinen inhibitorischen Effekt zeigen.

Bei allen anderen betrachteten Glycoclustern zeichnet sich die Tendenz ab, dass relativ kleine Glycocluster mit zwei oder vier Mannosylresten (**35**, **36**, **37**) ungefähr 10-fach bessere Liganden als Methylmannosid (**1**) sind, während größere Einheiten mit 8, 10 oder 12 präsentierten Kohlenhydraten (**18**, **38** bis **42**) die Adhäsion von Typ-1-fimbriierten Bakterien etwa zwei Größenordnungen besser als die Vergleichssubstanz Methylmannosid (**1**) inhibieren. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit einer Serie von früher untersuchten Glycoclustern<sup>77</sup>. Die gegenüber Methylmannosid gesteigerte inhibitorische Potenz wird bei Glycoclustern auf die lokale Erhöhung der Konzentration von Mannosylresten an der Bindungstasche zurückgeführt, was im Falle der Dissotiation eines vormals gebundenen Mannosylrestes die Bindung eines anderen, in der Nähe befindlichen Restes wahrscheinlicher macht.

Sehr erfolgreich, was die Entwicklung eines möglichst gut bindenden Liganden angeht, war die Optimierung monovalenter Liganden mit aromatischem Aglycon. Ausgehend von der Leitstruktur **6** wurde eine Reihe von Derivaten synthetisiert, unter denen die Verbindungen **11a** in beiden Testsystemen, **11b** lediglich im Hämagglutinations-Hemmtest eine verbesserte Wirkung zeigten, die auf eine optimierte Interaktion mit der Proteinoberfläche nahe der Bindungstasche zurückgeführt wird. Ebenfalls berücksichtigt werden muss, dass die  $\pi$ - $\pi$ -Interaktionen der aromatischen Systeme durch die Einführung von Substituenten verändert werden. Die Derivatisierung des Quadratsäure-Systems (**12a,b,c** sowie **13**) führte zu einer Verschlechterung der Inhibitoreigenschaften. Vorversuche mit Mannosamin (**44**) zeigten, dass die Substitution der 2-OH-Gruppe des Mannosylrestes durch eine Aminofunktion ebenfalls zu einer Verschlechterung der Bindungseigenschaften führt.

Eine kovalente Bindung der Quadratsäure-domäne an den in der Bindungstasche des FimH befindlichen *N*-Terminus des Proteins konnte aufgrund der schwachen Inhibitoreigenschaften von **6** ausgeschlossen werden.

Der ambivalente Ligand **28** zeigte den einzelnen, in ihm verknüpften Kohlenhydrat-domänen kein verbessertes Bindungsverhalten. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass keine Verbrückung zwischen zwei Bindungstaschen des Proteins stattgefunden hat, wofür mehrere Erklärungen denkbar sind. Neben der Möglichkeit, dass der Abstand zwischen den beiden Kohlenhydrat-domänen falsch gewählt wurde und eine Verbrückung daher nicht zustande kommen kann, können auch entropische Faktoren gegen eine optimale Bindung dieses Liganden sprechen. Durch eine hypothetische Bindung werden die Freiheitsgrade der bindenden Struktur eingeschränkt, was zu einem Entropieverlust des Gesamtsystems aus Ligand und Protein führt. Dieser muss durch einen Gewinn an Bindungsenergie kompensiert werden, bevor die Bindung beider Zuckerreste zu einem energetischen Vorteil führt.

Die BSA-Konjugate **34a**, **b** und **c** zeigen eine Verbesserung der inhibitorischen Potenz von etwa einer Größenordnung gegenüber den Monomeren. Auch diese Verbesserung des Bindungsverhaltens kann auf eine lokale Erhöhung der Konzentration an Monomeren nahe der Bindungstasche zurückgeführt werden. Dies ist vergleichbar dem bei Glycoclustern auftretenden Effekt, wobei bei den dargestellten Konjugaten eine Kontrolle über die Abstände zwischen den bindenden Resten sowie über die Anzahl und Orientierung dieser nicht möglich ist, was bei Clustern oder dendritischen Strukturen besser beeinflusst werden kann.

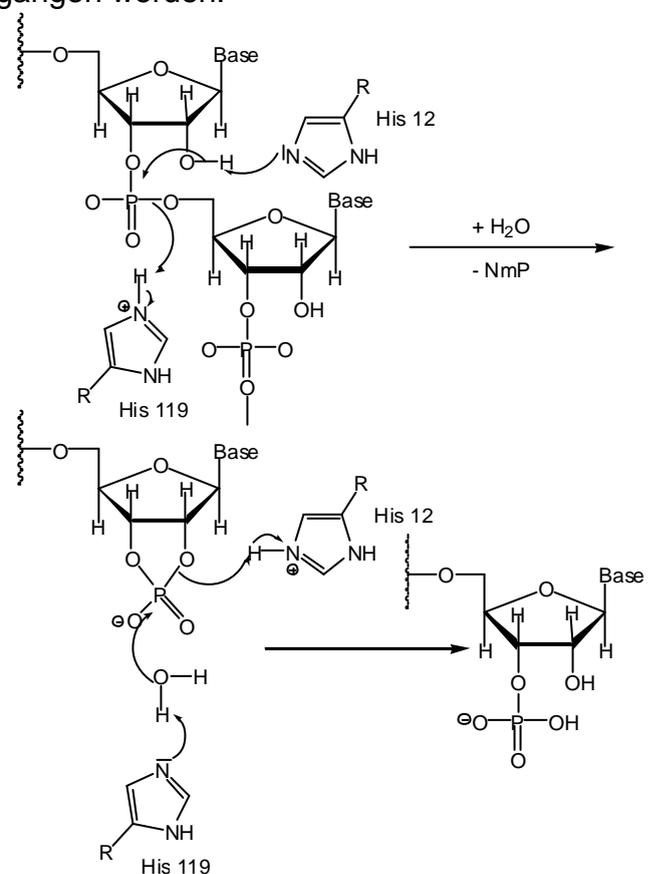
Zusammengefasst kann gesagt werden, dass optimierte kleine Liganden für das Typ-1-fimbriale Lektin die vielversprechendsten Inhibitoren für FimH darstellen und eine multiple Präsentation dieser Einheiten - soweit synthetisch möglich - die Avidität in bekannter Weise verstärkt. Substanz **11a** ist dabei der bis dato beste aller bekannten monovalenten Liganden für das Typ-1-fimbriale Lektin, Substanz **34c** ist der insgesamt beste Ligand für dieses Lektin, soweit bisher beschrieben.

## 4. Der Einfluss von N-Glycosylierung auf Enzymaktivität

### 4.1 Das Modellsystem RNase A / RNase B

Während die Wechselwirkungen von Lektinen mit Kohlenhydratstrukturen häufig klar in Zusammenhang mit einem biologischen Ereignis gebracht werden können, ist die biologische Bedeutung der Glycosylierung von membranständigen oder extrazellulären Proteinen nicht immer abschließend geklärt. Bisherige Untersuchungen weisen auf eine Vielzahl von möglichen Funktionen des Glycoteils in Glykokonjugaten hin, im Zusammenhang mit Zell-Zell Kommunikation<sup>94,95</sup>, für die Unterstützung der Proteinfaltung durch Hilfsproteine (Chaperone)<sup>96,97</sup> sowie die Stabilisierung von Proteinen. Da der biosynthetische Aufwand für die Synthese von Oligosacchariden erheblich ist, kann von einer wichtigen Funktion dieser Glycostrukturen für den Organismus ausgegangen werden.

Ein generelles Problem bei der Untersuchung biologischer Funktionen ist die Detektion eines Signals, das Hinweise auf die biologische Bedeutung und die Funktion der jeweiligen Komponente liefert. Will man die Bedeutung der Glycosylierung für die Funktion eines Glycoproteins untersuchen, benötigt man ein Signal, das durch eine molekulare Interaktion mit der Kohlenhydratteilstruktur entsteht und hinreichend genau ausgelesen werden kann.



**Abb. 24:** Funktionsweise von RNAsen;  
NmP = Nucleotid-monophosphat  
His = Histidin

Da die gesamte Glycocalix einer Zelle zunächst ein zu komplexes System darstellt, um möglicherweise sehr kleine Signale zu detektieren, ist es zunächst sinnvoll, ein geeignetes Modellsystem für die Untersuchung der biologischen Funktion von Proteinglycosylierung zu finden. Dazu wurden hier die beiden Proteine RNase A und RNase B ausgewählt, zwei Enzyme von denen letzteres glycosyliert ist. Als read-out wurde die Aktivität des jeweiligen Enzyms betrachtet.

Alternativ zu dem hier gewählten Ansatz, gibt es bereits Methoden die Oligosaccharidstrukturen von Proteinen zu verändern, um Einblicke in ihre Wirkungsweise zu erhalten. Die hierzu verwendeten Verfahren umfassen die gentechnische Veränderung posttranslationaler Enzyme, wie bereits an Hefezellen durchgeführt<sup>98</sup>, die Einführung von chemisch modifizierbaren nicht-natürlichen Kohlenhydraten mittels Nutzung vorhandener Biosynthesewege<sup>99,100</sup> sowie einer Kombination aus zielgerichteter Mutagenese und nachfolgender chemischer Modifikation<sup>101,102</sup>.

RNase B, ein 17 kD schweres glycosyliertes Enzym katalysiert die Spaltung von Einzelstrang-RNA zwischen Pyrimidin-Dimeren (**Abb. 24**). Der einzige Unterschied zu RNase A besteht in der Glycosylierung über eine *N*-glycosidische Bindung an Asn34. RNase A besitzt hier nur eine freie Aminosäuren-Seitenkette. RNase B ist in fünf Glycoformen mit  $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$  bis  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  glycosyliert<sup>103,104</sup>. Bisherige Untersuchungen gehen davon aus, dass durch die glycosylierte Seitenkette die Oligomerisierung des Enzyms beeinflusst wird<sup>105,106</sup>, was eine Veränderung der Katalysatoreigenschaften zur Folge hat. Ebenfalls wird die Stabilität des Proteins gegenüber thermischer Denaturierung<sup>107</sup> und enzymatischem Abbau<sup>108</sup> gesteigert. Darüber hinaus sollte hier überprüft werden, ob das Enzym eventuell Signale aus seiner Umgebung in Form von Kohlenhydrat-Protein- oder Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen über das Oligosaccharid auffängt und somit die katalytischen Eigenschaften geregelt werden. Wäre dies der Fall, sollte die RNase B-Aktivität durch eine geeignete Wechselwirkung steuerbar sein, während RNase A als nichtglycosylierte Form dieses Enzyms den gleichen Einfluss nicht wahrnehmen dürfte und somit als Kontrollsystem verwendet werden kann.

Bei den Proteinen, mit denen versucht werden sollte die Aktivität der RNase B über die Wechselwirkung mit dem Kohlenhydrat-Teil zu beeinflussen fiel die Wahl auf zwei Lektine, die terminale Mannosylreste binden sowie auf Hefemannan, das über Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen mit dem *N*-Glycan der RNase B

interagieren könnte. Als Lektine wurden ConA aus *Canavalia ensiformis* sowie ein Lektin aus *Narcissus pseudonarcissus* gewählt. ConA liegt bei den im Test eingestellten pH-Wert in Form eines Tetramers vor, das Narcissus-Lektin als Dimer.

#### 4.1.1 Aufbau des Testsystems

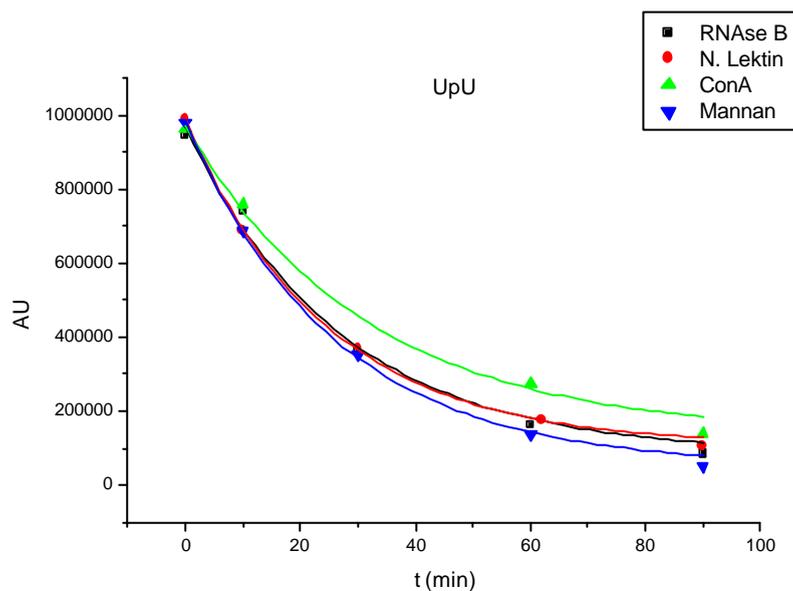
Vorraussetzung für den Erfolg der Untersuchung ist, dass die enzymatische Spaltung einer definierten Menge des Dinukleotids UpU mit hoher Genauigkeit und reproduzierbar verfolgt werden kann. Hierfür wurde, analog zu Versuchen mit synthetischen Modellsystemen von RNAsen<sup>109,110</sup>, die Trennung und Detektion des Eduktes UpU sowie der Produkte U und UmP mittels analytischer HPLC vorgenommen. Die Zuordnung der Retentionszeiten des Eduktes und eines der Produkte (UmP) wurde durch die Analyse der Reinsubstanzen erhalten. Hierbei wurden folgende Retentionszeiten erhalten: UmP: 3.1 min, U: 5.0 min, UpU: 6.2 min. Die RNase-Probe wurde zunächst mit der angegebenen Menge des jeweiligen Liganden 30 min inkubiert, um dann dem Substrat zugesetzt zu werden. Typischerweise wurden aus 1 ml Probenlösung vor der Zugabe der Enzymlösung (T = 0) sowie 10, 30, 60 und 90 Minuten nach dieser Zugabe jeweils 50µl Probenlösung entnommen, mittels einer RP-8-Säule getrennt und per UV-Detektor analysiert. Ausgewertet wurden die Integrale der erhaltenen Signale, die gegen die verstrichene Reaktionszeit aufgetragen wurde.

Zur Verifizierung der Bindung von ConA an RNase B wurde mit kommerziell erhältlichem HRP-konjugiertem ConA ein ELLA analog dem in Kapitel 3.2 beschriebenen ELISA aufgebaut. Es wurden jedoch nicht kompetitiv Liganden für ConA zugesetzt sondern nur Blindproben durchgeführt, welche die Bindung des konjugierten ConA an eine mit RNase B beschichtete Mikrotiterplatte (vgl. 3.3) nachweisen. Ein weiterer Kontrollversuch an einer unbeschichteten Mikrotiterplatte unterstützte das erhaltene Ergebnis, dass HRP-konjugiertes ConA an RNase B beschichtete Mikrotiterplatten bindet, unbeschichtete Platten hingegen nicht gebunden werden. Diese Tests wurden als Positivkontrolle für das Bindungspotential von ConA gegenüber der Oligosaccharidstruktur der RNase B durchgeführt. Der auf diese Weise erstellte und überprüfte ELLA kann jederzeit als kompetitives System zur Überprüfung von Liganden für ConA eingesetzt werden.

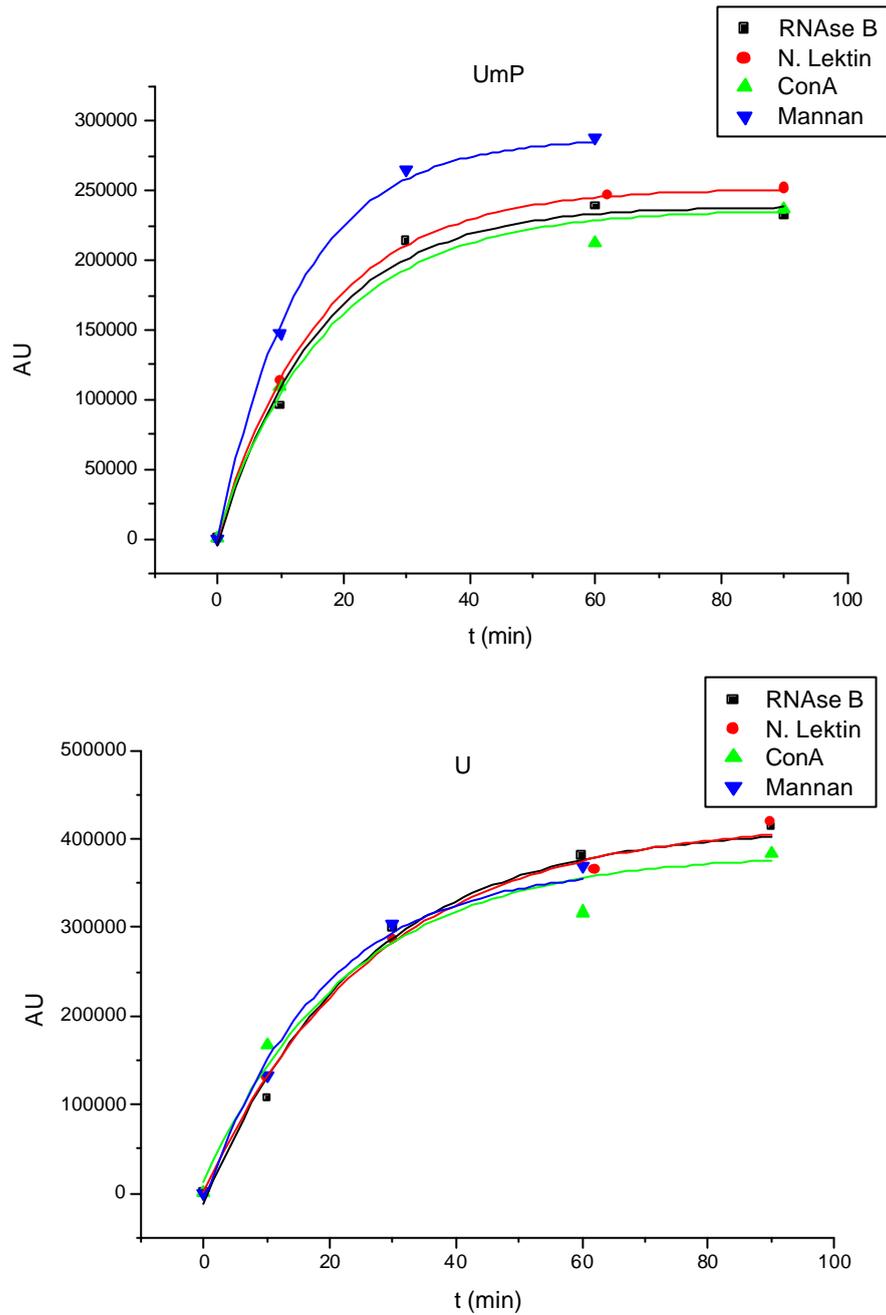
## 4.1.2 Testergebnisse

Die enzymatische Spaltung von UpU in die beiden Produkte U und Ump wurde graphisch gegen die Zeit aufgetragen und an eine exponentielle Ausgleichsfunktion angepasst (**Abb. 25 a und b**).

Diese ersten Versuche zeigen, dass innerhalb der Messgenauigkeit nur ConA und Mannan einen Einfluss auf das Enzym zu haben scheinen. Die enzymatische Aktivität der RNase B wird durch ConA anscheinend leicht herabgesetzt, durch Mannan leicht erhöht. Für weitere Versuche wurde daher Beeinflussung der RNase B mit Mannan untersucht, da hier ein Effekt am deutlichsten hervortritt. Interaktionen zwischen den Oligosaccharidresten (im Sinne schwacher Kohlenhydrat-Kohlenhydrat Wechselwirkungen) oder zwischen Oligosacchariden und Protein können durch die Anwesenheit von Mannan verhindert bzw. verlangsamt werden.



**Abb. 25a:** Spaltung von UpU durch RNase B;  
UpU = Uridylyl(3'→5')uridin.

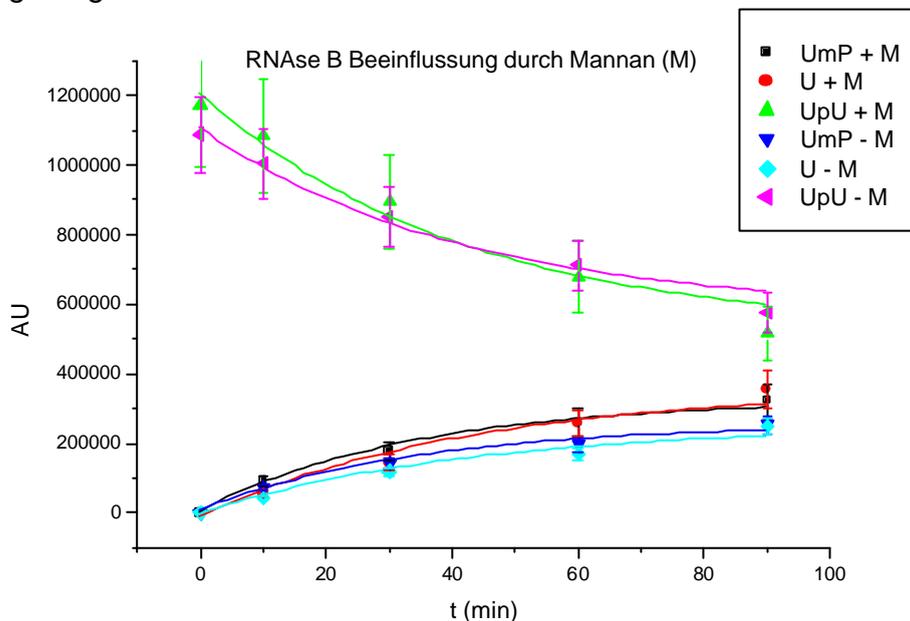


- Legende:**
- - Spaltung von UpU ausschließlich durch RNase B
  - - Spaltung von UpU durch RNase B mit zugesetztem *Narcissus*-Lektin
  - ▲ - Spaltung von UpU durch RNase B mit zugesetztem ConA
  - ▼ - Spaltung von UpU durch RNase B mit zugesetztem Mannan

**Abb. 25b:** Spaltung von UpU: Beobachtung der Produktentstehung (UmP und U);  
Ump = Uridinmonophosphat, U = Uridin

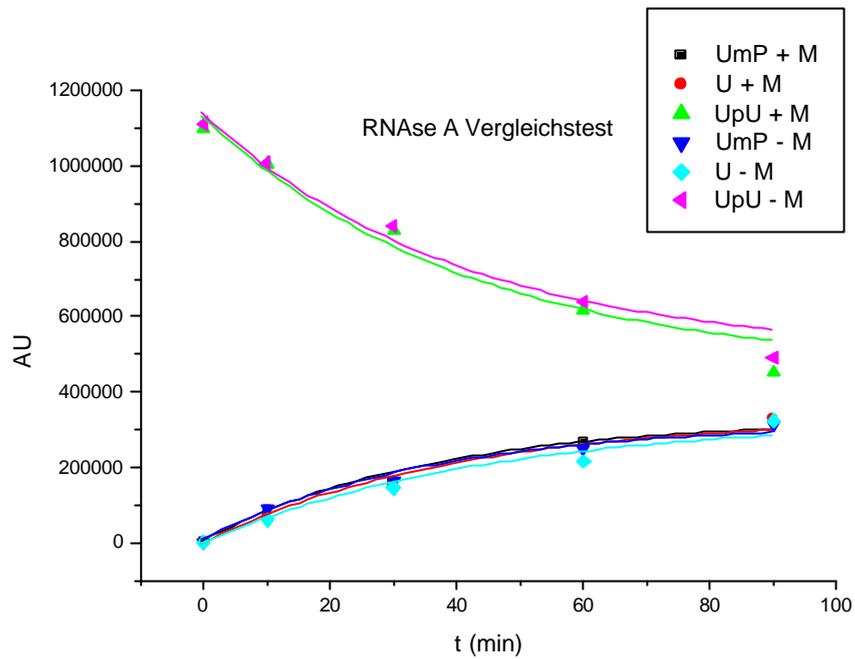
Wie zu erkennen ist (**Abb. 26a** und **b**), wird die Aktivität Enzym RNase B durch die Zugabe von Mannan erhöht. Dieses kann durch die Beeinflussung von Kohlenhydrat - Kohlenhydrat Wechselwirkungen zwischen zwei oder mehr Rnase B Einheiten erklärt werden, die ggf. bei Anwesenheit von Mannan verhindert oder geschwächt werden. Ein Vergleichstest mit dem nichtglycosylierten Enzym RNase A zeigt, erwartungsgemäß, keine Veränderung in der enzymatischen Aktivität nach Zugabe von Mannan.

Die hier erhaltenen Ergebnisse belegen, dass das gewählte Testsystem in der Lage ist, Einflüsse auf die enzymatischen Aktivitäten der RNase B zu detektieren. Die Ungenauigkeit des Systems (ca. 5%) verhindert jedoch, dass schwache Einflüsse wie z.B. durch das *Narcissus*-Lektin analysiert werden können, was die Anwendungsmöglichkeiten dieses Tests leider stark reduziert.



- Legende:**
- - Bildung von UmP mit zugesetztem Mannan
  - - Bildung von U mit zugesetztem Mannan
  - ▲ - Spaltung von UpU mit zugesetztem Mannan
  - ▼ - Bildung von UmP ohne Mannan
  - ◆ - Bildung von UmP ohne Mannan
  - ◀ - Spaltung von UpU ohne Mannan

**Abb. 26a:** Spaltung von UpU, Beeinflussung von RNase B durch Mannan.



- Legende:**
- - Bildung von UmP mit zugesetztem Mannan
  - - Bildung von U mit zugesetztem Mannan
  - ▲ - Spaltung von UpU mit zugesetztem Mannan
  - ▼ - Bildung von UmP ohne Mannan
  - ◆ - Bildung von U ohne Mannan
  - ◀ - Spaltung von UpU ohne Mannan

**Abb. 26:** Spaltung von UpU, Beeinflussung durch Mannan, Kontrolle mittels Vergleich mit RNase A

## 5. Zusammenfassung

Kohlenhydrate kommen in der belebten Natur in großer struktureller Vielfalt vor, übernehmen die verschiedensten Funktionen und gehen die unterschiedlichsten Wechselwirkungen mit ihrer Umgebung ein. Einige Formen der nicht-kovalenten Wechselwirkungen mit anderen Molekülen sind, - im Fall der Lektine -, für Zucker phänomenologisch schon früh beschrieben und Mitte des letzten Jahrhunderts zuerst detailliert untersucht worden. Für die bakterielle Adhäsion ist bekannt, dass uropathogene Stämme von *E. coli* sogenannte Typ-1-Fimbrien nutzen, die ein Mannose-bindendes Lektin enthalten, das verwendet wird um einen ersten Kontakt zur Oberfläche der Wirtszellen über Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkungen aufzunehmen. Die Funktion dieser Adhäsion ist nach wie vor Gegenstand von Diskussionen. Neuere Untersuchungen gehen davon aus, dass mittels der Typ-1-Fimbrien nicht nur eine simple Verankerung des Bakteriums an der Oberfläche der Wirtszelle passiert, sondern im Zusammenspiel mit dem Lipopolysaccharid des Bakteriums auch die Immunreaktion der Wirtszelle moduliert werden kann. Hier wie anderswo wird das Potenzial von Kohlenhydraten und ihrer Derivate als Wirkstoffe deutlich. Schon heute sind Kohlenhydrate als Enzyminhibitoren als Wirkstoffe auf dem Markt und auch als multivalenten Liganden für Shigatoxin haben sie eindrucksvolle Wirkung gezeigt.

Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit Liganden für das Typ-1-fimbriale Lektin FimH ausgehend von dem literaturbekannten Wissen zu optimieren und zu synthetisieren und gleichzeitig das biologische Testsystem zu bearbeiten. Die Kenntnis der Röntgenstruktur des Proteins FimH war eine wichtige Grundlage für das Ligandendesign. Außerdem sollten neue Theorien über die Möglichkeit mehrerer Bindungsstellen auf FimH in die Überlegungen einfließen. Zunächst wurden monovalente Liganden, Mannoside mit aromatischen Aglykon synthetisiert und dabei das Quadratsäurederivat **6** als Leitstruktur für weitere Optimierungen gefunden. Varianten dieser Verbindung, die Derivate **11a** und **11b** zeigten verbesserte Bindung an FimH, was mittels Docking-Studien erklärt und verstanden werden konnte. Mit den Verbindungen **11a** und **11b** wurden die beiden bisher potentesten monovalenten Liganden für das FimH-Protein dargestellt. Der Quadratsäure-Linker des Mannosids **6** erleichterte die weitere Derivatisierung, wodurch z.B. die Glycopeptide **12a** - **12c**

und **13** leicht zugänglich wurden. Außerdem konnte die gleiche Chemie für den Aufbau von Glycoclustern mit Quadratsäurediamiden als verbrückenden Element genutzt werden, wodurch die trivalente Verbindung **16** und das große Oligosaccharidmimetikum **22** erhalten wurden. Die Verbindung wiegt fast 4 kD und konnte erstmals vollständig charakterisiert und vermessen werden. Im Rahmen der biologischen Tests wurde für Cluster **22** jedoch ein inhibitorisches Potenzial ermittelt, das lediglich der Größenordnung vieler Glycomimetika (z.B. Verbindungen **38** bis **42**) mit einfacherer Architektur entspricht.

Um die Hypothese, auf FimH befänden sich möglicherweise zwei, für die Kohlenhydrat-Bindung wichtige Domänen zu testen, wurde der asymmetrisch bivalente Ligand **28** an das Protein angepasst und seine Synthese entsprechend einer modularen Strategie unternommen. Die modulare Bauweise lieferte noch einige Derivate von **28** und erlaubt auch zukünftig die leichte Optimierung des Liganden. Leider erwies sich **28** im ELISA als schlechter Ligand. Dadurch kann leider nicht zwingend ausgeschlossen werden, dass die zugrundeliegende Hypothese über zwei Bindungstaschen auf FimH nicht stimmt. Es könnte auch lediglich die Verbrückung der beiden CRDs gescheitert sein.

Mit der Konjugation der Substanzen **6**, **11a** und **11b** an BSA konnte eine Serie von Neoglycokonjugaten generiert werden deren Inhibitoreigenschaften gegenüber den Monomeren noch einmal verbessert wurden. Bezogen auf die Vergleichssubstanz Methylmannosid (**1**) wurde mit **34c** der stärkste bisher beschriebene Inhibitor für FimH dargestellt.

Kapitel 3 der vorliegenden Arbeit befasst sich auch mit der vergleichenden Testung einer Vielzahl von Kohlenhydrat-Liganden, die den eigenen Synthesen oder denen von Kollegen entstammen. Dabei wurden auch Variationen des Testsystems erarbeitet und evaluiert. Wichtige Trends konnten nun auf Basis der FimH-Struktur im Sinne quantitativer Struktur-Wirkungs-Beziehungen erklärt werden, was einen großen Schritt vorwärts für das Verständnis der molekularen Details der Kohlenhydrat-Bindung an FimH bedeutet. Ein altes Ergebnis, das früher mit dem Cluster-Glycosid **43** erhalten wurde, wurde neu validiert und begründet revidiert. Anderes bleibt noch unklar. Es ist abzusehen, dass die biologische Bedeutung der Glycosylierung von Proteinen zu Glycoproteinen in vielen Aspekten noch im Dunkeln

liegt. Daher wurde dieser Arbeit ein 4. Kapitel angefügt, das sich mit den Konsequenzen von Glycosylierung auf Enzymaktivität beschäftigt. Es wurde ein Modellsystem mit RNase A und der glycosylierten Variante des Enzyms, RNase B erarbeitet und es konnten Hinweise erhalten werden, dass die Aktivität des glycosylierten Enzyms durch Mannose-bindende Lektine oder auch durch Oligosaccharide mittels Lektin-Kohlenhydrat- oder Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Wechselwirkung beeinflusst werden kann. Dies lässt sich evtl. in Einklang mit literaturbekannten Aussagen bringen, nach denen eine Kohlenhydrat-vermittelte Oligomerisierung von RNase B festgestellt wurde. Dies sind hochinteressante Befunde, die Türen zu neuen Forschungsfeldern öffnen könnten.

## **6. Summary**

In nature carbohydrates occur in great structural variety and interact non-covalently with their surroundings in many different ways. In the case of lectins these interactions have been - in the case of lectins - phenomenologically investigated quite early and have been described in detail since the middle of the last century. Bacterial adhesion is an important process in the genesis of infections: It is well known that uropathogenic strains of *E. coli*, so called type 1 fimbriae establish a first contact to the surface of their host cells via carbohydrate-lectin-interactions. The function of this contact is still under discussion; novel investigations suggest not only a mere anchoring of the bacteriae to the host cell but also an interaction between the fimbriae and LPS to modulate the immunoreaction of the host cell. This is an example for the potential of carbohydrates and their derivatives as drugs or other therapeutic agents. Today carbohydrates are on the market as enzyme inhibitors and have e. g. demonstrated their properties as multivalent ligands for shigatoxin.

The aim of this work was to synthesise and optimise ligands for the type 1 fimbrial lectin whilst modifying the biological test system. The elucidation of the X-ray-structure of the protein FimH by Knight et al. was the basis for a new ligand design. Recent theories about multiple binding sites on the protein had to be considered as well. Starting by synthesising monovalent mannosides with aromatic aglycons, the squaric acid derivative **6** was identified as lead structure for further optimisation. Varieties of this compound (**11a** and **11b**) showed even better binding to FimH. This results were rationalised by molecular docking studies. Compounds **11a** and **11b** turned out to be the most potent monovalent ligands for FimH known so far. The squaric acid linker of mannoside **6** opens the possibility for easy future derivatisation which in the course of this work lead to the glycopeptides **12a** - **12c** and **13**. The same concept could be utilised to generate glycoclusters based on squaric acid amides as bridging element. The trivalent compound **16** and the large oligosaccharide mimeticum **22** were prepared by this method; the latter with the molecular mass of nearly 4 kDa was completely characterised (for the first time). The inhibitory potential for this compound was in a similar range as that of many glycomimetica (compounds **38** to **42**) with a more simple architecture.

To test the hypothesis of two carbohydrate binding domains on FimH, asymmetric bivalent ligand **28** was designed to fit the protein and synthesised according to a modular strategy. This approach gave the opportunity to easy derivatisation and optimisation of this structure. Unfortunately compound **28** turned out to be a poor ligand considering the ELISA results. The hypothesis about two carbohydrate binding domains on FimH could neither be confirmed nor be refuted as there is still the possibility of a failure to bridge the two CRD's.

By conjugating compounds **6**, **11a** and **11b** to BSA, a series of neoglycoconjugates was generated. Their inhibitory potencies surpass those of the monomeric substances. Relative to methyl mannoside (**1**) compound **34c** was found to be the most potent inhibitor for FimH known so far.

Another part of the thesis is focused on the comparison of carbohydrate ligands synthesised in the course of this work and prepared in the course of other projects. Variants of the testing system were designed and evaluated. Important trends can now be understood on the basis of ligand structure and effects. This is an important step towards the understanding of molecular details of the carbohydrate binding to FimH. A former result concerning cluster glycoside **43** was evaluated anew and revised on the basis of new data. Other questions are still up to discussion. The biological importance of carbohydrates in glycoproteins is in many aspects, still not fully understood Part 4 of this work is trying to get some answers by investigating the consequences of glycosylation of enzymes on activity of the biocatalyst. The model system RNase A and its glycosylated form RNase B was chosen to investigate the influence of glycosylation on enzyme activity. Clues have been gathered that interactions between the glycosylated enzyme and mannose binding lectins or glycosylated enzyme and oligosaccharides respectively modulate the enzymatic activity. This is in accordance to earlier results from the literature stating that oligomerisation of RNase B is mediated by carbohydrates. These are highly interesting results that might well open up completely new fields in the carbohydrate sciences.

## **7. Experimenteller Teil**

### **7.1 Allgemeine Methoden**

Die unter 7.2 beschriebenen Reaktionen wurden unter normalen atmosphärischen Bedingungen durchgeführt. Die verwendeten Lösungsmittel wurden mit folgenden Trockenmitteln durch Erhitzen und nachfolgende Destillation aufbereitet, jedoch nicht explizit getrocknet.

Lösungsmittel	Trockenmittel
Methanol	Magnesiumspäne
Essigester	Kaliumcarbonat
Cyclohexan	Natriumhydroxid

Folgende Lösungsmittel wurden in bereits sehr guter Qualität von folgenden Lieferanten bezogen:

Lösungsmittel	Lieferant
DMF, trocken	Fluka
DMF, für die Peptidkupplung	Fluka

Für die durchgeführten Assays und HPLC-Läufe wurden folgende Lösungsmittel eingesetzt:

Entionisiertes Wasser	erhalten durch Behandlung von demineralisierten Wasser in einer USF-ELGA Purelab Plus Anlage (el. Widerstand des erhaltenen Wassers: 18.2 M $\Omega$ / cm).
Acetonitril	des Lieferanten ACROS

Dünnschichtchromatogramme wurden auf Merck Gieselgelfolie (Merck GF<sub>254</sub>) durchgeführt. Die Detektion erfolgte entweder durch UV-Licht oder durch Besprühen und nachfolgendes Erhitzen mit 10%iger Schwefelsäure in Ethanol.

Für die Flashchromatographie wurde Kieselgel 60 (230 - 400 mesh, Korngröße 40 – 63 µm) von Merck eingesetzt. Reinigungen an Umkehrphasen-Gel wurden an einer MPLC-Anlage der Firma Büchi mit einer Merck Licroprep RP-18 durchgeführt.

Gelpermeationschromatographie wurde für Moleküle mit Massen über  $M = 2000$  an Sephadex LH20 Gel der Firma Amersham Biosciences durchgeführt, bei kleineren Molekülen kam Biogel P4 der Firma Bio-Rad zum Einsatz.

Als analytische HPLC wurde ein Gerät der Firma Merck-Hitachi, als präparative HPLC ein Gerät der Firma Shimadzu verwendet.

Drehwehre wurden an einem Perkin-Elmer 241 Polarimeter (Natrium - D - Linie 589 nm, Küvettenlänge 1 dm) gemessen. Die verwendeten Lösungsmittel sind bei den jeweiligen gemessenen Drehwerten mit angegeben.

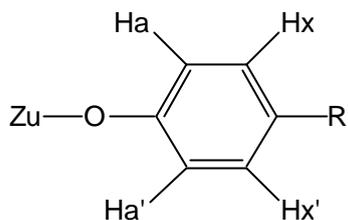
NMR-Spektren wurden auf zwei Geräten der Firma Bruker gemessen. Zum Einsatz kam ein ARX 300 (300 MHz für  $^1\text{H}$ , 75.47 für  $^{13}\text{C}$ ), sowie ein DRX 500 (500 MHz für  $^1\text{H}$ , 125.75 für  $^{13}\text{C}$ ).

Für die Zuordnung der Signale wurden zum Teil zweidimensionale Methoden zur Hilfe genommen ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY sowie HSQC und HMBC).

Die Spektren wurden mit TMS als internem Standard, DSS als externem Standard oder den folgenden Lösungsmittelsignalen kalibriert:

CD <sub>3</sub> OD	$^1\text{H}$	3.35 ppm (s)
	$^{13}\text{C}$	49.3 ppm (sept)
DMSO-D <sub>6</sub>	$^1\text{H}$	2.49 ppm (quin)
	$^{13}\text{C}$	39.7 ppm (sept)
D <sub>2</sub> O	$^1\text{H}$	DSS (extern)
	$^{13}\text{C}$	DSS (extern)

Aromatische Protonen werden wie folgt bezeichnet:



MALDI-ToF-Massenspektren wurden an einem Biflex Gerät der Firma Bruker bei 19 kV Beschleunigungsspannung mit einer Sinapinsäurematrix (gesättigte Sinapinsäurelösung in 9:1 Wasser / Acetonitril mit 0.1 % TFA Zusatz) gemessen.

Die MALDI-ToF-Spektren der BSA-Quadratsäure-Konjugate wurden am Forschungszentrum Borstel von Herrn PD. Dr. B. Lindner an einem Bruker-Reflex Gerät mit einer DHB-Matrix gemessen.

ESI-ToF-Massenspektren wurden an MARINER 5280 der Firma Applied Biosystems aufgenommen.

## 7.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften

### **AAV 1:** Hydrierung von Nitrogruppen zum entsprechenden Amin

Die zu hydrierende Substanz wurde in Methanol oder bei nicht ausreichender Löslichkeit in DMF gelöst, mit ca. 30 mg Pd/C-Katalysator versetzt und für 1 h unter 1 bar Wasserstoffatmosphäre bei RT gerührt. Der Katalysator wurde anschließend durch die Filtration mit einem Spritzenfilter (Porengröße 0.45 µm) entfernt und das erwünschte Amin konnte üblicherweise entweder in quantitativer Ausbeute erhalten werden oder ohne Entfernen des Lösungsmittels direkt eingesetzt werden.

### **AAV 2:** Zemplén-Deacetylierung

Das Edukt wurde in Methanol gelöst oder suspendiert und mit einer frisch zubereiteten Natriummethanolat-Lösung aus ca. 50 mg Natrium in 5 ml Methanol versetzt, 30 min bei Raumtemperatur gerührt, wenn nicht anders beschrieben mit stark saurem Ionentauscher (Amberlite IR 120) neutralisiert, filtriert und eingeeengt um das Produkt in quantitativer Ausbeute zu erhalten.

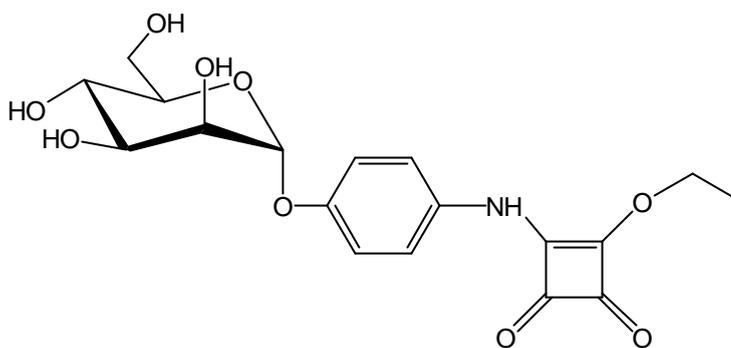
### **AAV 3:** Konjugation von Quadratsäurederivaten an BSA

Das entsprechende Quadratsäurederivat in einer 0.4 molaren Kaliumcarbonatlösung mit BSA versetzt, 3 d gerührt und wurde abschließend 2 d zur Reinigung dialysiert (Dialyseschlauch der Firma Medicell Int. Ltd, DTV12000.05.000, 12-14 kD). Die erhaltene Lösung wurde lyophilisiert um das gewünschte Glycokonjugat zu erhalten.

## 7.2.1 Einzelvorschriften

### *p*-[*N*-(4-Ethoxy-2,3-dioxocyclobut-1-enyl)amino]phenyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid (**6**)

200 mg (0.66 mmol) des Aminophenylmannosids **5** wurden in 10 ml MeOH gelöst und 100  $\mu$ l (0.68 mmol) DES wurden zugesetzt. Die Lösung wurde über Nacht gerührt,



danach eingengt und eine Kombination aus Flashchromatographie (MeOH / EE 1:1) und MPLC-RP-Chromatographie (MeOH / H<sub>2</sub>O 1:1) führte zu der Verbindung **6** als weißes Lyophilisat.

Ausbeute: 165 mg (0.41 mmol;  $M = 395.36 \text{ g mol}^{-1}$ ), 63%

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>6</sub>-DMSO, D<sub>2</sub>O-exchange):  $\delta = 7.27$  (2H, bs, arom. H),  $7.07$  (2H, d, arom. H),  $5.31$  (1H, d, H-1),  $4.73$  (2H, q OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>),  $3.80$  (1H, dd, H-2),  $3.65$  (1H, dd, H-3),  $3.58$  (1H, dd, H-6b),  $3.57$ - $3.41$  (3H, m, H-5, H-6a, H-4),  $1.39$  (3H, t, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm;

Glycon :  $^3J_{1,2} = 1.9$ ,  $^3J_{2,3} = 3.4$ ,  $^3J_{3,4} = 9.0$ ,  $^3J_{5,6b} = 1.7$ ,  $^2J_{6a,6b} = 11.5$  Hz;

Aglycon:  $^3J_{\text{arom}} = 9.0$  Hz,  $^3J_{1,2} = 7.1$  Hz;

<sup>13</sup>C-NMR (50.32 MHz, 313 K, D<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta = 187.96$ ,  $183.26$ ,  $177.73$ ,  $169.31$  (C-Quadratsäure),  $153.21$  (Man-O-C<sub>Ar</sub>),  $132.27$  (*p*-C<sub>Ar</sub>),  $121.04$  (*m*-C<sub>Ar</sub>),  $117.39$  (*o*-C<sub>Ar</sub>),  $99.31$  (C-1),  $74.80$  (C-5),  $70.66$  (C-3),  $70.00$  (C-2),  $69.29$  (CH<sub>2</sub>),  $66.82$  (C-4),  $61.08$  (C-6),  $15.49$  (CH<sub>3</sub>) ppm.

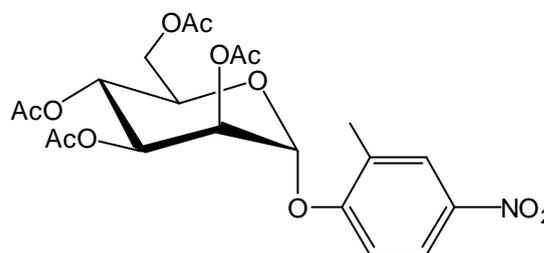
MALDI-ToF-MS:  $m/z = 418.5$ ,  $[M+Na^+-lon]$  (theor. 418.1) für  $C_{18}H_{21}NO_9$  ( $M = 395.12$ )

$[\alpha]_D^{20}$  ( $c = 1.0$  in DMSO) =  $+ 82.3^\circ$

Elementaranalyse:  $C_{18}H_{21}NO_9 \cdot H_2O$ : gefunden: C 52.14%, H 5.53%, N 3.49%;  
theoretisch: C: 52.30%, H 5.61%, N 3.39%

(2-Methyl-4-nitrophenyl)-2,3,4,6-O-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid (**9b**)

12.0 g (30.7 mmol) Mannosepentaacetat **7** und 12.0 g (78.4 mmol) 2-Methyl-4-Nitrophenol **8b** wurden mit 600 mg Zinkchlorid gemischt und 30 min auf  $160^\circ C$  erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde der



Schmelzkuchen in Essigester aufgenommen und 3 mal mit 1 M Natronlauge und abschließend mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde getrocknet, eingeeengt und flaschchromatographisch (EE / CH 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 4.10 g (8.49 mmol;  $M = 483.42 \text{ g mol}^{-1}$ ), 28%

$^1H$ -NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 8.08$  (2H,  $m_c$ , arom.  $H_x, H_x'$ ), 7.20 (1H, d, arom.  $H_a$ ), 5.64 (1H, d, H-1), 5.54 (1H, dd, H-3), 5.49 (1H, dd, H-2), 5.41 (1H, dd  $\approx$  t, H-4), 4.30 (1H, dd, H-6a), 4.02 (1H, dd, H-6b), 4.00 (1H, ddd, H-5), 2.38 (3H, s,  $CH_3$ ), 2.23, 2.07, 2.06, 2.04 (je 3H, s,  $COCH_3$ ) ppm;

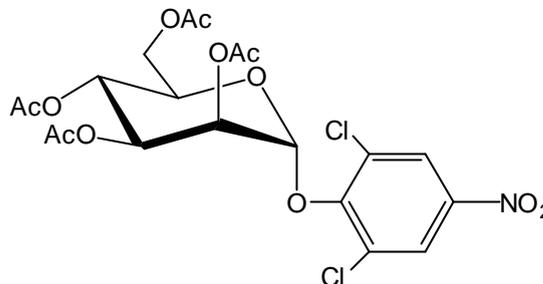
Glycon :  $^3J_{1,2} = 1.8$ ,  $^3J_{2,3} = 3.4$ ,  $^3J_{3,4} = 10.0$ ,  $^3J_{4,5} = 10.0$ ,  $^3J_{5,6a} = 5.6$ ,  $^3J_{5,6b} = 2.4$ ,  
 $^2J_{6a,6b} = 12.4$  Hz;

Aglycon:  $^3J_{arom} = 9.0$  Hz;

$^{13}C$ -NMR (75.47 MHz,  $D_6$ -DMSO):  $\delta = 170.14$ , 169.97, 169.30, 169.62 (C=O), 158.37 (Man-O- $C_{Ar}$ ), 142.67 ( $p$ - $C_{Ar}$ ), 128.73 ( $m$ - $C_{x'Ar}$ ), 126.50 ( $m$ - $C_{xAr}$ ), 123.18 ( $o$ - $C_{a'Ar}$ ), 113.30 ( $o$ - $C_{aAr}$ ), 95.60 (C-1), 69.85, 69.02, 68.65, 65.45 (C-2, C-3, C-4, C-5), 61.93 (C-6), 20.83, 20.66, 20.37 ( $COOCH_3$ ), 16.36 ( $CH_3$ ) ppm.

(2,6-Dichlor-4-nitrophenyl)-2,3,4,6-O-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid (**9c**)

5.0 g (12.8 mmol) Mannosepentaacetat **7** und 5.0 g (24.0 mmol) 2,6-Dichlor-4-Nitrophenol **8c** wurden mit 300 mg Zinkchlorid gemischt und 30 min auf 160°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde der Schmelzkuchen in Essigester aufgenommen und 3 mal mit 1 M Natronlauge und abschließend mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde getrocknet, eingeeignet und flaschchromatographisch (EE / CH 1:1) gereinigt.



Ausbeute: 180 mg (0.33 mmol;  $M = 538.29 \text{ g mol}^{-1}$ ), 2.6%

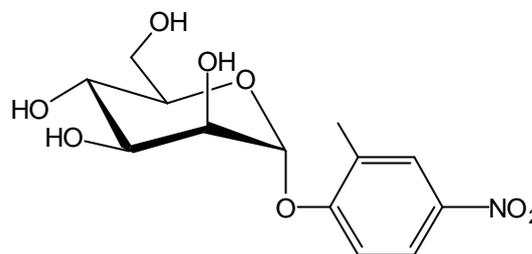
$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 8.25$  (2H, bs arom.  $\text{H}_x, \text{H}_x'$ ), 5.79 (1H, dd, H-2), 5.52 (1H, d, H-1), 5.42 (1H, dd $\approx$ t, H-4), 5.41 (1H, dd  $\approx$  t, H-4), 4.68 (1H, ddd, H-5), 4.29 (1H, dd, H-6a), 4.19 (1H, dd, H-6b), 2.20, 2.10, 2.08, 2.05 ( je 3H, s,  $\text{COCH}_3$ ) ppm;

$^3J_{1,2} = 2.0$ ,  $^3J_{2,3} = 3.3$ ,  $^3J_{3,4} = 10.2$ ,  $^3J_{4,5} = 10.2$ ,  $^3J_{5,6a} = 5.2$ ,  $^3J_{5,6b} = 2.4$ ,  $^2J_{6a,6b} = 12.4$  Hz;

$^{13}\text{C-NMR}$  (125.76 MHz,  $\text{D}_6\text{-DMSO}$ ):  $\delta = 170.52$ , 169.84, 169.68, 169.65 (C=O), 154.55 (Man-O- $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 144.19 ( $p\text{-C}_{\text{Ar}}$ ), 129.96 ( $o\text{-C}_{\text{Ar}}$ ), 124.70 ( $m\text{-C}_{\text{Ar}}$ ), 101.33 (C-1), 71.32, 69.08, 68.43, 65.53 (C-2, C-3, C-4, C-5), 62.20 (C-6), 20.83, 2 x 20.74, 20.77 ( $\text{COOCH}_3$ ) ppm.

(2-Methyl-4-nitrophenyl)- $\alpha$ -D-mannopyranosid (10)

4.00 g (8.27 mmol) des acetylierten Mannosids **9b** wurden nach **AAV 2** unter Zemplén-Bedingungen entschützt.



Ausbeute: 2.63 g (8.34 mmol;  $M = 315.28 \text{ g mol}^{-1}$ ), quantitativ

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_6\text{-DMSO}$ ):  $\delta = 8.08$  (2H,  $m_c$ , arom.  $H_x, H_x'$ ), 7.35 (1H, d, arom.  $H_a$ ), 5.62 (1H, d, H1), 3.90 (1H,  $m_c$ , H2), 3.71 (1H, dd, H3), 3.57 (1H, dd, H-6a), 3.54-3.45 (2H, m, H-4, H-5), 3.27 (1H, dd, H-6b), 2.26 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ) ppm;

Glycon :  $^3J_{1,2} = 1.9$ ,  $^3J_{2,3} = 3.4$ ,  $^3J_{3,4} = 9.2$ ,  $^3J_{5,6a} = 1.9$ ,  $^3J_{5,6b} = 9.4$ ,  $^2J_{6a,6b} = 11.8$  Hz;

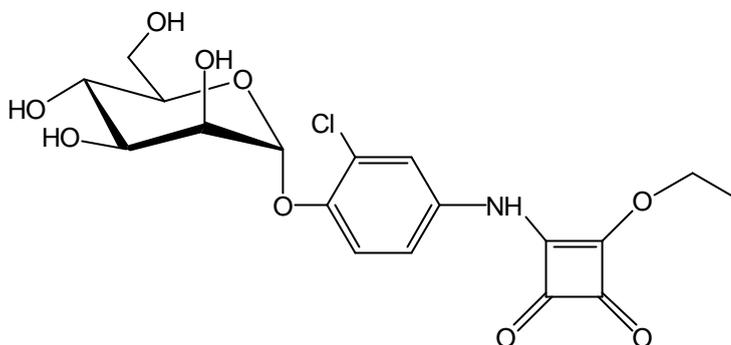
Aglycon:  $^3J_{\text{arom}} = 9.0$  Hz,  $^3J_{1,2} = 7.1$  Hz;

$^{13}\text{C-NMR}$  (125.76 MHz,  $\text{D}_6\text{-DMSO}$ ):  $\delta = 159.51$  (Man-O- $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 141.16 ( $p\text{-C}_{\text{Ar}}$ ), 128.15 ( $m\text{-C}_{x'\text{Ar}}$ ), 125.77 ( $m\text{-C}_{x\text{Ar}}$ ), 123.38 ( $o\text{-C}_{a'\text{Ar}}$ ), 114.06 ( $o\text{-C}_{a\text{Ar}}$ ), 98.37 (C-1), 75.60, 70.80, 69.88, 66.61 (C-2, C-3, C-4, C-5), 60.99 (C-6), 15.84 ( $\text{CH}_3$ ) ppm.

{*o*-Chlor-*p*-[*N*-4-ethoxy-2,3-dioxycyclobut-1-enyl]amino}phenyl}- $\alpha$ -D-mannopyranosid

**(11a)**

290 mg (0.86 mmol) des  
Chlornitrophenylmannosids **3**  
wurden in 10 ml MeOH gelöst  
und nach **AAV 1** mit 100 mg  
Pd/C-Katalysator für 1 h unter  
1 bar Wasserstoffatmosphäre



bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wurde filtriert und 300  $\mu$ l (2.03 mmol)  
DES wurden zugesetzt. Die Lösung wurde über Nacht gerührt, danach eingeeengt  
und mittels MPLC-RP-Chromatographie (MeOH / H<sub>2</sub>O 1:1) gereinigt. Die  
Titelverbindung wurde als weißes Lyophilisat erhalten.

Ausbeute: 287 mg (0.67 mmol; M = 429.81 g mol<sup>-1</sup>), 78%

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>6</sub>-DMSO, D<sub>2</sub>O-exchange):  $\delta$  = 7.51 (1H, bs, arom. H<sub>a</sub>), 7.34  
(1H, d, arom. H<sub>k</sub>), 7.25 (1H, d, arom. H<sub>k</sub>), 5.40 (1H, d, H-1), 4.78 (2H, q OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)  
3.87 (1H, dd, H-2), 3.72 (1H, dd, H-3), 3.38-3.64 (4H, m, H-5, H-6a, H-6b, H-4), 1.41  
(3H, t, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm;

Glycon : <sup>3</sup>J<sub>1,2</sub> = 1.7, <sup>3</sup>J<sub>2,3</sub> = 3.2, <sup>3</sup>J<sub>3,4</sub> = 8.8, <sup>3</sup>J<sub>5,6b</sub> = 1.7, <sup>2</sup>J<sub>6a,6b</sub> = 11.5 Hz;

Aglycon: <sup>3</sup>J<sub>arom</sub> = 9.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>1,2</sub> = 7.1 Hz;

<sup>13</sup>C-NMR (50.32 MHz, 313 K, D<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 191.56, 187.68, 183.52, 178.08 (C-  
Quadratsäure), 148.21 (Man-O-C<sub>Ar</sub>), 133.06 (*p*-C<sub>Ar</sub>), 122.94 (*m*-C<sub>Ar</sub>), 121.09 (*m*-C<sub>Ar</sub>),  
119.35 (*o*-C<sub>Ar</sub>-Cl), 118.24 (*o*-C<sub>Ar</sub>), 99.80 (C-1), 75.27 (C-5), 70.56 (C-3), 69.88 (C-2),  
69.49 (CH<sub>2</sub>), 66.61 (C-4), 61.00 (C-6), 15.44 (CH<sub>3</sub>) ppm.

MALDI-ToF-MS: m/z = 452.0, [M+Na<sup>+</sup>-Ion] (theor. 452.1) für C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>ClNO<sub>9</sub> (M =  
429.08)

$[\alpha]_D^{20}$  (c = 1.0 in DMSO) = + 54.7°

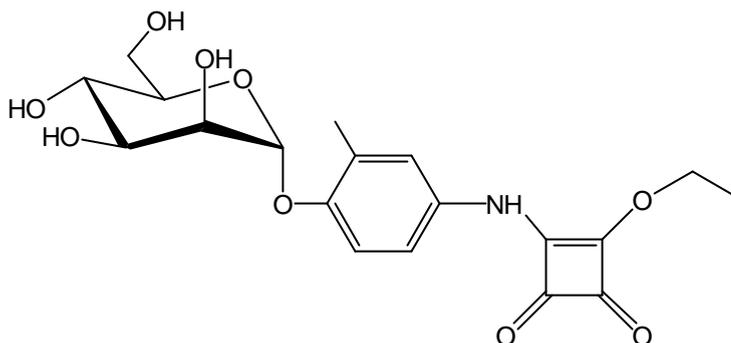
Elementaranalyse: C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>ClNO<sub>9</sub>·H<sub>2</sub>O: gefunden: C: 48.97%, H 4.63%, N 3.28%;  
theoretisch: C: 48.28%, H 4.95%, N 3.13%

{*o*-Mehtyl-*p*-[*N*-4-ethoxy-2,3-dioxycyclobut-1-enyl]amino]phenyl}- $\alpha$ -D-mannopyranosid (**11b**)

320 mg (1.02 mmol)

Methylnitrophenylmannosids

**10** wurden in 10 ml MeOH gelöst und nach **AAV 1** mit 100 mg Pd/C-Katalysator für 1 h



unter 1 bar Wasserstoffatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wurde filtriert und 150  $\mu$ l (1.02 mmol) DES wurden zugesetzt. Die Lösung wurde 2 h gerührt, danach eingengt und mittels MPLC-RP-Chromatographie (MeOH / H<sub>2</sub>O 1:1) gereinigt. Die Titelverbindung wurde als weißes Lyophilisat erhalten.

Ausbeute: 258 mg (0.63 mmol; M = 409.39 g mol<sup>-1</sup>), 62%

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 7.19-7.08 (3H, m, arom. H), 5.32 (1H, d, H-1), 4.75 (2H, q OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.86 (1H, dd, H-2), 3.70 (1H, dd, H-3), 3.61 (1H, dd, H-6a), 3.51-3.44 (2H, m, H-6b, H-4), 3.39 (1H, ddd, H-5), 2.16 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.40 (3H, t, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm;

Glycon : <sup>3</sup>J<sub>1,2</sub> = 1.9, <sup>3</sup>J<sub>2,3</sub> = 3.1, <sup>3</sup>J<sub>3,4</sub> = 9.2, <sup>3</sup>J<sub>5,6a</sub> = 1.9, <sup>3</sup>J<sub>5,6b</sub> = 9.2, <sup>2</sup>J<sub>6a,6b</sub> = 11.8 Hz;

Aglycon: <sup>3</sup>J<sub>arom</sub> = 8.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>1,2</sub> = 7.1 Hz;

<sup>13</sup>C-NMR (50.32 MHz, 313 K, D<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 188.01, 183.60, 177.60, 169.28 (C-Quadratsäure), 151.37 (Man-O-C<sub>Ar</sub>), 131.73 (*p*-C<sub>Ar</sub>), 127.43 (*m*-C<sub>xAr</sub>), 122.30 (*m*-C<sub>xAr</sub>), 118.48 (*o*-C<sub>a'Ar</sub>), 115.50 (*o*-C<sub>aAr</sub>), 98.97 (C-1), 75.06 (C-5), 70.87 (C-3), 70.26 (C-2), 69.38 (CH<sub>2</sub>), 66.81 (C-4), 61.14 (C-6), 16.19 (C<sub>Ar</sub>-CH<sub>3</sub>), 15.65 (CH<sub>3</sub>) ppm.

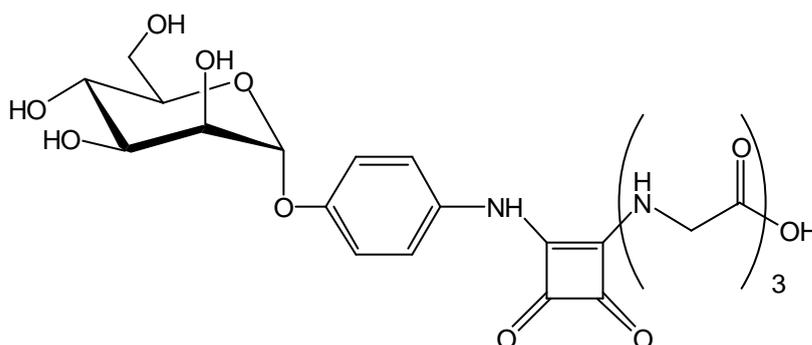
MALDI-ToF-MS:  $m/z = 432.3$ ,  $[M+Na^+-lon]$  (theor. 432.1) für  $C_{19}H_{23}NO_9$  ( $M = 409.14$ )

$[\alpha]_D^{20}$  ( $c = 1.0$  in DMSO) =  $+ 54.0^\circ$

Elementaranalyse:  $C_{18}H_{21}NO_9 \cdot H_2O$ : gefunden: C: 53.53%, H 5.81%, N 3.05%;  
theoretisch: C: 53.39%, H 5.90%, N 3.28%

*p*-[N-(4-Triglycyl-2,3-dioxocyclobut-1-enyl)amino]phenyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid (**12a**)

100 mg (0.25 mmol) **6**  
und 50 mg Triglycin (0.26  
mmol) wurden in 10 ml  
MeOH gelöst und mit 100  
 $\mu$ l DIPEA versetzt. Die  
Lösung wurde über Nacht



bei RT gerührt, eingengt und mittels MPLC-RP-Chromatographie (MeOH /  $H_2O$  1:3)  
gereinigt. Die Titelverbindung wurde als weißes Lyophilisat erhalten.

Ausbeute: 79 mg (0.15 mmol;  $M = 538.46 \text{ g mol}^{-1}$ ), 58.7%

$^1H$ -NMR (500 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta = 7.49$  (2H, d, arom. H), 7.05 (2H, d, arom. H), 5.28 (1H, d, H-1), 4.34 (2H, s  $NCH_2COOH$ ), 3.81 (1H, dd, H-2), 3.79 (2H, d,  $N-CH_2-CONH$ ), 3.66 (1H, dd, H-3), 3.61-3.41 (6H, m, H-4, H-5, H-6a, H-6b,  $N-CH_2-CONH$ ) ppm;

Glycon :  $^3J_{1,2} = 1.7$ ,  $^3J_{2,3} = 3.0$ ,  $^3J_{3,4} = 8.5$  Hz;

Aglycon:  $^3J_{arom} = 8.6$ ,  $^2J_{1,1'} = 5.8$  Hz;

$^{13}C$ -NMR (125.76 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta = 178.55$  (C=O Quadratsäure), 173.88, 173.38, 173.21 (C=O), 170.09 (C=O Quadratsäure), 122.80 ( $o-C_{Ar}$ ), 120.21 ( $m-C_{Ar}$ ), 100.84

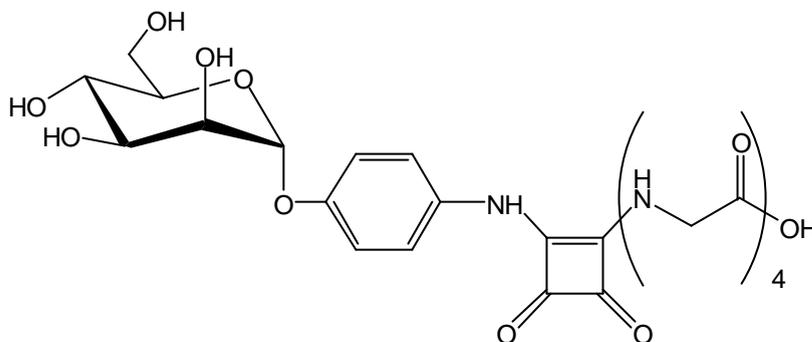
(C-1), 75.69, 72.67, 72.20, 68.88 (C-2, C-3, C-4, C-5), 63.01 (C-6), 45.37, 44.86, 44.80 (3 x Gly-CH<sub>2</sub>) ppm.

MALDI-ToF-MS:  $m/z = 561.4$ , [M+Na<sup>+</sup>-Ion] (theor. 561.1) für C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>12</sub> (M = 538.15)

$[\alpha]_D^{20}$  (c = 1.0 in D<sub>2</sub>O) = + 38.0°

*p*-[N-(4-Tetraglycyl-2,3-dioxocyclobut-1-enyl)amino]phenyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid  
(12b)

150 mg (0.38 mmol) **6**  
und 50 mg Tetraglycin  
(0.36 mmol) wurden in 10  
ml MeOH / H<sub>2</sub>O 1 : 1  
gelöst und mit 100  $\mu$ l  
DIPEA versetzt. Die



Lösung wurde über Nacht bei RT gerührt, eingengt und mittels MPLC-RP-Chromatographie (MeOH / H<sub>2</sub>O 1:4) gereinigt. Die Titelverbindung wurde als weißes Lyophilisat erhalten.

Ausbeute: 138 mg (0.23 mmol; M = 595.51 g mol<sup>-1</sup>), 64.4%

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta = 7.19$  (2H, d, arom. H), 7.06 (2H, d, arom. H), 5.49 (1H, m, H-1), 4.39 (2H, s, NCH<sub>2</sub>COOH), 4.12 (1H, dd, H-2), 4.03 (2H, s, N-CH<sub>2</sub>-CONH), 4.00 (1H, dd, H-3), 3.97 (2H, s, N-CH<sub>2</sub>-CONH), 3.80-3.66 (6H, m, H-4, H-5, H-6a, H-6b, N-CH<sub>2</sub>-CONH) ppm;

Glycon :  $^3J_{1,2} = 1.8$ ,  $^3J_{2,3} = 3.3$ ,  $^3J_{3,4} = 9.2$  Hz;

Aglycon:  $^3J_{\text{arom}} = 8.5$  Hz;

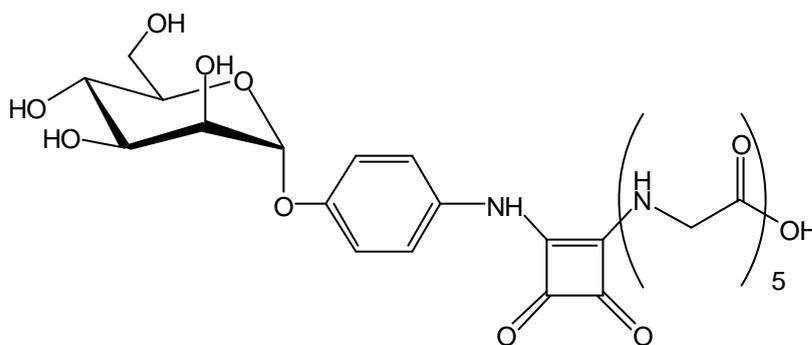
$^{13}\text{C}$ -NMR (125.76 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 174.22, 173.35$  (2 x C=O), 120.40 (*o*-C<sub>Ar</sub>), 120.28 (*m*-C<sub>Ar</sub>), 100.83 (C-1), 75.74, 72.69, 72.19, 68.91 (C-2, C-3, C-4, C-5), 63.02 (C-6), 45.31, 44.98, 44.88, 44.69 (4 x Gly-CH<sub>2</sub>) ppm.

MALDI-ToF-MS:  $m/z = 617.8$ , [M+Na<sup>+</sup>-Ion] (theor. 618.2) für C<sub>24</sub>H<sub>29</sub>N<sub>5</sub>O<sub>13</sub> (M = 595.2)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  (c = 1.0 in  $\text{D}_2\text{O}$ ) = + 21.1°

*p*-[N-(4-Pentaglycyl-2,3-dioxocyclobut-1-enyl)amino]phenyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid  
**(12c)**

100 mg (0.25 mmol) **6**  
und 74 mg Pentaglycin  
(0.24 mmol) wurden in 10  
ml MeOH / H<sub>2</sub>O 2 : 1  
gelöst und mit 100  $\mu\text{l}$   
DIPEA versetzt. Die



Lösung wurde über Nacht bei RT gerührt, eingengt und mittels MPLC-RP-Chromatographie (MeOH / H<sub>2</sub>O 1:4) gereinigt. Die Titelverbindung wurde als weißes Lyophilisat erhalten.

Ausbeute: 126 mg (0.19 mmol; M = 652.56 g mol<sup>-1</sup>), 80.5%

$^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 7.23$  (2H, d, arom. H), 7.13 (2H, d, arom. H), 5.54 (1H, m, H-1), 4.76 (2H, s NCH<sub>2</sub>COOH), 4.15 (1H, dd, H-2), 4.03 (2H, s, N-CH<sub>2</sub>-CONH), 4.01 (1H, m, H-3), 4.00 (2H, s, N-CH<sub>2</sub>-CONH), 3.95 (2H, s, N-CH<sub>2</sub>-CONH), 3.80-3.67 (6H, m, H-4, H-5, H-6a, H-6b, N-CH<sub>2</sub>-CONH) ppm;

Glycon :  $^3J_{1,2} = 1.7, ^3J_{2,3} = 3.4$  Hz;

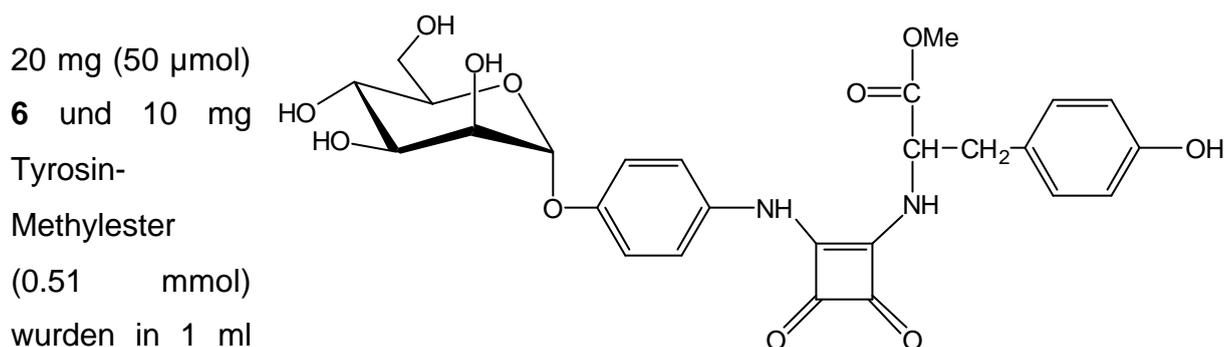
Aglycon:  $^3J_{\text{arom}} = 8.6$  Hz;

$^{13}\text{C}$ -NMR (125.76 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 174.37$  (5 x C=O), 123.51 ( $o\text{-C}_{\text{Ar}}$ ), 120.29 ( $m\text{-C}_{\text{Ar}}$ ), 100.79 (C-1), 75.72, 72.68, 72.19, 68.91 (C-2, C-3, C-4, C-5), 63.00 (C-6), 44.87 (5 x Gly- $\text{CH}_2$ ) ppm.

MALDI-ToF-MS:  $m/z = 674.6$ ,  $[\text{M}+\text{Na}^+\text{-Ion}]$  (theor. 675.2) für  $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}_{14}$  (M = 652.2)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  (c = 1.0 in  $\text{D}_2\text{O}$ ) = + 26.5°

*p*-[N-(4-Methyltyrosyl-2,3-dioxocyclobut-1-enyl)amino]phenyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid  
**(13)**



$\text{MeOH} / \text{H}_2\text{O}$  4 : 1 gelöst und mit 250  $\mu\text{l}$  DIPEA versetzt. Die Lösung wurde über Nacht bei RT gerührt, eingengt und mittels MPLC-RP-Chromatographie ( $\text{MeOH} / \text{H}_2\text{O}$  1:4) gereinigt. Die Titelverbindung wurde als weißes Lyophilisat erhalten.

Ausbeute: 17 mg (31  $\mu\text{mol}$ ; M = 544.51  $\text{g mol}^{-1}$ ), 62.4%

$^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 7.04$  (2H, d, arom. H), 7.03 (2H, d, arom. H), 6.75 (4H, m, arom. H), 5.47 (1H, d, H-1), 4.04 (1H, dd, H-2), 3.93 (1H, dd, H-3), 3.83 (3H, s,  $\text{COOCH}_3$ ), 3.81 - 3.72 (5H, m, H-4, H-6a, H-6b,  $\text{CH-CH}_2$ ), 3.65 (1H, ddd, H-5), 3.10 (1H, dd,  $\text{CHCH}_2$ ) ppm;

Glycon :  $^3\text{J}_{1,2} = 1.8$ ,  $^3\text{J}_{2,3} = 3.4$ ,  $^3\text{J}_{3,4} = 9.5$ ,  $^3\text{J}_{4,5} = 5.4$ ,  $^3\text{J}_{5,6a} = 9.7$   $^3\text{J}_{5,6b} = 2.4$  Hz;

Aglycon:  $^3\text{J}_{\text{arom}} = 8.6$ ,  $^3\text{J}_{\text{aromTyr}} = 9.2$  Hz;

$^{13}\text{C}$ -NMR (125.76 MHz,  $\text{D}_6$ -DMSO):  $\delta = 184.60, 182.74, 176.15, 172.73$  (C-Quadratsäure), 165.70 (C=O), 157.78 ( $\text{C}_{\text{Ar-OH}}$ ), 154.64 (Man-O- $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 131.45 ( $p$ - $\text{C}_{\text{ArTyr}}$ ), 131.33 ( $p$ - $\text{C}_{\text{ArpAP}}$ ), 121.40 ( $m$ - $\text{C}_{\text{ArTyr}}$ ), 118.78 ( $m$ - $\text{C}_{\text{ArpAP}}$ ), 116.43 ( $o$ - $\text{C}_{\text{ArTyr}}$ ), 116.34 ( $o$ - $\text{C}_{\text{ArpAP}}$ ), 100.56 (C-1), 75.41 (C-5), 72.36 (C-3), 71.96 (C-2), 68.32 (C-4), 62.66 (C-6), 56.70 (CH), 52.38 ( $\text{CH}_3$ ), 39.98 ( $\text{CH}_2$ ) ppm.

MALDI-ToF-MS:  $m/z = 567.4$ ,  $[\text{M}+\text{Na}^+]$  (theor. 567.2) für  $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_{11}$  (M = 544.2)

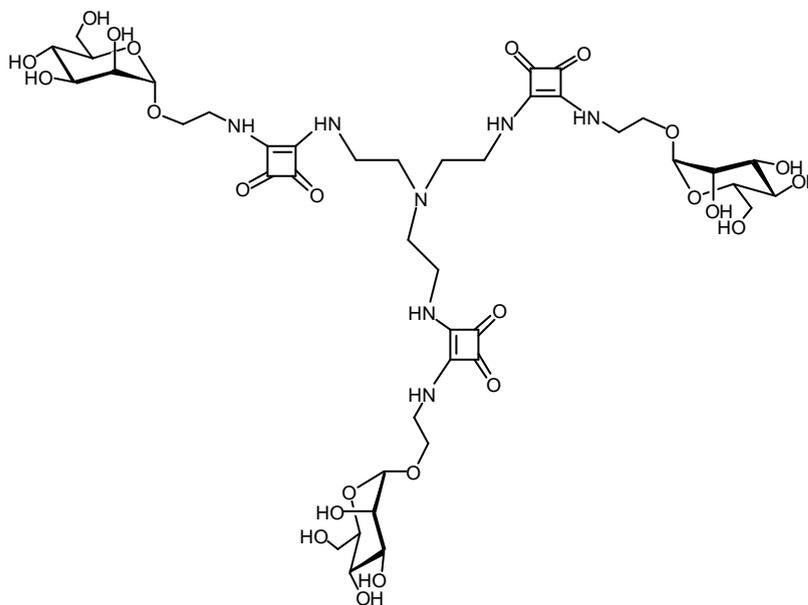
Elementaranalyse:  $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_{11} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ :

gefunden: C: 52.51%, H 5.66%, N 4.78%;

theoretisch: C: 52.17%, H 5.73%, N 4.68%

Tris-2-{N-[4-N-( $\alpha$ -D-mannopyranosyloxyethyl)-2,3-dioxocyclobut-1-enyl]aminoethyl}amin (16)

500 mg (1.4 mmol) Mannopyranosyloxyethyl-quadratsäuremonoamid  $15^{80}$  wurden in 10 ml MeOH gelöst und mit 60  $\mu\text{l}$  (0.4 mmol) Tris-(2-aminoethyl)-amin sowie 0.5 ml DIPEA versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 24 h bei RT gerührt und dann eingengt. Das Rohprodukt wurde mittels HPLC gereinigt.



Ausbeute: 152 mg (8.46  $\mu\text{mol}$ ; M = 1050.0  $\text{g mol}^{-1}$ ), 36.2%

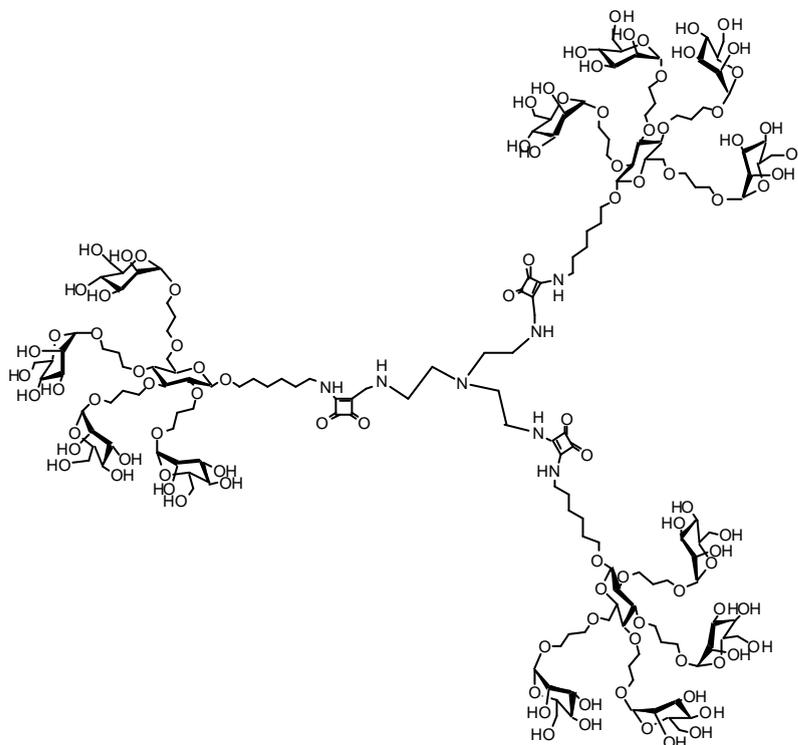
$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 4.86$  (3H, m, 3 x H-1), 4.08 (3H, m, 3 x H-2), 3.85 (3H, m, 3x H-3), 3.78-3.61 (3H, m, 3 x H-5, 3 x H-6a, 3 x H-6b, 18 x ethyl), 3.61 (3H, m, 3 x H-4), 3.50 (6H, m,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$  (125.76 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 184.44$ , 178.85 (C=O-Quadratsäure), 171.71, 169.98, (C=C-Quadratsäure), 101.94 ( 3 x C-1), 75.37 (3 x C-5), 72.95 (3 x C-3), 72.39 (3 x C-2), 68.99 (3 x C-4), 68.18 (3 x  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 65.43 (3 x  $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 63.36 (3 x C-6), 46.29 (3 x  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 41.18 (3 x  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ) ppm.

MALDI-ToF-MS:  $m/z = 1071.55$  [ $\text{M}+\text{Na}^+$ -Ion], (theor. 1072.4) für  $\text{C}_{42}\text{H}_{63}\text{N}_7\text{O}_{24}$  (M = 1049.4)

Tris-2-{N-[4-N-{6-Aminohexyl-2,3,4,6-tetra-O-[3-( $\alpha$ -D-mannopyranosyloxy)-propyl]- $\beta$ -D-glucopyranosyloxyhexyl]-2,3-dioxocyclobut-1-enyl]aminoethyl}amin (**22**)

38 mg (29.6  $\mu\text{mol}$ ) 6-Aminohexyl-1-cyclobuten-3,4-dion-2,3,4,6-tetra-O-[3-( $\alpha$ -D-mannopyranosyloxy)-propyl]- $\beta$ -D-glucopyranosid **21** wurden in 2 ml MeOH gelöst und an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit je 0.25  $\mu\text{l}$  (zusammen 3.3  $\mu\text{mol}$ ) Tris-(2-aminoethyl)-amin



sowie 0.5 ml DIPEA versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 10 d bei RT gerührt und eingengt. Das Rohprodukt wurde mittels GPC gereinigt.

Ausbeute: 8 mg (2.06  $\mu\text{mol}$ ; M = 3890.0 g  $\text{mol}^{-1}$ ), 62.4%

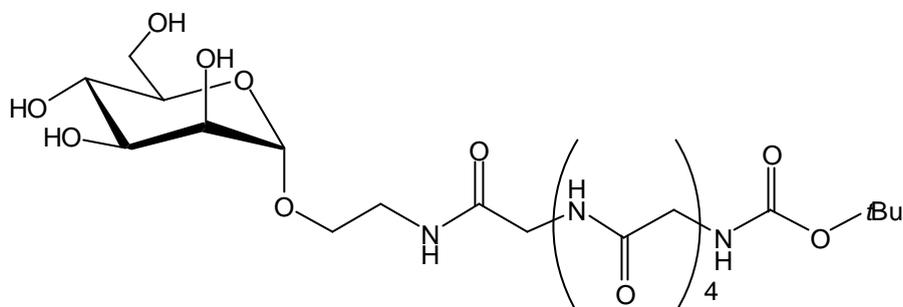
$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  4.86-4.83 (12H, m, 12 x  $\text{H-1}_{\text{Man}}$ ), 4.38 (3H, d, 3 x  $\text{H-1}_{\text{Glc}}$ ), 3.96-3.54 (141 H, m, 12 x  $\text{H-2}_{\text{Man}}$ , 12 x  $\text{H-3}_{\text{Man}}$ , 12 x  $\text{H-4}_{\text{Man}}$ , 12 x  $\text{H-5}_{\text{Man}}$ , 12 x  $\text{H-6a}_{\text{Man}}$ , 12 x  $\text{H-6b}_{\text{Man}}$ , 3 x  $\text{H-5}_{\text{Glc}}$ , 3 x  $\text{H-6a}_{\text{Glc}}$ , 3 x  $\text{H-6b}_{\text{Glc}}$ , 15 x  $(\text{Glc})\text{OCH}_2$ , 12 x  $\text{Man-O-CH}_2$ , 3 x  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ , 3 x  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.37 (3 H, m, 3 x  $\text{H-4}_{\text{Glc}}$ ), 3.30 (3H, dd  $\approx$  t, 3 x  $\text{H-3}_{\text{Glc}}$ ), 3.09 (3H, m, 3 x  $\text{H-2}_{\text{Glc}}$ ), 2.79 (6 H, m, 3 x  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 2.00-1.86 (24H, m, 12 x  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 1.69-1.56 (12H, m, 3 x  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 1.46-1.34 (12H, m, 3 x  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$  (125.76 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  = 104.9 (3 x  $\text{C-1}_{\text{Glc}}$ ), 102.2 (12 x  $\text{C-1}_{\text{Man}}$ ), 86.3 (3 x  $\text{C-3}_{\text{Glc}}$ ), 84.0 (3 x  $\text{C-2}_{\text{Glc}}$ ), 80.3 (3 x  $\text{C-4}_{\text{Glc}}$ ), 76.2 (3 x  $\text{C-5}_{\text{Glc}}$ ), 75.2 (12 x  $\text{C-5}_{\text{Man}}$ ), 73.4 (3 x  $\text{Glc-O-CH}_2$ ), 73.1 (12 x  $\text{C-3}_{\text{Man}}$ ), 73.0 (3 x  $\text{Glc-O-CH}_2$ ), 72.7 (3 x  $\text{Glc-O-CH}_2$ ), 72.6 (12 x  $\text{C-2}_{\text{Man}}$ ), 72.26 (3 x  $\text{Glc-O-CH}_2$ ), 71.3 (3 x  $\text{Glc-O-CH}_2$ ), 70.6 (3 x  $\text{C-6}_{\text{Glc}}$ ), 69.1 (12 x  $\text{C-4}_{\text{Man}}$ ), 66.8 (12 x  $\text{Man-O-CH}_2$ ), 63.33 (12 x  $\text{C-6}_{\text{Man}}$ ), 46.6 (3 x  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 32.6, 32.0, 31.9, 31.8, 31.2 (12 x  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ , 3 x  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ , 3 x  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 27.7, 27.3 (3 x  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ) ppm.

MALDI-ToF-MS:  $m/z$  = 3915.3,  $[\text{M}+\text{Na}^+ - \text{Ion}]$  (theor. 3909.7) für  $\text{C}_{164}\text{H}_{283}\text{N}_7\text{O}_{96}$  ( $M$  = 3886.8)

(2-Amidoethyl-*w*-*N*-*t*-Butyloxycarbonylpentaglycid)- $\alpha$ -D-mannopyranosid (23)

300 mg (0.75 mmol)  
Boc-geschütztes  
Pentaglycid sowie  
170 mg (0.83 mmol)  
DCC und 110 mg  
(0.81 mmol) HOBT



wurden bei 0°C in 10 ml DMF gelöst und für 30 min gerührt. Anschließend wurden 150 mg (0.67 mmol) Aminoethyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid **5** zugegeben, weitere 30 min bei 0°C gerührt und nach einer Zugabe von 100  $\mu$ l DIPEA die Kühlung entfernt und über Nacht bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wurde der Ansatz filtriert, eingeeengt und mittels MPLC-RP-Chromatographie (MeOH / H<sub>2</sub>O 1:4  $\rightarrow$  2:3) gereinigt. Die Titelverbindung wurde als weißes Lyophilisat erhalten.

Ausbeute: 190 mg (0.31 mmol; M = 608.6 g mol<sup>-1</sup>), 46.3%

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  = 4.78 (1H, d, H-1), 3.95 (6H, m, 2 x N-CH<sub>2</sub>-CONH, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.93 (2H, s, N-CH<sub>2</sub>-CONH), 3.87 (1H, m, H-2), 3.86 (2H, s, N-CH<sub>2</sub>-CONH), 3.82 (2H, m, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.81 (1H, dd, H-6a), 3.77 (2H, s, N-CH<sub>2</sub>-CONH), 3.72 (1H, m, H-3), 3.59-3.50 (3H, m, H-4, H-5, H-6b), 1.39 (9H, s, C-CH<sub>3</sub>) ppm;

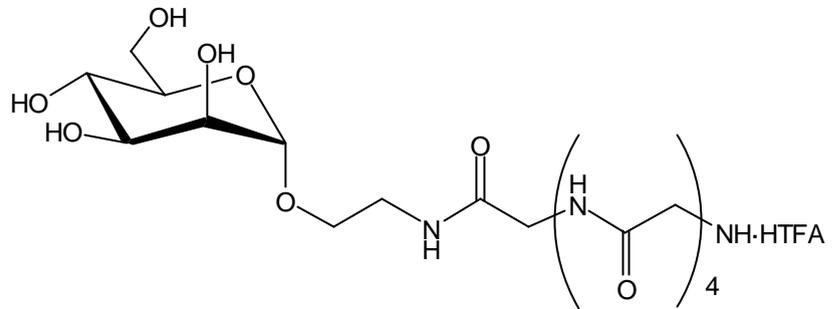
<sup>3</sup>J<sub>1,2</sub> = 1.8, <sup>3</sup>J<sub>2,3</sub> = 3.5, <sup>3</sup>J<sub>3,4</sub> = 8.9, <sup>3</sup>J<sub>5,6b</sub> = 1.8, <sup>2</sup>J<sub>6a,6b</sub> = 12.1 Hz;

<sup>13</sup>C-NMR (125.76 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  = 175.96 (NH-CO-O), 174.60, 2 x 174.36, 2 x 173.74 (C=O), 101.98 (C-1), 84.15 (C-CH<sub>3</sub>), 75.11 (C-5), 72.80 (C-3), 72.32 (C-2), 69.10 (C-4), 68.02 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 63.25 (C-6), 45.82 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 44.81 (4 x CH<sub>2</sub>), 41.27 (CH<sub>2</sub>), 29.89 (C-CH<sub>3</sub>) ppm.

MALDI-ToF-MS: m/z = 631.1, [M+Na<sup>+</sup>-Ion] (theor. 631.3) für C<sub>23</sub>H<sub>40</sub>N<sub>6</sub>O<sub>13</sub> (M = 608.3)

(2-Amidoethyl-pentaglycyl)- $\alpha$ -D-mannopyranosid - hydrotrifluoroacetat (24)

190 mg (0.31 mmol) **23** wurden 2h in 90%iger, wässriger TFA gerührt und *i. vac.* bei Raumtemperatur eingengt. Der Rückstand



wurde in Wasser aufgenommen, filtriert und gefriergetrocknet. Die Titelverbindung wurde als weißes Lyophilisat erhalten.

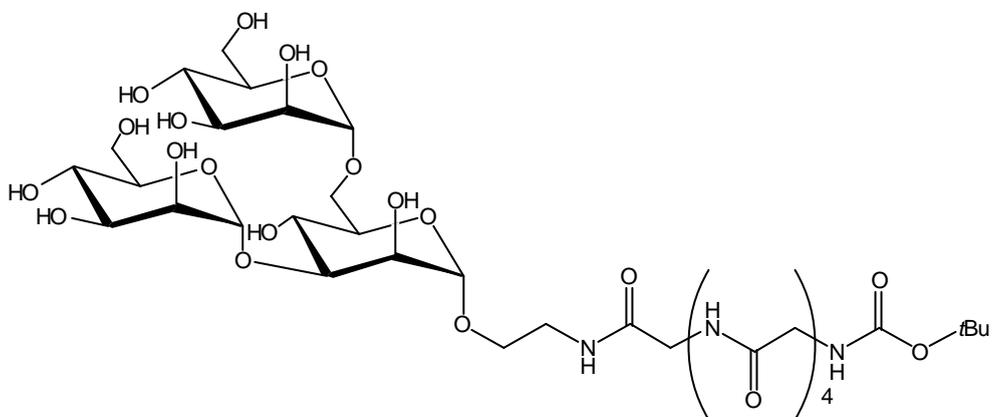
Ausbeute: 163 mg (0.26 mmol;  $M = 622.5 \text{ g mol}^{-1}$ ), 84.5%

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 4.79$  (1H, m, H-1), 4.02, 3.97, 3.95, 3.87, 3.86 (je 2H, s, N- $\text{CH}_2\text{-CONH}$ ), 3.80-3.38 (10H, m, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6a, H-6b, 2 x  $\text{CH}_2$ ) ppm.

MALDI-ToF-MS:  $m/z = 531.1$ ,  $[\text{M}+\text{Na}^+\text{-Ion}]$  (theor. 531.2) für  $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}_{11}$  ( $M = 508.23$ )

(2-Amidoethyl-*w-N-t*-Butyloxycarbonylpentaglycyl)-3,6-di-O- $\alpha$ -D-mannopyranosyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid (26)

250 mg (0.46 mmol) Tri-mannosid **25** sowie 220 mg (0.55 mmol)



Boc-

geschütztes Pentaglycid und 250 mg (0.66 mmol) HATU wurden bei  $0^\circ\text{C}$  in 5 ml DMF gelöst und mit 100  $\mu\text{l}$  DIPEA versetzt. Anschließend wurde über Nacht gerührt.

Zur Aufarbeitung wurde der Ansatz filtriert, eingengt und mittels MPLC-RP-Chromatographie (MeOH / H<sub>2</sub>O 1:4 → 2:3) gereinigt. Die Titelverbindung wurde als weißes Lyophilisat erhalten.

Ausbeute: 162 mg (0.31 mmol; M = 932.88 g mol<sup>-1</sup>), 37.8%

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ = 5.14 (1H, d, H-1), 4.93 (1H, s, H-1'), 4.77 (1H, d, H-1''), 4.09, 4.05, 4.02 ( je 1H, dd, 3 x H-2), 3.98 (8H, m, 3 x N-CH<sub>2</sub>-CONH, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.92-3.84 (6H, m, je 3x H3, H6a), 3.81 (4H, m, 2 x N-CH<sub>2</sub>-CONH), 3.76 (2H, m, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.68–3.30 (9H, m, je 3 x H4, H5, H6b), 1.40 (9H, s, C-CH<sub>3</sub>) ppm;

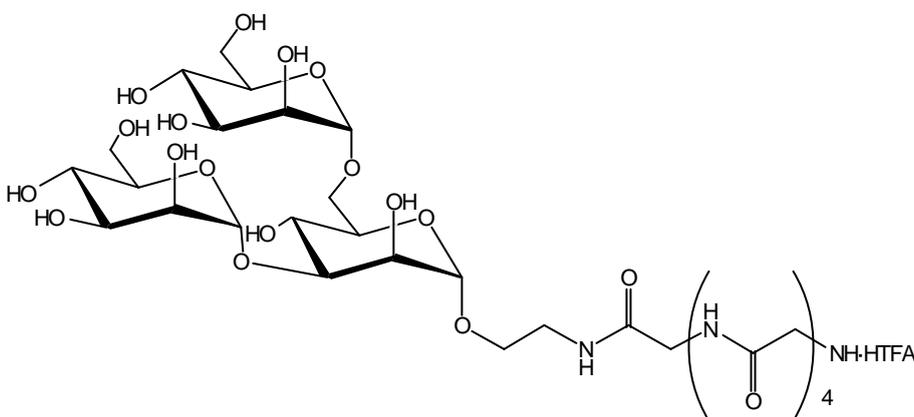
<sup>3</sup>J<sub>1,2</sub> = 1.5, <sup>3</sup>J<sub>1',2'</sub> = 1.6, <sup>3</sup>J<sub>1'',2''</sub> = 1.9, <sup>3</sup>J<sub>2,3</sub> = 3.1, <sup>3</sup>J<sub>2',3'</sub> = 3.3, <sup>3</sup>J<sub>2'',3''</sub> = 3.3 Hz.

MALDI-ToF-MS: m/z = 956.1, [M+Na<sup>+</sup>-Ion] (theor. 955.4) für C<sub>35</sub>H<sub>60</sub>N<sub>6</sub>O<sub>23</sub> (M = 932.4)

(2-Amidoethyl-pentaglycyl)-3,6-di-O-α-D-mannopyranosyl-α-D-mannopyranosid-hydrotrifluoroacetat (27)

72 mg (77.2 μmol)

**26** wurden 2h in 90%iger, wässriger TFA gerührt und *i. vac.* bei Raumtemperatur eingengt. Der Rückstand wurde



in Wasser aufgenommen, filtriert und gefriergetrocknet. Die Titelverbindung wurde als weißes Lyophilisat erhalten.

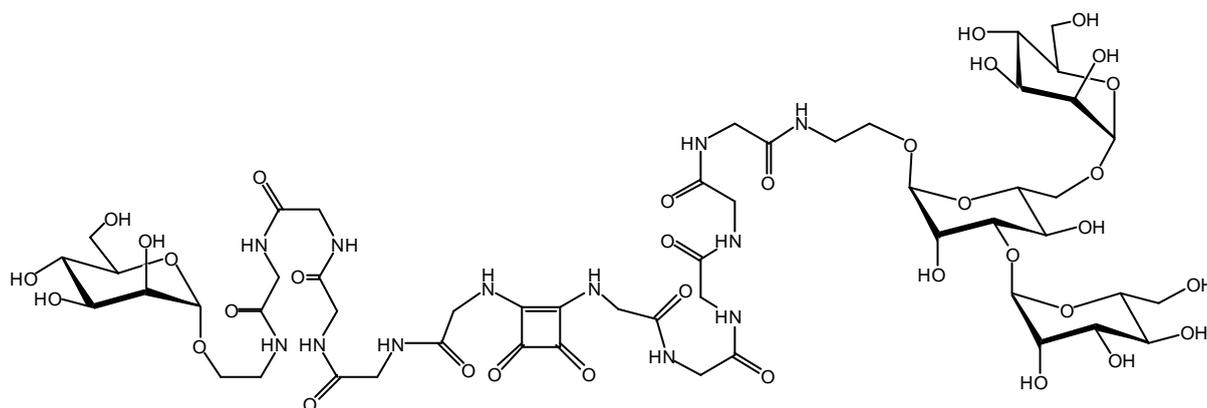
Ausbeute: 62 mg (65.6 μmol; M = 945.78 g mol<sup>-1</sup>), 84.9%

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta = 5.05$  (1H, d, H-1), 4.84 (1H, d, H-1'), 4.79 (1H, s, H-1''), 4.05 (1-H, m, H-2), 4.02 (2H, s, N- $\text{CH}_2$ -CONH), 4.01 (1-H, m, H-2'), 3.98, 3.96 (je 2H, s, 2 x N- $\text{CH}_2$ -CONH), 3.93 (1H, dd, H-2''), 3.88 - 3.86 (je 2H, s, 2 x N- $\text{CH}_2$ -CONH), 3.85-3.60 (19 H, m, je 3x H-3, H-4, H-5, H-6a, H-6b,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ) ppm; (die Protonen konnten nicht korrekt den Ringsystemen zugeordnet werden).

$^3\text{J}_{1,2} = 1.6$ ,  $^3\text{J}_{1',2'} = 1.6$ ,  $^3\text{J}_{2,3} = 3.4$ ,  $^3\text{J}_{2',3'} = 3.3$ ,  $^3\text{J}_{2'',3''} = 3.3$  Hz.

MALDI-ToF-MS:  $m/z = 855.8$ ,  $[\text{M}+\text{Na}^+]$ -Ion (theor. 855.8) für  $\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{N}_6\text{O}_{21}$  ( $M = 832.76$ )

### Klammer-Saccharid (28)



15 mg (24.1  $\mu\text{mol}$ ) **27** wurden in 1 ml DMF gelöst, mit 8  $\mu\text{l}$  Triethylamin neutralisiert und mit 3.4  $\mu\text{l}$  (23  $\mu\text{mol}$ ) DES versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 2 h gerührt und der Umsatz an diesem Punkt mittels MALDI-ToF kontrolliert. Anschließend wurden 20 mg (21.1  $\mu\text{mol}$ ) **24** sowie 100  $\mu\text{l}$  Triethylamin zugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wurde die Reaktionsmischung eingeeengt und mittels Größenausschlußchromatographie an Bio-Gel P4 gereinigt.

Ausbeute: 12 mg (8.46  $\mu\text{mol}$ ;  $M = 1418.2 \text{ g mol}^{-1}$ ), 40.3%

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , water suppression):  $\delta = 4.88$  (1H, d, H-1), 4.83 (1H, d, H-1), 4.80 (1H, d, H-1), 4.72 (1H, d, H-1), 4.03, 4.01, 4.00, 3.97, 3.96 (je 2H, s, 5 x N-

CH<sub>2</sub>-CONH), 3.91 (2H, m, H-2, H-2'), 3.93 (2H, s, N-CH<sub>2</sub>-CONH), 3.88 - 3.81 (10 H, m, H-2'', H-2''', 4 x H-3, 4 x H-6a), 3.76 - 3.68 (28 H, m, 4 x N-CH<sub>2</sub>-CONH, 4 x H-4, 4 x H-5, 4 x H-6b, 2 x OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, 2 x OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N) ppm;

<sup>3</sup>J<sub>1,2</sub> = 1.6, <sup>3</sup>J<sub>1',2'</sub> = 1.3, <sup>3</sup>J<sub>1'',2''</sub> = 1.5, <sup>3</sup>J<sub>1,2</sub> = 1.1 Hz;

<sup>13</sup>C-NMR (125.76 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 185.45, 178.85 (C=O<sub>QS</sub>), 176.04, 175.43, 174.68, 174.61, 174.58, 174.44, 174.41, 174.33, 174.27, 173.82, 173.76, (C=O), 104.83, 102.08, 102.09, 101.80 (C-1), 75.74, 75.22, 75.12, 74.67 (C-5), 73.33, 73.12, 73.01, 72.92 (C-3), 72.55, 72.50, 72.44, 72.41 (C-2), 69.22, 69.16 (je 2 x C-4), 68.10 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 67.62 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 64.19, 64.06, 63.69, 63.34 (C-6), 48.69 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 46.07 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 45.87 (8 x CH<sub>2</sub>), 45.24 (CH<sub>2</sub>), 45.18 (CH<sub>2</sub>) ppm.

MALDI-ToF-MS: m/z = 1442.2, [M+Na<sup>+</sup>-Ion] (theor. 1441.5) für C<sub>52</sub>H<sub>82</sub>N<sub>12</sub>O<sub>34</sub> (M = 1418.52)

ESI-ToF-MS: m/z = 1441.1, [M+Na<sup>+</sup>-Ion] (theor. 1441.5) für C<sub>52</sub>H<sub>82</sub>N<sub>12</sub>O<sub>34</sub> (M = 1418.52)

### 2-Amidoethyl-*w*-N-*t*-Butyloxycarbonylpentaglycyl)-α-D-glucopyranosid (30)

150 mg (0.38 mmol)

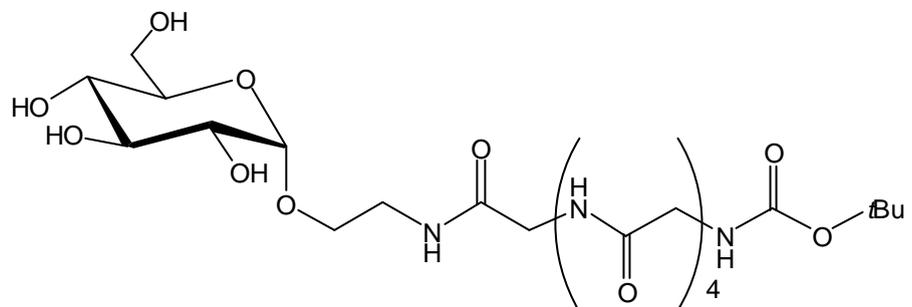
Boc-geschütztes

Pentaglycid sowie

170 mg

(0.83 mmol) DCC

und 120 mg



(0.88mmol) HOBt wurden bei 0°C in 10 ml DMF gelöst und für 30 min gerührt. Anschließend wurden 200 mg (1.12 mmol) Aminoethyl-α-D-glucopyranosid **29** zugegeben, weitere 30 min bei 0°C gerührt und nach einer Zugabe von 100 µl DIPEA die Kühlung entfernt und über Nacht bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wurde der

Ansatz filtriert, eingengt und mittels MPLC-RP-Chromatographie (MeOH / H<sub>2</sub>O 1:4 → 2:3) gereinigt. Die Titelverbindung wurde als weißes Lyophilisat erhalten.

Ausbeute: 190 mg (0.31 mmol; M = 608.6 g mol<sup>-1</sup>), 81.6%

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 3.98 (1H, d, H1), 3.91 (8H, m, 3 x NCH<sub>2</sub>-CONH, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.81 (2H, s, N-CH<sub>2</sub>-CONH), 3.77 (1H, dd, H-6a), 3.73 (4H, s, N-CH<sub>2</sub>-CONH, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.59-3.50 (5H, m, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6b), 1.32 (9H, s, C-CH<sub>3</sub>) ppm;

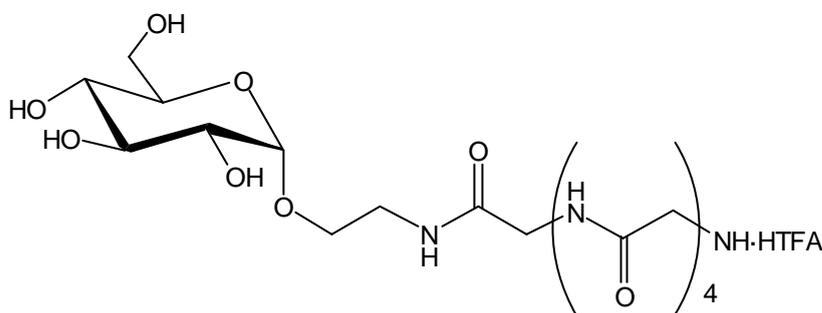
<sup>3</sup>J<sub>5,6a</sub> = 1.9, <sup>2</sup>J<sub>6a,6b</sub> = 12.0 Hz;

<sup>13</sup>C-NMR (125.76 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 176.03 (NH-CO-O), 174.72, 174.64, 174.39, 174.01, 173.78 (C=O), 102.05 (C-1), 83.30 (C-CH<sub>3</sub>), 75.19 (C-5), 72.88 (C-3), 72.40 (C-2), 69.18 (C-4), 63.32 (C-6), 50.28 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 45.87 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 44.87 (5 x N-CH<sub>2</sub>-CONH), 29.95 (C-CH<sub>3</sub>) ppm;

MALDI-ToF-MS: m/z = 631.6, [M+Na<sup>+</sup>-Ion] (theor. 631.3) für C<sub>26</sub>H<sub>32</sub>N<sub>6</sub>O<sub>14</sub> (M = 608.3)

(2-Amidoethyl-pentaglycyl)-α-D-glucopyranosid - hydrotrifluoroacetat (31)

190 mg (0.31 mmol) **30** wurden 1h in 90%iger, wässriger TFA gerührt und *i. vac.* bei Raumtemperatur eingengt.



Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen, filtriert und gefriergetrocknet. Die Titelverbindung wurde als weißes Lyophilisat erhalten.

Ausbeute: 200 mg (0.32 mmol; M = 622.5 g mol<sup>-1</sup>), quantitativ

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_6\text{-DMSO}$ ):  $\delta = 3.85$  (1H, d, H-1), 3.77 (1H, m, H-2), 3.62 (2H, s, N- $\text{CH}_2\text{-CONH}$ ), 3.61-3.10 (17H, m, H-3, H-4, H-5, H6a, H6b, 4 x N $\text{CH}_2\text{-CONH}$ ,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ) ppm;

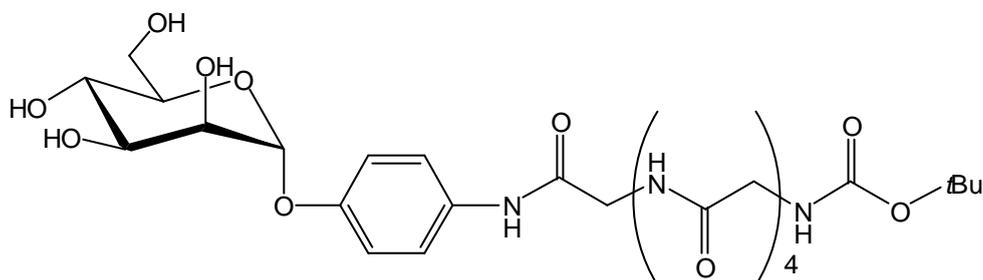
$^3\text{J}_{1,2} = 5.1$  Hz;

$^{13}\text{C-NMR}$  (125.76 MHz,  $\text{d}_6\text{-DMSO}$ ):  $\delta = 169.22$ , 169.21, 169.12, 168.66, 166.34 (C=O), 99.95 (C-1), 74.00 (C-5), 70.87 (C-3), 70.22 (C-2), 67.01 (C-4), 65.25 (C-6), 61.25 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 53.56 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 41.96 (4 x  $\text{CH}_2$ ), 41.81 ( $\text{CH}_2$ ) ppm.

MALDI-ToF-MS:  $m/z = 531.6$ ,  $[\text{M}+\text{Na}^+\text{-Ion}]$  (theor. 531.2) für  $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}_{11}$  (M = 508.23)

(*p*-Amidophenyl- $\omega$ -*N*-*t*-Butyl-oxycarbonylpentaglycyl)- $\alpha$ -D-mannopyranosid (**32**)

350 mg (0.88 mmol) Boc-geschütztes Pentaglycid sowie 180 mg



(0.88 mmol) DCC und 120 mg (0.88 mmol) HOBT wurden bei  $0^\circ\text{C}$  in 8 ml DMF gelöst und für 30 min gerührt. Anschließend wurden 240 mg (0.88 mmol) *p*-Aminophenyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid **10** zugegeben, weitere 30 min bei  $0^\circ\text{C}$  gerührt und nach einer Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  DIPEA die Kühlung entfernt und über Nacht bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wurde der Ansatz filtriert, eingengt und mittels MPLC-RP-Chromatographie (MeOH /  $\text{H}_2\text{O}$  1:4  $\rightarrow$  2:3) gereinigt. Die Titelverbindung wurde als weißes Lyophilisat erhalten.

Ausbeute: 150 mg (0.31 mmol;  $M = 656.6$  g mol $^{-1}$ ), 26.0%

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 7.30$  (2H, d, arom. H), 7.09 (2H, d, arom. H), 5.52 (1H, d, H-1), 4.09 (1H, d, H-2), 4.00 (2H, s,  $\text{N-CH}_2\text{-CONH}$ ), 3.97 (1H, dd, H3), 3.94, 3.93, 3.89, 3.72 (je 2H, s, 4 x  $\text{N-CH}_2\text{-CONH}$ ), 3.70-3.63 (4H, m, H-4, H-5, H-6a, H-6b), 1.34 (9H, s,  $\text{C-CH}_3$ ) ppm;

Glycon:  $^3\text{J}_{1,2} = 1.8$ ,  $^3\text{J}_{2,3} = 3.4$ ,  $^3\text{J}_{3,4} = 8.7$  Hz;

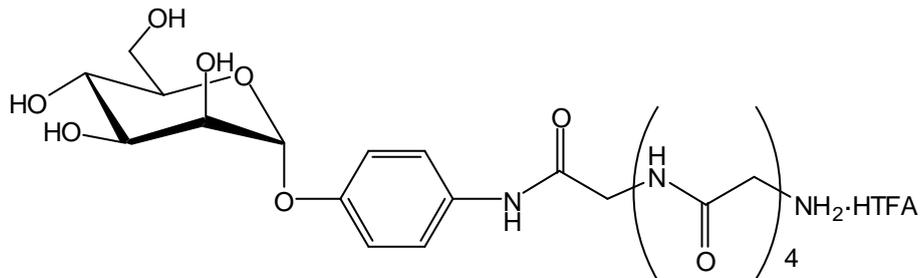
Aglycon:  $^3\text{J}_{\text{arom}} = 9.1$  Hz;

$^{13}\text{C-NMR}$  (125.76 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 175.90$  ( $\text{NH-CO-O}$ ), 2 x 174.64, 174.47, 172.28, 160.65 ( $\text{C=O}$ ), 155.47 ( $\text{Man-O-C}_{\text{Ar}}$ ), 133.38 ( $p\text{-C}_{\text{Ar}}$ ), 126.48 ( $o\text{-C}_{\text{Ar}}$ ), 119.91 ( $m\text{-C}_{\text{Ar}}$ ), 100.68 (C-1), 84.11 ( $\text{C-CH}_3$ ), 75.68, 72.67, 72.17, 68.87 (C-2, C-3, C-4, C-5), 62.96 (C-6), 45.77, 45.10, 44.90, 44.80, 44.71 (5 x  $\text{CH}_2$ ), 29.86 ( $\text{C-CH}_3$ ) ppm.

MALDI-ToF-MS:  $m/z = 679.6$ , [ $\text{M}+\text{Na}^+\text{-Ion}$ ] (theor. 679.6) für  $\text{C}_{27}\text{H}_{40}\text{N}_6\text{O}_{13}$  ( $\text{M} = 656.27$ )

(*p*-Amidophenyl-pentaglycyl)- $\alpha$ -D-mannopyranosid - hydrotrifluoroacetat (**33**)

150 mg (0.31 mmol) **32** wurden 3 h in 75%iger, wässriger TFA gerührt und *i. vac.*



bei Raumtemperatur eingeeengt. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen, filtriert und gefriergetrocknet. Die Titelverbindung wurde als weißes Lyophilisat erhalten.

Ausbeute: 180 mg (0.26 mmol;  $\text{M} = 670.6 \text{ g mol}^{-1}$ ), 86.6%

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 7.28$  (2H, d, arom. H), 7.08 (2H, d, arom. H), 5.51 (1H, d, H-1), 4.09 (1H, d, H-2), 4.00 (2H, s,  $\text{N-CH}_2\text{-CONH}$ ), 3.94 (9H,  $m_{\text{c}}$ ,  $\text{N-CH}_2\text{-CONH}$ ,

H-3), 3.80 (2H, s, N-CH<sub>2</sub>-CONH), 3.72-3.61 (4H, m, H-4, H-5, H-6a, H-6b ppm;

Glycon: <sup>3</sup>J<sub>1,2</sub> = 1.6, <sup>3</sup>J<sub>2,3</sub> = 3.3 Hz;

Aglycon: <sup>3</sup>J<sub>arom</sub> = 8.9 Hz;

<sup>13</sup>C-NMR (125.76 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 174.59, 174.50, 174.30, 172.30, 170.20 (C=O), 155.46 (Man-O-C<sub>Ar</sub>), 132.70 (p-C<sub>Ar</sub>), 126.45 (o-C<sub>Ar</sub>), 119.96 (m-C<sub>Ar</sub>), 100.74 (C-1), 75.73, 72.72, 72.20, 68.93 (C-2, C-3, C-4, C-5), 63.02 (C-6), 45.13, 44.99, 44.89, 44.77, 44.47 (5 x CH<sub>2</sub>) ppm.

MALDI-ToF-MS: m/z = 579.6, [M+Na<sup>+</sup>-Ion] (theor. 579.2) für C<sub>22</sub>H<sub>32</sub>N<sub>6</sub>O<sub>11</sub> (M = 556.21)

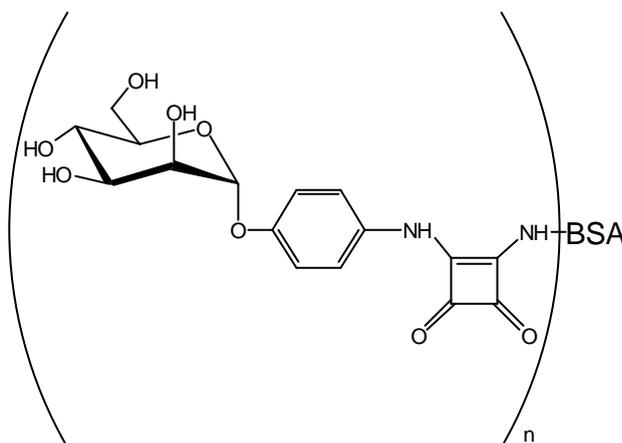
p-[N-(4-Amino-2,3-dioxocyclobut-1-enyl)amino]phenyl-α-D-mannopyranosid -BSA-Konjugat (34a)

10.0 mg (25.3 μmol) **6** und 10.0 mg (ca. 0.15 μmol) BSA wurden nach **AAV 3** konjugiert und gereinigt.

Ausbeute: 13 mg

MALDI-ToF-Analyse: M<sub>0</sub> = 87

kD, d.h. durchschnittlich 53 Einheiten des QS - Derivates wurden konjugiert.



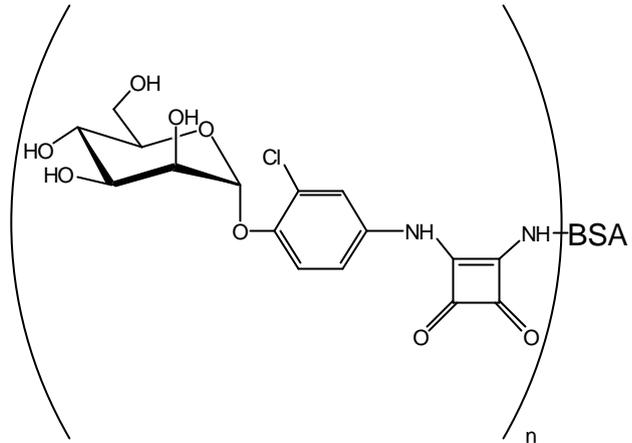
{*o*-Chlor-*p*-[*N*-4-amino-2,3-dioxycyclobut-1-enyl]amino]phenyl}- $\alpha$ -D-mannopyranosid-BSA-Konjugat (**34b**)

10.0 mg (23.3  $\mu$ mol) **11a** und 10.0 mg (ca. 0.15  $\mu$ mol) BSA wurden nach **AAV 3** konjugiert und gereinigt.

Ausbeute: 12 mg

MALDI-ToF-Analyse:  $M_0 = 86$  kD, d.h.

durchschnittlich 47 Einheiten des QS - Derivates wurden konjugiert.



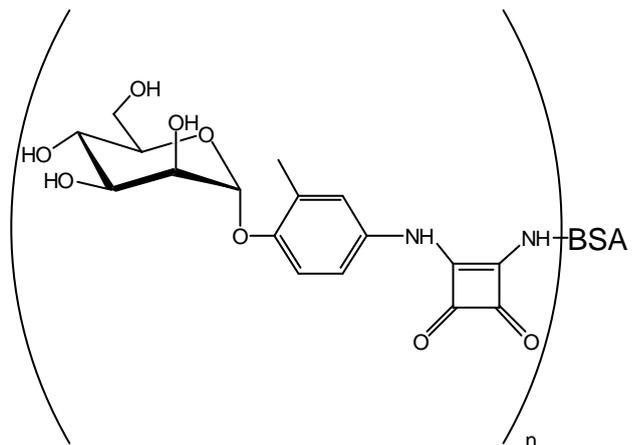
{*o*-Mehtyl-*p*-[*N*-4-amino-2,3-dioxycyclobut-1-enyl]amino]phenyl}- $\alpha$ -D-mannopyranosid-BSA-Konjugat (**34c**)

10.0 mg (24.5  $\mu$ mol) **11b** und 10.0 mg (ca. 0.15  $\mu$ mol) BSA wurden nach AAV 3 konjugiert und gereinigt.

Ausbeute: 12 mg

MALDI-ToF-Analyse:  $M_0 = 85$  kD, d.h.

durchschnittlich  $n = 46$  Einheiten des QS - Derivates wurden konjugiert.



## 7.2.2 ELISA

### Folgende Materialien wurden verwendet:

<b>Puffer</b>	<b>Substanzen pro Liter</b>	
PBS-Puffer	8.00 g	Natriumchlorid
	0.20 g	Kaliumchlorid
	0.20 g	Kalium-di-hydrogenphosphat
	1.44 g	di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat
	mit Kalium-di-hydrogenphosphat auf pH 7.2 eingestellt	
PBSE-Puffer wie PBS		
	100 mg	Thimerosal
PBSET-Puffer wie PBSE		
	500 µl	Tween 20
Carbonat-Puffer	1.59 g	Natriumcarbonat
	2.52 g	Natriumhydrogencarbonat
	100 mg	Thimerosal
	mit Natriumcarbonat auf pH 9.5 eingestellt	
Citrat-Puffer	29.41 g	tri-Natriumcitrat-Dihydrat
	480.33 g	Citronensäure
	mit 2.5 M Citronensäure auf pH 4.5 eingestellt	

## Weitere benötigte Materialien:

**Inhibitorlösungen:** Die jeweiligen Substanzmengen Inhibitor wurden eingewogen und in 1 ml bidest. Wasser gelöst.

**Bakterien:** Bakterien des Stammes *E. coli* (HB101, pPKI4) wurden auf mit Ampicillin versetzten Agarplatten über Nacht vermehrt. Am nächsten Tag wurden 50 bis 100 mg Bakterienkultur abgestrichen und in ca. 10 ml PBS-Puffer suspendiert. Diese Suspension wurde zentrifugiert, der Puffer abdekantiert und der Rückstand wieder in PBS-Puffer aufgenommen, sodass 10 mg Feuchtgewicht der Bakterienkultur in 1 ml PBS-Puffer suspendiert war. Für den Test wurde diese Suspension noch einmal 1:20 mit PBS-Puffer verdünnt.

**Antikörper:** Während des Tests wurden zwei AK verwendet. Bei dem zuerst eingesetzten Antikörper handelt es sich um einen polyklonalen, aus Kaninchen gewonnenen Antikörper, der die von den Bakterien exprimierten Fimbrien erkennt und bindet. Dieser Antikörper wird zur Verwendung im Test 1:1000 in mit 2% Magermilchpulver (w/v) versetzten PBSE-Puffer verdünnt. Der zweite für den Test benötigte Antikörper kann den ersten Antikörper binden und ist peroxidasekonjugiert. Dieser Antikörper ist ebenfalls polyklonal und wird zunächst aus Ziegen gewonnen und später peroxidasekonjugiert. Im ELISA wurde dieser Antikörper in einer Verdünnung von 1:4000 ebenfalls in 2% Magermilchpulver (w/v) in PBSE-Puffer eingesetzt.

## **Folgende Arbeitsschritte wurden im ELISA durchgeführt:**

- 1) Coaten der Mikrotiterplatten mit Hefemannan durch Befüllen der Wells mit je 100 µl Mannanlösung (1mg/ml in Carbonatpuffer mit Thimerosal, kein Azid!) und Trocknen über Nacht bei 37°C.
- 2) 1x mit 150 µl PBSE waschen.
- 3) Blocken mit 150 µl Magermilch (der Firma Uelzena) in PBSE.
- 4) 1x mit 150 µl PBSE waschen
- 5) Je 50 µl PBSE in die Wells pipettieren.
- 6) 50 µl Inhibitorlösung zupipettieren, serienweise 1:2 verdünnen.
- 7) 50 µl Bakterienlösung (10 mg Feuchtgewicht/ml, 1x in PBSE gewaschen, 1:20 verdünnt) zupipettieren.
- 8) 1h bei 37°C inkubieren.
- 9) 4x mit PBSE waschen.
- 10) 50 µl Lösung 1. Antikörper (Verdünnung 1:2000 in 2% MM/PBSE) zugeben.
- 11) 30 min bei 37°C inkubieren.
- 12) 2x mit PBSET waschen.
- 13) 50 µl Lösung 2. Antikörper (Verdünnung 1:4000 in 2% MM/PBSE) zupipettieren.
- 14) 30 min bei 37°C inkubieren.
- 15) 3x mit PBSET waschen.
- 16) 1x mit PBSE waschen.
- 17) 1x mit Substratpuffer (= Citratpuffer) waschen.
- 17) 50 µl einer frisch angesetzten Lösung aus ABTS (1 mg/ml) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (25 µl/ml, 0.1%) zupipettieren.
- 18) 30 min bei 37°C inkubieren.
- 19) Stoppen der Farbreaktion mit 50 µl 2% Oxalsäure (in bidest. H<sub>2</sub>O).
- 20) Messen im ELISA-Reader bei 405 nm (Referenzfilter 490 nm).

## **Vergleich unterschiedlicher Oberflächenbeschichtungen bei der Anwendung des ELISA-Systems**

Um etwaige Einflüsse der Beschichtung mit Hefe-Mannan im ELISA-System beurteilen und bzw. eventuelle Verfälschungen der Ergebnisse ausschließen zu können wurden vergleichende Tests mit den Glycoproteinen RNase B und Ovalbumin als Substituten für Mannan durchgeführt.

Der Assay wurde wie oben beschrieben mit Mannose und Methyl- $\alpha$ -D-mannosid durchgeführt, jedoch mit den entsprechend anders belegten Oberflächen der Microtiterplatten.

## **RNase-Tests**

### **Folgende Materialien wurden verwendet:**

<b>Puffer</b>	<b>Substanzen pro Liter</b>	
HEPES-RNase-	8.00 g	Natriumchlorid
Puffer	0.27 g	di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat
	12.00 g	HEPES (0.05 mol)
	0.48 g	Magnesiumchlorid
	0.11 g	Calciumchlorid
	pH = 7.4	

### **Substrat**

1 mg UpU wurden in 20 ml HEPES - Puffer gelöst und zu jeweils 1 ml Einheiten aliquotisiert.

### **RNase A- und B-Stammlösungen**

2 mg des jeweiligen Enzyms wurden in 1 ml HEPES - Puffer gelöst. Für ein typisches Experiment ohne Liganden-Zugabe wurden dann 10 µl dieser Lösung zu dem Substrat pipettiert.

## **RNAse / Liganden-Stammlösungen**

Als Liganden für die RNAse B wurden die Mannosylrest-bindenden Lectine aus Osterglocken (*Narcicissus pseudonarcissus*) (2 Untereinheiten, je 13 kD) und ConA (*Canavalia ensiformis*) (4 Untereinheiten, je 26 kD) als Beispiele für Protein-Kohlenhydrat Wechselwirkungen sowie Mannan aus (*sac. cerv.*) als Beispiel für eine mögliche Kohlenhydrat-Kohlenhydrat Wechselwirkung ausgewählt.

Die Liganden wurden vor dem Versuch in der jeweils angegebenen Menge zu der RNAse-Stammlösung zugegeben, die erhaltene Lösung gemischt und 30 min bei RT inkubiert.

### **Durchführung des RNAse-Tests:**

- 1) Herstellen der RNAse- oder RNAse/Liganden-Stammlösung
- 2) 1. Analyse des Substrats mittels analytischer HPLC ohne Enzymzugabe (T = 0)
- 3) Zugabe der jeweiligen RNAse-Stammlösung, mischen der Probe.
- 4) Analyse der Probe, üblicherweise 10, 30, 60 und 90 Minuten nach der Zugabe der Enzymlösung.

Die Zuordnung der Produktpeaks erfolgte durch die Analyse von reinem UMP unter gleichen HPLC-Laufbedingungen.

## Verifizierung der Bindung von ConA an RNase B

Um sicherzustellen, daß eine Bindung zwischen ConA und RNase B stattgefunden hat, wurde ein qualitativer ELLA wie folgt durchgeführt:

- 1) Coaten der Mikrotiterplatten mit RNaseB durch Befüllen der Wells mit je 100 µl RNaseB-Lösung (1mg/ml in Carbonatpuffer mit Thimerosal, kein Azid!) und Trocknen über Nacht bei 37°C.
- 2) 2x mit 150 µl PBS waschen.
- 3) 100µl ConA-Lösung (HRP-konjugiert, 1mg / l) zugegeben
- 4) 1h bei 37°C inkubieren.
- 5) 4x mit PBS waschen.
- 6) 1x mit Substratpuffer (= Citratpuffer) waschen.
- 7) 50 µl einer frisch angesetzten Lösung aus ABTS (1 mg/ml) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (25 µl/ml, 0.1%) zupipettieren.
- 8) 1 h bei 37°C inkubieren.

Der Test wurde in 8 Feldern mit positiven Ergebnis (grüne Farbentwicklung) durchgeführt; eine negative Blindprobe ohne Zugabe von HRP-konjugiertem ConA ergab das erwartete Ausbleiben der Farbreaktion.

## **8. Literatur**

- 1 P. Nuhn, *Naturstoffchemie* **1997**, 3. Auflage, S. Hirzel Verlag, Stuttgart, Leipzig.
- 2 J. F. Robyt, *Essentials of Carbohydrate Chemistry* **1998**, Springer-Verlag, New York.
- 3 R. Ikan (Editor), *Naturally Occuring Glycosides* **1999**, J. Wiley & Sons, Chichester.
- 4 A. Schatz, E. Bugie, S. A. Waksman, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1944**, 55, 66 - 69.
- 5 Th. K. Lindhorst, *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* **2003**, 2. Auflage, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.
- 6 H.-J. Gabius, H.-C. Siebert et al., *ChemBioChem* **2004**, 5, 740 - 764.
- 7 H.-J. Gabius, H.-C. Siebert et al., *Biochim. et Biophys. Acta* **2002**, 1572, 740 - 764.
- 8 C. R. Bertozzi, *Chem. & Biol.* **1995**, 2, 703 - 708.
- 9 W. M. Watkins, P. Greenwell, A. D. Yates, P. H. Johnson, H. Philip, *Biochimie* **1988**, 70, 1597-611.
- 10 W. C. Boyd, *The Proteins* **1954**, Vol. 2, Part 2, 756 - 884.
- 11 S. W. Mitchell, *Smithsonian Contrib. Knowledge* **1860**, XII, 89 - 90.
- 12 H. Stillmark, *Inaugural Dissertation* **1888**, Schnackenburgs Buchdruckerei, Dorpat.
- 13 [http://www.spec.ch.man.ac.uk/99stuf/interests\\_98.html](http://www.spec.ch.man.ac.uk/99stuf/interests_98.html)
- 14 J. B. Sumner, *J. Biol. Chem.* **1919**, 37, 137 - 142.
- 15 H.-J. Gabius, *Eur. J. Biochem.* **1997**, 243, 543 - 576.
- 16 D. C. Kilpatrick, *Biochim. et Biophys. Acta* **2002**, 1572, 187 - 197.
- 17 R. A. Dwek, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 683 - 720.
- 18 H. Lis, N. Sharon, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 637 - 674.
- 19 P. Sears, C.-H. Wong, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 2446 - 2471; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 2300-2324.
- 20 C. Fuhrer, M. Spiess, *Biomembranes* **1996**, 4, 175 - 199.
- 21 D. T. Conolly, R. R. Townsend, K. Kawaguchi, W. R. Bell, Y.C. Lee, *J. Biol. Chem.* **1982**, 275, 939 - 945.
- 22 Y. C. Lee, R. T. Lee, P. Lin, *Biochemistry* **1984**, 23, 4255 - 4261.

- 23 K. Y. Wang, T. B. Kuhlenschmidt, Y. C. Lee, *Biochemistry* **1985**, *24*, 5932 - 5938.
- 24 J. B. Lowe, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2003**, *15*, 531 - 538
- 25 <http://www.aspirin.de/produkte/produktgeschichte.html#ank1897>
- 26 S. H. Ferreira, S. Moncada, J. R. Vane, *Nature* **1971**, *231*, 237 - 9.
- 27 E. Chain, H. W. Florey, S. D. Gardner, N. G. Heatley, M. A. Jennings, J. Orr-Ewing, A. G. Sanders, *Lancet* **1940**, *II*, 226 - 8.
- 28 J. T. Park, J. L. Strominger, *Science* **1957**, *125*, 99 - 101.
- 29 M. Gates, G. Tschudi, *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 1109 - 10.
- 30 L. Terenius, *Acta Pharm. Tox.*, **1973**, *33*, 377 - 84
- 31 L. Schofield, M. C. Hewitt, K. Evans, M.-A. Siomos, P. H. Seeberger, *Nature* **2002**, *418*, 785 - 789.
- 32 P.H. Seeberger, X. Beebe, G. D. Sukenick. S. Pochapski, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 491 - 493.
- 33 Z. Zhang, I. R. Ollmann, X.-S. Ye, R. Wischnat, T. Baasov, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 734 - 753.
- 34 X.-S. Ye, C.-H. Wong, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 2410 - 2431.
- 35 D. E. Levy, C. Tang, *The Chemistry of C-Glycosides* **1995**, Pergamon, Oxford.
- 36 V. J. Hruby, T. O. Matsunaga, *Synthetic Peptides 2nd Edition* **2002**, 292 - 376, Oxford University Press, New York.
- 37 R. Roy, D. Zanini, J. Meunier, A. Romanowska, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 1869 - 1872.
- 38 Y. C. Lee, *Carbohydr. Res.* **1978**, *67*, 509 - 514.
- 39 J. J. Lundquist, E. J. Toone, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 555 - 578.
- 40 P. I. Kitov, D. R. Bundle, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 16271 - 16284.
- 41 M. v. Itzstein, W. Y. Wu, G. B. Kok, M. S. Pegg, J. C. Dyason, B. Jin, T. V. Phan, M. L. Smythe, H. F. White, *Nature* **1993**, *363*, 418 - 423.
- 42 M. v. Itzstein, W.-Y. Wu, B. Jin, *Carbohydr. Res.* **1994**, 259, 301 - 305.
- 43 W. Lew, X. Chen, C. U. Kim, *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 663 - 672.
- 44 K. McClellan, C.M. Perry, *Drugs* **2001**, *61*, 261 - 283.
- 45 K. E. Doucette, F. Y. Aoki, *Expert Opin. Pharmacother.* **2001**, *2*, 1671 - 1683.
- 46 C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv. Drug Del. Rev.* **1997**, *23*, 3 - 25.

- 47 K. A. Karlsson, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, 5, 622 - 635.
- 48 N. Sharon, *FEBS Letters* **1987**, 217, 145 - 257.
- 49 B. Foxman, L. Zhang, K. Palin, P. Tallman, C. F. Marrs, *J. Infect. Dis.* **1995**, **171**, 1514 - 1521.
- 50 H. Connell, W. Agace, P. Klemm, M. Schembri, S. Maarild, C. Svanborg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 9827 - 9832.
- 51 R. R. Isenberg, P. Barnes, *Cell* **2002**, 101, 1 - 4.
- 52 R. Blomgran, L. Zhen, O. Stendahl, *Infekt. Immun.* **2004**, 72, 4570 - 4578.
- 53 R. Tewari, J. I. MacGregor, T. Ikeda, J. R. Little, S. J. Hultgren, S. N. Abraham, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 3009 - 3015.
- 54 M. Vetsch, C. Puorger, T. Spirig, U. Grauschopf, E.-U. Weber-Ban, R. Glockshuber, *Nature* **2004**, 431, 330 - 332.
- 55 D. Coudhury, A. Thompson, V. Stojanoff, S. Langermann, J. Pickner, S. J. Hultgren, S. D. Knight, *Science* **1999**, 285, 1061 - 1066.
- 56 F. G. Sauer, M. Barnhart, D. Choudhury, S. D. Knight, G. Wacksmann, S. J. Hultgren, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, 5, 548 - 556.
- 57 S. D. Knight, J. Berglund, D. Choudhury, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, 6, 653-660.
- 58 S. Kötter, U. Krallmann-Wenzel, S. Ehlers, Th. K. Lindhorst, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1998**, 2193 - 2200.
- 59 Th. K. Lindhorst, Ch. Kieburg, U. Krallmann-Wenzel, *Glycoconjugate J.* **1998**, 15, 605 - 613.
- 60 N. Firon, I. Ofek, N. Sharon, *Carbohydr. Res.* **1983**, 120, 235 - 249.
- 61 O. Sperling, *Diplomarbeit*, Hamburg **2001**.
- 62 M. Rarey, B. Kramer, T. Lengauer, G. Klebe, *J. Mol. Biol.*, **1996**, 267, 470 - 489.
- 63 A. Fuchs, Dissertation, in Vorbereitung, Kiel **2005**.
- 64 L. F. Tietze, M. Arit, M. Beller, K.-H. Glüsenkamp, E. Jähde, M. F. Rajewsky, *Chem. Ber.* **1991**, 124, 1215 - 1221.
- 65 L. F. Tietze, C. Schroter, S. Gabius, U. Brinck U A. Goerlach-Graw, H. J. Gabius, *Biocon. Chem.* **1991**, 2, 148 - 53.
- 66 V. Kamath, P. Diedrich, O. Hindsgaul, *Glycocon. J.* **1996**, 13, 315-319.
- 67 A. Reglero, *Intern. J. Biochem.* **1979**, 10, 285 - 288.
- 68 Y. Oda, K. Minami, *Eur. J. Biochem.* **1986**, 159, 239 - 45.

- 69 P. Krist, M. Kuzma, I. Pelyvas, P. Simerska, V. Kren, *Coll. Czech Chem. Comm.* **2003**, 68, 801 - 811.
- 70 A. Fuchs, persönliche Mitteilung.
- 71 S. Kötter, Dissertation, Hamburg **2000**.
- 72 A. Patel, Dissertation, Kiel **2001**.
- 73 M. Boysen, Dissertation, Kiel **2003**.
- 74 R. Roy, *Carbohydr. Eur.* **1999**, 27, 34 - 41.
- 75 B. Colonna, V. D. Harding, S. A. Nepogodiev, F. M. Raymo, N. Spencer, J. F. Stoddart, *Chem. Eur. J.* **1998**, 4, 1244 - 1254.
- 76 P. Langer, S. J. Ince, S. V. Ley, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1998**, 3913 - 3915.
- 77 M. Dubber, Dissertation, Hamburg **2001**.
- 78 M. Dubber, Th. K. Lindhorst, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 5275 - 5281.
- 79 K. Döge, Diplomarbeit, Kiel **2003**.
- 80 M. Izumi, S. Okumura, H. Yuasa, H. Hashimoto, *J. Carb. Chem.* **2003**, 5, 317 - 329.
- 81 N. Nagahori, R. T. Lee, S.-I. Nishimura, D. Pagé, R. Roy, Y. C. Lee, *ChemBioChem* **2002**, 3, 836 - 844.
- 82 G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques* **1996**, Academic Press, San Diego.
- 83 D. C. Carter, J. X. Ho **1994**, *Adv. Protein Chem.*, 45, 153 - 203
- 84 B. Lindner, persönliche Mitteilung.
- 85 <http://en.wikipedia.org/wiki/Plasmid>
- 86 K. A. Krogfelt, P. Klemm, *Microb. Path.* **1988**, 4, 231 - 238.
- 87 P. Klemm et al., *Methods in Microbiology* **1998**, 27, 239 - 248.
- 88 C. H. Jones et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 8397 - 8401.
- 89 F. Lottspeich, H. Zorbas, *Bioanalytik* **1998**, Spektrum Verlag, Berlin, Heidelberg.
- 90 M. Boysen, K. Elsner, O. Sperling, Th. K. Lindhorst, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 22, 4376 - 4386.
- 91 F. Thieme, Dissertation, in Vorbereitung, Kiel **2005**.
- 92 O. Sperling, E. Klima-Bartczak, Th. K. Lindhorst, Publikation in Vorbereitung.
- 93 N. Firon, I. Ofek, N. Sharon, *Carbohydr. Res.* **1983**, 120, 235 - 249.
- 94 J. Rojo, J. C. Morales, S. Penades, *Topics Curr. Chem.* **2002**, 218, 45 - 92.

- 95 J. M. de la Fuente, S. Penades, *Glycocon. J.* **2004**, *21*, 149 - 163.
- 96 C. Hammond, I. Braakman, A. Helenius, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 913 - 17.
- 97 L. Ellgaard, M. Molinari, A. Helenius, *Science* **1999**, *286*, 1882 - 1888.
- 98 B.-K. Choi, P. Bobrowicz, R. C. Davidson, S. R. Hamilton, D. H. Kung, H. Li, R. G. Miele, J. H. Nett, S. Wildt, T. U. Gerngross, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 5022 - 5027.
- 99 L. K. Mahal, K. J. Yarema, C. R. Bertozzi, *Science* **1997**, *276*, 1125 - 1128.
- 100 E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007 - 2010.
- 101 B. G. Davis, C. R. Loyd, J. B. Jones, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9614 - 9615.
- 102 C. R. Loyd, B. G. Davis, J. B. Jones, *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1537 - 1544.
- 103 D. Fu, L. Chen, R. A. O'Neill, *Carbohydr. Res.* **1994**, *261*, 173 - 186.
- 104 N. Kawasaki, M. Otha, S. Hyuga, O. Hashimoto, T. Hayakawa, *Anal. Biochem.* **1999**, *269*, 297 - 303.
- 105 R. A. Dwek, H. C. Joao, I. G. Scragg, *FEBS Letters* **1992**, *307*, 343 - 346.
- 106 G. Gotte, M. Libonati, D. V. Laurents, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 46241 - 46251.
- 107 U. Arnold, R. Ulbrich-Hofmann, *Biochemistry* **1997**, *36*, 2166 - 2172.
- 108 P. M. Rudd, H. C. Joao, E. Coghill, P. Fiten, M. R. Saunders, G. Opdenakker, R. A. Dwek, *Biochemistry* **1994**, *33*, 17 - 22.
- 109 T. Oost, A. Filippazzi, M. Kalesse, *Liebigs Ann.* **1997**, 1005 - 1011.
- 110 M. Yashiro, H. Kaneiwa, K. Onaka, M. Komiyama, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2004**, 605 - 610.

## **9. Lebenslauf**

### **Lebenslauf**

**Dipl.-Chem. Oliver Sperling,**

**\*31.12.1973 in Hamburg, deutsche Staatsangehörigkeit**

#### **Schule**

**08/1980-06/1984**      Grundschule Eckerkoppel, Hamburg

**08/198-06/1993**      Gymnasium Tonndorf, Hamburg

#### **Berufliche Ausbildung / CTA**

**08/1990-01/1994**      Gymnasium Altona, Hamburg  
Gewerbeschule G13, Hamburg  
Doppelqualifikation Abitur / Chemisch-Technischer  
Assistent

#### **Zivildienst**

**02/1994-04/1995**      Zivildienst im Berufsförderungswerk Hamburg, Hamburg-  
Farmsen; Betreuung von Umschülern im  
elektrotechnischen Fachbereich

#### **Universität**

**SS 1995 – SS 2001**      Studium der Chemie, Universität Hamburg

- WS 1998/1999**      Auslandsaufenthalt am University College Dublin  
(ERASMUS - Programm)  
Synthese von Eisencarbonylkomplexen  
Betreuung: Prof. Dr. A. R. Manning
- 09/2000-05/2001**      Diplom-Arbeit in Organischer Chemie:  
"Synthese von Oligomannosiden als Liganden für das Typ-  
1- fimbriale Lektin"  
Betreuung: Prof. Dr. Th. K. Lindhorst, Universität Hamburg
- Seit SS 2001**      Promotionsstudium, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
Betreuung: Prof. Dr. Th. K. Lindhorst, Universität Kiel

### **Wissenschaftliche Tätigkeiten**

- 1996-1998**      Hilfskraft in der Arbeitsgruppe Dr. Brockmann,  
Organomeereschemie, Universität Hamburg
- WS 1999/2000**      Hilfskraft im Organisch-Chemischen Praktikum für  
Mediziner, Universität Hamburg
- Seit SS 2001**      Mitarbeit im Rahmen des SFB 470 "Glycostrukturen in  
Biosystemen"  
Assistent im Praktikum für Medizinische Chemie  
Projektleiter S1-Labor

## Wiss. Vorträge und Veröffentlichungen

### Posterpräsentationen

- a) Eurocarb XI, Lissabon 2001, Poster A 100
- b) 2<sup>nd</sup> Int. Symposium on Conf. Control of Biomolecular Function, Lübeck 2001
- c) Glycostructures in Biological Systems, Hamburg 2001, 2 Posters
- d) Zuckrblick, Prag, 2002
- e) Carblink III, Kiel, 2002
- f) Summer school med. chem, Regensburg, 2002
- g) GDCh Jahrestagung, München, 2003, Poster Evo.-Bio. 009, *Poster Award*
- h) XXII ICS, Glasgow, Poster 189

### Vorträge

- a) Zuckrblick, Prag, 2002, 30min
- b) Carblink III, Kiel 2002, flash presentation
- c) SFB 470 Jahrestreffen, Hamburg 2004, 30min

### Artikel

- a) *Aust. J. Chem.*, **2002**, 55, 87-93, Trivalent cluster mannosides with aromatic partial structure as ligands for the type 1 fimbrial lectin of *E. coli*
- b) *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 22, 4376 - 4386, Glycerol and Glycerol Glycol Glycodendrimers

## **10. Danksagung**

Die vorliegende Arbeit ist das Ergebnis von rund 10 interessanten Jahren an drei Universitäten, an denen ich nicht nur als (Nachwuchs-) Wissenschaftler tätig war, sondern in deren Umkreis ich auch privat gelebt habe. Ohne die tatkräftige Unterstützung von Familie und Freunden während dieser Zeit hätte ich sicherlich wesentlich mehr Schwierigkeiten gehabt und deutlich weniger Spaß an meiner Arbeit gefunden.

Mein besonderer Dank gilt wiederum meinen Eltern **Elly** und **Gerd Sperling**, für ihre Unterstützung und ihr Vertrauen. Ebenso gilt mein Dank der **Wiener** Dependence der **Familie Sperling** und **Marie Höllmer**.

Selbst außerhalb von Familie und Labor findet ein Chemiker bisweilen Zeitgenossen, die ihn nicht nur dulden, sondern seine Anwesenheit begrüßen und ihn sogar in entlegenen Gegenden dieser Welt besuchen. Vielen Dank daher an **Nils Goldbaum**, **Joanna Ritter**, **Matthias Knarr**, **Olivera Stojkovic**, **So-Young Shin**, **Felix + Anke Vahldiek** und **Nicole Bechert** für die vielen lustigen Abende, auch in Kiel.

Im Labor finden sich ab und an Freunde, die man ebenso gerne in der Freizeit wie beruflich sieht. In besonderer Weise trifft dieses auf **Mike Boysen** zu, der manchen Abend in Kiel und Hamburg zu einem Erlebnis werden ließ. Danke auch an **Anna Blechschmidt**, diese Runde vortrefflich erweiterte.

**Niels** und **Conny Röckendorf** danke ich für gelungene Gastfreundschaft an einigen Abenden in Oering.

**Familie Hornke** gilt mein Dank für den schnellen Familienanschluss, der mir gewährt wurde, sowie für diverse schöne Urlaubstage (oder auch deren vorangehende Abende!).

Vielen Mitgliedern und ehemaligen Mitgliedern meines Arbeitskreises, die die Zeit im Labor nie langweilig werden ließen danke ich:

- **Katharina Elsner** für ständige Diskussionsbereitschaft im Labor und ihrer bereitwilligen Übernahme des Postens einer Kulturbeauftragten.
- **Andreas Fuchs** für Studienfahrten und Einblicke in das Leben in Gebieten südlich der Elbe (ebenfalls Familie Fuchs für die freundliche Unterbringung), sowie die ausgezeichnete Zusammenarbeit in Docking Angelegenheiten.
- **Christine Haug** für ihre Hilfe bei den Widrigkeiten vieler Anträge, Formulare und Bestellungen.
- **Christoph Heidecke** für die gute Laune auf diversen Reisen (spez. Prag und Glasgow), bei denen er sowohl während als auch *nach* dem Tagungsprogramm die gleiche prima Gesellschaft wie an Abenden in Kiel war.
- **Mike Kleinert** für seine Organisation des AK-Frühstücks.
- **Elwira Klima-Bartczak** für die vielen wichtigen manchmal gar nicht so kleinen `Kleinigkeiten`, die sie stets für das Miteinander im Arbeitskreis organisiert sowie in ganz besonderer Weise für alles, was sie zum Gelingen dieser Arbeit im Labor mit einem Engagement beigetragen hat, das weit über das erwartete hinaus ging.
- **Edda Kettler** die jetzt leider viel zu weit entfernt von Kiel ihrer Forschung nachgeht für unvergleichliche Sprüche und ständige Hilfsbereitschaft.
- **Marco Kühne** als Vorbild, was Gelassenheit bei schwieriger Chemie angeht.
- **Sonja Lütje** die ebenfalls leider nicht mehr Arbeitskreis dabei ist, für stoisch ertragene Montage, ausgezeichneten Erste-Hilfe-Leistungen und der tollen Bereitschaft, in ihrem `2. Wohnzimmer` Kaffeepausen einzulegen.
- **Harun Shaikh** for bringing the English language back into our lab.
- **Florian Thieme** für Hilfe und Erklärungen an der HPLC und seinem Einsatz für das reaktivierte Kieler-Koch-Kollektiv, was zu einigen tollen Abenden in Kiel führte.
- **Mark Walter** für gute Nachbarschaft im Labor (ohne einen einzigen Einsatz der erklärtermaßen griffbereiten Elefantenbüchse) und die bereitwillig gewährten Einblicke in das Leben eines Außerirdischen.

- **Michaela Wiegand** ebenfalls für das neue Kieler-Koch-Kollektiv (hier auch Dank an **Stefan**), für das Korrekturlesen meiner Arbeit und die gute Laune, sogar an sonst grummeligen Montagen.

Den Angestellten des IfOC der Uni Kiel für ihre Unterstützung, sei es in der Spektroskopischen Abteilung (**Dr. C. Wolf, U. Drieling, H. Franzen, M. Höftmann, G. Kohlmeyer-Yilmaz, D. Meyer**), im Sekretariat (**R. Meinlschmidt**), der Bibliothek (**C. Ahrens, M. Krannich, K. Wagener**), der Chemikalienausgabe (**A. Wilms**) oder bei Technischen- und Versorgungsproblemen (**R. Kargoll, M Bänsch**).

Weiterhing gab es außerhalb des Arbeitskreises in Kiel noch viele Personen, ohne die sowohl die Arbeits- als auch die Freizeit wesentlich langweiliger ausgesehen hätte, daher möchte ich an dieser Stelle noch **Arne Stademann** und **Tim Dreesen** für einige lustige Abende und spannende Diskussionen danken. Ebenfalls geht mein Dank an die **laido-Gruppe** der Uni-Kiel, die meinen Wochenenden so oft zu einem guten und vor allem entspannteren Start verholfen hat.

Und zum Schluss meiner Freundin **Kathleen Hornke**, für die Liebe in den vergangenen 2 Jahren, ihrem Verständnis in einigen Stressphasen, die sie mit mir durchgemacht hat und für die Ideen, die wir in nächster Zeit umsetzen wollen.