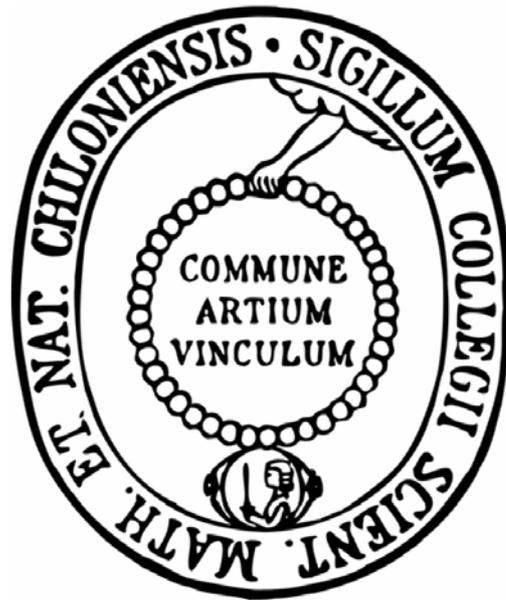


**Mono- und bifunktionelle mannosidische
Photoaffinitätsliganden für das bakterielle Lektin
FimH: Design, Synthese und Anwendung**



Dissertation

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

vorgelegt von

Michaela Märten

aus Osterode am Harz

Kiel 2010

1. Gutachter: Prof. Dr. Th. K. Lindhorst

2. Gutachter: Prof. Dr. U. Lüning

Tag der mündlichen Prüfung: 10.02.2010

Zum Druck genehmigt: 05.03.2010

gez. Prof. Dr. Lutz Kipp

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.

Michaela Märten

*Gehe in den Garten der Stille und höre auf die
Stille zwischen den Geräuschen: Dies ist die
wahre Musik der Natur.*

Weisheit aus Japan

Der praktische Teil der vorliegenden Arbeit wurde im Zeitraum Dezember 2003 bis September 2006 im Arbeitskreis Frau Prof. Th. K. Lindhorst am Institut für Organische Chemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel angefertigt. Die endgültige Fertigstellung erfolgte nach knapp 3jähriger Elternzeit im Dezember 2009.

Meiner akademischen Mentorin, Frau Prof. Th. K. Lindhorst danke ich sehr herzlich für die interessante Themenstellung. Ihre Offenheit gegenüber neuen Vorschlägen förderte mein eigens angestrebtes selbständiges wissenschaftliches Arbeiten enorm. Da ihre Tür stets für mich offen stand, konnten gemeinsame konstruktive Fachdiskussionen und lange Gespräche in warmherziger Atmosphäre meinen Forschergeist im weitgreifenden Bereich der Naturwissenschaften weiter anspornen und stärken.

Meinen drei Lieben

Jarne Lennart, Lena Sophie, Stefan

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung _____ **I**

Abstract _____ **III**

1 Einleitung _____ **1**

1.1 Die Funktion von Kohlenhydrat-Protein-Interaktionen in lebenden Organismen **2**

1.1.1 Kohlenhydrate besitzen eine biologische Funktion _____ 2

1.1.2 Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen an Zelloberflächen _____ 3

1.2 Photoaffinitätsmarkierung _____ **14**

1.2.1 Allgemeine Vorbemerkungen _____ 14

1.2.2 Photoaktive funktionelle Gruppen _____ 18

1.3 Affinitätschromatographie _____ **22**

1.4 Massenspektrometrie als analytisches Werkzeug _____ **26**

1.4.1 Allgemeine Vorbemerkungen _____ 26

1.4.2 Ionisations-Methoden und Arten von Massenspektrometern _____ 27

1.4.3 Proteolytische Hydrolyse von Proteinen und MS-Analyse _____ 35

2 Fragestellungen und Zielsetzungen dieser Arbeit _____ **38**

3 Synthese photoaktiver α -D-Mannoside und Mannosylpeptide _____ **40**

3.1 Entwicklung und Synthese monofunktionaler photoaktiver α -D-Mannoside **40**

3.1.1 Allgemeines _____ 40

3.1.2 Synthese der Hydroxy-funktionalisierten photoaktiven Bausteine 7 und 9 _____ 41

3.1.3 Synthese der photoaktiven α -D-Mannoside 12 und 14 _____ 44

3.1.4 Synthese des photoaktiven Benzophenon-tragenden α -D-Mannosids 16 _____ 47

3.2 Synthese bifunktionaler photoaktiver α -D-Mannoside _____ **48**

3.2.1 Allgemeines _____ 48

3.2.2 Synthese des biotinylierten Benzophenon-tragenden α -D-Mannosylpeptides 19 _____ 50

3.2.3 Synthese der Diazirin-Carbonsäure 20 _____ 51

3.2.4 Synthese des biotinylierten Diazirin-tragenden α -D-Mannosylpeptides 23 _____ 52

3.2.5 Synthese des biotinylierten Diazirin-tragenden α -D-Mannosylpeptides 26 _____ 53

4 Evaluation der synthetisierten photoaktiven Liganden _____ **56**

4.1 Allgemeines _____ **56**

4.2 Bestrahlung der potenziellen photoaktiven α -D-Mannoside _____ **57**

4.2.1 Bestimmung der Absorptionsmaxima _____ 57

4.2.2 Ermittlung der Reaktionszeiten der synthetisierten Photomarker _____ 59

4.2.3 Massenspektrometrische Analyse der in Lösung gebildeten Insertionsprodukte _____ 63

4.2.4 Bestrahlung der photoaktiven Mannoside unter physiologischen Bedingungen _____ 66

4.2.5 Bestrahlung der photoaktiven Mannoside in Anwesenheit von Aminosäuren _____ 67

4.2.6 Bestrahlung der photoaktiven Mannoside in Anwesenheit von Modell-Peptiden _____ 74

4.2.7 Bestrahlung des bakteriellen Adhäsins FimH in Anwesenheit der photoaktiven Mannoside als potenzielle Liganden	95
4.3 Markierung von FimCH und Concanavalin A	125
4.4 ELISA und Molecular Modeling im Hinblick auf die Bindungsaffinität der synthetisierten Liganden	135
4.4.1 ELISA	136
4.4.2 Resultate des ELISA	138
4.4.3 <i>Docking</i> -Studien	141
4.4.4 Resultate der Computer-unterstützten <i>Docking</i> -Studien	142
4.5 Qualitative Bewertung der synthetisierten photoaktiven α-D-Mannoside 12, 14, 16, 19, 23 und 26	150
5 Zusammenfassung und Ausblick	153
6 Summary and Outlook	164
7 Experimenteller Teil	170
7.1 Allgemeine Vorbemerkungen	170
7.1.1 Physikalische Daten	170
7.1.2 Vorbemerkungen zu den Reaktionsvorschriften	172
7.2 Synthese photoaktiver Mannoside als Liganden für das Lektin FimH	174
7.2.1 Synthese monofunktionaler photoaktiver Mannoside	174
7.2.2 Synthese bifunktionaler photoaktiver Mannoside	181
7.3 Bestrahlung der synthetisierten photoaktiven Mannoside	198
7.3.1 Allgemeine Vorbemerkungen	198
7.3.2 Ermittlung der Absorptionsmaxima und der Zerfallsdauer der photoaktiven Substanzen	200
7.3.3 Bestrahlung der synthetisierten photoaktiven Mannoside unter physiologischen Bedingungen	201
7.3.4 Bestrahlung der synthetisierten photoaktiven Mannoside in Gegenwart verschiedener Aminosäuren	203
7.3.5 Bestrahlung der synthetisierten photoaktiven Mannoside in Gegenwart ausgewählter Modell-Peptide	204
7.3.6 Bestrahlung der synthetisierten photoaktiven Mannoside in Gegenwart des bakteriellen Adhäsins FimH	205
7.3.7 Bestrahlung der synthetisierten photoaktiven Mannoside in Gegenwart der Mannose-spezifischen Lektine FimCH und Concanavalin A	210
7.4 Affinitätschromatographie	213
7.4.1 Allgemeine Vorbemerkungen	213
7.4.2 Verwendete Lösungen	213
7.4.3 Durchführung der Affinitätschromatographie	214
7.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	215
7.5.1 Allgemeines	215
7.5.2 SDS-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Proteinen nach Laemmli	216
7.5.3 SDS-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Proteinen nach Schägger	218
7.5.4 Färbemethoden zur Visualisierung der Proteinbanden in SDS-Gelen	220
7.6 Immunchemische Methoden	223
7.6.1 Dot-Immunoassay (Dot Blot)	223
7.6.2 Western Blot	225
7.6.3 Immunchemische Färbung	227

7.7 Methoden für die massenspektrometrische Analyse	229
7.7.1 Allgemeines	229
7.7.2 Proteolytischer Verdau im Gel	229
7.7.3 Direkter proteolytischer Verdau mit Trypsin	234
7.7.4 Probenvorbereitung mit ZipTip	236
7.7.5 Probenvorbereitung für MALDI-TOF-Messungen	237
7.7.6 ESI-FT-ICR-MS/MS-Messungen	239
7.7.7 MALDI-TOF/TOF-Messungen	240
7.8 Untersuchung der biologischen Aktivität der photoaktiven Liganden	241
7.8.1 ELISA	241
7.9 Computer-gestützte Docking-Studien	246
8. Anhang	247
A UV-VIS-Spektren der photoaktiven Mannoside 12, 14, 16, 19, 23 und 26	247
B Abkürzungsverzeichnis	255
C Lebenslauf	260
Herzlichen Dank	263

Kurzfassung

Zur Aufklärung des Adhäsionsprozesses des α -D-Mannose-spezifischen Lektins FimH ist die Erforschung der molekularen Interaktionen zwischen der auf der FimH-Oberfläche lokalisierten CRD und seinen Liganden von Interesse. Um die Ligand-Bindungseigenschaften des Adhäsins FimH zu untersuchen, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Methode der Photoaffinitätsmarkierung angewendet.

Im organisch präparativen Teil wurden die bisher unbekanntes photoaktiven mono- und bifunktionellen α -D-Mannoside **12**, **14**, **16**, **19**, **23** und **26** ausgestattet mit verschiedenen PAFGs als Liganden für das bakterielle Lektin FimH erfolgreich designed und synthetisiert. Nach Bestrahlung mit UV-Licht sind die Photomarker in der Lage, durch kovalente Bindung am Eingang der CRD stabile Protein-Ligand-Komplexe zu bilden, die mittels Massenspektrometrie und gegebenenfalls spezifischer Affinitätsfärbung analysiert werden können.

Im zweiten Teil dieser Arbeit erfolgten nach Aufklärung des photolytischen Verhaltens der photoaktiven Mannoside in unterschiedlichen Lösungsmitteln Bestrahlungsexperimente in Anwesenheit gezielt ausgewählter Aminosäuren und Peptide. Dabei gebildete Insertionsprodukt-Analoga konnten massenspektrometrisch nachgewiesen werden.

Der nächste Schritt bestand in der Bestrahlung des Mannose-spezifischen Proteins FimH in Gegenwart der synthetisierten photoaktiven Liganden. Zur Isolierung und Analyse gebildeter Kreuzkupplungsprodukte wurden Affinitätschromatographie, Western Blot, proteolytische Hydrolyse sowie Massenspektrometrie eingesetzt. Im Falle des Azides **12** und der Diazirine **14**, **23** und **26** konnten nach Inkubation und Bestrahlung entsprechende Insertionsaddukte identifiziert werden.

Analoge Ergebnisse ergaben sich bei Markierungsexperimenten des Protein-Komplexes FimCH und des Mannose-spezifischen Lektins ConA in Anwesenheit der bifunktionellen Mannoside **19**, **23** und **26**.

Eine biologische Aktivität der photoaktiven Mannoside **12**, **14**, **16** und **19** konnte mittels ELISA in Form charakteristischer Inhibitionspotenziale nachgewiesen werden; in Kombination mit Computer-gestützten Docking-Studien wurde auch gezeigt, dass die vier getesteten Mannoside eine gegenüber dem Standard Methyl- α -D-mannosid erhöhte Bindungsaffinität zu FimH besitzen.

Resultierend aus allen im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse wurde deutlich, dass der dreigliedrige Diazirin-Ring (**14**, **23** und **26**) für die photoinduzierte Markierung der untersuchten Biomoleküle die am besten geeignete photoaktive funktionelle Gruppe ist. Die zusätzlich an **23** und **26** gebundene Biotin-Einheit eignet sich dabei hervorragend zum Nachweis und zur Isolierung gebildeter Insertionsprodukte. Zusätzlich handelt es sich bei den photoaktiven Liganden **23** und **26** um „universelle“ Markierungsreagenzien, die potenziell in der Lage sind, ganze Bibliotheken oder sogar Organismen auf Mannose-bindende Proteine zu „screenen“ und diese auf ihre Ligand-Bindungseigenschaften hin zu untersuchen.

Abstract

To elucidate the adhesion mechanisms of the α -mannose-specific lectin FimH, the investigation of the molecular interactions between the CRD expressed at the tip of FimH and its ligands is of relevance. To explore the ligand binding of the α -mannose-specific adhesin FimH the method of photoaffinity labeling was selected.

First a set of six unique mono- and difunctional photoactive α -D-mannosides **12**, **14**, **16**, **19**, **23** and **26** equipped with different PAFGs were designed and synthesized successfully. After irradiation with UV light the PAFGs are able to bind covalently at the edge of the CRD to form stable protein ligand complexes which can be analyzed by different methods, such as mass spectrometry or biochemical affinity staining.

The next part of this thesis dealt with the determination of the irradiation properties of **12**, **14**, **16**, **19**, **23** and **26** followed by studies including illumination experiments in different solvents, in the presence of different selected amino acids and model peptides. Mass spectrometric analyses identified covalent insertion product analogues.

The third step was the irradiation of the target protein FimH in the presence of the synthesized photoactive mannosides. In order to analyze possible formed insertion products mass spectrometry, affinity chromatography, western blot and tryptic digest were used. Incubation and irradiation of the protein in the presence of azide **12** and diazirines **14**, **23** and **26** led to products correlating with the respective insertion products. They were identified by mass spectrometry, western blot and/or dot blot affinity staining. Similar results were achieved after incubation and irradiation of the protein complex FimCH and the mannose specific protein Concanavalin A in the presence of the difunctional biotinylated photoprobes **19**, **23** and **26**.

In order to show biological activity the α -D-mannoside derivatives **12**, **14**, **16** and **19** were tested by ELISA. Relative inhibitory potencies were based on the inhibitory potency of methyl α -D-mannoside (MeMan). Computer aided docking studies in regard of the binding potencies of the photoactive mannosides were performed in addition to the ELISA. The results showed, that the four tested photoprobes exhibit higher binding affinities to FimH than the benchmark MeMan.

According to all irradiation experiments and subsequent analyses it was obvious, that the diazirine ring seems to be the most suitable PAFG for the photolabeling of the investigated biomolecules. The “upgrade” by introducing the biotin residue to

facilitate identification and isolation of crosslink products makes the difunctional diazirines **23** and **26** suitable photoaffinity probes which can be used for the detection of mannose binding proteins in organisms or protein libraries and for the investigation of ligand binding of mannose specific proteins. Due to these unique properties the diazirines **23** and **26** can be used as advantageous photolabels for studies in biological chemistry.

1 Einleitung

Auf dem Gebiet der naturwissenschaftlichen Forschung gelten die Studien von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen als eine stetige Herausforderung für Chemiker und Biologen. Tragen diese molekularen Erkennungs-Phänomene doch zu einer erheblichen Anzahl an biochemischen Prozessen in lebenden Organismen bei. So laufen zum Beispiel Zell-Zell-Kommunikation, Zell-Migration, molekulare Erkennung, Stoffwechselfvorgänge, Embryogenese, Immunreaktionen sowie bakterielle Infektionen und Krebs-Metastase nicht ohne das interaktive Zusammenspiel von entsprechenden Rezeptor-Ligand-Paaren ab.^[1,2,3,4,5] Viele solcher molekularen Erkennungsprozesse basieren auf den Interaktionen zwischen Kohlenhydrat-bindenden Proteinen (Lektinen) und Oligosaccharid-Teilstrukturen aus Glycoproteinen und Glycolipiden, die in die Zellmembran eingebettet sind und ihre Glycane auf der Zelloberfläche präsentieren. Für ein besseres Verständnis der Funktion biologischer Rezeptoren ist die Aufklärung struktureller Details der Rezeptor-Ligand-Interaktionen unumgänglich.

Auch in der Wirkstoff-Forschung und Arzneimittelentwicklung spielt die Untersuchung von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen eine wesentliche Rolle. Um die gewünschte Wirkung im lebenden Organismus zu erzielen, müssen Arzneimittel zunächst den entsprechenden Wirkstoff freisetzen, der dann z. B. über die Blutbahn an seinen „Wirkort“ gelangen muss. Als sog. „Wirkorte“ können Rezeptoren oder Enzyme fungieren, die für den lebenden Organismus essentielle Funktionen ausüben. Solche Rezeptoren befinden sich beispielsweise auf der Oberfläche von Zellen. Durch Interaktion eines Rezeptormoleküls mit einem Wirkstoff-Molekül kann z.B. der Zelle ein Signal vermittelt werden, welches das weitere biologische Geschehen beeinflusst. Natürlich üben nur solche Arzneistoffe eine physiologisch sinnvolle Wirkung aus, die spezifisch und selektiv an den jeweiligen Rezeptor binden. Eine besondere Bedeutung wird hierbei den Rezeptor-Inhibitoren beigemessen. Zahlreiche Arbeitsgruppen im Bereich der naturwissenschaftlichen Forschung haben es sich seit Jahren zur Aufgabe gemacht, neue Wirkstoffe für Arzneimittel zu entwickeln und auch heute ist dieses Gebiet der Medizinischen Chemie hochaktuell.

1.1 Die Funktion von Kohlenhydrat-Protein-Interaktionen in lebenden Organismen

1.1.1 Kohlenhydrate besitzen eine biologische Funktion

Nukleinsäuren, Proteine, Lipide und Kohlenhydrate zählen zu den wichtigsten Klassen natürlicher Makromoleküle und bilden gleichzeitig die vier „Pfeiler“ des Lebens.^[6] Die naturwissenschaftliche Forschung vergangener Jahre ging davon aus, dass die Speicherung und der Transfer biologischer Informationen in lebenden Organismen auf den Nukleinsäuren und Proteinen basiert, während den Kohlenhydraten in diesem Zusammenhang keinerlei Bedeutung beigemessen wurde. Zuckermoleküle wurden lediglich als Bausteine stabiler Zellwände und als Energielieferanten für den Metabolismus lebender Organismen beschrieben.^[7] Seit mehreren Jahren gilt diese Sichtweise jedoch als veraltet. Neueren Erkenntnissen zur Folge geht die biologische Bedeutung der Kohlenhydrate weit über die allgemeine Aufgabe als Gerüstbaustoff und Energiespeicher hinaus. Aufgrund ihrer funktionellen und strukturellen Vielfalt, die im Gegensatz zu Nukleinsäuren und Proteinen eine hohe molekulare Diversität bewirken, gelten Kohlenhydrate in der heutigen Zeit im Hinblick auf ihre biologische Funktion in der Zellkommunikation als äußerst interessante Moleküle. Durch ihren hohen Anteil an Funktionalitäten stehen viele Möglichkeiten für Kettenverlängerungen oder Verzweigungen zur Verfügung, die im Bereich der Nukleinsäuren oder Proteine so nicht möglich sind.^[8] Oligosaccharide und glycosylierte Strukturen wie Glycoproteine, Glycolipide und andere Glykokonjugate wie beispielsweise die GPI-Anker^[9] sind Bestandteil aller pflanzlichen und tierischen Organismen.

Mit zunehmendem Interesse an der Erforschung von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen in lebenden Organismen wurde auch deutlich, dass besonders den Interaktionen zwischen Kohlenhydraten und Proteinen eine entscheidende Rolle bei Prozessen wie der Zell-Zell-Erkennung und der Kommunikation zwischen einzelnen Zellen zukommt. So sind in diesem Zusammenhang vor allem noch einmal die Begriffe Zelladhäsion, Immunreaktion und Signaltransduktion hervor zu heben. Das stetig wachsende Interesse an der biologischen Funktion von Kohlenhydraten in

lebenden Organismen sorgte dafür, dass die Glycobiologie in rasantem Tempo zu einem neuen wichtigen Forschungsfeld im Bereich der biologisch-chemischen Forschung herangewachsen ist.

1.1.2 Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen an Zelloberflächen

1.1.2.1 Die Glycocalyx

Seit den 60er Jahren ist bekannt, dass alle eukaryontischen Zellen (Erythrozyten, Epithelzellen usw.) eine Plasmamembran besitzen, deren extrazelluläre Oberfläche von einer Kohlenhydrat-reichen Schicht außergewöhnlicher Komplexität umgeben ist.^[10] Die unterschiedlichen und sehr vielfältigen Oligo- und Polysaccharidstrukturen sind entweder als sog. Glycokonjugate (Glycopeptide, Glycolipide) in der die Zelle umgebenden Lipiddoppelschicht verankert oder aber durch andere nicht-kovalente Interaktionen auf der Zellmembran lokalisiert. 1963 schlug H. S. Bennett den Begriff „Glycocalyx“ vor^[11], welcher sämtliche auf der Membran eukaryontischer Zellen befindlichen Oligo- und Polysaccharid-enthaltenden Strukturen, die in den extrazellulären Raum hinausragen als biologische Einheit zusammenfassen sollte. Dieser Zuckermantel ist für jeden Zelltyp spezifisch, wobei das entsprechende Kohlenhydratmuster gleichzeitig ein für das Entwicklungsstadium und die Funktion der Zelle typisches Merkmal ist. Das Erscheinungsbild dieses charakteristischen Musters kann sich im Laufe der Lebensdauer einer Zelle wandeln.^[6] Es bildet im physiologischen Sinne die Grundlage für die Kommunikation und die Registrierung körpereigener Zellen. Auch im Bereich medizinischer und pathologischer Prozesse, etwa für die Blutgruppen-Erkennung oder im Rahmen von Infektionskrankheiten, Autoimmunerkrankungen sowie für die diagnostische Krebszellentestung spielt die strukturelle Beschaffenheit der auf der Zelloberfläche präsentierten Saccharidepitope eine entscheidende Rolle.^[12, 13, 14] So unterscheiden sich beispielsweise die Glycocalices von Tumorzellen deutlich von denen „gesunder“ Zellen: viele zeigen deutlich dünnere Glycocalices und bei einigen Tumorarten tritt eine Runterregulierung von Glycosyltransferasen auf. Dies hat eine unvollständige Glycansynthese zur Folge,

was dazu führt, dass auf der Zelloberfläche kürzere Saccharidstrukturen präsentiert werden.^[15,16]

Tatsächlich sind bis heute weder der vollständige strukturelle Aufbau der die Zelle umgebenden Glycocalyx, noch ihre exakte Zusammensetzung, verbunden mit ihrer letztendlichen Funktion in lebenden Organismen vollständig aufgeklärt.

1.1.2.2 Biologische Bedeutung der Lektine

Biochemische Prozesse wie die Zell-Zell-Kommunikation, Immunreaktionen, Stoffwechselfvorgänge, Zell-Migration, molekulare Erkennung, Embryogenese sowie bakterielle Infektionen und Krebs-Metastase werden als sog. „molekulare Erkennungsphänomene“ verstanden und laufen nicht ohne das interaktive Zusammenspiel von Rezeptoren und ihren Liganden ab. Überwiegend basieren diese Erkennungsprozesse auf Interaktionen zwischen den komplexen Oligosaccharid-Strukturen der Glycoproteine und -lipide, die die Glycocalyx aufbauen und entsprechenden Kohlenhydrat-bindenden Proteinen. Kohlenhydrat-erkennende Proteine werden allgemein als Lektine bezeichnet und haben die Eigenschaft, Zellen zu agglutinieren und / oder Glykokonjugate (Glycoproteine, Glycolipide etc.) zu präzipitieren.^[17] Sie wurden zunächst ausschließlich aus Pflanzenextrakten isoliert und vornehmlich zur Agglutination von Erythrozyten eingesetzt. W.C. Boyd et al. fanden allerdings später heraus, dass Lektine auch aus tierischen Organen zu gewinnen sind und keinesfalls alle an Erythrozyten binden.^[17] Ferner binden sie reversibel an spezifische Saccharidomänen, wobei sie weder eine enzymatische Aktivität noch die Eigenschaften von Antikörpern, die im Optimalfall irreversibel an ein Antigen binden, aufweisen. Daraus ergab sich die Übereinkunft, alle Kohlenhydrat-bindenden Proteine, die weder Enzyme noch Immunglobuline sind, als Lektine zu bezeichnen. Die Bezeichnung „Lektin“, bereits 1954 von W. C. Boyd und E. Slaughter eingeführt^[18], leitet sich vom lateinischen Begriff *legere* für *auswählen* ab. Lektine enthalten mindestens eine Kohlenhydrat-erkennende Domäne (engl. *carbohydrate recognition domain* = CRD), an denen der Saccharid-Ligand gebunden wird. Aufgrund von Gemeinsamkeiten ihrer Primärstrukturen werden sie u. a. in C-, S- und P-Typ-Lektine kategorisiert.

In einem Bericht von 1860 wird erstmals über eine Lektin-Ligand-Interaktion berichtet, wobei hier die Koagulation von Taubenblut mit Klapperschlangengift beschrieben wird und der Effekt später auf die Wechselwirkung zwischen einem im Schlangengift enthaltenen C-Typ-Lektin und den Taubenblut-Erythrozyten zurückgeführt werden konnte.^[19] Die Untersuchung und Isolation der Lektine erstreckte sich nachfolgend über das Gebiet der toxischen Pflanzenagglutinine^[20] bis hin zu Agglutininen in Rinderserum und nicht toxischen Pflanzenagglutininen. Trotz gewisser Unsicherheiten bezüglich ihrer chemischen Charakterisierung werden Lektine in den letzten Jahrzehnten in steigendem Umfang in der medizinischen Grundlagenforschung eingesetzt. Sie eignen sich, um bestimmte Zelltypen oder Zellfragmente (z. B. Membrantypen) zu charakterisieren, Zellen in verschiedenen Entwicklungsstadien zu erkennen, normale Zellen von Tumorzellen zu unterscheiden, die verschiedenen Phasen des Zellzyklus zu markieren und verschiedene Zelltypen affinitätschromatographisch voneinander zu trennen.

Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit das Hauptinteresse auf den Mannose-bindenden Lektinen liegt, sollen die prominentesten Vertreter dieser Spezies im Folgenden näher betrachtet werden. Das Mannose-bindende Protein (MBP)^[21, 22] gehört zur Familie der C-Typ-Lektine und besitzt entscheidende Funktionen bei der frühen Immunabwehr.^[23] Durch die Interaktionen mit fremden Oligosacchariden auf pathogenen Organismen wie Pilzen, Bakterien oder Viren begünstigt es den Vorgang der Phagozytose. Durch seine Bindung an die Erregeroberfläche löst das Mannose-bindende Protein eine Antikörper-unabhängige Aktivierung des Komplementsystems aus, wodurch die Lyse des Erregers und nachfolgend dessen Elimination vermittelt werden.

1.1.2.3 Concanavalin A

Das Kohlenhydrat-bindende Lektin Concanavalin A (ConA) wird aus *Canavalia ensiformis*, der Schwertbohne (engl. *Jack Bean*) isoliert und ist das erste Lektin, dessen dreidimensionale Struktur aufgeklärt wurde.^[24,25,26,27] Das ConA- Monomer beinhaltet 237 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von $M_r = 26.5$ kDa.^[28] Strukturmerkmal der Aminosäurekette sind zwei antiparallele β -Faltblätter, von denen eines aus sechs Strängen, das andere aus sieben Strängen besteht. Die in der

Struktur enthaltenen helikalen Abschnitte haben demgegenüber kaum Gewicht. Im nativen Zustand besitzt jedes ConA-Monomer eine Saccharid-Bindestelle, eine Übergangsmetall-Ion-Bindestelle S1 (im allgemeinen Mn^{2+}) sowie eine Ca^{2+} -Bindestelle S2.^[29] Die exakten Atom-Koordinaten sind über die *Brookhaven* Protein Datenbank^[30] abrufbar. Concanavalin A bildet im aktiven Zustand Aggregate. So erfolgt eine Dimerbildung, indem sich zwei Proteinketten, die sechssträngigen Faltblätter, zu einem zwölfsträngigen aneinander legen. Zwei solcher Dimere lagern sich zum funktionellen tetrameren Komplex zusammen, indem ihre zwölfsträngigen Faltblätter versetzt aneinander binden (Abb. 1.1). Der Komplex enthält somit vier getrennte Bindestellen für Kohlenhydrate, wobei bevorzugt die Monosaccharide Mannose und Glucose gebunden werden. Unterhalb eines pH-Wertes von 6.5 dissoziiert das Tetramer in Dimere.

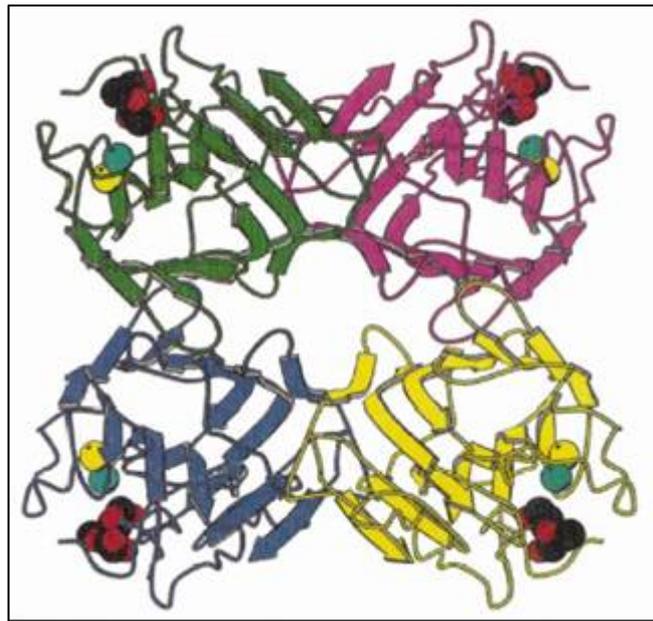


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des tetrameren ConA-Komplexes gebunden an den Liganden Methyl- α -D-mannopyranosid. Die Mn^{2+} -Ionen sind gelb, die Ca^{2+} -Ionen cyan eingefärbt. Die Kohlenstoffatome des Saccharid-Liganden sind schwarz, die Sauerstoffatome rot eingefärbt. Die Dimere werden von den grünen und pinkfarbenen (AB-)Untereinheiten bzw. von den beiden blauen und gelben (CD-) Untereinheiten gebildet.^[31]

Die beiden bivalenten Metall-Ionen sind fest in die ConA-Struktur integriert und spielen eine essentielle Rolle für die Bindung von Kohlenhydrat-Liganden, da sie die Aminosäure-Reste, welche die Saccharid-Bindestasche bilden in der erforderlichen Konformation stabilisieren.^[32,33,34,35] Eine Demetallisierung führt zum vollständigen

Aktivitätsverlust des Proteins.^[36] Die Metall-Ionen-Bindestellen S1 und S2 sind im oberen Teil des vorderen β -Faltblattes lokalisiert (Abb. 1.2).

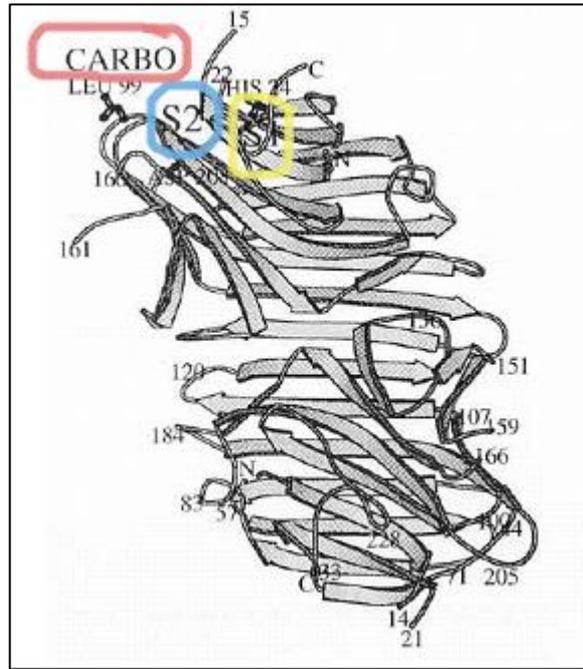


Abb.1.2: Sekundärstruktur des nativen ConA-Monomers mit MOLSCRIPT.^[36] Die Mn^{2+} -Bindestelle S2 ist blau, die Ca^{2+} -Bindestelle S1 ist gelb und die Kohlenhydratbindestelle „CARBO“ ist rot markiert.

Das Entfernen beider Metall-Ionen aus ihren Positionen führt zur Zerstörung der Kohlenhydrat-Bindestelle, da sich einige essentielle Aminosäure-Reste ohne die Stabilisierung der Metall-Ionen von ihren nativen Positionen entfernen, was zu einer Verformung der Saccharid-Bindetasse führt. Daraus resultierend passt ein Kohlenhydrat-Ligand nicht mehr optimal in das aktive Zentrum.^[37]

1.1.2.4 Typ-1-Fimbrien und das bakterielle Lektin FimH

Der bakterielle Befall von Zelloberflächen eines Organs mit anschließender Vermehrung kann ernsthafte Probleme für den lebenden Organismus mit sich bringen. Treten beispielsweise *Escherichia coli*-Bakterien, die bei Gesunden

hauptsächlich im Darm lokalisiert sind, in den Urogenitaltrakt über und vermehren sich in der Harnblase, reagiert der betroffene Organismus mit Entzündungserscheinungen, wie es bei der Cystitis der Fall ist.^[38,39] Daneben können auch Harnwegsinfekte und Nierenbeckenentzündung auftreten.^[40]

Verantwortlich für die pathogene Reaktion sind auf der Bakterienoberfläche lokalisierte proteinogene Organellen, die Fimbrien oder Pili, die eine Adhäsion der Bakterien an die Glycocalyx der Wirtszelle ermöglichen^[41,42,43], da sie bevorzugt an Kohlenhydrat-Moleküle binden. Historisch bedingt sind die von *E. coli* exprimierten Pili bezüglich ihrer Sensitivität gegenüber spezifischen Kohlenhydrat-Inhibitoren bei Hemagglutinations-Reaktionen in unterschiedliche Typen eingeteilt. So existieren beispielsweise P-, Typ-1- und Typ-4-Fimbrien.^[44] Die auf der Oberfläche von *E. coli*-Bakterien lokalisierten filamentartigen Typ-1-Fimbrien erreichen eine Länge von bis zu 2 μm und bilden helikale Stäbchen. Sie besitzen eine moderate Affinität gegenüber terminalen α -Mannosyl-Resten. Ihre Biosynthese erfolgt über den sog. „*chaperone-usher pathway*“ (engl. *chaperone* = Begleiter; engl. *usher* = Platzanweiser)^[45,46], wobei sie systematisch aus einzelnen Pilus-Untereinheiten aufgebaut werden (Abb. 1.3). Hierbei treten die entsprechenden Untereinheiten, die sog. Fim-Proteine (FimA, FimF, FimG und FimH) zunächst in einer nicht gefalteten Struktur in das Periplasma des Bakteriums ein und bilden dort 1:1-Komplexe mit dem „*chaperone*“-Protein FimC, welches die korrekte Faltung der einzelnen Proteine auslöst. Wechselwirkungen des Protein-Komplexes mit dem in der äußeren Membran lokalisierten „*usher*“-Protein FimD animieren die Dissoziation des Komplexes, wobei das „*chaperone*“ im Periplasma zurückbleibt und die Fim-Untereinheiten in die Fimbrie eingebaut werden.^[44,45]

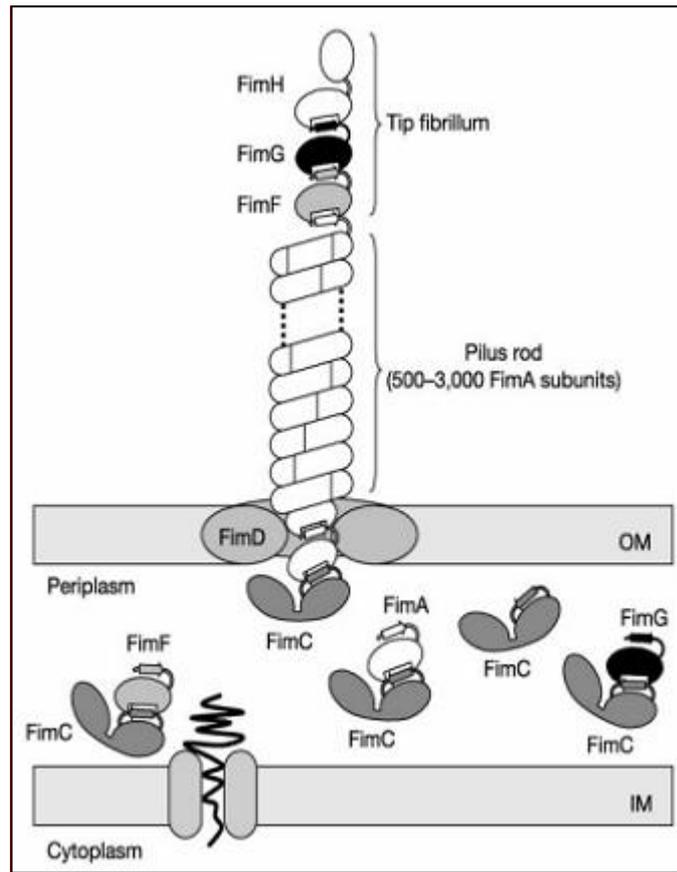


Abb. 1.3: Biosynthese der Typ-1-Fimbrien von *E. coli*-Bakterien.

Der Mechanismus des „chaperone-usher-pathways“ zur Ausbildung eines Pilus' ist hierbei schematisch dargestellt.^[46]

Die Adhäsionsbereitschaft der Typ-1-Fimbrien gegenüber terminalen α -Mannosyl-Resten wird durch das Lektin FimH hervorgerufen, welches an der äußersten Spitze der Fimbrie lokalisiert ist und somit lediglich einen geringen Anteil des gesamten fimbriellen Protein-Komplexes einnimmt. Das gefaltete, native FimH-Lektin besteht aus zwei Domänen der all-beta-Klasse und ist aus 279 Aminosäuren aufgebaut. Die N-terminale Rezeptor-Bindedomäne umfasst die Aminosäuren AS 22-179, wobei diese zusätzlich mit einem kurzen Signal-Peptid (AS 1-21) versehen ist. Die C-terminale Pilin-Domäne beginnt bei Aminosäure AS 180 und endet bei Aminosäure AS 300. Diese Angaben stammen aus der Protein-Datenbank *SwissProt*.^[179] In den Veröffentlichungen der charakterisierten Kristallstrukturen des FimCH-Protein-Komplexes^[47,48] wurde das am N-Terminus lokalisierte Signal-Peptid entfernt, so dass die Numerierung der Aminosäure-Reste um 21 nach vorne verschoben ist (Lektin-Domäne AS 1-158; Pilin-Domäne AS 159-279). Im weiteren Verlauf der

vorliegenden Arbeit ist die Sequenz-Bezeichnung des FimH-Proteins den Publikationen angepasst.

Lektine, die aus zwei Domänen aufgebaut sind, sind sowohl in Lösung als auch in kristalliner Form nur stabil, wenn die C-terminale Pilus-Domäne durch Proteine abgesättigt wird. Daher wurde das FimH-Protein erstmals als Komplex mit dem FimC-Protein kristallisiert.^[50,51] Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass die N-terminale Rezeptor-Bindedomäne ohne zugehörige Pilin-Domäne korrekt gefaltet ist und eine stabile und funktionsfähige Einheit darstellt.^[49,50,51,52] An der äußersten Spitze der FimH-Rezeptor-Bindedomäne ist die Substratbindestelle lokalisiert. In der 1999 von Choudhury et al. ermittelten und veröffentlichten Kristallstruktur des Chaperone-Adhäsins-Komplexes FimCH ist ein Molekül Cyclohexylbutanoyl-N-hydroxyethyl-D-glucamid (C-HEGA) (Auflösung 2.7 Å) als Additivum zur Kristallisation in der Bindetasche gebunden.^[48] Strukturell ähnelt dieses dem physiologisch relevanten Rezeptor-Molekül D-Mannose. 2002 veröffentlichten C. S. Hung et al. eine zweite Kristallstruktur des FimCH-Komplexes, in dessen CRD der natürliche Kohlenhydrat-Ligand α -D-Mannose gebunden vorlag (Abb. 1.4).^[48]

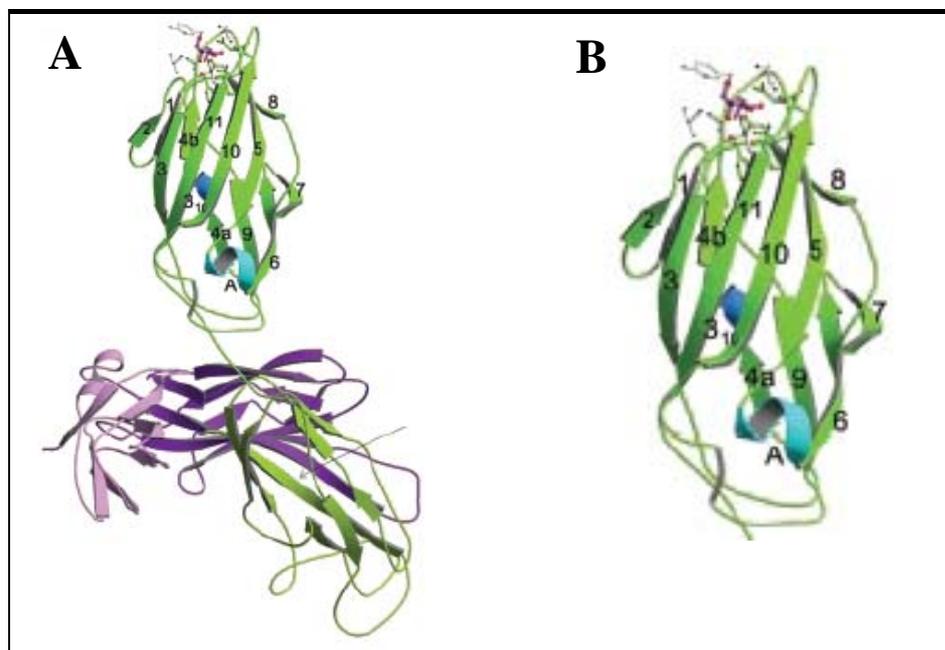


Abb. 1.4: Kristallstruktur des FimCH Chaperone-Adhäsins-Komplexes mit dem natürlichen Kohlenhydrat-Liganden α -D-Mannose. A) MOLSCRIPT Sekundärstruktur des FimCH-Lektin-Komplexes; FimC ist violett gefärbt, die Lektindomäne des Adhäsins FimH ist in grün/blau dargestellt während die Pilin-Domäne gelb/grün eingefärbt ist. B) Vergrößerte Ansicht der FimH-Lektindomäne mit der Kohlenhydrat-Bindestelle (CRD).^[48]

Zusätzlich enthält die Publikation Ergebnisse über die Charakterisierung der Substrat-Bindestelle anhand von „*site-directed mutagenesis*“ sowie einer umfassenden funktionellen Analyse. Die Substrat-Bindestelle besitzt die Form einer relativ tiefen Tasche, die den *N*-Terminus des Proteins enthält und deren geometrische Form und Größe perfekt für die Aufnahme eines D-Mannose-Moleküls ausgelegt sind. Der Monosaccharid-Ligand ist in der Bindetasche hauptsächlich von negativ geladenen Aminosäure-Resten umgeben (Asp47, Asp54, Asp140), so dass seine Position, Konfiguration und Orientierung überwiegend von der „*inhüllenden*“ Elektronendichte bestimmt sind. Die ausgeprägte Hydrophilie am „*Boden*“ der CRD (Phe1, Asn46, Asp54, Gln133, Thr134, Asn135) bewirkt, dass die Mannose die pyranoid Form mit α -konfiguriertem anomeren Zentrum einnimmt. In dieser Orientierung ist eine hohe Stabilisierung des Liganden über sehr intensive Interaktionen in Form von Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen den in der Bindetasche lokalisierten Aminosäure-Seitenketten und den exocyclischen Sauerstoffen des Mannopyranosids gewährleistet. Ein Wassermolekül in der Bindetasche ermöglicht zusätzlich zur Wechselwirkung mit dem *N*-Terminus eine Interaktion der Backbone-Struktur des Proteins mit dem Sauerstoff der 2-OH-Gruppe des Liganden. Das Sauerstoff-Atom des anomeren Zentrums hingegen ragt ohne Beteiligung an den direkten komplexierenden Wechselwirkungen aus der CRD in das Lösungsmittel hinaus und steht so als Verknüpfungspunkt für die Einführung zusätzlicher funktioneller Gruppen zur Verfügung. Diese strukturellen Gegebenheiten wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit für die Entwicklung und das Design photoaktiver α -D-Mannoside als neue Liganden für FimH ausgenutzt. Auffällig ist auch, dass der Bereich um die CRD herum ausschließlich von lipophilen Aminosäuren (Ile13, Tyr48, Ile52 und Phe142) „gesäumt“ ist. Die beiden aromatischen Reste der Tyrosine Tyr48 und Tyr137 bilden das sog. „Tyrosin-Tor“ (engl. *tyrosine gate*). In der Abbildung 1.5 wird deutlich, dass das Tyrosin-Tor anhand der Orientierung beider Tyrosin-Reste zueinander in der vorliegenden Kristallstruktur als „geöffnet“ bezeichnet werden kann. Am Rande der CRD sind die Aminosäuren Phe1, Ile13, Ile52, Asp140 und Phe142 lokalisiert, die zusammen mit den beiden Tyrosin-Resten Tyr48 und Tyr137 den sog. „Hydrophoben Grat“ (engl. „*hydrophobic ridge*“) bilden. Dieser „zwingt“ den Kohlenhydrat-Liganden in eine Prä-Konformation, die die polaren Interaktionen in der Bindetasche vereinfacht. Ebenso könnte der hydrophobe „Eingangsbereich“ für die bessere Bindung eines

verzweigten Mannotriosids und auch von Pentasacchariden gegenüber dem Monosaccharid (mit)verantwortlich sein.^[48,161] Neuere Studien belegen ebenfalls, dass auch Kohlenhydrat-Liganden auf α -D-Mannosid-Basis, deren anomeres Zentrum mit aromatischen Struktureinheiten verknüpft wurde, eine höhere Bindungsaffinität zum Protein zeigen als α -D-Mannose selbst.^[177]

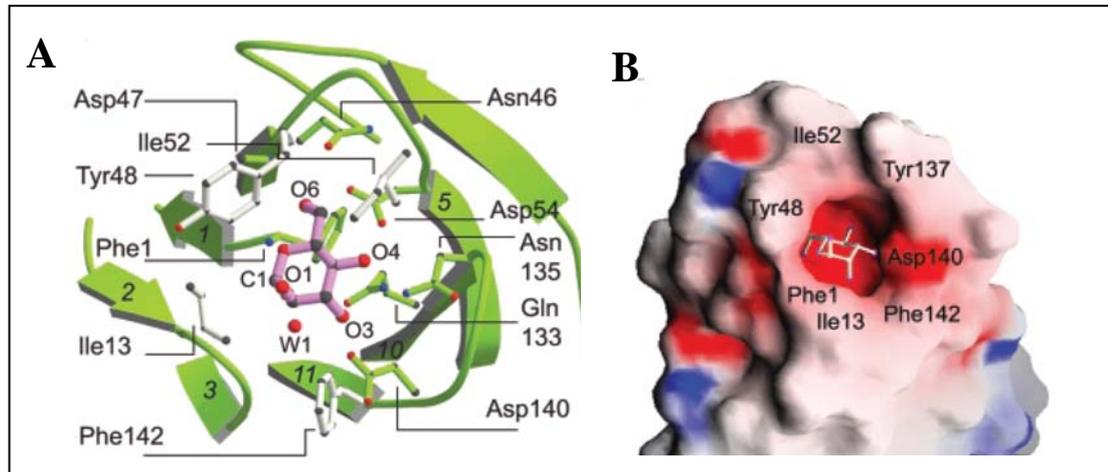


Abb. 1.5: A) Ausschnitt aus der Sekundärstruktur des FimH-Adhäsins; gezeigt ist die Kohlenhydraterkennungs-Domäne des FimH-Proteins mit allen für die Stabilisierung des Liganden essentiellen Aminosäure-Resten. B) Oberflächendarstellung der Rezeptor-Bindedomäne des FimH-Proteins; das elektrostatische Potenzial ist farblich hervorgehoben; positiv geladene Aminosäureseitenketten sind blau eingefärbt, negativ geladene Seitenketten sind rot eingefärbt und neutrale Reste sind grau eingefärbt. Die Aminosäure-Reste der „hydrophobic ridge“ sind gekennzeichnet.^[52]

In einer dritten, 2005 von Bouckaert et al. veröffentlichten 3D-Struktur kommt der Einfluss des Tyrosin-Tores auf die Komplexierung der Liganden deutlich zur Geltung^[52]. Dabei gelang es, die Kristallstrukturen zweier FimH-Lektindomänen, die aus zwei voneinander unabhängigen Bakterienstämmen exprimiert wurden, zu erhalten (FimH_{tr1}, FimH_{tr2}). Beide komplexieren den gleichen Liganden: Butyl- α -D-mannosid. Die charakterisierten Lektindomänen bestehen aus den Aminosäure-Resten AS 1-158 und stimmen mit der kompletten Lektindomäne des FimH-Proteins aus der in 2002 veröffentlichten Struktur des FimCH-Komplexes überein. Auch die Strukturen der „FimH_{tr}-Teilstücke“ differieren nicht wesentlich von der Struktur derselben Domäne im FimCH-Komplex. Im Bereich der tiefen Monosaccharid-Bindetasche existieren sowohl für die Ausrichtung der Backbone- und Seitenkettenatome, als auch für die Position des pyranoiden Ringes des Liganden

kaum Unterschiede. Jedoch variiert in beiden FimH_{tr} -Kristallstrukturen die Orientierung der beiden aromatischen Tyrosin-Reste am Eingang der CRD, die das Tyrosin-Tor bilden (Abb. 1.6). Im Falle des FimH_{tr1} nimmt der aromatische Ring des Tyr48-Restes eine andere Konformation ein, sodass das Tyrosin-Tor als „geschlossen“ bezeichnet werden kann. Diese Änderung der Orientierung führt zu einer deutlich größeren lipophilen Fläche am Eingang der CRD, was eine bessere Stabilisierung der Butylseitenkette des Kohlenhydratliganden durch stärker ausgeprägte hydrophobe Wechselwirkungen zur Folge hat.

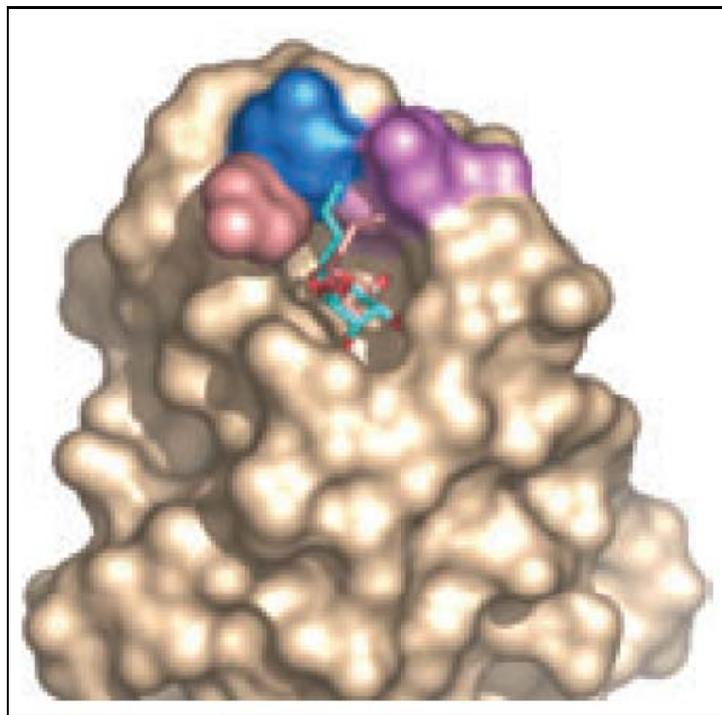


Abb. 1.6: Oberflächenpräsentation der unterschiedlichen Alkyl- und Aminosäureseitenketten-Konformationen in den Kristallstrukturen von FimH_{tr1} und FimH_{tr2} : die Butylgruppe in FimH_{tr1} ist cyan gefärbt, Tyr48 ist dunkelblau gefärbt; die Butylgruppe und Tyr48 in FimH_{tr2} sind altrosa gefärbt; Tyr137 ist für beide Kristallstrukturen violett gefärbt und Ile52 ist für beide Strukturen pink gefärbt.^[52]

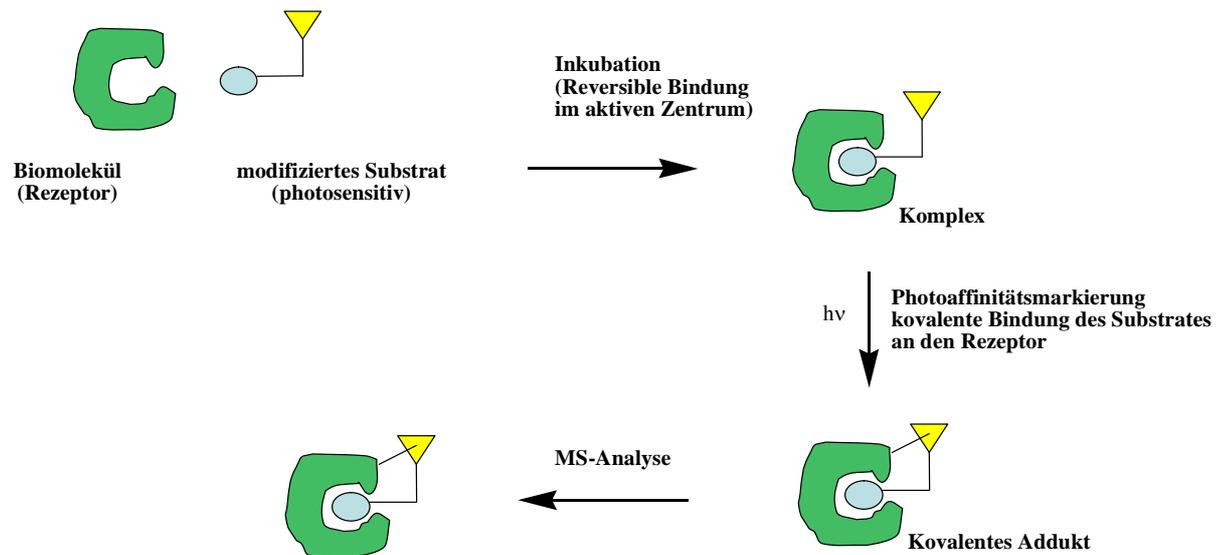
Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die theoretischen Berechnungen der Ligandbindungsaffinitäten gegenüber FimH stets beide Orientierungen des „Tyrosin-Tores“ berücksichtigt und entsprechend kommentiert.

1.2 Photoaffinitätsmarkierung

1.2.1 Allgemeine Vorbemerkungen

Für die Studien der Wechselwirkungen biologisch signifikanter Liganden mit ihren Rezeptoren gewann in den letzten Jahren die Methode der Photoaffinitätsmarkierung (engl. photoaffinity labeling) vor allem in Kombination mit der Massenspektrometrie immer mehr an Bedeutung. Im Zusammenhang mit der erfolgreichen Charakterisierung von Proteinen anhand ihrer röntgenographisch aufgenommenen Kristallstrukturen stellt sich bei der Untersuchung von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen häufig die Frage, ob ein Ligand in Lösung bzw. in einer komplexeren biologischen Umgebung auf die gleiche Art und Weise mit seinem Rezeptor interagiert wie es die Kristallstruktur dieses Rezeptor-Ligand-Komplexes zeigt. Dies muss nicht unbedingt der Fall sein, da die thermodynamischen Umstände bei der Kristallisation und im Kristall andere sind als in Lösung. Es ist möglich, dass im „lebendigen Geschehen“ noch andere molekulare Wechselwirkungen von Bedeutung sind, als es lediglich eine statische Kristallstruktur nahe legen kann. Da die Methode der Photomarkierung ausschließlich in Lösung durchgeführt wird, eignet sie sich somit hervorragend zur näheren Beleuchtung dieser und anderer damit verbundenen Fragestellungen. Einige Publikationen in diesem Bereich machen deutlich, wie gut sich diese Untersuchungsmethode bereits etabliert hat. So publizierte beispielsweise eine Arbeitsgruppe aus Frankfurt am Main im Jahre 2001 die Charakterisierung des aktiven Zentrums der in der Galle lokalisierten Gallensäure für das ileale Lipid-bindende Protein (ILBP) anhand der Photoaffinitätsmarkierung.^[53] Die Interaktionen der Gallensäure mit dem ILBP vermitteln hauptsächlich den Fettabbau und die Aktivierung der Verdauungsenzyme im lebenden Organismus. Die Gruppe um C. Jossart veröffentlichte 2005 Ergebnisse über durchgeführte Studien der Ligandbindedomäne eines Rezeptors, der peptidische Hormone spezifisch bindet, die für die Regulierung der Homöostase im lebenden Organismus verantwortlich sind.^[54] Auch hierbei kam die Methode der Photoaffinitätsmarkierung erfolgreich zum Einsatz.

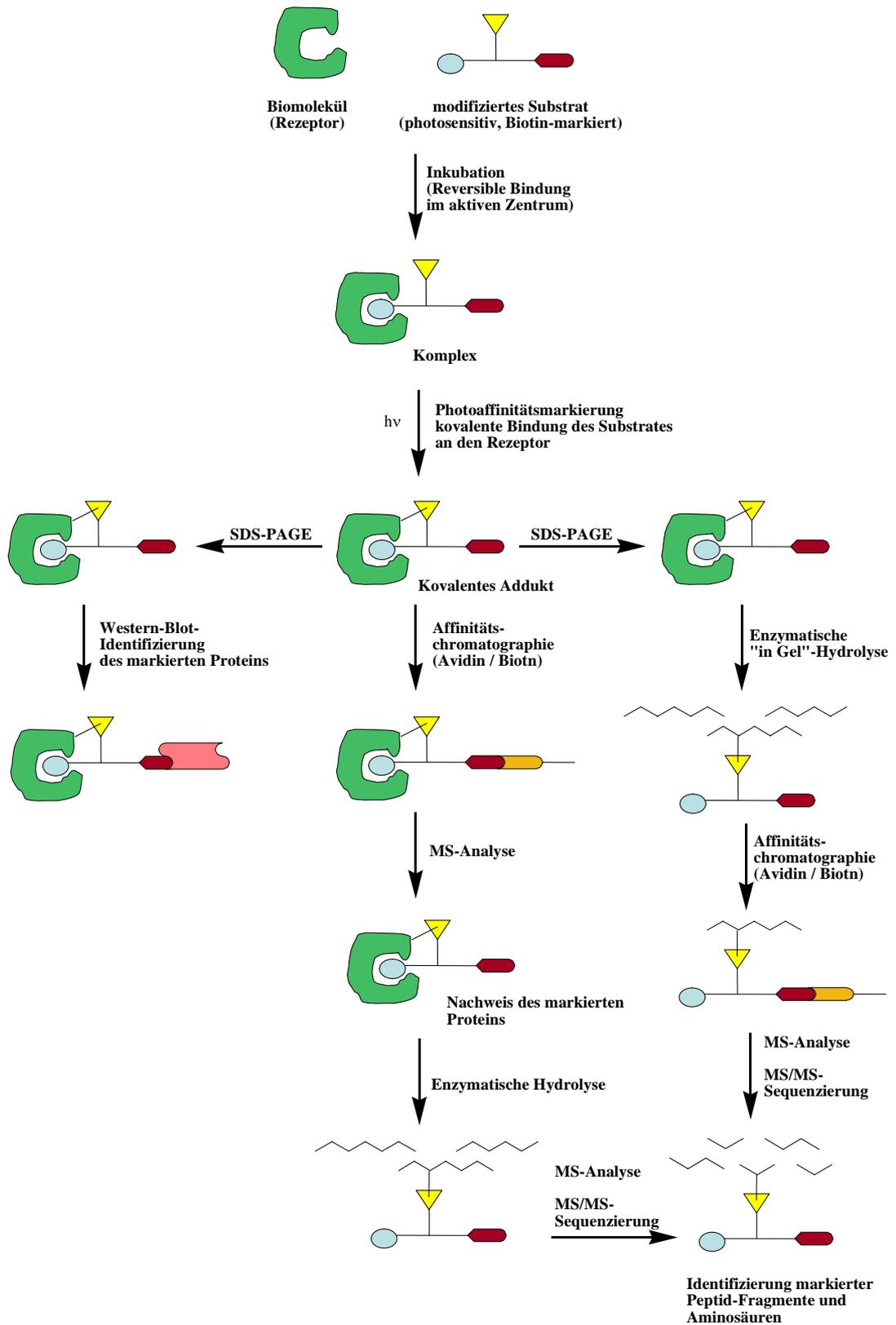
Das grundlegende Prinzip dieses Verfahrens beruht auf dem Einsatz photoaktiver funktioneller Gruppen (Photophore, PAFG), die kovalent mit entsprechenden Liganden verknüpft werden müssen. Die Bestrahlung eines solchen photoaktiven Derivates mit UV-Licht einer geeigneten Wellenlänge führt zu einem hoch reaktiven Intermediat, welches mit einem, in der Nähe befindlichen Molekül eine kovalente Bindung ausbilden kann. Wird also ein photoaktiver Ligand zuerst mit dem entsprechenden Rezeptor inkubiert und der gebildete Ligand-Rezeptor-Komplex in Lösung bestrahlt, entstehen stabile, kovalent gebundene Kreuzkupplungs-Produkte, die sich im Anschluss anhand massenspektrometrischer Methoden analysieren lassen (Schema 1.1a). Die spezifische Affinität der Liganden zum Rezeptor-Protein fördert hierbei die notwendige Ausbildung des Protein-Ligand-Komplexes. Die photosensitive Gruppe ist dann in direkter Nähe zum Protein lokalisiert. Während der Bestrahlung mit Licht im passenden UV-Wellenlängenbereich bilden sich die für die jeweiligen photoaktiven Gruppen charakteristischen hochreaktiven Zwischenstufen aus, die schnell mit benachbarten Gruppen des Biomakromoleküls reagieren können.



Schema 1.1a: Schematische Darstellung der Photoaffinitätsmarkierung eines Proteins.

Zusätzlich zur photoaktiven Gruppe ist es sinnvoll, die Liganden mit einer Indikatorgruppe auszustatten, um die Identifizierung und Reinigung des markierten Proteins (Affinitätschromatographie, Western Blot, etc.) zu erleichtern. Die dargestellten Überlegungen führten zur Konzeption des in Schema 1.1b gezeigten

Workflows. Die in den Schemata 1.1a und 1.1b dargestellten Arbeitsabläufe wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit umgesetzt.



Schema 1.1b: Schematische Darstellung der Photoaffinitätsmarkierung eines Proteins mit anschließenden Reinigungs- und Analyse-Möglichkeiten.

Idealerweise bietet dieses Verfahren die Möglichkeit, den genauen Ort, an dem der Ligand eine stabile kovalente Bindung zum Rezeptor ausgebildet hat, herauszufinden. Dies lässt dann auf die molekularen Details der vorangegangenen nicht-kovalenten Interaktion des Liganden mit seinem Rezeptor schließen.

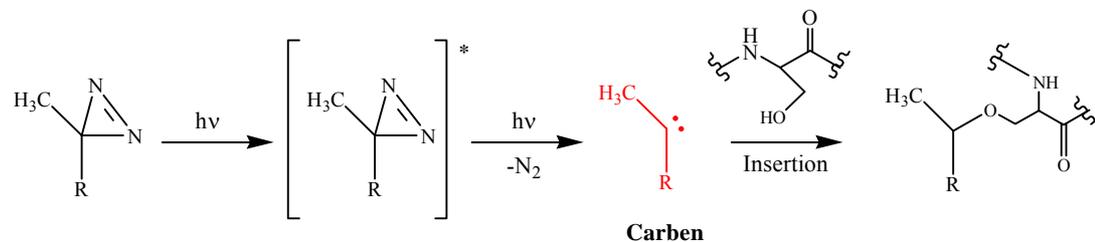
Die Planung solcher Experimente wird von Anfang an von einem kritischen Punkt, dem der Photoaffinitätsmarkierung beeinflusst. Die vorliegende Problemstellung sowie die Zielsetzung eines Projektes bestimmen die Wahl der photolabilen Gruppe, die durch Photoaktivierung zu einer kovalenten Verknüpfung zwischen Ligand und Rezeptor führen soll, in entscheidendem Maße. In den häufigsten Fällen besteht die photoaktivierbare Spezies typischerweise aus einem modifizierten Derivat des Rezeptor-Substrates. In jedem Falle muss die Auswahl des Photophores gut durchdacht und auf das zu untersuchende Ligand-Rezeptor-System abgestimmt sein, um möglichst schnell und effektiv an Informationen bezüglich Bindeverhalten und Bindungsmechanismen heran zu kommen.

Der eingesetzte PAL sollte so klein wie möglich sein, sodass es nicht zu einer sterischen Hinderung der Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen kommt, was eine unerwünschte Erniedrigung der Komplexbindungskonstante zur Folge hätte. Ebenso sollten Aktivierung und Ausbildung des reaktiven Intermediates in Wellenlängenbereichen über 280 nm erfolgen, um eine mögliche Beschädigung der Rezeptormoleküle (meist Proteine) bei der Bestrahlung zu vermeiden. Die Lebensdauer des reaktiven Intermediates sollte so kurz wie möglich sein, um unerwünschte Nebenreaktionen oder sogar die Dissoziation des Ligand-Rezeptor-Komplexes vor der kovalenten Bindungsbildung zu vermeiden. Die Bildung eines stabilen kovalenten Adduktes zwischen Ligand und Rezeptor ist für die nachfolgende Analyse äußerst wichtig, da die meisten Analysemethoden wie Elektrophorese, Chromatographie oder Massenspektrometrie die Dissoziation des Komplexes fördern und somit zu nicht auswertbaren Ergebnissen führen. Fiel die Entscheidung zu Gunsten einer bestimmten photoaktivierbaren Gruppe, müssen Kontrollexperimente bestätigen, dass diese auch für das vorliegende Problem geeignet ist. Um sicher zu stellen, dass die Rezeptor-Ligand-Bindungseigenschaften nicht verändert wurden, muss immer eine Kontrolle mit dem nicht derivatisierten System parallel durchgeführt werden.

1.2.2 Photoaktive funktionelle Gruppen

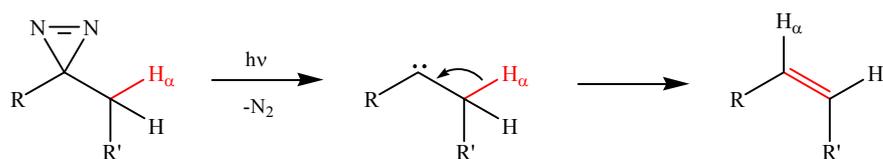
Die bekanntesten Photophore, die bisher für Photoaffinitätsmarkierungs-Experimente eingesetzt wurden, sind Arylazide, Benzophenone und Diazirine.^[140] Arylazide und Diazirine sind Vorstufen der Nitrene und Carbene, während die Aktivierung der Benzophenone über die Ausbildung radikalischer Arylketone verläuft.^[55]

Diazirine wandeln sich während der Bestrahlung mit UV-Licht im Wellenlängenbereich um 350 nm durch Stickstoff-Abspaltung in hoch reaktive Carbene um. Diese insertieren bereitwillig in N-H und O-H-Gruppen biochemischer Makromoleküle und bilden dabei stabile kovalente Kreuzkupplungsprodukte (Schema 1.2).



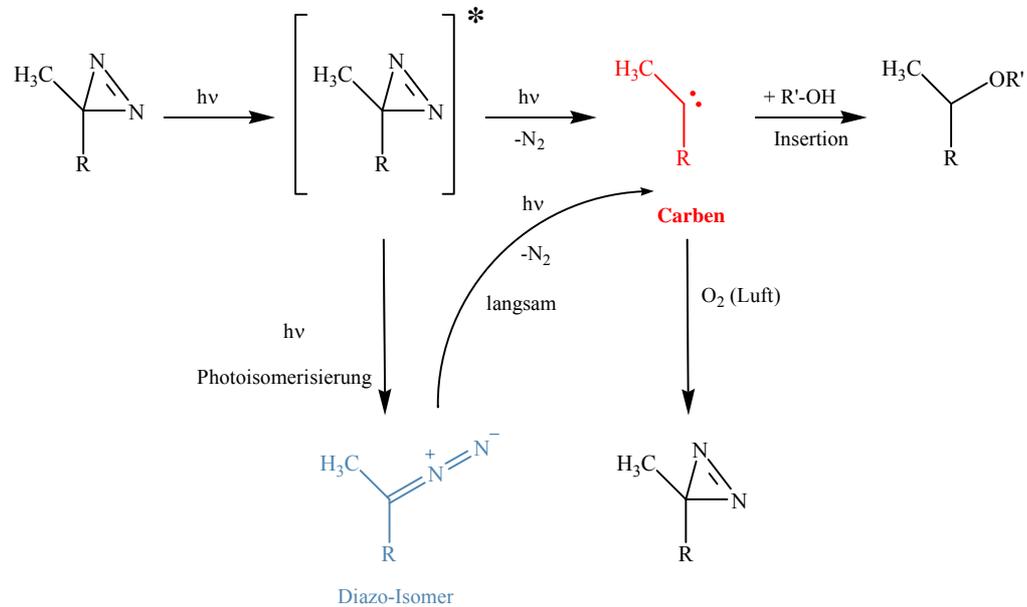
Schema 1.2: Photolytische Aktivierung eines Diazirin-Photophores mit Insertion und Bildung des Kreuzkupplungsproduktes.

Hierbei müssen jedoch unerwünschte Nebenreaktionen in Betracht gezogen werden, die in direkter Konkurrenz zur Insertions-Reaktion stehen und diese somit entweder stark einschränken oder sogar verhindern können. So neigen aliphatische Diazirine während der photolytischen Aktivierung durch Migration direkt dem Dreiring benachbarter α -H-Atome zur intramolekularen Bildung entsprechender Alkene (Schema 1.3).^[56] Diese Reaktion verläuft schneller als die Insertion des intermediär gebildeten Carbens mit einer Biomolekül-Funktionalität, so dass die Photomarkierung nicht zu den gewünschten Ergebnissen führt.^[56,104]



Schema 1.3: Intramolekulare Bildung eines Alkens bei Anwesenheit von α -H-Atomen als unerwünschte Nebenreaktion bei der Bestrahlung aliphatischer Diazirine.

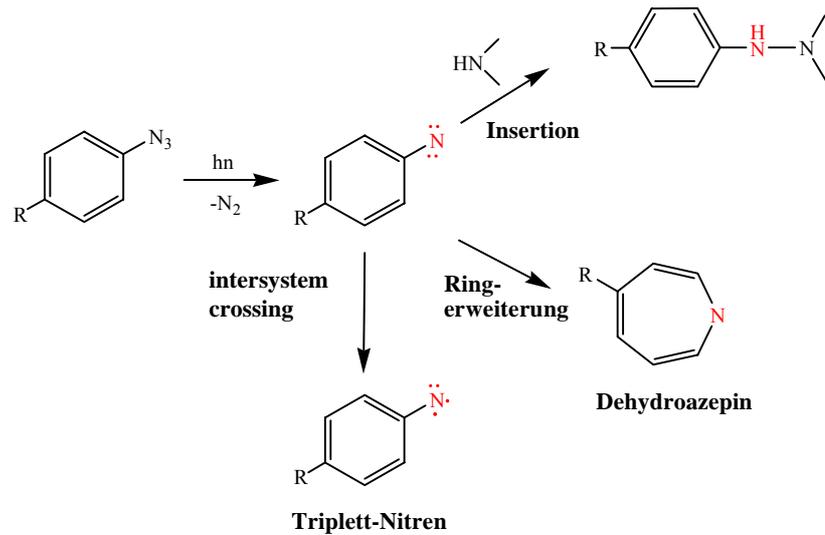
Eine weitere kritische Eigenschaft der Diazirine ist die Isomerisierung zu den entsprechenden Diazo-Verbindungen, deren Potenzial, durch Stickstoff-Abspaltung reaktive Carbene zu bilden, um einiges geringer ist, als das der Diazirine (siehe Schema 1.4).^[57]



Schema 1.4: Photoisomerisierung des Diazirins zum entsprechenden Diazo-Isomer als Konkurrenzreaktion zur Insertion in Biomolekül-Funktionalitäten.

Eine nahezu vollständige Unterbindung dieser unerwünschten Nebenreaktionen kann durch den Einsatz des von Brunner et al. entwickelten 3-(Trifluormethyl)-3-aryl-3H-diazirines^[58] als photoaktive funktionelle Gruppe erreicht werden. Diese Spezies trägt keine α -H-Atome und die gebildeten Carbene liefern hauptsächlich Insertionsprodukte, wobei die Isomerisierung zur Diazo-Gruppierung weitestgehend zurückgedrängt ist.^[57]

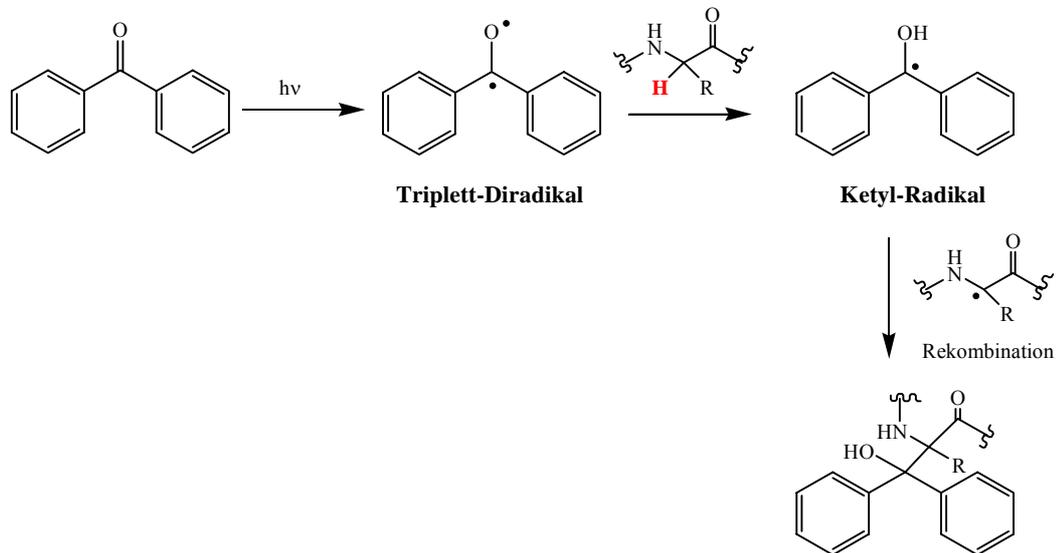
Ebenso häufig als Photophore für Photomarkierungsexperimente eingesetzt werden Arylazide. Während der Bestrahlung mit UV-Licht im Wellenlängenbereich von 340 nm bilden sie nach Stickstoff-Abspaltung reaktive Singulett-Nitrene, die, wie auch die Carbene, durch Insertion eine stabile kovalente Bindung mit Biomolekülen eingehen können.^[59,60]



Schema 1.5: Photolytische Aktivierung der Arylazide; Bildung des Singulett-Nitrens, Umlagerung zum Triplett-Nitren, Insertion in Biomoleküle und Ringerweiterung zum Dehydroazepin.

Auch bei der Verwendung von aromatischen Aziden sind unerwünschte Nebenreaktionen bekannt. So können während der Bestrahlung durch *intersystem crossing*, dem Übertritt eines Elektrons aus dem angeregten Singulett- in den angeregten Triplett-Energiezustand, aus den intermediär gebildeten reaktiven Singulett-Nitrenen Triplett-Nitrene entstehen (Schema 1.5). Diese können nicht in Biomoleküle insertieren, sondern fungieren lediglich als Wasserstoff-Akzeptoren.^[61,62] Hauptsächlich bilden sich jedoch bei der photolytischen Aktivierung der Phenylazide aus den reaktiven Singulett-Nitrenen durch eine Ringerweiterung sog. Dehydroazepine (Schema 1.5).^[61,62] Diese werden entweder von Nukleophilen oder dem Solvens abgefangen, unter Bildung von Aminen, oder sie diffundieren aus der Bindetasche heraus, um kovalent an andere nukleophile Gruppen zu binden, die weiter vom aktiven Zentrum entfernt sind.^[63] Dies führt zu nicht erwünschter, unspezifischer und unkontrollierter Markierung, was eine nachfolgende Analyse erheblich erschwert und somit die Effektivität des Experimentes drastisch herabsetzt. In Abwesenheit nukleophiler Reaktionspartner stabilisieren sich die intermediären Singulett-Nitrene durch Polymerisation, was einen erheblichen Ausbeuteverlust an markierter Spezies zur Folge hat.^[64,65,66] Platz et al. fanden 1989 heraus, dass die Neigung zur Ringerweiterung bei pentafluorierten Phenylaziden deutlich minimiert ist und somit die Bildung kovalenter Kreuzkupplungsprodukte bevorzugt ist.^[67]

Eine dritte photoaktive Spezies stellen die Benzophenone dar, deren Bestrahlung im Wellenlängenbereich von 350 nm zur Ausbildung eines diradikalischen Triplettzustandes führt, dessen Wechselwirkung mit C-H-Bindungen zur Abspaltung von Wasserstoff führt. Die Rekombination der intermediär auftretenden Ketyl- und Alkyl-Radikale ergibt schließlich das kovalente Addukt (Schema 1.6). Eine charakteristische Eigenschaft der aus Benzophenonen entstehenden Triplett-Radikale ist dessen Möglichkeit, in den Grundzustand zu relaxieren. Dieses Phänomen führt gegenüber den Diazirinen und Arylaziden zu deutlich längeren Bestrahlungsdauern und geringeren Insertionsausbeuten.^[135]



Schema 1.6: Photolytische Aktivierung eines Benzophenon-Photophores mit Bildung des Kreuzkupplungsproduktes.

Alle hier vorgestellten photoaktiven funktionellen Gruppen zeichnen sich durch charakteristische Vorteile aber auch durch eine Reihe kritischer Nachteile aus. Daher hängt die letztendliche Entscheidung für ein geeignetes Photophor maßgeblich vom vorliegenden Analyse-Problem und den Zielsetzungen ab. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zunächst alle drei Photophore für Markierungsexperimente eingesetzt. Nach Auswertung der hierbei erzielten Ergebnisse konnte für die weiterführenden Experimente der am besten geeignete photoaktive Ligand ausgewählt werden.

1.3 Affinitätschromatographie

Das physikalische Phänomen der Affinitätschromatographie beruht auf der spezifischen und reversiblen Adsorption eines Moleküls an einen individuellen matrixgebundenen Bindungspartner. Ein verfügbarer, affiner Bindungspartner wird kovalent an eine Matrix gebunden und dient als immobilisierter Ligand. Die spezifische Interaktion mit diesem Ligand wird genutzt, um einen Adsorbenten selektiv aus einer komplexen Mischung heraus zu adsorbieren. Die Elution des Adsorbenten wird dann entweder durch eine kompetitive Verdrängung aus der Bindung, durch einen Konformationswechsel aufgrund einer pH-Wert-Änderung oder durch eine Änderung der Ionenstärke erreicht. Die Affinitätschromatographie gilt als die Trennmethode mit der größten Spezifität und Selektivität für die Isolierung und Reinigung von Biomolekülen. Zu den am häufigsten eingesetzten Systemen gehört beispielsweise das Avidin-Biotin-System, bei dem die hohe Bindungsaffinität des niedermolekularen Biotins an das Protein Avidin ausgenutzt wird. Ein weiteres Verfahren basiert auf der Reinigung „His-markierter“ Proteine mittels Nickel-Affinitätschromatographie. Hierfür wird die Komplexbildung des Ni²⁺-Kations durch die Imidazol-Reste des Histidins ausgenutzt.^[68]

Für die erfolgreiche Durchführung der Affinitätschromatographie spielt die exakte Einhaltung der Abfolge einer Reihe allgemeiner Arbeitsschritte eine entscheidende Rolle: i) Adsorption der Probe, ii) Waschen, iii) Desorption und iv) Regeneration der Matrix.

Die Adsorption der Probe wird im Wesentlichen durch die Affinitätskonstante und die Kapazität der Säule bestimmt. Probe und Matrix werden in einem geeigneten Puffer äquilibriert und definierte Werte von pH und Ionenstärke sichergestellt. Das Auftragsvolumen spielt hierbei keine Rolle. Beim Waschen werden durch Änderung der Pufferbedingungen (z. B. Erhöhung der Ionenstärke und/oder pH-Wert-Änderung) unspezifisch gebundene Komponenten entfernt; die Desorption erfolgt entweder spezifisch, wenn ein geeigneter Eluent zur kompetitiven Verdrängung zur Verfügung steht, oder sie erfolgt unspezifisch durch Änderung der Umgebungsbedingungen (pH, Konz. des Elutionsmittels, Ionenstärke, etc.). Die Möglichkeit zur Regeneration der Matrix ist vor allem aus wirtschaftlicher Sicht

wichtig, da das meist teure Säulenmaterial so für mehrere Reinigungen eingesetzt werden kann. Somit wird primär weniger Abfall produziert und zusätzlich werden Kosten eingespart.

Bei der Auswahl eines Liganden für die Affinitätschromatographie wird zwischen monospezifischen und gruppenspezifischen Liganden unterschieden. Eine monospezifische Wechselwirkung erfolgt ausschließlich zwischen einem definierten Bindungspaar. Als Beispiel hierfür kann das in dieser Arbeit verwendete Biotin-Avidin-System genannt werden.^[69] So können biotinylierte Biomoleküle wie Peptide oder Proteine über einen mit Avidin funktionalisierten Träger aus einer komplexen Peptid- oder Proteinmischung heraus adsorbiert werden. Die biologische Wechselwirkung dient hierbei gleichzeitig zur Isolierung und zur Erkennung der gewünschten Komponente. Sie stellt oftmals die einzige Möglichkeit dar, um kleine Mengen des Zielmoleküls zu erhalten, damit es nachfolgend beispielsweise massenspektrometrisch untersucht werden kann. Bei gruppenspezifischen Liganden binden alle ähnlichen Proteine aus einer Klasse an eine Affinitätsmatrix. Ein anschauliches Beispiel hierfür sind die Lektine, also Proteine, die spezifisch an Kohlenhydratbausteine binden.^[70]

In Abbildung 1.7 ist das Verfahren der Affinitätschromatographie schematisch beschrieben; wobei die einzelnen Phasen des Verfahrens in einem Chromatogramm verdeutlicht werden.

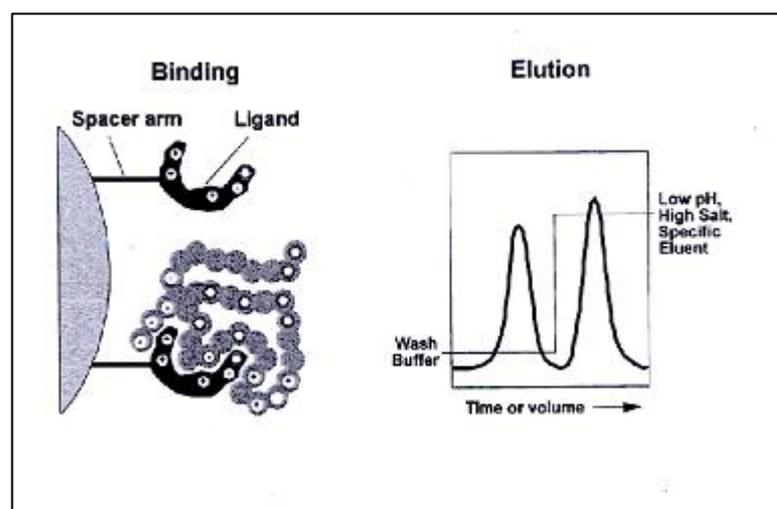
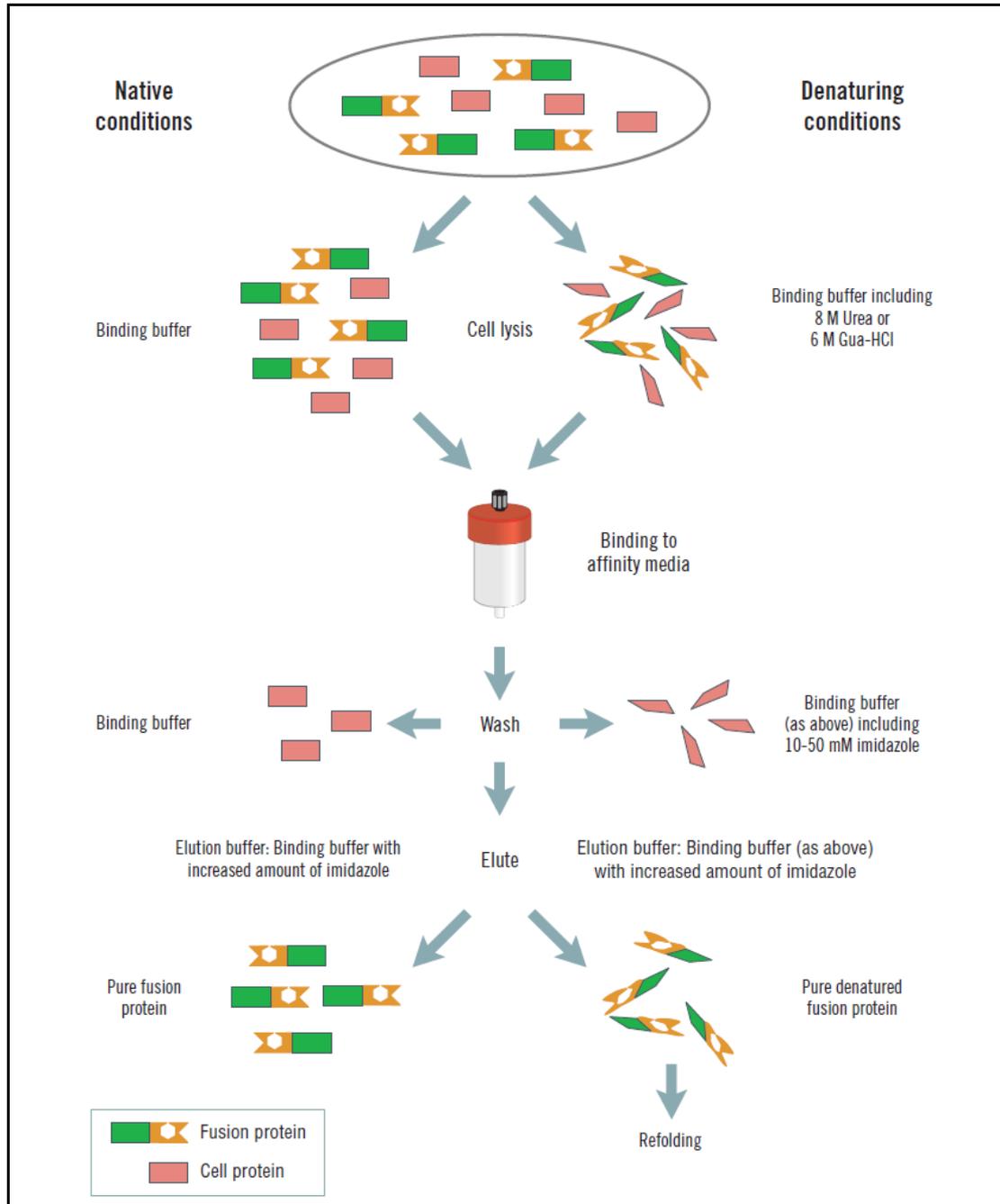


Abb.1.7. Schematische Darstellung des Verfahrens der Affinitätschromatographie. Auf der linken Seite werden Bindungsvorgang und Elution der Analytmoleküle verdeutlicht. Das Chromatogramm rechts zeigt die einzelnen Phasen des Verfahrens.

Das nachfolgende Schema zeigt das Verfahren der Affinitätschromatographie schematisch mit allen notwendigen Arbeitsschritten, ausgehend vom nativen zu reinigenden Protein bis zur Elution des gewünschten markierten Proteins (Schema 1.8).



Schema 1.8. Schematische Darstellung der Affinitätschromatographie mit allen notwendigen Arbeitsschritten.^[71]

Seit den 30er Jahren ist bekannt, dass das Glycoprotein Avidin ein Bestandteil des Eiweißes ist.^[72] In seiner nativen Form liegt es als Tetramer mit einem

Molekulargewicht von $M \sim 68$ kDa vor, dessen 4 identische Untereinheiten je eine Bindestelle für einen Biotin-Rest besitzen.^[152] Die daraus resultierenden extrem starken Wechselwirkungen zwischen Avidin und Biotin rufen seit etwa 20 Jahren ein besonderes Interesse hervor. Die Bindung zwischen Avidin und Biotin wird durch eine Dissoziationskonstante $K_D = 10^{-15}$ M charakterisiert, was einer freien Energie von 21 kcal / mol entspricht. Dies ist ein sehr hoher Wert für eine nicht kovalente Interaktion eines Proteins mit einem so kleinen Molekül wie Biotin.^[73] In Abbildung 1.8 ist der Avidin-Biotin-Komplex schematisch gezeigt.

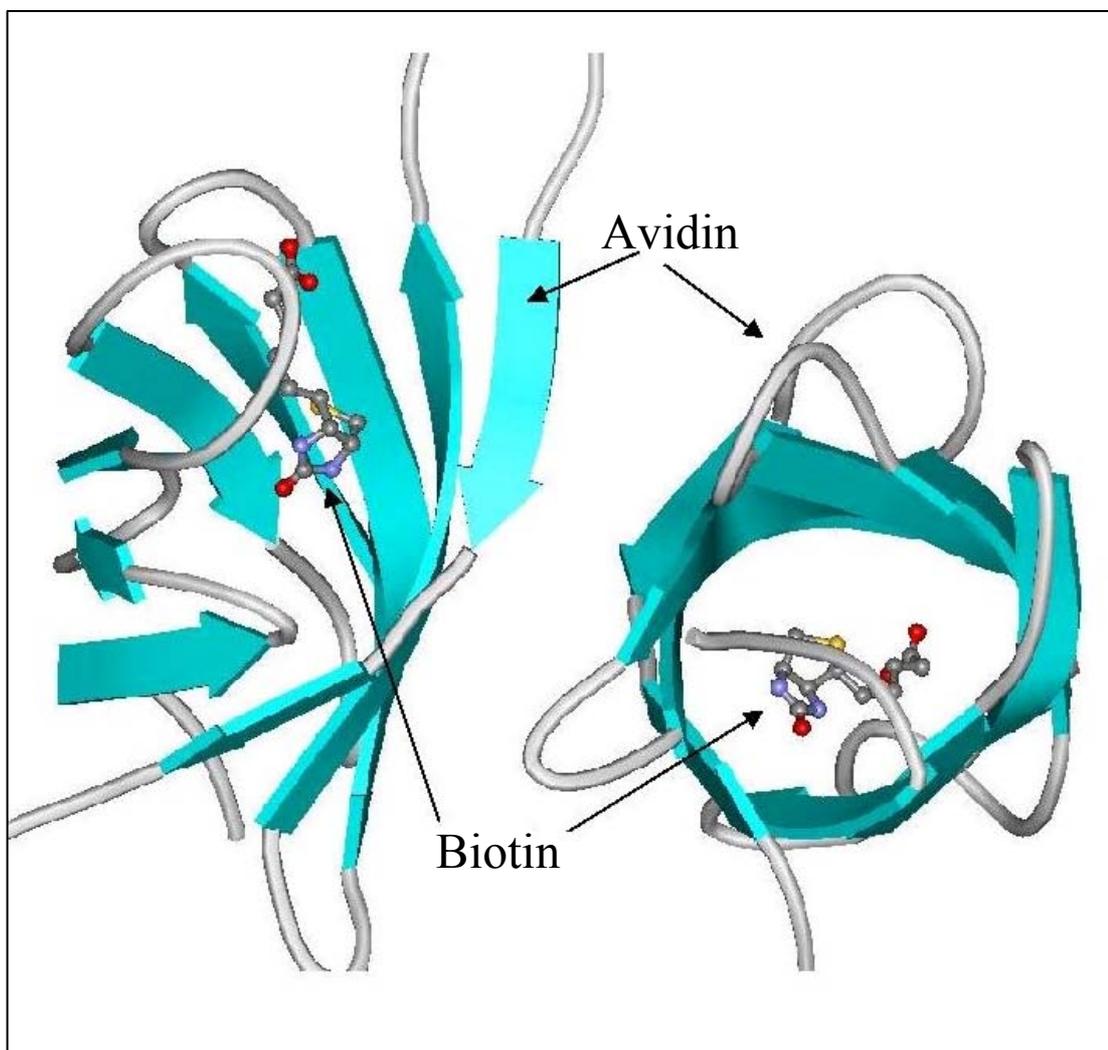


Abb. 1.8. Röntgenkristallstruktur des Avidin-Biotin-Komplexes.^[74]

Das Avidin-Biotin-System zeichnet sich durch eine Reihe von Vorteilen aus, die es zu einem in der naturwissenschaftlichen Forschung häufig verwendeten Bindungspaar machen. So ist zum Beispiel durch die hohe Affinität und Stabilität des

Avidin-Biotin-Komplexes gewährleistet, dass sich die gewünschte kovalente Interaktion der zu untersuchenden Komponenten einstellt. Zudem besitzt das System eine hohe Anwenderbreite, da ein Biotin-Rest an fast alle (Bio-)moleküle angefügt werden kann. Darüber hinaus ist dieses Strukturelement im Vergleich zu anderen Biomarkern (z. B. „6-His-Tag“, Fluoreszenzmarker) relativ klein, was die vollständige Erhaltung der biologischen Aktivität und der physiologischen Eigenschaften des zu untersuchenden Makromoleküls nach dessen Biotinylierung gewährleistet. Aufgrund dieser vorteilhaften Eigenschaften ist das Avidin-Biotin-System besonders zur Reinigung und Isolierung biotinylierter Biomoleküle (Peptide und Proteine) aus komplexen Gemischen mittels Affinitätschromatographie einsetzbar.

1.4 Massenspektrometrie als analytisches Werkzeug

1.4.1 Allgemeine Vorbemerkungen

Mit der Untersuchung kleiner gasförmiger oder flüchtiger Verbindungen begann in den 1950er die Entwicklung der organischen Massenspektrometrie. Letztere ist mittlerweile fest als Standardmethode für die qualitative und quantitative Analytik organischer und bioorganischer Verbindungen etabliert. Über mehrere Jahrzehnte hinweg war die organische Massenspektrometrie beschränkt auf die Analyse niedermolekularer, flüchtiger und damit leicht ionisierbarer Verbindungen anhand von Chemischer Ionisation (CI) oder Elektronenstoß-Ionisation (EI). Die Erschließung neuer Anwendungsfelder war stets verknüpft mit der Entwicklung neuer Ionisierungsverfahren. Mit Felddesorption (FD), Fast Atom Bombardment (FAB), Plasmadesorption (PD) und Thermospray (TS) begann in den 1970ern eine grundsätzliche Veränderung in der Anwendbarkeit der Massenspektrometrie. Es war nun möglich, gasförmige Ionen polarer, nicht flüchtiger Verbindungen ohne vorherige Derivatisierung zu erzeugen. Dabei brachten diese Methoden nicht nur

eine erhebliche Zeitersparnis, sondern legten den Grundstein für die Untersuchung höher molekularer organischer Substanzen und Biomakromolekülen.

Der entscheidende Durchbruch gelang 1988 mit der Entwicklung von MALDI-MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry) durch M. Karas und F. Hillenkamp^[75] sowie 1984 ESI-MS (Electrospray-Ionization Mass Spectrometry) durch J. B. Fenn et al.^[76,77]

Beide Ionisierungsmethoden sind heute aufgrund ihrer hohen Sensitivität für den Bereich der bioorganischen Analyse nicht mehr wegzudenken. John Fenn wurde 2002 für die Entwicklung der ESI-MS-Methode sogar mit dem Nobelpreis geehrt. Zusätzliche technische Fortschritte in den Bereichen Instrumentierung und Datenverarbeitung machten es im Laufe der letzten Jahre möglich, in kurzer Zeit die Molekülmassen großer Biomoleküle mit hoher Genauigkeit zu bestimmen, wobei geringste Probenmengen (im pmol bis fmol-Bereich) ausreichen. Diese außerordentlich hohe Empfindlichkeit erlaubt sowohl die Analyse posttranslationaler Modifikationen von Proteinen und Proteinen, als auch die Sequenzierung von Peptiden. Die Kombination verschiedener MALDI-MS- und ESI-MS-Techniken ermöglicht mittlerweile sogar genaue Untersuchungen nicht-kovalenter Interaktionen zwischen Biorezeptoren und Wirkstoffmolekülen.

1.4.2 Ionisations-Methoden und Arten von Massenspektrometern

Ein Massenspektrometer ist ein Instrument, in dem Ionen produziert und im Vakuum nach ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z) getrennt werden. Obwohl es eine große Anzahl verschiedener Massenspektrometer gibt, die nach unterschiedlichen Prinzipien arbeiten, ist allen gemein, dass sie jedem Ion ein definiertes Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z) zuordnen. Jedes Massenspektrometer besteht grundsätzlich aus drei Komponenten. Dies ist zunächst die Ionenquelle, die aus entsprechenden Analyt-Molekülen in der Gasphase Ionen erzeugt. Die gebildeten Ionen werden im zweiten Teilbereich, dem Massenanalysator nach ihrem Masse/Ladungs-Quotienten (m/z) aufgetrennt und treffen schließlich auf den dritten Bestandteil eines Massenspektrometers, den Detektor. Nach Transformation der Signale in Daten wird im PC-Element das entsprechende Massenspektrum erzeugt.

1.4.2.1 MALDI-MS

Bei der MALDI-Methode werden die Analytmoleküle zunächst mit einem hohen Überschuss an gelöster „Matrixsubstanz“ gemischt, auf einen Probenträger aufgetragen und getrocknet. Beim Trocknen werden die Analytmoleküle in die kristallisierende „Matrix“ eingebaut, was zum Ausbilden einer einheitlichen co-kristallinen Schicht führt.^[78] Als „Matrix“ finden vor allem niedermolekulare aromatische Säuren wie α -Cyano-4-hydroxycimtsäure, 2,5-Dihydroxybenzoesäure oder Sinapinsäure Anwendung (Abb. 1.9).

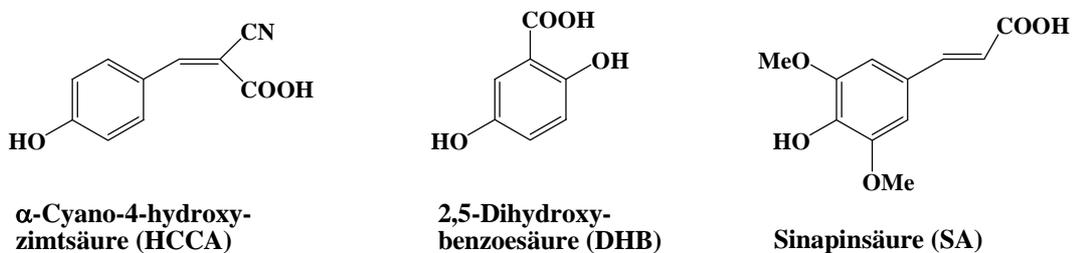


Abb. 1.9: Häufig eingesetzte Matrizes für MALDI-MS.

Der Probenteller wird in die Ionenquelle eingeschleust und die feste Matrix/Analyt-Mischung im Vakuum mit kurzen Pulsen (3-15 ns) eines hochenergetischen (10^6 - 10^7 W/cm²) UV-Lasers ($\lambda = 337$ nm) bestrahlt. Die Wellenlänge der vom Laser ausgesendeten Strahlung befindet sich im Absorptionsbereich der „Matrixsubstanz“, was zur Anregung der co-kristallinen Schicht führt. Schließlich werden durch diese Anregung sowohl Analyt als auch Matrix aus der Schicht herausgeschleudert. Mit dem Herausschleudern werden gleichzeitig Protonen der Matrix-Moleküle auf die Analyt-Moleküle übertragen, wodurch auf schonende Art und Weise im Allgemeinen einfach geladene Ionen des Typs $[M + H]^+$ oder $[M + Na]^+$ gebildet werden (Abb. 1.10).^[79]

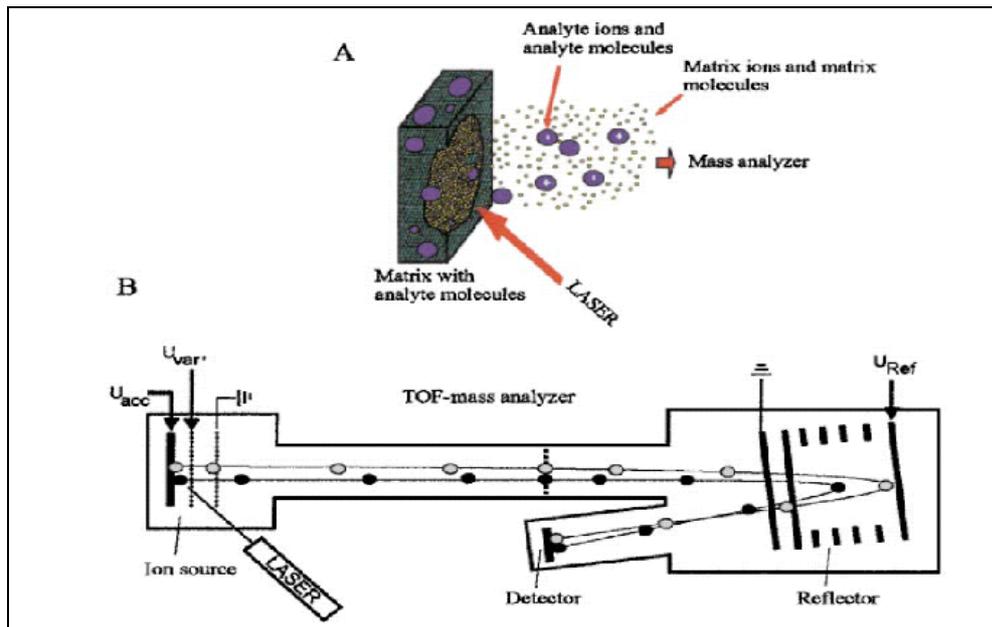


Abb. 1. 10: Mechanismus des Ionisierungsprozesses bei MALDI (A, oben) sowie schematische Darstellung des MALDI-TOF-Gerätes (B, unten).^[79]

In Kombination mit MALDI wird meist ein Flugzeit- oder TOF-Massenanalysator (Time-of-flight) verwendet. Das Prinzip beruht darauf, dass die in der Ionenquelle erzeugten Ionen zunächst durch eine angelegte Spannung beschleunigt werden, so dass sie trotz unterschiedlicher m/z -Werte dieselbe kinetische Energie besitzen. Danach wird ihre Flugzeit im feldfreien Vakuum bestimmt. Dies führt dazu, dass große Ionen länger brauchen, bis sie den Detektor erreichen, als kleine Ionen. Aus der kinetischen Energie resultiert die Flugzeit, die in der Größenordnung von μs liegt und proportional zum m/z -Verhältnis ist. Abbildung 1.10 zeigt den schematischen Aufbau eines solchen MALDI-TOF-Instruments. Die Messungen können entweder im Linear-Modus erfolgen oder im Reflektor-Modus. Im Linear-Modus befindet sich der Detektor am Ende des Flugrohres und die Methode eignet sich vor allem für die MS-Analyse großer Moleküle (Proteine, Nukleinsäuren, etc.) mit Molekulargewichten, die über 10000 Da liegen.^[80] Das Isotopenmuster eines Signales kann daher nicht aufgelöst werden und linear bestimmte Massen werden in der Regel als sog. Durchschnittsmassen (*Average Masses*) angegeben. Im Reflektor-Modus werden die Ionen am Ende des Flugzeitrohres durch eine angelegte „Umkehrspannung“ in ihrer Richtung umgelenkt und gelangen dann auf den

Detektor (Abb. 1.10). Reflektor-TOF-Instrumente erreichen ein Auflösungsvermögen von >10000 ^[76]; das Isotopenmuster eines Signals kann aufgelöst werden, so dass die monoisotopische Masse angegeben werden kann. Diese Methode eignet sich vor allem für kleinere Moleküle (organische Moleküle, Peptide, etc.) des Massenbereiches bis 5000 Da. Ein großer Vorteil von MALDI-TOF-Geräten ist ihre hohe Sensitivität und Massengenauigkeit, weshalb diese Methode bevorzugt zur Massenbestimmung proteolytisch hydrolysierter Proteine im Massenbereich von 700 bis 3500 Da angewendet wird. Über den daraus erhaltenen „Massen-Fingerprint“ der Peptide kann das entsprechende Protein schließlich mit Hilfe von Online-Datenbanken identifiziert werden.

1.4.2.2 Tandem-Massenspektrometrie

Tandem-Massenspektrometrie zählt heute in Verbindung mit entsprechender Datenbank-Recherche zu den wichtigsten Methoden der Sequenzanalyse von Peptiden und Proteinen. Wird beispielsweise ein im MALDI-MS-Experiment gefundenes Peptid weiter fragmentiert und die Massen der daraus resultierenden „Teilstücke“ bestimmt, handelt es sich um Tandem-Massenspektrometrie bzw. MS/MS-Spektrometrie. Für die Tandem-Massenspektrometrie werden unter anderem MALDI-TOF-TOF-Instrumente eingesetzt (Abb. 1.11). Das entsprechende zu fragmentierende Peptid gelangt nach Beschleunigung (meist 20 kV) in der Ionenquelle und anschließendem Passieren des Massenanalysators 1 in eine Kollisionszelle. Hier erfolgt eine Aktivierung durch Stöße mit Gasmolekülen (He, Ar, Xe), wobei die Translationsenergie der Ionen teilweise in Schwingungsenergie umgewandelt wird. Diese zusätzliche Anregung der intramolekularen Schwingungen führt schließlich zu struktursignifikanten Fragmentierungsreaktionen. (engl. „*collision-induced dissociation*“ = CID).^[81] Im Anschluss werden die gebildeten Ionen wieder beschleunigt und die Auftrennung nach der Flugzeit erfolgt schließlich im Flugrohr (Massenanalysator 2) mit Reflektor-Detektor (Abb. 1.9).

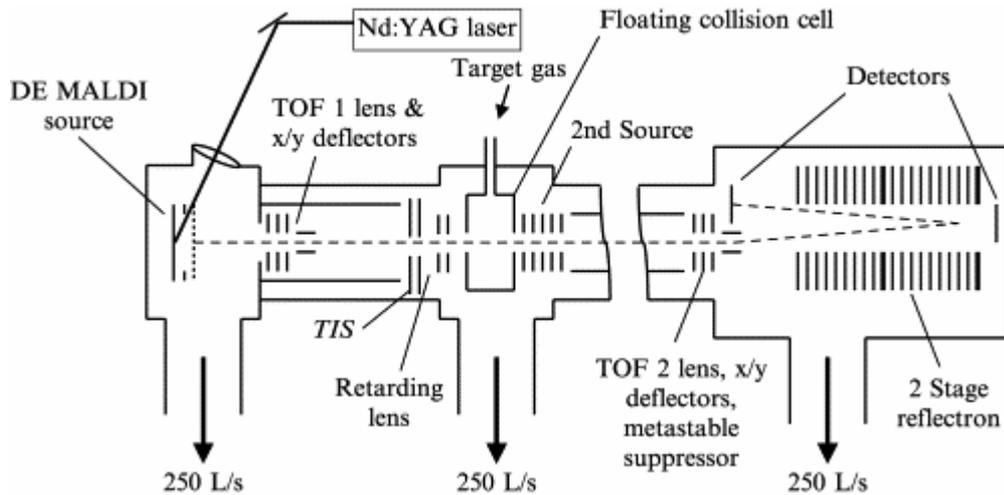


Abb. 1.11: Schematischer Aufbau eines MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometers.^[82]

Diese Methode basiert darauf, dass Peptide hauptsächlich an den Peptidbindungen gespalten werden, so dass die auftretenden Massendifferenzen zwischen einzelnen Fragmenten Aminosäuren entsprechen, die idealerweise anhand ihrer charakteristischen Massen aus dem Spektrum abgelesen werden können (Abb. 1.12). Unter Verwendung der von Biemann entwickelten Nomenklatur können unterschiedliche Fragmente genau bezeichnet werden.^[83] Verbleibt die Ladung beim Bindungsbruch am N-Terminus, handelt es sich um a, b und c-Ionen; verbleibt sie am C-Terminus, handelt es sich um x, y und z-Ionen. Bei einem tryptischen Verdau verbleibt die Ladung bevorzugt am C-Terminus positiv geladener Lys- oder Arg-Reste, daher treten bei MS/MS-Fragmentierungen überwiegend y-Ionen auf.

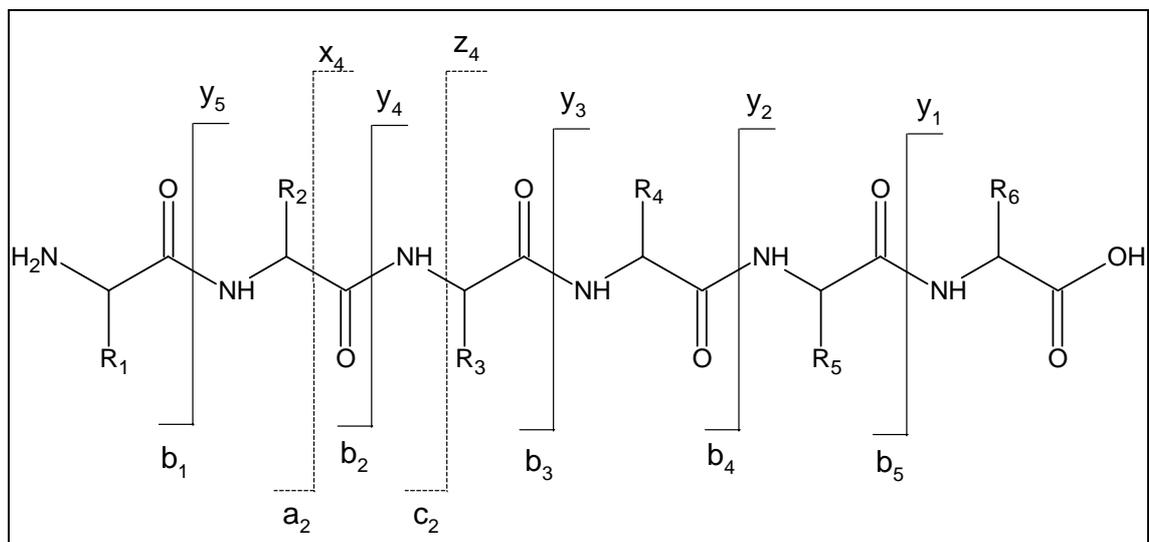


Abb. 1.12: Nomenklatur nach Biemann^[83] für die Fragmentierung des Peptidrückgrates.

Die potenziellen Fragmente sind mit entsprechenden Buchstaben gekennzeichnet.

Aus gut aufgelösten Tandem-Massenspektren läßt sich die Sequenz eines Peptides komplett erhalten. Die Auswertung erfolgt meist mit Hilfe von Online-Datenbanken oder Online-Suchmasken, wobei nicht nur die y-Ionen, sondern auch andere Fragmentationen (z. B. interne Ionen od. Immonium-Ionen) erkennbar sind. Die so gewonnenen Daten erlauben eine exakte Bestimmung der Masse des Peptides. Ferner kann daraus eine Sequenzanalyse erfolgen und es ist zudem auch möglich, posttranslationale Modifikationen an Peptiden experimentell zu bestimmen. Analog dazu können beispielsweise auch photomarkierte Peptide durch MS/MS-Spektrometrie auf den Ort der Markierung hin untersucht werden, da durch entsprechende Vergleichsmessungen mit dem nicht markierten Peptid die entscheidenden Fragmentationen detektiert und bestimmt werden können, die den Marker tragen.

1.4.2.3 ESI-MS

Aufgrund der vielfältigen Anwendungsbreite einer Electrospray-Ionenquelle gilt sie zusammen mit MALDI als wichtigste Ionisationsquelle im Bereich der Bioorganischen Chemie. Neben niedermolekularen organischen Verbindungen und Kohlenhydraten lassen sich auch Biomakromoleküle wie Lipide, Nukleinsäuren und Proteine mit dieser MS-Technik untersuchen, wobei bisher kein Massenlimit existiert. Im Gegensatz zu MALDI liegen die mit ESI-MS zu analysierenden Substanzen in Lösung vor, welche kontinuierlich durch eine Kapillarspitze geleitet und in einem starken elektrostatischen Feld versprüht wird. Das elektrostatische Feld ist direkt zwischen Kapillare und einer nur wenige Millimeter davon entfernten Gegenelektrode lokalisiert. Liegt an der Kapillarspitze eine positive Spannung an, entstehen unter Atmosphärendruck zunächst Tropfen, die an ihrer Oberfläche eine positive Überschussladung tragen (Abb. 1.13).^[84,85] Das Lösungsmittel verdampft, die Tröpfchen schrumpfen und es kommt aufgrund starker Abstoßungskräfte mehrmals hintereinander zu explosionsartigen Zerfällen der einzelnen Tropfen (Coulomb-Explosion), so dass letztendlich nur noch einzelne Analytmoleküle in einer Solvathülle vorliegen. Ist das Lösungsmittel schließlich vollständig verdampft,

bleiben Ionen mit einer hohen Anzahl an Ladungen zurück, wobei die Ladungszahl sich proportional zur Größe des Analytmoleküls verhält.

Eine schonende Ionisierung, besonders wünschenswert für die MS-Analyse empfindlicher Biomakromoleküle, ist gewährleistet, wenn eine stabile Vernebelung ohne elektrische Entladung erzeugt wird. In einer Electrospray-Quelle kann dieser optimale Zustand über eine breite Variation der Lösungsmittelzusammensetzung und über einen weiten Flussbereich aufrechterhalten werden. Bei stabiler Vernebelung fließt zwischen Kapillare und Gegenelektrode ein Strom von 0.1-3 μA .

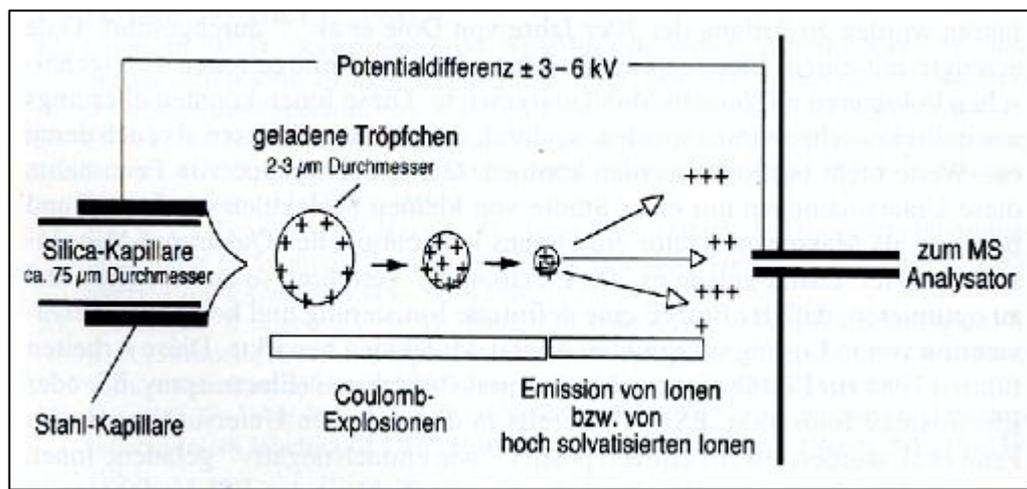


Abb. 1.13: Ionenbildung aus Aerosoltröpfchen bei der Elektrospray-Ionisierung. Die Flussraten liegen bei 5-20 nL pro min.^[86]

Grundsätzlich können als Massenanalysatoren für Ionen aus einer ESI-Ionenquelle alle herkömmlichen Analysatoren verwendet werden. Massenauflösung und Massengenauigkeit sind jedoch hierbei stark vom eingesetzten Gerät abhängig. Bei einem Gerät mit hoher Massenauflösung ist es möglich, die Ladung z eines Ions am Abstand der Isotopenpeaks zu erkennen. Bei einfach geladenen Ionen MH^+ besitzen die einzelnen Isotopenpeaks einen Abstand von 1 Da, während der entsprechende Abstand bei einem 10fach geladenen Ion MH_{10}^{10+} bereits nur noch 1/10 Da beträgt. Diese Methode wird häufig zur Bestimmung Molekularer Massen von Proteinen angewendet.

1.4.2.4 ESI-FT-ICR-MS

Eine weitere massenspektrometrische Analysetechnik stellt die Fourier-Transform-Ionenzyklotron-Resonanz-Massenspektrometrie in Kombination mit der Electrospray-Ionisierung (ESI-FT-ICR-MS) dar.^[87,88]

Folgendes Prinzip liegt dieser Methode zugrunde: Als Massenanalysator befindet sich hinter der ESI-Ionenquelle eine sog. Quadrupol-Ionenfalle, bestehend aus einer Ringelektrode mit zwei Endkappen. An die Ringelektrode ist eine variable Hochfrequenzspannung angelegt, während die beiden Endkappen geerdet sind. Die Ionen treten durch eine Öffnung in der Eintrittskappe in die Ionenfalle ein und zirkulieren auf dreidimensionalen stabilen Bahnen innerhalb des Elektrodenraumes. Ionen unterschiedlicher Masse rotieren dabei mit unterschiedlichen Kreisfrequenzen im angelegten Feld. Bei Einstrahlung eines elektromagnetischen Wechselfeldes mit einer Frequenz, die der Kreisfrequenz einer Ionensorte bestimmter Masse entspricht, nehmen diese Ionen Energie auf. Diese aufgenommene Energie kann in Abhängigkeit der eingestrahlten Frequenz gemessen werden, um daraus im Anschluss das m/z -Verhältnis zu bestimmen. Durch stufenweises Anlegen des Wechselfeldes werden die Ionen nacheinander destabilisiert und aus der Ionenfalle auf den Detektor geschossen. Es besteht auch die Möglichkeit, nur eine ausgewählte Ionensorte mit definierter Masse auf ihrer Bahn stabil zu halten. Diese „eingefangenen“ Ionen können dann durch Stöße mit Gasmolekülen (He, Ar, Xe) in einer sog. Kollisionskammer zur Fragmentierung angeregt werden. Abbildung 1.14 zeigt den schematischen Aufbau eines FT-ICR-Massenspektrometers.

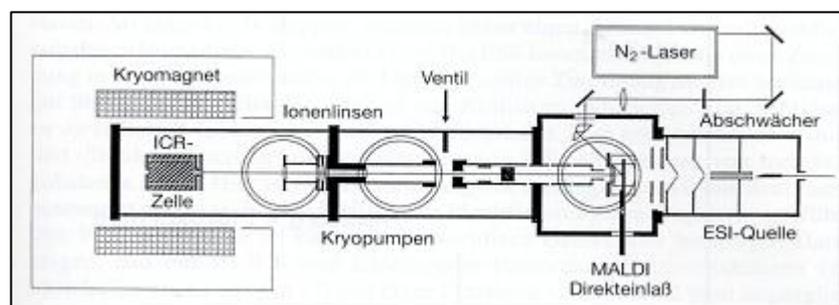


Abb.1. 14: Schematischer Aufbau des Analysatorsteiles eines FT-ICR-MS- Gerätes, das mit einer ESI-Ionenquelle und einer Laser-Desorptionsquelle ausgestattet ist (Fa. Bruker-Franzen, Bremen).

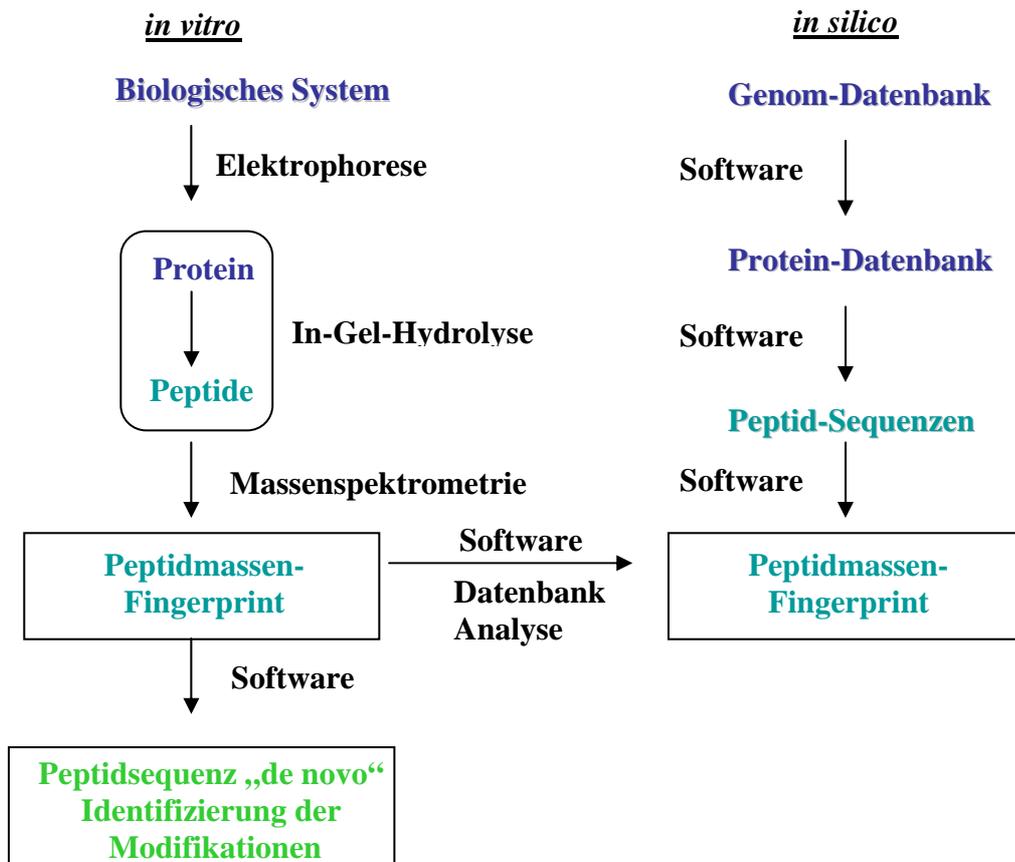
Durch die extrem hohe Auflösung, die bei der ESI-FT-ICR-Massenspektrometrie erreicht werden kann, eignet sich diese Methode besonders zur Identifizierung modifizierter Peptide, die beispielsweise eine Phosphatester-, eine Kohlenhydrat-, eine Alkylgruppe tragen oder mit einem photolytisch eingeführten Rest markiert sind.

1.4.3 Proteolytische Hydrolyse von Proteinen und MS-Analyse

Die proteolytische In-Gel-Hydrolyse von Proteinen wird häufig als Probenvorbereitung für deren massenspektrometrische Analyse angewendet. Nach Auftrennung der zu untersuchenden Proteine im SDS-Polyacrylamidgel werden entsprechende Banden aus dem Gel ausgeschnitten und einer enzymatischen Spaltung unterzogen. Die Methode wurde 1992 von Rosenfeld et al. etabliert^[89], wobei die grundlegenden Komponenten neben einigen Verbesserungen zur Steigerung der Peptidausbeute und Qualität entwickelt wurden. Im Wesentlichen werden bei der Probenvorbereitung nach der Elektrophorese folgende Arbeitsschritte durchlaufen, um die entsprechenden Proteine zu untersuchen (Kapitel 6.7.2). Die nach der Auftrennung der Proteine im Gel angeordneten, angefärbten Banden werden aus dem Gel ausgeschnitten und entfärbt. Wenn nötig, werden nach dem Entfärbungsschritt die in den Proteinen enthaltenen Cystein-Seitenketten in einem Reduzierungs-/Alkylierungsschritt modifiziert, damit die Disulfidbrücken der entsprechenden Proteine irreversibel getrennt werden und somit eine optimale Entfaltung gewährleistet ist. Anschließend erfolgt die proteolytische Hydrolyse im Gel, wobei die Proteine enzymatisch, meist mit Trypsin in Peptide gespalten werden, die aus dem Gel extrahiert werden können. Für die nachfolgende massenspektrometrische Untersuchung erfolgt häufig entweder ein Entsalzungs- und Anreicherungs-Schritt oder die chromatographische Auftrennung der Peptide mittels RP-Chromatographie.^[90]

Die letztendliche Identifizierung eines Proteins bzw. die Analyse von Protein-Modifikationen, wie beispielsweise posttranslationale Modifikationen oder photochemisch induzierte Markierungen, erfolgt durch das Zusammenwirken zweier Abläufe. Für die Auswertung des *in vitro*-Experimentes ist ein Vergleich mit einer

sog. *in silico*-Hydrolyse erforderlich. Letztere entspricht einer Computer-Simulation der enzymatischen Spaltung, basierend auf Genom- und Proteom-Datenbanken wie beispielsweise der Online-Suchmaske ProteinProspector. Aus den einzelnen Peptidmassen eines Proteins resultiert ein charakteristisches Muster, das durch den Abgleich mit den Datenbanken eine Identifizierung des Proteins bzw. seiner Modifikation ermöglicht (Peptidmassen-Fingerprint, PMF). Das folgende Schema zeigt das „Zusammenspiel“ des *in vitro*-Experimentes mit dem *in silico*-Verdau.



Schema 1.9. „Zusammenspiel“ von experimenteller In-Gel-Hydrolyse mit theoretischem *in silico* Verdau zur Identifikation von Proteinen und ihren Modifikationen mittels Massenspektrometrie.

Für die proteolytische Spaltung von Proteinen wird in den häufigsten Fällen die Protease Trypsin eingesetzt, welche Peptidbindungen spezifisch am C-terminalen Ende von Arginin und Lysin schneidet. Die Hydrolyserate sinkt, wenn sich unmittelbar benachbart zur Schnittstelle eine saure Aminosäure befindet. Eine Spaltung findet in der Regel nicht statt, wenn auf die Schnittstelle C-terminal die

Aminosäure Prolin folgt.^[91] Daneben finden jedoch auch die Serinprotease Chymotrypsin^[92,93] sowie die Endoproteasen Glu-C^[94,95,96,97], Lys-C^[98,99,100] und Asp-N^[101] Verwendung. Während Chymotrypsin Peptidbindungen C-terminal von Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan spaltet, schneiden die Endoproteasen jeweils nur spezifisch an einer Aminosäure. Abhängig von der Verteilung der Schnittstellen ist die komplette Sequenzabdeckung eines Proteins mit nur einer Protease meist nicht möglich. In diesem Fall kann das Zielprotein in verschiedenen Ansätzen mit unterschiedlichen Proteasen hydrolytisch gespalten werden, wodurch oftmals sich überlappende Peptide resultieren, die zusammengesetzt einen hohen Anteil der Gesamtsequenz des Proteins, im Optimalfall sogar 100 %, abdecken.^[102,103]

2 Fragestellungen und Zielsetzungen dieser Arbeit

Im Bereich der pharmakologischen Forschung gewinnt die Untersuchung von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen zunehmend an Bedeutung. Zur Aufklärung des Ligandbindeverhaltens biologischer Rezeptoren werden häufig Kristallstrukturen herangezogen, die einen komplexierten Liganden in der Bindetasche des entsprechenden Rezeptor-Proteins aufweisen. Ein Nachteil der Kristallstrukturen besteht darin, dass sie lediglich eine einzige mögliche Konformation des betreffenden Protein-Ligand-Komplexes zeigen. Hieraus ergibt sich nun die Frage, ob die molekularen Interaktionen in den Kristallstrukturen die gleichen sind wie zwischen Ligand und Rezeptor in Lösung. Aus thermodynamischer Sicht muss dies nicht der Fall sein. Um Ligand-Rezeptor-Paare dahingehend noch besser zu verstehen, sollte daher im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Methode etabliert werden, die die Untersuchung der Protein-Ligand-Wechselwirkungen in einem dynamischen System ermöglicht. Hierfür würde sich besonders das in Lösung durchgeführte Verfahren der Photoaffinitätsmarkierung anbieten.

Ein gut charakterisiertes Rezeptor-Ligand-System ist die Erkennung von α -D-Mannosiden durch das bakterielle Lektin FimH. Der FimH-Mannosid-Komplex vermittelt auf molekularer Ebene die Kolonisierung der Oberflächen eukaryontischer Zellen mit pathogenen *E. coli*-Bakterien. Aus den drei bereits veröffentlichten Kristallstrukturen des Adhäsins FimH^[47,48,52] geht hervor, dass an dessen Spitze eine Kohlenhydrat-erkennende Domäne (engl. *carbohydrate recognition domain* = CRD) in Form einer tiefen Bindetasche existiert, die für α -D-Mannose in seiner pyranoiden Form ausgelegt ist. Die Verwendung photoaktiver Mannose-Derivate könnte dazu beitragen, die Wechselwirkungen von FimH mit Kohlenhydraten noch genauer zu verstehen. In der Arbeitsgruppe Lindhorst wurde eine erste Dissertation zum Thema 2004 abgeschlossen, die sich mit Synthesen einer Reihe Mannose-basierender Liganden für das Lektin FimH befasste, die alle mit einer Diazirin-Funktion als Photophor ausgestattet sind.^[56] Es zeigte jedoch keine dieser Verbindungen die gewünschte Funktion im Hinblick auf die Markierung des FimH-Proteins, so dass hier keine weiteren Fortschritte für das Verständnis der Zucker-FimH-

Wechselwirkungen erreicht werden konnten. Ziel der vorliegenden Arbeit sollte es sein, die Methode der Photoaffinitätsmarkierung mit geeigneteren photoaktiven Liganden für das FimH-Protein zu etablieren und anzuwenden. Hierzu war es zunächst erforderlich, eine Reihe mannosidischer Liganden, die photoaktivierbare Gruppen am anomeren Zentrum tragen, zu „designen“ und zu synthetisieren. Da bisher nicht geklärt wurde, welches Photophor für das vorliegende Problem am besten geeignet ist, wurden die drei literaturbekanntesten photoaktiven Funktionalitäten Diazirin, Arylazid und Benzophenon verwendet. Im nächsten Schritt galt es, die synthetisierten, neuen Verbindungen auf ihre photolytischen Eigenschaften hin zu untersuchen. Hierbei waren zunächst deren Reaktionsverhalten und Handhabbarkeit in verschiedenen Solventien zu prüfen. Im Anschluss daran waren, abgestimmt auf die Sequenz der CRD von FimH anhand ausgewählter Aminosäuren und Peptide die Reaktivität und Selektivität der synthetisierten photoaktiven Mannoside zu evaluieren. Gleichzeitig sollten geeignete Methoden zur Analyse gebildeter Insertionsaddukte etabliert werden. Wünschenswert war hierbei, eine Auswahl des am besten geeigneten Photophors für den erfolgreichen Einsatz zur Markierung des bakteriellen Lektins FimH zu treffen. Der letzte Schritt bestand darin, die synthetisierten photoaktiven Mannoside auf ihr Potenzial, das Protein FimH mittels Photoinduktion zu markieren, zu testen.

Von großem Vorteil ist hierbei die Tatsache, dass die gesamte Prozedur in Lösung stattfindet. Damit ist sowohl jede vom Protein eingenommene Konformation, als auch jede für die Adhäsion entscheidende Interaktion zwischen Ligand und Protein berücksichtigt.

3 Synthese photoaktiver α -D-Mannoside und Mannosylpeptide

In diesem Kapitel soll über die Synthesen photoaktiver α -D-Mannoside bzw. photoaktiver Mannosylpeptide berichtet werden, die als potenzielle Liganden für das Mannose-spezifische Adhäsion FimH fungieren sollen. Darüber hinaus wurden die synthetisierten Photomarker auch zur photoinduzierten Markierung weiterer Proteine, wie zum Beispiel dem Protein-Komplex FimCH und dem Mannose-spezifischen Lektin Concanavalin A eingesetzt.

Zunächst sind einige Überlegungen zum Design der Verbindungen beschrieben, bevor die einzelnen Reaktionsstufen schließlich im Detail erläutert werden.

3.1 Entwicklung und Synthese monofunktionaler photoaktiver α -D-Mannoside

3.1.1 Allgemeines

Als Basis für die strukturelle Entwicklung photoaktiver α -D-Mannosid-Derivate als potenzielle Liganden für das bakterielle Adhäsion FimH dienten sowohl die 2002 von Hung et al.^[48] publizierte Kristallstruktur des FimH-Mannose-Komplexes (s. Kapitel 1.1.2.4) als auch die erst kürzlich von Knight et al. veröffentlichte Kristallstruktur des FimH-Proteins mit Butylmannosid als Ligand.^[52] In Kapitel 1.1.2.4 wurde bereits genau erläutert, dass sich beide Strukturen in der räumlichen Anordnung der beiden Thyrosin-Reste Tyr 137 und Tyr 148, die das sog. Tyrosin-Tor am Rande der postulierten *Carbohydrate Recognition Domain* (CRD) aufspannen, unterscheiden. Für die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit, die unter anderem das Design photoaktiver Mannoside beinhaltet, war diese räumliche Abweichung jedoch nicht essentiell. Bei der Photoaffinitätsmarkierung von Proteinen liegen diese immer in

gelöster Form vor, wobei ein dynamisches Gleichgewicht zwischen allen eingenommenen Konformeren vorliegt. Die räumliche Anordnung der Protein-Struktur um die CRD herum ist hierbei also nicht starr, sondern verändert sich ständig. Demnach war für das Ligand-Design nicht die Peripherie des aktiven Zentrums entscheidend, sondern vielmehr die räumliche Fixierung des Mannopyranosyl-Derivates in der Bindetasche des Proteins.

Aus den in Kapitel 1.1.2.4 enthaltenen Ausführungen geht hervor, dass die CRD exakt auf die Komplexierung einer α -D-Mannosyl-Einheit ausgelegt ist, wobei lediglich die OH-Gruppe an C-1 nicht an stabilisierenden Wechselwirkungen beteiligt ist, sondern aus der Bindetasche herausragt. Für den strukturellen Aufbau der photoaktiven Liganden ergab sich daher die grundlegende Idee, die photoaktiven funktionellen Gruppen an C-1-Position einzuführen. Die einzelnen Synthese-Sequenzen sollten hierbei so aufgebaut sein, dass die Verknüpfung entweder direkt über eine Glycosylierungsreaktion erreicht wurde oder das photolabile Element über einen als „Verlängerung“ eingebauten Linker an die Mannose-Einheit gebunden wurde. Anhand dieser Modifizierungen wurde sichergestellt, dass hierbei keine direkten Änderungen an der Struktur des Liganden erfolgten, was zum Verlust der Bindungsaffinität zum FimH-Protein führen könnte. Durch unterschiedliche Linker-Moleküle kann eine zusätzliche Variabilität im Abstand der photoaktiven funktionellen Gruppe zur Mannose-Einheit erreicht werden. Die photoaktive funktionelle Gruppe ist somit außerhalb der CRD angeordnet und kann durch Bestrahlung mit UV-Licht kovalent an das Protein binden, wodurch der Ligand in der Bindetasche fixiert wird und die anschließende Untersuchung des Protein-Ligand-Komplexes erleichtert wird.

In den folgenden Kapiteln werden die ausgearbeiteten und durchgeführten Synthesen unter Berücksichtigung dieser strukturellen Aspekte im Einzelnen beschrieben und erläutert.

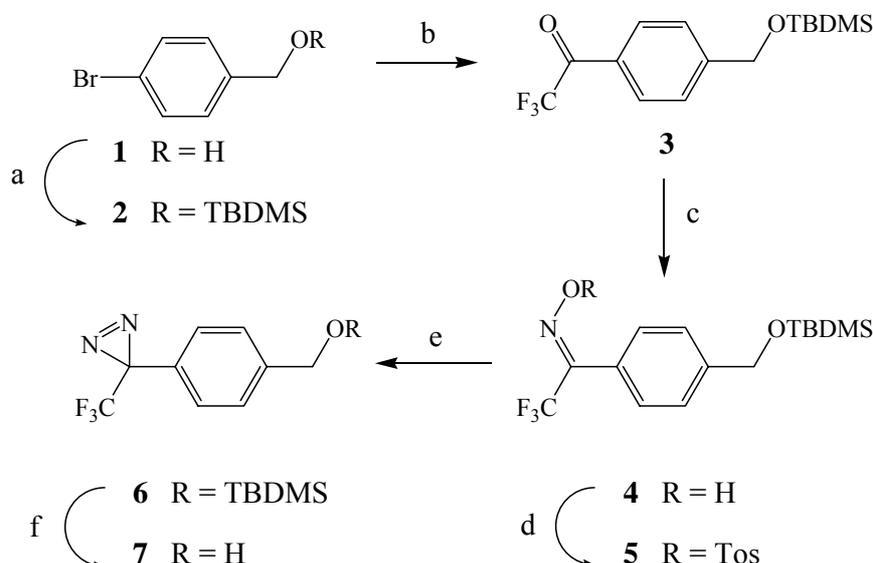
3.1.2 Synthese der Hydroxy-funktionalisierten photoaktiven Bausteine 7 und 9

Zunächst wurden Hydroxy-funktionalisierte Photoaffinitätsmarker hergestellt, die nachfolgend mannosyliert wurden. Die aus dieser Synthese-Sequenz resultierenden

Mannoside können als photoaktive Liganden für das bakterielle Adhäsin FimH Anwendung finden.

Das erste photoaktive Struktur-Element, mit der das „Basismolekül“ α -D-Mannose verknüpft werden sollte, war der dreigliedrige Diazirin-Ring. Eine Grundvoraussetzung für die zu synthetisierende Diazirin-Struktur bestand darin, dass sie keine α -H-Atome enthalten durfte, denn diese führen bei nachfolgender Photoaktivierung zu unerwünschten Nebenreaktionen^[104] (siehe Kapitel 1.2.2). Um dieses grundlegende Problem zu umgehen, wurde das 1993 von Brunner et al.^[105] erstmals synthetisierte 3-Trifluoromethyl-3-phenyldiazirin^[57,106,107,108,109] als geeigneter photolabiler Baustein gewählt. Für die passende Funktionalisierung wurde *p*-Bromobenzylalkohol (**1**) als Ausgangsmaterial verwendet, dessen freie Hydroxy-Gruppe in einem ersten Reaktionsschritt unter Standard-Bedingungen mit TBDMSCl geschützt wurde, so dass Verbindung **2** resultierte (Schema 3.2).^[110] Der Silyl-geschützte *p*-Bromobenzylalkohol **2** wurde im nächsten Reaktionsschritt bei -30 °C zunächst unter Argon-Atmosphäre mit *n*-BuLi dehalogeniert und *in situ* mit frisch bereitetem *N*-Trifluoroacetylpiperidin^[111] zum entsprechenden Trifluoracetat **3** umgesetzt. Die so generierte Carbonylverbindung **3** diente als Ausgangsmaterial für die Synthese des gewünschten lichtempfindlichen Diazirins. Im Allgemeinen gelingt dies durch direktes Umsetzen der Carbonyl-Komponente in das entsprechende sehr instabile Diaziridin, welches im Anschluß zum Diazirin oxidiert wird.^[112] Im Falle der hier vorliegenden Carbonylverbindung **3** war eine analoge Umsetzung aufgrund der stereoelektronischen Effekte des direkt benachbarten aromatischen Ring-Systems nicht möglich. Daher musste die Synthese dahingehend modifiziert werden, dass das Keton **3** zunächst unter Verwendung von Hydroxylamin-hydrochlorid in trockenem EtOH unter Argon-Schutzgasatmosphäre in das entsprechende Oxim **4** umgewandelt wurde, welches in einem weiteren Reaktionsschritt mit Tosylchlorid in trockenem DCM unter Argon-Atmosphäre in das aktivierte Tosyloxim **5** überführt wurde. Der Tosylat-Rest fungierte im nächsten Schritt als gute Austrittsgruppe, was den nukleophilen Angriff des Ammoniak-Stickstoff-Atoms erleichterte und somit die Bildung des intermediären instabilen Diaziridins begünstigte, das nicht isoliert wurde, sondern *in situ* durch eine methanolische Iod-Lösung zum Diazirin **6** oxidiert wurde. Nach Entfernen der Silyl-Schutzgruppe mit 10 %iger methanolischer HCl konnte das gewünschte photoaktive Hydroxy-funktionalisierte [*p*-(Hydroxymethyl)phenyl]-(trifluoromethyl)diazirin **7** nach Kieselgel-

Flashchromatographie als reines Produkt mit einer Ausbeute von 77 % isoliert werden.



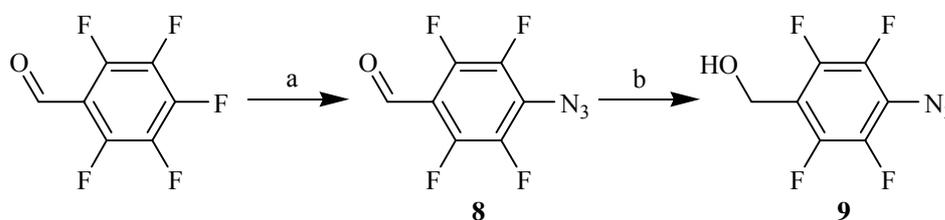
Schema 3.2: a) TBDMS-Cl, Imidazol, trockenes DMF, RT, 87%; b) *n*-BuLi, trockener Diethylether, -30 °C, *N*-Trifluoroacetyl-piperidin, -50 °C, Argon, 89%; c) Hydroxylamin-hydrochlorid, trockenes EtOH, Argon, 60 °C, 60%; d) Tosylchlorid, *N,N*-DMAP, *NEt*₃, trockenes CH₂Cl₂, Argon, 0 °C, RT, 65%; e) NH₃, trockener Diethylether, -60 °C, *NEt*₃, 10% I₂ in MeOH, 0 °C → RT, 55%; f) 10% HCl in trockenem MeOH, RT, 77%.

Eine weitere photoaktive funktionelle Gruppe, die für die Synthese potenzieller photolabiler α -D-Mannoside in Betracht gezogen wurde, ist der Arylazid-Rest, welcher zu den bekanntesten photoaktiven Reagenzien gehört.^[113,114,115] In der Literatur wird berichtet, dass Phenylazide nahezu keine Insertionsprodukte bilden, wenn sie bei Raumtemperatur in unpolaren Kohlenwasserstoffen als Lösungsmittel bestrahlt werden.^[116,117] Vielmehr unterliegen die bei der Photolyse intermediär gebildeten reaktiven Singulett-Nitrene einer schnellen Ringerweiterung, was zur Bildung von entsprechenden Dehydroazepinen führt (siehe ausführlich Kapitel 1.2.2).^[118,119,120,121]

Werden dahingegen polyfluorierte Phenylazide, wie zum Beispiel Pentafluor-Phenylazide eingesetzt, treten diese unerwünschten Umlagerungsreaktionen aufgrund einer erhöhten Aktivierungs-Energiebarriere in den Hintergrund. Die Fluor-Atome in der Nachbarstellung zur Azidofunktion bewirken eine Verlängerung der Lebensdauer

der gebildeten Singulett-Nitrene, welche dadurch an Stabilität gewinnen und weitaus weniger zur unerwünschten Ringerweiterung führen.^[122,123] Sie können daher leichter von geeigneten Nukleophilen, wie Aminen, Alkoholen und sogar unpolaren Alkanen eingefangen werden, um stabile kovalente Addukte zu bilden.^[116,124,125] Aus diesen Gründen wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Hydroxy-funktionalisiertes Arylazid **9**, ausgehend von Pentafluorobenzaldehyd synthetisiert.

Im ersten Reaktionsschritt wurde das *para*-ständige Fluor-Atom der Ausgangssubstanz Pentafluorobenzaldehyd analog einer regioselektiven nukleophilen aromatischen Substitution mit Natriumazid unter Rückfluß in einem Aceton-Wasser-Gemisch umgesetzt, um *p*-Azido-tetrafluorobenzaldehyd (**8**) zu erhalten, wobei die Ausbeuten hierbei vergleichbar mit den in der Literatur angegebenen Daten ausfielen.^[116,123] In einem weiteren Reaktionsschritt wurde die Aldehyd-Funktion in **8** chemoselektiv unter Verwendung eines Diaminomethyl-Boran-Komplexes in Essigsäure^[126] zum entsprechenden photoaktiven Benzylalkohol **9**^[116,123] reduziert, der nach Reinigung über Kieselgel-Flashchromatographie mit einer Ausbeute von 89 % erhalten werden konnte (Schema 3.4).



Schema 3.4: a) NaN_3 , Aceton-Wasser (1:1), Rückfluß (100 °C), 95%; b) Dimethylamin-Boran-Komplex, AcOH (98%), 55 °C, 89%.

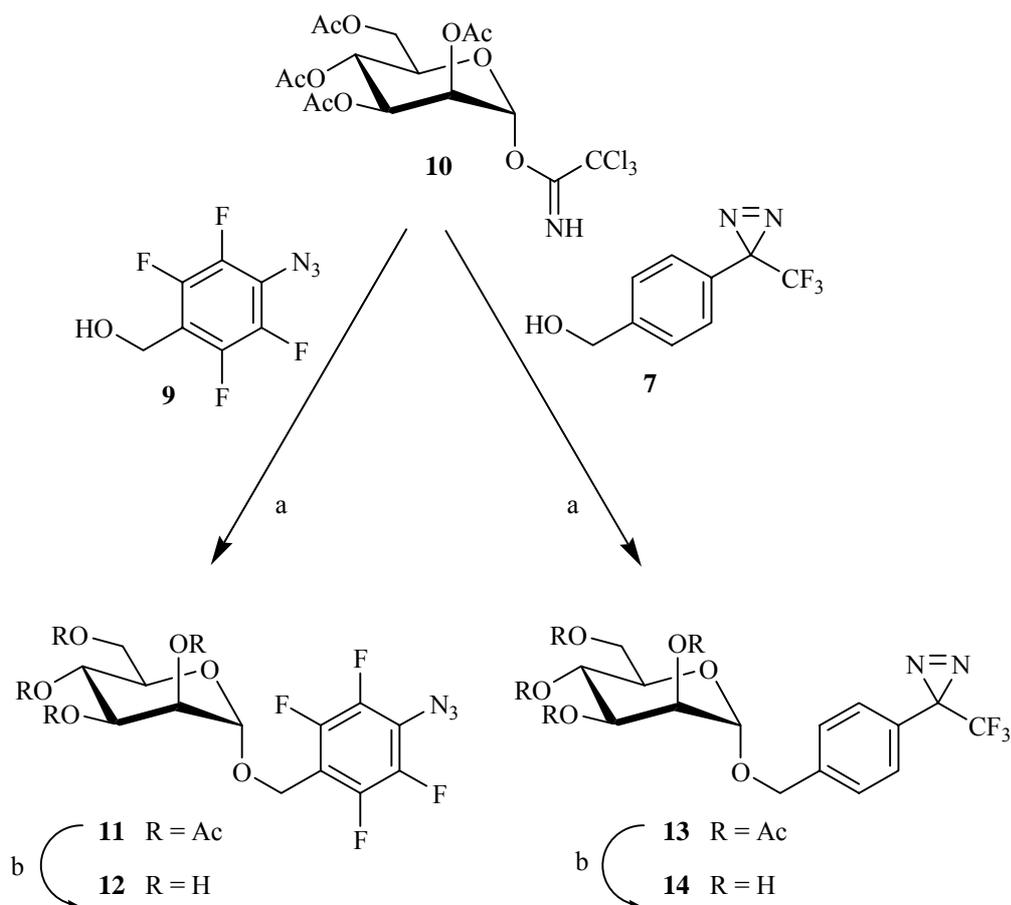
3.1.3 Synthese der photoaktiven α -D-Mannoside **12** und **14**

Durch Verwendung der vorher synthetisierten Hydroxy-funktionalisierten Bausteine **7** und **9** war es nun möglich, α -D-Mannoside mit einer photoaktiven Aglykon-Gruppierung durch Mannosylierung herzustellen. Dies gelang vorzugsweise unter

Verwendung des 1-*O*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-trichloracetimidates (**10**)^[127] mit katalytischen Mengen der Lewis-Säure TMSOTf.^[128] Das Trichloracetimidat kann in drei Stufen aus Mannose erhalten werden.

Der Azido-funktionalisierte Benzylalkohol **9** wurde nach dem beschriebenen „Trichloracetimidat-Verfahren“ mannosyliert^[128], um das gebildete Acetylgeschützte Mannosid **11** nach Reinigung mittels Kieselgel-Flashchromatographie in 69 % Ausbeute zu erhalten. Verbindung **11** wurde direkt im Anschluß nach einer Methode von Zemplén^[129] mit frisch hergestellter methanolischer Natriummethanolat-Lösung in trockenem Methanol unter Argon-Atmosphäre geschützt. Nach der Reinigung des Rohproduktes mittels Flashchromatographie an Reversed-Phase-Kieselgel (RP-Kieselgel) konnte das gewünschte photoaktive Azido-funktionalisierte α -D-Mannosid **12** mit einer Ausbeute von 89 % erhalten werden (Schema 3.5).

Ausgehend von Diazirin **7** erfolgte die analoge Glycosylierungsprozedur, die nach Reinigung des Rohproduktes mittels Kieselgel-Flashchromatographie mit einer Ausbeute von 69 % zum Acetylgeschützten Mannosid **13** führte. Dieses wurde wiederum nach Zemplén geschützt, um nach einem RP-Reinigungsprozess das gewünschte photoaktive Diazirin-tragende α -D-Mannosid **14** mit einer Ausbeute von 88 % zu erhalten. Aufgrund der hohen Photoaktivität der Diazirine war bei der Lagerung und der weiteren Umsetzung des Diazirin-Bausteins **7** sowie aller nachfolgenden Synthese-Stufen und Reinigungsschritte unbedingt darauf zu achten, unter Ausschluss von Tageslicht zu arbeiten, um eine Zersetzung der Substanzen zu verhindern.



Schema 3.5: a) 0.3 eq TMSOTf, trockenes CH_2Cl_2 , Argon, RT, 69% für **11** (56 h), 69% für **13** (5 d); b) 1 M NaOMe in trockenem MeOH, Argon, RT, 89% für **12**, 88% für **14**.

Bedingt durch die herabgesetzten Reaktivitäten der entsprechenden Benzylalkohole **7** und **9** waren für die Mannosylierungsreaktionen, die zu den Verbindungen **11** und **13** führen, modifizierte Reaktionsbedingungen nötig. Durch die elektronenziehenden Substituenten am aromatischen Ring wird in diesen beiden Aglykon-Komponenten die Elektronendichte am Hydroxy-Sauerstoff-Atom erheblich erniedrigt.

Aus diesen Gründen wurden in beiden Fällen zur vollständigen Umsetzung beider Akzeptor-Alkohole **7** und **9** sowohl die Katalysatormenge, als auch Reaktionstemperatur und Reaktionszeit, verglichen mit den Literaturangaben, deutlich erhöht.

3.1.4 Synthese des photoaktiven Benzophenon-tragenden α -D-Mannosids 16

Aus der Literatur ist bekannt, dass Benzophenone als potenzielle photolabile Gruppen eingesetzt werden können. So wurden beispielsweise im Rahmen einer Arbeit von G. D. Prestwich und G. Dormán von 1994 photolabile Benzophenone bereits als Photophore eingesetzt, um Bindestellen und konformelle Eigenschaften von Nukleotiden und Proteinen zu untersuchen.^[135] Zudem zeigen Benzophenone drei grundlegende chemische und biochemische Eigenschaften, die sie von den Arylaziden und Diazirinen abheben:

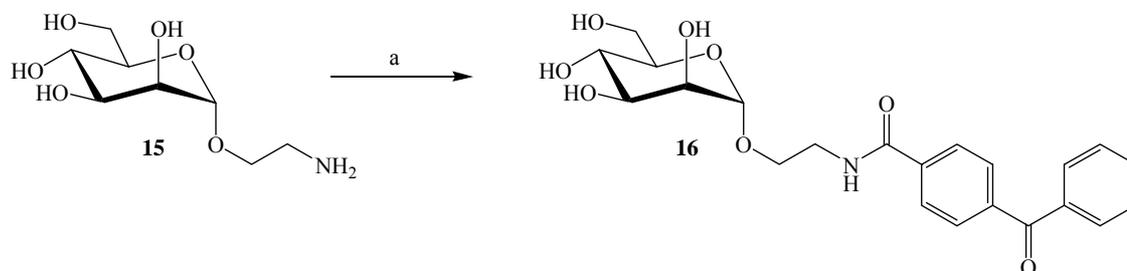
Zunächst einmal besitzen sie eine höhere Stabilität als Arylazide und Diazirine; zusätzlich ist es möglich, mit Benzophenonen unter Einstrahlung von Tageslicht zu arbeiten, ohne dabei eine Zersetzung zu induzieren; die maximale Absorption der Benzophenone liegt bei 350-360 nm und damit außerhalb der Wellenlängen, die eine Zersetzung von Proteinen bewirken können. Als letzte Eigenschaft sei erwähnt, dass Benzophenone bei Bestrahlung bevorzugt in unpolare C-H-Bindungen, die hauptsächlich in den hydrophoben Bereichen der Biomoleküle liegen, insertieren. Diese Adduktbildung findet unabhängig von der Anwesenheit von Wasser oder sterisch anspruchsvollen Nukleophilen statt.

Aufgrund dieser interessanten Eigenschaften vereinigt mit den Parallelen, die sich aus der Prestwich-Dormán-Publikation^[135] auf die hier vorliegende Arbeit ziehen lassen, wurde Benzophenon als drittes photolabiles Strukturelement in die Synthesepanung photoaktiver α -D-Mannoside aufgenommen.

Zur effizienten Einführung des Benzophenon-Struktur-Elementes wurde eine einfache Peptid-Kupplungsreaktion durchgeführt, da hier von kommerziell erhältlicher 4-Benzoylbenzoesäure und einem Amino-funktionalisierten α -D-Mannosid ausgegangen werden konnte. Als geeignet hierfür erwies sich 2'-Aminoethyl- α -D-mannosid (**15**)^[130,131], welches über eine vierstufige Syntheseroute, beginnend mit peracetylierter Mannose, synthetisiert wurde.^[132] Verbindung **15** wurde für eine Reihe weiterer Reaktionen als sogenanntes „Core-Molekül“ eingesetzt.

Die Peptid-Kupplung zwischen 2'-Aminoethyl- α -D-mannosid (**15**) und 4-Benzoylbenzoesäure wurde HATU-vermittelt in trockenem DMF unter Argon-Atmosphäre durchgeführt.^[133] Nach der Reinigung des Rohproduktes mittels

Kieselgel-Flashchromatographie und anschließender präparativer RP-HPLC konnte das gewünschte photoaktive Benzophenon-gekoppelte Mannosid **16** in 52 % Ausbeute erhalten werden (Schema 3.6).



Schema 3.6: a) 4-Benzoylbenzoesäure, HATU, DIPEA, trockenes DMF, Argon, RT, 52%.

3.2 Synthese bifunktioneller photoaktiver α -D-Mannoside

3.2.1 Allgemeines

Grundsätzlich ergeben sich bei „Crosslinking-Reaktionen“ zwischen photoaktiven Verbindungen und entsprechenden Reaktionspartnern komplexe Gemische aus Edukt, nicht markiertem Reaktionspartner, unspezifischen Nebenprodukten sowie photomarkiertem Produkt. Die Komplexität dieser Mischung erschwert die Analyse der Insertionsprodukte erheblich, was im Rahmen dieser Arbeit die Entwicklung einer Methode erforderte, die es erlaubt, das gewünschte Insertionsprodukt entweder anzureichern oder aus dem Gemisch zu isolieren.

Eine Isolierung der entsprechenden Produkte mittels HPLC schied hierbei aus, da die Massendifferenzen und die Moleküleigenschaften zwischen markierten und nicht markierten Biomolekülen dafür zu gering sind. Es kommt somit nicht zu einer gewünschten Trennung ausreichender Auflösung. Als geeigneter Lösungsansatz für diese Problematik bot sich die Erweiterung der photoaktiven α -D-Mannoside auf bifunktionelle Strukturen an, wobei die potenziellen Lektin-Liganden nicht nur mit einer photoaktiven Gruppe, sondern auch mit einem Biotin-Rest ausgestattet werden.

Abbildung 3.1 zeigt das entwickelte allgemeine Modell bifunktionaler photoaktiver α -D-Mannosid-Derivate.

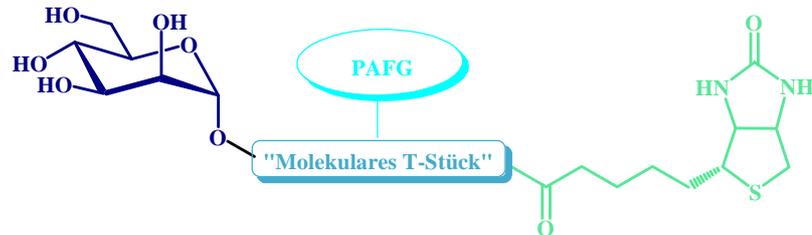
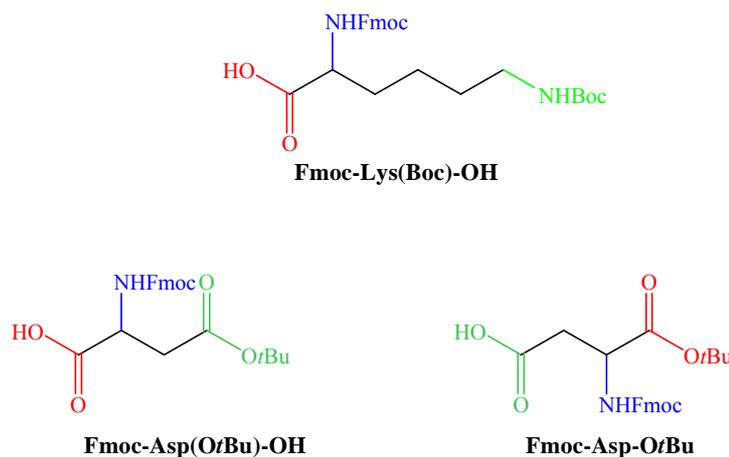


Abb. 3.1: Modell eines bifunktionellen Photoaffinitätsmarkers. Das α -D-Mannosid, die photoaktive funktionelle Gruppe (PAFG) und der Biotin-Rest sind über einen trifunktionellen Spacer („molekulares T-Stück“) miteinander verbunden.

Aufgrund dieser wirkungsvollen Eigenschaften wurde der Biotin-Rest im Rahmen dieser Arbeit zur Erweiterung und Verbesserung der Eigenschaften photoaktiver α -D-Mannoside zur Aufklärung des Kohlenhydrat-Bindevhaltens Mannose-spezifischer Lektine gewählt. Eine Reihe durchgeführter Synthesen zur Herstellung bifunktionaler biotinylierter und photoaktiver α -D-Mannoside sind im weiteren Verlauf dieses Kapitels detailliert beschrieben.

Um sowohl die Einführung der photoaktiven funktionellen Gruppe, sowie die Konjugation der Biotin-Einheit mit der Basis-Struktur zu ermöglichen, war die Verwendung geeigneter Linker erforderlich. Da das Linker-Molekül gleichzeitig über drei funktionelle Gruppen verfügen musste, um den Aufbau photoaktiver bifunktionaler Mannoside zu erlauben, die Synthesen der Zielverbindungen jedoch so effektiv wie möglich ausfallen sollten, fiel die Wahl auf die kommerziell erhältlichen orthogonal geschützten trifunktionellen Aminosäuren Lysin und Asparaginsäure (Schema 3.7).

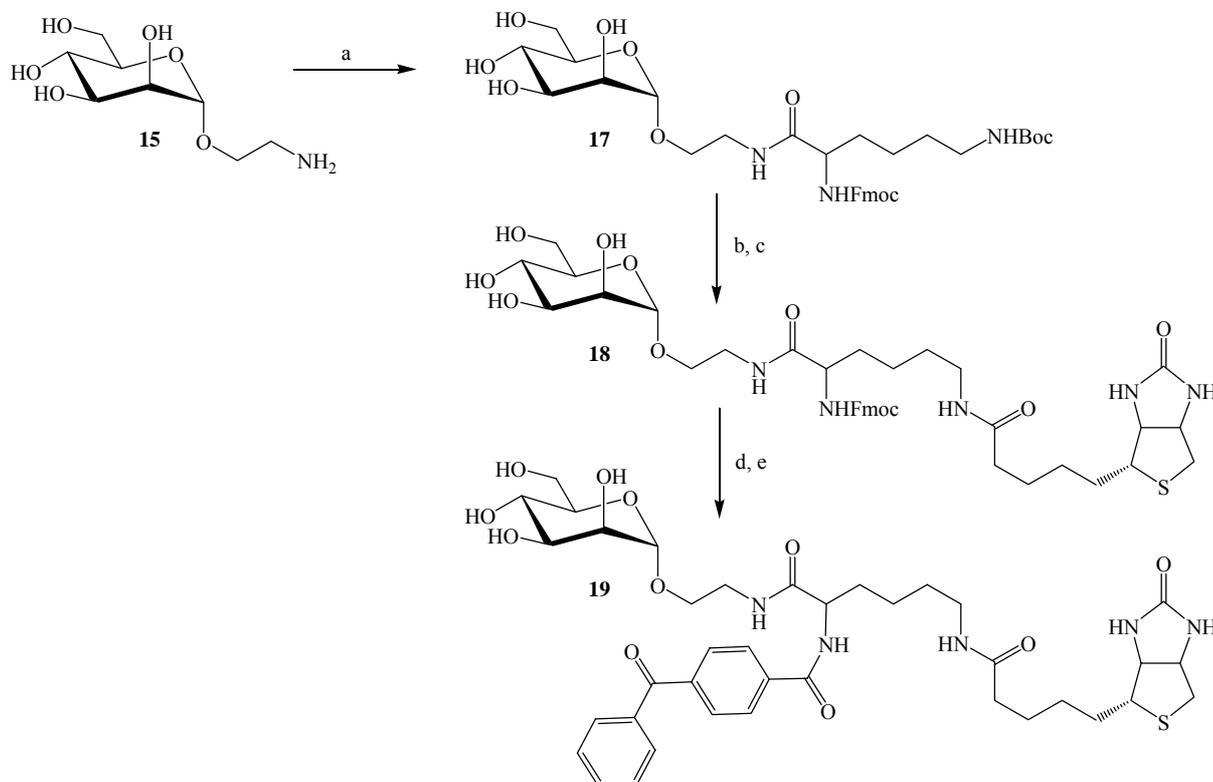


Schema 3.7: Orthogonal geschützte trifunktionelle Aminosäuren, eingesetzt als Linker-Strukturen zur Synthese bifunktioneller Photomarker.

3.2.2 Synthese des biotinylierten Benzophenon-tragenden α -D-Mannosylpeptides **19**

Als Ausgangsverbindung für diese Synthese-Route diente wieder 2'-Aminoethyl- α -D-mannosid (**15**). Dieses wurde zunächst über eine Peptid-Kupplung mit der orthogonal geschützten Aminosäure-Komponente Fmoc-Lys(Boc)-OH zu dem entsprechenden bifunktionellen Glycopeptid **17** umgesetzt, welches zwei orthogonale Schutzgruppen in der Aglykon-Region trägt (Schema 3.8). Für die Reaktion wurden HATU und DIPEA unter Standard-Bedingungen eingesetzt.^[52] Das geschützte Diamin **17** diente als Ausgangsmaterial sowohl für die Einführung des Biotin-Strukturelementes, als auch für die Kupplung mit der photoaktiven funktionellen Gruppe. Die Entfernung der *N*-tert-Butyloxycarbonyl(Boc)-Schutzgruppe erfolgte *in situ* unter Verwendung von 80 % wässr. TFA bei RT. Das hierbei gebildete freie Amin wurde sofort mittels HATU und DIPEA in trockenem DMF unter Argon-Atmosphäre mit (+)-Biotin zum Peptid umgesetzt. Nach Reinigung des Rohproduktes mittels Kieselgel-Flashchromatographie konnte das biotinylierte Glycopeptid **18** in 69 % Ausbeute erhalten werden (Schema 3.8). Im folgenden Reaktionsschritt wurde die α -Aminofunktion des Lysin-Linkers mit 20 % Piperidin in DMF bei RT entschützt und das hieraus gewonnene freie Amin sofort anhand einer weiteren HATU/DIPEA-vermittelten Peptid-Kupplungsreaktion mit 4-Benzoylbenzoesäure umgesetzt. Das gebildete Rohprodukt wurde mittels zweier

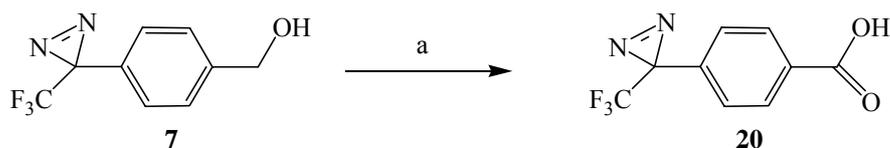
aufeinander folgenden Kieselgel-Flashchromatographien gereinigt, um das gewünschte photoaktive biotinylierte α -D-Mannosylpeptid **19** in 40 % Gesamtausbeute zu erhalten.



Schema 3.8: a) Boc-Lys-Fmoc-OH, HATU, DIPEA, trockenes DMF, Argon, RT, 87% (Rohprodukt);
 b) 80% aq. TFA, RT; c) (+)-Biotin, HATU, DIPEA, trockenes DMF, Argon, RT, 69%
 (zwei Stufen); d) 20% Piperidin, DMF; e) 4-Benzoylbenzoesäure, HATU, DIPEA,
 trockenes DMF, Argon, RT, 40% ausgehend von **15**.

3.2.3 Synthese der Diazirin-Carbonsäure **20**

Zur Vereinfachung der nachfolgenden Synthese-Routen war es notwendig, ein weiteres Struktur-Element herzustellen. Hierzu wurde das zur Synthese des monofunktionellen Mannosids **14** synthetisierte Diazirin-tragende Benzylalkohol-Derivat **7** dahingehend modifiziert, dass die alkoholische Hydroxy-Funktion durch Zugabe von KMnO_4 unter basischen Bedingungen zur entsprechenden Carbonsäure **20** oxidiert wurde.^[107] Eine weitere Reinigung des Produktes war hierbei nicht mehr notwendig, da eine für die weitere Umsetzung ausreichende Reinheit bereits nach der Synthese erreicht war. Die Diazirin-Carbonsäure **20** konnte mit einer Ausbeute von 88 % hergestellt werden (Schema 3.9).

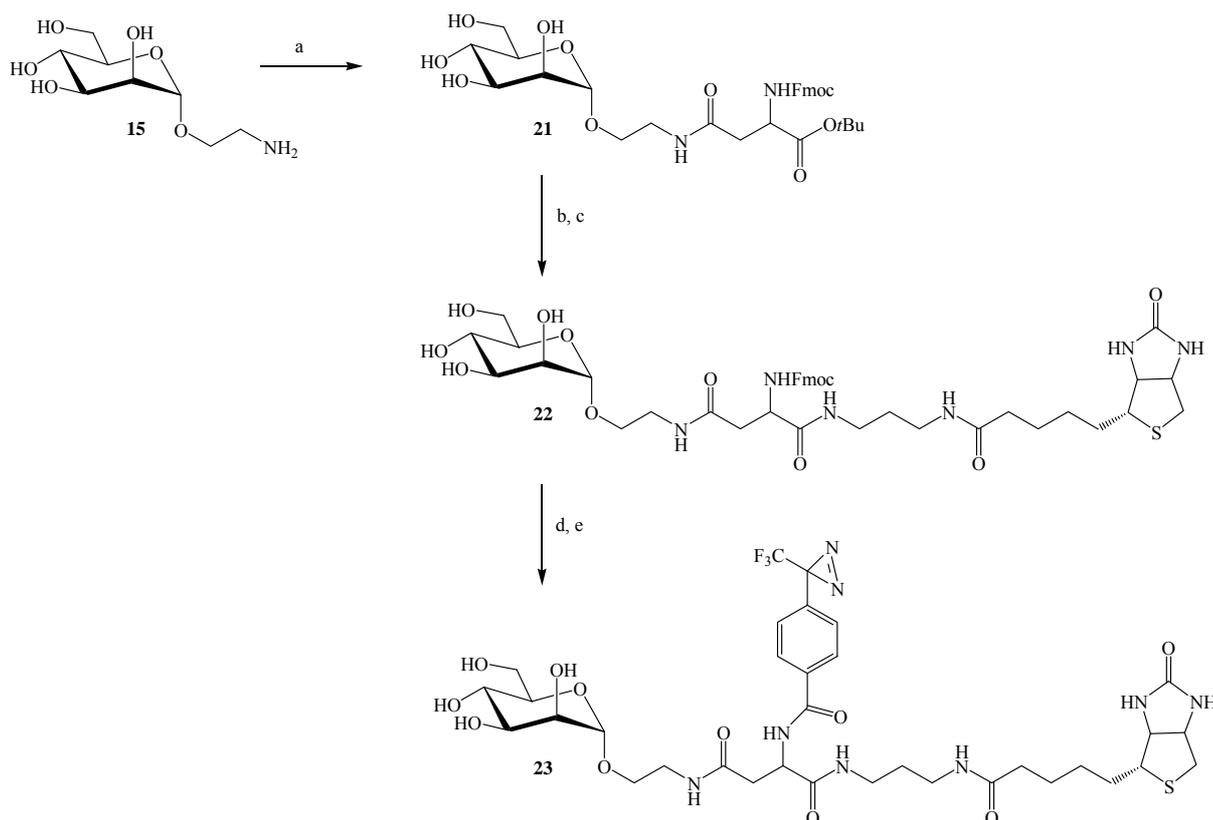


Schema 3.9: a) 1.5 eq $KMnO_4$, 0.1 N KOH, Dioxan, 2 h, RT, 88% Rohprodukt.

3.2.4 Synthese des biotinylierten Diazirin-tragenden α -D-Mannosylpeptides 23

Diese Synthese-Route wurde ausgehend vom allgemeinen „Core-Molekül“ 2'-Aminoethyl- α -D-mannosid (**15**) mit einer HATU/DIPEA-katalysierten Peptid-Kupplung in trockenem DMF unter Argon-Atmosphäre gestartet, wobei ein orthogonal geschütztes Asparaginsäure-Derivat, Fmoc-Asp-OtBu, als Reaktionspartner und gleichzeitig als trifunktionelle Linker-Struktur eingesetzt wurde. Nach der Reinigung des Rohproduktes mittels Kieselgel-Flashchromatographie wurde das orthogonal geschützte bifunktionelle Glycopeptid **21** mit einer Ausbeute von 95 % erhalten (Schema 3.10).

Die im ersten Schritt hergestellte Glycoaminosäure **21** diente als Ausgangssubstanz für die beiden nächsten Reaktionsstufen, um das Biotin-Strukturelement einzuführen; hierzu wurde zunächst der *tert*-Butylester durch Zugabe von 80 % aq. TFA bei RT hydrolysiert und die so gebildete freie Carbonsäure direkt weiter umgesetzt, indem durch eine Peptid-Kupplung unter Standard-Bedingungen die Biotinylamido-propylammonium-Komponente angefügt wurde. Die Reinigung mittels präparativer HPLC über eine RP-Säule lieferte das gewünschte biotinylierte Zwischenprodukt **22** mit einer Ausbeute von 42 %. Die Entschützung der α -Aminofunktion von **22** erfolgte in 20 % Piperidin, wobei das gebildete freie Amin direkt weiter umgesetzt wurde, indem die photoaktive Diazirin-Carbonsäure **20** mittels HATU/DIPEA-katalysierter Peptid-Kupplungsreaktion unter Standard-Bedingungen eingeführt wurde. Nach der Reinigung des Rohproduktes anhand einer Kieselgel-Flashchromatographie konnte das gewünschte bifunktionelle photoaktive Diazirin-tragende α -D-Mannosid **23** mit einer Ausbeute von 64 % erhalten werden (Schema 3.10).



Schema 3.10: a) *Fmoc-Asp-OtBu*, HATU, DIPEA, trockenes DMF, Argon, RT, 95 %; b) 80 % aq.

TFA, RT (Rohprodukt); c) (+)-*Biotinylamidopropylammonium-trifluoroacetat*, HATU,

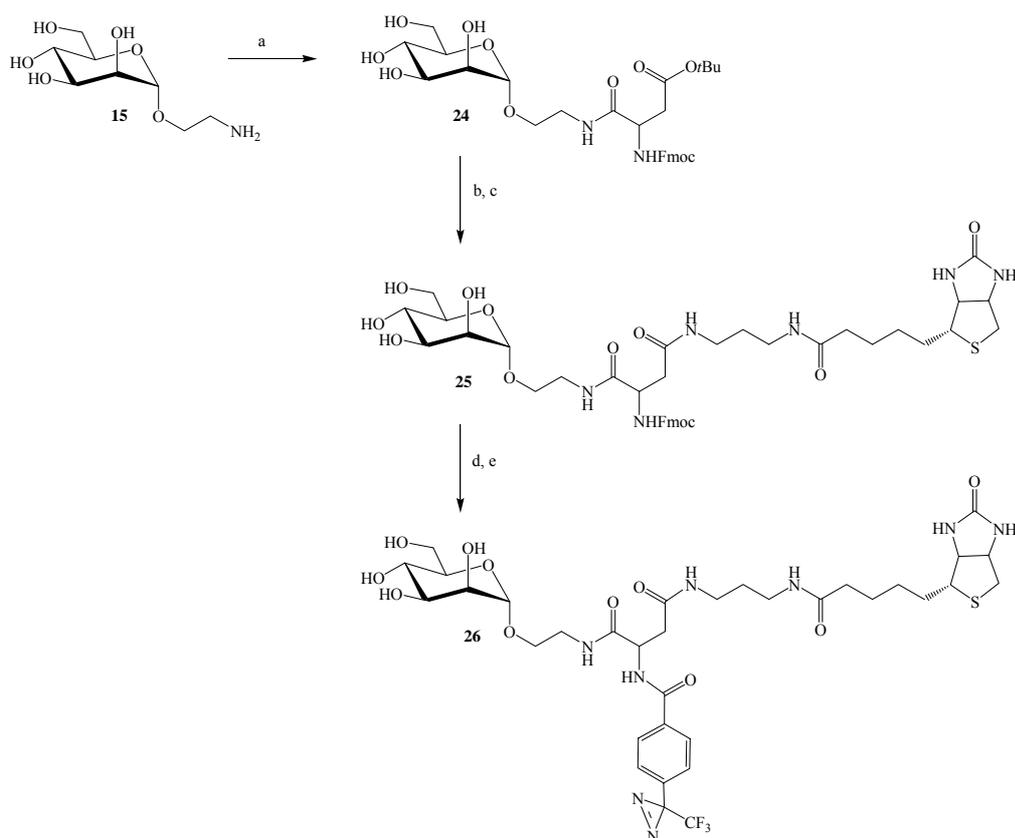
DIPEA, trockenes DMF, Argon, RT, 42 %; d) 20 % *Piperidin*, DMF, RT (Rohprodukt);

e) *Diazirincarbonsäure 20*, HATU, *DIPEA*, trockenes DMF, Argon, RT, 64 %.

3.2.5 Synthese des biotinylierten Diazirin-tragenden α -D-Mannosylpeptides **26**

Ein weiteres biotinyliertes photolabiles α -D-Mannosid **26**, welches ebenfalls Diazirin als photoaktive funktionelle Gruppe trägt, wurde unter Verwendung der orthogonal geschützten Aminosäure *Fmoc-Asp(OtBu)-OH* synthetisiert. Als Ausgangssubstanz wurde wiederum 2'-Aminoethyl- α -D-mannopyranosid (**15**) eingesetzt. Der Syntheseweg erfolgte analog der in 3.2.4 beschriebenen Prozedur. Zunächst wurde mittels einer Peptid-Kupplung unter Standard-Bedingungen der Asparaginsäure-Linker an den Zucker angefügt. Nach Reinigung des Rohproduktes mittels Kieselgel-Flashchromatographie konnte die orthogonal geschützte bifunktionelle Glycoaminosäure **24** mit einer Ausbeute von 89 % erhalten werden (Schema 3.11). Im nächsten Reaktionsschritt wurde der *tert*-Butylester durch Zugabe von 80 % aq. *TFA* bei RT gespalten und die gebildete freie Carbonsäure *in situ* ohne weitere

Reinigung für die folgende Reaktion eingesetzt. In einer Standard-Peptid-Kupplung in trockenem DMF unter Argon-Atmosphäre mit (+)-Biotinylamidopropylammonium-trifluoracetat als Reaktionspartner erfolgte die Bildung des Glycopeptides **25**. Die Reinigung des erhaltenen Rohproduktes mittels präparativer HPLC über einen MeCN/H₂O-Gradienten lieferte das biotinylierte Glycopeptid **25** mit ausreichender Reinheit und einer Ausbeute von 36 %. In der folgenden Reaktionsstufe wurde die 9-Fluorenylmethoxycarbonyl(Fmoc)-Schutzgruppe in 20 % Piperidin in DMF bei RT entfernt und das gebildete instabile freie Amin direkt und ohne weitere Reinigung mit der Diazirin-Carbonsäure **20** umgesetzt. Die HATU/DIPEA-vermittelte Peptid-Kupplung erfolgte bei RT in trockenem DMF unter Argon-Atmosphäre. Das Rohprodukt der Reaktion wurde mittels Kieselgel-Flashchromatographie gereinigt und das gewünschte bifunktionelle, biotinylierte photoaktive α -D-Mannosylpeptid **26** konnte als reines Produkt mit einer Ausbeute von 80 % erhalten werden (Schema 3.11).



Schema 3.11: a) Fmoc-Asp(OtBu)-OH, HATU, DIPEA, trockenes DMF, Argon, RT, 89 %;
 b) 80 % aq. TFA, RT (Rohprodukt); c) (+)-Biotinylamidopropylammonium-trifluoracetat, HATU, DIPEA, trockenes DMF, Argon, RT, 36 %;
 d) 20 % Piperidin, DMF, RT (Rohprodukt); e) Diazirin-Carbonsäure **20**, HATU, DIPEA, trockenes DMF, Argon, RT, 80 %.

Die beiden synthetisierten bifunktionellen Diazirine **23** und **26** unterscheiden sich strukturell durch die Position, an der die photolabile Diazirin-Carbonsäure **20** jeweils an die Moleküle angefügt wurde. In Verbindung **23** ist das Diazirin-tragende Strukturelement um ein C-Atom weiter vom mannosidischen Zuckerring entfernt als in Verbindung **26**; dieser strukturelle Unterscheid könnte sich im Hinblick auf die Interaktionen mit den Proteinen *FimH truncate*, FimCH und ConA auf die Stärke der Ligandbindung auswirken. Die nachfolgend durchgeführten Bestrahlungsexperimente mit anschließenden biochemischen Analysen der gebildeten Insertionsprodukte belegen diese Hypothese (vgl. Ausführungen in den Kapiteln 4.2.7.6 und 4.3).

Im organisch präparativen Teil dieser Arbeit gelang es demnach, sechs unterschiedliche photoaktive α -D-Mannoside als potenzielle Liganden für das bakterielle Lektin FimH zu synthetisieren, die bis dahin noch nicht literaturbekannt waren (Verbindungen **12**, **14**, **16**, **19**, **23** und **26**).^[134] Abhängig von der Syntheseroute war es hierbei möglich, drei unterschiedliche photoaktive funktionelle Strukturelemente, die Diazirin-Gruppierung, eine Azid-Funktion und einen Benzophenon-Rest an die entsprechenden Verbindungen anzufügen. Die drei α -D-Mannoside **12**, **14** und **16** stellen jeweils monofunktionelle Photomarker dar, während die Glycopeptid-Derivate **19**, **23** und **26** als bifunktionelle Photophore zusätzlich als wichtiges biochemisches „Tool“ eine Biotin-Einheit tragen. Dieses Strukturelement dient der Erleichterung späterer Analysen. Mit den sechs neuen, im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Mannosiden ist es entgegen den meisten vergleichbaren Veröffentlichungen gewährleistet, Photoaffinitätsmarkierung ohne den Einsatz radioaktiver Marker zu betreiben. Diese Tatsache garantiert daher ein sichereres und weniger gesundheitsgefährdendes Arbeiten.

4 Evaluation der synthetisierten photoaktiven Liganden

4.1 Allgemeines

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich hauptsächlich mit Design und Synthese unterschiedlicher photoaktiver α -D-Mannosyl-Derivate. Als potenzielle Liganden für das bakterielle Adhäsion FimH sollen sie zur Aufklärung der Ligandbindungs-Mechanismen mittels Photoaffinitätsmarkierung eingesetzt werden. Wie im vorangehenden Kapitel beschrieben, konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgreich sechs unterschiedliche photoaktive α -D-Mannosyl-Derivate **12**, **14**, **16**, **19**, **23** und **26** als potenzielle Liganden für das bakterielle Lektin FimH synthetisiert werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit erfolgte anhand mehrerer photochemischer und biochemischer Experimente der „*Proof of Principle*“. Die synthetisierten photoaktiven Mannoside **12**, **14**, **16**, **19**, **23** und **26** sollten während der Bestrahlung mit UV-Licht hoch reaktive Zwischenstufen wie Carbene, Nitrene und Radikal-Ionen freisetzen, die in entsprechende Biomoleküle wie zum Beispiel Aminosäuren, Peptide und Proteine insertieren können. Die daraus durch kovalente Bindungen resultierenden stabilen Produkte können im Anschluss anhand unterschiedlicher Analyse-Methoden (Massenspektrometrie, biochemische Assays) genauer untersucht und identifiziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Reihe unterschiedlicher Photolyse-Experimente etabliert, die es ermöglichten, die charakteristischen Reaktionseigenschaften der entsprechenden Verbindungen aufzuzeigen und nachzuweisen. In den folgenden Kapiteln werden diese Evaluations-Schritte im Einzelnen vorgestellt und die daraus resultierenden Ergebnisse diskutiert.

4.2 Bestrahlung der potenziellen photoaktiven α -D-Mannoside

4.2.1 Bestimmung der Absorptionsmaxima

Zunächst einmal war es erforderlich, die optimalen Photolyse-Bedingungen für die einzelnen neuen photoaktiven α -D-Mannoside zu ermitteln, um geeignete Reaktionsbedingungen für die Photoaktivierung sowie die bestmögliche Ausnutzung ihrer Reaktionseigenschaften zu ermöglichen.

Daher wurden in einer ersten Studie die Absorptionsmaxima aller sechs photolytisch aktivierbaren Verbindungen anhand UV-VIS-spektrometrischer Methoden bestimmt. Hierfür wurden, wie ausführlich in Kapitel 6.3.2 beschrieben, entsprechende Stammlösungen der einzelnen Verbindungen vorbereitet. Im Hinblick auf die spätere Photomarkierung des bakteriellen Adhäsins FimH war es hierbei wünschenswert, dass die synthetisierten Photomarker möglichst wasserlöslich sind. Für das Diazirin **14** und die beiden Benzophenon-Derivate **16** und **19** ist dieses gewährleistet. Bei den drei übrigen photoaktiven Verbindungen sind zum Erreichen einer vollständigen Löslichkeit Kosolventien nötig. Zur Erstellung der Stammlösungen wurden das Diazirin **14** und die beiden Benzophenon-Derivate **16** und **19** in Aqua bidest. gelöst, während die beiden bifunktionellen Diazirine **23** und **26** in Aqua bidest./MeCN (1:1) und das Azid **12** aufgrund seiner geringen Wasserlöslichkeit in MeOH gelöst wurden. Von jeder dieser Lösungen wurden UV-VIS-Spektren im Wellenlängenbereich von $400 \text{ nm} \geq \lambda \geq 240 \text{ nm}$ gemessen. Die daraus graphisch ermittelten Absorptionsmaxima λ_{max} sind in Tabelle 4.1 aufgeführt.

Tabelle 4.1: Für die synthetisierten photoaktiven Mannoside mittels UV-VIS-Spektroskopie ermittelte Absorptionsmaxima.

Photoaktiver Ligand	c _{PAL} in Lösungsmittel	Absorptions-max. λ_{max} [nm]
Azid 12	0.1 mM in MeOH ^[a]	265; 305 (schwach)
Diazirin 14	0.1 mM in Aqua bidest.	266; 356
Benzophenon 16	0.25 mM in Aqua bidest.	264
Benzophenon 19	0.75 mM Aqua bidest.	242; 289
Diazirin 23	0.1 mM in Aqua bidest. / MeCN (1:1) ^[b]	266; 302 (schwach); 353
Diazirin 26	0.1 mM in Aqua bidest. / MeCN (1:1) ^[b]	266; 302 (schwach); 336

Die entsprechenden UV-VIS-Spektren der photoaktiven Liganden sind im Anhang dieser Arbeit angefügt.

[a] Das Azid **12** ist in Wasser nur schwer löslich.

[b] Die bifunktionellen Diazirine **23** und **26** sind nur durch Zusatz von 50% MeCN in Wasser löslich.

Aus der gezeigten Tabelle ist ersichtlich, dass alle vermessenen Verbindungen mindestens ein Absorptionsmaximum im Wellenlängenbereich von $\lambda = 240$ nm bis 270 nm besitzen, die von den substituierten aromatischen Systemen herrühren. Weiterhin zeigen die Diazirine **14**, **23** und **26** Absorptionsmaxima bei Wellenlängen zwischen $\lambda = 335$ nm und 360 nm, welche charakteristisch für den Diazirin-Ring sind. Die zusätzlich bei den Verbindungen **23** und **26** auftretenden schwachen Maxima bei $\lambda = 302$ nm lassen sich nicht eindeutig einem charakteristischen Chromophor zuordnen. Das Azid **12** zeigt ein zweites schwaches Maximum bei $\lambda =$

305 nm. Im Falle der beiden Benzophenone konnten keine deutlichen Absorptionsmaxima für die Carbonlygruppe identifiziert werden; diese hätten im Wellenlängenbereich um $\lambda = 340$ nm liegen sollen. Zur weiteren Evaluierung der synthetisierten photolabilen Mannoside erfolgte deren Bestrahlung mit UV-Licht definierter Wellenlängenbereiche.

4.2.2 Ermittlung der Reaktionszeiten der synthetisierten Photomarker

Im nächsten Schritt war es notwendig, die individuellen „Reaktionszeiten“ der einzelnen Photomarker zu bestimmen. Bezogen auf diese Arbeit ist die „Reaktionszeit“ definiert als die Bestrahlungszeit, in der sich das Edukt vollständig umgesetzt hat. Als Maß hierfür wurde die Bestrahlungsdauer bestimmt, innerhalb derer die einzelnen für die photoaktiven funktionellen Gruppen charakteristischen Absorptionsmaxima auf einen Wert von Null abgesunken waren. Zu diesem Zweck wurden die vorbereiteten Stammlösungen (vgl. Kapitel 6.3.2) in der speziell für diese Experimente angefertigten Bestrahlungsapparatur zunächst einmal mit Licht der Leistung 150 Watt und der Wellenlängen $\lambda \geq 305$ sowie $\lambda \geq 320$ nm bei RT bestrahlt (wie in Kapitel 6.3.1 beschrieben). Währenddessen wurden in regelmäßigen Zeitabständen von jeweils 5 Minuten UV-VIS-Absorptionsspektren der einzelnen Verbindungen aufgenommen und die Abnahme der entsprechenden Absorptionsmaxima beobachtet. Waren die Maxima auf einen Wert von Null abgesunken, wurde diese Bestrahlungszeit als optimale Bestrahlungsdauer für die vollständige Aktivierung der photoreaktiven Verbindung definiert. Die auf diese Weise ermittelten Werte sind in Tabelle 4.2 aufgeführt. Da die beiden unterschiedlichen Wellenlängenbereiche des eingestrahnten UV-Lichtes sich in keinsten Weise auf die nach der Bestrahlung aufgenommenen UV-VIS-Spektren auswirkte, wurde im Folgenden lediglich mit UV-Licht des Wellenlängenbereiches oberhalb von 320 nm bestrahlt. Diese Maßnahme wurde getroffen, um die Gefahr einer möglichen Zerstörung der später eingesetzten Peptide und Proteine durch zu energiereiche Strahlung auszuschließen.

Tabelle 4.2: Ermittlung der Aktivierungszeit der einzelnen synthetisierten Photomarker anhand des stetigen Abbaus der Absorptionsmaxima λ_{\max} in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer.

Verbindung (PAL)	c_{PAL} in Lösungsmittel	Abbau von λ_{\max} [min] ^[a]
12 (monofunkt. Azid)	0.1 mM in MeOH	30
14 (monofunkt. Diazirin)	0.1 mM in Aqua bidest.	10
16 (monofunkt. Benzophenon)	0.25 mM in Aqua bidest.	[b]
19 (bifunkt. Benzophenon)	0.75 mM Aqua bidest.	[b]
23 (bifunkt. Diazirin)	0.1 mM in Aqua bidest. / MeCN (1:1)	10
26 (bifunkt. Diazirin)	0.1 mM in Aqua bidest. / MeCN (1:1)	10

[a] Kontrolle des Absinkens der Absorptionsmaxima durch Aufnahme der UV-VIS-Spektren in 5- minütigen Zeitintervallen während der Bestrahlung. Die eingetragene Zeit entspricht dem Absinken von λ_{\max} auf einen Wert von Null.

[b] Kein Absinken von λ_{\max} aufgrund der Relaxation des angeregten Triplett-Radikals in den Grundzustand.

Wie aus Tabelle 4.2 ersichtlich, ergaben sich für die Aktivierung von Diazirin und Azid als photoaktive funktionelle Gruppe Reaktionszeiten von 10 bzw. 30 min bei Raumtemperatur. Abbildung 4.1 zeigt graphisch den zeitlichen Abbau der maximalen Absorptionsbande des Diazirins **14**. Die Abnahme der entsprechenden Absorptionsbande bei $\lambda_{\max} = 356$ nm mit fortschreitender Bestrahlungsdauer ist deutlich zu erkennen, so ist das Absorptionsmaximum nach einer Bestrahlungsdauer von 10 Minuten verschwunden. Das zweite im Spektrum sichtbare Absorptionsmaximum bei niedriger Wellenlänge ($\lambda = 266$ nm) resultiert aus dem aromatischen System der Verbindung. Da es im Hinblick auf die zu untersuchende Reaktivität keine Rolle spielt, wird es im Folgenden nicht weiter beachtet.

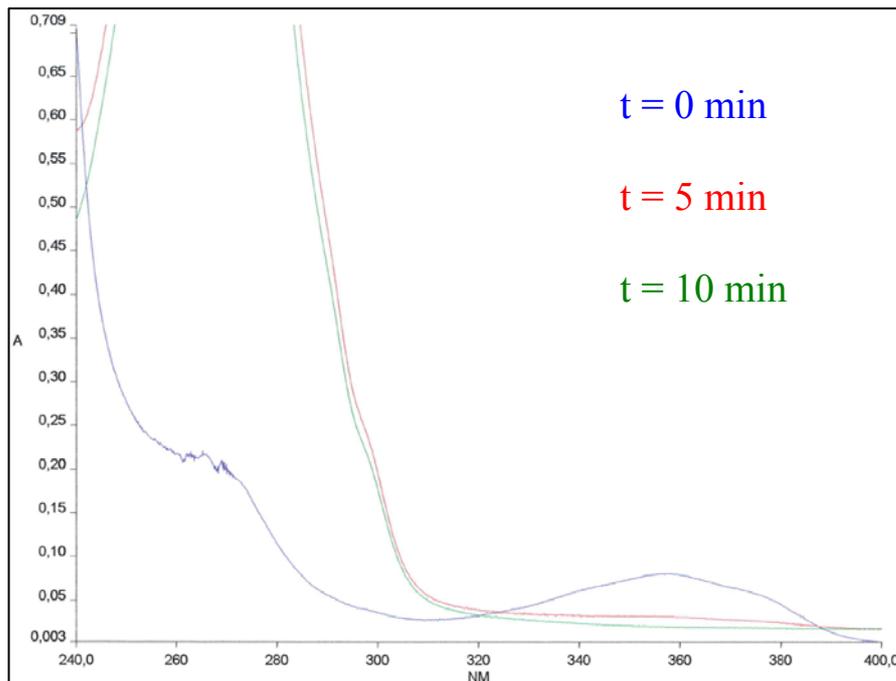


Abb. 4.1: Zeitabhängige UV-VIS-Spektren des photoaktiven Diazirins **14**. Abnahme des Absorptionsmaximums λ_{max} mit fortschreitender Bestrahlungszeit t .

Die folgende Abbildung zeigt die zeitabhängigen UV-VIS-Spektren des Azides **12**. Das vom aromatischen Ring herrührende Absorptionsmaximum wurde bei $\lambda = 265$ nm bestimmt und ist in der folgenden Abbildung bewusst „abgeschnitten“ worden, da es für die weiteren Untersuchungen im Rahmen der Aktivierung des Azides nicht relevant ist.

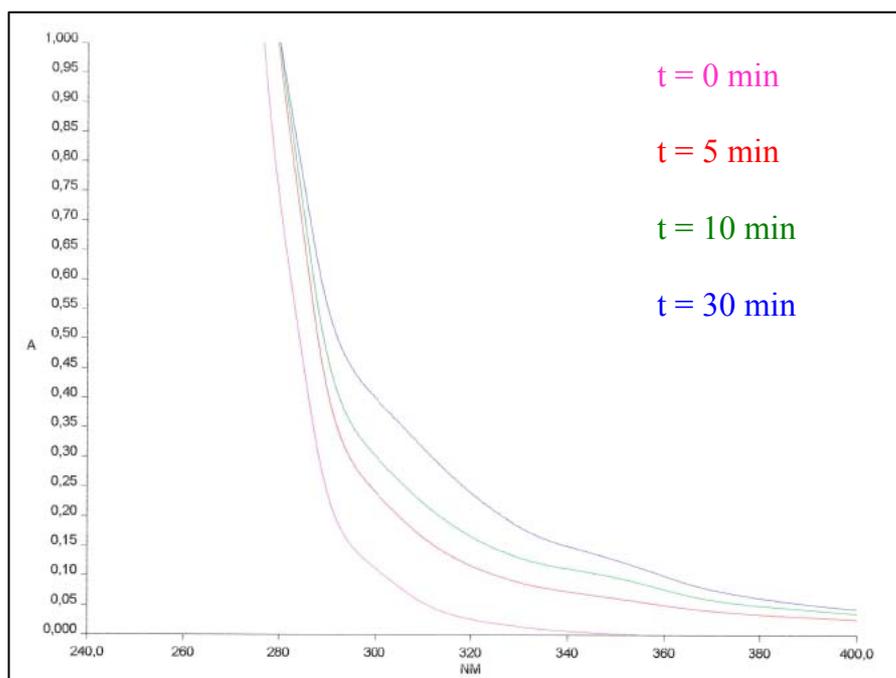


Abb. 4.2: Zeitabhängige UV-VIS-Spektren des photoaktiven Azides **12**.

Auffällig an dieser Graphik ist, dass sich mit fortschreitender Bestrahlungsdauer ein neues Absorptionsmaximum bei $\lambda = 349$ nm zeigt. Nach einer Bestrahlungsdauer von 30 Minuten ist dieses deutlich zu erkennen. Diese Tatsache lässt sich dadurch erklären, dass sich während der Bestrahlung ein „neues“ Chromophor gebildet haben könnte. Es ist literaturbekannt^[64], dass die reaktiven intermediär aus dem Azid entstehenden primären Nitrene durch Kombination mit sich selber zu entsprechenden Azoverbindungen führen. Das Absorptionsmaximum einer solchen Azo-Gruppe liegt im Allgemeinen bei Wellenlängen zwischen $\lambda = 340$ nm und 360 nm; daher ist es sehr wahrscheinlich, dass auch im Falle der fortschreitenden Bestrahlung des Azides **12** dieses aktiviert wurde, wobei die intermediär gebildeten reaktiven Singulett-Nitrene durch Kombination die Bildung einer entsprechenden Azoverbindung bewirkten.

Benzophenone besitzen die Eigenschaft, dass die durch Bestrahlung erzeugten Triplett-Radikale reversibel in den entsprechenden Grundzustand relaxieren, wenn kein geeigneter Reaktionspartner anwesend ist, um Insertionsprodukte zu bilden.^[135] Einerseits ist diese Relaxationseigenschaft vorteilhaft. Unerwünschte Nebenreaktionen während der Photolyse, bei der die intermediär gebildeten hochreaktiven Zwischenstufen entweder durch das Lösungsmittel abgefangen werden oder sich in weniger reaktive Isomere umwandeln, werden so vermieden. Im Hinblick auf die zur Aktivierung erforderliche Bestrahlungsdauer wirkt sich diese Relaxationseigenschaft jedoch nachteilig aus, da frühestens nach 60 min UV-Bestrahlung die Bildung von Insertionsprodukten anhand von MS-Analysen der bestrahlten Proben beobachtet wurde. In der Literatur sind sogar Fälle beschrieben, in denen sich die Belichtungsdauer über mehrere Stunden hinziehen kann.^[135] Eine Bestrahlung über mehrere Stunden mit hoher Leistung verbraucht jedoch unnötige Energie und steigert noch dazu das Risiko, in der Lösung enthaltene Biomoleküle zu zerstören.

Die folgende Abbildung enthält die zeitabhängig gemessenen UV-VIS-Spektren des photoaktiven Benzophenons **16**. Deutlich zu sehen ist hierbei, dass sich die Absorptionsspektren mit fortlaufender Bestrahlungsdauer nicht merklich ändern. Selbst nach 60-minütiger Photolyse hat sich die Ausgangsverbindung nicht umgesetzt, was zu dem oben erläuterten Relaxationsprozess passt. Aus diesen Beobachtungen heraus resultierte die Entscheidung, die Bestrahlungsdauer während

weiterer photolytischer Umsetzungen der Benzophenon-Derivate **16** und **19** im Rahmen dieser Arbeit auf 60 min festzusetzen.

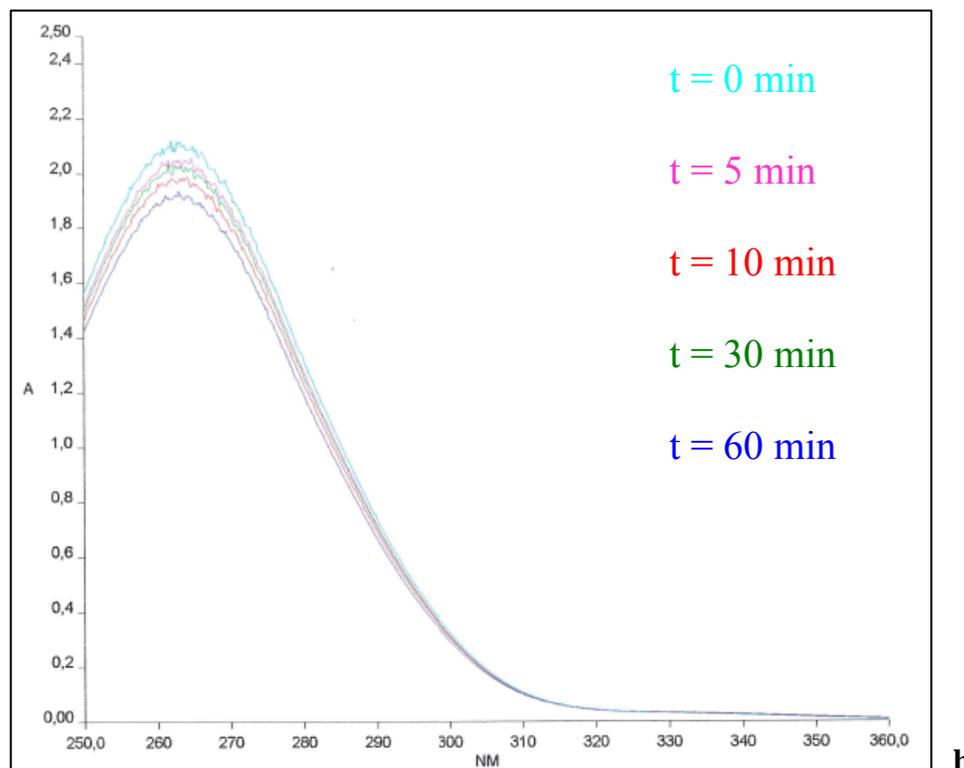


Abb. 4.3: Zeitabhängige UV-VIS-Spektren des photoaktiven Benzophenons **16**. Abnahme des Absorptionsmaximums λ_{max} mit der Zeit t .

4.2.3 Massenspektrometrische Analyse der in Lösung gebildeten Insertionsprodukte

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden die in 4.2.2 bestrahlten Lösungen der monofunktionellen Photomarker **12**, **14** und **16** massenspektrometrisch untersucht. Im Falle des Diazirins **14** konnten hierbei eindeutig Produkte sowohl in Aqua bidest. als auch in MeOH identifiziert werden, deren m/z -Werte mit den Summenformeln und Molekulargewichten der entsprechenden Insertionsprodukte korrelieren. Abbildung 4.4 zeigt das ESI-MS-Spektrum des Produktes, welches nach photolytischer Aktivierung des Diazirins **14** durch Abspaltung eines Stickstoff-Moleküls und nachfolgende kovalente Bindung des intermediären Carbens an das Lösungsmittel Wasser gebildet wurde.

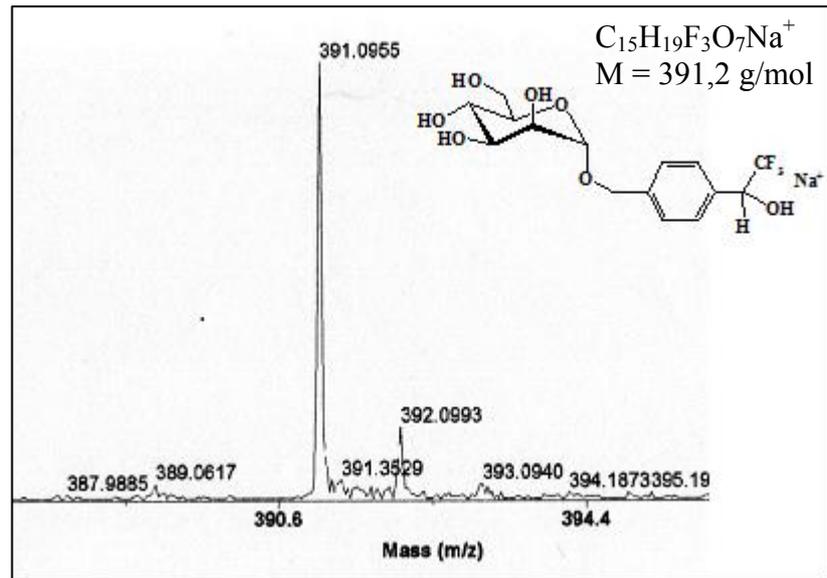


Abb. 4.4: ESI-MS des Insertionsproduktes des Diazirins **14** mit Aqua bidest. als Lösungsmittel. Aufgenommen mit dem Mariner ESI-TOF 5280 Spektrometer (Applied Biosystems).

Die Bildung eines kovalenten Insertionsproduktes mit Methanol konnte ebenfalls massenspektrometrisch nachgewiesen werden (Abb. 4.5).

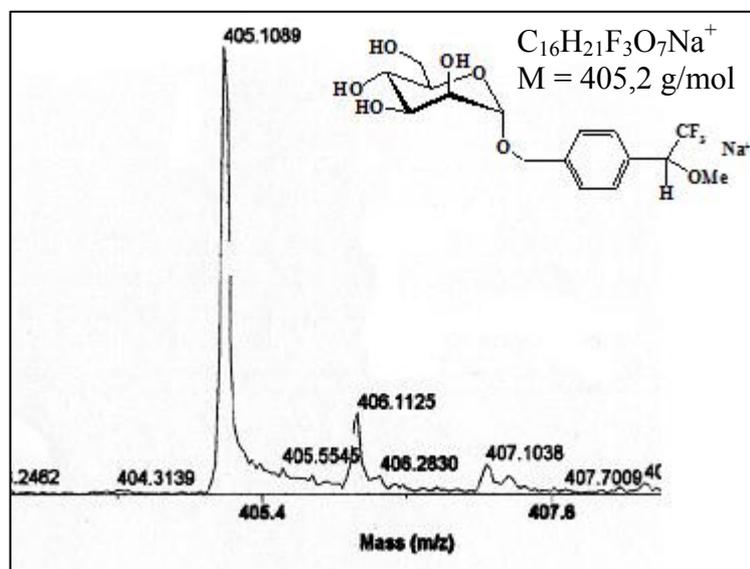


Abb. 4.5: ESI-MS des Insertionsproduktes des Diazirins **14** mit MeOH als Lösungsmittel. Aufgenommen mit dem Mariner ESI-TOF 5280 Spektrometer (Applied Biosystems).

Bei den in den Abbildungen gezeigten Strukturen handelt es sich jeweils um Strukturvorschläge der entsprechenden Insertionsprodukte; eine genaue

Strukturaufklärung anhand von NMR-Spektren erfolgte im Bezug auf die Zielsetzung dieser Arbeit nicht. Im Falle des Azides **12** wurde lediglich MeOH als Lösungsmittel eingesetzt, da diese Verbindung nur sehr schwer in Wasser löslich ist. Dies gilt ebenso für unpolare Lösungsmittel wie Cyclohexan oder ähnliche. Nach 30-minütiger Bestrahlung, wie in 4.2.2 beschrieben, konnten im ESI-MS-Spektrum zwei intensive Signale mit einer Masse von $m/z = 381.3$ sowie $m/z = 409.2$ nachgewiesen werden. Das Signal mit $m/z = 381.3$ konnte nicht weiter interpretiert werden während das Signal bei $m/z = 409.2$ zu dem Natrium-Addukt des entsprechenden Insertionsproduktes mit der Summenformel $C_{14}H_{17}F_4NO_7Na^+$ (monoisotopische Masse: 410.02) passen könnte. Da die Ergebnisse in diesem Falle nicht eindeutig sind, wurde auf die Abbildung des entsprechenden ESI-MS-Spektrums verzichtet.

Die Bestrahlung des Benzophenon-Photophors **16** in Aqua bidest. führte auch nach 60 Minuten nicht zur Bildung eines entsprechenden Insertionsproduktes. Im ESI-MS war stets das Natrium-Addukt des intakten Eduktes mit der Masse $m/z = 454.1$ zu finden (Abb. 4.6), was darauf schließen lässt, dass Benzophenone bei Bestrahlung mit UV-Licht keine kovalenten Addukte mit polaren Lösungsmitteln wie Wasser bilden. Dies würde auch die These von Prestwich et al. bestätigen^[135].

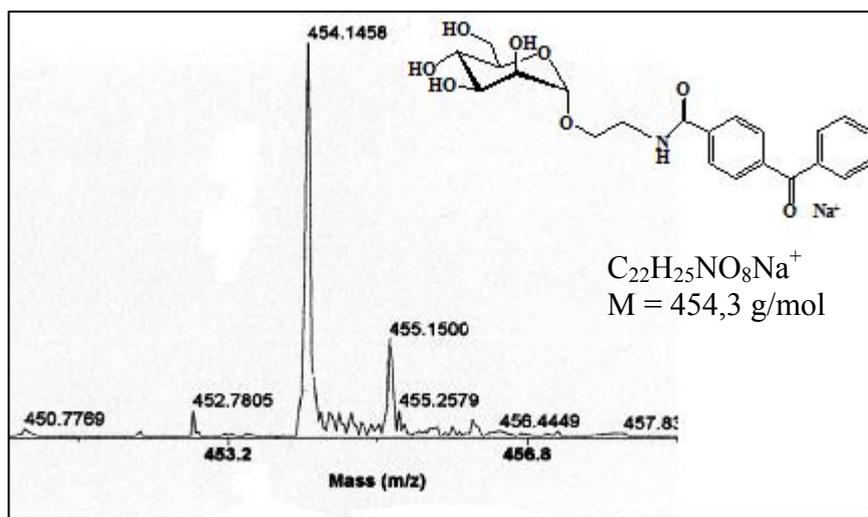


Abb. 4.6: Das ESI-MS zeigt nach 60-minütiger Bestrahlung des Benzophenon-Labels **16** in Aqua bidest. lediglich das Natrium-Addukt des intakten Eduktes. Aufgenommen mit dem Mariner ESI-TOF 5280 Spektrometer (Applied Biosystems).

4.2.4 Bestrahlung der photoaktiven Mannoside unter physiologischen Bedingungen

Die synthetisierten photoaktiven Mannoside sollen für die Untersuchung von Ligandbindungseigenschaften Mannose-spezifischer Lektine, insbesondere dem bakteriellen Adhäsin FimH, und deren Photoaffinitätsmarkierung eingesetzt werden. Lektine, wie das FimH, sind in lebenden Organismen unter „physiologischen Bedingungen“ aktiv. Um die Anwendung der synthetisierten Verbindungen unter diesen speziellen Bedingungen im Zweifelsfall zu gewährleisten, wurden sie auch hier zunächst auf ihre Löslichkeit hin untersucht.

PBS-Puffer, eingestellt auf einen pH-Wert von 7.4, wird allgemein als physiologischer Puffer angesehen. Da dieser Puffer jedoch einen hohen Gehalt an Ionen enthält, der die spätere massenspektrometrische Analyse unnötig erschweren würde, wurde in dieser Arbeit ein 50 mM Natrium-dihydrogenphosphat-Puffer, eingestellt auf pH 7.4, verwendet, der das „physiologische System“ ebenfalls mimikrieren sollte. Es zeigte sich, dass vor allem die Diazirin-tragenden Mannoside **14**, **23** und **26** sowie die beiden Benzophenon-Derivate **16** und **19** vollständig in dem Puffer löslich sind, während das Azid **12** lediglich eine schwache Löslichkeit zeigt.

Im Folgenden wurden von den löslichen Verbindungen entsprechende Stammlösungen ($c = 0.1 \text{ mM}$) in Phosphat-Puffer vorbereitet, die wie in 4.2.2 beschrieben, bestrahlt und anschließend massenspektrometrisch untersucht wurden.

Im Falle der Diazirine **14**, **23** und **26** konnten mittels ESI-MS-Untersuchungen die Massen der entsprechenden Insertionsprodukte, die aus der kovalenten Bindung der intermediären Carbene mit Wasser resultierten, nachgewiesen werden (vgl. Strukturvorschläge in Kapitel 4.2.3 und entsprechende Analoga). Bei den Benzophenonen **16** und **19** zeigte sich abermals nur das Natrium-Addukt des intakten Eduktes.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass mit den vorliegenden photoaktiven Verbindungen auch photoinduzierte Markierungen unter physiologischen Bedingungen möglich sein sollten, da alle photoaktiven Mannoside bis auf das Azid **12** in einem entsprechenden Puffer vollständig löslich sind und sich bei Bestrahlung ebenso verhalten wie in wässriger Lösung. In den Massenspektren zeigte sich jedoch zusätzlich eine Reihe anderer Signale, die auf im Puffer enthaltene Phosphate schließen lassen. Beispielsweise entspricht die in den Spektren enthaltene Masse m/z

= 142.91 dem im Puffer enthaltenen Natrium-dihydrogenphosphat NaH_2PO_4 , und die ebenfalls in den Spektren auftretende Masse $m/z = 164.92$ entspricht Natriumphosphat Na_3PO_4 , welches sich während der Bestrahlung im Puffer gebildet haben könnte. Um vor allem die massenspektrometrischen Studien im Rahmen weiterer Evaluationsschritte aufgrund des hohen Ionengehaltes nicht unnötig zu erschweren, wurden die folgenden Photolyse-Experimente zunächst so weit möglich in wässriger Lösung durchgeführt.

4.2.5 Bestrahlung der photoaktiven Mannoside in Anwesenheit von Aminosäuren

Nach Aufklärung des photochemischen Verhaltens der synthetisierten photoaktiven Mannoside in unterschiedlichen Lösungsmitteln, bestand der nächste Evaluationsschritt darin, die Photomarker in Anwesenheit niedermolekularer Biomoleküle zu bestrahlen, um Aussagen über eventuelle Präferenzen der Photophore im Hinblick auf den Ort der Insertion treffen zu können. Zunächst sollte jeweils ein Vertreter jeder photoaktiven funktionellen Gruppe sowie ein bifunktionelles Mannosid bezüglich seines Insertionsverhaltens eingesetzt werden. Es wurden hierfür Azid **12**, Diazirin **14**, Benzophenon **16** und Benzophenon **19** als photolabile Verbindungen ausgewählt, während als niedermolekulare Biomoleküle die folgenden sechs entsprechend geschützten Aminosäuren verwendet wurden: Boc-Thr-OH, Boc-Ser-OH, Boc-Tyr-OH, Boc-Ile-OH, Cbz-Lys-OH und H-Arg-OH.

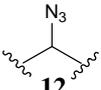
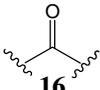
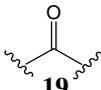
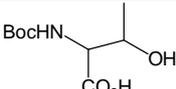
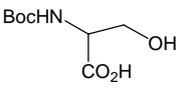
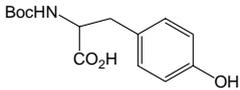
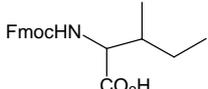
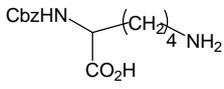
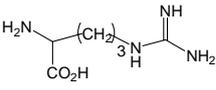
Die Wahl dieser speziellen Aminosäuren erfolgte dabei nicht willkürlich, sondern unter Berücksichtigung der Sequenz des bakteriellen Adhäsins FimH (s. Kapitel 1.1.2.4), welches als sog. „Target-Molekül“ zu Grunde gelegt wurde. Jede der oben genannten Aminosäuren findet sich mindestens einmal am äußeren Rand der CRD des Lektins FimH wieder. Da für die Ausbildung der kovalenten Bindung zwischen Photophor und Protein aufgrund der Lage der α -D-Mannoside in der Protein-Bindetasche besonders die Aminosäuren der Protein-Sequenz relevant sind, die sich am Rand der CRD befinden, war es äußerst interessant zu klären, ob die unterschiedlichen photoaktiven funktionellen Gruppen in die entsprechenden Aminosäuren insertieren. In einigen Fällen konnte eine Überprüfung hinsichtlich eventueller Präferenzen bezüglich des Ortes der Insertion angeschlossen werden, um

Informationen darüber zu erhalten, mit welchen Funktionalitäten bevorzugt eine kovalente Bindung ausgebildet wird.

Die Bestrahlungen in Anwesenheit der einzelnen Aminosäuren erfolgte bei den Verbindungen **14**, **16** und **19** jeweils in Aqua bidest., während für das schlecht in Wasser lösliche Azid **12** nur MeOH als Lösungsmittel in Frage kam. Für die photoaktiven Mannoside wurde eine konstante Konzentration von 0.1 mM gewählt und die Photolyse-Experimente wurden jeweils mit vier verschiedenen Aminosäure-Konzentrationen (0.05 mM [2:1], 0.2 mM [1:2], 0.5 mM [1:5] und 1.0 mM [1:10]) durchgeführt (s. Kapitel 6.3.4). Die hier eingeführte Variation der Aminosäure-Konzentration galt im Hinblick auf eine erfolgreiche Durchführung der Photoaffinitätsmarkierung als ein entscheidendes Kriterium. Die entsprechenden Photomarker mussten in jedem Falle gegenüber den zu markierenden Biomolekülen in deutlichem Unterschuss vorliegen, um mögliche nicht-spezifische Insertionen zu vermeiden. Gleichzeitig sollte das Verhältnis beider Komponenten so gewählt sein, dass sich die gewünschten Kreuzkupplungsprodukte auch bilden können. Zusätzlich musste gewährleistet sein, dass sich letztere auch bei der anschließenden Analyse per MS-Untersuchung oder Affinitätsfärbung in ausreichender Intensität detektieren ließen. Anhand der hier beschriebenen Bestrahlung in Gegenwart der ausgewählten Aminosäuren wurde ein optimales molares Verhältnis von Photomarker zu Biomolekül von 1:10 bestimmt.

Nach der Bestrahlung wurden die jeweiligen Probelösungen massenspektrometrisch auf die Bildung von Insertionsprodukten analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.3 zusammengefasst.

Tabelle 4.3: Massenspektrometrisch ermittelte Ergebnisse der Photolysen ausgewählter Aminosäuren mit den Photomarkern **12**, **14**, **16** und **19** in Lösung.

	 12 M = 383.07 in MeOH	 14 M = 378.10 in H ₂ O	 16 M = 431.16 in H ₂ O	 19 M = 785.93 in H ₂ O
 M = 219.23	k. I.	$m/z = 570.5$	k. I.	k. I.
 M = 205.21	k. I.	k. I.	k. I.	k. I.
 M = 281.30	k. I. [a]	k. I. [a]	k. I. [a]	k. I. [a]
 M = 339.39	$m/z = 709.3$	k. I.	k. I.	k. I.
 M = 280.32	k. I.	$m/z = 631.4$	$m/z = 712.8$	$m/z = 1067.2$
 M = 174.20	k. I.	$m/z = 525.3$	k. I.	k. I.

k.I. = kein Insertionsprodukt

[a] Keine übereinstimmende Löslichkeit von Photomarker und Aminosäure in H₂O oder MeOH, daher waren hier keine Insertionsprodukte nachweisbar.

Aus Tabelle 4.3 ist ersichtlich, welches Photophor mit welcher Aminosäure eine kovalente Bindung eingeht, um ein stabiles Insertionsprodukt zu bilden. Das Diazirin **14** bindet bevorzugt an Aminosäuren mit polaren Seitenketten, die eine OH- oder eine Aminogruppe enthalten. Die folgende Abbildung enthält jeweils einen Strukturvorschlag pro möglichem Insertionsprodukt; die in den entsprechenden MALDI-TOF-MS-Spektren gefundenen Signale korrelieren dabei mit den Summenformeln der photomarkierten Aminosäuren sowie mit deren monoisotopischen Massen.

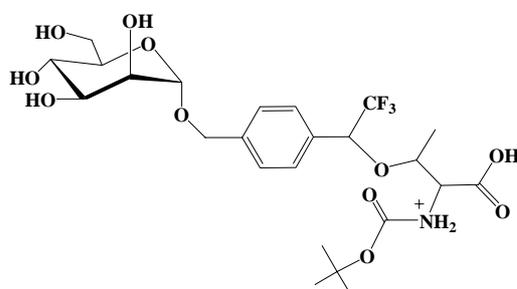
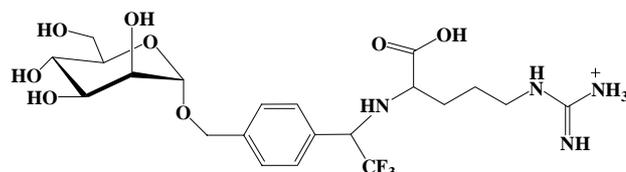
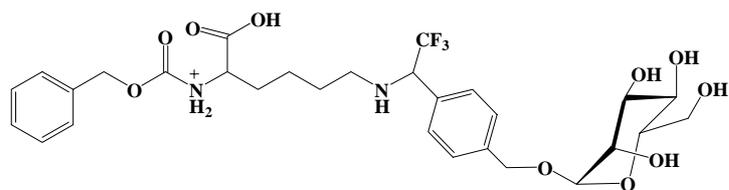


Abb. 4.7. Strukturvorschläge für die gebildeten Insertionsprodukte nach Bestrahlung des Diazirins **14** mit den Aminosäuren Lysin, Arginin und Threonin.

Für die einzelnen Verbindungen liegen keine strukturanalytischen Daten, wie beispielsweise NMR-Spektren, vor, es handelt sich daher bei den angegebenen Strukturen um Vorschläge möglicher Insertionsprodukte.

Das Azid **12** bindet lediglich an Isoleucin; auch in diesem Falle existiert ein entsprechender Strukturvorschlag für ein mögliches Insertionsprodukt (Abb. 4.8).

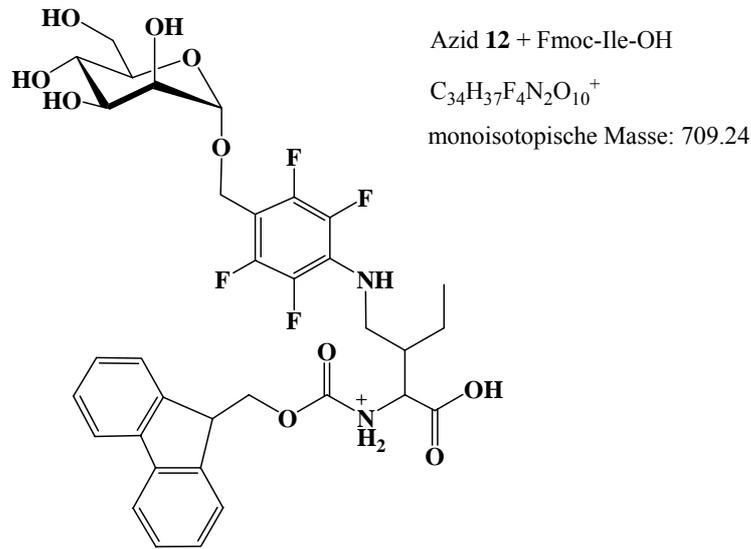


Abb. 4.8. Strukturvorschlag eines möglichen Insertionsproduktes nach Bestrahlung des Azides **12** in Gegenwart der Aminosäure Isoleucin.

Beide Benzophenone **16** und **19** bevorzugen Aminosäuren mit mehreren Methylengruppen wie Lysin. Die nachfolgende Abbildung zeigt zwei Strukturvorschläge der möglichen Insertionsprodukte, deren Summenformeln und monoisotopischen Massen mit den massenspektrometrisch gefundenen Signalen korrelieren.

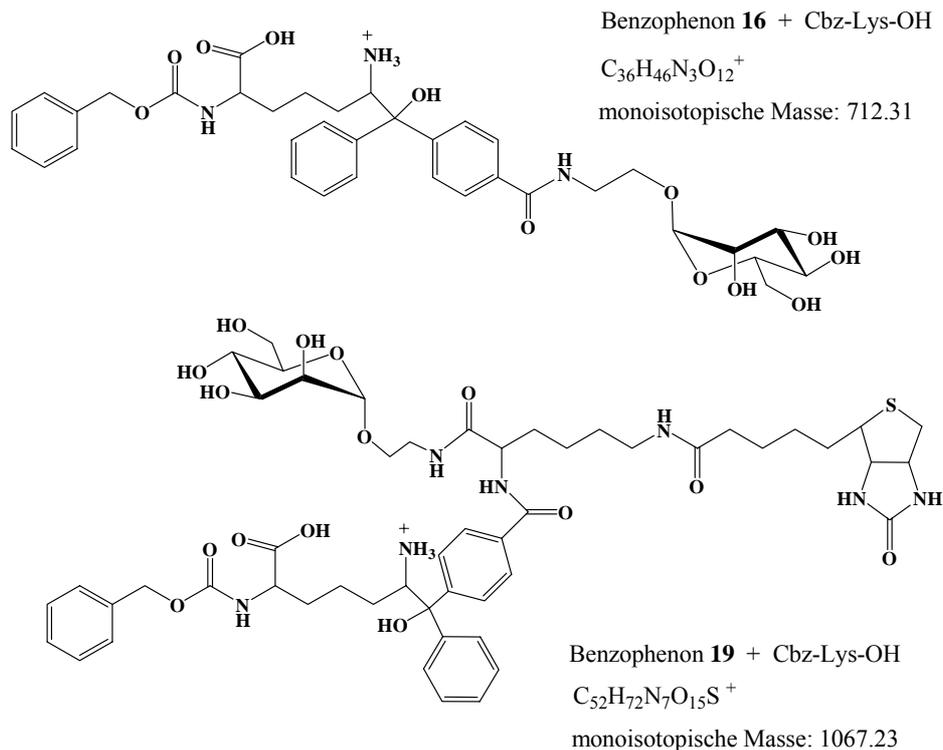
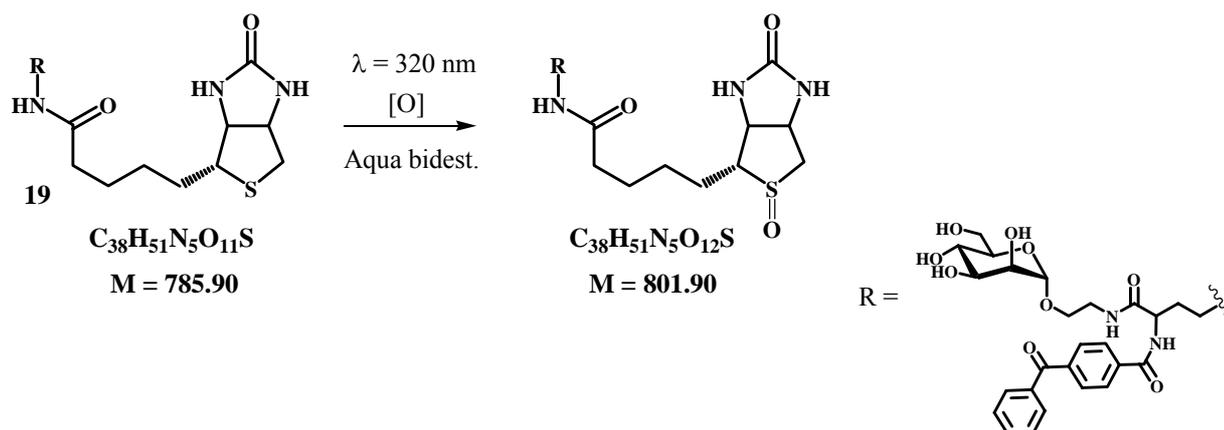


Abb. 4.9. Strukturvorschläge möglicher Insertionsprodukte nach Bestrahlung der Benzophenone **16** und **19** mit Lysin.

Das Insertionsprodukt des Benzophenons **19** nach Bestrahlung in Gegenwart von Lysin konnte mit Hilfe einer mit Avidin immobilisierten Affinitätsäule unter Ausnutzung der starken Wechselwirkungen zwischen Avidin und Biotin gereinigt und aufkonzentriert werden. Das anschließend von der Substanz aufgenommene MALDI-TOF-MS zeigte den gewünschten Produktpeak bei $m/z = 1067.2$ passend zur Summenformel $[C_{52}H_{72}N_7O_{12}S]^+$ sowie ein Signal bei $m/z = 824.3$. Letzteres Masse-Ladungsverhältnis weist eine um die Differenz von $\Delta 16$ höhere Masse als das ursprüngliche Edukt auf und korreliert mit der Summenformel $C_{38}H_{51}N_5O_{12}SNa^+$. Die Summenformel gibt einen Hinweis darauf, dass das Schwefel-Atom während der Bestrahlung oxidiert worden sein könnte und somit das entsprechende Biotin-Sulfon gebildet wurde. (Siehe Schema 4.1).

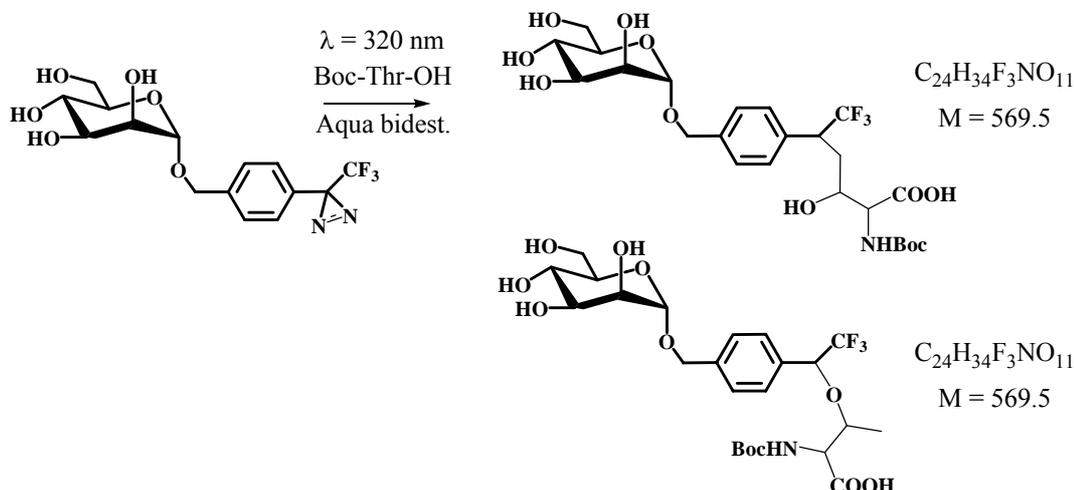


Schema 4.1: Oxidation des Biotin-Schwefel-Atoms während der Bestrahlung führt zu um $\Delta 16$ erhöhten Massen bei Edukt und Insertionsprodukt.

Als Oxidationsmittel hierbei könnte in der Lösung enthaltener Luftsauerstoff wirken, der durch Bestrahlung mit UV-Licht aktiviert wird. Analog wurde die entsprechende Bestrahlung mit denselben Komponenten unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt, was zu einer deutlichen Reduktion der Intensität des entsprechenden Signals mit $m/z = 824.3$ führte. Für die Ergebnisse der Markierungs-Experimente spielt diese während der Bestrahlung beobachtete mögliche Oxidationsreaktion keine nennenswerte Rolle, ist aber durchaus ein interessanter Aspekt. Fakt ist, dass an dieser Stelle erfolgreich der „*Proof of Principle*“ erbracht wurde, dass die Isolierung von Kreuzkupplungsprodukten mit Affinitätschromatographie möglich ist.

Weiterhin auffällig war die geringe Ausbeute an Insertionsprodukt im Vergleich zu nicht umgesetztem Edukt, die in allen Fällen zwischen 10 % und 15 % lag. Dieses Phänomen wurde bereits in anderen Arbeiten berichtet.^[105,136] Mögliche Nebenreaktionen, wie zum Beispiel die Adduktbildung des Photolabels mit dem Lösungsmittel, traten nicht auf; in den entsprechenden Massenspektren wurden keine Massen gefunden, die auf solche Addukte hinweisen. In den aufgenommenen Massenspektren wurde jedoch stets ein sehr intensives Signal des nicht umgesetzten Eduktes gefunden. Das spricht dafür, dass die Insertion der vorliegenden photoaktiven funktionellen Gruppen in Biomoleküle bevorzugt stattfindet und der Reaktion mit dem Lösungsmittel in jedem Falle überlegen ist.

Anhand der in Tabelle 4.3 aufgeführten Massen ist zwar ersichtlich, in welchem Falle sich ein Insertionsprodukt gebildet hat, es lassen sich jedoch keine Hinweise über die Regioselektivität bzw. die Chemo­selektivität der einzelnen photoaktiven funktionellen Gruppen gewinnen. So ist beispielsweise nicht eindeutig klar, ob das bei Bestrahlung des Diazirins **14** intermediär gebildete Carben kovalent an die OH-Gruppe oder an eine C-H-Einfachbindung des Threonins gebunden hat (Schema 4.2).



Schema 4.2: Mögliche Insertionsprodukte, die während der Photolyse des Diazirins **14** mit Boc-Thr-OH gebildet werden.

In der Literatur^[137,138,139] ist beschrieben, dass Carbene eher an polare Gruppen wie zum Beispiel Amino- oder Hydroxygruppen binden, als in unpolare C-H-Bindungen insertieren. Dies spricht auch dafür, dass das Diazirin **14** nach Tabelle 4.3 hauptsächlich mit den Aminosäuren reagiert hat, die solche Gruppen tragen.

Benzophenone bevorzugen andererseits eher lineare Alkylketten^[135,140], was dadurch untermauert wird, dass die Benzophenone **16** und **19** während der Photolyse ausschließlich kovalente Addukte mit Lysin gebildet haben, einer Aminosäure mit linearer Alkylkette.

Um genauere Informationen bezüglich Regio- und Chemoselektivität der einzelnen Photophore zu erhalten, müssten zusätzlich entweder NMR-spektroskopische Analysen der gebildeten Insertionsprodukte durchgeführt werden, oder die entsprechenden Verbindungen müssten anhand von MS/MS-Fragmentierungen auf mögliche strukturelle Hinweise untersucht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte jedoch zunächst eine „Grund-Evaluierung“ der synthetisierten photoaktiven Verbindungen erfolgen. Ziel war es dabei, festzustellen, ob Markierungs-Experimente unter den erforderlichen Bedingungen überhaupt möglich sind, um diese Ergebnisse später auf größere Biomoleküle, wie Proteine übertragen zu können. Daher war es wichtig zu beobachten, inwieweit die zur Verfügung stehenden Photophore in Anwesenheit von Aminosäuren während der Bestrahlung die gewünschten Umsetzungen zeigen oder nicht.

Alle drei untersuchten photoaktiven funktionellen Gruppen reagierten mit einer Reihe von Aminosäuren, die sich in der näheren Umgebung der Bindetasche des Lektins FimH befinden, was sie zunächst alle als Photomarker für die geplanten Untersuchungen qualifizierte. Ungeachtet einer weiteren strukturellen Analyse der gebildeten Insertionsprodukte wurden die Verbindungen **12**, **14**, **16** und **19** sowie die bifunktionellen Diazirine **23** und **26** deshalb für weitere Evaluations-Experimente eingesetzt.

4.2.6 Bestrahlung der photoaktiven Mannoside in Anwesenheit von Modell-Peptiden

4.2.6.1 Bestrahlung und MS-Analyse

Der nächste Schritt zur Evaluation der synthetisierten photoaktiven Mannoside beinhaltete die Bestrahlung der photolabilen Substanzen in Gegenwart von Peptiden, um zu untersuchen, ob sich das „Photolyse-Potenzial“ auch bei Einsatz höher

molekularer Biomoleküle bestätigen lässt. Letztendlich sollten die hergestellten Mannoside als potenzielle Liganden für die Photomarkierung des bakteriellen Lektins FimH entwickelt werden. Daher war die Berücksichtigung der strukturellen Beschaffenheit der CRD des Proteins FimH für die Auswahl der in diesem Evaluationsschritt zu verwendenden Peptide von entscheidender Bedeutung. Die Aminosäuren, die am Rande der Bindetasche des Adhäsins lokalisiert sind, sollten demnach auch in der Sequenz der hier eingesetzten Peptide vorkommen. Weitere Überlegungen führten zu der Schlussfolgerung, dass die entsprechenden Peptide so vielfältig wie möglich sein sollten und somit einen Großteil der proteinogenen Aminosäuren abdecken sollten. Ein zusätzliches Auswahlkriterium bestand darin, dass zur Erleichterung der späteren Analyse entstandener Kreuzkupplungsprodukte möglichst niedermolekulare Peptide zur Anwendung kommen sollten. Resultierend aus diesen Ideen wurden für die Studien dieses Kapitels die folgenden drei Modell-Peptide ausgewählt:

- i) Das im menschlichen Organismus vorkommende Oktapeptid Angiotensin II H-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-OH (DRVYIHPF, $M = 1046.54 \text{ g / mol}$, Fluka). Angiotensin ist ein körpereigenes Gewebshormon. Es wirkt stark blutdrucksteigernd, indem es die Blutgefäße verengt. In einem mehrstufigen Aufbauweg wird das Hormon in der Leber aus einer Vorstufe (Angiotensin I) gebildet. Dieser mehrstufige Aufbauweg heißt Renin-Angiotensin-System. Hier setzen an verschiedenen Stellen mehrere Arzneimittelgruppen (ACE-Hemmer, AT1-Rezeptor-Antagonisten) zur Blutdrucksenkung an.^[141,142,143]
- ii) Das synthetische, käuflich zu erwerbende Oktapeptid H-Pro-Thr-His-Ile-Lys-Trp-Gly-Asp-OH (PTHIKWGD, PeptidMW, $M = 953.07 \text{ g / mol}$, Bachem).
- iii) Das unpolare Pentaglycin ($M = 303.27 \text{ g / mol}$, Fluka).

Die Auswahl fiel auf diese drei Peptide, da vor allem die Sequenzen der beiden Oktapeptide alleine 12 der 20 proteinogenen Aminosäuren abdecken. Pentaglycin hingegen stellt mit seiner eher unpolaren Struktur ein entgegen gesetztes Extremum dar. Das Entscheidende an der Vielfältigkeit der beiden Oktapeptide ist jedoch, dass die strukturbildenden Aminosäuren zum größten Teil (etwa 50 %) den Aminosäuren entsprechen, die sich am Rande der Bindetasche des bakteriellen Adhäsins FimH befinden (Thr-51, Ile-13, Ile-52, Tyr-48 und Tyr-137, Asp-47, Asp-140, Phe-142, Asn-138, siehe Kapitel 1.1.2.4). Sie gelten daher als interessante Zielmoleküle für den kovalenten Angriff der photoaktiven Spezies.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst überprüft, inwieweit die vorliegenden photoaktiven Mannoside durch Bestrahlen kovalent an die Modell-Peptide binden, wobei die hierbei gebildeten Insertionsprodukte anhand massenspektrometrischer Methoden nachzuweisen waren. Eine zusätzliche Überlegung bestand darin, gebildete kovalente Addukte mit Hilfe von MS/MS-Studien auf den Ort, an dem die kovalenten Bindungen geknüpft wurden, zu untersuchen. Eine solche Analyse würde zum einen Informationen darüber liefern, an welcher Stelle der FimH-CRD die einzelnen Photophore binden könnten. Sie bietet aber auch eine gute Möglichkeit, die strukturellen Eigenschaften der synthetisierten Mannoside, beispielsweise den Abstand der photoaktiven funktionellen Gruppe von der Mannose-Einheit im Hinblick auf die Markierung des FimH-Proteins kritisch zu betrachten.

Zur Durchführung der Bestrahlungsexperimente wurden zunächst Probelösungen vorbereitet, die die jeweiligen Peptide in 10-fachem Überschuss bezogen auf die photoaktiven Verbindungen enthielten (jeweils 1 mM Peptid und 0.1 mM Mannosid); als Lösungsmittel wurde Aqua bidest. verwendet (s. Kapitel 6.3.5). Dieses Verhältnis von Photomarker zu Peptid wurde im Zusammenhang mit der Markierung der einzelnen Aminosäuren (siehe Kapitel 4.2.5) bestimmt, da hierbei nicht-spezifische Bindungen vermieden werden können und gleichzeitig eine eindeutige Detektion entstandener Kreuzkupplungsprodukte gewährleistet ist. Die Bestrahlungszeit der eingesetzten Proben bezog sich hierbei auf die in Kapitel 6.3.2 ermittelten Bestrahlungsdauern (Diazirine **14**, **23**, **26** jeweils 10 min, Azid **12** 30 min und die Benzophenone **16** und **19** jeweils 60 min bei $\lambda \geq 320$ nm). Nach der Bestrahlung wurden die einzelnen Proben entweder nach der ZipTipTM-Methode (s. Kapitel 6.7.4) oder über eine Avidin-Affinitätssäule (s. Kapitel 6.4.3) für die anschließende MS-Analyse angereichert und präpariert. Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst (Tabelle 4.4).

Tabelle 4.4: Monoisotopische Massen nach Bestrahlung der drei Modell-Peptide in Anwesenheit der photolabilen Mannoside **12**, **14**, **16**, **19**, **23** und **26**.

Photoaktives	Addukt	Addukt	Addukt
Mannosid	mit Angiotensin II DRVYIHPF (M = 1046.54)	mit Peptid MW PTHIKWGD (M = 953.07)	mit Pentaglycin GGGGG (M = 303.27)
Azid 12 (M = 383.25)	$m/z = 1401.6^{[a]}$	$m/z = 1309.7$	n. b.
Diazirin 14 (M = 378.30)	$m/z = 1397.6^{[a]}$	$m/z = 1326.6$	n. b.
Benzophenon 16 (M = 431.44)	k. I.	k. I.	$m/z = 735.8$
Benzophenon 19 (M = 785.93)	$m/z = 1849.2^{[b]}$	k. I.	k. I.
Diazirin 23 (M = 832.85)	$m/z = 1851.1$	n. b.	k. I.
Diazirin 26 (M = 832.85)	$m/z = 1851.4$	n. b.	k. I.

n. b. = nicht bestimmt.

k. I. = keine Insertion.

[a] weitere Analyse mittels ESI-MS und MS-MS-Fragmentierung.

[b] Bildung des Biotin-Sulfons durch Oxidation des Biotin-Schwefel-Atoms während der Bestrahlung.

Das bei der Bestrahlung des Modell-Peptides Angiotensin II mit Diazirin **14** gebildete Produkt mit dem Masse-Ladungsverhältnis $m/z = 1397.6$ wurde zusätzlich per ESI-MS analysiert. Hierbei wurde ein Signal mit dem Masse-Ladungsverhältnis $m/z = 698.82$ gefunden, welches mit der Summenformel $C_{65}H_{90}F_3N_{13}O_{18}^{2+}$ (monoisotopische Masse: 1397.47) korreliert, die dem zweifach positiv geladenen Kation des gewünschten Insertionsproduktes entspricht. Das aufgenommene Spektrum ist in Abb. 4.7 gezeigt.

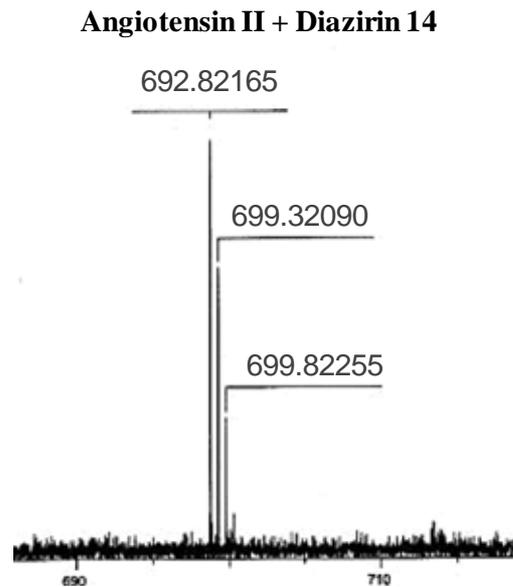


Abb. 4.10. ESI-MS-Spektrum des nach Bestrahlung von Angiotensin II und Diazirin **14** gebildeten Produktes. Das gefundene Signal entspricht dem zweifach geladenen Kation des Insertionsproduktes $[M + 2H]^{2+}$. Aufgenommen mit dem 7 Tesla Apex II Massenspektrometer (Bruker). [Zahlen im Scan wurde wegen schlechter Lesbarkeit manuell nachbearbeitet]

Das identifizierte Signal aus dem ESI-MS-Spektrum (Abb. 4.10) mit der Masse $m/z = 698.82$ für das mit Diazirin **14** markierte Peptid spricht dafür, dass die photoinduzierte Markierung in äquimolarem Verhältnis erfolgte, d. h. es wurde jeweils ein Molekül Peptid mit einem Molekül Photophor markiert. Dieses Phänomen lässt in jedem Falle die Bildung unspezifisch markierter Produkte ausschließen und bestätigt somit die hervorragende Selektivität der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methode. Die folgende Abbildung enthält einen Strukturvorschlag für das markierte Angiotensin II; dieser ist nicht mittels adäquater Strukturaufklärung, beispielsweise anhand entsprechender NMR-Spektren, belegt. Es handelt sich dabei lediglich um eine mögliche Struktur, deren Masse mit den in den MS-Spektren gefundenen m/z -Werten korreliert (Abbildung 4.11).

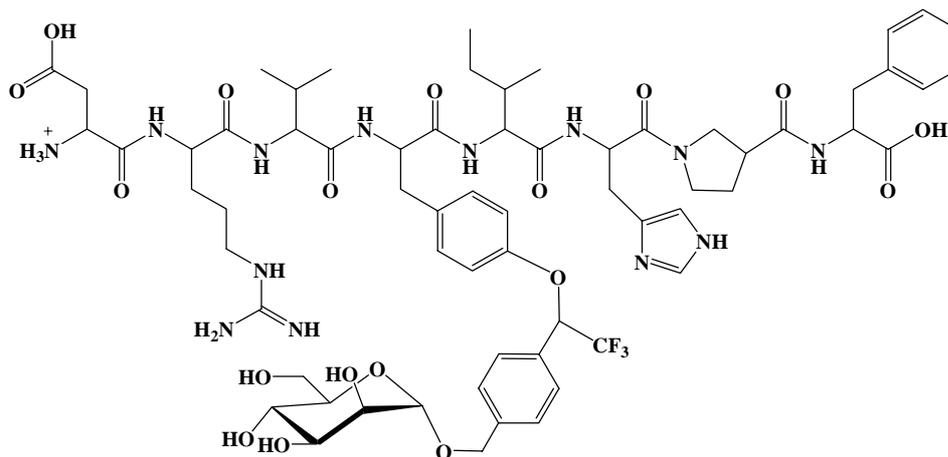


Abb. 4.11. Spekulativer Strukturvorschlag für das mit Diazirin **14** photomarkierte Angiotensin II mit der Summenformel $C_{65}H_{89}F_3N_{13}O_{18}^+$ (monoisotopische Masse: 1396.47).

Die in Abb. 4.11 gezeigte Markierungsposition an der Aminosäure Tyrosin wird durch die nachfolgend in diesem Kapitel aufgeführten Ergebnisse belegt (vgl. Abb. 4.17 und Abb. 4.18).

Im Folgenden wurde das Peptid Angiotensin II nach Bestrahlung mit dem bifunktionellen Diazirin **23** massenspektrometrisch untersucht; die Abbildung 4.12 zeigt das entsprechende MALDI-TOF-Massenspektrum.

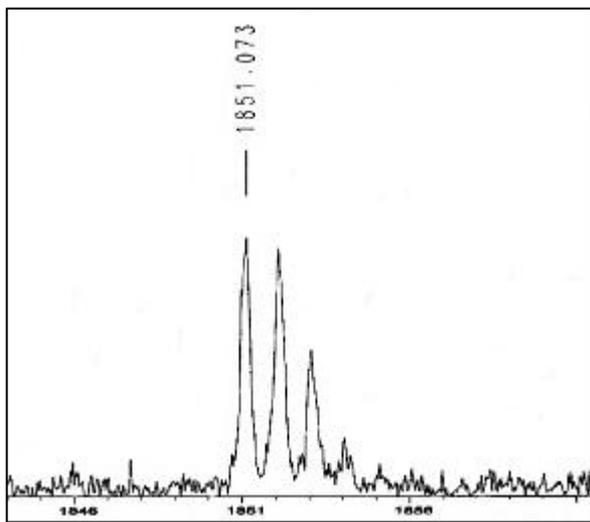


Abb. 4.12. MALDI-TOF-MS des Insertionsproduktes, das durch kovalente Bindung des Diazirins **23** an Angiotensin II gebildet wurde. Aufgenommen mit dem Biflex III Massenspektrometer (Bruker).

Das im MALDI-TOF-MS-Spektrum identifizierte Signal bei $m/z = 1851.07$ korreliert mit der Summenformel $C_{84}H_{119}F_3N_{19}O_{23}S^+$ (monoisotopische Masse: 1850.84); diese

entspricht dem protonierten Produkt nach Photomarkierung des Peptides Angiotensin II mit dem intermediär aus Diazirin **23** gebildeten Carben. In der Abbildung 4.13 ist ein möglicher Vorschlag der Struktur des Produktes enthalten; dieser wurde nicht mittels analytischer Strukturaufklärung, etwa durch ein NMR-Spektrum, nachgewiesen und basiert daher auf Spekulationen, die sich aus den massenspektrometrisch ermittelten Ergebnissen ergeben. Die Markierungsposition an der Aminosäure Tyrosin ist nachfolgend in diesem Kapitel (siehe Abb. 4.17 und Abb. 4.18) anhand von MS-Fragmentierungs-Experimenten gefestigt worden, jedoch lediglich im Falle des Diazirins **14**. Abbildung 4.13 zeigt demnach einen relativ wahrscheinlichen Strukturvorschlag.

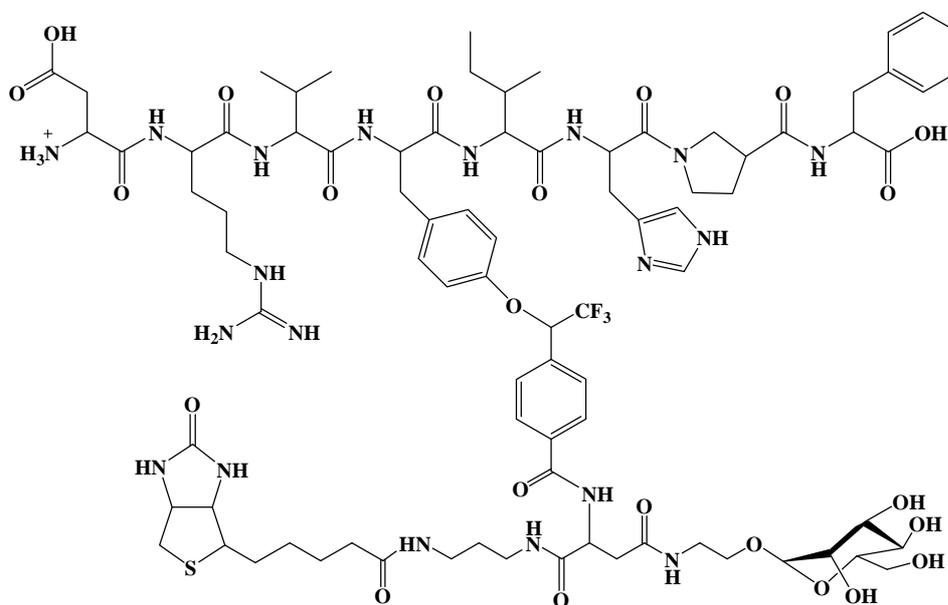
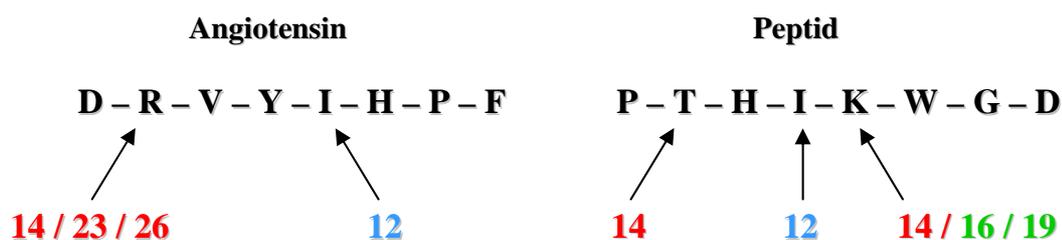


Abb. 4.13. Strukturvorschlag des Insertionsproduktes nach Photomarkierung des Peptides Angiotensin II mit dem bifunktionellen Diazirin **23**; Summenformel $C_{84}H_{119}F_3N_{19}O_{23}S^+$ (monoisotopische Masse: 1850.84).

Wie bereits beschrieben, trat die photoinduzierte Markierung des Peptides auch in diesem Falle im Verhältnis 1:1 auf.

Hinsichtlich ihres Markierungspotenzials zeigen die sechs synthetisierten Mannoside klare Tendenzen in Richtung einer polaritätsabhängigen Insertions-Präferenz. Diese Hypothese resultiert aus den vorher durchgeführten Bestrahlungsexperimenten der Photoaffinitätsliganden sowie in Lösung als auch in Gegenwart einfacher Aminosäuren (vgl Kapitel 4.2.3 und 4.2.5). Eine Zusammenfassung dieser Befunde liefert einen Vorschlag für zwei Insertions-Schemata, welche für die beiden

chemisch markierten Oktapeptide zur graphischen Veranschaulichung aufgestellt werden können. Die Diazirine **14**, **23** und **26** binden dabei scheinbar vorwiegend an die polaren Aminosäuren Arginin, Tyrosin, Threonin und Lysin, während die Benzophenone **16** und **19** Aminosäuren mit längeren Alkylketten wie Lysin vorziehen. Das Azid **12** scheint ebenfalls Methyl- oder Methylene-Gruppen für die Bildung einer kovalenten Bindung zu bevorzugen (Schema 4.3).



Schema 4.3. Gezeigt sind die bisher ermittelten Insertionspräferenzen der photoaktiven Mannoside **12**, **14**, **19**, **23** und **26** bezogen auf die beiden als Modell-Peptide eingesetzten Oktapeptide Angiotensin II und PTHIKWGD (PeptidMW).

Um diese Annahmen bezüglich des Bindungsortes der photoaktiven Spezies weiter zu festigen, wurde von dem Insertionsprodukt, welches durch Photomarkierung des Modell-Peptides Angiotensin II mit dem Diazirin **14** gebildet wurde, eine ESI-FT-ICR-MS/MS-Analyse durchgeführt.^[144] Das FT-ICR-MS-Verfahren liefert eine exzellente Massenauflösung und -genauigkeit (Auflösung $R \geq 100\,000$), was für die Analyse hoch-komplexer Analytmischungen notwendig ist.^[145, 146] Zusätzlich können anhand dieser Technik in der Analysen-Zelle ionische Spezies mit definiertem Masse-Ladungsverhältnis, die „Mutterionen“ (parent ions), isoliert werden. Es ist also hiermit möglich, markierte Peptide und Proteine mit sehr hoher Massenauflösung zu identifizieren, die entsprechenden parent ions zu isolieren und diese anschließend über eine weitere MS-Fragmentierung zu untersuchen. Die Fragmentierungs-Experimente wurden mit dem doppelt geladenen, vorher isolierten, in Abb. 4.10 gezeigten Mutterion unter Verwendung der „sustained off-resonance irradiation collision-induced dissociation“ (SORI-CID)^[147] mit Argon als Kollisionsgas durchgeführt. Bei Zusammenstößen der „Mutterionen“ mit dem Kollisionsgas kommt es zu einer weiteren Fragmentierung in sog. „Tochterionen“, wobei N-terminale und C-terminale, aber auch interne Fragmentionen entstehen

können. Diese Fragmente werden mit Hilfe publizierter Nomenklatur-Regeln^[148] bezeichnet (siehe Kapitel 1.3.2.2). In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse der MS/MS-Fragmentierung des parent ions des mit dem Diazirin **14** photomarkierten Peptides Angiotensin II aufgelistet (Tabelle 4.5).

Table 4.5. Gefundene Fragmentionen nach MS/MS-Analyse des Insertionsproduktes aus Angiotensin II und Diazirin **14**.

Masse des Fragment-Ion [m/z]	Zugeordnete Sequenz
698.82	parent ion ^[a]
582.34	[VYIHP – 28]
323.57	b ₅ ²⁺
223.54	[IH – 28]
138.08	H

[a] parent ion: [C₆₅H₉₀F₃N₁₃O₁₈]²⁺

Aus dem Fragmentierungsmuster des Insertionsproduktes Angiotensin II mit Diazirin **14** lässt sich eindeutig das Signal mit der Masse $m/z = 698.82$ identifizieren, welches die Existenz des kovalenten Adduktes zwischen Diazirin **14** und Peptid bestätigt. Die anderen gefundenen Fragment-Ionen lassen sich eindeutig dem in der Online-Suchmaske ProteinProspector gefundenen Fragmentierungsmuster für das „reine“ Angiotensin II zuordnen, was zu der Aussage führt, dass die bei der Bestrahlung kovalent geknüpfte Bindung zwischen Photomarker und Peptid bei der MS/MS-Analyse zuerst gespalten wird, bevor die Fragmentierung des Peptides erfolgt. Daher ergeben sich hierbei keine weiteren Aussagen hinsichtlich des exakten Insertionsortes.

Zur Erklärung dieser Ergebnisse ist es sinnvoll, die kovalent an das Peptid gebundenen Mannoside als eine Art „posttranslationale Modifikation“ bzw. als „Glycopeptid-Analogon“ zu definieren. Es ist beschrieben, dass die Bindungen posttranslationaler Modifikationen bei Fragmentierungen in der Massenspektrometrie weniger stabil sind, als die Peptidbindungen des Peptid-Rückgrates und daher bei massenspektrometrischen Sequenz-Studien zuerst abgespalten werden.^[150]

Um dennoch zusätzliche Informationen bezüglich der Sequenzaufklärung der photoinduziert markierten Modell-Peptide zu erhalten, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine weitere massenspektrometrische Methode angewendet.^[149] Mit Hilfe der MALDI-TOF-TOF-Technik ist es ebenfalls möglich, Peptide anhand von MS/MS-Fragmentierungen auf schonende Weise hinsichtlich ihrer Sequenz und Modifikationen zu untersuchen. Hierzu wurden Proben des vorher in Gegenwart der photoaktiven Mannoside **12**, **14**, **16**, **19** und **23** bestrahlten Modell-Peptides Angiotensin II, wie in Kapitel 6.7.4 und 6.7.5 beschrieben, präpariert und im 4700 Proteomics Analyzer MS-Gerät vermessen. Zur Kontrolle wurde zunächst ein MS/MS-Spektrum des nicht markierten Angiotensin II als Referenz aufgenommen. Abbildung 4.14 zeigt dieses nach der MS/MS-Fragmentierung.

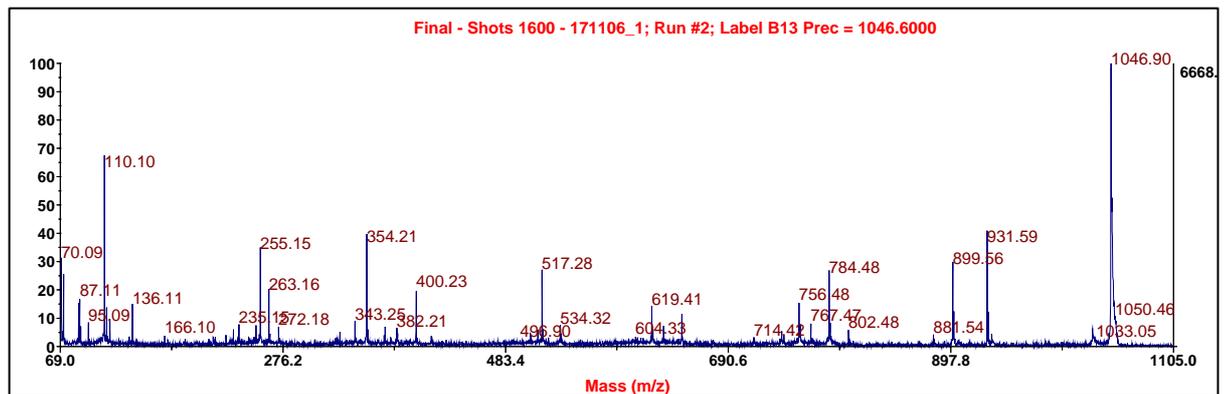


Abb. 4.14. MS/MS-Spektrum nach Fragmentierung des nicht markierten Modell-Peptides Angiotensin II. Aufgenommen mit dem 4700 Proteomics Analyzer Massenspektrometer (Applied Biosystems).

Anhand der Online-Suchmaske ProteinProspector wurden die gefundenen Fragmente nach Biemann et al.^[83] gekennzeichnet und tabellarisch der Peptid-Sequenz zugeordnet (Tabelle 4.6).

Tabelle 4.6. Zuordnung der bei der Fragmentierung von Angiotensin II gefundenen Fragment-Ionen zur entsprechenden Peptid-Sequenz. Die Nomenklatur der Fragmente erfolgte nach Biemann et al.^[83]

Masse des Fragment-Ions [m/z]	Zugeordnete Sequenz
1046.90	[MH] ⁺
931.59	y ₇
899.56	b ₇ – H ₂ O
881.54	b ₇
802.48	b ₆ – H ₂ O
784.48	b ₆
767.47	b ₆ – NH ₃
756.48	a ₆
619.41	a ₅
534.32	b ₄
517.28	b ₄ – NH ₃
400.23	y ₃
354.21	b ₃ – NH ₃
343.25	a ₃
272.18	b ₂
263.16	y ₂
255.15	b ₂ – NH ₃
235.12	HP
166.10	y ₁
136.11	Y
110.10	H
87.11	R
70.09	P

Die folgende Abbildung zeigt die „Bruchstellen“, die während des MS/MS-Experimentes zu den einzelnen Peptid-Fragmenten führen, wobei hier der Übersicht wegen nur die „gängigen“ Peptid-Fragmente gezeigt sind (Abb. 4.15).

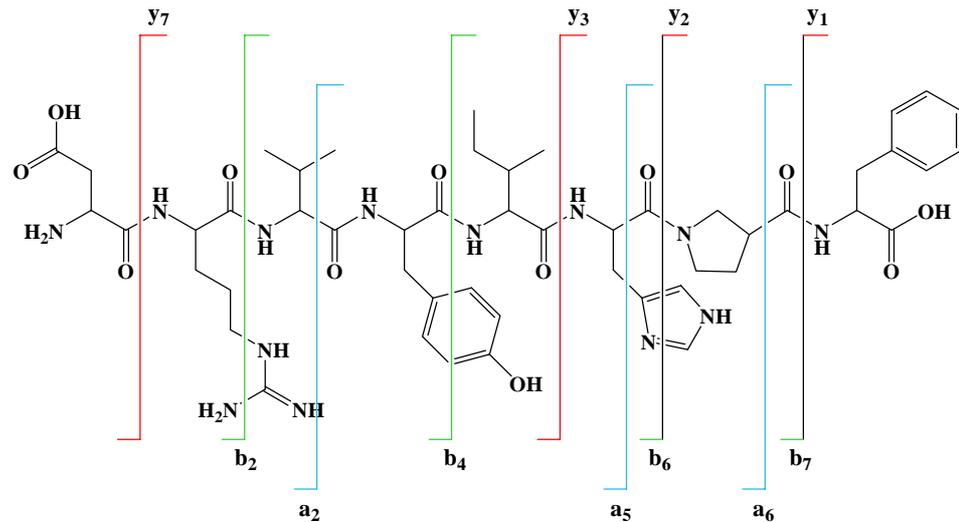


Abb. 4.15. Bezeichnung der „gängigen“ Peptid-Fragmente, die aus dem MS/MS-Spektrum von Angiotensin II identifiziert werden konnten.

Die in der Abbildung 4.15 mit y bezeichneten Fragmente stammen aus der C-terminalen Serie und die mit a und b gekennzeichneten Fragmente aus der N-terminalen Serie. Alle übrigen, in Tabelle 4.6 zugeordneten und im Spektrum identifizierten Fragmente sollen hier nicht im Einzelnen aufgeführt werden. Der charakteristische Verlust von NH_3 (b-NH₃-Serie) ist auf eine zusätzliche Fragmentierung der Seitenkette von Arginin zurückzuführen. Zusätzlich existieren auch Fragmente, die durch Verlust von H_2O (b-H₂O-Serie) erzeugt wurden. Ergänzend sei an dieser Stelle noch erklärt, dass die mit den Buchstaben Y, H, R und V gekennzeichneten Fragmente als Immonium-Ionen charakteristisch für die zugehörigen Aminosäuren Tyrosin, Histidin, Arginin und Prolin sind. Zusammenfassend lässt sich aus den in Tabelle 4.6 aufgeführten Fragmenten nach Zuordnung zur Peptid-Sequenz aus dem aufgenommenen MS/MS-Spektrum eindeutig die korrekte Peptid-Sequenz von Angiotensin II ableiten. So ist diese Methode durchaus auch zur Analyse des photochemisch markierten Peptides anwendbar. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die aus der Bestrahlung des Peptides Angiotensin II in Anwesenheit der photolabilen Mannoside **12**, **14** und **23** massenspektrometrisch untersucht. Zunächst wurde anhand einer MALDI-TOF-Messung die Masse des entsprechenden parent ions isoliert und diese im Anschluss mittels MALDI-TOF-MS/MS fragmentiert. Die Zuordnung der im jeweiligen MS/MS-Spektrum enthaltenen Massen zu den entsprechenden Peptid-Fragmenten

erfolgte mit Hilfe der online-Datenbank Protein Prospector. Im Folgenden sind die Ergebnisse gezeigt und diskutiert.

In Abbildung 4.16 ist das MS/MS-Spektrum des mit dem Diazirin **14** markierten Angiotensin II gezeigt.

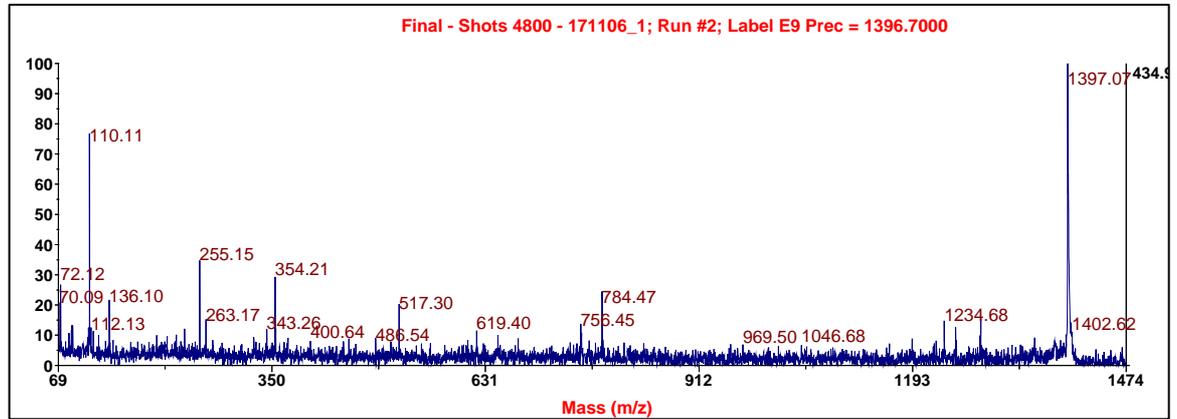


Abb. 4.16. MS/MS-Spektrum von Angiotensin II nach photoinduzierter Markierung mit dem Diazirin **14**. Das Signal, welches dem Molekulargewicht des Insertionsproduktes entspricht ($M = 1397.07$), wurde als Mutter-Ion definiert. Aufgenommen mit dem 4700 Proteomics Analyser Massenspektrometer (Applied Biosystems).

Die nachfolgende Tabelle enthält die identifizierten Fragmente mit entsprechender Zuordnung zur Peptid-Sequenz (Tabelle 4.7).

Tabelle 4.7. Zuordnung der identifizierten Fragmente aus dem MS/MS-Experiment des mit Diazirin **14** markierten Peptids Angiotensin II.

Masse des Fragment-Ions [m/z]	Zugeordnete Sequenz
1397.07	[MH] ⁺
1281.47	[MH - D] ⁺
1234.68	?
1046.68	[MH - Carben] ⁺
969.50	[a ₅ + Carben]
784.47	b ₆
756.45	a ₆
619.40	a ₅
517.30	b ₄ - NH ₃
486.54	[Y + Carben]

400.64	y ₃
354.21	b ₃ – NH ₃
343.26	a ₃
263.17	y ₂
255.15	b ₂ – NH ₃
136.10	Y
112.13	R
110.11	H
72.12	V
70.01	P

Die blau unterlegten Fragment-Ionen sind für den Nachweis der Regiochemie der Photomarkierung entscheidend.

Im Bereich niederer m/z -Werte unter $m/z = 400$ sind beide Spektren (nicht markiertes und markiertes Angiotensin II, Abb. 4.14 und Abb. 4.16) nahezu identisch und zeigen dieselben Signale für die entsprechenden Fragment-Ionen. Ebenso bestätigen die gefundenen Immonium-Ionen, die für die Aminosäuren Tyrosin, Arginin, Histidin, Valin und Prolin charakteristisch sind, die korrekte Sequenz des Peptides Angiotensin II. Auffällig ist jedoch, dass das in Abbildung 4.16 gezeigte Spektrum zusätzliche Signale bei $m/z = 1281.47$, $m/z = 1234.68$ und $m/z = 969.50$ und $m/z = 486.54$ enthält (in Tabelle 4.7 blau unterlegt). Bei Subtraktion der Massendifferenz von $\Delta m/z = 350.10$, die dem während der Bestrahlung intermediär aus dem Diazirin **14** gebildeten reaktiven Carben entspricht, ergeben sich die Massen $m/z = 931.37$ (y₇), $m/z = 884.68$ (nicht zuzuordnen), $m/z = 619.40$ (a₅) und $m/z = 136.44$ (Y). Die folgende Abbildung zeigt die „Bruchstellen“, die im MS/MS-Spektrum zu den einzelnen Peptid-Fragmenten führen. Der Übersicht wegen sind lediglich die Peptid-Fragmente gezeigt, die gegenüber der Abb. 4.15 neu hinzugekommen sind.

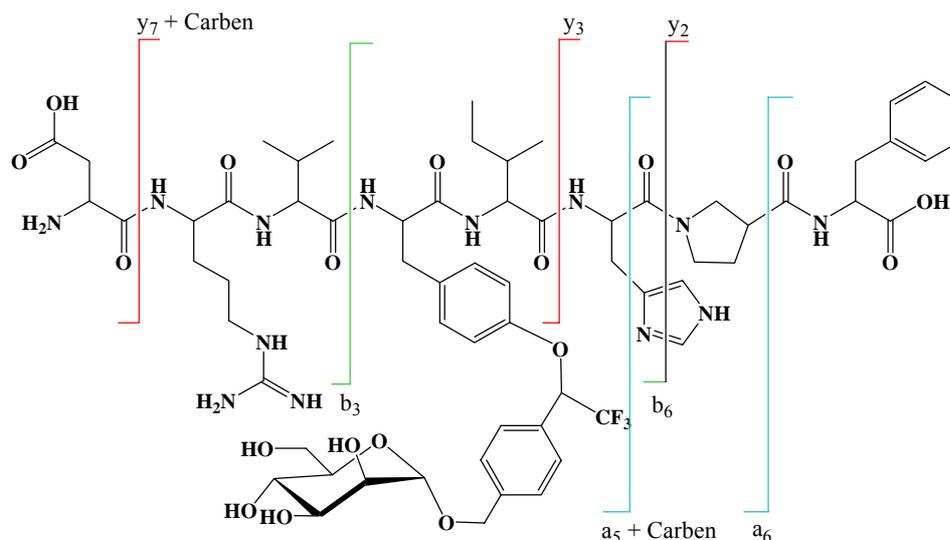


Abb. 4.17. Fragmentierungsmuster für das mit Diazirin **14** photomarkierte Peptid Angiotensin II. Gezeigt sind die für die Charakterisierung essentiellen „Bruchstellen“.

Zu beachten ist, dass es sich bei der in Abb. 4.17 gezeichneten Struktur des mit dem Diazirin **14** markierten Angiotensin II lediglich um einen Strukturvorschlag handelt, der mit den im MS/MS-Spektrum identifizierten Masse-Ladungsverhältnissen korreliert. Ein sicherer Nachweis der tatsächlichen Peptidstruktur in Form eines NMR-Spektrums liegt nicht vor. Abbildung 4.18 enthält einen Strukturvorschlag des markierten Immonium-Ions von Tyrosin, welcher exakt mit dem gefundenen Masse-Ladungsverhältnis $m/z = 486.54$ korreliert und einen deutlichen Hinweis auf den Ort der Photomarkierung von Angiotensin durch das Diazirin **14** gibt.

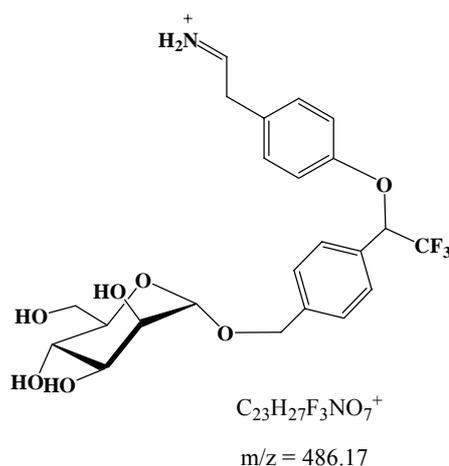


Abb. 4.18. Strukturvorschlag des im MS/MS-Spektrum identifizierten Tyr-Immonium-Ions, photomarkiert durch das Diazirin **14**.

Eine exakte Zuordnung des Fragment-Ions mit der Masse $m/z = 1234.68$ war in diesem Falle nicht möglich. Aus diesen erhaltenen Massen lässt sich letztendlich

schließen, dass der Photoaffinitätsmarker an den Fragment-Ionen y_7 und a_5 gebunden ist, die beide die Aminosäure Tyrosin enthalten. Die im MS/MS-Spektrum identifizierten Fragment-Ionen zeigen mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit, dass das durch Photoaktivierung des Diazirins **14** generierte Carben an die Aminosäure Tyrosin gebunden hat. Diese Hypothese könnte durch die Markierungsexperimente der einfachen Aminosäuren zusätzlich gefestigt werden, jedoch konnte aufgrund der nicht kompatiblen Löslichkeiten von Diazirin und geschütztem Tyrosin kein analoges Ergebnis erzielt werden (vgl. Kapitel 4.2.5, Tabelle 4.3). Die anhand der MS/MS-Fragmentierung des photomarkierten Angiotensin II erhaltenen Resultate bestätigen zusätzlich die aus vorangegangenen Experimenten erhaltenen Befunde in sofern, dass Carbene, die durch UV-Bestrahlung aus Diazirinen gebildet werden, bevorzugt in polare OH- oder NH-Bindungen insertieren. Diese Studien beweisen demnach, dass die Photoaffinitätsmarkierung des Modell-Peptides Angiotensin II mit dem synthetisierten photoaktiven Mannosid-Liganden **14** möglich ist und dass die im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierte Methode zur Aufklärung des Markierungsortes ebenso erfolgreich ist. Analog dazu wurden auch MALDI-TOF-Analysen der Insertionsprodukte durchgeführt, die aus der Bestrahlung von Angiotensin II in Gegenwart des bifunktionellen Diazirins **23** sowie des Azides **12** resultierten. Die Ergebnisse werden im Anschluss gezeigt und diskutiert. Die folgende Abbildung enthält das MS/MS-Spektrum, welches aus der Fragmentierung des mit dem bifunktionellen Diazirin **23** markierten Angiotensin II resultierte (Abb. 4.19).

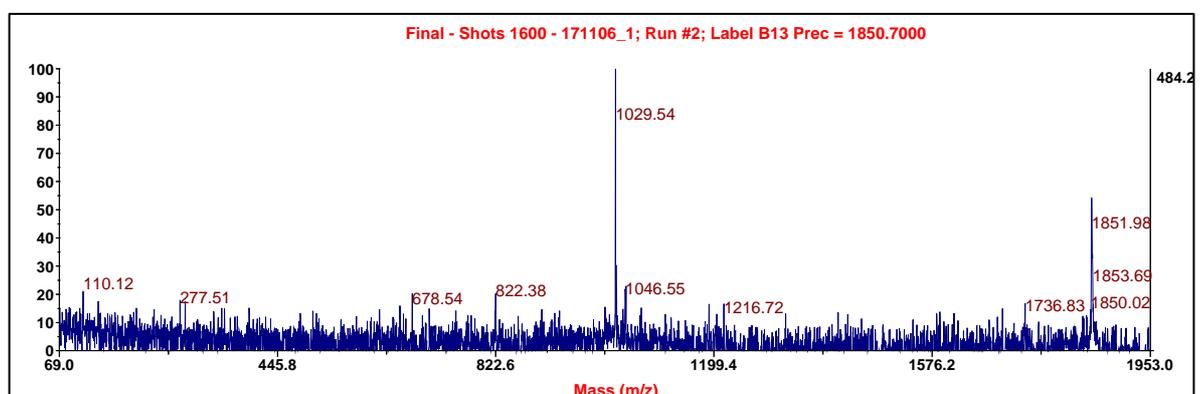


Abb. 4.19. MS/MS-Spektrum der Fragmentierung des durch das bifunktionelle Diazirin **23** markierten Angiotensin II ($M = 1851.98$). Das für das Insertionsprodukt gefundene Signal wurde für die Fragmentierung als Mutter-Ion definiert. Aufgenommen mit dem 4700 Proteomics Analyzer Massenspektrometer (Applied Biosystems).

In der nachfolgenden Tabelle sind die identifizierten Fragmente mit entsprechender Zuordnung zur Peptid-Sequenz aufgeführt (Tabelle 4.8).

Tabelle 4.8. Zuordnung der identifizierten Fragmente aus dem MS/MS-Experiment des mit Diazirin **23** markierten Peptides Angiotensin II.

Masse des Fragment-Ions [m/z]	Zugeordnete Sequenz
1851.98	[MH] ⁺
1736.83	[MH – D] ⁺
1216.72	?
1046.55	[MH – Carben] ⁺
1029.54	[MH – 822]
822.38	[MH – 1029]
678.54	?
277.51	?
110.12	H

Anhand der mäßigen Auflösung des MS/MS-Spektrums lassen sich keine exakten Aussagen über den Ort der Markierung des Peptides treffen. Das als Mutter-Ion identifizierte Signal mit der Masse $m/z = 1851.98$ zeigt jedoch eindeutig, dass eine Markierung des Peptides Angiotensin II mit dem photolytisch aus Diazirin **23** generierten Carben erfolgt ist. Das Signal mit der Masse $m/z = 1736.83$ entspricht dem photomarkierten Peptid nach Abspaltung des *N*-terminal lokalisierten Asparaginsäure-Restes. Weiterhin lassen sich auch die Peaks mit den Massen $m/z = 1046.55$ (Angiotensin II nach Abspaltung des Carbens) und $m/z = 1029.54$ (Angiotensin II nach Abspaltung von NH₃) zuordnen. Der Verlust von NH₃ ist charakteristisch für die im Peptid enthaltene Aminosäure Arginin. Das Fragment mit der Masse $m/z = 822.38$ resultiert aus der Abspaltung des Fragmentes mit der Masse $m/z = 1029.54$ vom Mutterion; die Aufklärung der zugehörigen Sequenz ist jedoch nicht möglich. Die übrigen unbekannt im Spektrum gefundenen Signale weisen eine zu geringe Intensität auf, so dass sie hier nicht als markante Peaks angesehen werden können. Somit sind Analyse und Charakterisierung des vorliegenden

MS/MS-Spektrums an dieser Stelle mit der Aussage, dass eine Photomarkierung stattgefunden hat, erschöpft.

In Abbildung 4.20 ist das aus dem MS/MS-Experiment des mit Azid **12** markierten Peptides Angiotensin II resultierende MS/MS-Spektrum gezeigt.

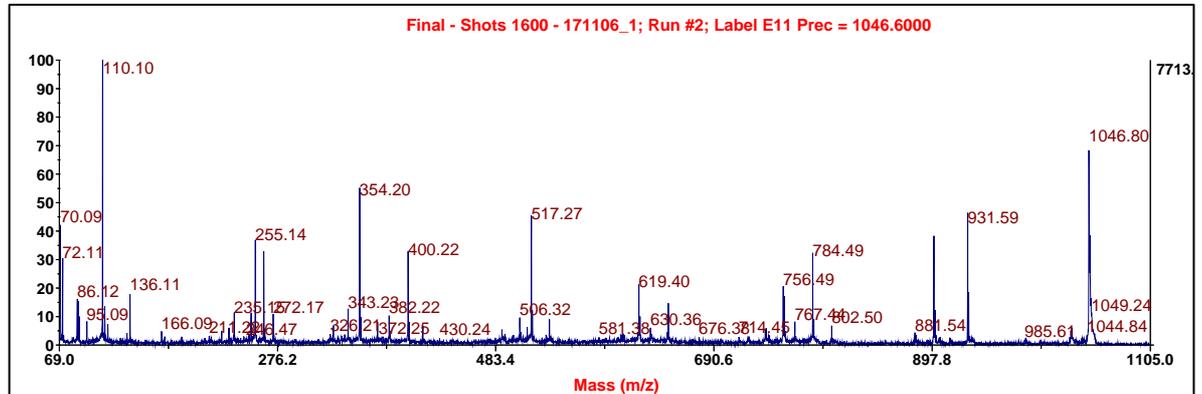


Abb. 4.20. MS/MS-Spektrum des durch das photolabile Azid **12** markierten Peptides Angiotensin II. Aufgenommen mit dem 4700 Proteomics Analyzer Massenspektrometer (Applied Biosystems).

Die Auflösung des Spektrums ist hierbei gut, so dass eine Reihe von auftretenden Fragment-Ionen identifiziert und der entsprechenden Peptid-Sequenz zugeordnet werden konnten. Die gewonnenen Daten sind in Tabelle 4.9 enthalten.

Tabelle 4.9. Zuordnung der identifizierten Fragment-Ionen aus dem MS/MS-Experiment des mit Azid **12** markierten Peptides Angiotensin II.

Masse des Fragment-Ions [m/z]	Zugeordnete Sequenz
1046.80	Angiotensin II
931.59	y ₇
881.54	b ₇
802.50	b ₅ + H ₂ O
784.49	b ₆
767.40	b ₆ – NH ₃
756.49	a ₅
676.38	y ₅
630.36	b ₅ – NH ₃
619.40	a ₄

581.38	?
517.27	b ₄ – NH ₃
506.32	a ₃
400.22	y ₃
382.22	?
354.20	b ₃ – NH ₃
343.23	a ₂
272.17	b ₂
255.14	b ₂ – NH ₃
136.11	Y
110.10	H
86.12	I
72.11	V
70.09	P

Ein Vergleich dieser Daten mit dem Fragmentierungsmuster des nicht markierten Peptides zeigt keine wesentlichen Unterschiede. Die Fragmentierung erfolgte hierbei sogar noch präziser; der aus der Arginin-Seitenkette resultierende Verlust von NH₃ in der b-Serie ist häufiger zu beobachten und auch ist die Anzahl der y-Fragmente erhöht. Die Sequenz des Peptides Angiotensin II kann somit eindeutig bestätigt werden, jedoch sind keine weiteren Fragmente vorhanden, die auf eine Markierung mit dem Photomarker Azid **12** hinweisen. Die Fragment-Ionen, die nicht zuzuordnen waren, geben ebenfalls keinen Hinweis auf die Insertion des aus Azid **12** gebildeten Nitrens in das Peptid. Die entsprechenden Signale zeigen im Spektrum eine sehr geringe Intensität, so dass dabei angenommen werden muss, dass es sich um Verunreinigungen handelt. Diese Analyse-Ergebnisse bestätigen die aus vorangegangenen Experimenten bereits resultierende Tatsache, dass die kovalente Bindung zwischen intermediär gebildetem Singulett-Nitren und Peptid extrem instabil ist. Bereits niedrige Kollisionsenergien sind hierbei zur Spaltung der Bindung, bei der das Peptid noch intakt bleibt ausreichend, so dass aus diesem MS/MS-Experiment keine Informationen über den Ort der Markierung erhalten werden konnten.

Im Falle des in Anwesenheit der beiden Benzophenone **16** und **19** bestrahlten Peptides Angiotensin II konnten anhand der MALDI-TOF-TOF-Analyse keine

Hinweise auf die Bildung eines Insertionsproduktes gewonnen werden, die anhand von Fragmentierungs-Experimenten weiter hätten untersucht werden können. Diese Ergebnisse bestätigen die aus vorangegangenen Experimenten gewonnenen Hinweise, dass Benzophenone für eine direkte und unkomplizierte photoinduzierte Markierung von Biomolekülen eher weniger geeignet sind (ohne Abbildung).

Aufgrund der allgemein auftretenden Problematik bei der massenspektrometrischen Analyse posttranslational modifizierter Peptide, wurde im Rahmen der MS-Geräteentwicklung eine alternative Methode entwickelt, die sog. CID/ETD-Ion Trap Massenspektrometrie.^[150] Die Elektronen Transfer Dissoziations (ETD)-Methode für Spektrometer, die mit einer Ionenfalle ausgestattet sind, erlaubt eine selektive Fragmentierung des Peptidrückgrates, während die Kohlenhydrat-Struktur der posttranslationalen Modifikation intakt bleibt. Eine Kombination aus Kollisions induzierter Dissoziation (CID)^[151] und Elektronen Transfer Dissoziation würde daher ideale Voraussetzungen für die massenspektrometrische Analyse von Kohlenhydrat-modifizierten Peptiden bieten. Bei den oben genannten Insertionsprodukten könnte dieses Verfahren eingesetzt werden, um weitere Hinweise bezüglich des Ortes der kovalenten Bindung der photoaktiven Spezies an das Peptid zu erhalten. Doch im Rahmen der Arbeit war keine Möglichkeit gegeben, die bei der Photolyse gebildeten Kreuzkupplungsprodukte mit den neu-entwickelten MS-Geräten zu analysieren.

4.2.6.2 SDS-Gelelektrophorese nach Schügger

Neben der massenspektrometrischen Analyse bietet die Methode der SDS-Gelelektrophorese eine Möglichkeit der Visualisierung markierter Peptide.^[181] Da der zu detektierende Massen-Bereich hierbei jedoch nach unten auf Massen von etwa 1000 - 1200 Da beschränkt ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst ein Tris-Tricin-Gel der beiden Modell-Peptide angefertigt und die einzelnen Banden im Anschluss mittels Silberfärbung detektiert (s. Kapitel 6.5.3). Das entsprechende Gel ist in Abb. 4.21 gezeigt. Eine ausführliche Beschreibung der Grundlagen der Gelelektrophorese ist in Kapitel 4.2.7.5 gegeben.

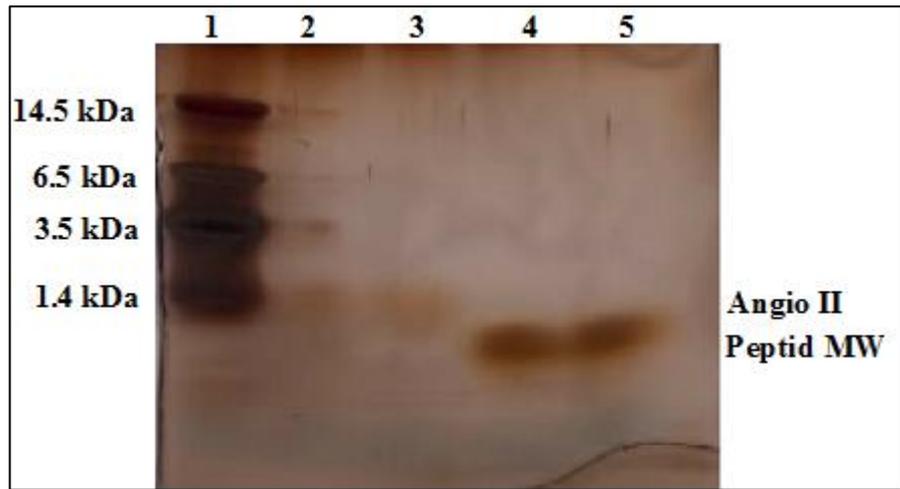


Abb. 4.21. Schägger-Gel der Modell-Peptide Angiotensin II und PTHIKWGD (Silberfärbung); Spur 1: Größenstandard, Spur 2: 4.6 µg Angiotensin II, Spur 3: 6.1 µg Angiotensin II, Spur 4: 4.2 µg PTHIKWGD, Spur 5: 5.6 µg PTHIKWGD. Die Namensbezeichnung auf der rechten Seite gibt gleichzeitig die ungefähre Laufhöhe der Peptide wieder.

Aus der Abbildung lässt sich eindeutig erkennen, dass die beiden Peptide mit der Silberfärbung zwar detektiert werden können, jedoch zeigt sich, dass die Auflösung des Geles nicht ausreichend ist, um zusätzliche Spots zu identifizieren, die den entsprechenden Insertionsprodukten zugeordnet werden können. Zwischen nicht markierten und markierten Peptiden liegt eine zu geringe Massendifferenz vor, die sich nicht im Bereich der maximal zu erzielenden Auflösung des Geles befindet. Außerdem ist die Färbung im Falle des Angiotensins II äußerst schwach. Ein Tris-Tricin-Gel, welches zusätzlich mit den vorher massenspektrometrisch nachgewiesenen Insertionsprodukten „Diazirin-**14**-Angiotensin II“, „Diazirin-**23**-Angiotensin II“ und „Azid-**12**-Angiotensin II“ belegt wurde, zeigte keine eindeutige Färbung und damit keine eindeutige Zuordnung der einzelnen Banden. Eine Erklärung hierfür bietet die Tatsache, dass die entsprechenden Peptide eine zu geringe Masse aufweisen und daher während des Anfarbe-Prozesses aus dem Gel herausdiffundieren. Die im Gel verbleibende Substanzmenge ist somit zu gering, um ihre eindeutige Detektion zu ermöglichen.

4.2.7 Bestrahlung des bakteriellen Adhäsins FimH in Anwesenheit der photoaktiven Mannoside als potenzielle Liganden

4.2.7.1 Allgemeines

In den vorangehenden Kapiteln wurde gezeigt, dass die sechs synthetisierten α -D-Mannoside durch Bestrahlung mit UV-Licht im Wellenlängenbereich von $\lambda \geq 320$ nm in ihre entsprechenden reaktiven Intermediate überführt werden können, welche in Anwesenheit geeigneter nukleophiler Gruppen kovalente Addukte mit Lösungsmittelmolekülen, Aminosäuren und Peptiden bilden können. Dabei zeigen sie sowohl unterschiedliche Insertionspräferenz als auch unterschiedliche Reaktivität, sind jedoch alle potenzielle Kandidaten für die Untersuchung von Protein-Ligand-Bindungseigenschaften mittels der Photoaffinitätsmarkierung. Dieses Kapitel befasst sich mit der Evaluierung aller sechs photoaktiven α -D-Mannoside **12**, **14**, **16**, **19**, **23** und **26** im Hinblick auf ihre Markierungs-Eigenschaften bei der Bestrahlung in Gegenwart des bakteriellen Adhäsins FimH.

Für diese Evaluationsreihe wurde nicht mit dem ursprünglichen bakteriellen Adhäsins FimH gearbeitet, sondern mit einem „Teilstück“, dem sog. *FimH truncate* (*FimH_{tr}*, Arbeitsgruppe S. D. Knight, Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Molecular Biology, Uppsala), welches eine am C-Terminus um 119 Aminosäuren gekürzte Sequenz aufweist. Zur Erleichterung der Reinigung und Isolierung wurde das *FimH truncate* am C-terminalen Ende mit einem aus sechs Histidinen bestehenden „Signal“-Peptid (ein sog. „6His-Tag“) versehen. Die exakte Sequenz des eingesetzten Protein-Teilstückes *FimH truncate* enthält demnach die Aminosäuren 1-160 des natürlichen FimH-Proteins sowie zwei Glycin-Reste und einen „6His-Tag“:

```
FAKTANGT AIPIGGGSAN VYVNLAPVVN VGQNLVVDLS  
TQIFCHNDYP ETITDYVTLQ RGSAYGGVLS NFSGTVKYSG  
SSYPFPTTSE TPRVVYNSRT DKPWPVALYL TPVSSAGGVA  
IKAGSLIAVL ILRQTNNYNS DDFQFVWNIY ANNDVVVPT  
GGHHHHHH
```

Das *FimH truncate* verfügt über dieselben biochemischen und biologischen Eigenschaften wie das an der Bakterienoberfläche exprimierte FimH-Protein (persönliche Kommunikation S. D. Knight). Das experimentell bestimmte Molekulargewicht des Protein-Teilstückes beträgt $m/z = 17839$ Da (Biflex II, Research Centre in Borstel); über die Online-Datenbank Prowl ergibt sich ein theoretisch berechnetes Molekulargewicht von $m/z = 17845$ Da, wobei die Differenz von 6 Da in diesem Massenbereich vernachlässigbar gering ist.

Ein SDS-Polyacrylamid-Gel des Protein-Teilstückes zeigte keine Verunreinigungen, so dass das modifizierte Protein für die Studien im Rahmen dieser Arbeit bedenkenlos eingesetzt werden konnte.

Für die Bestrahlungsexperimente wurden zunächst Probelösungen vorbereitet, die sowohl das Protein *FimH truncate*, als auch jeweils eines der synthetisierten Photophore **12**, **14**, **16**, **19**, **23** und **26** in definierter Menge enthielten. Das Verhältnis Protein zu Photophor wurde hierbei von 10:1 (optimales molares Verhältnis, bestimmt in Kapitel 4.2.5) auf 5:1 geändert, da ansonsten die Detektion gebildeter Kreuzkupplungsprodukte in SDS-Gelen und Western Blots mittels Affinitätsfärbung erschwert worden wäre. Die einzelnen Proben wurden entsprechend mit Aqua bidest. auf ein Gesamtvolumen von jeweils 500 μL verdünnt. Vor der Bestrahlung wurde jede Probelösung zunächst bei 37°C inkubiert, um die Ausbildung des Protein-Ligand-Komplexes unter physiologischen Bedingungen sicher zu stellen. Im Anschluss wurde jede Probe mit Licht im Wellenlängenbereich $\lambda \geq 320$ nm bestrahlt, wobei die für jede photoaktive funktionelle Gruppe ermittelten Bestrahlungsdauern (vgl. Kapitel 6.3.2) eingehalten wurden. Zur Kontrolle wurde eine entsprechende Probelösung, bestehend aus *FimH truncate* ohne photoaktive Spezies als Referenz vorbereitet, unter denselben Bedingungen inkubiert und für 20 min mit Licht im Wellenlängenbereich $\lambda \geq 320$ nm bestrahlt (s. Kapitel 6.3.6).

Zur Untersuchung der einzelnen bestrahlten Proben sowie der gebildeten Insertionsprodukte wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Reihe verschiedener Analysemethoden etabliert und angewendet:

- 1) Direkte Präparation der bestrahlten Proben für die massenspektrometrische Analyse (MALDI-TOF-MS mit auf das jeweilige Analyseproblem abgestimmter Matrix).

- 2) Affinitätsfärbung (Dot Blot) des photomarkierten und biotinylierten Proteins durch Ausbildung eines Biotin-Streptavidin-HRP-Farbstoff-Komplexes.
- 3) Isolierung der markierten biotinylierten Proteine mittels Biotin-Avidin-Affinitätschromatographie.
- 4) Auftragen der einzelnen Proben auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel.
- 5) Affinitätsfärbung (Western Blot) des markierten und biotinylierten Proteins durch „oxidatives Anfärben“ der jeweiligen gebildeten Komplexe.
- 6) Proteolytische In-Gel-Hydrolyse mit drei unterschiedlichen Proteasen und nachfolgende massenspektrometrische Analyse (MALDI-TOF-MS / MALDI-TOF-TOF-MS/ ESI-MS/ ESI-MS-MS).
- 7) Tryptische Hydrolyse direkt aus der Probelösung mit anschließender massenspektrometrischer Analyse (MALDI-MS/ ESI-MS).

In den folgenden Kapiteln werden diese Analysemethoden und die damit erhaltenen Ergebnisse beschrieben und diskutiert.

4.2.7.2 Direkte massenspektrometrische Analyse

Für die massenspektrometrische Analyse wurden die einzelnen Proben entweder mit α -Cyano-4-hydroxymizinsäure oder mit Sinapinsäure als Matrix-Substanz direkt auf dem Probeneller präpariert und mittels MALDI-TOF-MS vermessen (Kapitel 6.7.5). Die Messungen wurden mit drei verschiedenen Geräten durchgeführt, die im Linearmodus jeweils unterschiedliche Auflösungen lieferten. Dies führte zu leichten Schwankungen in den einzelnen Massenwerten, die jedoch im Toleranzbereich lagen. Im Allgemeinen ist es üblich, Proteine im Massenbereich um 20 kDa im Linearmodus zu vermessen, was zu einer verminderten Auflösung der einzelnen

Signale führt, sodass die jeweiligen Isotopenpeaks nicht mehr einzeln darstellbar sind. Daher werden die entsprechenden Massen in der vorliegenden Arbeit generell als „Average-Massen“ angegeben.

Die folgende Tabelle enthält die mit den drei verschiedenen Massenspektrometern gemessenen Daten für *FimH truncate* im nativen Zustand und für dasselbe Protein nach Bestrahlung (Tabelle 4.10). Der Vergleich beider Analyse-Ergebnisse ermöglicht zu beurteilen, ob das *FimH truncate* die für die Photoaffinitätsmarkierung benötigten Bestrahlungsbedingungen unbeschadet übersteht.

Tabelle 4.10. MALDI-TOF-Massen des *FimH truncate* im nativen Zustand sowie nach Bestrahlung, gemessen mit drei verschiedenen MS-Geräten.

	Biflex II	Biflex III	4700 Proteomics Analyzer
	Research Center Borstel (Bruker)	Organik CAU Kiel (Bruker)	Biologie CAU Kiel (Applied Biosystems)
FimH truncate	$m/z = 17839^{[a]}$	$m/z = 17863^{[a]}$	$m/z = 17865^{[a]}$
nativ	$m/z = 8914^{[b]}$	$m/z = 8919^{[b]}$	$m/z = 8921^{[b]}$
FimH truncate			
bestrahlt	$m/z = 17839^{[a]}$	$m/z = 17867^{[a]}$	$m/z = 17865^{[a]}$
(ohne Ligand)	$m/z = 8914^{[b]}$	$m/z = 8911^{[b]}$	$m/z = 8921^{[b]}$

[a] Einfach geladenes Kation $[M + H]^+$; [b] zweifach geladenes Kation $[M + 2H]^{2+}$.

Die für das bestrahlte native *FimH truncate* gemessenen Average-Massen stimmen jeweils, bis auf minimale Schwankungen, mit denen des nicht bestrahlten *FimH truncate*-Proteins überein und unterscheiden sich zudem nur geringfügig von dem für *FimH truncate* über die Online-Suchmaske Prowl berechneten Molekulargewicht von $m/z = 17845$. Die geringen Massenungenauigkeiten resultieren aus geräteabhängigen leichten Schwankungen der jeweiligen Auflösung der entsprechenden Massenspektren. Sie liegen jedoch in einem für den Massenbereich um 20 kDa akzeptablen Bereich. Als Kernaussage ist hierbei festzuhalten, dass das Protein sowohl durch Temperaturen von 37°C, als auch durch Bestrahlung mit UV-Licht im Wellenlängenbereich $\lambda \geq 320$ nm nicht verändert oder gar beschädigt wird. Somit kann es für die Photolyse-Reaktionen eingesetzt werden, ohne befürchten zu

müssen, dass Artefakte oder Nebenprodukte auf Seiten des Proteins auftreten. Abb. 4.22 zeigt das aufgenommene MALDI-TOF-Massenspektrum des nativen *FimH truncate*.

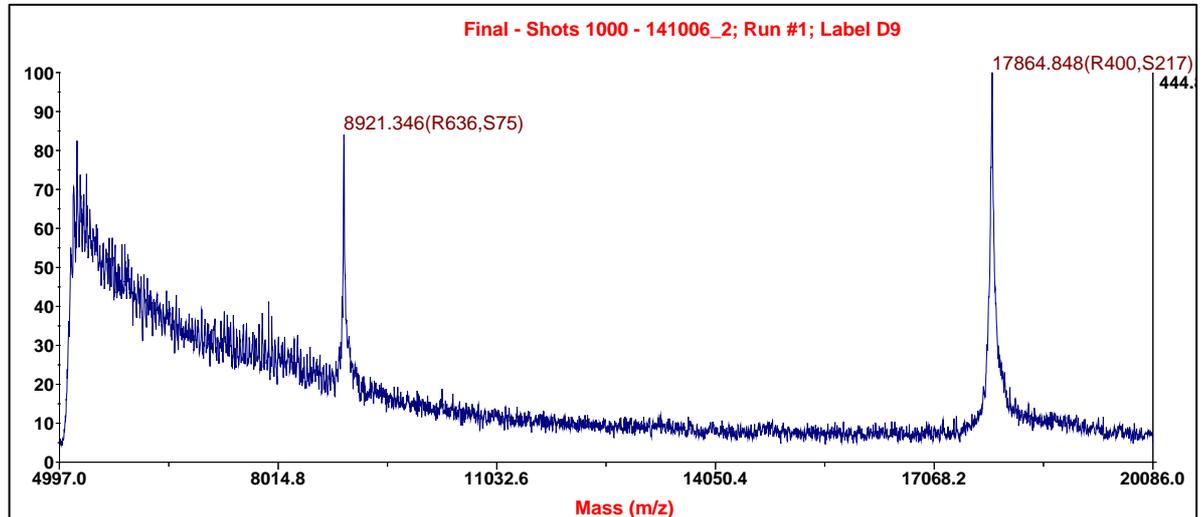


Abb. 4.22. MALDI-TOF-MS-Spektrum des *FimH*-Proteins in nativem Zustand (nach 20 min Bestrahlung). Aufgenommen mit dem 4700 Proteomics Analyzer Spektrometer (Applied Biosystems): $8921 = [M+2H]^{2+}$; $17864 = [M+H]^+$.

Der folgende Teil dieses Kapitels enthält die Ergebnisse, die sich aus der Inkubation und Bestrahlung des Protein Teilstückes *FimH truncate* in Anwesenheit der einzelnen photoaktiven Mannosid-Liganden **12**, **14**, **16**, **19**, **23** und **26** mit nachfolgenden Analysen ergeben; zudem schließt sich die Diskussion der erhaltenen Ergebnisse an.

Die Tabelle 4.11 zeigt die Massen, die nach Bestrahlung des *FimH truncate* Proteins in Gegenwart von jeweils einem photoaktiven Mannosid mittels MALDI-TOF-MS-Analyse ermittelt wurden.

Tabelle 4.11. Ermittelte Massen der Insertionsprodukte und des *FimH truncate*-Proteins nach Bestrahlung in Gegenwart der einzelnen photoaktiven Mannoside; die entsprechende Massendifferenz wurde berechnet (PA = Proteomic Analyzer, BII = Biflex II, BIII = Biflex III).

	Masse Insertions- produkt [m/z]	Masse FimH _{tr} [m/z]	Massen- differenz [Δ m/z]	MS-Gerät
FimH _{tr} / Azid 12	18205 ^[a]	17863 ^[a]	342	PA
FimH _{tr} / Diazirin 14	18200 ^[a]	17858 ^[a]	342	PA
FimH _{tr} / Benzophenon 16	17839 ^[a]	k. I. ^[b]	0	BII
FimH _{tr} / Benzophenon 19	17865 ^[a]	k. I. ^[b]	0	PA
FimH _{tr} / Diazirin 23	18672 ^[a]	17905 ^[a]	767	BIII
FimH _{tr} / Diazirin 26	18500 ^[a]	17697 ^[a]	803	BIII

k. I. = kein Insertionsprodukt;

[a] einfach geladenes Kation [M + H]⁺

Die in Tabelle 4.11 aufgeführten experimentell ermittelten Massen zeigen deutlich, dass es möglich ist, das Protein *FimH truncate* mit α-D-Mannosiden, die eine photolabile Funktionalität tragen, während der Bestrahlung mit UV-Licht zu markieren. Im Falle des Azides **12** und der Diazirine **14**, **23** und **26** konnten die entsprechenden Insertionsprodukte nach Inkubation und Bestrahlung eindeutig im MALDI-TOF-MS mit hoher Auflösung identifiziert werden. Die Markierung des Proteins *FimH truncate* erfolgte dabei in äquimolarem Verhältnis, was bedeutet, dass während der Bestrahlung pro Molekül Protein nur ein Molekül der jeweiligen photoaktiven Spezies kovalent gebunden wurde. Dies ist ein erster wichtiger Hinweis darauf, dass die photoaktiven Mannoside **12**, **14**, **23** und **26** womöglich, wie

beabsichtigt, in die Bindetasche des Proteins diffundiert sind und dort über entsprechende hydrophobe und hydrophile Wechselwirkungen fixiert wurden. Nach Ausbildung dieser Protein-Ligand-Komplexe führte die Reaktion mit den nach der Bestrahlung gebildeten reaktiven Intermediaten zur kovalenten Modifikation des Proteins. Zusätzlich ist die Existenz einer weiteren Mannose-spezifischen Bindetasche auf der Oberfläche des Proteins *FimH truncate* anhand dieser Ergebnisse sehr unwahrscheinlich.

In Abbildung 4.23 ist das MALDI-TOF-MS-Spektrum des Insertionsproduktes von *FimH truncate* und Azid **12** gezeigt. Deutlich erkennbar ist das nach der Bestrahlung aufgetretene Signal bei einem m/z -Verhältnis von 18205 neben dem Signal des nicht markierten *FimH truncate*-Proteins bei $m/z = 17863$. Die Differenz von $\Delta m/z = 342$ Da entspricht nahezu der Masse des bei Bestrahlung intermediär aus dem Azid **12** durch Stickstoffabspaltung gebildeten Nitrens ($M = 355$ ber. für $C_{13}H_{13}F_4NO_6$). Die für Messungen im Linear-Modus äußerst geringe Abweichung von $\Delta m/z = 13$ Da liegt für diesen Massenbereich im Toleranzbereich. Hierbei ist auch deutlich zu sehen, dass sich nur ein Insertionsprodukt gebildet hat und dass nur ein Molekül Azid pro Molekül Protein gebunden wird, ein sicherer Hinweis darauf, dass nur eine Mannose-spezifische Bindetasche auf der Oberfläche des *FimH truncate* Proteins existiert. Besonders auffällig im MS-Spektrum in Abbildung 4.23 ist die hohe Intensität des Signals für das kovalent markierte Addukt im Vergleich zur Signalintensität des nicht markierten Proteins. Dies kann zum einen bedeuten, dass die Ausbeute an markiertem Produkt sehr hoch ist, zum anderen ist es auch möglich, dass die beiden Spezies in der Ionenquelle des MALDI-TOF-MS-Gerätes unterschiedlich gut ionisierbar sind und somit die entsprechenden Signale mit vergleichbarer Intensität im Spektrum zu sehen sind.

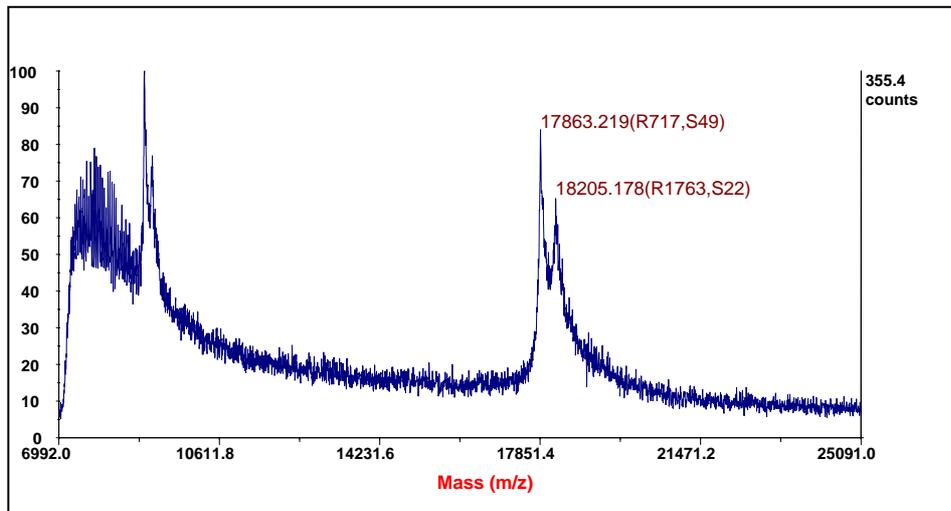


Abb. 4.23. MALDI-TOF-MS-Spektrum des bei Bestrahlung von *FimH truncate* mit dem Azid **12** gebildeten Insertionsproduktes. Aufgenommen mit dem 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems): 17863 = $[M+H]^+$; 18205 = $[M+\text{Nitren}+H]^+$; die beiden nicht gelabelten Signale bei $m/z \sim 8900$ entsprechen den jeweils zweifach geladenen Ionen $[M+H]^{2+}$ bzw. $[M+\text{Nitren}+H]^{2+}$.

Die Abbildung 4.24 zeigt das MALDI-TOF-MS-Spektrum des Insertionsproduktes der *FimH truncate*-Teilsequenz nach Inkubation und Bestrahlung mit dem Diazirin **14**. Das Signal mit der zugeordneten „Average-Masse“ von $m/z = 18200$ entspricht dem Insertionsprodukt, wobei wiederum nur ein Molekül Diazirin pro Molekül Protein gebunden wird; dies ist ebenfalls ein deutlicher Hinweis für die Existenz nur einer Mannose-spezifischen CRD auf der *FimH_{tr}*-Oberfläche. Das intensivere Signal mit dem Masse/Ladungs-Verhältnis $m/z = 17858$ zeigt das nicht markierte Protein *FimH truncate*. Der Intensitätsunterschied beider Signale fällt deutlicher aus als bei der Markierung mit dem Azid **12**. Im Falle der Markierung mit dem Diazirin konnte jedoch eine höhere Auflösung und damit verbunden eine größere Übereinstimmung mit der berechneten Masse des bei Bestrahlung intermediär gebildeten Carbens erzielt werden. Die Massendifferenz zwischen Insertionsprodukt und nicht markiertem Protein beträgt hierbei $\Delta m/z = 342$ und liegt somit nur um 8 Da neben dem berechneten Wert für das Carben ($M = 350$, ber. für $C_{15}H_{17}F_3O_6$), was in diesem Massenbereich einer sehr hohen Genauigkeit entspricht.

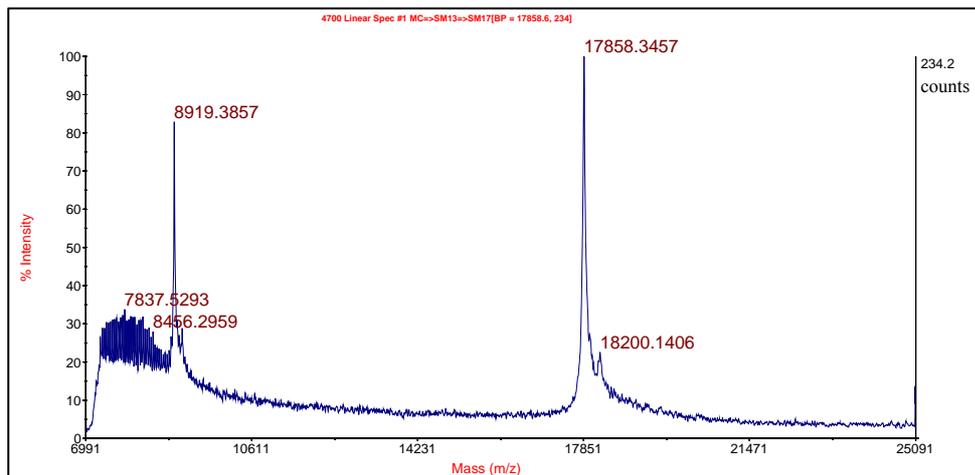


Abb. 4.24. MALDI-TOF-MS-Spektrum des bei der Bestrahlung des *FimH truncate*-Proteins mit Diazirin **14** gebildeten Insertionsproduktes. Aufgenommen mit dem 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems): 8919 = $[M+2H]^{2+}$; 17858 = $[M+H]^+$; 18200 = $[M+Carben+H]^+$.

Die in Tabelle 4.11 enthaltenen m/z -Werte der Insertionsprodukte, die nach Inkubation und Bestrahlung des Proteins *FimH truncate* mit den beiden bifunktionellen Diazirinen **23** und **26** mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie nachgewiesen wurden, zeigen ebenfalls, dass die photoinduzierte Markierung am Protein erfolgt ist. Die entsprechenden erhaltenen MALDI-TOF-Spektren sind in den Abbildungen 4.25 und 4.26 gezeigt.

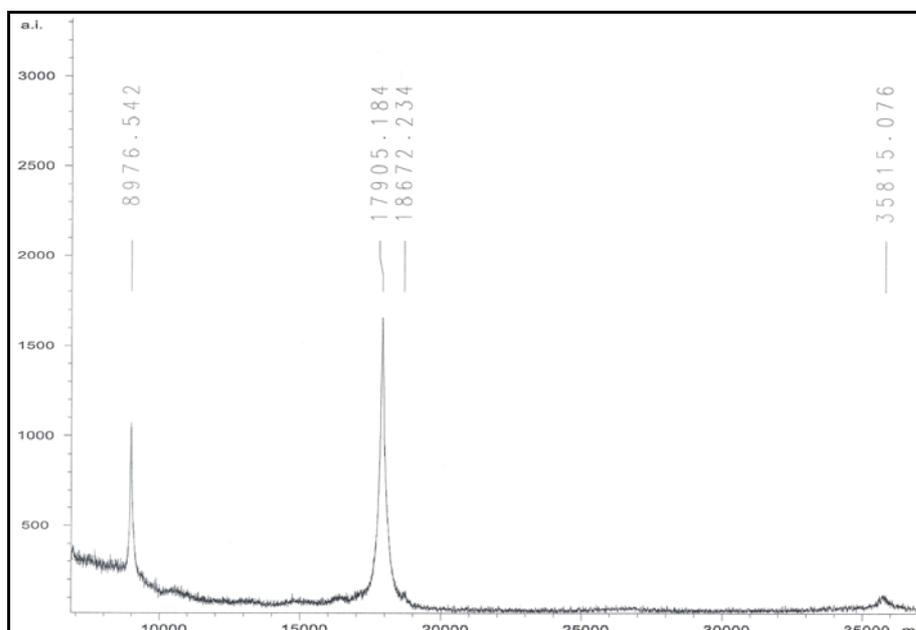


Abb. 4.25. MALDI-TOF-MS-Spektrum des bei der Bestrahlung des *FimH truncate*-Proteins mit Diazirin **23** gebildeten Insertionsproduktes. Aufgenommen mit dem 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems): 8976 = $[M+2H]^{2+}$; 17905 = $[M+H]^+$; 18672 = $[M+Carben+H]^+$.

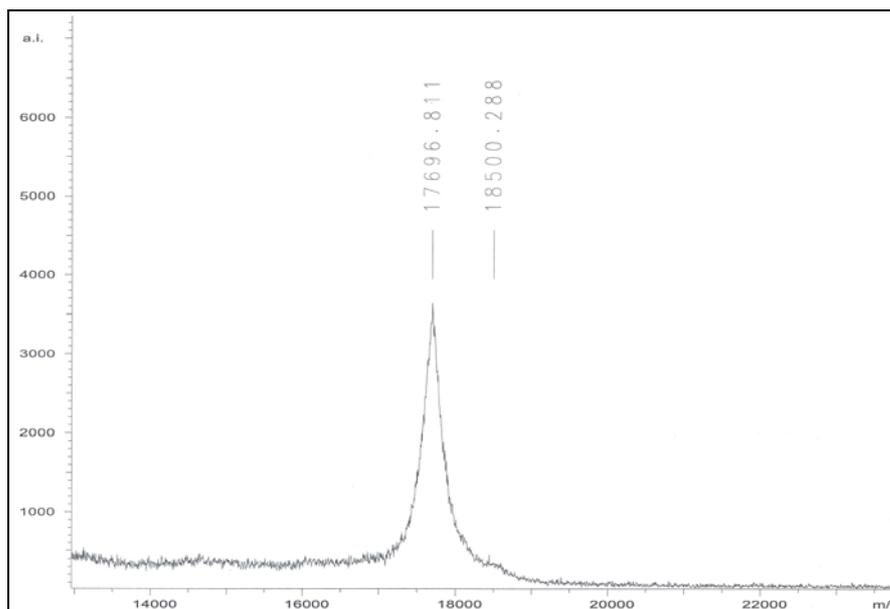


Abb. 4.26. MALDI-TOF-MS-Spektrum des bei der Bestrahlung des *FimH truncate*-Proteins mit Diazirin **26** gebildeten Insertionsproduktes. Aufgenommen mit dem 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems): 17696 = $[M+H]^+$; 18500 = $[M+Carben+H]^+$.

Es wird deutlich, dass jeweils ein Molekül der photoaktiven Verbindung mit einem Molekül Protein eine kovalente Bindung ausgebildet hat. Somit ist auch in diesen Fällen der Hinweis gegeben, dass sich lediglich eine Mannose-spezifische CRD auf der Oberfläche des *FimH truncate* Proteins befindet. Die Massendifferenzen zwischen den experimentell bestimmten Masse/Ladungs-Verhältnissen des Insertionsproduktes und des nicht markierten Proteins betragen im Falle des Diazirins **23** $\Delta m/z = 767$ Da und $\Delta m/z = 803$ Da für das Diazirin **26**. Im Vergleich zu den theoretisch berechneten Massendifferenzen, die den intermediär erzeugten Carbenen entsprechen ($M = 804$, ber. für $C_{34}H_{47}F_3N_6O_{11}S$), liegen die Abweichungen somit in der für das verwendete MS-Gerät akzeptablen Toleranzgrenze.

Die beiden photolabilen Benzophenon-tragenden α -D-Mannoside **16** und **19** zeigen in Gegenwart des Protein-Teilstückes *FimH truncate* keine Insertionsprodukte nach Inkubation und Bestrahlung. In den entsprechenden Massenspektren sind keine Signale detektierbar, die auf eine kovalente Bindung der beiden Benzophenone an das Protein hinweisen. In Abbildung 4.27 ist das MALDI-TOF-Massenspektrum nach der Bestrahlung von *FimH truncate* in Anwesenheit des bifunktionellen Benzophenons **19** gezeigt. Neben dem Signal des Proteins mit $m/z = 17865$ sind hierbei keine weiteren Adduktpeaks erkennbar.

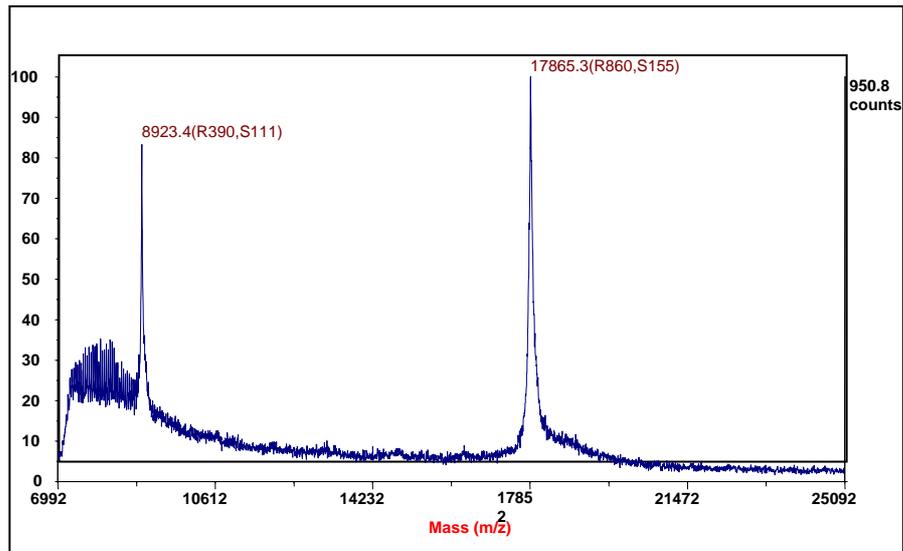


Abb. 4.27. MALDI-TOF-MS-Spektrum nach Inkubation und Bestrahlung des Proteins *FimH truncate* in Anwesenheit des Benzophenons **19**. Aufgenommen mit dem 4700 Proteomics Analyser (Applied Biosystems): $8923 = [M+2H]^{2+}$; $17865 = [M+H]^+$.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die beiden photolabilen Benzophenon-tragenden α -D-Mannoside **16** und **19** in Gegenwart des Protein-Teilstückes *FimH truncate* keine Insertionsprodukte nach Inkubation und Bestrahlung zeigen. Im Falle des Azides **12** sowie der Diazirine **14**, **23** und **26** konnten massenspektrometrisch Produkte nachgewiesen werden, die mit den Massen entsprechender Kreuzkupplungs-Produkte korrelieren. Festzuhalten bleibt außerdem, dass in keinem der aufgenommenen Spektren Signale identifiziert werden konnten, die ein mehrfach markiertes Protein zeigen. Somit ist die Existenz einer weiteren Mannose-spezifischen Bindetasche auf der Oberfläche von *FimH truncate* sehr unwahrscheinlich.

4.2.7.3 Dot Blot-Affinitätsfärbung

Eine weitere Möglichkeit, die neben der massenspektrometrischen Analyse zum Nachweis gebildeter kovalenter Addukte zwischen dem Protein *FimH truncate* und den einzelnen synthetisierten photoaktiven α -D-Mannosiden dienen kann, ist durch die Affinitätsfärbung mittels Dot Blot gegeben. Hierbei handelt es sich um eine sehr sensitive und selektive biochemische Methode, bei der Proteine auf einer

Blotmembran durch spezifische Antikörper mit nachfolgender Farbreaktion detektiert werden können.^[185]

Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieses Verfahren vor allem zur „Affinitätsfärbung“ auf der Blotmembran verankerter biotinylierter Proteine eingesetzt, in dem die hohe Affinität des Biotin-Restes zu Streptavidin bzw. Avidin ausgenutzt wurde. Streptavidin ist ein bakterielles Protein, welches als Tetramer aus *Streptomyces avidinii* isoliert wird und ein Molekulargewicht von $M \sim 75$ kDa besitzt. Es ist in der Lage, vier Biotin-Moleküle bzw. Biotin-Reste unter der Ausbildung eines nicht-kovalenten Komplexes zu binden und zeigt dabei eine hohe Bindungsaffinität mit einer Dissoziationskonstante $K_D = 4 \cdot 10^{-14}$ M.^[152] Im Bereich der Affinitätsfärbung ist das Biotin/Streptavidin-System besonders geeignet, da hier durch speziell aufeinander abgestimmte Anfärbereagenzien lediglich biotinylierte Biomoleküle erkannt werden. Die vorher nach Kapitel 6.6.1.3 vorbereiteten, inkubierten und bestrahlten Proben wurden auf eine Nitrocellulose-Membran (NC-Membran) aufgetragen, dort fixiert und analog der in Kapitel 6.6.1.3 beschriebenen Durchführung behandelt. Zur Detektion der biotinylierten Proteine wurde ein Streptavidin-horse-radish-peroxidase-(HRP)-Konjugat in Kombination mit dem Redox-Farbstoff 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) verwendet. Durch HRP wird die Oxidation des DAB enzymatisch katalysiert. Der entstehende Farbstoff präzipitiert und wird als rot-violett gefärbter „Spot“ auf der Membran sichtbar. Die Methode ist hoch sensitiv, und es können so bereits Proteinmengen im ng-Bereich nachgewiesen werden. Die folgende Abbildung 4.28 zeigt einen Dot Blot für das Protein *FimH truncate*, der mit unterschiedlichen Proben des Proteins belegt ist. Spur 1 enthält das native Protein, welches ohne photoaktive Spezies bestrahlt wurde. Spur 3 und Spur 6 sind mit *FimH truncate* belegt, welches in Anwesenheit der monofunktionellen photoaktiven Mannoside **12** und **14**, die beide keine Biotin-Einheit tragen, bestrahlt wurde. Spur 7 wurde als sog. „Blindprobe“ nicht belegt.

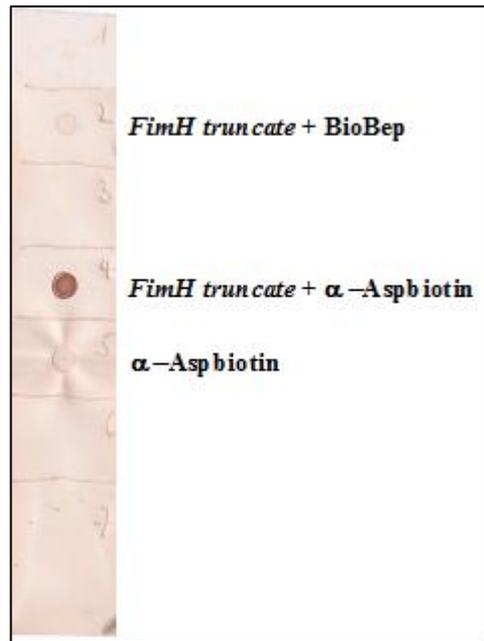


Abb. 4.28. Dot Blot des Proteins *FimH truncate* ($FimH_{tr}$). Spur 1: $FimH_{tr}$ (bestrahlt); Spur 2: $FimH_{tr}$ + Benzophenon-Derivat **19** (bestrahlt); Spur 3: $FimH_{tr}$ + Azid **12** (bestrahlt); Spur 4: $FimH_{tr}$ + Diazirin-Derivat **23** (bestrahlt); Spur 5: Diazirin-Derivat **23** (nicht bestrahlt); Spur 6: $FimH_{tr}$ + Diazirin-Derivat **14** (bestrahlt); Spur 7: leer.

Deutlich angefärbt ist in diesem Dot Blot die Spur 4, die *FimH truncate* enthält, welches in Gegenwart des bifunktionellen Diazirin-Derivates **23** bestrahlt wurde. Der gut sichtbare „Spot“ beweist, dass eine kovalente Verknüpfung zwischen Protein und Photophor in hoher Konzentration erfolgt ist und dass sich das gewünschte Biotintragende Insertionsprodukt gebildet hat. Das in Gegenwart der bifunktionellen biotinylierten Benzophenon-Spezies **19** bestrahlte *FimH truncate* Protein zeigt ebenfalls eine eindeutige, jedoch schwächere Färbung (Spur 2). Wurde lediglich die bifunktionelle Komponente **23** aufgetragen und bestrahlt (Spur 5), ergibt sich hierbei eine sehr schwache Färbung. Die Begründung für den schwach gefärbten „Spot“ liegt auf der Hand. Da es sich bei Verbindung **23** im Gegensatz zu dem markierten Protein um ein niedermolekulares „kleines“ organisches Molekül handelt, welches nicht ausreichend auf der NC-Membran fixiert wird, wird die zu Beginn des Experimentes aufgetragene Konzentration von **23** im Laufe der einzelnen Waschschriffe stark erniedrigt. Die unterschiedlichen Färbintensitäten der Proben-„Spots“ in Spur 2 und Spur 4 lassen sich anhand zweier Tatsachen begründen. Ein Vergleich des vorliegenden Dot Blots mit den Ergebnissen der massenspektrometrischen Analyse aus Kapitel 4.2.7.2 führt zu der Annahme, dass das Benzophenon **19** zur

photoinduzierten Markierung des Proteins *FimH truncate* nicht geeignet ist. Im MALDI-TOF-MS-Spektrum konnte kein entsprechendes Insertionsprodukt detektiert werden und auch der angefertigte Dot Blot zeigt lediglich eine äußerst schwache Farbintensität. Diese Ergebnisse sprechen für die Tatsache, dass im Falle der Benzophenone eine strukturell ungünstige Umgebung der CRD des Proteins vorliegt, so dass es sterisch bedingt nur geringfügig oder gar nicht zur Ausbildung einer kovalenten Bindung kommen kann. Das Insertionsprodukt liegt daher nur in äußerst geringer Konzentration vor, die kaum nachweisbar ist.

Die Untersuchung der Bindungsaffinität des Benzophenons **19** zum Protein könnte eine weitere Erklärung liefern. Die photoaktive Verbindung besitzt eine relativ starre räumliche Struktur, die mit der photolabilen Benzophenon-Funktionalität sowie der Biotin-Einheit zusätzlich räumlich sehr anspruchsvolle Substituenten trägt. Dies könnte dazu führen, dass die Bindungsaffinität zum FimH Protein im Gegensatz zu den anderen photoaktiven Mannosiden erheblich erniedrigt wird. In Kapitel 4.4 dieser Arbeit erfolgen sowohl eine nähere Betrachtung als auch eine ausführliche Diskussion der Bindungsaffinität der einzelnen photoaktiven Spezies zum Protein FimH.

Im Folgenden ist die Abbildung eines weiteren Dot Blots gezeigt (Abb. 4.29), der mit unterschiedlichen Proben des *FimH truncate*-Proteins in Anwesenheit der beiden bifunktionellen biotinylierten Diazirine **23** und **26** belegt ist.

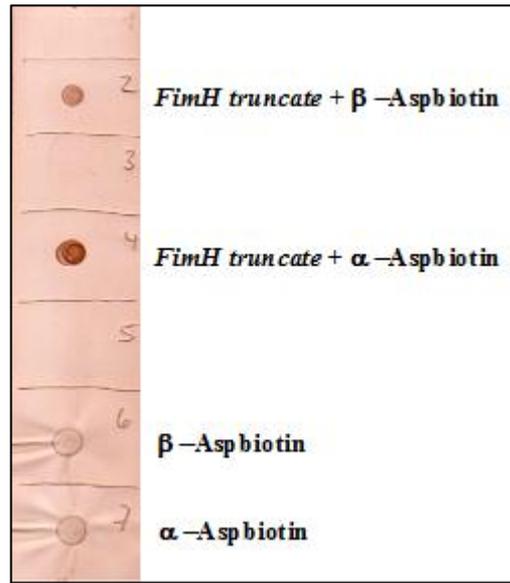


Abb. 4.29. Dot Blot des Proteins *FimH truncate* ($FimH_{tr}$). Spur 1: $FimH_{tr}$ (bestrahlt); Spur 2: $FimH_{tr}$ + Diazirin-Derivat 26 (bestrahlt); Spur 3: $FimH_{tr}$ + Diazirin-Derivat 23 (nicht bestrahlt); Spur 4: $FimH_{tr}$ + Diazirin-Derivat 23 (bestrahlt); Spur 5: $FimH_{tr}$ + Diazirin-Derivat 26 (nicht bestrahlt); Spur 6: Diazirin-Derivat 26 (nicht bestrahlt); Spur 7: Diazirin-Derivat 23 (nicht bestrahlt).

Diese Dot Blot-Affinitätsfärbung liefert klare Aussagen über die Markierung des Proteins mit den beiden Diazirinen 23 und 26. In den Spuren, die beide Komponenten enthalten, aber nicht bestrahlt wurden (Spur 3 und 5), ist keine Färbung zu erkennen, während die Spuren, die beide Komponenten nach der Bestrahlung zeigen (Spur 2 und 4), deutlich gefärbt sind. Die Spuren 6 und 7 sind jeweils mit einem nicht bestrahlten Diazirin ohne Protein belegt und zeigen schwach gefärbte „Spots“, was aus der schlechten Haftung niedermolekularer organischer Verbindungen auf NC-Membranen herrührt. Die Affinitätsfärbung mittels Dot Blot beweist daher eindeutig, dass das Protein *FimH truncate* von den biotinylierten Diazirinen 23 und 26 photoinduziert markiert werden kann und stellt somit additiv zur Massenspektrometrie eine wichtige hochsensitive Detektionsmethode im Rahmen dieser Arbeit dar.

4.2.7.4 Affinitätschromatographie

Im Rahmen dieser Arbeit konnten jeweils geeignete Verfahren der Affinitätschromatographie zur Reinigung und Isolierung markierter biotinylierter Aminosäuren sowie markierter biotinylierter Peptide erfolgreich etabliert werden. Im Falle der biotinylierten Aminosäuren erlaubte das Auftragen größerer Substanzmengen die Verwendung des in Kapitel 1.3 gezeigten Schemas (Schema 1.8) mit einer 1 ml Avidinsäule für die Reinigung. Bei den eingesetzten Modell-Peptiden Angiotensin II und „Peptid MW“ konnten nur sehr kleine Mengen im μ molaren Bereich für die photoinduzierten Markierungen eingesetzt werden. Eine Aufkonzentrierung der während der Bestrahlungsexperimente gebildeten biotinylierten Peptide konnte mit ZipTipTM-Pipettenspitzen (siehe Kapitel 6.7.4), die mit Avidin-Säulenmaterial gefüllt waren, erreicht werden. Dieses modifizierte Verfahren diente gleichzeitig der direkten Probenvorbereitung für eine anschließende massenspektrometrische Analyse, da die zu analysierenden Proben so direkt auf den Probenteller eluiert werden konnten.

Es wurde zudem versucht, auch größere Peptidfragmente im Massenbereich zwischen 6000 und 9000 Da bzw. größere Proteine im Massenbereich um etwa 20 kDa mittels Affinitätschromatographie zu isolieren. Hierbei konnten jedoch keine biotinylierten Fragmente bzw. Proteine angereichert werden. Auch ein Austausch des Elutionspuffers gegen eine 3 mM aq. Biotinlösung zur kompetitiven Verdrängung brachte keinen Erfolg, sodass bisher, bezogen auf die vorliegende Arbeit, keine geeignete Reinigungs-Methode für große Biomoleküle etabliert werden konnte. Der Parameter „Biotin-Konzentration“ konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht variiert werden. Zudem ist das Säulenmaterial speziell für Affinitätschromatographie von markierten Peptiden entwickelt worden, was darauf schließen lässt, dass die Porengröße zu gering ist, um eine effektive Bindung der markierten Proteine an die stationäre Phase zu ermöglichen.

4.2.7.5 SDS-Gelelektrophorese

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eines der wichtigsten Verfahren im Bereich der Proteinanalytik; es handelt sich dabei um eine Methode, mit der Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld aufgetrennt werden können. Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein anionisches Detergenz, welches die Proteine denaturiert, in dem es sich mit seiner hydrophoben Kette um das Proteinrückgrat „wickelt“ und fest an die Proteine bindet, was zur Ausbildung einer SDS-Polypeptid-Micelle mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit führt. Im Durchschnitt lagert sich ein SDS-Molekül pro zwei Aminosäuren (ca. 1.4 g SDS pro Gramm Protein) an. Durch die Eigenladung des SDS werden die Ladungen der Proteine so effektiv kompensiert, dass die Mobilität der Micellen im angelegten Spannungsfeld lediglich vom Molekulargewicht der entsprechenden Proteine abhängt. Über große Bereiche des SDS-Geles kann so eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der entsprechenden Molekulargewichte und den Wanderungsgeschwindigkeiten der SDS-Polypeptid-Micellen erreicht werden, was zu einer klaren Auftrennung der einzelnen Proteine nach Molekulargewicht führt. Mit Hilfe von spezifischen Standards lassen sich die Molekulargewichte der zu untersuchenden Proteine leicht bestimmen. SDS spaltet auch Wasserstoffbrücken, blockiert hydrophobe Interaktionen und faltet Proteine auf, was für eine erfolgreiche Auftrennung im Gel erforderlich ist.

Bei der Probenvorbereitung wird das Aufbrechen von sekundären, tertiären und quartären Strukturelementen (Denaturierung der Proteine) durch 5-minütiges Erhitzen auf 95°C und Zugabe von SDS erreicht. Die SDS-denaturierten Proteine / Polypeptide haben die Form flexibler Stäbchen mit einheitlich negativer Ladung pro Längeneinheit.

Ein kontinuierliches System verwendet lediglich einen Puffer für Behälter und Gel. Die Trennung erfolgt nach Ladung und Größe der Proteine, wobei die Ladung der Moleküle durch den Puffer beeinflussbar ist. Bei diskontinuierlichen Systemen besteht das Gel aus einem großporigen Sammelgel und einem engporigen Trenngel, wodurch eine höhere Auflösung erreicht wird.

Die Trennung der einzelnen Proteine erfolgt im Polyacrylamidgel. Diese Gele werden durch radikalische Copolymerisation von Acrylamid und *N,N*-Methylenbisacrylamid-Monomeren als sog. *Crosslinker* in wässrigen Puffersystemen

erhalten. Die Porengröße kann hierbei durch den Grad der Vernetzung bestimmt werden. Zur Anfertigung der in der vorliegenden Arbeit dokumentierten SDS-Gele zur Trennung von Proteinen wurden ausschließlich Polyacrylamid-Fertiggele (16 % TRIS-Glycin und 10-20 % TRIS-Glycin-Gradientengele) der Firma Anamed in Darmstadt verwendet. Das Verfahren diente zunächst zur Reinheitsüberprüfung der eingesetzten Proteine *FimH truncate*, Concanavalin A sowie des Proteinkomplexes FimCH, um in nachfolgenden Schritten die photoinduziert markierten Proteine auf dem Gel durch Anfärben zu detektieren und nachzuweisen.

Zur Reinheitsüberprüfung wurden, wie ausführlich in Kapitel 6.5.2 beschrieben, ausreichende Mengen (2 µg bis 7 µg) der beiden bakteriellen Adhäsine *FimH truncate* und FimCH in ein SDS-Tris-Glycin-Polyacrylamid-Gel (16 %) eingetragen und durch Anlegen eines zeitlich variierten Spannungsgradienten von 100-250 V aufgetrennt. Die einzelnen Proteine wurden im Anschluss auf dem Gel fixiert und die entsprechenden Banden mit Coomassie^[182] angefärbt. Das erhaltene Gel ist in Abb. 4.30 zu sehen.

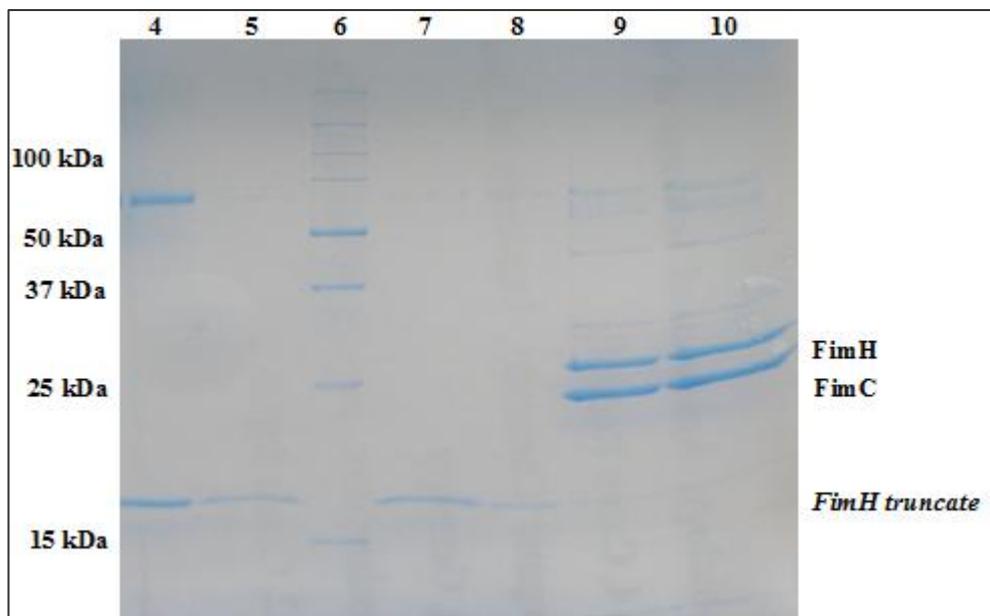


Abb. 4.30. Tris-Glycin-Gel (16 %) der Proteine *FimH truncate* und Concanavalin A sowie des Protein-Komplexes FimCH sowie (Coomassie-Färbung). Spur 4/5/7/8: *FimH truncate*, Spur 6: Molekulargewichts-Marker für Proteine (BioRad, vgl. Kapitel 6.5.2.2), Spur 9/10: *FimH-FimC-Komplex*.

Anhand des Markers in Spur 6 lassen sich die Molekulargewichte der einzelnen Proteine entsprechend zuordnen, wobei sich für *FimH truncate* eine Masse von 18 kDa, für das FimC-Teilstück eine Masse von 25 kDa und für das Adhäsin FimH eine Masse von 29 kDa ergeben. Ein Vergleich mit den in der Online-Datenbank Swissprot enthaltenen Massen bestätigt die Identität der Proteine (M = 17845 Da, ber. für *FimH truncate*; M = 26689 Da, ber. für FimC; M = 29069 Da, ber. für FimH). Die leichten Verunreinigungen des FimH/FimC-Proteinkomplexes im höhermolekularen Bereich resultieren vermutlich daraus, dass die sog. Signalpeptide, die meist am *N*-Terminus des Proteins lokalisiert sind und aus etwa 20 bis 30 Aminosäuren aufgebaut sind, noch enthalten sind.

Die Verunreinigung beim Molekulargewicht von etwa 65 kDa in Spur 4 resultiert von Bovinem Serum Albumin (BSA), welches in den hier nicht gezeigten Spuren 2 und 3 als Standardprotein enthalten war und möglicherweise beim Einbringen in das Gel in die Spur 4 eindiffundiert ist. Das Gel in Abb. 4.30 zeigt demnach, dass alle eingesetzten Proteine intakt sind und für nachfolgende Markierungsreaktionen eingesetzt werden können.

Zum Nachweis des photoinduziert markierten Proteinteilstückes *FimH truncate* wurden die vorher inkubierten und bestrahlten Proben (s. Kapitel 6.3.6) in ein Tris-Glycin-Polyacrylamid-Gel eingetragen und im angelegten elektrischen Feld aufgetrennt. Das fertige Gel wurde im Anschluss fixiert und die einzelnen Proteinbanden unter Anwendung der in Kapitel 6.5.4.2 beschriebenen sehr sensitiven Silberfärbung^[153] detektiert. Das fertige Gel ist in Abb. 4.31 gezeigt.

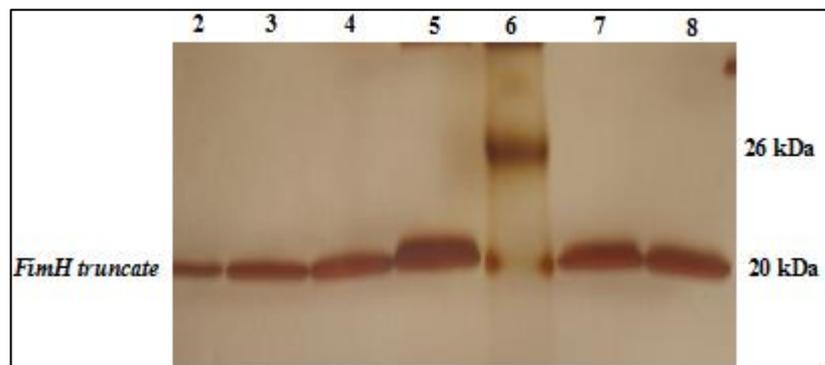


Abb. 4.31. SDS-Gel *FimH truncate*, Silberfärbung ($FimH_{tr}$). Spur 2/3: $FimH_{trunc}$ (bestrahlt), Spur 4: $FimH_{trunc}$ + Diazirin **14** (bestrahlt), Spur 5: $FimH_{trunc}$ + Azid **12** (bestrahlt), Spur 6: Protein-Standard, Spur 7: $FimH_{trunc}$ + Diazirin **23** (bestrahlt), Spur 8: $FimH_{trunc}$ + Benzophenon **19** (bestrahlt).

Im silbergefärbten Gel ist deutlich zu erkennen, dass in den Spuren 4, 5, 7 und 8 direkt über der Bande bei 18 kDa, die dem *FimH truncate*-Protein entspricht, eine zweite Bande angefärbt wurde, die die Existenz eines gebildeten Insertionsproduktes in der entsprechenden Probe eindeutig beweist. Aufgrund der geringen Massendifferenzen zwischen markiertem und nicht markiertem Protein konnte im Gel keine schärfere Trennung beider Banden erreicht werden, da die Auflösung der Polyacrylamid-Gele hierfür nicht ausreichte. Ein Vergleich mit den Spuren 2 und 3, in die jeweils nur das Protein eingetragen wurde macht jedoch deutlich, dass es sich in den anderen Fällen um eine zusätzliche Bande handelt.

Dieses silbergefärbte SDS-Polyacrylamid-Gel ist damit eine weitere analytische Methode, die die Existenz photoinduziert markierter Insertionsprodukte des bakteriellen Adhäsins *FimH truncate* mit den synthetisierten photoaktiven Mannosiden **12**, **14**, **16**, **19**, **23** und **26** eindeutig bestätigt.

4.2.7.6 Western Blot-Affinitätsfärbung

Die Technik des Western Blottings^[154] umfasst das Proteinblotting mit anschließender Affinitätsfärbung. Prinzipiell verläuft dieses Verfahren analog zum Dot Blot (Kapitel 4.2.7.3). Die Probenaufgabe auf die Membran erfolgt jedoch nicht durch Auftropfen aus einer vorbereiteten Probelösung, sondern durch einen sog. Elektrotransfer. Hierzu werden die zu untersuchenden Proteine zunächst in einem SDS-Gel aufgetrennt und direkt aus dem nicht angefärbten Gel elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose-Membran (NC-Membran) überführt. Meist findet der Protein-Transfer nach der Methode des „Semidry“-Verfahrens statt. Bei dieser Methode befinden sich Gel und Membran zwischen mit Puffer getränkten Filterpapieren; der Transfer erfolgt hierbei senkrecht zur Laufrichtung des Geles durch Anlegen einer Spannung an Graphit- oder Platin-beschichtete Elektroden. Nach Fixieren der übertragenen Proteine können diese dann mit Hilfe unterschiedlicher Affinitätsfärbung-Methoden untersucht werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Western Blot-Verfahren zum Nachweis photoinduziert markierter Proteine (*FimH truncate*, FimCH und ConA) verwendet. Dabei erfolgt die Affinitätsfärbung über die Erkennung biotinylierter

Proteine anhand eines HRP-konjugierten Streptavidins, welches mit dem Farbstoff 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) eine charakteristische Farbreaktion eingehen kann.

Die Untersuchung des markierten Proteins *FimH truncate* erfolgte durch Auftrennen entsprechend vorbereiteter Proben (s. Kapitel 6.3.6) in einem SDS-Tris-Glycin-Polyacrylamidgel mit anschließendem Elektrotransfer auf eine NC-Membran. Zur Überprüfung des erfolgreichen Transfers aller Proteine auf die Membran wurde zunächst eine proteinspezifische Färbung mit dem Azofarbstoff Ponceau S durchgeführt (s. Kapitel 6.6.2.2). Das Ergebnis der Färbung ist in Abb. 4.32 gezeigt.

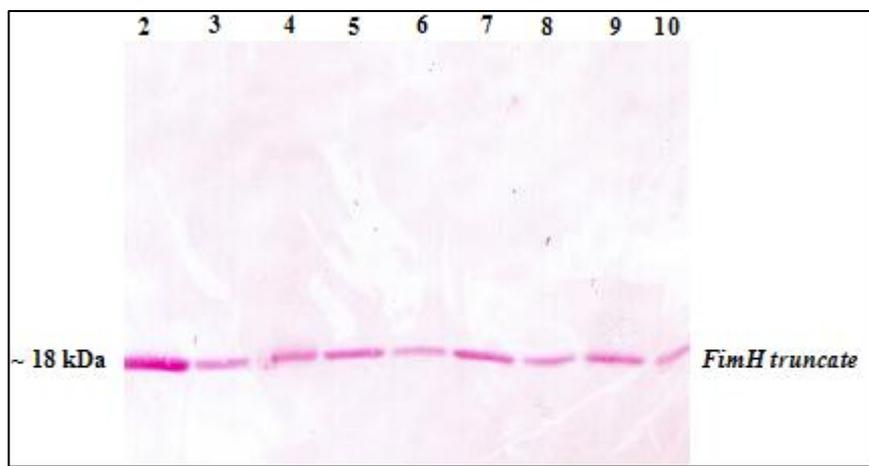


Abb. 4.32. Ponceau S-Färbung *FimH truncate* ($FimH_{tr}$): Spur 2: $FimH_{tr}$ (3.8 μ g, bestrahlt), Spur 3: $FimH_{tr}$ + Diazirin **14** (3.8 μ g, bestrahlt), Spur 4: $FimH_{tr}$ + Azid **12** (3.8 μ g, bestrahlt), Spur 5/6: $FimH_{tr}$ + Diazirin **23** (3.8 μ g / 1.9 μ g, bestrahlt), Spur 7/8: $FimH_{tr}$ + Diazirin **26** (3.8 μ g / 1.9 μ g, bestrahlt), Spur 9/10: $FimH_{tr}$ + Benzophenon **19** (3.8 μ g / 1.9 μ g, bestrahlt).

Die für das Protein *FimH truncate* charakteristischen Banden im Bereich von 18 kDa sind durch den Farbstoff Ponceau S durchgängig von Spur 2 bis Spur 10 angefärbt, was zeigt, dass der Proteintransfer korrekt und vollständig erfolgt ist. Eine scharfe Auflösung von Doppelbanden, die den jeweiligen photomarkierten Proteinen zuzuordnen sind, kann diese Färbemethode jedoch nicht leisten. Die verwendete Färbelösung dient also zum einen zur Visualisierung von Proteinen. Desweiteren bewirkt er, dass letztere auf der Membran fixiert werden und so direkt nach dem Auswaschen des Farbstoffes die Affinitätsfärbung der biotinylierten Proteine analog des in Kapitel 4.2.7.3 beschriebenen Dot Blot-Verfahrens (siehe auch Kapitel 6.6.3) erfolgen kann. In Abb. 4.33 ist die angefärbte Membran gezeigt.

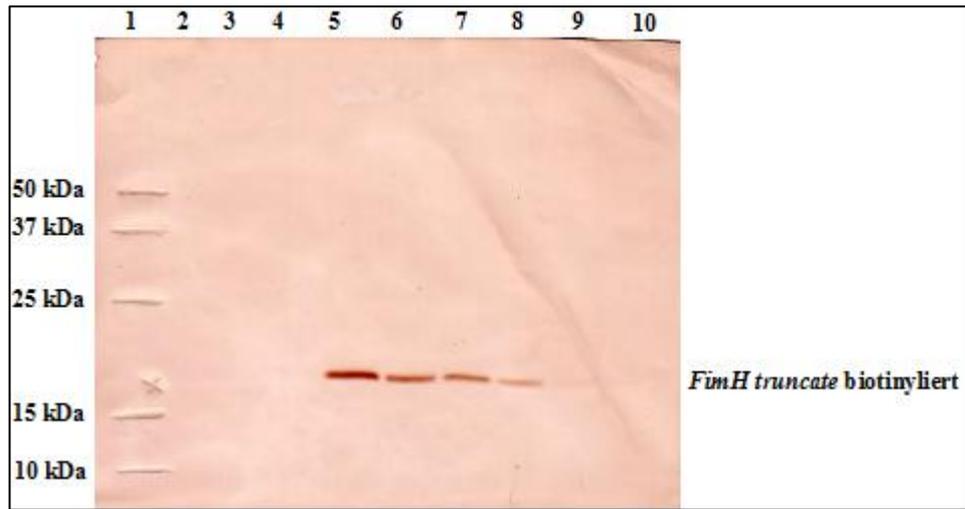


Abb. 4.33. Affinitätsfärbung des biotinylierten *FimH truncate* ($FimH_{tr}$). Spur 1: Protein-Standard, Spur 2: $FimH_{tr}$ (3.8 μ g, bestrahlt), Spur 3: $FimH_{tr}$ + Diazirin **14** (3.8 μ g, bestrahlt), Spur 4: $FimH$ + Azid **12** (3.8 μ g, bestrahlt), Spur 5/6: $FimH_{tr}$ + Diazirin **23** 3.8 μ g/1.9 μ g, bestrahlt), Spur 7/8: $FimH_{tr}$ + Diazirin **26** (3.8 μ g/1.9 μ g, bestrahlt), Spur 9/10: $FimH_{tr}$ + Benzophenon **19** (3.8 μ g/1.9 μ g, bestrahlt).

Zur Orientierung und Bestimmung der Molekulargewichte wurde in Spur 1 ein Protein-Standard aufgetragen, dessen einzelne Banden auf der Membran vor der Affinitätsfärbung mit Bleistift-Strichen markiert wurden. Das ebenfalls in Spur 1 mit Bleistift gesetzte Kreuz dient der Kontrolle und markiert das Molekulargewicht, welches die Ponceau S gefärbten *FimH truncate* Proteine aufwiesen. In der Abbildung ist deutlich zu erkennen, dass in den Spuren 2 bis 4 keine Färbung auftritt, obwohl in der vorher durchgeführten Färbung mit dem Protein-spezifischen Farbstoff Ponceau S eindeutig Proteine im Massenbereich von 18 kDa nachgewiesen wurden. Spur 2 enthält lediglich das bestrahlte *FimH truncate*, in den Spuren 3 und 4 wurde es durch die monofunktionellen, nicht biotinylierten photoaktiven Mannoside **12** und **14** markiert. Da sie keinen Biotin-Rest tragen, werden sie nicht von dem Streptavidin-HRP-Konjugat erkannt und somit nicht angefärbt. Die Spuren 5 bis 10 enthalten das *FimH truncate* Protein, welches in Anwesenheit der bifunktionellen biotinylierten photoaktiven Mannoside **23**, **26** und **19** bestrahlt wurde. In all diesen Spuren ist jeweils eine Bande etwas oberhalb der Masse 18 kDa deutlich gefärbt, was beweist, dass die einzelnen Photophore kovalent an das Protein gebunden haben und die daraus resultierenden biotinylierten Proteine von dem Streptavidin-HRP-Konjugat erkannt wurden. Da sich die Färbeintensität im Western Blot proportional zur Antikörperkonzentration verhält, lässt sich anhand der einzelnen gefärbten

Banden zum einen eine Abhängigkeit von der Probenkonzentration ableiten, zum anderen lassen sich auch unterschiedliche Ausbeuten an markiertem Protein erkennen. Die Spuren 5 und 6 enthalten das mit dem biotinylierten Diazirin **23** markierte Protein in unterschiedlicher Konzentration, wobei die Abschwächung der Farbtintensität von Spur 5 nach Spur 6 erkennbar ist. Analog verhält es sich in den Spuren 7 und 8, welche *FimH truncate* markiert mit dem biotinylierten Diazirin **26** enthalten. Die Spuren 9 und 10 zeigen eine deutliche Abschwächung der Farbtintensität gegenüber den vorherigen Banden. Hier wurde *FimH truncate* aufgetragen, welches mit dem bifunktionellen Benzophenon **19** markiert wurde. Die Farbabschwächung ist ein deutliches Zeichen dafür, dass es sich hierbei nicht nur um eine Konzentrationserniedrigung der eingesetzten Komponenten handelt, sondern um eine geringere Ausbeute an markiertem Protein. Das Benzophenon-Derivat **19** bindet nicht annähernd so effektiv an das Protein wie die beiden Diazirine **23** und **26**, was die Resultate der vorherigen Studien eindeutig bestätigt. Ein Vergleich der Farbtintensität der Spuren 5/6 (Verbindung **23**) gegenüber der Farbtintensität der Spuren 7/8 (Verbindung **26**) lässt ebenfalls Unterschiede erkennen. Die Intensität der gefärbten Banden im Western Blot ist im Falle von **23** deutlich höher, als die von **26**. Diese Tatsache belegt die Hypothese aus Kapitel 3.2.5; der strukturelle Unterschied beider bifunktionellen Diazirine **23** und **26** führt zu unterschiedlich starken Bindungsaffinitäten gegenüber dem Protein *FimH truncate*. Demnach wird das Mannosid **23** mit der um ein C-Atom weiter vom Zuckerring entfernten photoaktiven funktionellen Gruppe stärker vom Protein gebunden als das Diazirin **26**.

4.2.7.7 Ergebnis der Proteolytische Hydrolyse im Gel

Die Methode des proteolytischen Verdaus wurde an dieser Stelle angewendet, um über den Peptidfragment-Massenfingerprint Informationen über die genaue Insertionsposition der photoaktiven α -D-Mannoside an dem Protein *FimH truncate* zu erhalten. Zunächst wurden die hydrolytischen Spaltungen im Gel durchgeführt, wobei jeweils drei parallele Ansätze mit den Enzymen Trypsin, Chymotrypsin und Glu-C durchgeführt wurden. Die einzelnen Arbeitsschritte sind in Kapitel 6.7.2 dieser Arbeit genau beschrieben. Zunächst wurde das nicht markierte Protein *FimH*

truncate nach Reinigung mittels SDS-Gelelektrophorese direkt aus dem Gel mit den einzelnen Enzymen Trypsin, Glu-C und Chymotrypsin hydrolysiert, um festzustellen, inwieweit sich das Protein jeweils hydrolytisch spalten lässt und welches Enzym letztendlich für das vorliegende Analyseproblem am besten geeignet ist. Desweiteren sollten diese *FimH truncate*-Spaltungen als Referenzen dienen, um Informationen darüber zu gewinnen, ob sich die gebildeten Peptid-Fragmente überhaupt massenspektrometrisch identifizieren lassen. In Abbildung 4.34 ist ein MS-Spektrum gezeigt, welches aus der tryptischen „in-Gel-Hydrolyse“ des *FimH truncate*-Proteins resultierte.

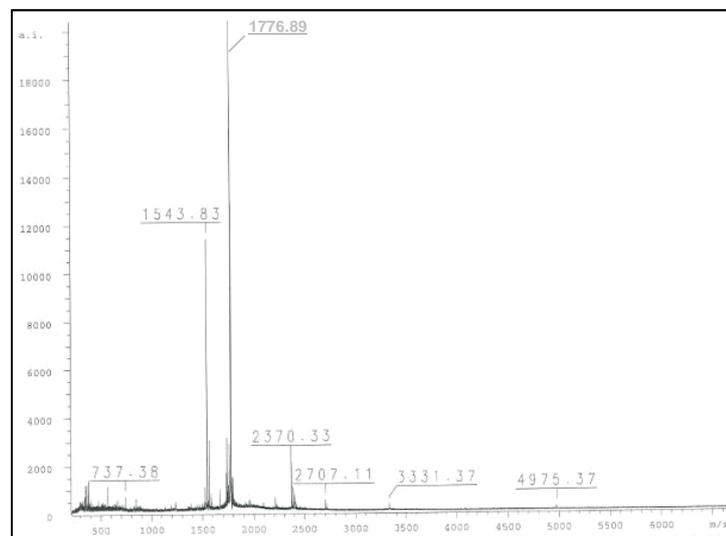


Abb.4.34. Massenspektrum resultierend aus der tryptischen „in-Gel-Hydrolyse“ des Adhäsins *FimH truncate* aufgenommen am Biflex III der Firma Bruker. Das intensive, hier nicht „gelabelte“ Signal besitzt die Masse $m/z = 1776.89$.

Die folgende Tabelle 4.12 enthält die aus dem Spektrum identifizierten Signale mit den entsprechenden Massen sowie die mit Hilfe der online-Datenbank ProteinProspector^[155] aus der in-silico-Hydrolyse ermittelten zugehörigen Peptid-Sequenzen.

Tabelle 4.12. Identifizierte Peptid-Fragmente mit entsprechender Masse, resultierend aus der tryptischen Hydrolyse des *FimH truncate*-Proteins mit Zuordnung zur Aminosäure-Sequenz.

Masse des Fragment-Ions [Da]	Zugeordnete Sequenz
737.38	Aminosäuren 93 bis 98
1543.83	Aminosäuren 61 bis 76
1776.89	Aminosäuren 77 bis 92
2370.33	Aminosäuren 99 bis 121
2707.11	?
3331.37	?
4975.37	?

Aus dem MS-Spektrum konnten somit nur vier für das Protein charakteristische Massen identifiziert werden. Das Peptid-Fragment mit der Masse $m/z = 737.38$ entspricht den Aminosäuren (R)VVYNSR(T) der *FimH truncate*-Sequenz; das Fragment mit der Masse $m/z = 1543.83$ entspricht der Aminosäure-Sequenz (R)GSAYGGVLS NFSGTVK(Y); das Fragment mit der Masse $m/z = 1776.89$ lässt sich der AS-Sequenz (K)YSGSSYPFPTTSETPR(V) zuordnen und das Peptid-Fragment mit der Masse $m/z = 2370.33$ lässt sich dem *FimH_{tr}*-Protein-Sequenzabschnitt (R)TDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIK(A) zuordnen. Die drei mit „?“ versehenen Fragment-Ionen, die im MS-Spektrum gefunden wurden, konnten nicht interpretiert werden. Bei Betrachtung der in Tabelle 4.12 enthaltenen Daten wird klar, dass die vier charakterisierten Peptid-Fragmente den „mittleren Sequenzbereich“ des *FimH truncate* Proteins sehr exakt abdecken. Mit Hilfe der online-Suchmaske ProteinProspector^[155] ist es ebenso möglich, anhand der Fragmente die korrekte Protein-Sequenz des *FimH truncate* zu identifizieren. Daher wurde die Protease Trypsin für die Hydrolyse des photoinduziert markierten Proteins im Hinblick auf die Analyse des Markierungsortes in die engere Wahl gezogen. Die Abbildung 4.35 enthält ein Massenspektrum, welches aus der enzymatischen Hydrolyse des *FimH truncate* Proteins mit Chymotrypsin erhalten wurde.

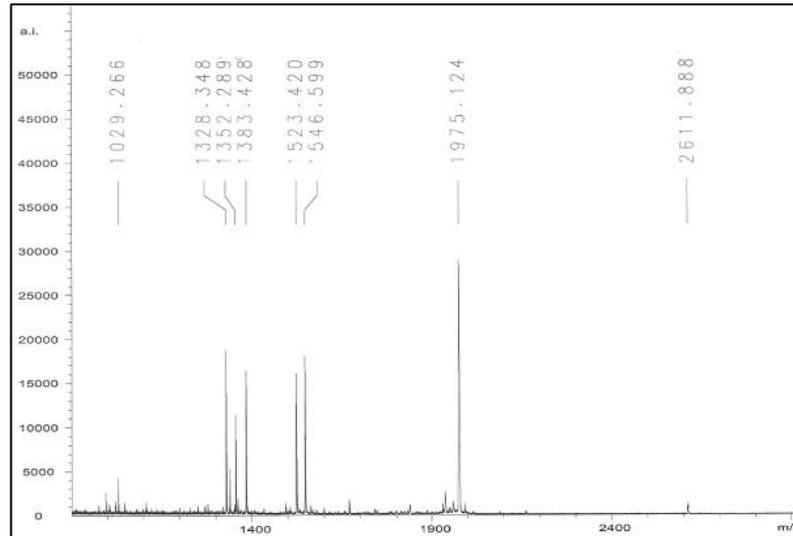


Abb.4.35. MS-Spektrum resultierend aus der enzymatischen Spaltung des FimH truncate-Proteins mit Chymotrysin. Aufgenommen mit dem Biflex II Massenspektrometer von Bruker.

Die folgende Tabelle enthält die gefundenen Peptid-Fragmente mit ihren entsprechenden Massen sowie die aus der online-Suchmaske ProteinProspector^[155] per in-silico-Hydrolyse ermittelten Peptid-Sequenzen.

Tabelle 4.13. Identifizierte Peptid-Fragmente mit entsprechender Protein-Sequenz-Zuordnung, die aus der enzymatischen Hydrolyse des FimH_n-Proteins mit Chymotrypsin erhalten wurden.

Masse des Fragment-Ions [Da]	Zugeordnete Sequenz
1029.26	?
1328.34	Aminosäure 65 bis 77
1352.28	Aminosäure 44 bis 64 (ohne Signalpeptid AS 46 bis 54)
1383.42	Aminosäure 96 bis 107
1523.42	?
1546.59	Aminosäure 96 bis 108
1975.12	Aminosäure 78 bis 95
2611.88	Aminosäure 82 bis 105

Wie an den Daten der Tabelle zu sehen ist, konnten bei der Hydrolyse mit Chymotrypsin sechs Peptid-Fragmente anhand der online-Suchmaske Protein Prospector^[155] der korrekten Protein-Sequenz zugeordnet werden. Hierbei entspricht das gefundene Fragment mit der Masse $m/z = 1328.34$ dem Protein-Sequenzabschnitt (Y)GGVLSNFSGTVKY(S); das Fragment mit der Masse $m/z = 1352.28$ der Aminosäure-Sequenz (F)CHNDYPRGSAY(G); das Peptid-Fragment mit der Masse $m/z = 1383.42$ lässt sich dem Sequenzabschnitt (Y)NSRTDKPWPVAL(Y) zuordnen; das Fragment mit der Masse $m/z = 1546.59$ entspricht dem Abschnitt (Y)NSRTDKPWPVALY(L); das gefundene Peptid-Fragment mit der Masse $m/z = 1975.12$ wurde der Protein-Sequenz (Y)SGSSYPFPTTSETPRVVY(N) zugeordnet und das Fragment mit der Masse $m/z = 2611.88$ entspricht der *FimH_{tr}* - Teilsequenz (F)SGTVKYSGSSYPFPTTSET PRVVY(N). Somit ist auch bei der Spaltung mit dem Enzym Chymotrypsin, ähnlich der tryptischen Hydrolyse, der mittlere Sequenzbereich des *FimH truncate*-Proteins sehr gut abgedeckt. Die hydrolytischen Spaltungen des photolytisch markierten *FimH_{tr}*-Proteins mit Chymotrypsin resultierten allerdings in unübersichtlichen Massenspektren, die eine Vielzahl an Signalen enthielten, die nicht eindeutig der entsprechenden Protein-Sequenz zuzuordnen waren. Diese Komplexität ist eine Folge aus der charakteristischen Eigenschaft des Chymotrypsins, Proteine nicht an spezifischen Stellen zu spalten.^[92,93] Durch die Einführung der Photomarker in das Protein könnte gegebenenfalls die Selektivität des Chymotrypsins im Vergleich zum nicht markierten Protein *FimH_{tr}* weiter vermindert worden sein. Daher wurde an dieser Stelle auf entsprechende Abbildungen und Interpretationen der erhaltenen Spektren verzichtet.

Die enzymatische Spaltung des nicht markierten *FimH truncate*-Proteins mit der Endoprotease Glu-C lieferte nach massenspektrometrischer Analyse keine interpretierbaren Spektren, sondern überwiegend unspezifische Signale. Daher schied das Enzym für weitere Untersuchungen im Bereich dieser Arbeit aus und es soll daher an dieser Stelle auch auf entsprechende Abbildungen verzichtet werden.

Um weitere Hinweise über den genauen Markierungsort des Proteins *FimH truncate* nach Bestrahlung in Gegenwart der synthetisierten photoaktiven Liganden zu erhalten, fand die tryptische In-Gel-Hydrolyse auch bei den markierten Proteinen Anwendung. In den folgenden beiden Abbildungen sind Massenspektren gezeigt, die

jeweils aus der Spaltung des *FimH truncate*-Proteins nach Bestrahlung mit dem bifunktionellen Diazirin **23** erhalten wurden.

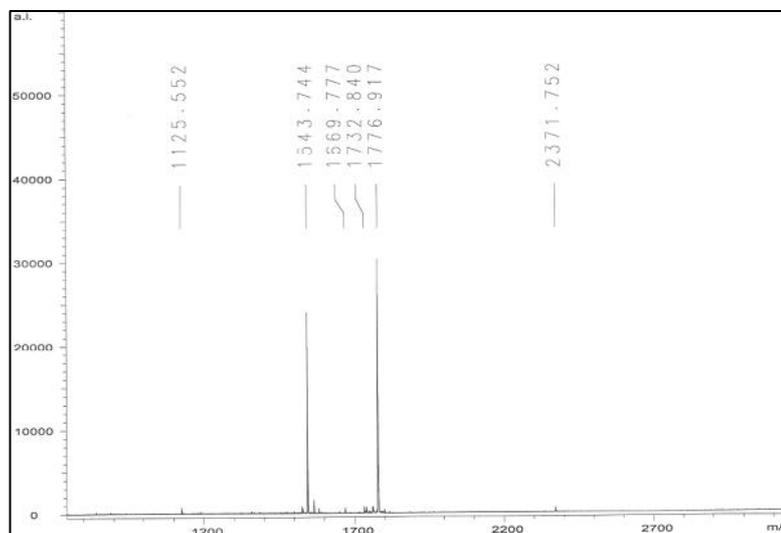


Abb. 4.36. Massenspektrum resultierend aus der tryptischen „in-Gel-Hydrolyse“ des mit Diazirin **23** markierten Proteins *FimH truncate*. Aufgenommen mit dem Biflex II Massenspektrometer von Bruker.

Die einzelnen gefundenen Peptid-Fragmente mit ihren entsprechenden Massen sowie die jeweilige Zuordnung zur Aminosäure-Sequenz anhand der in-silico-Berechnung mit der online-Suchmaske ProteinProspector^[155] sind in Tabelle 4.14 aufgeführt.

Tabelle 4.14. Peptid-Fragmente aus dem tryptischen in-Gel-Verdau des mit Diazirin **23** markierten Proteins *FimH truncate* mit entsprechender Zuordnung der Aminosäure-Sequenzen.

Masse des Fragment-Ions [Da]	Zugeordnete Sequenz
1125.55	Aminosäuren 122 bis 132
1543.74	Aminosäuren 61 bis 76
1669.77	?
1732.84	?
1776.91	Aminosäuren 77 bis 92
2371.75	Aminosäuren 99 bis 121

Wie aus der oben gezeigten Tabelle ersichtlich, konnten insgesamt vier Peptid-Fragmente aus dem erhaltenen Massenspektrum identifiziert und zugeordnet werden. Der Vergleich zu den Daten, die aus der tryptischen Spaltung des nicht markierten *FimH truncate*-Proteins erhalten wurden (Abb. 4.35 und Tab. 4.12) zeigt keine wesentlichen Unterschiede. Statt des Signales mit der Masse $m/z = 737.38$ wurde ein Peptid-Fragment mit der Masse $m/z = 1125.55$ gefunden, welches sich der Aminosäure-Sequenz (K)AGSLIAVLILR(Q) des nicht markierten Proteins zuordnen lässt. Keines der gefundenen Peptid-Fragmente liefert einen Hinweis auf eine Markierung des Proteins; die mit „?“ versehenen Signale konnten nicht interpretiert werden. Auffällig bei allen aufgenommenen Spektren ist, dass keines der identifizierten Peptid-Fragmente den Bereich der Kohlenhydrat-Erkennungsdomäne des *FimH truncate*-Proteins abdeckt. Die in-silico-Berechnungen mit der online-Suchmaske ProteinProspector^[155] zeigen, dass die Peptid-Fragmente, welche die Aminosäuren der Umgebung der CRD des Proteins beinhalten, hauptsächlich im Massenbereich von $m/z = 6000$ bis $m/z = 9000$ liegen. Mit den im Rahmen dieser Arbeit angewendeten MS-Methoden war es jedoch nicht möglich, diesen Massenbereich hinreichend aufzulösen; es konnten lediglich Peptid-Fragmente bis zu einer Masse von $m/z = 3500$ detektiert werden. Das in Abbildung 4.37 enthaltene MS-Spektrum macht dieses Analysen-Problem deutlich. Im Massenbereich $> m/z = 3500$ war es nicht mehr möglich, auftretende Signale zu detektieren. Auch Messungen im Linear-Modus brachten hierbei keine Verbesserungen.

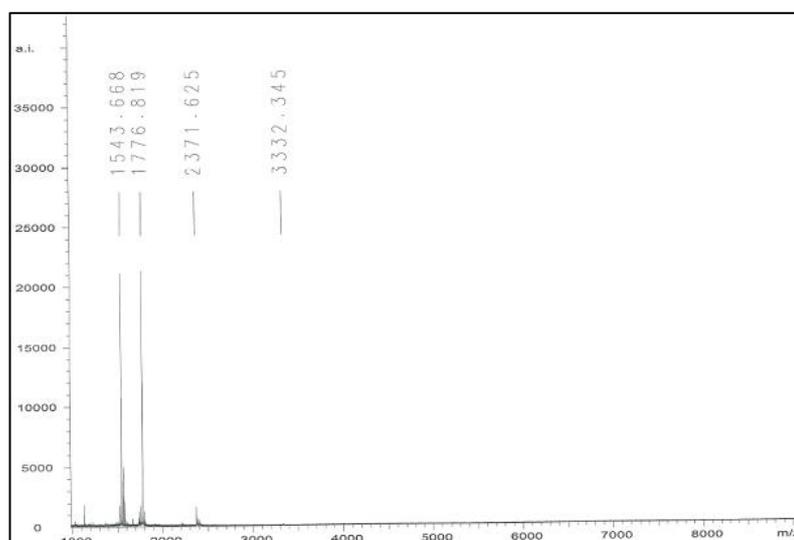


Abb. 4.37. Massenspektrum, welches aus der tryptischen „in-Gel-Hydrolyse“ des mit Diazirin 23 markierten *FimH truncate*-Proteins erhalten wurde; aufgenommen mit dem Biflex II Gerät von Bruker.

Da mit Hilfe der enzymatischen Hydrolyse und anschließender massenspektrometrischer Analyse keine Peptid-Fragmente identifiziert werden konnten, die den Bereich der Bindetasche des *FimH_{tr}*-Proteins abdecken, war es somit auch nicht möglich, gezielte Aussagen über den genauen Markierungsort des Proteins zu treffen. Anhand der identifizierten Peptid-Fragmente lässt sich jedoch festhalten, dass hier keine kovalente Bindung mit den photoaktiven Liganden erfolgt ist. Das bedeutet, dass in den erfassten Sequenzbereichen des untersuchten Proteins *FimH truncate* keine unspezifische Markierung erfolgt ist.

Die hier geschilderten Analyse-Ergebnisse traten bei allen Proben auf, die nach enzymatischer Hydrolyse des mit den synthetisierten photoaktiven Liganden markierten *FimH_{tr}* massenspektrometrisch vermessen wurden. Daher sollen an dieser Stelle keine weiteren Massenspektren gezeigt werden.

4.2.7.8 Tryptische Hydrolyse aus der Lösung

Alternativ zur in Kapitel 4.2.7.7 beschriebenen Hydrolyse aus dem SDS-Gel, kann die enzymatische Spaltung von Proteinen auch direkt aus der Lösung durchgeführt werden. Bei dieser „direkten“ Hydrolyse liegen die zu untersuchenden Proteine, im Gegensatz zum in-Gel-Verdau, in höherer Konzentration vor. Zur Analyse der Addukte des photoaktiv markierten Proteins *FimH* kann diese Methode daher von Vorteil sein. Falls die Konzentration der gebildeten Insertionsprodukte für die massenspektrometrische Erfassung der Peptid-Fragmente bei der enzymatischen in-Gel-Hydrolyse zu gering ist, besteht bei der „direkten“ Hydrolyse die Chance, diese Fragmente dennoch zu identifizieren und zu analysieren. Jedoch kann diese Herangehensweise durch einen höheren Grad an „Verunreinigungen“ in der Lösung erschwert werden, die sonst durch die Auftrennung im SDS-Gel entfernt werden. Da für dieses Analyseproblem bezogen auf die vorliegende Arbeit bisher keine Erfahrungsberichte existieren, wurden beide Methoden herangezogen, um keine Ergebnisse zu verlieren. Analog des Schemas 4.5 im Kapitel 4.2.7.7 wurden die entsprechenden *FimH truncate*-Proben nach der Bestrahlung direkt aus der Lösung enzymatisch hydrolysiert, um eine größere Anzahl an Peptid-Fragmenten in höherer Konzentration zu erzeugen. Anschließend wurden diese massenspektrometrisch im Hinblick auf den genauen „Markierungsort“ untersucht. Als Protease wurde hierbei

ausschließlich Trypsin eingesetzt, da sich hierbei, verglichen mit Chymotrypsin und Glu-C, die größte Anzahl analysierbarer Peptid-Fragmente bildete. Die entsprechenden Proben wurden hierbei wie in Kapitel 6.7.3 beschrieben präpariert und anschließend der tryptischen Hydrolyse unterzogen.

Die nachfolgende massenspektrometrische Untersuchung der erhaltenen Lösungen brachte bezogen auf die mit der in-Gel-Hydrolyse erzielten Ergebnisse keine weiteren Verbesserungen. Die interessanten großen Peptide um $m/z = 6000$ bis $m/z = 9000$, deren Analyse einen genauen Aufschluss des Markierungsortes des Proteins liefern würde, konnten auch hierbei nicht erfasst werden.

4.3 Markierung von FimCH und Concanavalin A

Um die Funktion und potenziell breite Anwendbarkeit der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten und synthetisierten photoaktiven Liganden zu evaluieren, wurden die Markierungsexperimente mit zwei weiteren Proteinen durchgeführt. Das im vorangehenden Kapitel verwendete *FimH truncate* enthält lediglich die für die Erkennung der Mannosid-Liganden wichtigen Domänen, stellt also ein „Modell“ für Typ-1-Fimbrien dar. In lebenden Organismen ist es jedoch als solches „Teilstück“ nicht existent. Um so nah wie möglich an den Vorgängen der Natur zu arbeiten (siehe Kapitel 1.1.2.4), wurde zunächst der Protein-Komplex FimCH als Zielmolekül für die Photoaffinitätsmarkierung mit den neuen Liganden eingesetzt. Zur Erweiterung des Einsatzbereiches der entwickelten Photoaffinitätsmarker wurde im Anschluss ein weiteres Mannose-spezifisches Lektin, das Concanavalin A markiert und analysiert. Hierbei lag das Interesse bevorzugt auf den Markierungseigenschaften der bifunktionellen Mannoside **19**, **23** und **26**. Diese mit einem Biotin-Rest „ausgestatteten“ photoaktiven Liganden erlauben die Verwendung der Affinitätsfärbung zur Analyse gebildeter Insertionsaddukte. Zur Durchführung dieser Versuchsreihe wurden die Proteine zunächst, wie in Kapitel 6.3.7 beschrieben, in Anwesenheit jeweils eines der drei ausgewählten Photomarker bestrahlt. Die Untersuchungen der entsprechenden Proben erfolgten anhand von bioanalytischen Methoden wie Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel sowie anschließende Affinitätsfärbung mittels Western Blot (Kapitel 6.6.2.2). Zur erweiterten Analyse

wurden aus den angefertigten SDS-Gelen eine Reihe von Banden ausgeschnitten, einer proteolytischen Hydrolyse mit Trypsin unterzogen (s. Kapitel 6.7.2.7) und die resultierenden Proben im Anschluss massenspektrometrisch untersucht. In Abbildung 4.38 ist die Auftrennung der beiden Lektine FimCH und ConA anhand eines SDS-Geles gezeigt. Auf dem Gel befinden sich jeweils Proben nicht bestrahlter und bestrahlter Proteine.

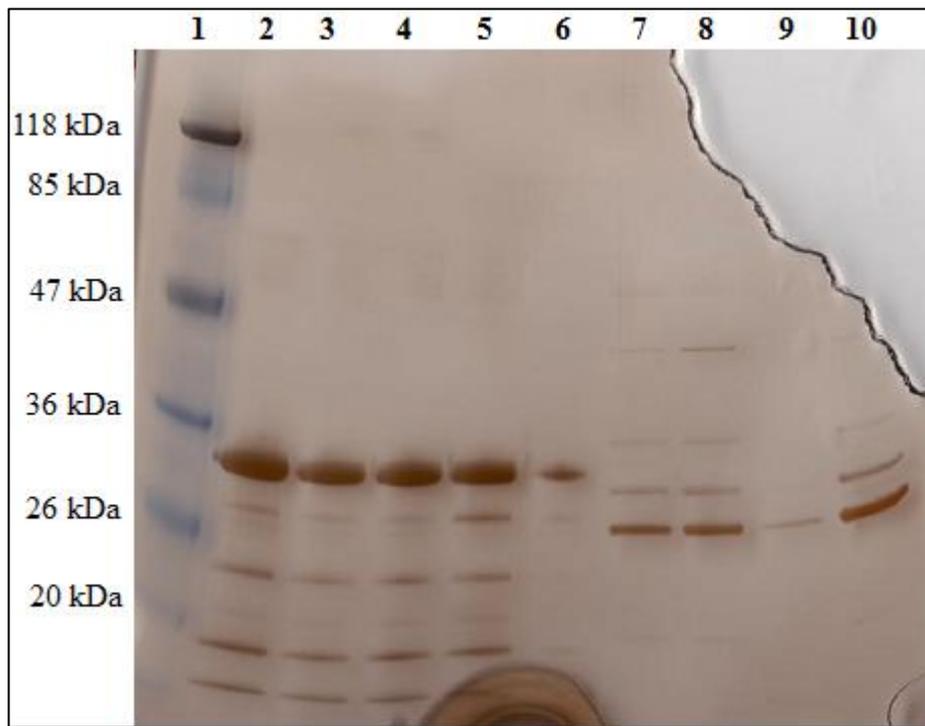


Abb.4.38. Tris-Glycin-Gel (16 %) der Lektine ConA und FimCH (silver stain). Spur 1: Protein-Standard, Spur 2: ConA (nicht bestrahlt), Spur 3/4: ConA + 23 (bestrahlt), Spur 5/6: ConA + 26 (bestrahlt), Spur 7: FimCH (nicht bestrahlt), Spur 8/9: FimCH + 23 (bestrahlt), Spur 10: FimCH + 26 (bestrahlt).

Die Spuren 2 bis 6 zeigen sehr intensiv gefärbte Banden im Bereich von 30 kDa und mehrere schwächer gefärbte Banden in niederen Massenbereichen. Zur näheren Identifikation wurden die Banden um 30 kDa aus dem Gel ausgeschnitten und massenspektrometrisch am Biflex II Gerät von Bruker untersucht. Hierbei zeigte sich eindeutig, dass es sich um die monomere Struktur des Proteins Concanavalin A mit der Masse von 26.5 kDa handelt. Da das Protein nur im aktiven Zustand Aggregate bildet (siehe Kapitel 1.1.2.3), ist es nicht ungewöhnlich, dass im SDS-Gel, nach Denaturierung des Proteins lediglich das Monomer zu finden ist. Die ungenaue Übereinstimmung mit dem Protein-Standard in Spur 1 kann dadurch zustande

kommen, dass ConA im für das SDS-Gel verwendeten Puffergemisch ein anderes Laufverhalten als das Standard-Proteingemisch zeigt. Das Gel diente hierbei hauptsächlich zur Orientierung und als Methode der Reinigung. Die restlichen gefärbten Banden im niedermolekularen Bereich wurden nicht weiter analysiert, da es sich hierbei höchstwahrscheinlich um Verunreinigungen oder Teilfragmente handelt. Aus dem Gel ist anhand der Silberfärbung nicht zu erkennen, ob eine Photomarkierung des Proteins mit den entsprechenden photoaktiven Mannosiden **23** und **26** erfolgte, da das Auflösungsvermögen des verwendeten SDS-Geles zur Unterscheidung solch geringer Massendifferenzen nicht ausreichend ist. Die massenspektrometrische Analyse am Bruker Biflex II ergab für die Messung im Linearmodus aufgrund mangelndem Auflösungsvermögen im Bereich der Massen um 27 kDa hinsichtlich der Markierung des Proteins ConA ebenfalls keine deutlichen Ergebnisse. Zur weiteren Untersuchung des ConA Proteins wurde eine tryptische in-Gel-Hydrolyse mit anschließender massenspektrometrischer Analyse durchgeführt. In Abbildung 4.39 ist eines der aus dem tryptischen Verdau des nicht markierten ConA erhaltenen MS-Spektren gezeigt.

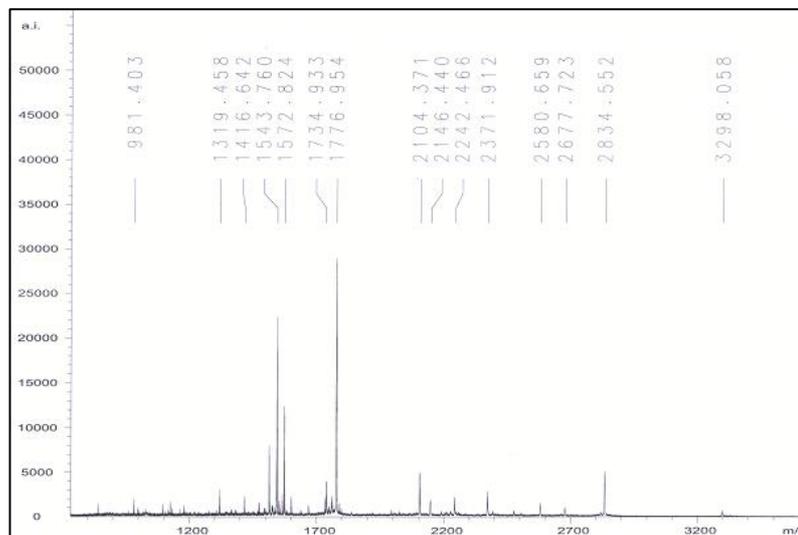


Abb. 4.39. Massenspektrum der tryptischen Hydrolyse des Proteins Concanavalin A; aufgenommen mit dem Biflex II der Firma Bruker.

In Tabelle 4.15 sind die aus dem Spektrum identifizierten Peptid-Fragmente mit ihrer entsprechenden sequenziellen Zuordnung aus der in-silico-Hydrolyse mittels ProteinProspector^[155] aufgelistet.

Tabelle 4.15. Identifizierte Peptid-Fragmente resultierend aus der tryptischen Hydrolyse des Mannose-spezifischen Lektins ConA mit entsprechend zugeordneter Aminosäure-Sequenz.

Masse des Fragment-Ions [Da]	Zugeordnete Sequenz
981.40	?
1319.45	Aminosäure 159 bis 172
1416.64	Aminosäure 47 bis 59
1543.76	?
1572.82	Aminosäure 47 bis 60
1734.93	?
1776.95	?
2104.37	Aminosäure 139 bis 158
2146.44	?
2242.46	Aminosäure 117 bis 135
2371.91	?
2580.65	?
2677.72	?
2834.55	Aminosäure 201 bis 228
3298.05	?

Anhand der durchgeführten tryptischen Hydrolyse des Proteins konnten im Massenspektrum sechs Peptid-Fragmente identifiziert und der korrekten Aminosäure-Sequenz zugeordnet werden. Das Peptid-Fragment mit der Masse $m/z = 1319.49$ entspricht dabei dem Sequenz-Abschnitt (R)VSSNGSPEGSSVGR(A); das Fragment mit der Masse $m/z = 1416.64$ lässt sich der Sequenz (K)VGTAHIIYNSVDK(R) zuordnen; das gefundene Fragment-Ion mit der Masse $m/z = 1572.82$ entspricht der Sequenz (K)VGTAHIIYNSVDKR(V); das Peptid-Fragment mit der Masse $m/z = 2104.37$ beinhaltet die Aminosäuren (K)DLILQGDATTGTDGNLELTR(V); das Fragment mit der Masse $m/z = 2242.46$ entspricht dem Sequenz-Abschnitt (K)SNSTHQTDALHFMFNQFSK(D) und das größte gefundene Peptid-Fragment mit der Masse $m/z = 2834.55$ lässt sich der Aminosäure-Sequenz (K)SPDHPADGIAFFISNIDSSIPSGSTGR(L) zuordnen. Bei

den mit „?“ versehenen Fragment-Ionen konnten nicht interpretiert werden. Aus der Anzahl der übereinstimmenden Signale lässt sich schließen, dass sich diese Methode durchaus eignet, um aus der analogen Untersuchung des mit den photoaktiven Liganden markierten Proteins Hinweise auf den Markierungsort zu erhalten. Die diesbezüglich im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse ergaben allerdings wegen der zu geringen Auflösung der MS-Spektren sowie einem zu hohen Grad an Verunreinigungen des Proteins keine eindeutigen Resultate. Aus diesen Gründen wird an dieser Stelle auf entsprechende Abbildungen verzichtet.

In die Spuren 7 bis 10 des SDS-Geles in Abbildung 4.38 wurden Proben des Protein-Komplexes FimCH eingetragen. Die darin enthaltenen Banden zeigen deutlich, dass es sich bei FimCH um einen Komplex aus den zwei Proteinen FimC und FimH handelt. Die stark gefärbte Bande bei einer Masse von 26 kDa resultiert vom Chaperone FimC, während sich die Bande bei 29 kDa dem nativen FimH zuordnen lässt. Der komplette Protein-Komplex mit einer Masse von 55 kDa liegt, entsprechend der nur schwachen Bandenfärbung, auf dem Gel nur zu einer äußerst geringen Konzentration vor. Auffällig hierbei ist auch, dass die Färbung für das Chaperone FimC deutlich intensiver ausfällt als für das Adhäsın FimH. Dies kann ein erster Hinweis darauf sein, dass das Protein FimH in den verwendeten Proben gegenüber FimC nur in sehr geringer Konzentration vorliegt. Da die Silberfärbung jedoch nicht proportional zur vorliegenden Protein-Konzentration verläuft, ist dies lediglich ein Hinweis. Bei der massenspektrometrischen Untersuchung der ausgeschnittenen Banden traten ähnliche Probleme auf wie vorher bei ConA. Das Protein FimC mit der Masse von 26 kDa konnte am Bilflex II eindeutig nachgewiesen werden, bei FimH ergaben die MS-Messungen jedoch keine erfolgreiche Bestätigung. Zusätzlich wurde analog zu ConA auch vom FimCH-Proteinkomplex eine tryptische Hydrolyse direkt aus dem SDS-Gel durchgeführt, wobei im Anschluss die massenspektrometrische Analyse erfolgte. In Abbildung 4.40 ist eines der daraus resultierenden MS-Spektren des nicht markierten FimCH-Komplexes gezeigt.

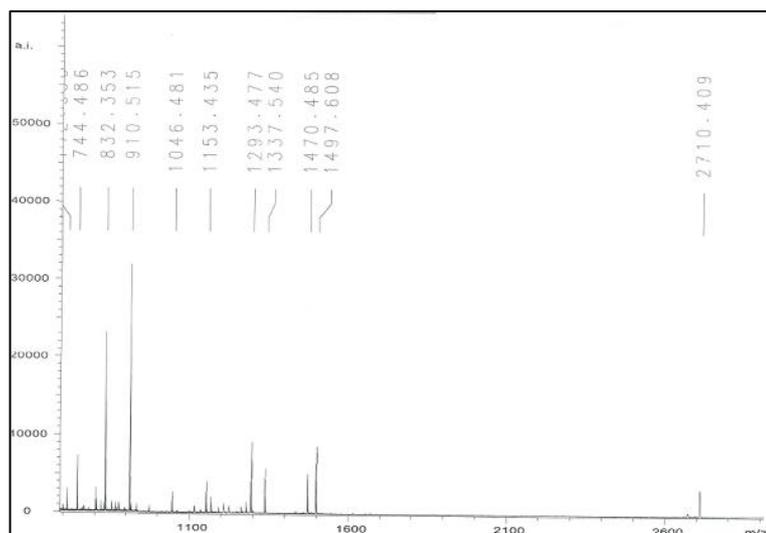


Abb. 4.40. Massenspektrum der tryptischen Hydrolyse des Protein-Komplexes FimCH; aufgenommen mit dem Biflex II der Firma Bruker.

In Tabelle 4.16 sind die identifizierten Peptid-Fragmente aufgelistet und entsprechend nach Abgleich mit den Ergebnissen der theoretisch mit ProteinProspector^[155] durchgeführten in-silico-Hydrolyse ihrer jeweiligen Sequenz zugeordnet.

Tabelle 4.16. Identifizierte Peptid-Fragmente resultierend aus der tryptischen Hydrolyse des Protein-Komplexes FimCH mit entsprechend zugeordneter Aminosäure-Sequenz.

Masse des Fragment-Ions [Da]	Zugeordnete Sequenz
744.48	?
832.35	?
910.51	Aminosäure 392 bis 398
1046.48	Angiotensin II (interner Standard)
1153.43	Aminosäure 359 bis 367
1293.47	Aminosäure 456 bis 467
1337.54	?
1470.48	Aminosäure 377 bis 389
1497.60	Aminosäure 346 bis 358

Aus der Anzahl der identifizierten Fragmente lässt sich erkennen, dass diese Methode sich durchaus als geeignet erweist, um das Protein nach photoinduzierter Markierung mit den synthetisierten photoaktiven Mannosiden auf den genauen Markierungsort hin zu untersuchen. Es konnten anhand der tryptischen Hydrolyse fünf Peptid-Fragmente identifiziert und ihrer entsprechenden Aminosäure-Sequenz zugeordnet werden. Das Peptid-Fragment mit der Masse $m/z = 910.51$ entspricht hierbei der Protein-Sequenz (K)LYYRPAK(L); das Fragment mit der Masse $m/z = 1153.43$ kann der Sequenz (R)ESLFWMNVK(A) zugeordnet werden; das Peptid-Fragment mit der Masse $m/z = 1293.47$ entspricht den Aminosäuren (K)LPSDAGSNITYR(T); das Fragment mit der Masse $m/z = 1470.48$ beinhaltet die Sequenz (K)LTENTLQLAIISR(I) und das Peptid-Fragment mit der Masse $m/z = 1497.60$ entspricht der Teilsequenz (R)ILDATNNQLPQDR(E). Der Vergleich mit den Daten aus der in-silico-Hydrolyse, erhalten mit Hilfe der online-Datenbank ProteinProspector^[155] zeigt jedoch, dass alle gefundenen Fragmente vom chaperone FimC stammen. Es konnten anhand der enzymatischen Spaltung keine Peptid-Fragmente des Proteins FimH identifiziert werden. Bei den mit „?“ versehenen Fragment-Ionen handelt es sich um in der Probe enthaltene Verunreinigungen, die nicht interpretiert werden konnten. Trotzdem wurde an dieser Stelle versucht, den photoinduziert markierten FimCH-Komplex anhand einer tryptischen Hydrolyse mit anschließender massenspektrometrischer Analyse auf den Markierungsort hin zu untersuchen. Jedoch ergaben die ersten Versuche in diese Richtung keine hinreichenden Ergebnisse, sodass an dieser Stelle auf entsprechende Abbildungen und Erläuterungen verzichtet werden soll. Anhand dieser Analysenmethode war es demnach nicht möglich, weiterführende Aussagen über die Photomarkierung der eingesetzten Proteine zu treffen.

Daher sollte im Anschluss die hoch sensitive biochemische Affinitätsfärbung mittels Western-Blot mehr Informationen in diesem Bereich liefern. Das Verfahren wurde analog Kapitel 6.6.2.2 des experimentellen Teiles dieser Arbeit durchgeführt, indem die Proteine zunächst vom SDS-Gel auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert wurden. Die vollständige Überführung aller Proteine wurde anschließend durch spezifisches Anfärben mit dem Farbstoff Ponceau S kontrolliert. Gleichzeitig stellt diese Färbung die Fixierung der Proteine auf der Membran sicher. Abbildung 4.41 zeigt die spezifische Färbung der NC-Membran mit Ponceau S.

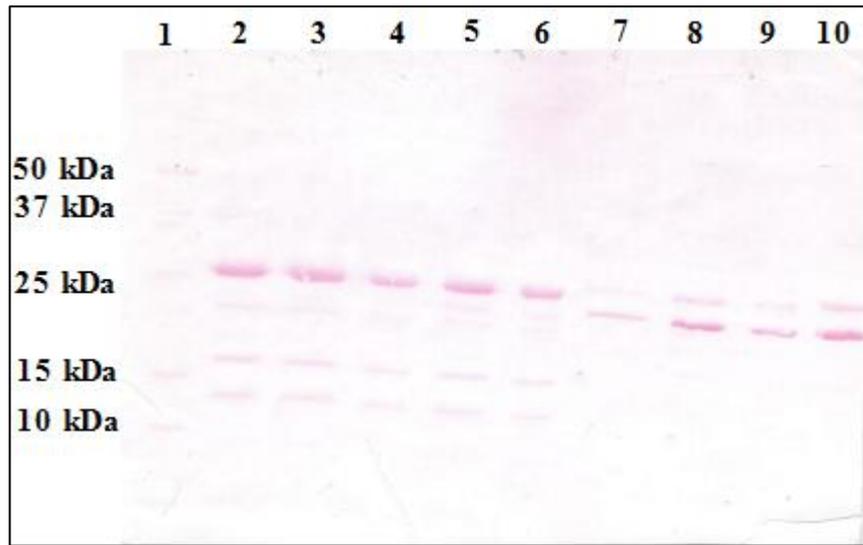


Abb. 4.41. Ponceau S-Färbung der Proteine ConA und FimCH. Spur 1: Protein-Größenstandard; Spur 2: ConA bestrahlt (4.2 µg); Spur 3/4: ConA + **23** (bestrahlt 4.2 µg / 2.1 µg); Spur 5/6: ConA + **26** (bestrahlt, 4.2 µg / 2.1 µg); Spur 7: FimCH nicht bestrahlt (4.0 µg); Spur 8/9: FimCH + **23** (bestrahlt, 4.0 µg / 2.0 µg); Spur 10: FimCH + **26** (bestrahlt, 4.0 µg).

Da für den Western-Blot auf der Nitrocellulose-Membran ein anderer Protein-Standard als für das in Abbildung 4.38 gezeigte SDS-Gel verwendet wurde, resultieren hierbei genauere Übereinstimmungen der einzelnen Protein-Massen. Die Färbung zeigt eindeutig, dass alle Proteine vollständig aus dem SDS-Polyacrylamid-Gel auf die NC-Membran übertragen wurden, wobei die unterschiedlichen Färbeintensitäten auffallend sind. Das in den Spuren 2 bis 6 aufgetragene Protein ConA weist nach Reaktion mit Ponceau S deutlich sichtbare „Spots“ im Bereich von 26 kDa auf, wobei die Spots in den Spuren 4 und 6 eine geringere Färbeintensität zeigen. Das bedeutet zum einen, dass das Protein auf der NC-Membran als Monomer fixiert ist und zum anderen spiegeln sich hierbei auch die Konzentrationsunterschiede wieder, da sich die Färbeintensität des Farbstoffes Ponceau S proportional zur vorliegenden Protein-Konzentration verhält.

Im Falle des Protein-Komplexes FimCH, welches in den Spuren 7 bis 10 aufgetragen wurde, sind die Banden im Massenbereich von 26 kDa deutlich stärker gefärbt, als die Banden im Massenbereich um 29 kDa. Daraus läßt sich schließen, dass das Chaperone FimC in den verwendeten Proben in höherer Konzentration vorliegt als das Adhäsion FimH. Möglicherweise ist in diesen Proben nicht nur der Protein-Komplex FimCH in äquimolarem Verhältnis beider Proteine enthalten, sondern ein

Überschuss an Chaperone FimC. Auch hier ist die Proportionalität der Färbeintensität zur vorliegenden Proteinkonzentration deutlich erkennbar.

Für die Durchführung der folgenden Immunfärbung wurde zunächst der Farbstoff Ponceau S mit Wasser vollständig von der NC-Membran heruntergewaschen. Die charakteristische Immunfärbung erfolgte im Anschluss analog der in Kapitel 6.6.2.2 dieser Arbeit beschriebenen Arbeitsschritte, wobei der daraus erhaltene vollständige Western-Blot in Abbildung 4.42 gezeigt ist.

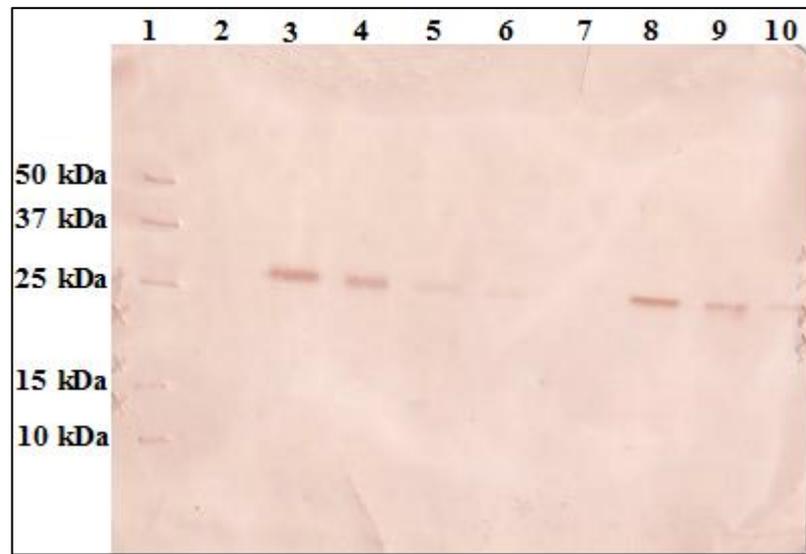


Abb. 4.42. Western Blot Proteine ConA und FimCH. Spur 1: Protein-Größenstandard;
Spur 2: ConA bestrahlt (4.2 μg); Spur 3/4: ConA + **23** (bestrahlt 4.2 μg / 2.1 μg);
Spur 5/6: ConA + **26** (bestrahlt, 4.2 μg / 2.1 μg); Spur 7: FimCH nicht bestrahlt
(4.0 μg); Spur 8/9: FimCH + **23** (bestrahlt, 4.0 μg / 2.0 μg); Spur 10: FimCH +
26 (bestrahlt, 4.0 μg).

Anhand des vorliegenden Blotes läßt sich sehr gut erkennen, dass die Immunfärbung nur in den Spuren eingetreten ist, in denen sich auch in Gegenwart Biotin-tragender Photophore bestrahltes Protein befindet. Die Spuren 2 und 7, welche lediglich Concanavalin A und FimCH ohne zusätzlichen Photomarker enthalten, weisen keine charakteristische Färbung auf. Aus diesen Ergebnissen lässt sich daher grundsätzlich schließen, dass die gewünschte Photomarkierung mit den hergestellten bifunktionellen Photomarkern **23** und **26** auch im Falle des Mannose-spezifischen Lektins Concanavalin A sowie des Protein-Komplexes FimCH erfolgreich gelang. Zusätzlich können anhand der unterschiedlichen Färbeintensitäten im vorliegenden Western Blot sowohl Aussagen über die enthaltenen Protein-Konzentrationen als

auch über die Qualität der eingesetzten photoaktiven Liganden getroffen werden. Die um jeweils die Hälfte reduzierte Protein-Konzentration der einzelnen Proben ist anhand der abgeschwächten Färbung zwischen den Banden in den Spuren 3 und 4 für ConA sowie den Banden in den Spuren 8 und 9 für FimCH gut nachvollziehbar. Zusätzlich weisen die „Spots“, die aus der Bestrahlung der Proteine mit dem photoaktiven bifunktionellen Mannosid **23** resultieren eine eindeutig kräftigere Immunfärbung auf, als die aus der Bestrahlung mit Mannosid **26** resultierenden „Spots“. Diese Beobachtung bezieht sich sowohl auf das Protein *FimH truncate* (vgl. Kapitel 4.2.7.6, Abb. 4.33), als auch auf das Lektin ConA (vergl. Spuren 3/4 mit Spuren 5/6) und ebenso auf den Protein-Komplex FimCH (vergl. Spuren 8 und 10). Aus diesen experimentell erhaltenen Resultaten läßt sich deutlich ableiten, dass das Mannosid **23** mit der photoaktiven funktionellen Gruppe in α -Position des Asparagyl-Restes besser an die Proteine bindet als das Mannosid **26**, bei dem die Diazirin-Gruppierung um ein C-Atom näher am pyranoiden Monosaccharid-Liganden lokalisiert ist. Da im Falle der in diesem Kapitel untersuchten Proteine ConA und FimCH jedoch keine Molecular Modelling-Studien durchgeführt wurden, lassen sich an dieser Stelle auch keine genauen Aussagen über die 3D-Struktur der nach Inkubation gebildeten Protein-Ligand-Komplexe treffen. Es ist demnach auch nicht klar belegt, dass sich die Diazirin-Gruppierung in Verbindung **26** tatsächlich näher am Mannosid befindet. Fakt ist, dass eine unterschiedliche Positionierung der photoaktiven funktionellen Gruppe die Stärke der Protein-Ligand-Bindung durchaus beeinflusst.

Zusätzlich fällt bei Betrachtung des Blottes in der Abbildung 4.42 auf, dass bei den bestrahlten Proben des Protein-Komplexes FimCH die Affinitätsfärbung im Massenbereich von 29 kDa auftritt. Demnach ist bei Bestrahlung des Komplexes FimCH mit beiden eingesetzten Photomarkern **23** und **26** ausschließlich das Mannose-spezifische Adhäsion FimH markiert worden, nicht jedoch das Chaperone FimC. Das Resultat des Western-Blots besätigt zum einen, dass FimH ein Mannose-bindendes Protein ist. Im Vergleich zu den publizierten Kristallstrukturen^[47,48,52] ist hiermit auch die Mannose-Spezifität des Proteins im dynamischen System deutlich gezeigt. Die Selektivität der Verbindungen **23** und **26** konnte außerdem auf das ebenfalls Mannose-bindende Lektin ConA transferiert werden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass es sich zumindest bei den photoaktiven Liganden **23** und **26** um „universelle“ Markierungsreagenzien handelt, die potenziell in der Lage sind, ganze

Bibliotheken oder sogar Organismen auf Mannose-bindende Proteine zu screenen. Untermauert wird diese These dadurch, dass in der unselektiven aber proteinspezifischen Ponceau S-Färbung (Abb. 4.41) sowie in der Silberfärbung (Abb.4.38) jeweils eine Vielzahl von Banden angefärbt sind, während bei der Affinitätsfärbung in Abb 4.42 lediglich die Mannose-bindenden Proteine FimH und ConA gefärbt sind.

Die in diesem Kapitel zusammengefassten Ergebnisse zeigen letztendlich eindeutig, dass die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten und synthetisierten bifunktionellen Diazirin-tragenden photoaktiven Liganden **23** und **26** durchaus auch geeignet sind, um anhand des hier etablierten Verfahrens Mannose-spezifische Proteine zu identifizieren.

4.4 ELISA und Molecular Modeling im Hinblick auf die Bindungsaffinität der synthetisierten Liganden

Zur Studie des Bindungsverhaltens, das die in der vorliegenden Arbeit synthetisierten photoaktiven Mannoside bezogen auf das bakterielle Lektin FimH zeigen, wurden zwei sich ergänzende Methoden herangezogen. Zum einen wurden mit Hilfe des ELISA-Verfahrens die charakteristischen inhibitorischen Potenzen (IC_{50} -Werte) der einzelnen Verbindungen experimentell bestimmt. Anhand der ermittelten Werte lässt sich einschätzen, inwieweit die potenziellen Liganden die Typ-1-Fimbrien-vermittelte bakterielle Adhäsion an Zelloberflächen inhibieren. Anschließende theoretische Berechnungen über Computer-gestützte Moleküldynamik-Simulationen lieferten vergleichende Daten bezüglich der Bindungsaffinität der synthetisierten Mannoside zum bakteriellen Lektin FimH. Die angewandten Methoden sind in den folgenden zwei Kapiteln genauer beschrieben; sie enthalten zudem die Dokumentation und Diskussion der gewonnenen Ergebnisse. Durch Kombination beider Methoden lassen sich so Voraussagen über die Protein-Ligand-Bindungsstärke machen.

4.4.1 ELISA

Im Rahmen dieser Arbeit fungierte der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) als Methode für das Studium des Adhäsionsprozesses Typ-1-Fimbrien exprimierender *E. coli*-Bakterien an Zuckeroberflächen. Prinzipiell handelt es sich hierbei um eine Enzym-katalysierte Umwandlung eines Chromogens. Ein lösliches, zunächst farbloses Chromogen (ABTS) wird dabei zu einem löslichen, quantifizierbaren Farbstoff umgesetzt.

Grundsätzlich finden alle ELISA-Reaktionen mit einem an einer Oberfläche immobilisierten Partner statt, was die Trennung von gebundenen und nicht gebundenen Komponenten erheblich vereinfacht. Die Durchführung in 96-Loch-Mikrotiter-Platten aus Polystyrol (PS) macht den ELISA-Prozess zu einem problemlos automatisierbaren Verfahren, welches heute aus der biochemischen Forschung nicht mehr wegzudenken ist. Hierbei finden drei unterschiedliche Durchführungsmethoden des ELISA ihre Anwendung: a) der Sandwich-ELISA, b) der kompetitive ELISA und c) der nicht-kompetitive ELISA.^[156] Letzterer wurde in der vorliegenden Arbeit eingesetzt, um die Inhibitionspotenziale der vier photoaktiven α -D-Mannosid-Derivate **12**, **14**, **16** und **19** anhand eines gekoppelten Antikörper-Systems experimentell zu bestimmen und damit eine biologische Aktivität der entsprechenden Liganden zu zeigen. Mittels dieses ELISA-Testverfahrens wurde zusätzlich bestimmt, inwieweit die zu untersuchenden photoaktiven Liganden in der Lage sind, die Adhäsion Typ-1-Fimbrien exprimierender Bakterien an eine mit Mannan beschichtete PS-Oberfläche zu hemmen. Mannan aus *Saccharomyces cerevisiae* ist ein komplexes Gemisch aus Polysacchariden, die aus Mannose-Einheiten aufgebaut sind und deren Molekulargewichtsverteilung zwischen 65 und 130 kDa liegt.^[157] Es wurde hier verwendet, um die Glycocalyx zu mimikrieren, wobei die strukturelle Beschaffenheit bewusst auf Mannose-Einheiten beschränkt wurde, da der Schwerpunkt dieser Forschungsarbeit auf die Aufklärung der Bindungsprozesse Mannose-spezifischer Lektine gerichtet ist. Die eingesetzten Bakterien wurden genetisch so verändert, dass sie die Typ-1-Fimbrien überexprimieren und keine anderen Pili.^[158,159,160] Sie stammen aus einem *E. coli* K12-Stamm und tragen die Bezeichnung *E. coli* HB101 *pPK14* (nach Per Klemm; in diesem Falle wurde das vierte Plasmid aus seinem Labor verwendet.)

Nach Immobilisierung der PS-Mikrotiter-Oberfläche mit Mannan erfolgte die Inkubation nach Zugabe der zu untersuchenden Liganden sowie der entsprechenden *E. coli*-Bakterien. Anschließend wurde ein Antikörper zugegeben, der die Typ-1-Fimbrien spezifisch erkennt und an sie bindet. Dieser erste Antikörper wiederum wurde von einem zweiten, HRP-konjugierten Antikörper erkannt. Nachfolgend zugesetztes ABTS wurde über mittels einer Oxidationsreaktion in seine farbige Form überführt; das Ausmaß des Inhibitionspotenzials wurde abschließend anhand entsprechender optischer Dichten (OD-Werte) in einem ELISA-Reader gemessen (siehe Kapitel 6.8.1.4). Die OD-Werte des gebildeten Farbstoffes erlauben somit den Rückschluss auf die Menge an gebundenem Antikörper. Im Bezug auf eine Blindprobe ohne entsprechenden Inhibitor (OD_{blind}) ergibt sich das prozentuale Inhibitionspotenzial demnach nach der Formel

$$I = \frac{OD_{blind} - OD}{OD_{blind}} \times 100$$

Zur Bestimmung des Inhibitionspotenzials anhand einer entsprechenden Verdünnungsreihe bezogen auf die zu untersuchenden Ligand-Konzentrationen wurden sigmoide Kurven erhalten, aus denen der sogenannte IC_{50} -Wert (IC_{50} [mmol/L]) ermittelt werden kann. Der IC_{50} -Wert entspricht der Konzentration an Inhibitor, bei der die Adhäsion der Bakterien an die immobilisierte Oberfläche zu 50 % gehemmt ist. Die bestimmten IC_{50} -Werte der einzelnen photoaktiven Mannoside wurden hierbei auf den IC_{50} -Wert des in der Literatur als Standard-Inhibitor beschriebenen Methyl- α -D-mannosids^[161,162,163] bezogen, welches auf derselben Mikrotiterplatte getestet wurde. Dadurch wurden eventuelle Schwankungen, die aufgrund unterschiedlicher Oberflächen-Immobilisierung bzw. nicht identischer Beschaffenheit der PS-Oberfläche verschiedener Mikrotiter-Platten auftreten könnten, vermieden. Ebenso ergab sich hierbei die Möglichkeit eines relativen Vergleichs der ermittelten Werte direkt bezogen auf den Standard anhand sog. RIP-Werte (relative Inhibitionspotenziale). Der RIP-Wert für Methyl- α -D-mannosid wurde dabei jeweils auf derselben Platte als $RIP = 1$ definiert. Die Einführung der RIP-Werte führt in jedem Falle zu reproduzierbaren und dadurch verlässlicheren sowie genaueren Ergebnissen. Die literaturbekannten synthetischen FimH-Liganden Methylumbelliferyl- α -D-mannosid^[164] und Butyl- α -D-mannosid^[47] wurden für

experimentelle ELISA-Studien im Rahmen dieser Arbeit nicht herangezogen, sondern lediglich in die theoretischen Moleküldynamik-Simulationen als Vergleichswerte mit einbezogen (siehe Kapitel 4.4.3).

4.4.2 Resultate des ELISA

Mit vier der sechs synthetisierten photoaktiven α -D-Mannosid-Derivaten wurden zur Untersuchung ihres Inhibitionspotenzials ELISA-Tests durchgeführt. Die monofunktionellen Mannoside **12**, **14** und **16** wurden ausgewählt, um eventuelle Einflüsse der photoaktiven funktionellen Gruppen auf die individuellen Bindungseigenschaften zu vergleichen. Das längerkettige, starre Mannosid **19** diente als Modell-Verbindung zur Studie der Bindungseigenschaften bifunktioneller Glycopeptide. Die zu testenden Verbindungen wurden jeweils in Anwesenheit der beiden Inhibitor-Standards Methyl- α -D-mannosid (MeMan) und *p*-Nitrophenyl- α -D-mannosid (*p*NPMan) vermessen, wobei die Startkonzentration stets 1.0 mgmL^{-1} betrug und auf der Mikrotiter-Platte systematisch im Verhältnis 1:2 verdünnt wurde (siehe Kapitel 6.8.1.4). Aus den entsprechenden im ELISA-Reader bestimmten optischen Dichten wurden anschließend die jeweiligen IC_{50} -Werte (IC_{50} [mmol/L]) bzw. die relativen Inhibitionspotenziale (RIP-Werte) berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.17 gezeigt, auf eine graphische Darstellung wurde in diesem Falle verzichtet, da keine der getesteten photolabilen Verbindungen herausragende Inhibitionseigenschaften gegenüber den beiden Standards aufweist.

Tabelle 4.17. Mittels ELISA ermittelte Inhibitionspotenziale der photoaktiven

Mannoside **12**, **14**, **16** und **19** im Vergleich zu den beiden Standard-Inhibitoren MeMan und pNPMa.

Inhibitor	MeMan	pNPMa	12	14	16	19
IC ₅₀ [mmolL ⁻¹]						
ELISA 1	3,48	0,05	0,07	0,09	0,26	0,93
IC ₅₀ [mmolL ⁻¹]						
ELISA 2	0,20	0,04	0,05	0,23	0,08	- [a]
IC ₅₀ [mmolL ⁻¹]						
ELISA 3	- [a]	0,03	0,07	0,05	0,27	0,33
Mittelwert	1,84	0,04	0,06	0,12	0,20	0,63
Standard- abweichung	2,32	0,01	0,01	0,09	0,10	0,42
RIP-Wert aus den Mittelwerten	1	47	30	15	9	3

[a] Aus den Rohdaten war kein IC₅₀ zu ermitteln.

Die in der Tabelle enthaltenen Daten zeigen, dass die vier getesteten photoaktiven Mannoside **12**, **14**, **16** und **19** eine charakteristische biologische Aktivität aufweisen; es handelt sich damit nicht nur um rein synthetische Verbindungen, sondern um Photoaffinitäts-Liganden, die zur Untersuchung biologischer Systeme eingesetzt werden können. Im Hinblick auf das Inhibitionspotenzial schneiden die drei monofunktionellen photoaktiven Mannoside **12**, **14** und **16** gegenüber beiden Standards mittelmäßig ab. Gegenüber dem bekannten Inhibitor Methyl- α -D-Mannosid^[161,162,163] besitzen alle drei höhere RIP-Werte, was bedeuten dürfte, dass in allen drei Fällen die gebildeten Protein-Ligand-Komplexe stabiler sind. Die Steigerung des Inhibitionspotenzials liegt in der strukturellen Beschaffenheit der Aglykone begründet. Sharon et al. fanden 1987 heraus, dass eine Modifizierung der als Liganden für Typ-1-Fimbrien eingesetzten α -D-Mannoside durch Einführen aromatischer Aglykone zu erheblich verbesserten Inhibitionseigenschaften führt. So wurden beispielsweise *p*-Nitrophenyl- α -D-mannosid sowie 4-Methylumbelliferyl- α -D-mannosid entdeckt, die auch heute noch als Referenzsubstanzen im Rahmen der Entwicklung neuer Inhibitoren gelten.^[164]

Aufbauend auf diese Studien wurden im Rahmen dieser Arbeit eine Reihe der synthetisierten photoaktiven Liganden zur Steigerung der Komplexbildungskonstanten mit dem Protein FimH mit einem aromatischen Aglykon versehen. Vergleichend zur Bindungsaffinität des in Tabelle 4.17 aufgeführten wirksamsten Inhibitors *p*NPMa zeigen die untersuchten Liganden **12**, **14** und **16** jedoch deutlich schwächere Werte. Begründen lässt sich dieser Befund anhand der in den Verbindungen **12** und **14** enthaltenen „naturfremden“ Strukturelemente, des Diazirin-Ringes mit der benachbarten Trifluoromethylgruppe, sowie der Azido-Funktion. Diese Funktionalitäten könnten dazu führen, dass nach Ausbildung des Protein-Ligand-Komplexes keine hinreichend stabilisierenden Wechselwirkungen mit der Peripherie rund um die CRD des FimH ausgebildet werden. Durch den Benzophenon-Substituenten erhält der Ligand **16** eine sterisch anspruchsvolle und starre Struktur, die ein direktes „Anschmiegen“ an die hydrophobe Region um das Tyrosin-Tor des Proteins wahrscheinlich erschwert, so dass auch hierbei keine optimale Ausbildung stabilisierender Wechselwirkungskräfte zustande kommt.

Der bifunktionelle photoaktive Ligand **19** zeigt im ELISA nur eine sehr schwache Inhibitionskraft, was zum einen sicherlich auf die Größe und die daraus resultierende mangelnde Flexibilität zurück zu führen ist. Andererseits ist es ebenso wahrscheinlich, dass hier andere Interaktionen außerhalb der CRD auftreten, die gegen die stabilisierenden Wechselwirkungen des mannopyranoiden Systems in der Bindetasche wirken und somit zu dem schwachen Inhibitionspotenzial führen.^[177] Durch die Einführung der Peptidkette in die Aglykon-Region resultiert ein intensiverer Kontakt der Verbindung mit der Protein-Oberfläche außerhalb der CRD. Durch diese stärkeren Interaktionen kann es passieren, dass der pyranoide Ring des Mannosids aus der Bindetasche „herausgezogen“ wird und somit zu einer abgeschwächten Ligandbindungsstärke führt, wie an den Werten in Tabelle 4.18 zu beobachten ist. Passend zu diesen Überlegungen wurden 2006 von Lindhorst et al. ELISA-Studien veröffentlicht, die auf Mannosid-Liganden basieren, deren Aglykon über eine Quadratsäure-Ester-Funktion mit Glycin-Einheiten verlängert wurde, in der Hoffnung, die Ligand-Bindungsstärke gegenüber FimH weiter zu steigern.^[177] Die synthetisierten Verbindungen erhielten in den theoretisch durchgeführten Docking-Studien durchweg sehr hohe Scoring-Werte, jedoch zeigten sie im ELISA eher niedrige RIP-Werte.

4.4.3 Docking-Studien

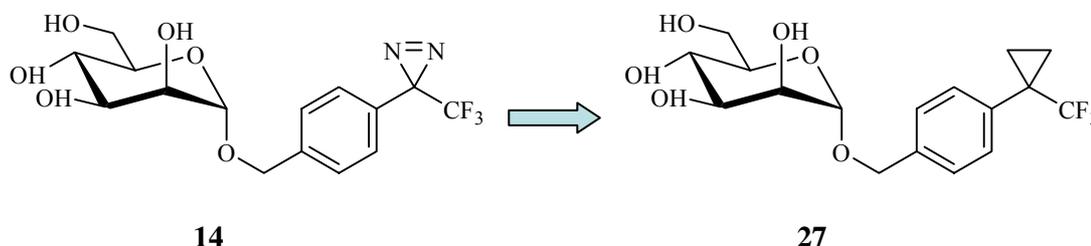
Um die in den ELISA-Experimenten ermittelten Ergebnisse für die Bindungsaffinitäten der vier synthetisierten photoaktiven Liganden **12**, **14**, **16** und **19** einer weiterführenden qualitativen Bewertung zu unterziehen, wurden zum theoretischen Vergleich Computer-unterstützte *Docking*-Studien durchgeführt.^[165] Hierbei wurde die Methode des FlexX-*Dockings* verwendet, welche sich bereits im Rahmen der Arbeit von A. Fuchs^[166] zur Aufklärung von Protein-Kohlenhydrat-Bindungsstudien bestens bewährt hatte.

Der angewandte FlexX-Algorithmus^[167,168,169,170] ermöglicht eine vollständige und flexible Behandlung der entsprechenden zu untersuchenden Liganden auf der Basis eines inkrementellen Aufbaus des Liganden in der Bindetasche des FimH-Proteins. Für die theoretischen Studien im Rahmen dieser Arbeit wurden die beiden von Knight et al. experimentell ermittelten Kristallstrukturen des FimH-Proteins^[47,52] als grundlegende Konformationen des FimH-Proteins verwendet. Dazu wurde der entsprechende CRD-Bereich des FimH über das im Rechenprogramm Sybyl^[171, 172] implementierte FlexX als fixierter Rezeptor definiert. Ausgehend von dieser starren Bindungstasche wurde anhand des FlexX-*Docking*-Algorithmus im Folgenden versucht, eine Evaluierung der Protein-Ligand-Interaktion mit einem flexiblen Liganden zu erreichen. Hierfür wurde die vorliegende Bindungstasche zunächst nach Plätzen für Protein-Ligand-Wechselwirkungen abgesucht, die nachfolgend in Dreiecke mit definiertem Interaktionspotenzial eingeteilt wurden. Entsprechend der zu untersuchende Ligand in einer seiner möglichen Konformationen sowohl dem Platzbedarf als auch den physikalisch-chemischen Bedürfnissen eines Zieldreiecks, wurde eine Übereinstimmung festgestellt. Dabei neu ausgebildete Wasserstoffbrücken sowie ionische und lipophile Wechselwirkungen und die Einschränkung von Freiheitsgraden im Molekül wurden jeweils festgehalten. Die Anwendung der FlexX-Scoring-Funktion wurde zur Evaluierung der Bindungsstärke zusätzlich durch weitere Scoring-Funktionen des Consensus-Verfahrens^[173,174] nach Sybyl erweitert, was eine größere Verlässlichkeit der Bewertung der gedockten Konformation für einen entsprechenden Liganden bewirkte. Durch Kombination beider Scoring-Programme resultierte eine Reihe dimensionsloser „Scoring-Werte“, die das Interaktionspotenzial der zu untersuchenden Liganden in unterschiedlichen Konformationen gegenüber der starren Bindungstasche wiedergaben. Die

berechneten Scoring-Werte beziehen sich hierbei auf die entsprechenden Bindungsenergien, wobei demnach kleinere Scoring-Werte auf einen stärker bindenden Liganden hinweisen.

4.4.4 Resultate der Computer-unterstützten *Docking*-Studien

Die folgenden Abschnitte enthalten eine vergleichende Gegenüberstellung der experimentell bestimmten RIP-Werte mit den jeweils höchsten berechneten Scoring-Werten im Bezug auf die Bindungsstärke zu FimH (Tabelle 4.19). Für alle Docking-Studien mit FimH wurden sowohl die Kristallstruktur mit „offenem Tyrosin-Tor“^[48] als auch die mit „geschlossenem Tyrosin-Tor“^[52] berücksichtigt. Die entsprechenden moleküldynamisch berechneten Protein-Ligand-Komplexe der photoaktiven Mannosid-Derivate **12**, **14**, **16** und **19** mit dem Protein sind in den jeweiligen Abbildungen gezeigt (Abb. 4.43 bis 4.50). Aufgrund von Einschränkungen des FlexX-Scoring-Programms bei der räumlichen Darstellung komplexer Funktionalitäten, wurden die Berechnungen im Falle des Diazirins **14** mit einem strukturverwandten Derivat durchgeführt, bei dem der charakteristische Diazirin-Dreiring durch einen einfacheren Cyclopropan-Ring mimikriert wurde (Schema 4.4). Die geringen Einflüsse auf die räumliche Struktur und die leicht veränderte Elektronendichte-Verteilung im Dreiring waren für diese Studien von untergeordneter Bedeutung und wurden daher vernachlässigt.



Schema 4.4. Vereinfachtes Cyclopropyl-Analogon **27** des Diazirins **14** für die Computer-unterstützten *Docking*-Studien.

Zur verbesserten Übersicht in den einzelnen Abbildungen ist der entsprechende Ligand jeweils als „Ball-Stick-Modell“ gezeigt, während die entscheidende Sequenz der Protein-Struktur als „Conolly-Oberfläche“^[175] dargestellt ist. Zur weiteren Verdeutlichung wurden die einzelnen Atome unterschiedlich eingefärbt (Kohlenstoff ≡ grau; Wasserstoff ≡ weiss, Sauerstoff ≡ rot, Stickstoff ≡ blau, Schwefel ≡ gelb und Fluor ≡ magenta).

*Tabelle 4.18. Vergleichende Übersicht der experimentell ermittelten Inhibitionspotenziale sowie der jeweils höchsten berechneten Scoring-Werte für die photoaktiven Liganden 12, 14, 16 und 19. Zusätzlich sind die entsprechenden Daten der Standards Methyl- α -D-mannosid (MeMan), *p*-Nitrophenyl- α -D-mannosid (pNPMa) sowie *n*-Butyl- α -D-mannosid (BuMan) aufgeführt.*

Verbindung	Score	Score	IC ₅₀ ^[e]	RIP
	FimH	FimH		
	I ^[a]	II ^[b]		
MeMan	-22,5	-23,3	1,84	1
<i>p</i>NPMa	-24,9	-27,4	0,04	47
BuMan	-20,5 ^[c]	-21,5 ^[c]	-	-
12	-23,6	-24,0	0,06	30
14^[d]	-28,3 ^[d]	-29,3 ^[d]	0,12	15
16	-30,2	-29,8	0,20	9
19	-31,9	-36,0	0,63	3

[a] Basierend auf FimH-Mannose-Komplex von 2002^[48].

[b] Basierend auf FimH-Butylmannosid-Komplex von 2005^[52].

[c] Übernommene literaturbekannte Werte^[176].

[d] Vereinfachtes Cyclopropyl-Analogon (**27**) des Diazirins **14**.

[e] IC₅₀-Werte (mmolar).

Die in Tabelle 4.18 enthaltenen theoretisch berechneten Daten zeigen bei den vier photoaktiven Liganden eine deutliche Tendenz zu niederen Scoring-Werten. Demnach binden sie, mit Ausnahme des vereinfachten Cyclopropyl-Analogons (**27**) des Diazirins **14**, erheblich stärker an das FimH-Protein als die Standards Methyl- α -D-mannosid und *p*-Nitrophenyl- α -D-mannosid. Diese Tatsache gilt sowohl für die Kristallstruktur des Proteins mit „offenem Tyrosin-Tor“ als auch für die Kristallstruktur des Proteins mit „geschlossenem Tyrosin-Tor“.

Die beiden folgenden Abbildungen (Abb 4.43 und Abb. 4.44) zeigen die berechneten Protein-Ligand-Komplexe des Lektins mit dem strukturell vereinfachten Cyclopropyl-Analogon (**27**) des Diazirins **14**.

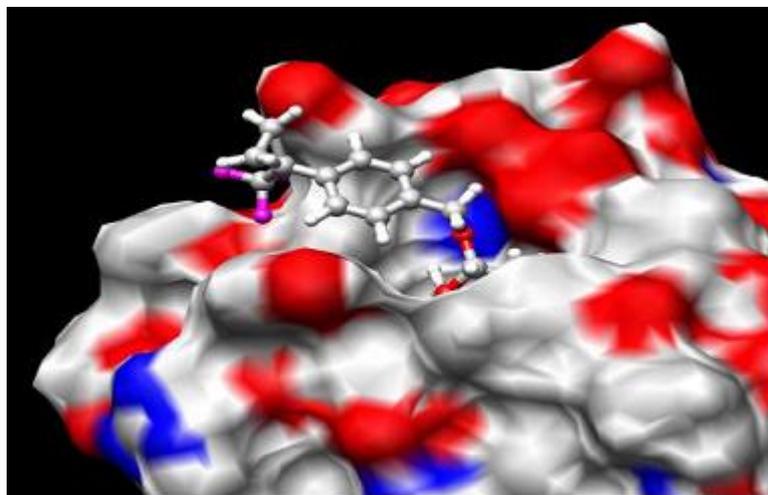


Abb. 4.43. Strukturell vereinfachtes Cyclopropyl-Analogon (**27**) des photoaktiven Diazirins **14** als Ligand in der CRD des Lektins *FimH* in der Konformation mit „geöffnetem Tyrosin-Tor“; gezeigt ist die „gedockte“ Form mit dem höchsten Scoring-Wert.

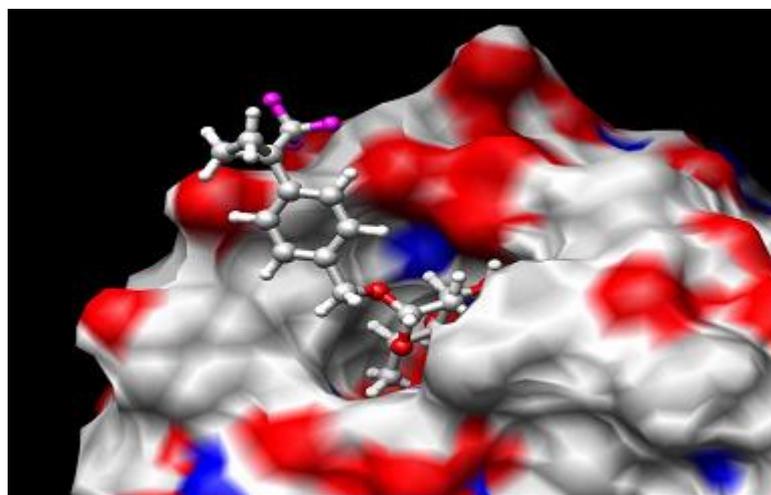


Abb. 4.44. Strukturell vereinfachtes Cyclopropyl-Analogon (**27**) des photoaktiven Diazirins **14** als Ligand in der CRD des Lektins *FimH* in der Konformation mit „geschlossenem Tyrosin-Tor“; gezeigt ist die „gedockte“ Form mit dem höchsten Scoring-Wert.

Die Scoring-Werte liegen in beiden Fällen um -29.0 und zeigen somit gegenüber den Standards MeMan und *p*NPMan eine deutlich gesteigerte Bindungsaffinität zum Rezeptorprotein *FimH*. Analog den beiden Standards

ist der Mannosyl-Rest auch beim modifizierten Diazirin in der Bindetasche des Proteins „vergraben“, wobei das α -konfigurierte Aglykon aus der Bindetasche herausragt. Diese ideale Geometrie des α -positionierten Aglykons erlaubt optimale Wechselwirkungen des Phenylrings des modifizierten Diazirins mit dem Tyrosin-Tor^[177], welches von den beiden aromatischen Ringen von TYR48 und TYR137 gebildet wird. Die Dreiring-Gruppierung in **14** trägt ebenfalls zur Stabilisierung des Liganden in der CRD bei. Besonders deutlich ist diese optimale „Passform“ in der Abbildung mit „offenem Tyrosin-Tor“ (Abb. 4.43) zu sehen. Zusätzliche lipophile Interaktionen bewirken eine höhere Bindungsaffinität zum Rezeptor-Protein und damit relativ niedrige Scoring-Werte im Vergleich zu den beiden Standardmannosiden. Die niedrigeren RIP-Werte, die im ELISA ermittelt wurden, zeigen jedoch eine eher abgeschwächte Bindungsaffinität gegenüber *p*NPMan. Dies lässt sich auf die drei Fluor-Atome des Diazirins **14** zurückführen. Die hohe Polarität dieser drei sehr nahe beieinander liegenden Substituenten führt in der lipophilen Umgebung der Bindetasche des FimH-Proteins zu einer minimalen Destabilisierung gegenüber dem Komplex mit *p*NPMan.

Das Azid **12** sollte mit Scoring-Werten um -24.0 eine nahezu identische Bindungsaffinität zu FimH aufweisen wie der Standard *p*NPMan. Die berechneten Protein-Ligand-Komplexe mit jeweils höchstem Scoring-Wert sind in den Abbildungen 4.45 und 4.46 gezeigt.

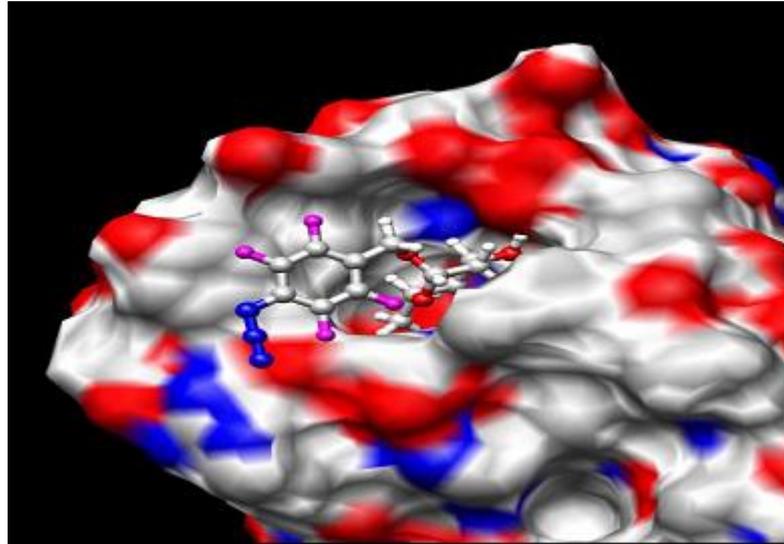


Abb. 4.45. Das photoaktive Azid **12** als Ligand in der CRD des FimH-Proteins in der Konformation mit „geschlossenem Tyrosin-Tor“; gezeigt ist die „gedockte“ Form mit dem höchsten Scoring-Wert.

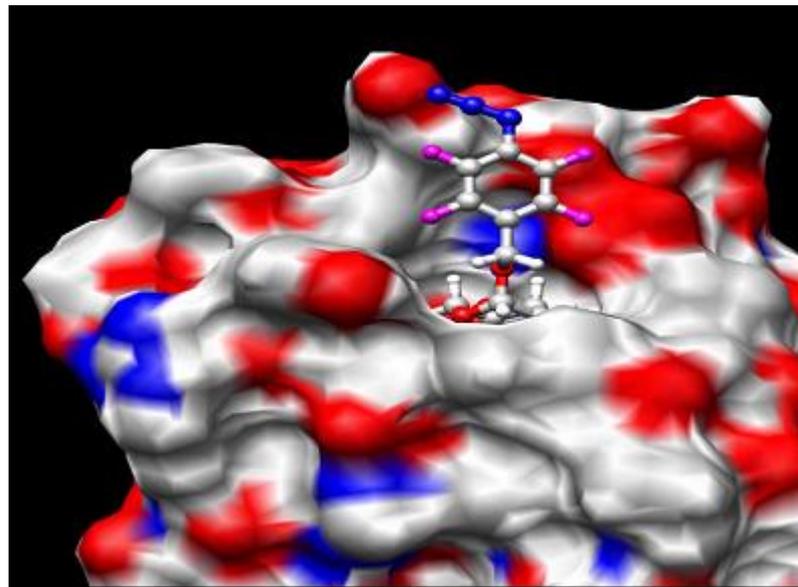


Abb. 4.46. Das photoaktive Azid **12** als Ligand in der CRD des FimH-Proteins in der Konformation mit „geöffnetem Tyrosin-Tor“; gezeigt ist die „gedockte“ Form mit dem höchsten Scoring-Wert.

Im Protein-Ligand-Komplex mit „geschlossenem Tyrosin-Tor“ (Abb. 4.45) ist die Stabilisierung durch die π - π -Wechselwirkungen mit den beiden Tyrosin-Resten der Aminosäuren TYR48 und TYR137 sehr schön zu erkennen. Die am Phenylrest in *p*-Position lokalisierte Azid-Gruppierung liegt in Abb. 4.45 genau über einem

Stickstoff-reichen Gebiet des Proteins. Mit diesen NH-Gruppen können zusätzliche stabilisierende Wechselwirkungen aufgebaut werden, was zu den mit *p*NPMan vergleichbaren, guten Scoring-Werten führt. Das schlechtere Abschneiden im ELISA lässt sich ähnlich erklären wie im Falle des Diazirins **14**. Die vier am aromatischen System lokalisierten polaren Fluor-Substituenten stören die stabilisierenden Interaktionen mit der lipophilen Peripherie der Lektin-CRD, sodass sich im ELISA eine schwächere Bindungsaffinität zu FimH gegenüber *p*NPMan zeigt.

Der photoaktive Ligand **16** trägt mit der Benzophenon-Gruppierung eine erweiterte aromatische Einheit am Aglykon. Entsprechend niedrig sind die berechneten Scoring-Werte. Sie liegen mit rund -30.0 noch einmal niedriger als die für das Diazirin **14** berechneten Werte. Die Abbildungen 4.47 und 4.48 zeigen deutlich das enge „Anschmiegen“ der beiden Phenylringe an den lipophilen Bereich außerhalb der CDR.

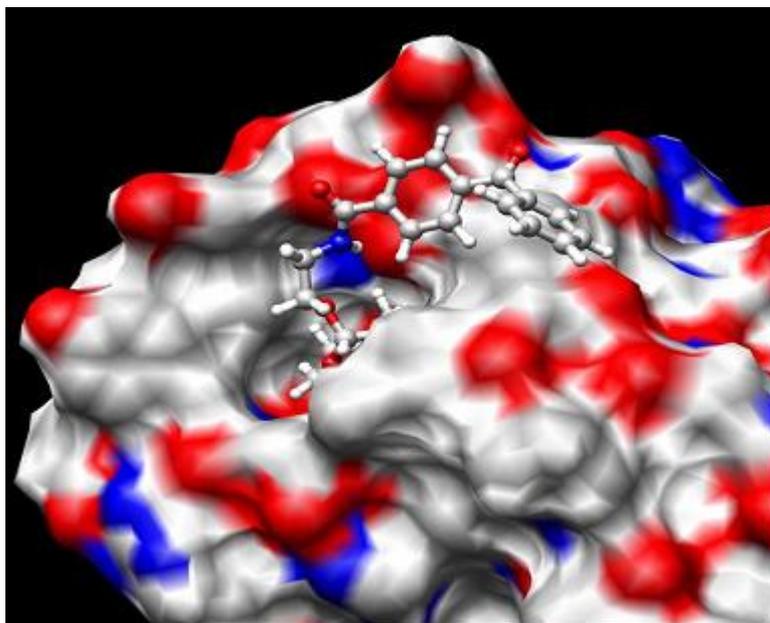


Abb. 4.47. Das photoaktive Benzophenon **16** als Ligand in der CRD des FimH-Proteins in der Konformation mit „geschlossenem Tyrosin-Tor“; gezeigt ist die „gedockte“ Form mit dem höchsten Scoring-Wert.

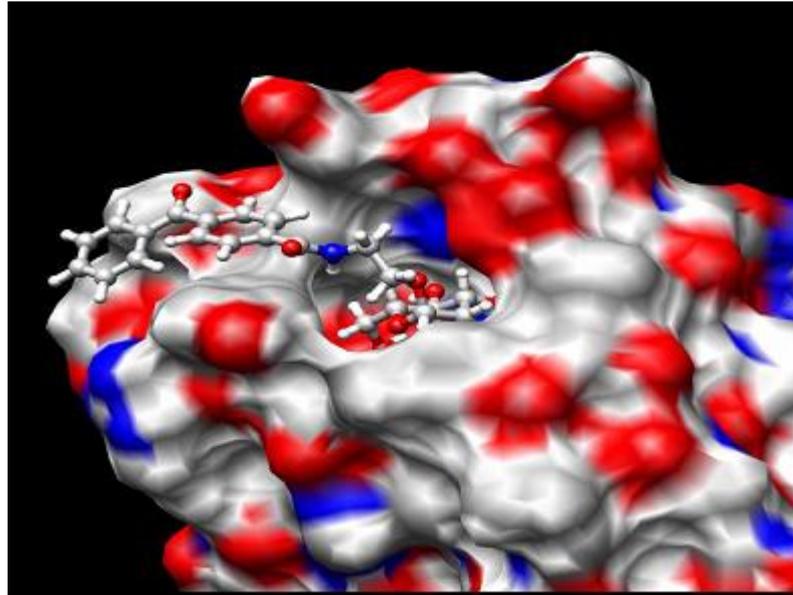


Abb. 4.48. Das photoaktive Benzophenon **16** als Ligand in der CRD des FimH-Proteins in der Konformation mit „geöffnetem Tyrosin-Tor“; gezeigt ist die „gedockte“ Form mit dem höchsten Scoring-Wert.

Zusätzlich zu den π - π -Interaktionen des einen Phenylsystems mit den beiden Tyrosinen des Tyrosin-Tors ergeben sich stabilisierende Wechselwirkungen zwischen dem zweiten Phenylring mit der lipophilen Peripherie der Bindetasche, was zu den guten Scoring-Werten passt.

Ein Vergleich mit den aus dem ELISA-Experiment ermittelten Werten für den Ligand **16** zeigt die Diskrepanz zwischen den theoretischen Berechnungen und experimentellen Ergebnissen. Ergänzend zu den übrigen im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Resultaten entspricht der niedrige RIP-Wert für das photoaktive Benzophenon-Derivat den interaktiven Verhältnissen im Protein-Ligand-Komplex. Durch den sterisch sehr anspruchsvollen Benzophenon-Rest ist die Bildung des Komplexes erheblich erschwert. Die hervorragenden Eigenschaften zur perfekten Stabilisierung, die in der theoretischen Berechnung voll zum Tragen kommen, sind praktisch wertlos, wenn sich die Protein-Ligand-Verbindung aus sterischen Gründen gar nicht bilden kann.

Im Falle des photoaktiven Glycopeptides **19** stimmen die Ergebnisse aus ELISA und Docking-Studien am wenigsten überein. In den Docking-Experimenten erreicht der bifunktionelle Photoaffinitätsmarker **19** Top-Scoring-Werte von - 31.9 und -36.0, die für eine extrem stabile Interaktion sprechen (Abb. 4.49 und 4.50).

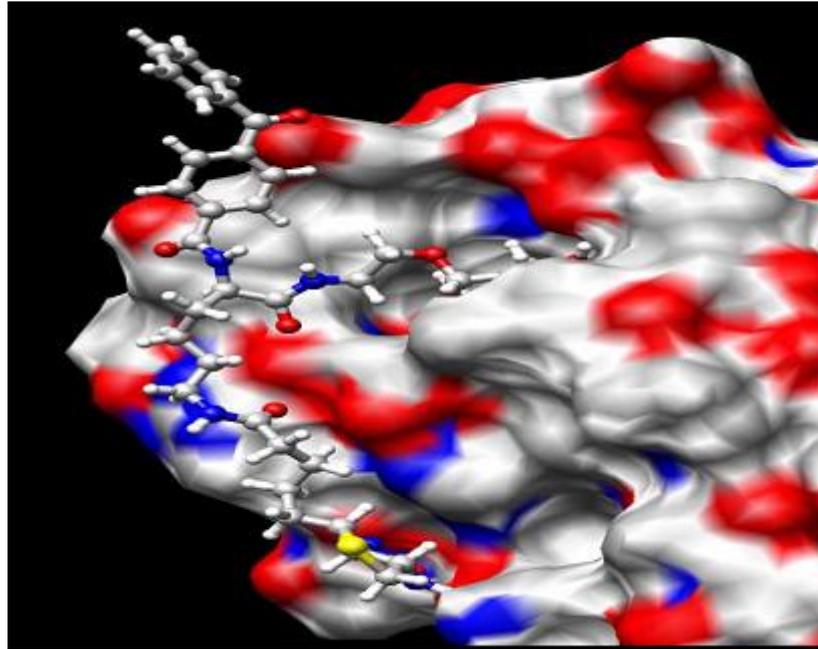


Abb. 4.49. Das photoaktive bifunktionelle Benzophenon **19** als Ligand in der CRD des FimH-Proteins in der Konformation mit „geschlossenem Tyrosin-Tor“; gezeigt ist die „gedockte“ Form mit dem höchsten Scoring-Wert.

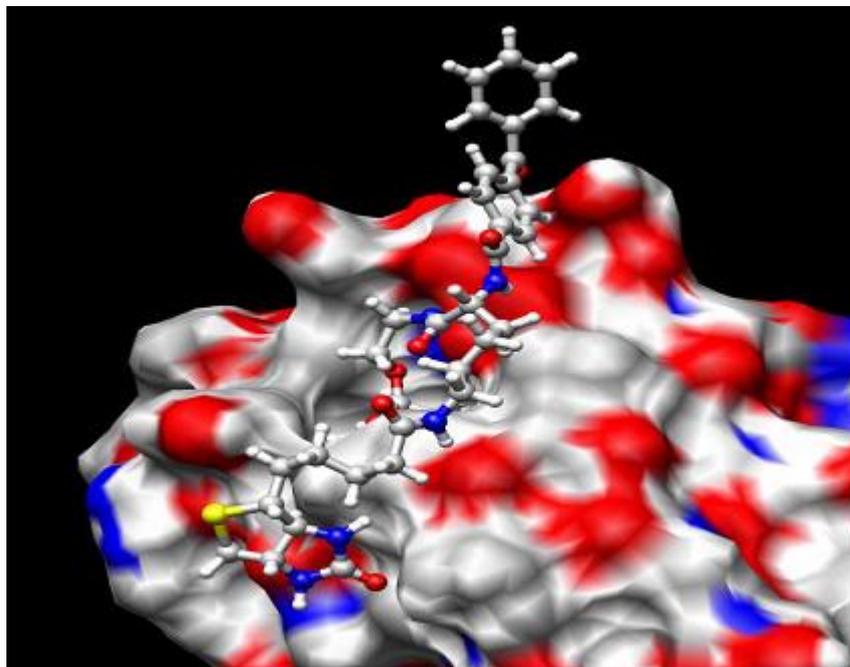


Abb. 4.50. Das photoaktive bifunktionelle Benzophenon **19** als Ligand in der CRD des FimH-Proteins in der Konformation mit „geöffnetem Tyrosin-Tor“; gezeigt ist die „gedockte“ Form mit dem höchsten Scoring-Wert.

Bei „geschlossenem Tyrosin-Tor“ sind die stabilisierenden Wechselwirkungen zwischen Protein und Ligand noch stärker ausgeprägt als bei „offenem Tyrosin-Tor“,

da ein „Anschmiegen“ des verlängerten Aglykons hierbei exakter funktioniert. Das Peptidgerüst des Aglykons fördert die Ausbildung lipophiler Wechselwirkungen mit dem Protein in der Peripherie der CRD, was theoretisch zu einem sehr stabilen Protein-Ligand-Komplex führt.

Trotz dieser exzellenten Scoring-Werte zeigen die Ergebnisse des ELISA-Testes lediglich schwache Bindungsaffinitäten für das α -D-Mannosid **19**, was bedeuten kann, dass der Mannosyl-Rest nicht mehr ausreichend in der Bindetasche des Proteins stabilisiert wird. Die Begründung für dieses Phänomen muss zum einen in der Größe des Liganden **19** und zum anderen in der chemischen Struktur dieser Verbindung verborgen liegen. Wenn das Aglykon im Vergleich zum α -D-Mannosid räumlich zu groß wird und dazu noch ein Peptidgerüst enthält, werden zu viele und zu starke lipophile Wechselwirkungen mit der Peripherie der Bindedomäne des Proteins ausgebildet, welche bewirken können, dass der Mannosyl-Rest einfach aus der Bindetasche heraus „gehebelt“ wird und somit in einem Affinitätsverlust resultiert. Diese Tatsache wurde bereits in Kapitel 4.4.2 ausführlich diskutiert.^[177]

4.5 Qualitative Bewertung der synthetisierten photoaktiven α -D-Mannoside **12, **14**, **16**, **19**, **23** und **26****

Zusammenfassend soll an dieser Stelle eine qualitative Bewertung der sechs synthetisierten photoaktiven α -D-Mannoside **12**, **14**, **16**, **19**, **23** und **26** bezüglich ihres Einsatzes zur Photoaffinitätsmarkierung des bakteriellen Lektins FimH erfolgen.

Zunächst wird aus den hier erarbeiteten Ergebnissen deutlich, dass die Benzophenone (synthetisierte Mannoside **16** und **19**) als Photophore zur Markierung von Mannose-bindenden Proteinen ausscheiden. Sie zeigen zwar die gewünschte Löslichkeit in Wasser und Phosphatpuffer und binden an Aminosäuren mit linearer Alkylkette (Lys) und Peptide mit linearer unpolarer Struktur (Pentaglycin). Auch lassen sie sich, verglichen mit den Diazirinen und Aziden auf relativ einfachem Wege synthetisieren und ohne Probleme bei Tageslicht handhaben. Sie gehen jedoch weder mit den Peptiden Angiotensin II und PTHIKWGD, noch mit den zu untersuchenden Proteinen *FimH truncate* und ConA sowie dem Proteinkomplex

FimCH kovalente Bindungen ein. Zusätzlich benötigen die Benzophenone zur Aktivierung sehr hohe Bestrahlungsdauern von mind. 60 min bei einem Absorptionsmaximum von $\lambda_{\max} \approx 330$ nm, wobei die dabei angeregten reaktiven Radikale meist bevorzugt in den Grundzustand relaxieren statt kovalent an die Biomoleküle zu binden.

Das Azid **12** lässt sich, verglichen mit den Benzophenonen **16** und **19** sowie den Diazirinen **14**, **23** und **26** qualitativ „in der Mitte“ einordnen. Es bindet kovalent, jedoch nicht immer eindeutig an Biomoleküle, wobei es keine Präferenzen bezüglich der Polarität einzelner Regionen zeigt. Nachteilig wirken sich jedoch ganz klar die Löslichkeitseigenschaften aus; so ist das Azid **12** lediglich in MeOH löslich, was nicht den gewünschten Bedingungen für die photoinduzierte Markierung von Proteinen entspricht. Auch der Syntheseaufwand erscheint im Hinblick auf die sonstigen qualitativen Eigenschaften als potenzieller Photomarker zu hoch. Die zur Aktivierung ermittelte Bestrahlungsdauer von 30 min bei einem akzeptablen Absorptionsmaximum von $\lambda_{\max} = 343.3$ nm ist zwar kürzer als im Fall der Benzophenone, jedoch deutlich länger als es für die Aktivierung der Diazirine nötig ist. Die in dieser Arbeit dokumentierten Ergebnisse der MS-Analysen der mit dem Azid **12** markierten Peptide zeigen klar, dass die zwischen Photomarker und Peptid geknüpfte kovalente Bindung schwächer ist, als die Bindungen des Peptid-Rückgrates. Dadurch wird eine erfolgreiche Bestimmung des genauen Markierungsortes sowohl bei den niedermolekularen Peptiden als auch bei *FimH truncate* deutlich erschwert.

Demnach ist der dreigliedrige Diazirin-Ring (Diazirin **14**, **23** und **26**) für die photoinduzierte Markierung von Biomolekülen die am besten geeignete photoaktive funktionelle Gruppe. Nach einer relativ kurzen Bestrahlungsdauer von 10 min mit UV-Licht in einem für Biomakromoleküle völlig unbedenklichen Wellenlängenbereich ($\lambda_{\max} \approx 350$ nm), bildet sich das hoch reaktive Carben als intermediäre Zwischenstufe aus. Diese reagiert bereitwillig unter Ausbildung einer kovalenten Bindung mit entsprechend angebotenen Reaktionspartnern. Diese können entweder polare Lösungsmittel (Wasser, Alkohole) sein oder verschiedene Biomoleküle wie Aminosäuren, Peptide und Proteine. Bei Anwesenheit von niedermolekularen Aminosäuren mit polaren Seitenketten (Thr, Tyr, Lys und Arg), den Peptiden Angiotensin II und PTHIKWGD sowie den Proteinen *FimH truncate*,

FimCH und ConA tritt die Insertion in Lösungsmittelmoleküle in den Hintergrund. Die Ausbeuten an markierten Verbindungen pendeln sich hierbei zwischen 10 und 20 % ein. Zudem binden die Diazirine **14**, **23** und **26** bevorzugt an polare Regionen, die reich an OH- und NH₂-Gruppen sind. Das Diazirin **14** ist sowohl in Wasser als auch in physiologischem Phosphat-Puffer vollständig löslich, während die beiden bifunktionellen Diazirine **23** und **26** eine Zugabe von 50% Acetonitril benötigen, was sich für Biomoleküle als Nachteil auswirken könnte. Die eingesetzten Konzentrationen für die Photolysereaktionen in Gegenwart von Aminosäuren, Peptiden und Proteinen sind hierbei jedoch so gering, dass der in den jeweiligen Probelösungen enthaltene Anteil an Acetonitril vernachlässigbar klein ist.

Die Analysen der markierten Peptide und Proteine ergaben für alle drei photoaktiven Diazirin-Liganden **14**, **23** und **26** positive Ergebnisse; in allen Fällen konnten die jeweiligen Insertionsprodukte massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Zusätzlich war es möglich, die Bildung der Insertionsprodukte mittels immunchemischer Methoden eindeutig zu zeigen. Es war sogar möglich, Aussagen über die Bindungsstärke der einzelnen Liganden im Bezug auf die Proteine zu machen. Der zusätzlich eingeführte Biotin-Rest wirkte sich dabei ideal auf die durchgeführten biochemischen Detektionsmethoden aus. Einzige Schwachpunkte der Diazirine sind zum einen der erhöhte Syntheseaufwand, da zur Herstellung der Verbindungen **14**, **23** und **26** mehrere anspruchsvolle Reaktionsstufen erforderlich waren. Zum anderen ist die Diazirin-Gruppierung äußerst lichtempfindlich, sodass das „Handling“ dieser Verbindungen immer unter Ausschluß von Tageslicht erfolgen musste. Sind die Verbindungen jedoch erst einmal in ausreichender Menge synthetisiert und werden mit der erforderlichen Vorsicht behandelt, dienen sie als hervorragende Werkzeuge im Hinblick auf die Photoaffinitätsmarkierung Mannose-spezifischer Proteine.

Die qualitative Bewertung der hier diskutierten charakteristischen Eigenschaften ist in Form einer Gesamtübersicht in Tabelle 5.2 in Kapitel 5 zusammengefasst.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Im Bereich der pharmakologischen Forschung gewinnt die Studie von Rezeptor-Ligand-Interaktionen zunehmend an Bedeutung. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte eine Methode etabliert werden, die die Untersuchung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen in einem dynamischen System ermöglicht. Hierfür bot sich besonders das in Lösung durchgeführte Verfahren der Photoaffinitätsmarkierung an.

Als Adhäsionsprotein von *E. coli*-Bakterien fördert das Protein FimH die bakterielle Kolonisierung im Harntrakt des lebenden Organismus, was zu Harnwegsinfekten führt. FimH besteht aus zwei Protein-Domänen, einer Pilus-Domäne, die den C-Terminus trägt und einer Lektin-Domäne, an deren Spitze der N-Terminus in einer tiefen Bindetasche lokalisiert ist. Die Bindetasche fungiert als sog. Kohlenhydraterkennungs-Domäne (engl. *carbohydrate recognition domain* = CRD) und ist, wie in Kapitel 1.1.2.4 ausführlich berichtet, exakt auf die Komplexbildung einer α -D-Mannosyl-Einheit in pyranoider Anordnung ausgelegt. Inzwischen ist es gelungen, drei Kristallstrukturen des Adhäsins FimH zu erhalten^[47,48,52]. Dabei konnte das Protein jeweils mit den drei unterschiedlichen Liganden C-HEGA, α -D-Mannose in seiner pyranoiden Ringform und *n*-Butylmannosid kristallisiert werden. Die Kristallstrukturen der FimH-Ligand-Komplexe zeigen jeweils nur eine mögliche Konformation mit den dafür spezifischen Interaktionen. In biologischen Systemen liegt dahingegen ein dynamisches System vor, indem das Protein eine Vielzahl möglicher Konformationen einnehmen kann; die daraus resultierenden Wechselwirkungen zwischen Kohlenhydrat-Ligand und FimH-Protein können daher von den in den Kristallstrukturen vermittelten Umständen differieren. Für ein besseres Verständnis des Ligand-Bindevhaltens des FimH-Proteins ist die Berücksichtigung der Protein-Ligand-Interaktionen in Lösung daher sinnvoll.

An dieser Stelle kann die Methode der Photoaffinitätsmarkierung nützlich sein, da sie ausschließlich in Lösung durchgeführt wird und somit zur Untersuchung eines dynamischen Protein-Ligand-Systems besonders geeignet ist. Das Verfahren beruht auf dem Einsatz photoaktiver funktioneller Gruppen (PAFGs), die kovalent an die

entsprechenden Liganden gebunden sind. Die Bestrahlung eines solchen photoaktiven Derivates mit UV-Licht geeigneter Wellenlänge führt zu hoch reaktiven Intermediaten, die in der Lage sind, nach Inkubation des Liganden mit seinem Rezeptorprotein an geeigneten Stellen des Proteins eine kovalente Bindung zu knüpfen.

Für die Charakterisierung gebildeter Kreuzkupplungsprodukte können unterschiedliche Analyse-Methoden herangezogen werden. Zunächst wurden sechs verschiedene photolabile α -D-Mannoside designed und anschließend synthetisiert, die mit unterschiedlichen photoaktiven funktionellen Gruppen (Diazirin, Tetrafluorophenyl-Azid und Benzophenon) ausgestattet sind (Abbildung 5.1).

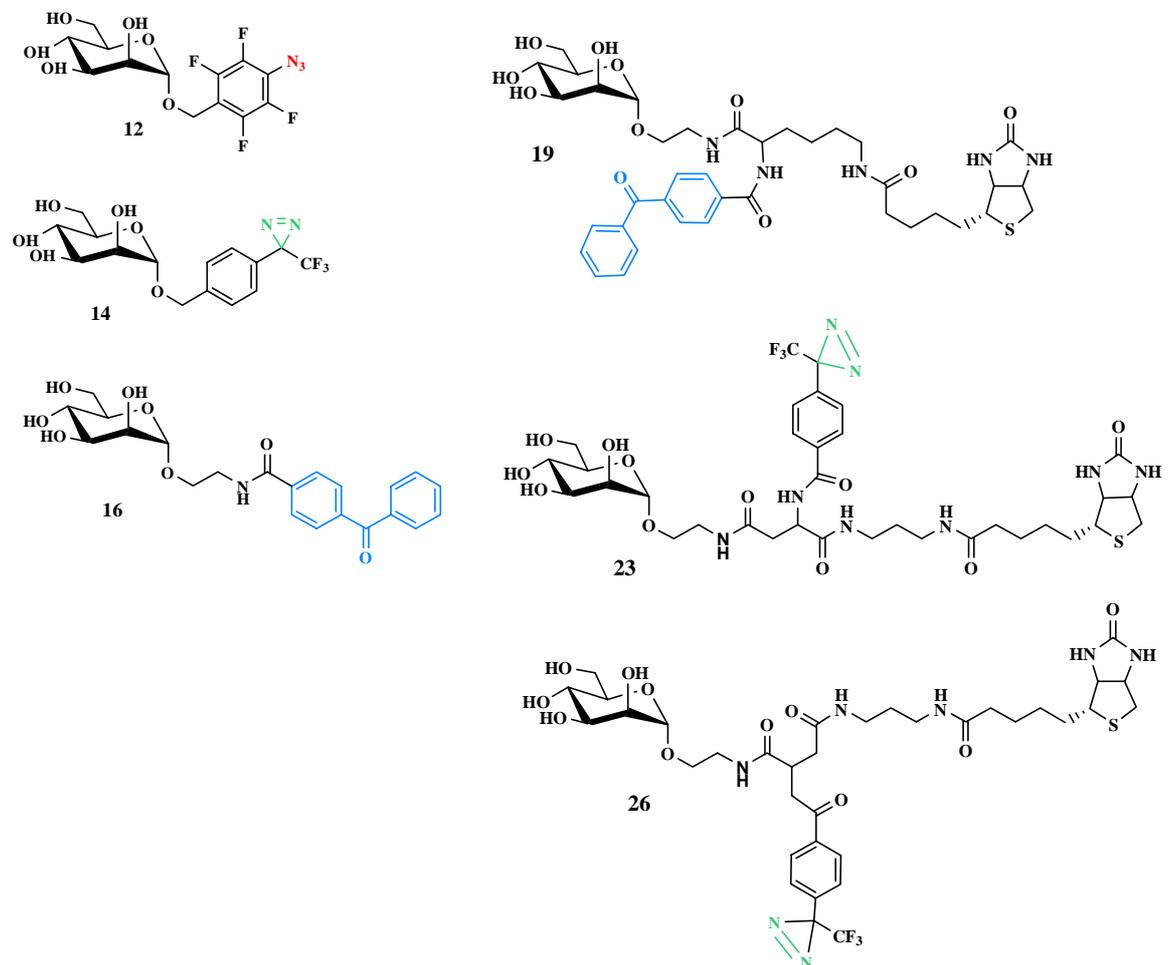


Abb. 5.1. Übersicht über die sechs synthetisierten photolabilen mannosidischen Liganden **12**, **14**, **16**, **19**, **23** und **26** für das bakterielle Lektin FimH. Die PAFGs sind farblich hervorgehoben (Diazirin: grün; Azid: rot; Benzophenon: blau).

Für den strukturellen Aufbau dieser photoaktiven Liganden spielt die Anordnung des α -D-Mannosyl-Restes in der Bindetasche des FimH-Adhäsins eine entscheidende Rolle und musste daher in jedem Falle für die grundlegenden Überlegungen berücksichtigt werden (ausführlich Kapitel 1.1.2.4). Die PAFGs wurden jeweils an C-1-Position des „Mannose-Grundgerüsts“ eingeführt, wobei die einzelnen Synthese-Sequenzen hierbei so aufgebaut wurden, dass die Verknüpfung entweder direkt über eine Glycosylierungsreaktion erreicht wurde oder das photolabile Element an Glycoaminosäuren gebunden wurde. Dieses Ligand-Design stellte sicher, dass die Komplexierung der jeweiligen mannosidischen Liganden in der FimH-Bindetasche nicht sterisch gehindert ist, da die entsprechenden PAFGs im Protein-Ligand-Komplex ausserhalb der CRD angeordnet sind. So können sie nach Bestrahlung mit UV-Licht kovalent am Eingang der Protein-CRD binden, der Ligand wird in der Bindetasche fixiert und die anschließende Untersuchung des Protein-Ligand-Komplexes wird möglich.

Die Synthesen des Azides **12** und des Diazirins **14** verliefen sehr effizient durch klassische Glycosylierung. Aufgrund der hohen Photoaktivität der Diazirine war bei ihrer Lagerung und Umsetzung unbedingt auf Lichtausschluss zu achten, um eine Zersetzung der Substanzen zu verhindern. Verbindung **16**, die Benzophenon als PAFG trägt, konnte über eine Standard-Peptidkupplungsreaktion mit kommerziell erhältlicher 4-Benzoyl-benzoessäure gewonnen werden.

Grundsätzlich liefern „Crosslinking-Reaktionen“ zwischen photoaktiven Verbindungen und entsprechenden Reaktionspartnern komplexe Gemische aus Edukt, nicht markiertem Reaktionspartner, unspezifisch markierten Nebenprodukten sowie photomarkiertem Produkt, so dass die Analyse der Insertionsprodukte erheblich erschwert ist. Als geeigneter Lösungsansatz für diese Problematik bot sich die Erweiterung der photoaktiven α -D-Mannoside auf bifunktionelle Strukturen an, so dass die potenziellen Lektin-Liganden nicht nur mit einer photoaktiven Gruppe, sondern zusätzlich mit einer Biotin-Einheit ausgestattet sind. Die Einführung des Biotin-Restes erleichtert die Analyse gebildeter Kreuzkupplungsprodukte erheblich, weil sie die Trennung komplexer Peptid- und Proteingemische mittels Affinitätschromatographie erlaubt. Außerdem besteht die Möglichkeit, eine hoch

selektive Affinitätsfärbung durchzuführen, um auf effiziente Weise photomarkierte Produkte zu detektieren.

Im organisch präparativen Teil dieser Arbeit gelang es demnach, erfolgreich sechs unterschiedliche photoaktive potenzielle Liganden basierend auf α -D-Mannose für das bakterielle Lektin FimH zu synthetisieren, die bis dahin noch nicht literaturbekannt waren^[134] (vgl. Abbildung 5.1). Mit diesen neuen Verbindungen ist es gewährleistet, Photoaffinitätsmarkierung ohne den Einsatz radioaktiver Marker zu betreiben.

Im zweiten Teil dieser Arbeit erfolgte anhand mehrerer photolytischer und biochemischer Experimente der „*Proof of Principle*“ des Projektes.

Nach Aufklärung des photolytischen Verhaltens der synthetisierten photoaktiven Mannoside in unterschiedlichen Lösungsmitteln bestand der nächste Evaluationsschritt darin, die Photomarker in Anwesenheit gezielt ausgewählter Aminosäuren und Peptide zu bestrahlen. Unter Berücksichtigung der strukturellen Beschaffenheit der CRD des bakteriellen Adhäsins FimH wurden sechs (teilweise orthogonal geschützte) Aminosäuren ausgewählt, von denen sich jede am äußeren Rand der CRD des Lektins FimH mindestens einmal wiederfindet:

Boc-Thr-OH, Boc-Ser-OH, Boc-Tyr-OH, Boc-Ile-OH, Cbz-Lys-OH und H-Arg-OH.

Die Photoaffinitätsmarkierung der einzelnen Aminosäuren führte zu einer Reihe massenspektrometrisch nachweisbarer Insertionsprodukte (siehe Tabelle 4.3, Kapitel 4.2.5). Zusätzlich ergaben sich daraus erste Hinweise bezüglich des Bindungsortes der photoaktiven Spezies, da sie hinsichtlich ihres Markierungspotenzials durchaus polaritätsabhängige Präferenzen zeigten. Das Diazirin **14** insertierte vorwiegend in die polaren Aminosäuren Arginin, Tyrosin, Threonin und Lysin, während die Benzophenone **16** und **19** ausschließlich an Lysin mit seiner linearen Alkylkette banden und das Azid **12** das unpolare Isoleucin bevorzugte. Zusätzlich konnte das Addukt, welches sich durch Insertion des biotinylierten Benzophenons **19** in das Cbz-geschützte Lysin-Derivat gebildet hat, mit Hilfe einer Avidin-Affinitätssäule unter Ausnutzung der starken Wechselwirkungen zwischen Avidin und Biotin erfolgreich gereinigt und aufkonzentriert werden.

Der nächste Schritt zur Evaluation der synthetisierten photoaktiven Mannoside beinhaltete die Bestrahlung der photolabilen Substanzen in Gegenwart ausgewählter Modell-Peptide. Hierfür wurden Angiotensin II, das synthetische, käufliche

Oktapeptid PTHIKWGD sowie das unpolare Pentaglycin ausgewählt. Das Entscheidende an der Vielfältigkeit der beiden Oktapeptide ist hierbei, dass die enthaltenen Aminosäuren zu erheblichem Teil (etwa 50 %) den Aminosäuren entsprechen, die die Bindetasche des bakteriellen Adhäsins FimH säumen, während Pentaglycin mit seiner eher unpolaren Struktur ein entgegengesetztes Extremum darstellt. Nach Bestrahlung, Reinigung mittels RP-Material oder Affinitätschromatographie sowie anschließender massenspektrometrischer Analyse ergab sich eine Reihe von Kreuzkupplungsprodukten, die mit Hilfe der ESI-FT-ICR-MS/MS-Technik und mittels MALDI-TOF-TOF-Massenspektrometrie näher charakterisiert werden konnten. So deutet das MS/MS-Spektrum von Angiotensin II und Diazirin **14** auf ein photomarkiertes Produkt hin, bei dem das durch Photoaktivierung generierte Carben an die Aminosäure Tyrosin des Angiotensin II gebunden hat.

Diese Tatsache bestätigt zusätzlich die aus vorangegangenen Experimenten erhaltenen Ergebnisse in sofern, dass Carbene, die durch UV-Bestrahlung aus Diazirinen gebildet werden, bevorzugt in polare OH- oder NH-Bindungen insertieren.

Der nächste wichtige Schritt dieser Arbeit bestand in der Bestrahlung des Mannose-spezifischen Proteins FimH in Gegenwart der synthetisierten photoaktiven Liganden. Hierbei wurde jedoch nicht mit dem ursprünglichen bakteriellen Adhäsins FimH gearbeitet, sondern mit einem „Teilstück“, dem sog. *FimH truncate*, welches eine am C-Terminus um 119 Aminosäuren gekürzte Sequenz aufweist. Trotz dieser Modifikationen verfügt *FimH truncate* über dieselben biologischen und biochemischen Eigenschaften wie das an der Bakterienoberfläche exprimierte FimH-Protein.

Zur Untersuchung der einzelnen bestrahlten Proben sowie der gebildeten Insertionsprodukte wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Reihe verschiedener Analyse-Methoden etabliert und eingesetzt:

- 1) Direkte Präparation der bestrahlten Proben für die massenspektrometrische Analyse (MALDI-TOF-MS mit auf das jeweilige Analyse-Problem abgestimmter Matrix); siehe dazu auch Kapitel 4.2.7.2.
- 2) Affinitätsfärbung (Dot Blot) des photomarkierten und biotinylierten Proteins

- durch Ausbildung eines Biotin-Streptavidin-HRP-Farbstoff-Komplexes (siehe Kapitel 4.2.7.3).
- 3) Isolierung der markierten biotinylierten Proteine mittels Biotin-Avidin-Affinitätschromatographie (ausführlich in Kapitel 4.2.7.4).
 - 4) Auftragen der einzelnen Proben auf ein SDS-Polyacrylamidgel (siehe dazu Kapitel 4.2.7.5).
 - 5) Affinitätsfärbung (Western Blot) des markierten und biotinylierten Proteins durch „oxidatives Anfärben“ der jeweiligen gebildeten Komplexe (ausführlich in Kapitel 4.2.7.6).
 - 6) Proteolytische In-Gel-Hydrolyse mit drei unterschiedlichen Proteasen und nachfolgende massenspektrometrische Analyse (MALDI-TOF-MS / MALDI-TOF-TOF-MS/ ESI-MS/ ESI-MS-MS); siehe dazu Kapitel 4.2.7.7.
 - 7) Tryptische Hydrolyse direkt aus der Probelösung mit anschließender massenspektrometrischer Analyse (MALDI-MS/ ESI-MS); siehe hierzu Kapitel 4.2.7.8.

Die danach erhaltenen Ergebnisse bestätigen das hohe Markierungs-Potenzial der eingesetzten Photomarker. Im Falle des Azides **12** und der Diazirine **14**, **23** und **26** konnten nach Inkubation und Bestrahlung massenspektrometrisch Produkte identifiziert werden, deren Masse-Ladungsverhältnis mit den Summenformeln und monoisotopischen Massen der entsprechenden Kreuzkupplungsprodukte korrelieren. Festzuhalten bleibt außerdem, dass in keinem der aufgenommenen Spektren Signale identifiziert werden konnten, die ein mehrfach markiertes Protein zeigen. Damit ist die Existenz einer weiteren Mannose-spezifischen Bindetasche auf der Oberfläche des FimH-Proteins sehr unwahrscheinlich.

Die Abbildung 5.2 enthält (stellvertretend für alle anderen MS-Spektren) das MALDI-TOF-MS-Spektrum des nach Bestrahlung von *FimH truncate* mit Diazirin **14** gebildeten Produkts, dessen Masse-Ladungsverhältnis mit der Summenformel sowie auch mit der monoisotopischen Masse des entsprechenden Insertionsproduktes übereinstimmt. In dem Spektrum sind die Signale des ein- und zweifach geladenen Kations des nicht markierten Proteins zu sehen; ebenso das Signal, welches mit dem einfach geladenen Kation des Insertionsproduktes korreliert. (für weitere MS-Spektren siehe Kapitel 4.2.7.2).

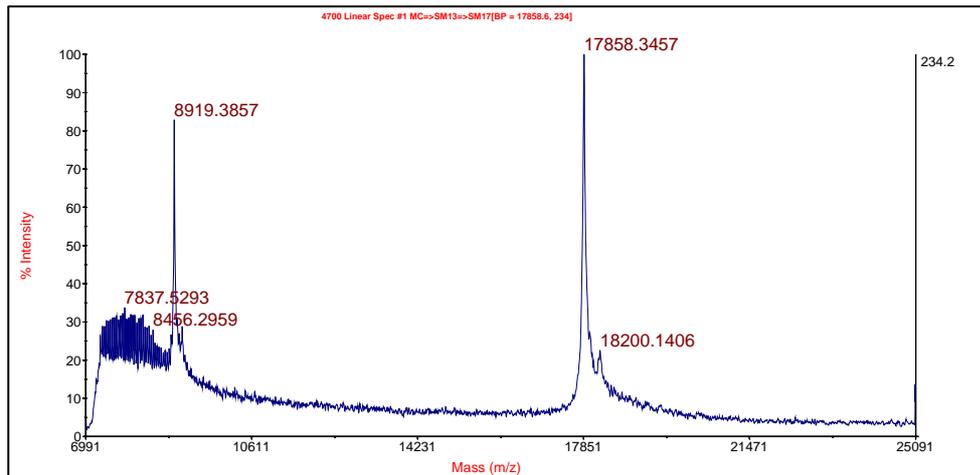


Abb. 5.2. MALDI-TOF-MS-Spektrum des bei der Bestrahlung des *FimH truncate* Proteins mit Diazirin **14** gebildeten Insertionsproduktes. Aufgenommen mit dem 4700 Proteomics Analyser (Applied Biosystems): 8919 = $[M+2H]^{2+}$; 17858 = $[M+H]^+$; 18200 = $[M+Carben+H]^+$.

Zur ergänzenden Visualisierung der mit den bifunktionellen photoaktiven Mannosiden **19**, **23** und **26** gebildeten Markierungsprodukte wurden zusätzlich hoch sensitive Affinitätsfärbungen in Form von Dot Blots und Western Blots durchgeführt. Für die selektive Anfärbung wurde hierbei die hohe Affinität des Biotin-Restes zu Streptavidin ausgenutzt (ausführlich Kapitel 4.2.7.3 und 4.2.7.6). Beide Methoden bestätigten die Markierung des Proteins *FimH truncate* mit den biotinylierten Photophoren **23**, **26** und **19**.

Desweiteren wurde versucht, mittels enzymatischer Hydrolyse und nachfolgender MS-Analyse des photoinduziert markierten Proteins *FimH truncate*, die entsprechenden Markierungsorte zu lokalisieren (vgl. Kapitel 4.2.7.7 und 4.2.7.8). Mit den verwendeten Analyse-Geräten war es jedoch nicht möglich, entsprechende Peptid-Fragmente zu identifizieren; eine unspezifische Markierung des Proteins konnte dennoch sicher ausgeschlossen werden.

Um die Funktion und potenziell breite Anwendbarkeit der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten und synthetisierten photoaktiven Liganden weiterführend zu evaluieren, wurden die Markierungsexperimente zusätzlich mit dem Protein-Komplex FimCH sowie dem ebenfalls Mannose-spezifischen Lektin Concanavalin A durchgeführt (siehe auch Kapitel 4.3). Hierbei lag das Interesse bevorzugt auf den Markierungseigenschaften der bifunktionellen Mannoside **19**, **23** und **26**, da diese zur

Analyse gebildeter Insertionsaddukte neben der Massenspektrometrie auch die Verwendung der Affinitätsfärbung erlauben. Im Falle der biotinylierten Diazirine **23** und **26** konnten durch Kombination von SDS-Polyacrylamidgel mit nachfolgendem Western Blot die entsprechend markierten Proteine ConA und FimCH nachgewiesen werden. Ebenso konnte anhand der photoinduzierten Markierung des Protein-Komplexes FimCH die Mannose-Spezifität des FimH-Proteins bestätigt und für das dynamische System eindeutig gezeigt werden. Der Transfer der Selektivität der Verbindungen **23** und **26** auf das ebenfalls Mannose-bindende Lektin ConA liefert zudem einen klaren Hinweis darauf, dass es sich zumindest bei den photoaktiven Liganden **23** und **26** um „universelle“ Markierungsreagenzien handelt, die potenziell in der Lage sind, ganze Bibliotheken oder sogar Organismen auf Mannose-bindende Proteine zu „screenen“.

Zusätzlich sind die Verbindungen **23** und **26** auch geeignet, um anhand des hier etablierten Verfahrens Mannose-spezifische Proteine auf ihre Ligand-Bindungseigenschaften hin zu untersuchen.

Um die biologische Aktivität der synthetisierten photoaktiven Mannoside zu zeigen und das Bindungsverhalten bezogen auf das bakterielle Lektin FimH zu testen, wurden mit Hilfe des ELISA-Verfahrens die charakteristischen relativen Inhibitionspotenziale (RIP-Werte) der einzelnen Verbindungen experimentell bestimmt. Anschließend Computer-gestützte Docking-Studien lieferten vergleichende theoretische Daten über die Bindungsaffinität der Mannoside gegenüber dem bakteriellen Lektin FimH. Die vier getesteten photolabilen Mannoside **12**, **14**, **16** und **19** zeigen alle biologische Aktivität. Zudem besitzen sie alle höhere Inhibitionspotenziale als der Standard Methyl- α -D-mannosid, was für eine erhöhte Bindungsaffinität gegenüber dem Protein FmH spricht. Azid **12** und Diazirin **14** werden, den ELISA-Studien nach zu urteilen, deutlich besser in der CRD des FimH-Proteins gebunden als das biotinylierte Benzophenon **19**. Die Docking-Studien zeigen wiederum mit den ELISA-Resultaten keine vollständige Übereinstimmung. Die Ergebnisse beider Methoden sind in der Tabelle 5.1 zusammen gestellt, welche eine Gesamtübersicht der ermittelten charakteristischen Eigenschaften aller sechs photolabilen α -D-Mannoside **12**, **14**, **16**, **19**, **23** und **26** beinhaltet. Die farbliche Unterlegung einzelner Felder soll eine qualitative Bewertung der Photomarker widerspiegeln.

Tab. 5.2. Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten charakteristischen Eigenschaften der sechs synthetisierten Photomarker **12**, **14**, **16**, **19**, **23** und **26**.

Günstige Eigenschaften sind hierbei Grün, ungünstige Eigenschaften Rot und akzeptable Eigenschaften Gelb unterlegt.

	12 (Azid)	14 (Diazirin)	23 (Diazirin)	26 (Diazirin)	16 (Benzo- phenon)	19 (Benzo- phenon)
Synthese (Kapitel 3.1 und 3.2)	4 Stufen	8 Stufen (4 unter Schutzgas)	12 Stufen (6 unter Schutzgas)	12 Stufen (6 unter Schutzgas)	1 Stufe unter Schutzgas	5 Stufen (3 unter Schutzgas)
Handhabung	unter Tageslicht	unter Ausschluss von Tageslicht	unter Ausschluss von Tageslicht	unter Ausschluss von Tageslicht	unter Tageslicht	unter Tageslicht
Löslichkeit (Kapitel 4.2.2 und 4.2.4)	MeOH	H ₂ O, Phosphat-puffer	H ₂ O/MeCN, Phosphat-puffer	H ₂ O/MeCN, Phosphat-puffer	H ₂ O, Phosphat-puffer	H ₂ O, Phosphat-puffer
t_{Photolyse}^[a] [min] (Kapitel 4.2.2)	30	10	10	10	60	60
λ_{max} [nm] (Kapitel 4.2.1)	265; 305	266; 356	266; 353	266; 336	264	242; 289
Insertion LM (Kapitel 4.2.3)	MeOH	H ₂ O, MeOH	H ₂ O	H ₂ O	k. I. ^[b]	k. I. ^[b]

	12 (Azid)	14 (Diazirin)	23 (Diazirin)	26 (Diazirin)	16 (Benzo-phenon)	19 (Benzo-phenon)
KK^[c] mit AS (Kapitel 4.2.5)	Ile	Thr, Lys, Arg, Tyr	n. b. ^[d]	n. b. ^[d]	Ile, Lys	Lys
KK^[c] mit Peptiden (Kapitel 4.2.6)	Angio II, PTHIKWGD	Angio II, PTHIKWGD	Angio II	Angio II	Pentaglycin	Angio II
KK^[c] mit Proteinen (Kapitel 4.2.7 und 4.3)	<i>FimH_{tr}</i>	<i>FimH_{tr}</i>	<i>FimH_{tr}</i> , FimCH, ConA	<i>FimH_{tr}</i> , FimCH, ConA	k. I. ^[b]	k. I. ^[b]
Nachweis der Kreuzkupplung	MS	MS	MS, Affinitätsfärbung	MS, Affinitätsfärbung	k. I. ^[b]	k. I. ^[b]
RIP^[e] (Kapitel 4.4.2)	30 ^[e]	15 ^[e]	n. b. ^[d]	n. b. ^[d]	9 ^[e]	3 ^[e]
Scoring-Werte^[f] (Kapitel 4.4.4)	- 24.0 ^[f]	- 29.0 ^[f]	n. b. ^[d]	n. b. ^[d]	- 30.0 ^[f]	- 34.0 ^[f]

[a] t_{photolyse} = Bestrahlungsdauer in min

[b] k. I. = keine Insertion

[c] KK = Kreuzkupplungsprodukt

[d] n. b. = nicht bestimmt

[e] IP Standard-MeMan = 1

[f] Scoring-Wert Standard-MeMan: -23.0

Es wird hierbei deutlich, dass der dreigliedrige Diazirin-Ring (Diazirin **14**, **23** und **26**) für die photoinduzierte Markierung von Biomolekülen die am besten geeignete photoaktive funktionelle Gruppe ist. Die zusätzlich an **23** und **26** gebundene Biotin-Einheit eignet sich dabei hervorragend zum Nachweis und zur Isolierung gebildeter Insertionsprodukte. Während Benzophenone als Photophore zur Markierung von Mannose-bindenden Proteinen ausscheiden, nimmt das Azid **12** eine Art „Zwischenstufe“ ein.

Zusammenfassend konnte im Rahmen der Arbeit erfolgreich gezeigt werden, dass die synthetisierten Photoaffinitätsmarker als effektive Werkzeuge zur Markierung von Mannose-bindenden Proteinen einzusetzen sind. Durch die Verwendung moderner und hoch sensitiver massenspektrometrischer Techniken, die gegebenenfalls auch eine Vorfraktionierung markierter Proteine/Peptide (Kombination von LC und MS) erlauben, könnte zusätzlich eine Identifikation des Insertionsortes erfolgen. Damit könnte auch eindeutig bewiesen werden, dass keine weitere Mannose-spezifische CRD auf der Oberfläche des *FimH truncate* Proteins existiert.

Eine zusätzliche Erleichterung an diesem Punkt würde sicherlich auch die Verbesserung der hier vorgeschlagenen Affinitätschromatographie liefern, mit deren Hilfe es zwar möglich war, affinitätsmarkierte Peptide zu isolieren, nicht jedoch Proteine. Eine besser geeignete Säule (Variation der Porengröße, Länge, Volumen) in Verbindung mit veränderten Chromatographie-Bedingungen (Lauf-/Elutions-Puffer, Ionenstärke, pH-Wert) könnte zum gewünschten Ergebnis führen.

Darüberhinaus wäre es, nach Modifizierung des hier vorgeschlagenen Verfahrens, mit den entwickelten Photomarkern (vor allem mit den bifunktionellen Diazirinen **23** und **26**) dann möglich, weitere bekannte, für die pharmakologische Forschung interessante Mannose-spezifische Proteine auf ihre Ligand-Bindungseigenschaften zu untersuchen.

Ebenfalls denkbar in diesem Zusammenhang wäre es, durch Einsatz der hier synthetisierten biotinylierten photoaktiven α -D-Mannoside, sogenannte „fishing-out“-Experimente zu entwickeln, um aus komplexen biochemischen Gemischen oder Organismen (beispielsweise nach einem Zell-Aufschluss) selektiv bisher unbekannte Mannose-bindende Proteine zu isolieren, die anschließend identifiziert und charakterisiert werden könnten.

6 Summary and Outlook

In the field of pharmacological research the investigation of protein ligand interactions becomes more and more significant. Adhesion to the glycosylated surface of eukaryotic cells, mediated by lectins for example, plays an important role in inflammation and other cellular processes of living organisms. To elucidate the mechanisms involved in the adhesion to cell surfaces and their biological consequences, the investigation of the molecular interactions between carbohydrate recognition domains (CRDs) of lectins and their ligands is of relevance. The interaction of lectins with the cell surface carbohydrates influences cellular events such as cell division or immune response. Bacteria utilize their own lectins, which are assembled as part of the bacterial appendages, named fimbriae or pili, for adhesion and colonization of host cell surfaces. Uropathogenic *Escherichia coli* express so-called type 1 fimbriae, which have been shown to play a crucial role in adhesion, infection, invasion, and pathogenicity. The lectin domain of type 1 fimbriae is represented by a protein called FimH, which is specific for α -mannosyl residues. The molecular details of carbohydrate binding to FimH are not yet fully understood. X-ray studies have revealed that FimH has a CRD at its tip, which is compatible with mannose binding; however, binding experiments with various multivalent mannosyl clusters as well as theoretical studies have suggested that there might be additional carbohydrate binding domains on FimH. Nevertheless, crystal structures showing a ligand fixed in the binding pocket of the protein FimH offer no significant information about the molecular protein ligand interactions in a physiological system which is dynamic. Thermodynamical circumstances during the crystallization process and in the crystal structure itself are more limited than in solution, because they reflect only one possible protein conformation. The method of photoaffinity labeling, usually performed in solution, is a powerful tool for the investigation of dynamic protein ligand systems.

Within this thesis photoaffinity labeling was selected to explore the ligand binding to the α -mannose-specific adhesion FimH. Suitable α -D-mannoside derivatives equipped with suitable photoreactive functional groups (PAFG) were needed as ligands to further investigate the interactions of FimH with carbohydrates. The aim of this thesis was, to design and synthesize potential photoactive α -D-mannosides

with different PAFGs as ligands for the bacterial lectin FimH. Further on their potential to photolabel peptides and the protein FimH should be investigated and compared.

A set of six unique photoactive α -D-mannosides equipped with different photoactive functional groups, such as diazirine, azide and benzophenone, were successfully designed and synthesized (fig. 6.1).

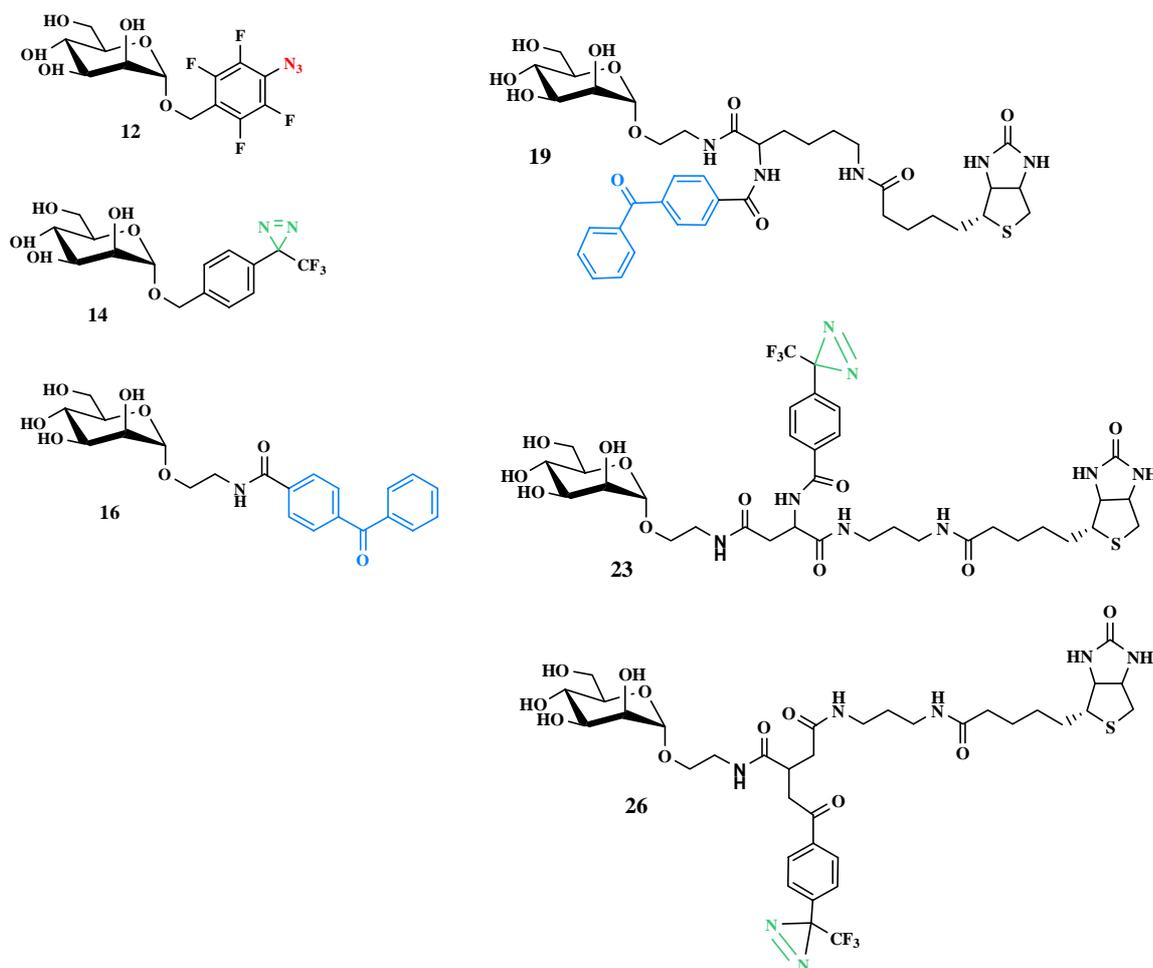


Figure 6.1. Designed and synthesized photolabile α -D-mannosides **12**, **14**, **16**, **19**, **23** und **26** as

Ligands. For the bacterial lectin FimH. The photoactive functional groups are highlighted in different colours (diazirines: green; azide: red and benzophenones: blue).

Based on the configuration of the α -D-mannosyl residue in the binding pocket of the adhesin FimH, the different PAFGs were introduced at C-1 position of the mannopyranose ring. The introduction of the different photoactive residues during

the syntheses was planned to contain a glycosylation reaction either or the binding to glycoamino acids. This ligand design ensures, that after forming the protein ligand complex the PAFGs are localized outside the CRD of FimH. After irradiation with UV light the photoactive functional groups are able to bind covalently at the edge of the CRD to form a stable protein ligand complex which can be analyzed by different methods, such as mass spectrometry or biochemical affinity staining.

The syntheses of azide **12** and diazirine **14** were performed very efficiently by glycosylation reaction, whereas benzophenone **16** was achieved via peptide coupling reaction starting with commercially available 4-benzoyl benzoic acid. The difunctionalized mannosides **19**, **23** and **26** contain a photolabel and a biotin marker additionally. The biotin residue was introduced to facilitate the isolation of a photolabeled product by biotin-avidin affinity chromatography. Furthermore it is possible to detect and identify photolabeled peptides and proteins via biochemical methods, such as western blotting or dot blotting. To synthesize the difunctional photoactive mannosides **19**, **23** and **26**, orthogonally functionalized glycoamino acid building blocks were used as scaffold molecules to introduce both, the PAFG and the biotin residue.

The next part of this thesis provided the proof of principle of the research project using different mass spectrometric and biochemical methods. After determining the irradiation properties of the photoactive mannosides **12**, **14**, **16**, **19**, **23** and **26**, which allow photoaffinity labeling of biomacromolecules such as peptides and proteins without degradation, the different photoprobes in photoaffinity labeling were compared. During their photolysis in water or MeOH, the azide **12** and the diazirine **14** formed products, which could be identified by mass spectrometric analysis as covalent insertion product analogues.

Further studies that include illumination experiments in the presence of six different simple protected amino acids and three model peptides allowed further conclusions about the features of the investigated photoactive ligands. Taken into account the structural composition of the CRD at the tip of FimH threonine, serine, tyrosine, isoleucine, lysine, and arginine were selected as suitable amino acids. Photolabeling of amino acids delivered first evidence concerning the local point of insertion. The diazirine group showed preference for the insertion into amino acids equipped with polar residues such as arginine, tyrosine, threonine and lysine. Benzophenones on the

other hand bound covalently to lysine containing a linear alkyl chain, whereas the azide **12** preferred unpolar isoleucine for covalent linkage.

Next, the irradiation in the presence of three model peptides angiotensin II, PTHIKWGD and pentaglycine was performed. With regard to the structural constitution of the carbohydrate binding pocket of FimH angiotensin II and PTHIKWGD were chosen. Unpolar pentaglycine was used as antipodal extremum. After irradiation, purification and mass spectrometric analysis, a series of cross coupling products could be identified and partially further investigated by ESI-FT-ICR-MS/MS-technique and MALDI-TOF-TOF-mass spectrometry.

Mass spectrometric analysis of the product formed after irradiation of angiotensin II in the presence of diazirine **14** indicated a covalent linkage with the tyrosine of the peptide.

The next crucial step of this thesis was the irradiation of the target protein FimH in the presence of the synthesized photoactive mannosides. Therefore a protein domain of FimH called *FimH truncate* was used, showing no differences in biochemical and biological properties. To investigate the irradiated samples and possible formed insertion products mass spectrometry, affinity chromatography, western blot and tryptic digest were used. Incubation and irradiation of *FimH truncate* in the presence of diazirine **14** lead to a product correlating with the respective insertion product. The MALDI-TOF-MS spectrum is shown in figure 6.2. In order to ensure specificity the receptor was incubated in molar excess to the ligand.

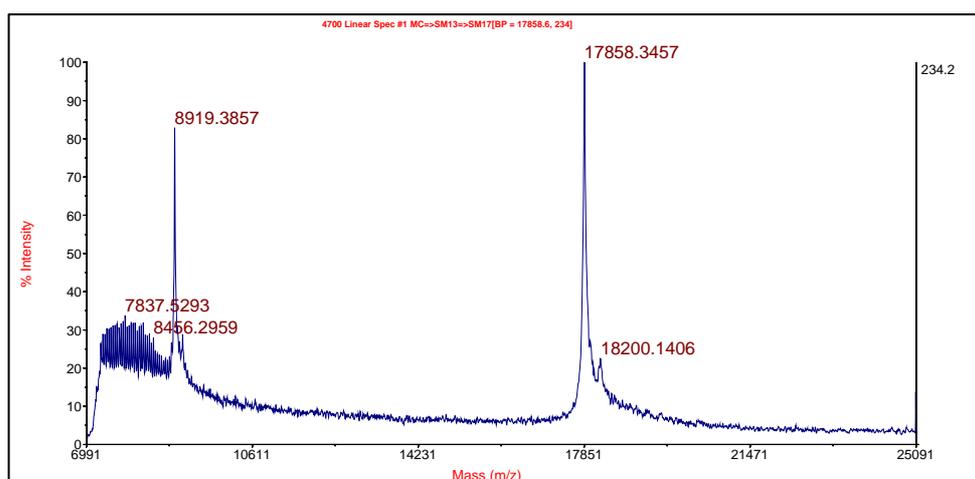


Figure.6.2. MALDI-TOF-MS-Spectrum of *FimH truncate* after irradiation in the presence of diazirine **14**, measured with 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems): $8919 = [M+2H]^{2+}$; $17858 = [M+H]^+$; $18200 = [M+carbene+H]^+$.

The photolabeled biotinylated protein could also be identified by western blot and dot blot affinity staining. Comparable results were achieved after incubation and irradiation of FimH truncate in the presence of azide **12** and diazirines **23** and **26**.

To further evaluate the function and potential application of the synthesized difunctional biotinylated photoprobes **19**, **23** and **26**, especially, photoaffinity labeling experiments in the presence of the protein complex FimCH and the mannose specific protein Concanavalin A were performed. With a combination of SDS polyacrylamide electrophoresis and western blot it was possible to detect both, the protein complex FimCH and the lectin ConA labelled by the diazirines **23** and **26**.

In order to show biological activity the prepared photolabile α -D-mannoside derivatives **12**, **14**, **16** and **19** were tested for their potency as inhibitors of type 1 fimbriae-mediated bacterial adhesion using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Relative inhibitory potencies (RIP values) were based on the inhibitory potency of the methyl α -D-mannoside (MeMan) in the same test (RIP MeMan = 1). Methyl α -D-mannoside is known as inhibitor of type 1 fimbriae-mediated bacterial adhesion and therefore it was used as a benchmark. In addition of the ELISA testing computer aided docking studies in regard of the binding potencies of the photoactive mannosides were performed. The results, listed in table 5.1, did not show exact concordance, but lead to the conclusion, that the four tested photoprobes exhibit higher binding affinities to FimH than the standard MeMan.

An overview of the properties determined for the six synthesized and tested photoactive α -D-mannoside derivatives **12**, **14**, **16**, **19**, **23** and **26** is presented in the following table. A comparison of their potential as useful photoprobes for the investigation of protein ligand interactions is shown through a colour code (green: good; yellow: average; red: poor).

According to all irradiation experiments and subsequent analyses it can be concluded, that the diazirine ring seems to be the most suitable photophore for the photolabeling of biomolecules such as peptides and proteins. The “upgrade” by introducing the biotin residue to facilitate identification and isolation of crosslink products makes the difunctional diazirines **23** and **26** suitable photoaffinity probes which can be used for the detection of mannose binding proteins in organisms or protein libraries and for the investigation of ligand binding properties of mannose

specific proteins. Due to these high quality properties the diazirines **23** and **26** can be used as advantageous photolabels for studies in biological chemistry.

Regarding the investigation of the exact insertion position in biomolecules, advanced mass spectrometric techniques should be used which are highly sensitive. A combination of liquid chromatography followed by mass spectrometric analysis could lead to successful results.

An improvement of the affinity chromatography proposed in this thesis could also be helpful to isolate and concentrate photolabeled proteins prior to mass spectrometric analysis or other analytic methods.

7 Experimenteller Teil

7.1 Allgemeine Vorbemerkungen

7.1.1 Physikalische Daten

NMR-Spektren wurden auf Spektrometern der Firma Bruker (ARX 300, DRX 500 und Avance 600) gemessen. Dabei lagen die Messfrequenzen für den ^1H -Kern bei 300 MHz, 500 MHz und 600 MHz, die Frequenzen für den ^{13}C -Kern lagen bei 75.47 MHz, 125.75 MHz und 150.90 MHz. Die jeweiligen chemischen Verschiebungen beziehen sich hierbei entweder auf die chemische Verschiebung der Standard-Substanz TMS oder auf die Verschiebungen der verwendeten Lösungsmittel CDCl_3 und CD_3OD . Die entsprechenden Werte sind im Folgenden aufgeführt:

CDCl_3	^1H	7.24	ppm (s)
	^{13}C	77.00	ppm (t), $J_{C,D} = 32$ Hz
CD_3OD	^1H	3.35	ppm (s), 4.78 ppm (s)
	^{13}C	49.30	ppm (Septett), $J_{C,D} = 21$ Hz
CD_3CN	^1H	1.93	ppm (s)
	^{13}C	1.30	ppm (Septett), $J_{C,D} = 21$ Hz
D_2O	^1H	4.65	ppm (s)

^1H - und ^{13}C -Verschiebungen sind in ppm auf einer δ -Skala aufgelistet; die folgenden Bezeichnungen wurden zur genauen Beschreibung der einzelnen Signale verwendet:

s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m_c = zentriertes Multiplett

Die Kopplungskonstanten (J) sind in Hertz (Hz) angegeben. C-H-Kopplungen wurden durch Breitbandeinstrahlung unterdrückt. Anhand von DEPT135-Experimenten wurden primäre, sekundäre, tertiäre und quartäre Kohlenstoff-Atome zugeordnet. In den meisten Fällen wurden für die eindeutige Zuordnung der einzelnen Signale zusätzlich 2D-Experimente COSY, HSQC, HMBC oder NOESY heran gezogen.

Drehwerte wurden in einem Perkin-Elmer Polarimeter 241 (Natrium-D-Linie: 589 nm, Küvettenlänge 1 dm) in den jeweils angegebenen Lösungsmitteln vermessen.

IR-Spektren wurden mit einem FT-IR-Spektrometer Paragon 1000 der Firma Perkin Elmer aufgenommen. Feste Substanzen wurden als gemischter KBr-Pressling vermessen; flüssige und ölige Substanzen wurden, als Film auf einen KBr-Pressling aufgetragen, vermessen. Die Lage der einzelnen Banden ist in Wellenzahlen (cm^{-1}) angegeben; die Bandenformen sind wie folgt beschrieben:

br = broad (breit), w = weak (schwach), m = medium (mittel), s = strong (stark)

EI- und CI-Massenspektren wurden auf einem Massenspektrometer MAT 8200 der Firma Finnigan bei Raumtemperatur gemessen. Als Kollisionsgas für CI-Messungen wurde Isobutan verwendet. Die relativen Intensitäten sind bezogen auf das Basis-Signal in Prozent angegeben.

MALDI-TOF-MS-Spektren wurden mit folgenden Geräten gemessen: i) einem Biflex III Spektrometer der Firma Bruker, ii) einem Biflex II der Firma Bruker sowie iii) einem Proteomics Analyzer 4700 der Firma Applied Biosystems gemessen. Die Beschleunigungsspannung bei den Bruker-Geräten betrug jeweils 19 kV, beim Proteomics Analyzer wurde die Beschleunigungsspannung abgestimmt auf die einzelnen Analysenprobleme variiert. Im Untertitel der in dieser Arbeit als Abbildungen gezeigten Massenspektren ist das jeweils angewandte Massenspektrometer angegeben. Als Matrix-Substanz wurde, wenn nicht anders angegeben, 4-Hydroxy- α -cyano-zimtsäure (HCCA) als gesättigte Lösung in TA-Lösung (33% MeCN / 0.1 % TFA / Aqua bidest.) verwendet. Die Ionisation wurde durch einen Stickstoff-Laser bei 337 nm initiiert.

MALDI-TOF-MS/MS-Massenspektren wurden mit einem Proteomics Analyzer 4700 der Firma Applied Biosystems gemessen. Die entsprechenden Proben wurden mittels ZipTip™-Präparation (siehe Kapitel 6.7.4) vorbereitet.

ESI-MS-Massenspektren wurden mit einem Mariner ESI-TOF 5280 Spektrometer der Firma Applied Biosystems gemessen. Für die massenspektrometrischen Untersuchungen der markierten Modell-Peptide und Proteine, insbesondere für die Aufnahme der ESI-FT-ICR-MS/MS-Spektren, wurde zusätzlich ein 7 Tesla Apex II Massenspektrometer der Firma Bruker verwendet.

Schmelzpunkte wurden mit einer Büchi 510 Schmelzpunktapparatur gemessen.

7.1.2 Vorbemerkungen zu den Reaktionsvorschriften

Alle luft- und feuchtigkeitsempfindlichen Reaktionen wurden in ausgeheizten Glasgeräten in Schutzgas-Atmosphäre (Stickstoff oder Argon) durchgeführt. Alle kommerziell erworbenen Reagenzien wurden - sofern nicht anders erwähnt - ohne weitere Vorreinigung eingesetzt. Es wurden ausschließlich destillierte bzw. getrocknete Lösungsmittel eingesetzt, die wie folgt behandelt wurden:

Dichlormethan	über Calciumhydrid
Essigsäureethylester	über Kaliumcarbonat
Methanol	über Magnesiumspänen
DMF	über Molekularsieb 4 Å
Acetonitril	„HPLC grade“ vom Hersteller Merck
Toluol	über Natrium oder Molekularsieb 4 Å

Für die **Säulenchromatographie** wurde Kieselgel 60 (230 - 400 mesh, Korngrösse 0.040 - 0.063 mm) der Firma Merck eingesetzt. Die Chromatographie wurde als Flash-Chromatographie mit einem Überdruck von 1-2 bar durchgeführt.

Für die **RP-Säulenchromatographie** wurde eine RP-MPLC-Anlage der Firma Büchi mit einer Lichroprep RP-18 Säule der Firma Merck verwendet.

Präparative HPLC wurde an einer LC-8a Anlage der Firma Shimadzu mit einer LiChrosorb RP-8-Säule der Firma HIBAR durchgeführt.

Analytische HPLC wurde an einer Hitachi LaChrom-Anlage der Firma Merck durchgeführt. Dabei wurden - wenn nicht anders angegeben - eine RP-8 LiChrosorb-Säule und eine Chromolith Performance RP-18-Säule von Merck eingesetzt.

Dünnschichtchromatogramme wurden auf Kieselgelfolie (GF₂₅₄, Merck) angefertigt. Die Detektion erfolgte entweder mit Hilfe einer UV-Lampe ($\lambda = 254$ nm, $\lambda = 366$ nm) oder durch verschiedene Anfärbereagenzien mit anschließendem Erhitzen. Die verwendeten Anfärbereagenzien sollen im Folgenden beschrieben werden:

Schwefelsäure-Reagenz: 10 %ig in EtOH

Anisaldehyd-Reagenz: 5.5 mL Anisaldehyd, 2.2 mL Eisessig und 7.5 mL Schwefelsäure konz. in 200 mL EtOH

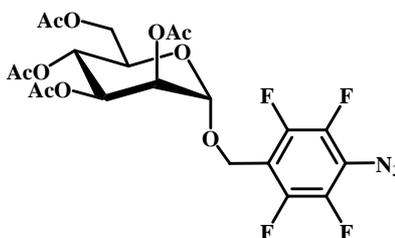
Ninhydrin-Reagenz: 0.3 g Ninhydrin gelöst in 100 mL Butanol und 3 mL Eisessig

7.2 Synthese photoaktiver Mannoside als Liganden für das Lektin FimH

In diesem Abschnitt sind ausschließlich die Synthesen, der zum Zeitpunkt der praktischen Durchführung nicht literaturbekannten Verbindungen beschrieben.

7.2.1 Synthese monofunktioneller photoaktiver Mannoside

7.2.1.1 4'-Azido-tetra-fluoro-benzyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranosid **11**



Zur Synthese des gewünschten Glykosids wurden 1.70 g (3.50 mmol) 1-*O*-Trichloracetimido-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannosid (**10**), das vorher in einer dreistufigen Synthese^[127] hergestellt wurde unter Argon-Atmosphäre in trockenem DCM (20 mL) gelöst. Dazu wurden im Argonstrom 0.83 g (3.90 mmol) *p*-Azido-tetrafluoro-benzylalkohol sowie tropfenweise 0.03 mL einer frisch präparierten TMSOTf-Lsg. (0.03 M in trockenem DCM) gegeben. Die resultierende Reaktionsmischung wurde unter Lichtausschluss bei RT in Inertgasatmosphäre für 56 h gerührt und der Umsatz per DC kontrolliert (T / EE; 2:1; AA). Entfernung des LM i. Vak. und Reinigung des Rohproduktes mittels Kieselgel-Flashchromatographie (T / EE; 2:1) lieferten das gewünschte Produkt **11** als reinen, orangefarbenen Feststoff (1.32 g, 2.40 mmol, 69 %, M = 551.12 g / mol).

Analytische Daten:

R_f = 0.55 (T / EE; 2:1);

FT-IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 2976 (s), 2124.7 (s), 1740 (s), 1655 (m), 1295 (s) cm⁻¹;

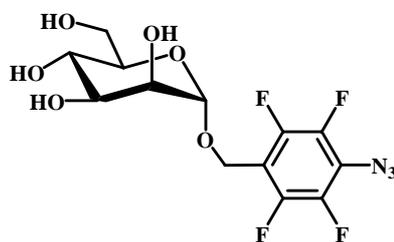
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 25 °C, Referenz: CDCl_3): $\delta = 5.25$ (dd, 1H, H-4, $J = 9.9$ Hz, $J = 3.0$ Hz), 5.23 (dd, 1H, H-3, $J = 3.7$ Hz, $J = 3.2$ Hz), 5.15 (dd, 1H, H-2, $J = 1.7$ Hz, $J = 3.6$ Hz), 4.85 (d, 1H, H-1, $J = 1.7$ Hz), 4.75 (dt, 1H, Benzyl-CHH, $J = 11.0$ Hz, $J = 1.8$ Hz), 4.54 (dt, 1H, Benzyl-CHH, $J = 11.0$ Hz, $J = 1.6$ Hz), 4.23 (dd, 1H, H-6a, $J = 12.3$ Hz, $J = 5.4$ Hz), 4.03 (dd, 1H, H-6b, $J = 12.3$ Hz, $J = 2.4$ Hz), 3.92 (ddd, 1H, H-5, $J = 9.9$ Hz, $J = 5.5$ Hz, $J = 2.4$ Hz), 2.15, 2.07, 1.98, 1.92 (4 s, 12 H, 4 CH_3 , 4 OAc) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.75 MHz, CDCl_3 , 25 °C, Referenz: CDCl_3): $\delta = 170.62$, 169.96, 169.82, 169.72 (4 C=O, 4 OAc), 146.60 (d, Aryl-C-F, $J_{\text{C,F}} = 156.2$ Hz), 144.62 (d, Aryl-C-F, $J_{\text{C,F}} = 164.2$ Hz), 141.41 (d, Aryl-C-F, $J_{\text{C,F}} = 106.7$ Hz), 139.42 (d, Aryl-C-F, $J_{\text{C,F}} = 115.4$ Hz), 120.96 (t, Aryl-C- N_3 , $J_{\text{C,F}} = 84.3$ Hz), 110.07 (t, Aryl-C- CH_2 , $J_{\text{C,F}} = 126.1$ Hz), 97.39 (C-1), 69.31 (C-2), 69.09 (C-5), 68.78 (C-3), 65.95 (C-4), 62.35 (C-6), 56.61 (Benzyl-C), 20.82, 20.65, 20.60, 20.42 (4 CH_3 , 4 OAc) ppm;

MALDI-TOF-MS: $m/z = 574.3$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 590.3 $[\text{M} + \text{K}]^+$ (M = 551.1 ber. für $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{F}_4\text{N}_3\text{O}_{10}$);

ESI-MS: $m/z = 574.10$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$, (M = 551.1 ber. für $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{F}_4\text{N}_3\text{O}_{10}$).

7.2.1.2 4'-Azido-tetra-fluoro-benzyl- α -D-mannopyranosid 12



Die Entfernung der Acetyl-Schutzgruppen erfolgte nach der Methode von G. Zemplén.^[129] Die geschützte Verbindung (600 mg, 1.10 mmol) wurde in 12 mL trockenem MeOH gelöst und 0.5 mL einer frisch präparierten 1 M Natriummethanolat-Lsg. vorsichtig zudosiert. Die Mischung wurde bei RT für 4 h gerührt und durch portionsweise Zugabe von saurem Ionenaustauscher Amberlite IR-

120 auf pH 6 eingestellt. Nach Filtration des Ionenaustauschers wurde das LM i. Vak. entfernt und das Rohprodukt mittels Kieselgel-Flashchromatographie (EE / MeOH / H₂O; 6:2:1) gereinigt. Das gewünschte Produkt lag als orangefarbene Kristalle (371 mg, 0.97 mmol, 89 %, M = 383.25 g / mol) vor.

Analytische Daten:

R_f = 0.66 (EE / MeOH / H₂O; 6:2:1);

M.p. = 159 °C;

[α]_D = + 36.5 (c = 2.0 mM, MeOH, T = 22 °C);

UV-Vis: λ_{max}(1) = 343.3 nm (c = 0.10 mM, Aqua bidest.), ε(1) = 1500 Lmol⁻¹cm⁻¹;

λ_{max}(2) = 250.6 nm (c = 0.10 mM, Aqua bidest.), ε(2) = 16300 Lmol⁻¹cm⁻¹;

FT-IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3465 (V), 3417 (v), 3370 (v), 3276 (v), 2925 (s), 2896 (m), 2120 (s), 1490 (m), 1241 (s), 1067 (s) cm⁻¹;

¹H-NMR (500 MHz, MeOD, 25 °C, Referenz: MeOD): δ = 4.92 (d, 1H, H-1, J = 1.6 Hz), 4.89 (dt, 1H, Benzyl-CHH, J = 11.6 Hz, J = 1.8 Hz), 4.70 (dt, 1H, Benzyl-CHH, J = 11.6 Hz, J = 1.7 Hz), 3.82 (dd, 1H, H-6a, J = 11.8 Hz, J = 2.4 Hz), 3.81 (dd, 1H, H-2, J = 3.0 Hz, J = 1.7 Hz), 3.77 (dd, 1H; H-6b, J = 11.8 Hz, J = 5.5 Hz), 3.67 (dd, 1H, H-4, J = 9.8 Hz, J = 2.7 Hz), 3.66 (dd, 1H, H-3, J = 2.6 Hz, J = 2.9 Hz), 3.56 (ddd, 1H, H-5, J = 9.8 Hz, J = 5.5 Hz, J = 2.3 Hz) ppm;

¹³C-NMR (125.75 MHz, MeOD, 25 °C, Referenz: MeOD): δ = 147.90 (d, Aryl-C-F, J_{C,F} = 179.5 Hz), 145.93 (d, Aryl-C-F, J_{C,F} = 212.0 Hz), 142.86 (d, Aryl-C-F, J_{C,F} = 179.0 Hz), 140.89 (d, Aryl-C-F, J_{C,F} = 227.5 Hz), 121.78 (t, Aryl-C-N₃, J_{C,F} = 222.7 Hz), 112.91 (t, Aryl-C-CH₂, J_{C,F} = 130.0 Hz), 101.96 (C-1), 75.09 (C-5), 72.04 (C-4), 71.99 (C-2), 68.40 (C-3), 62.79 (Benzyl-C), 57.50 (C-6) ppm;

MALDI-TOF-MS: m/z = 406.3 [M + Na]⁺, 421.3 [M + K]⁺, (M = 383.3 ber. für C₁₃H₁₃F₄N₃O₆);

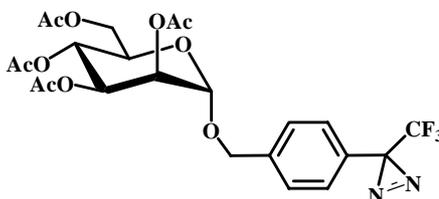
ESI-MS: m/z = 406.06 [M + Na]⁺,

789.13 $[2M + Na]^+$, ($M = 483.07$ ber. für $C_{13}H_{13}F_4N_3O_6$);

ESI-HR-MS: $m/z = 406.0678 [M + Na]^+$, ($M = 383.2526$ ber. für $C_{13}H_{13}F_4N_3O_6$);

$C_{13}H_{13}F_4N_3O_6$ (383.25): ber. C, 40.72; H, 3.42; N, 10.97; gef. C, 39.78; H, 3.02; N, 11.37.

7.2.1.3 3-Trifluoromethyl-3-[p-(2',3',4',6'-tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranosyl-oxy methyl)- phenyl]-diazirin **13**



Für die Glykosylierung wurden 0.62 g (1.26 mmol) Mannosetrichloracetimidat **10** für 20 min i. Vak. getrocknet und anschließend in 15 mL trockenem DCM gelöst. In Argon-Atmosphäre wurde die Diazirinkomponente (0.32 g, 1.50 mmol) vorsichtig hinzugegeben und die Reaktion durch Zutropfen von 1.5 mL einer frisch präparierten TMSOTf-Lsg. (0.01 M in trockenem DCM) gestartet. Die resultierende Reaktionsmischung wurde bei RT unter Inertgas-Atmosphäre für 5 d unter Lichtausschluss gerührt und der Umsatz per DC kontrolliert (T / EE; 1:1; AA). Entfernung des LM i. Vak. sowie eine Kieselgel-Flashchromatographie (T / EE; 1:1) lieferten das gewünschte Produkt **13** als gelbliches Pulver (566 mg, 1.04 mmol, 69 %, $M = 546.45$ g / mol).

Analytische Daten:

$R_f = 0.62$ (T / EE; 1:1);

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 25 °C, Referenz: $CDCl_3$): $\delta = 7.31$ (dd, 2H, Aryl-H, $J = 8.6$ Hz, $J = 2.2$ Hz), 7.14 (dd, 2H, Aryl-H, $J = 8.0$ Hz, $J = 2.3$ Hz), 5.30 (dd, 1H, H-3', $J = 9.9$ Hz, $J = 3.3$ Hz), 5.24 (dd, 1H, H-4', $J = 9.7$ Hz, $J = 9.7$ Hz), 5.22 (dd, 1H,

H-2', $J = 3.2$ Hz, $J = 1.8$ Hz), 4.80 (d, 1H, H-1', $J = 1.6$ Hz), 4.66 (d, 1H, Benzyl-CHH, $J = 12.3$ Hz), 4.50 (d, 1H, Benzyl-CHH, $J = 12.3$ Hz), 4.21 (dd, 1H, H-6'a, $J = 12.3$ Hz, $J = 5.2$ Hz), 4.00 (dd, 1H, H-6'b, $J = 12.3$ Hz, $J = 2.5$ Hz), 3.91 (ddd, 1H, H-5', $J = 9.5$ Hz, $J = 5.1$ Hz, $J = 2.5$ Hz), 2.13, 2.07, 1.89, 1.85 (4 s, 12 H, 4 CH₃, 4 OAc) ppm;

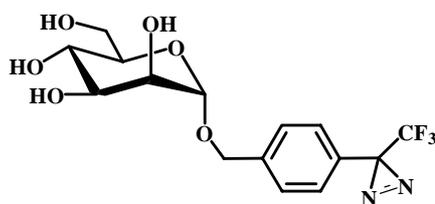
¹³C-NMR (75.45 MHz, CDCl₃, 25 °C, Referenz: CDCl₃): $\delta = 170.67$, 170.07, 169.96, 169.75 (4 C=O, 4 OAc), 163.45 (CF₃-C-N=N), 137.95 (Aryl-C-CH₂), 129.05 (Aryl-C), 128.30 (2 Aryl-C), 126.74, (2 Aryl-C), 122.20 (q, CF₃, $J_{C,F} = 274.7$ Hz), 96.79 (C-1'), 77.22 (C-5'), 69.43 (C-3'), 69.02 (C-2'), 68.81 (Benzyl-C), 66.04 (C-4'), 62.41 (C-6'), 20.91, 20.78, 20.73, 20.72 (4 CH₃, 4 OAc) ppm;

MALDI-TOF-MS: $m/z = 519.4$ [M - N₂ + H]⁺, (M = 546.45 ber. für C₂₃H₂₅F₃N₂O₁₀);

ESI-HR-MS: $m/z = 569.1446$ [M + Na]⁺, (M = 546.4473 ber. für C₂₃H₂₅F₃N₂O₁₀).

7.2.1.4 3-Trifluoromethyl-3-[p-(α -D-mannopyranosyloxymethyl)-phenyl]diazirin

14



Die Entfernung der Acetyl-Schutzgruppen erfolgte nach der Methode von G. Zemplén^[129]. Die geschützte Verbindung (297 mg, 0.50 mmol) wurde in 14 mL trockenem MeOH gelöst und 1.1 mL einer frisch präparierten Natriummethanolatlg. (2.0 mM) vorsichtig hinzugegeben. Die resultierende Mischung wurde bei RT für 1 h gerührt und der Umsatz per DC kontrolliert (T / EE; 1:1; AA) und mit saurem Ionenaustauscher Amberlite IR-120 auf pH 6 eingestellt. Nach Filtrieren des Ionenaustauschers wurde das LM i. Vak. entfernt und das Rohprodukt mittels zwei aufeinander folgenden Kieselgel-Flashchromatographien (EE / MeOH / H₂O; 6:2:1) gereinigt. Das Produkt **14** resultierte als gelbliches Pulver (166 mg, 0.44 mmol, 88 %, M = 378.30 g / mol).

Analytische Daten:

$R_f = 0.68$ (EE / MeOH / H₂O; 6:2:1);

$[\alpha]_D = +44.5$ ($c = 1.9$ mM, H₂O, T = 22 °C);

UV-Vis: $\lambda_{\max}(1) = 355.5$ nm ($c = 0.1$ mM, Aqua bidest.), $\epsilon(1) = 1500$ Lmol⁻¹cm⁻¹,
 $\lambda_{\max}(2) = 265.5$ nm ($c = 0.1$ mM, Aqua bidest.), $\epsilon(2) = 5200$ Lmol⁻¹cm⁻¹;

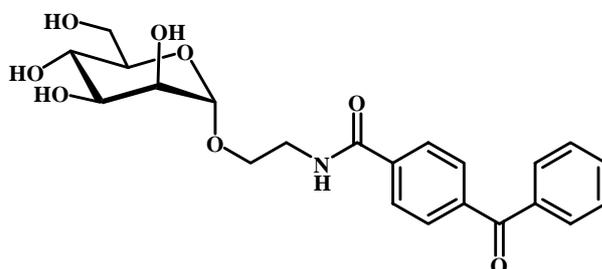
FT-IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3432$ (v), 2929 (s), 1664 (m), 1342 (s), 1154 (s), 832 (s) cm⁻¹;

¹H-NMR (500 MHz, MeOD, 25 °C, Referenz: MeOD): $\delta = 7.52$ (d, 2H, Aryl-H, $J = 8.5$ Hz), 7.28 (d, 2H, Aryl-H, $J = 8.1$ Hz), 4.87 (d, 1H, H-1, $J = 1.7$ Hz), 4.83 (d, 1H, Benzyl-CHH, $J = 12.4$ Hz), 4.61 (d, 1H, Benzyl-CHH, $J = 12.4$ Hz), 3.89 (dd, 1H, H-2, $J = 1.8$ Hz, $J = 3.4$ Hz), 3.87 (dd, 1H, H-6b, $J = 11.8$ Hz, $J = 2.3$ Hz), 3.77 (dd, 1H, H-3, $J = 3.4$ Hz, $J = 9.4$ Hz), 3.75 (dd, 1H, H-6a, $J = 5.9$ Hz, $J = 11.8$ Hz), 3.67 (t, 1H, H-4, $J = 9.5$ Hz), 3.60 (ddd, 1H, H-5, $J = 2.3$ Hz, $J = 6.0$ Hz, $J = 9.5$ Hz) ppm;

¹³C-NMR (125.75 MHz, MeOD, 25 °C, Referenz: MeOD): $\delta = 166.26$ (CF₃-C-N=N), 141.54 (Aryl-C-CH₂), 129.53 (2 Aryl-C), 129.24 (Aryl-C), 127.64 (2 Aryl-C) 123.63 (q, CF₃, $J_{C,F} = 273.8$ Hz), 100.94 (C-1), 75.03 (C-5), 72.60 (C-3), 72.11 (C-2), 69.02 (Benzyl-CH₂), 68.61 (C-4), 62.89 (C-6) ppm;

ESI-MS: $m/z = 473.18$ [M - N₂ + 2MeOH]⁺, 401.08 [M + Na]⁺, 373.08 [M - N₂ + Na]⁺, (M = 378.3 ber. für C₁₅H₁₇F₃N₂O₆);

ESI-HR-MS: $m/z = 401.0841$ [M + Na]⁺, (M = 378.3006 ber. für C₁₅H₁₇F₃N₂O₆).

7.2.1.5 4-Benzoyl-benzophenonyl-2'-amidoethyl- α -D-mannopyranosid 16

2'-Aminoethyl- α -D-mannosid (**15**) (200 mg, 0.90 mmol), HATU (330 mg, 0.90 mmol) und 4-Benzoylbenzoesäure (225 mg, 1.00 mmol) wurden in einem Schlenck-Kolben gemischt und i. Vak. für 30 min. getrocknet. Die Mischung wurde in 12 mL trockenem DMF gelöst und in Argon-Atmosphäre vorsichtig mit 0.34 mL (2.00 mmol) DIPEA versetzt. Die resultierende Reaktionsmischung wurde bei RT unter Argon-Atmosphäre für 17 h gerührt und das LM i. Vak. entfernt. Zur Reinigung des Rohproduktes wurde zuerst eine RP-Flashchromatographie (EE / MeOH / H₂O; 6:2:1) durchgeführt und das daraus erhaltene Produkt nochmals mittels HPLC (Gradienten-Elution) gereinigt. Das Produkt **16** resultierte als leicht gelblich gefärbtes Lyophyllisat (201 mg, 0.47 mmol, 52 %, M = 431.44 g / mol).

Analytische Daten:

R_f = 0.59 (EE / MeOH / H₂O; 6:2:1);

HPLC: RT = 40.9 min, Gradient: 38 % MeCN / 62 % H₂O;

[α]_D = +29.0 (c = 2.0 mM, H₂O, T = 22 °C).

UV-Vis: $\lambda_{\max}(1)$ = 330.0 nm (c = 0.25 mM, Aqua bidest.), $\epsilon(1)$ = 266.7 Lmol⁻¹cm⁻¹,
 $\lambda_{\max}(2)$ = 258.1 nm (c = 0.25 mM, Aqua bidest.), $\epsilon(2)$ = 14000 Lmol⁻¹cm⁻¹;

¹H-NMR (600 MHz, MeOD, 25 °C, Referenz: MeOD): δ = 8.00 (dd, 2H, Benzophenon-*m*-H, J = 8.4 Hz, J = 1.8 Hz), 7.87 (dd, 2H, Benzophenon-*o*-H, J = 8.1 Hz, J = 1.8 Hz), 7.83 (dd, 2H, Benzophenon-*o*-H, J = 7.8 Hz, J = 1.2 Hz), 7.71 (tt,

^1H , Benzophenon-*p*-H, $J = 7.4 \text{ Hz}$, $J = 1.2 \text{ Hz}$), 7.59 (td, 2H, Benzophenon-*m*-H, $J = 7.6 \text{ Hz}$, $J = 1.6 \text{ Hz}$), 4.86 (d, 1H, H-1, $J = 1.6 \text{ Hz}$), 3.93 (dd, 1H, manOCH₂CHH, $J = 10.3 \text{ Hz}$, $J = 4.8 \text{ Hz}$), 3.87 (dd, 1H, H-2, $J = 3.1 \text{ Hz}$, $J = 1.7 \text{ Hz}$), 3.86 (dd, 1H, H-6a, $J = 12.0 \text{ Hz}$, $J = 2.1 \text{ Hz}$), 3.76 (dd, 1H, H-3, $J = 6.2 \text{ Hz}$, $J = 3.5 \text{ Hz}$), 3.75 (dd, 1H, manOCH₂CHH, $J = 10.9 \text{ Hz}$, $J = 4.6 \text{ Hz}$), 3.73 (dd, 1H, H-6b, $J = 11.7 \text{ Hz}$, $J = 5.8 \text{ Hz}$), 3.71 (dd, 1H, manOCHHCH₂, $J = 8.8 \text{ Hz}$, $J = 7.3 \text{ Hz}$), 3.66 (dd, 1H, manOCHHCH₂, $J = 9.1 \text{ Hz}$, $J = 7.3 \text{ Hz}$), 3.65 (dd, 1H, H-4, $J = 9.2 \text{ Hz}$, $J = 6.9 \text{ Hz}$), 3.6 (ddd, 1H, H-5, $J = 9.5 \text{ Hz}$, $J = 5.9 \text{ Hz}$, $J = 2.2 \text{ Hz}$) ppm;

^{13}C -NMR (150.90 MHz, MeOD, 25 °C, Referenz: MeOD): $\delta = 197.73$ (Aryl-C=O), 169.46 (Benzophenon-C=O), 141.37 (Aryl-C), 139.24 (Aryl-C) 138.42 (Aryl-C), 134.15 (Aryl-C), 131.06 (2 Aryl-C), 130.97 (2 Aryl-C), 129.66 (2 Aryl-C), 128.49 (2 Aryl-C), 101.86 (C-1), 74.87 (C-5), 72.60 (C-3), 72.15 (C-2), 68.64 (C-4), 67.26 (manOCH₂CH₂), 62.93 (C-6), 41.07 (manOCH₂CH₂) ppm;

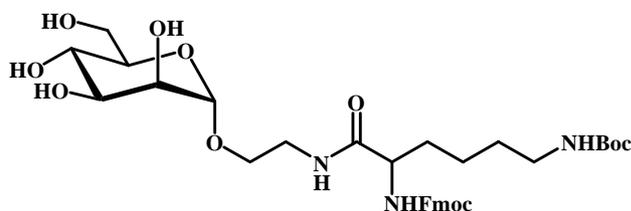
MALDI-TOF-MS: $m/z = 454.3$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$, ($M = 431.4$ ber. für C₂₂H₂₅NO₈);

ESI-MS: $m/z = 454.12$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$, ($M = 431.44$ ber. für C₂₂H₂₅NO₈);

ESI-HR-MS: $m/z = 454.1452$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$, ($M = 431.4358$ ber. für C₂₂H₂₅NO₈).

7.2.2 Synthese bifunktioneller photoaktiver Mannoside

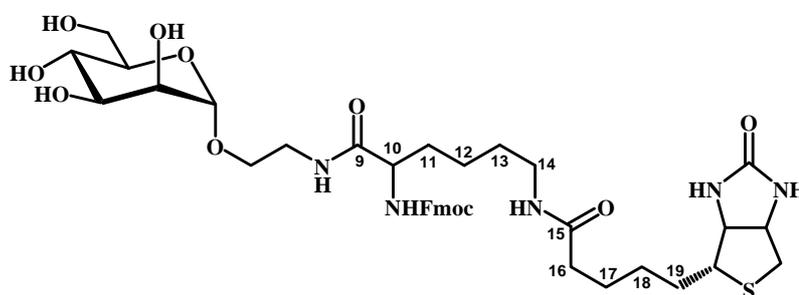
7.2.2.1 *N*-(ϵ Boc- α Fmoc-lys)aminoethyl α -D-mannopyranosid 17



2'-Aminoethyl α -D-mannosid (**15**) (375 mg, 1.65 mmol), HATU (590 mg, 1.65 mmol) und Fmoc-Lys(Boc)-OH (630 mg, 1.35 mmol) wurden in einem Schlenk-Kolben gemischt und 15 min. i. Vak. getrocknet. Dann wurde die Mischung in 16 mL trockenem DMF gelöst und vorsichtig mit DIPEA (0.53 mL, 2.70 mmol)

versetzt. Die resultierende Reaktionsmischung wurde in Argon-Atmosphäre bei RT für 18 h gerührt und das LM im Anschluss i. Vak. entfernt. Das entstandene Rohprodukt wurde über Kieselgel-Flashchromatographie (EE / MeOH / H₂O; 6:2:1) gereinigt. Das gewünschte Produkt **17** konnte als farbloses Pulver erhalten werden (980 mg, 1.46 mmol, 87%) und wurde direkt, ohne weitere Charakterisierung für die nächste Stufe eingesetzt. R_f = 0.61 (EE / MeOH / H₂O; 6:2:1)

7.2.2.2 *N-(εBiotin-αFmoc-lys)aminoethyl α-D-mannopyranosid 18*



Zur Entfernung der Boc-Schutzgruppe wurden 550 mg (0.82 mmol) der geschützten Verbindung **17** in 80 % aq. TFA (20 mL) gelöst und die Mischung für 30 min bei RT gerührt. Der Umsatz wurde per DC kontrolliert (EE / MeOH / H₂O; 6:2:1; AA) und das LM i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde zur vollständigen Entfernung der Säure mit Toluol codestilliert (6 x je 10 mL Toluol) und mit basischem Anionenaustauscher (Amberlite IRA-402) neutralisiert. Das gewünschte entschützte Produkt wurde als farbloses Pulver erhalten und direkt ohne weitere Reinigung für den nächsten Reaktionsschritt eingesetzt. R_f = 0.19 (EE / MeOH / H₂O; 6:2:1)

Das so erhaltene freie Amin (468 mg, 0.81 mmol) wurde einer Peptidkupplung unterzogen, um einen Biotin-Rest einzuführen. Nach Zufügen von (+)-Biotin (208 mg, 0.85 mmol) und 316 mg (0.81 mmol) HATU wurde die Mischung anschließend für 30 min i. Vak. getrocknet und danach in 20 mL trockenem DMF gelöst. DIPEA (0.45 mL, 2.25 mmol) wurde vorsichtig hinzugegeben, und die resultierende Reaktionsmischung wurde bei RT in Argon-Atmosphäre für 18 h gerührt. Der Umsatz wurde per DC kontrolliert (EE / MeOH / H₂O; 6:2:1; AA) und das LM i. Vak. entfernt. Das entstandene Rohprodukt wurde mittels Kieselgel-Flashchromatographie (EE / MeOH / H₂O; 6:2:1) gereinigt und das gewünschte

Produkt **18** als farbloses Lyophyllisat erhalten (496 mg, 0.62 mmol, 69% über zwei Reaktionsschritte, $M = 799.93 \text{ g/mol}$).

Analytische Daten:

$R_f = 0.40$ (EE / MeOH / H₂O; 6:2:1);

¹H NMR (500 MHz, MeOD, 25 °C, Referenz: MeOD): $\delta = 7.84$ (d, 2H, Fmoc-H, $J = 7.5 \text{ Hz}$), 7.72 (dd, 2H, Fmoc-H, $J = 10.4 \text{ Hz}$, $J = 7.7 \text{ Hz}$), 7.43 (t, 2H, Fmoc-H, $J = 7.4 \text{ Hz}$), 7.34 (td, 2H, Fmoc-H, $J = 7.5 \text{ Hz}$, $J = 1.2 \text{ Hz}$), 4.81 (d, 1H, H-1, $J = 1.4 \text{ Hz}$), 4.44 (dd, 1H, Fmoc-CHCH₂, $J = 9.0 \text{ Hz}$, $J = 5.7 \text{ Hz}$), 4.38 (ddd, 1H, Biotin-NHCHCHalkyl, $J = 7.9 \text{ Hz}$, $J = 4.2 \text{ Hz}$, $J = 0.8 \text{ Hz}$), 4.18 (dd, 1H, Biotin-NHCHCH₂S, $J = 7.9 \text{ Hz}$, $J = 4.5 \text{ Hz}$), 3.72 (dd, 1H, H-6a, $J = 7.2 \text{ Hz}$, $J = 3.9 \text{ Hz}$), 3.71 (dd, 1H, H-2, $J = 2.8 \text{ Hz}$, $J = 1.4 \text{ Hz}$), 3.68 (dd, 1H, H-6b, $J = 6.8 \text{ Hz}$, $J = 4.1 \text{ Hz}$), 3.62 (dd, 1H, H-3, $J = 8.9 \text{ Hz}$, $J = 3.4 \text{ Hz}$), 3.57 (dd, 1H, manOCHHCH₂, $J = 11.7 \text{ Hz}$, $J = 5.7 \text{ Hz}$), 3.50 (t, 1H, H-4, $J = 9.2 \text{ Hz}$), 3.47 (dd, 1H, manOCH₂CHH, $J = 11.5 \text{ Hz}$, $J = 5.1 \text{ Hz}$), 3.45 (dd, 1H, manOCH₂CHH, $J = 11.6 \text{ Hz}$, $J = 4.7 \text{ Hz}$), 3.40 (dd, 1H, manOCHHCH₂, $J = 11.6 \text{ Hz}$, $J = 5.2 \text{ Hz}$), 3.31 (dd, 1H, H-12a, $J = 6.4 \text{ Hz}$, $J = 4.3 \text{ Hz}$), 3.30 (dd, 1H, Biotin-CHH, $J = 7.7 \text{ Hz}$, $J = 1.1 \text{ Hz}$), 3.29 (ddd, 1H, H-5, $J = 10.5 \text{ Hz}$, $J = 6.1 \text{ Hz}$, $J = 4.0 \text{ Hz}$), 3.28 (dd, 1H, H-12b, $J = 6.3 \text{ Hz}$, $J = 4.3 \text{ Hz}$), 3.26 (dd, 1H, Biotin-CHH, $J = 4.5 \text{ Hz}$, $J = 1.0 \text{ Hz}$), 3.17 (ddd, 1H, Biotin-NHCHCHalkyl, $J = 10.3 \text{ Hz}$, $J = 7.9 \text{ Hz}$, $J = 4.5 \text{ Hz}$), 3.11 (dd, 1H, H-13a, $J = 9.0 \text{ Hz}$, $J = 6.6 \text{ Hz}$), 3.09 (ddd, 1H, H-10, $J = 9.00 \text{ Hz}$, $J = 7.0 \text{ Hz}$, $J = 2.1 \text{ Hz}$), 3.06 (dd, 1H, H-13b, $J = 9.3 \text{ Hz}$, $J = 6.0 \text{ Hz}$), 2.80 (dd, 1H, Fmoc-CHCHH, $J = 12.8 \text{ Hz}$, $J = 5.0 \text{ Hz}$), 2.59 (d, 1H, Fmoc-CHCHH, $J = 12.7 \text{ Hz}$), 2.08 (t, 2H, H-16a/b, $J = 7.4 \text{ Hz}$), 1.9 (dd, 1H, H-14a, $J = 10.2 \text{ Hz}$, $J = 5.8 \text{ Hz}$), 1.82 (dd, 1H, H-14b, $J = 10.0 \text{ Hz}$, $J = 5.7 \text{ Hz}$), 1.78 (dd, 1H, H-17a, $J = 7.9 \text{ Hz}$, $J = 3.7 \text{ Hz}$), 1.76 (dd, 1H, H-17b, $J = 7.4 \text{ Hz}$, $J = 3.9 \text{ Hz}$), 1.61 (dd, 1H, H-19a, $J = 7.7 \text{ Hz}$, $J = 6.1 \text{ Hz}$), 1.59 (dd, 1H, H-19b, $J = 7.5 \text{ Hz}$, $J = 3.2 \text{ Hz}$), 1.53 (dd, 1H, H-18a, $J = 15.5 \text{ Hz}$, $J = 7.9 \text{ Hz}$), 1.46 (dd, 1H, H-11a, $J = 9.0 \text{ Hz}$, $J = 7.2 \text{ Hz}$), 1.43 (dd, 1H, H-11b, $J = 7.1 \text{ Hz}$, $J = 2.5 \text{ Hz}$), 1.39 (dd, 1H, H-18b, $J = 15.7 \text{ Hz}$, $J = 7.5 \text{ Hz}$) ppm;

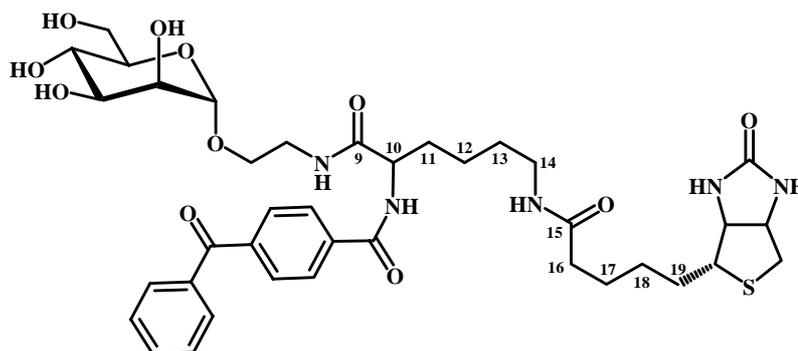
¹³C NMR (125.75 MHz, MeOD, 25 °C, Referenz: MeOD): $\delta = 176.03$ (C-9), 175.09 (C-15), 166.10 ((NH)₂-C=O), 158.47 (Fmoc-C=O), 151.37 (2 Fmoc-C), 148.57 (2 Fmoc-C), 128.84 (2 Fmoc-C), 128.21 (2 Fmoc-C), 126.26 (2 Fmoc-C), 120.96 (2

Fmoc-C), 101.70 (C-1), 74.77 (C-5), 72.60 (C-3), 72.11 (C-2), 68.74 (C-4), 67.94 (C-6), 67.11 (manOCH₂CH₂), 63.38 (Biotin-NHCHCH₂), 62.98 (manOCH₂CH₂), 61.64 (Biotin-NHCHCHalkyl), 57.01 (C-10), 56.76 (Biotin-NHCHCHalkyl), 55.57 (Fmoc-CH), 41.04 (Biotin-CH₂), 40.32 (C-14), 36.79 (C-12), 33.00 (C-13), 30.02 (C-16), 29.75 (C-17), 29.47 (C-18), 26.86 (C-19), 24.35 (C-11) ppm;

MALDI-TOF-MS: m/z = 822.9 [M + Na]⁺, 838.9 [M + K]⁺, (M = 799.9 ber. für C₃₉H₅₃N₅O₁₁S);

ESI-MS: m/z = 822.34 [M + Na]⁺, (M = 799.93 ber. für C₃₉H₅₃N₅O₁₁S).

7.2.2.3 *N*-(εBiotin-α-benzophenoncarbonyl-lys)aminoethyl-α-D-mannopyranosid 19



Zur Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe wurde Verbindung **18** (279 mg, 0.35 mmol) in 8 mL trockenem DMF gelöst, mit Piperidin (2 mL) versetzt und die resultierende Mischung in Argon-Atmosphäre bei RT für 30 min. gerührt. Eine Umsatzkontrolle wurde mittels DC (EE / MeOH / H₂O; 6:2:1; AA; Ninhydrin) durchgeführt. Nach Aufkonzentration i. Vak. wurde das Rohprodukt (280 mg, 0.35 mmol) in 12 mL trockenem DMF gelöst und zu einer Mischung aus 4-Benzoylbenzoesäure (68.0 mg, 0.30 mmol) and HATU (130 mg, 0.35 mmol) gegeben, welche vorher 30 min. i. Vak. getrocknet wurde. DIPEA (0.7 mL, 0.70 mmol) wurde vorsichtig zugetropft und die resultierende Reaktionsmischung für 20 h bei RT in Argon-Atmosphäre gerührt. Das LM wurde anschließend i. Vak. entfernt und das erhaltene Rohprodukt mittels zwei aufeinander folgenden Kieselgel-Flashchromatographien (EE / MeOH / H₂O; 6:2:1) gereinigt, um das gewünschte photolabile Produkt **19** in Form leicht gelblicher

Kristalle zu erhalten (110 mg, 0.14 mmol, 40% ausgehend von 2'-Aminoethylmannosid (**15**), $M = 785.90 \text{ g/mol}$).

Analytische Daten:

$R_f = 0.33$ (EE / MeOH / H₂O; 6:2:1);

M. p. = 134 °C;

$[\alpha]_D = +17.8$ ($c = 2.29 \text{ mM}$, H₂O; 22 °C);

UV-Vis: $\lambda_{\text{max}}(1) = 327.8 \text{ nm}$ ($c = 0.75 \text{ mM}$, Aqua bidest.), $\epsilon(1) = 1013.3 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$;
 $\lambda_{\text{max}}(2) = 290.0 \text{ nm}$ ($c = 0.75 \text{ mM}$, Aqua bidest.), $\epsilon(2) = 3613.3 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$; $\lambda_{\text{max}}(3) = 242.8 \text{ nm}$ ($c = 0.75 \text{ mM}$, Aqua bidest.), $\epsilon(3) = 4213.3 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$;

¹H NMR (500 MHz, MeOD, 25 °C, Referenz: MeOD): $\delta = 7.92$ (ddd, 2H, Benzophenon-*m*-H, $J = 8.6 \text{ Hz}$, $J = 1.9 \text{ Hz}$, $J = 1.1 \text{ Hz}$), 7.74 (ddd, 2H, Benzophenon-*o*-H, $J = 8.6 \text{ Hz}$, $J = 1.9 \text{ Hz}$, $J = 1.1 \text{ Hz}$), 7.70 (dd, 2H, Benzophenon-*o*-H, $J = 8.4 \text{ Hz}$, $J = 1.3 \text{ Hz}$), 7.57 (m_c, 1H, Benzophenon-*p*-H, $J = 7.5 \text{ Hz}$, $J = 1.5 \text{ Hz}$), 7.45 (m_c, 2H, Benzophenon-*m*-H, $J = 7.6 \text{ Hz}$, $J = 1.6 \text{ Hz}$, $J = 0.4 \text{ Hz}$), 4.68 (d, 1H, H-1, $J = 1.6 \text{ Hz}$), 4.44 (dd, 1H, H-10, $J = 9.0 \text{ Hz}$, $J = 5.7 \text{ Hz}$), 4.38 (ddd, 1H, Biotin-NHCHCH₂S, $J = 7.9 \text{ Hz}$, $J = 5.0 \text{ Hz}$, $J = 0.8 \text{ Hz}$), 4.18 (dd, 1H, Biotin-NHCHCHalkyl, $J = 7.9 \text{ Hz}$, $J = 4.5 \text{ Hz}$), 3.72 (dd, 1H, H-14a, $J = 7.2 \text{ Hz}$, $J = 6.9 \text{ Hz}$), 3.71 (dd, 1H, H-2, $J = 3.4 \text{ Hz}$, $J = 1.6 \text{ Hz}$), 3.68 (dd, 1H, H-6a, $J = 6.4 \text{ Hz}$, $J = 4.1 \text{ Hz}$), 3.62 (dd, 1H, H-3, $J = 8.9 \text{ Hz}$, $J = 3.4 \text{ Hz}$), 3.57 (dd, 1H, manOCHHCH₂, $J = 13.7 \text{ Hz}$, $J = 5.7 \text{ Hz}$), 3.50 (t, 1H, H-4, $J = 9.2 \text{ Hz}$), 3.41 (dd, 1H, H-14b, $J = 7.0 \text{ Hz}$, $J = 6.7 \text{ Hz}$), 3.40 (dd, 1H, H-6b, $J = 6.6 \text{ Hz}$, $J = 4.2 \text{ Hz}$), 3.29 (ddd, 1H, H-5, $J = 9.2 \text{ Hz}$, $J = 6.4 \text{ Hz}$, $J = 4.3 \text{ Hz}$), 3.11 (dd, 1H, manOCHHCH₂, $J = 13.8 \text{ Hz}$, $J = 7.9 \text{ Hz}$), 3.07 (ddd, 1H, Biotin-NHCHCHalkyl, $J = 10.3 \text{ Hz}$, $J = 5.9 \text{ Hz}$, $J = 4.5 \text{ Hz}$), 2.80 (dd, 1H, manOCH₂CHH, $J = 12.8 \text{ Hz}$, $J = 5.0 \text{ Hz}$), 2.58 (d, 1H, manOCH₂CHH, $J = 12.7 \text{ Hz}$), 1.83 (dd, 1H, Biotin-NHCHCHHS, $J = 13.8 \text{ Hz}$, $J = 6.2 \text{ Hz}$), 1.82 (dd, 1H, H-16a, $J = 6.1 \text{ Hz}$, $J = 3.5 \text{ Hz}$), 1.81 (dd, 1H, H-19b, $J = 9.8 \text{ Hz}$, $J = 5.1 \text{ Hz}$), 1.78 (dd, 1H, H-16b, $J = 6.2 \text{ Hz}$, $J = 3.3 \text{ Hz}$), 1.76 (dd, 1H, H-18a, $J = 9.3 \text{ Hz}$, $J = 4.5$

Hz), 1.74 (dd, 1H, H-13a, $J = 9.2$ Hz, $J = 4.5$ Hz), 1.73 (dd, 1H, H-19a, $J = 10.1$ Hz, $J = 4.6$ Hz), 1.61 (dd, 1H, H-17a, $J = 14.1$ Hz, $J = 7.6$ Hz), 1.59 (dd, 1H, H-11a, $J = 9.8$ Hz, $J = 8.0$ Hz), 1.57 (dd, 1H, Biotin-NHCHCHHS, $J = 13.0$ Hz, $J = 5.3$ Hz), 1.55 (dd, 1H, H-11b, $J = 10.0$ Hz, $J = 7.7$ Hz), 1.53 (dd, 1H, H-12a, $J = 14.9$ Hz, $J = 7.4$ Hz), 1.51 (dd, 1H, H-13b, $J = 9.3$ Hz, $J = 6.9$ Hz), 1.47 (dd, 1H, H-17b, $J = 13.8$ Hz, $J = 7.8$ Hz), 1.36 (dd, 1H, H-18b, $J = 9.7$ Hz, $J = 6.5$ Hz), 1.31 (dd, 1H, H-12b, $J = 15.2$ Hz, $J = 7.56$ Hz) ppm;

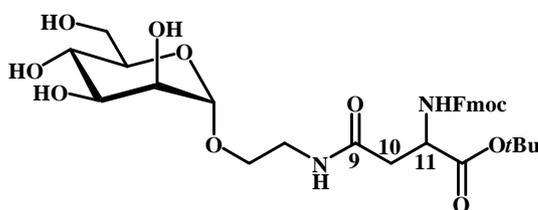
^{13}C NMR (125.75 MHz, MeOD, 25 °C, Referenz: MeOD): $\delta = 197.70$ (Aryl₂-C=O), 176.07 (C-15), 174.59 (C-9), 169.37 (Benzophenon-C=O) 166.09 ((NH)₂-C=O), 141.51 (2 Aryl-C), 138.73 (2 Aryl-C), 138.37 (Aryl-C), 134.19 (Aryl-C), 131.09 (2 Aryl-C), 130.95 (2 Aryl-C), 129.67 (2 Aryl-C), 128.78 (2 Aryl-C), 101.69 (C-1), 74.75 (C-5), 72.60 (C-2), 72.11 (C-3), 68.78 (C-4), 67.08 (C-6), 63.38 (Biotin-NHCHCHalkyl), 62.98 (C-14), 61.63 (Biotin-NHCHCH₂), 57.02 (Biotin-NHCHCHalkyl), 55.72 (C-10), 41.05 (manOCH₂CH₂), 40.42 (manOCH₂CH₂), 39.99 (C-16), 35.79 (C-19), 32.74 (C-11), 30.12 (C-13), 29.76 (Biotin-CH₂), 29.45 (C-17), 26.86 (C-18), 24.52 (C-12) ppm;

MALDI-TOF-MS: $m/z = 808.7$ [M + Na]⁺, 824.7 [M + K]⁺, (M = 785.93 ber. für C₃₈H₅₁N₅O₁₁S);

ESI-MS: $m/z = 808.33$ [M + Na]⁺;

ESI-HR-MS: $m/z = 808.3184$ [M + Na]⁺, (M = 785,9046 ber. für C₃₈H₅₁N₅O₁₁S).

7.2.2.4 4-(Aminoethyl α -D-mannopyranosyl)-N-Fmoc-Asp-1-OtBu 21



In einem trockenen, passend für eine Parallelsynthese-Apparatur angefertigten Reagenzglas (H = 12 cm, D = 4 cm) wurden 200 mg (0.900 mmol) 2'-Aminoethylmannosid (**15**), 320 mg (0.90 mmol) HATU und 400 mg (0.980 mmol) Fmoc-Asp-OtBu vorgelegt und etwa 10 min i. Vak. getrocknet und in 12 mL

trockenem DMF gelöst. In Stickstoff-Atmosphäre wurden 300 μ L (2.25 mmol) DIPEA zugegeben und die resultierende Mischung unter Schutzgas bei 23 °C über Nacht für 18 h gerührt. Der Umsatz wurde per DC kontrolliert (EE / MeOH / H₂O; 6:2:1; AA).

Das LM wurde i. Vak. entfernt und das Rohprodukt mittels Kieselgel-Flashchromatographie gereinigt (EE / MeOH / H₂O; 6:2:1). Das gewünschte Produkt **21** wurde als farbloses Lyophyllisat mit einer Ausbeute von 95 % (631 mg, 1.00 mmol) erhalten (M = 616.66 g / mol).

Analytische Daten:

R_f = 0.86 (EE / MeOH / H₂O; 6:2:1);

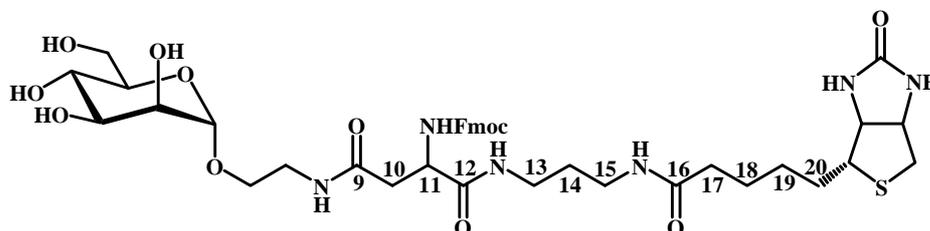
¹H-NMR (600 MHz, MeOD, 25 °C, Referenz: MeOD): δ = 7.84 (d, 2H, Fmoc-H, J = 7.6 Hz), 7.71 (d, 2H, Fmoc-H, J = 7.5 Hz), 7.43 (t, 2H, Fmoc-H, J = 7.5 Hz), 7.35 (t, 2H, Fmoc-H, J = 7.5 Hz), 4.81 (d, 1H, H-1, J = 1.5 Hz), 4.50 (dd, 1H, H-11, J = 7.2 Hz, J = 5.6 Hz), 4.40 (dd, 1H, Fmoc-CHH, J = 10.5 Hz, J = 7.2 Hz), 4.35 (dd, 1H, Fmoc-CHH, J = 10.5 Hz, J = 7.0 Hz), 4.28 (t, 1H, Fmoc-CH-CH₂, J = 7.0 Hz), 3.88 (dd, 1H, manOCH₂CHH, J = 11.6 Hz, J = 2.2 Hz), 3.87 (dd, 1H, H-2, J = 3.5 Hz, J = 1.8 Hz), 3.79 (dd, 1H, manOCHHCH₂, J = 10.5 Hz, J = 4.5 Hz), 3.75 (dd, 1H, manOCH₂CHH, J = 11.7 Hz, J = 5.9 Hz), 3.74 (dd, 1H, H-3, J = 9.3 Hz, J = 3.4 Hz), 3.65 (t, 1H, H-4, J = 9.5 Hz), 3.58 (ddd, 1H, H-5, J = 9.7 Hz, J = 5.7 Hz, J = 2.1 Hz), 3.57 (dd, 1H, manOCHHCH₂, J = 10.2 Hz, J = 4.3 Hz), 3.47 (ddd, 1H, H-6a, J = 14.2 Hz, J = 6.2 Hz, J = 4.6 Hz), 3.04 (ddd, 1H, H-6b, J = 14.2 Hz, J = 6.5 Hz, J = 4.7 Hz), 2.78 (dd, 1H, H-10a, J = 15.1 Hz, J = 5.4 Hz), 2.69 (dd, 1H, H-10b, J = 15.2 Hz, J = 7.3 Hz), 1.49 (s, 9H, 3 CH₃, O^tBu) ppm;

¹³C-NMR (150.9 MHz, MeOD, 25 °C, Referenz: MeOD): δ = 170.92 (Fmoc-C=O), 170.63 (O^tBu-C=O), 156.92 (C-9), 143.81(2 Fmoc-C), 141.15 (2 Fmoc-C), 127.40 (2 Fmoc-C), 126.79 (2 Fmoc-C), 124.88 (2 Fmoc-C), 119.54 (2 Fmoc-C), 100.28 (C-1), 81.63 (OC(CH₃)₃), 74.78 (C-5), 72.53 (C-3), 72.05(C-2), 68.64 (C-4), 68.12 (C-13), 67.17 (manOCH₂CH₂), 66.71 (manOCH₂CH₂), 51.63 (C-11), 48.30 (Fmoc-CH), 40.35 (C-6), 38.55 (C-10), 28.21 (3 CH₃, OC(CH₃)₃) ppm;

MALDI-TOF-MS: m/z = 639.2 [M + Na]⁺, 656.2 [M + K]⁺;

ESI-MS: m/z = 639.26 [M + Na]⁺, (M = 616.66 ber. für C₃₁H₄₀N₂O₁₁).

7.2.2.5 4-(Aminoethyl α -D-mannopyranosyl)-N-Fmoc-Asp-1-(N-(+)-biotinyl-3-aminopropyl)amid **22**



220 mg (0.36 mmol) des geschützten Glycopeptides **21** wurde in 5 mL 80% aq. TFA gelöst und für 60 min bei RT gerührt. Der Reaktionsverlauf wurde mittels DC kontrolliert (EE / MeOH / H₂O; 6:2:1; AA). Zur Aufarbeitung wurde das LM i. Vak. entfernt, der Rückstand in 2 mL MeOH aufgenommen, filtriert und das LM i. Vak. entfernt. Das verbleibende Rohprodukt (230 mg; 0.31 mmol; R_f = 0.36 (EE / MeOH / H₂O; 6:2:1); M = 562.57 g / mol) sowie 150 mg (0.43 mmol) HATU und 170 mg (0.41 mmol) der Biotin-Komponente wurden für 30 min i. Vak. getrocknet und in 5 mL DMF (zur Peptidsynthese) gelöst. In Stickstoffatmosphäre wurden 350 μ L (2.63 mmol) DIPEA hinzugefügt und die resultierende Mischung über Nacht unter Stickstoff bei RT gerührt. Der Reaktionsumsatz wurde per DC-Kontrolle (EE / MeOH / H₂O; 6:2:1; AA) verfolgt. Zur Aufarbeitung wurde überschüssiges DMF i. Vak. entfernt und das Rohprodukt mittels präparativer HPLC (MeCN/ H₂O-Gradient) gereinigt. Das gewünschte Produkt **22** wurde als farbloses Lyophilisat in 42 % Ausbeute erhalten (145 mg, 0.17 mmol, M = 842.96 g / mol).

Analytische Daten:

R_f = 0.47 (EE / MeOH / H₂O; 6:2:1);

Gradient HPLC: 0-5 min 100% H₂O, 5-20 min 60% H₂O, 20-30 min 40% H₂O, 30-40 min 0% H₂O, 40-50 min 0% H₂O, 50-60 min 100% H₂O, Retentionszeit: 33.8 min (42 % H₂O / 58 % MeCN);

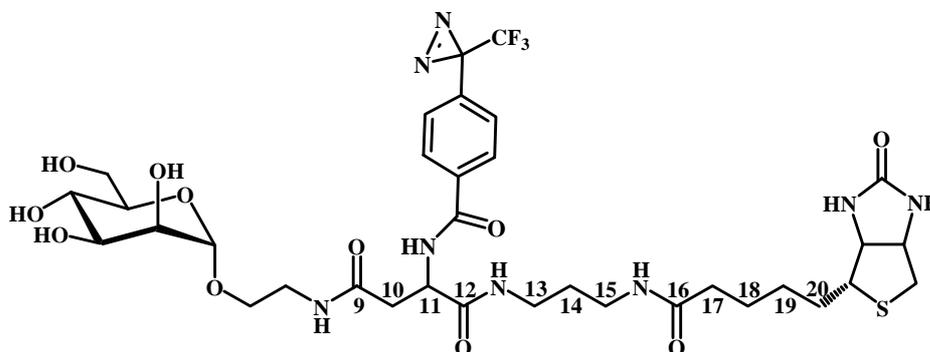
¹H-NMR (500 MHz, CD₃CN / D₂O, 1:1, 25 °C, Referenz: CD₃CN): δ = 7.85 (d, 2H, Fmoc-H, *J* = 7.6 Hz), 7.71 (dd, 2H, Fmoc-H, *J* = 6.8 Hz, *J* = 4.2 Hz), 7.45 (t, 2H, Fmoc-H, *J* = 7.4 Hz), 7.37 (td, 2H, Fmoc-H, *J* = 7.5 Hz, *J* = 4.1 Hz), 4.80 (d, 1H, H-1, *J* = 1.6 Hz), 4.51 (dd, 1H, Biotin-NHCHCH₂S, *J* = 7.6 Hz, *J* = 5.8 Hz), 4.42 (dd, 1H, manOCHHCH₂, *J* = 11.8 Hz, *J* = 6.8 Hz), 4.38 (dd, 1H, manOCHHCH₂, *J* =

11.8 Hz, $J = 7.3$ Hz), 4.27 (d, 1H, Biotin-NHCHCHalkyl, $J = 7.2$ Hz), 4.24 (t, 1H, H-11, $J = 6.8$ Hz), 3.86 (dd, 1H, H-2, $J = 3.4$ Hz, $J = 1.7$ Hz), 3.77 (dd, 1H, H-6a, $J = 12.1$ Hz, $J = 2.2$ Hz), 3.69 (dd, 1H, H-3, $J = 9.6$ Hz, $J = 3.9$ Hz), 3.68 (dd, 1H, H-6b, $J = 12.2$ Hz, $J = 3.6$ Hz), 3.65 (dd, 1H, Fmoc-CHH, $J = 11.9$ Hz, $J = 6.9$ Hz), 3.59 (t, 1H, H-4, $J = 9.6$ Hz), 3.53 (ddd, 1H, H-5, $J = 9.9$ Hz, $J = 5.5$ Hz, $J = 2.2$ Hz), 3.50 (dd, 1H, Fmoc-CHH, $J = 11.2$ Hz, $J = 6.7$ Hz), 3.41 (dd, 1H, manOCH₂CHH, $J = 14.1$ Hz, $J = 5.3$ Hz), 3.28 (ddd, 1H, manOCH₂CHH, $J = 14.2$ Hz, $J = 5.7$ Hz), 3.16 (dd, 1H, H-17a, $J = 9.3$ Hz, $J = 6.9$ Hz), 3.15 (t, 1H, Biotin-NHCHCHalkyl, $J = 7.4$ Hz), 3.12 (dd, 1H, H-17b, $J = 9.5$ Hz, $J = 6.6$ Hz), 2.87 (dd, 1H, Biotin-NHCHCHHS, $J = 12.8$ Hz, $J = 5.1$ Hz), 2.69 (dd, 1H, Biotin-NHCHCHHS, $J = 12.9$ Hz, $J = 4.9$ Hz), 2.67 (dd, 1H, H-13b, $J = 13.7$ Hz, $J = 7.5$ Hz), 2.59 (dd, 1H, H-13a, $J = 13.9$ Hz, $J = 7.8$ Hz), 2.56 (dd, 1H, H-15a, $J = 14.2$ Hz, $J = 7.2$ Hz), 2.53 (dd, 1H, H-15b, $J = 14.0$ Hz, $J = 6.8$ Hz), 2.15 (t, 1H, Fmoc-CH, $J = 7.3$ Hz), 2.13 (d, 1H, H-10a, $J = 6.8$ Hz), 2.11 (d, 1H, H-10b, $J = 6.5$ Hz), 1.66 (dd, 1H, H-20a, $J = 14.3$ Hz, $J = 7.6$ Hz), 1.64 (dd, 1H, H-14a, $J = 13.9$ Hz, $J = 7.0$ Hz), 1.62 (dd, 1H, H-14b, $J = 14.0$ Hz, $J = 7.2$ Hz), 1.59 (dd, 1H, H-20b, $J = 14.5$ Hz, $J = 7.0$ Hz), 1.54 (dd, 1H, H-19a, $J = 15.3$ Hz, $J = 8.0$ Hz), 1.49 (dd, 1H, H-19b, $J = 15.3$ Hz, $J = 8.1$ Hz), 1.33 (dd, 1H, H-18a, $J = 15.2$ Hz, $J = 7.5$ Hz), 1.28 (dd, 1H, H-18b, $J = 15.0$ Hz, $J = 7.3$ Hz) ppm;

¹³C-NMR (125.75 MHz; CD₃CN / D₂O, 1:1, 25 °C, Referenz: CD₃CN): $\delta = 180.86$ (C-9), 176.52 (C-12), 173.26 (C-16), 172.17 ((NH₂)₂C=O), 165.62 (Fmoc-C=O), 144.81 (2 Fmoc-C), 142.0 (2 Fmoc-C), 128.93 (2 Fmoc-C), 128.36 (2 Fmoc-C), 126.25 (Fmoc-C), 100.73 (C-1), 73.82 (C-5), 71.68 (C-2), 71.12 (C-3), 67.86 (Fmoc-CH₂), 67.69 (C-4), 66.75 (manOCH₂CH₂), 63.0 (Biotin-NHCHCHalkyl), 62.0 (C-6), 61.07 (Biotin-NHCHCH₂S), 56.30 (Biotin-NHCHCHalkyl), 53.14 (C-11) 47.81 (Fmoc-CH), 40.79 (Biotin-CH₂), 39.89 (manOCH₂CH₂), 38.45 (C-13), 37.64 (C-15), 37.59 (C-17), 36.52 (C-10), 29.29 (C-14), 29.09 (C-20), 28.80 (C-19), 26.27 (C-18) ppm;

MALDI-TOF-MS: $m/z = 843.5$ [M + H]⁺, 865.4 [M + Na]⁺, 881.4 [M + K]⁺, (M = 842.96 ber. für C₄₀H₅₄N₆O₁₂S);

ESI-MS: $m/z = 865.44$ [M + Na]⁺, (M = 842.96 ber. für C₄₀H₅₄N₆O₁₂S).

7.2.2.6 Bifunktionelles biotinyliertes mannosidisches Diazirin **23**

25.0 mg (29.7 μmol) der Fmoc-geschützten α -Asparaginsäurekomponente **22** wurden in 3.0 mL 20% Piperidin in DMF gelöst und 60 min bei RT gerührt. Der Umsatz wurde per DC (EE / MeOH / H₂O; 6:2:1; AA, Ninhydrin) kontrolliert. Zur Aufarbeitung wurde überschüssiges LM i. Vak. Entfernt. Das verbleibende Rohprodukt (23.6 mg; $R_f = 0.1$ (EE / MeOH / H₂O; 6:2:1); $M = 620.73$ g / mol) sowie 11.3 mg HATU (29.7 μmol) und 7.2 mg (31.0 μmol) der Carbonsäure **20** wurden in 1.5 mL DMF gelöst und in Stickstoff-Atmosphäre mit 0.03 mL (87.0 μmol) DIPEA versetzt. Die resultierende Reaktionsmischung wurde in Stickstoff-Atmosphäre bei RT über Nacht gerührt und der Umsatz per DC-Kontrolle (EE / MeOH / H₂O; 6:2:1; AA) überprüft. Überschüssiges DMF wurde entfernt und das Rohprodukt mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (EE / MeOH / H₂O; 6:2:1) unter Lichtausschluss gereinigt.

Das gewünschte photoaktive Produkt **23** wurde mit einer Ausbeute von 63.5 % (20.1 mg; 24.1 μmol) erhalten. ($M = 832.85$ g / mol)

Analytische Daten:

$R_f = 0.51$ (EE / MeOH / H₂O, 6:2:1);

$[\alpha]_D = +23.3$ ($T = 20^\circ\text{C}$, $\lambda = 589.2$ nm);

UV-Vis ($c = 0.12$ mM, MeCN / H₂O, 1:1): $\lambda_{\text{max}}(1) = 353.3$ nm, $\epsilon(1) = 6000$ Lmol⁻¹cm⁻¹; $\lambda_{\text{max}}(2) = 303.5$ nm, $\epsilon(2) = 10000$ Lmol⁻¹cm⁻¹; $\lambda_{\text{max}}(3) = 285.2$ nm, $\epsilon(3) = 24000$ Lmol⁻¹cm⁻¹; $\lambda_{\text{max}}(4) = 251.6$ nm, $\epsilon(4) = 37\,000$ Lmol⁻¹cm⁻¹;

FT-IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3448 \text{ cm}^{-1}$, 2929 cm^{-1} , 2381 cm^{-1} , 1654 cm^{-1} , 1560 cm^{-1} , 1268 cm^{-1} , 1137 cm^{-1} , 1102 cm^{-1} , 1060 cm^{-1} , 768 cm^{-1} ;

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{CD}_3\text{CN} / \text{D}_2\text{O}$, 1:1, 25 °C, Referenz: TMS): $\delta = 7.90$ (dt, 2H, Aryl-H, $J = 8.7 \text{ Hz}$, $J = 2.0 \text{ Hz}$), 7.39 (d, 2H, Aryl-H, $J = 8.2 \text{ Hz}$), 4.81 (dd, 1H, H-11, $J = 7.7 \text{ Hz}$, $J = 6.1 \text{ Hz}$), 4.75 (d, 1H, H-1, $J = 1.6 \text{ Hz}$), 4.50 (dd, 1H, Biotin- $\text{NH}_2\text{CHCHalkyl}$, $J = 7.9 \text{ Hz}$, $J = 4.9 \text{ Hz}$), 4.31 (dd, 1H, Biotin- $\text{NH}_2\text{CHCH}_2\text{S}$, $J = 7.9 \text{ Hz}$, $J = 4.5 \text{ Hz}$), 3.82 (dd, 1H, H-2, $J = 3.4 \text{ Hz}$, $J = 1.7 \text{ Hz}$), 3.76 (dd, 1H, manOCHHCH₂, $J = 12.1 \text{ Hz}$, $J = 2.2 \text{ Hz}$), 3.69 (dd, 1H, H-3, $J = 9.3 \text{ Hz}$, $J = 3.4 \text{ Hz}$), 3.67 (dd, 1H, manOCHHCH₂, $J = 12.0 \text{ Hz}$, $J = 2.4 \text{ Hz}$), 3.58 (t, 1H, H-4, $J = 9.8 \text{ Hz}$), 3.52 (ddd, 1H, H-5, $J = 9.8 \text{ Hz}$, $J = 5.3 \text{ Hz}$, $J = 2.2 \text{ Hz}$), 3.49 (dd, 1H, H-6a, $J = 5.5 \text{ Hz}$, $J = 4.2 \text{ Hz}$), 3.42 (dd, 1H, H-6b, $J = 5.7 \text{ Hz}$, $J = 2.3 \text{ Hz}$), 3.39 (dd, 1H, manOCH₂CHH, $J = 6.7 \text{ Hz}$, $J = 12.3 \text{ Hz}$), 3.30 (dd, 1H, manOCH₂CHH, $J = 6.4 \text{ Hz}$, $J = 12.3 \text{ Hz}$), 3.27 (dd, 1H, H-15a, $J = 12.5 \text{ Hz}$, $J = 7.3 \text{ Hz}$), 3.24 (dd, 1H, H-15b, $J = 12.2 \text{ Hz}$, $J = 6.9 \text{ Hz}$), 3.20 (dd, 1H, Biotin- $\text{NH}_2\text{CHCHalkyl}$, $J = 7.7 \text{ Hz}$, $J = 6.8 \text{ Hz}$), 3.13 (dd, 1H, H-17a, $J = 13.4 \text{ Hz}$, $J = 6.6 \text{ Hz}$), 3.12 (dd, 1H, H-17b, $J = 13.6 \text{ Hz}$, $J = 6.8 \text{ Hz}$), 2.91 (dd, 1H, Biotin- NH_2CHCHHS , $J = 13.0 \text{ Hz}$, $J = 5.0 \text{ Hz}$), 2.82 (dd, 1H, H-13a, $J = 15.1 \text{ Hz}$, $J = 6.0 \text{ Hz}$), 2.72 (dd, 1H, H-13b, $J = 15.1 \text{ Hz}$, $J = 6.6 \text{ Hz}$), 2.70 (dd, 1H, Biotin- NH_2CHCHHS , $J = 13.1 \text{ Hz}$, $J = 6.4 \text{ Hz}$), 2.16 (dd, 1H, H-20a, $J = 14.9 \text{ Hz}$, $J = 7.4 \text{ Hz}$), 2.15 (dd, 1H, H-20b, $J = 14.7 \text{ Hz}$, $J = 7.4 \text{ Hz}$), 1.68 (dd, 1H, H-19a, $J = 13.7 \text{ Hz}$, $J = 6.5 \text{ Hz}$), 1.67 (dd, 1H, H-19b, $J = 14.0 \text{ Hz}$, $J = 6.3 \text{ Hz}$), 1.63 (dd, 1H, H-18a, $J = 13.3 \text{ Hz}$, $J = 6.7 \text{ Hz}$), 1.57 (dd, 1H, H-14a, $J = 15.1 \text{ Hz}$, $J = 7.4 \text{ Hz}$), 1.53 (dd, 1H, H-18b, $J = 13.1 \text{ Hz}$, $J = 6.9 \text{ Hz}$), 1.51 (dd, 1H, H-10b, $J = 13.9 \text{ Hz}$, $J = 6.8 \text{ Hz}$), 1.36 (dd, 1H, H-14b, $J = 15.5 \text{ Hz}$, $J = 7.2 \text{ Hz}$), 1.30 (dd, 1H, H-10a, $J = 13.4 \text{ Hz}$, $J = 6.9 \text{ Hz}$) ppm;

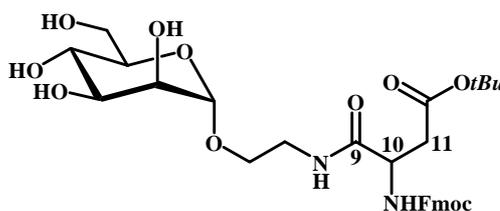
$^{13}\text{C-NMR}$ (150.90 MHz, $\text{CD}_3\text{CN} / \text{D}_2\text{O}$, 1:1, 25 °C, Referenz: TMS): $\delta = 176.60$ (Aryl-C=O), 172.78 (C-12), 172.37 (C-9), 168.61 (C-16), 165.66 ($(\text{NH}_2)_2\text{C}=\text{O}$), 135.57 (Aryl-C), 133.14 (Aryl-C), 129.11 (2 Aryl-C), 127.73 (2 Aryl-C), 124.44 (q, CF_3 , $J_{\text{C,F}} = \text{Hz}$), 100.72 (C-1), 87.77 ($\text{N}=\text{N}-\text{CCF}_3$), 73.82 (C-5), 71.68 (C-3), 71.10 (C-2), 67.70 (C-4), 66.73 (C-6), 62.81 (Biotin- $\text{NH}_2\text{CHCHalkyl}$), 61.95 (manOCH₂CH₂), 61.09 (Biotin- $\text{NH}_2\text{CHCH}_2\text{S}$), 56.29 (Biotin- $\text{NH}_2\text{CHCHalkyl}$), 52.36 (C-11), 40.78 (Biotin- $\text{NH}_2\text{CHCH}_2\text{S}$), 39.89 (manOCH₂CH₂), 38.13 (C-13), 37.68 (C-15), 37.36 (C-17), 36.49 (C-10), 29.71 (C-14), 29.24 (C-20), 28.78 (C-19), 26.24 (C-18) ppm;

MALDI-TOF-MS: $m/z = 827.3$ $[\text{M} - \text{N}_2 + \text{Na}]^+$;

ESI-MS: $m/z = 855.29 [M + Na]^+$, $827.29 [M - N_2 + Na]^+$, (ber. $M = 832.85$ für $C_{34}H_{47}F_3N_8O_{11}S$);

ESI-HR-MS: $m/z = 855.2972 [M + Na]^+$, ($M = 832,8455$ ber. für $C_{34}H_{47}F_3N_8O_{11}S$).

7.2.2.7 1-(Aminoethyl- α -D-mannopyranosyl)-N-Fmoc-Asp-4-OtBu 24



In einem trockenen, für eine Parallelsynthese-Apparatur angefertigten Reagenzglas (H = 12 cm, D = 4 cm) wurden 200 mg (0.900 mmol) 2'-Aminoethylmannosid (**15**), 320 mg (0.900 mmol) HATU und 400 mg (0.980 mmol) Fmoc-Asp(O^tBu)-OH vorgelegt und etwa 10 min im Vakuum getrocknet und in 12 mL trockenem DMF gelöst. In Stickstoff-Atmosphäre wurden 300 μ L (2.25 mmol) DIPEA zugegeben und die resultierende Mischung unter Schutzgas bei 23 °C über Nacht für 18 h gerührt. Der Umsatz wurde per DC kontrolliert (EE / MeOH / H₂O; 6:2:1; AA). Das LM wurde i. Vak. entfernt und das Rohprodukt mittels Kieselgel-Flashchromatographie gereinigt (EE / MeOH / H₂O; 6:2:1). Das Produkt **24** wurde als farbloses Lyophyllisat mit einer Ausbeute von 89 % (536 mg, 0.85 mmol) erhalten ($M = 616.66$ g / mol).

Analytische Daten:

$R_f = 0.75$ (EE / MeOH / H₂O; 6:2:1);

¹H-NMR (500 MHz, MeOD, 25 °C, Referenz: MeOD): $\delta = 7.82$ (dd, 2H, Fmoc-H, $J = 7.6$ Hz, $J = 3.5$ Hz), 7.71 (t, 2H, Fmoc-H, $J = 7.7$ Hz), 7.42 (dd, 2H, Fmoc-H, $J = 7.5$ Hz, $J = 3.4$ Hz), 7.34 (dd, 2H, Fmoc-H, $J = 6.9$ Hz, $J = 1.1$ Hz), 4.81 (d, 1H, H-1, $J = 1.4$ Hz), 4.52 (dd, 1H, H-10, $J = 8.7$ Hz, $J = 5.2$ Hz), 4.48 (dd, 1H, Fmoc-CHH, $J = 10.5$ Hz, $J = 7.0$ Hz), 4.39 (dd, 1H, Fmoc-CHH, $J = 10.7$ Hz, $J = 6.6$ Hz), 4.27 (t, 1H, Fmoc-CH $J = 7.0$ Hz), 3.88 (dd, 1H, manOCH₂CHH, $J = 12.1$ Hz, $J = 2.2$ Hz),

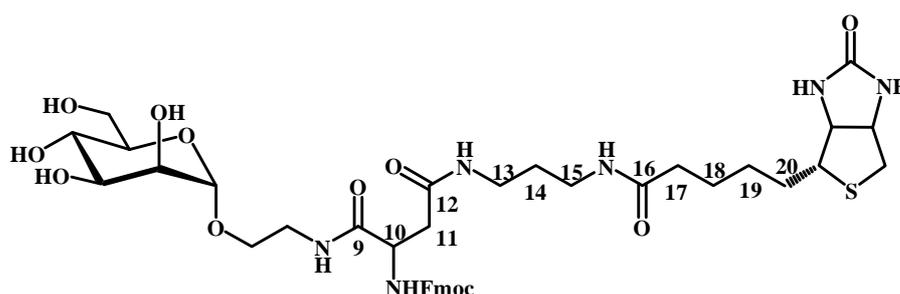
3.86 (dd, 1H, H-2, $J = 1.4$ Hz, $J = 3.0$ Hz), 3.79 (dd, 1H, manOCHHCH₂, $J = 10.7$ Hz, $J = 6.4$ Hz), 3.73 (dd, 1H, H-3, $J = 8.8$ Hz, $J = 3.0$ Hz), 3.75 (dd, 1H, manOCH₂CHH, $J = 11.8$ Hz, $J = 5.8$ Hz) 3.65 (t, 1H, H-4, $J = 9.6$ Hz), 3.57 (ddd, 1H, H-5, $J = 10.3$ Hz, $J = 6.1$ Hz, $J = 1.7$ Hz), 3.56 (dd, 1H, manOCHHCH₂, $J = 10.8$ Hz, $J = 5.8$ Hz), 3.48 (ddd, 1H, H-6a, $J = 13.9$ Hz, $J = 7.6$ Hz, $J = 4.9$ Hz), 3.42 (ddd, 1H, H-6b, $J = 13.9$ Hz, $J = 7.4$ Hz, $J = 5.0$ Hz), 2.82 (dd, 1H, H-11a, $J = 16.1$ Hz, $J = 5.1$ Hz), 2.60 (dd, 1H, H-11b, $J = 16.1$ Hz, $J = 8.9$ Hz), 1.47 (s, 9H, 3 CH₃, OC(CH₃)₃) ppm;

¹³C-NMR (150.92 MHz, MeOD, 25 °C, Referenz: MeOD): $\delta = 173.48$ (OtBu-C=O), 172.48 (Fmoc-C=O), 171.39 (C-9), 145.22 (2 Fmoc-C), 142.59 (2 Fmoc-C), 128.79 (2 Fmoc-C), 128.17 (2 Fmoc-C), 126.23 (2 Fmoc-C), 120.91 (2 Fmoc-C), 101.64 (C-1), 82.43 (C(CH₃)₃), 74.67 (C-5), 72.52 (C-3), 72.05 (C-2), 68.67 (C-4), 68.19 (Fmoc-CH₂), 67.06 (manOCH₂CH₂), 62.84 (manOCH₂CH₂), 53.32 (C-10), 48.34 (Foc-CH), 40.42 (C-6), 38.74 (C-11), 28.33 (C(CH₃)₃) ppm;

MALDI-TOF-MS: $m/z = 639.2$ [M + Na]⁺;

ESI-MS: $m/z = 639.26$ [M + Na]⁺, (M = 616.66 ber. für C₃₁H₄₀N₂O₁₁).

7.2.2.8 1-(Aminoethyl α -D-mannopyranosyl)-N-Fmoc-Asp-4-(N-(+)-biotinyl-3-aminopropyl)amid 25



250 mg der geschützten β -Asparaginsäure-Komponente **24** (0.41 mmol) wurden in 6 mL 80% aqu. TFA gelöst und für 30 min bei RT gerührt. Der Reaktionsumsatz wurde mittels DC-Kontrolle (EE / MeOH / H₂O; 6:2:1; AA-Reagens) verfolgt. Zur Aufarbeitung wurde überschüssige TFA i. Vak. Entfernt. Das Rohprodukt (150 mg; 0.27 mmol; $R_f = 0.37$ (EE / MeOH / H₂O; 6:2:1); M = 562.56 g / mol) sowie 98.1 mg (0.28 mmol) HATU und 109 mg (0.26) der Biotin-Komponente wurden für 30 min i.

Vak. getrocknet und in 4 mL DMF (zur Peptidsynthese) gelöst. In Stickstoffatmosphäre wurden 220 μ L (1.65 mmol) DIPEA hinzugefügt und die resultierende Mischung über Nacht unter Stickstoff bei RT gerührt. Der Reaktionsumsatz wurde per DC-Kontrolle (EE / MeOH / H₂O; 6:2:1; AA) verfolgt. Zur Aufarbeitung wurde überschüssiges DMF i. Vak. entfernt und das Rohprodukt mittels präparativer HPLC (MeCN / H₂O-Gradient) gereinigt. Das gewünschte Produkt **25** wurde als farbloses Lyophilisat mit einer Ausbeute von 36 % erhalten (80.4 mg, 95.4 μ mol, M = 842.96 g / mol).

Analytische Daten:

R_f = 0.54 (EE / MeOH / H₂O; 6:2:1);

Gradient HPLC: 0-5 min 100% H₂O, 5-20 min 60% H₂O, 20-30 min 40% H₂O, 30-40 min 0% H₂O, 40-50 min 0% H₂O, 50-60 min 100% H₂O, Retentionszeit: 33.8 min (42 % H₂O / 58 % MeCN);

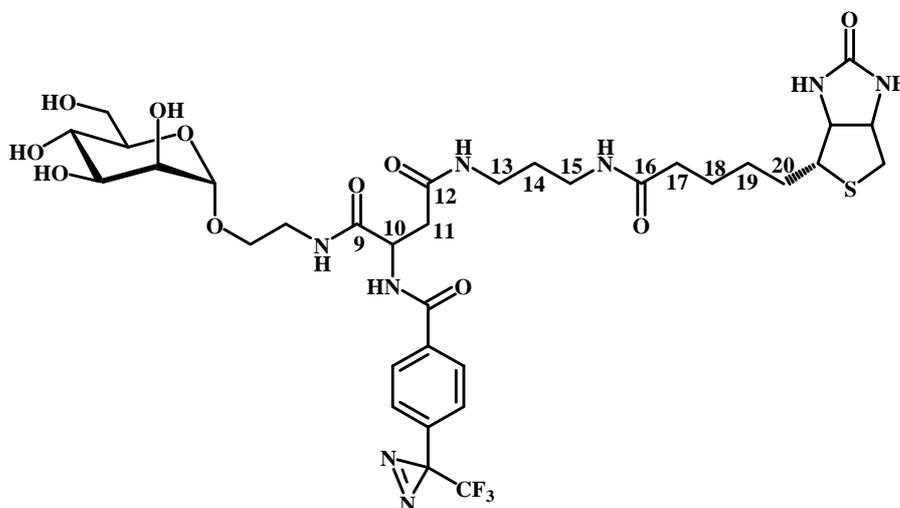
¹H-NMR (600 MHz, CD₃CN / D₂O, 1:1, 25 °C, Referenz: TMS): δ = 7.85 (d, 2H, Fmoc-H, J = 7.6 Hz), 7.67 (d, 2H, Fmoc-H, J = 7.5 Hz), 7.45 (t, 2H, Fmoc-H, J = 7.4 Hz), 7.38 (td, 2H, Fmoc-H, J = 7.5 Hz, J = 0.9 Hz), 4.77 (d, 1H, H-1, J = 1.7 Hz), 4.45 (dd, 1H, Biotin-NHCHCH₂S, J = 6.7 Hz, J = 4.5 Hz), 4.43 (t, 1H, H-10, J = 6.8 Hz), 4.40 (dd, 1H, Fmoc-CHH, J = 12.2 Hz, J = 5.5 Hz), 4.37 (dd, 1H, Fmoc-CHH, J = 12.0 Hz, J = 5.3 Hz), 4.29 (dd, 1H, Fmoc-CH, J = 5.5 Hz, J = 4.4 Hz), 4.27 (dd, 1H, Biotin-NHCHCHalkyl, J = 6.5 Hz, J = 4.7 Hz), 3.83 (dd, 1H, H-2, J = Hz, J = 1.6 Hz), 3.77 (dd, 1H, manOCHHCH₂, J = 12.2 Hz, J = 6.5 Hz), 3.69 (dd, 1H, H-3, J = Hz, J = Hz), 3.66 (dd, 1H, manOCHHCH₂, J = 12.1 Hz, J = 6.9 Hz), 3.64 (dd, 1H, H-6a, J = 12.0 Hz, J = 5.3 Hz), 3.58 (t, 1H, H-4, J = 9.8 Hz), 3.51 (dd, 1H, H-5, J = 9.8 Hz, J = 5.5 Hz), 3.50 (dd, 1H, H-6b, J = 11.9 Hz, J = 5.6 Hz), 3.43 (dd, 1H, manOCH₂CHH, J = 14.4 Hz, J = 6.5 Hz), 3.33 (dd, 1H, manOCH₂CHH, J = 13.9 Hz, J = 6.1 Hz), 3.17 (td, 1H, Biotin-NHCHCHalkyl, J = 7.1 Hz, J = 6.9 Hz), 3.12 (dd, 1H, H-13b, J = 13.9 Hz, J = 6.7 Hz), 3.10 (dd, 1H, H-13a, J = 13.7 Hz, J = 6.6 Hz), 3.09 (dd, 1H, H-17a, J = 13.5 Hz, J = 6.7 Hz), 3.07 (dd, 1H, H-17b, J = 13.2 Hz, J = 6.6 Hz), 2.66 (dd, 1H, H-15a, J = 14.4 Hz, J = 6.6 Hz), 2.54 (dd, 1H, H-15b, J = 14.7

Hz, $J = 9.4$ Hz), 2.11 (dd, 1H, H-11a, $J = 14.9$ Hz, $J = 7.4$ Hz), 2.09 (dd, 1H, H-11b, $J = 14.7$ Hz, $J = 7.4$ Hz), 1.61 (dd, 1H, H-14a, $J = 13.4$ Hz, $J = 6.8$ Hz), 1.58 (dd, 1H, H-14b, $J = 13.4$ Hz, $J = 6.7$ Hz), 1.52 (dd, 1H, H-20a, $J = 13.9$ Hz, $J = 6.7$ Hz), 1.50 (dd, 1H, H-19a, $J = 14.0$ Hz, $J = 6.8$ Hz), 1.48 (dd, 1H, H-20b, $J = 13.9$ Hz, $J = 7.2$ Hz), 1.45 (dd, 1H, H-19b, $J = 14.2$ Hz, $J = 7.0$ Hz), 1.30 (dd, 1H, H-18a, $J = 13.8$ Hz, $J = 7.4$ Hz), 1.27 (dd, 1H, H-18b, $J = 13.5$ Hz, $J = 7.3$ Hz) ppm;

^{13}C -NMR (150.92 MHz, $\text{CD}_3\text{CN} / \text{D}_2\text{O}$, 1:1, 25°C, Referenz: TMS): $\delta = 175.93$ (C-9), 172.84 (C-16), 171.53 (C-12), 165.08 ($(\text{NH}_2)_2\text{C}=\text{O}$), 157.25 (Fmoc-C=O), 144.24 (2 Fmoc-C), 144.19 (2 Fmoc-C), 129.51 (2 Fmoc-C), 128.51 (2 Fmoc-C), 128.40 (2 Fmoc-C), 127.83 (2 Fmoc-C), 100.1 (C-1), 73.22 (C-5), 71.12 (C-3), 68.07 (C-2), 67.38 (Fmoc- CH_2), 67.13 (C-4), 66.01 (C-6), 62.25 (Biotin-NHCHCHalkyl), 61.36 (manOCH₂CH₂), 60.50 (Biotin-NHCHCH₂S), 57.67 (Biotin-NHCHCHalkyl), 52.61 (C-10), 47.22 (Fmoc-CH), 39.35 (Biotin-NHCHCH₂S), 38.36 (manOCH₂CH₂), 37.07 (C-15), 36.84 (C-13), 35.95 (C-17), 28.69 (C-11), 28.52 (C-14), 28.22 (C-20), 25.66 (C-19), 25.53 (C-18) ppm;

MALDI-TOF-MS: $m/z = 865.3$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$;

ESI-MS: $m/z = 865.34$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$, (M = 842.96 ber. für $\text{C}_{40}\text{H}_{54}\text{N}_6\text{O}_{12}\text{S}$).

7.2.2.9 Bifunktionelles biotinyliertes mannosidisches Diazirin **26**

19.6 mg (23.2 μmol) der *N*-geschützten β -Asparaginsäurekomponente **25** wurden in 1.5 mL 20% Piperidin in DMF gelöst und 60 min bei RT gerührt. Der Reaktionsumsatz wurde mittels DC (EE / MeOH / H₂O, 6:2:1, AA, Ninhydrin) kontrolliert. Zur Aufarbeitung wurden DMF und flüchtige Nebenprodukte i. Vak. entfernt. Das entstandene Rohprodukt (19.6 mg; 31.6 μmol ; R_f -Wert = 0.09 (EE / MeOH / H₂O); $M = 620.73$ g / mol) sowie 14.0 mg HATU (36.8 μmol) und 7.2 mg Diazirincarbonsäure **20** (30.9 μmol) wurden in 1.5 mL DMF gelöst und unter Stickstoff-Atmosphäre mit 0.05 mL (145 μmol) DIPEA versetzt. Die resultierende Reaktionsmischung wurde über Nacht unter Stickstoff-Atmosphäre bei RT gerührt. Zur Überprüfung des Umsatzes wurde eine DC-Kontrolle durchgeführt (EE / MeOH / H₂O; 6:2:1; AA). Zur Aufarbeitung wurde überschüssiges DMF i. Vak. entfernt und das Rohprodukt (40.7 mg) mittels Kieselgel-Flashchromatographie (LM: EE / MeOH / H₂O; 6:2:1) gereinigt. Das gewünschte Produkt **26** resultierte als leicht gelbliches Lyophyllisat (21 mg, 25.2 μmol , 80 %, $M = 832.85$ g / mol).

Analytische Daten:

R_f -Wert = 0.33;

$[\alpha]_D = + 30.0$ ($T = 20^\circ\text{C}$, $\lambda = 589.2$ nm);

UV-Vis ($c = 0.12$ mM, MeCN / H₂O, 1:1): $\lambda_{\max}(1) = 335.9$ nm, $\epsilon(1) = 9833.3$ Lmol⁻¹cm⁻¹; $\lambda_{\max}(2) = 278.2$ nm, $\epsilon(2) = 18333.3$ Lmol⁻¹cm⁻¹; $\lambda_{\max}(3) = 233.5$ nm, $\epsilon(3) = 23333.3$ Lmol⁻¹cm⁻¹;

FT-IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3448$ cm⁻¹, 2941 cm⁻¹, 2381 cm⁻¹, 1685 cm⁻¹, 1654 cm⁻¹, 1637 cm⁻¹, 1560 cm⁻¹, 1438 cm⁻¹, 1400 cm⁻¹, 1280 cm⁻¹, 1202 cm⁻¹, 1113 cm⁻¹, 762 cm⁻¹;

¹H NMR: $\delta = 8.23$ (dd, 2H, Aryl-H, $J = 8.5$ Hz, $J = 1.4$ Hz), 7.38 (dd, 2H, Aryl-H, $J = 8.8$ Hz, $J = 1.3$ Hz), 4.86 (dd, 1H, H-10, $J = 8.6$ Hz, $J = 5.3$ Hz), 4.76 (d, 1H, H-1, $J = 1.5$ Hz), 4.49 (dd, 1H, Biotin-NHCHCH₂S, $J = 7.7$ Hz, $J = 4.4$ Hz), 4.30 (dd, 1H, Biotin-NHCHCHalkyl, $J = 8.0$ Hz, $J = 4.4$ Hz), 3.80 (dd, 1H, H-2, $J = 3.3$ Hz, $J = 1.7$ Hz), 3.73 (dd, 1H, H-7a, $J = 12.2$ Hz, $J = 2.3$ Hz), 3.69 (dd, 1H, H-6a, $J = 11.0$ Hz, $J = 4.3$ Hz), 3.68 (dd, 1H, H-3, $J = 9.7$ Hz, $J = 3.2$ Hz), 3.66 (dd, 1H, H-7b, $J = 12.2$ Hz, $J = 3.3$ Hz), 3.59 (t, 1H, H-4, $J = 9.8$ Hz), 3.52 (dd, 1H, H-6b, $J = 10.6$ Hz, $J = 4.4$ Hz), 3.49 (dd, 1H, H-5, $J = 10.0$ Hz, $J = 4.1$ Hz), 3.44 (dd, 1H, H-8a, $J = 6.8$ Hz, $J = 4.1$ Hz), 3.32 (dd, 1H, H-8b, $J = 6.1$ Hz, $J = 4.0$ Hz), 3.20 (dd, 1H, Biotin-NHCHCHalkyl, $J = 8.8$ Hz, $J = 5.4$ Hz), 3.19 (dd, 1H, H-13a, $J = 13.7$ Hz, $J = 6.9$ Hz), 3.16 (dd, 1H, H-17a, $J = 13.7$ Hz, $J = 6.9$ Hz), 3.10 (dd, 1H, H-17b, $J = 13.6$ Hz, $J = 6.5$ Hz), 3.05 (dd, 1H, H-13b, $J = 13.4$ Hz, $J = 7.0$ Hz), 2.90 (dd, 1H, Biotin-NHCHCHHS, $J = 13.0$ Hz, $J = 5.1$ Hz), 2.77 (dd, 1H, H-15a, $J = 14.7$ Hz, $J = 5.3$ Hz), 2.69 (dd, 1H, Biotin-NHCHCHHS, $J = 12.6$ Hz, $J = 4.8$ Hz), 2.68 (dd, 1, H-15b, $J = 14.9$ Hz, $J = 5.8$ Hz), 2.16 (dd, 1H, H-11a, $J = 15.3$ Hz, $J = 7.7$ Hz), 2.12 (dd, 1H, H-11b, $J = 14.9$ Hz, $J = 7.5$ Hz), 1.66 (ddd, 1H, H-18a, $J = 13.8$ Hz, $J = 7.1$ Hz, $J = 6.2$ Hz), 1.64 (dd, 1H, H-19a, $J = 15.3$ Hz, $J = 6.2$ Hz), 1.57 (ddd, 1H, H-18b, $J = 13.3$ Hz, $J = 6.8$ Hz, $J = 6.3$ Hz), 1.55 (dd, 1H, H-19b, $J = 15.5$ Hz, $J = 6.8$ Hz), 1.53 (dd, 1H, H-20a, $J = 14.6$ Hz, $J = 8.2$ Hz), 1.52 (dd, 1H, H-20b, $J = 14.6$ Hz, $J = 8.1$ Hz), 1.34 (dd, 1H, H-14a, $J = 15.1$ Hz, $J = 6.6$ Hz), 1.27 (dd, 1H, H-14b, $J = 15.3$ Hz, $J = 7.0$ Hz) ppm;

¹³C NMR: $\delta = 176.86$ (C-12), 172.58 (C-9), 171.47 (C-16), 168.28 (Aryl-C=O), 165.16 ((NH₂)₂C=O), 149.11 (Aryl-C), 139.43 (Aryl-C), 136.19 (q, CF₃, $J_{CF} =$ Hz), 129.08 (2 Aryl-C), 128.99 (2 Aryl-C), 100.67 (C-1), 84.21 (N=N-CCF₃), 73.78 (C-5), 71.69 (C-2), 71.12 (C-3), 67.74 (C-4), 66.57 (C-6), 62.85 (Biotin-NHCHCHalkyl), 61.92 (manOCH₂CH₂), 61.09 (Biotin-NHCHCH₂S), 56.32 (Biotin-NHCHCHalkyl), 52.34 (C-10), 40.78 (Biotin-NHCHCH₂S), 39.97 (manOCH₂CH₂),

38.47 (C-15), 37.63 (C-13), 37.39 (C-17), 36.50 (C-11), 29.21 (C-14), 29.08 (C-20), 28.79 (C-19), 26.23 (C-18) ppm;

MALDI-TOF-MS: $m/z = 855.3 [M + Na]^+$;

ESI-MS: $m/z = 827.31 [M - N_2 + Na]^+$; $855.31 [M + Na]^+$, (M = 832.85 ber. für $C_{34}H_{47}F_3N_8O_{11}S$);

ESI-HR-MS: $m/z = 855.2969 [M + Na]^+$, (M = 832.8455 ber. für $C_{34}H_{47}F_3N_8O_{11}S$).

7.3 Bestrahlung der synthetisierten photoaktiven

Mannoside

7.3.1 Allgemeine Vorbemerkungen

Für die Umsetzungen der synthetisierten photoaktiven Verbindungen durch Bestrahlung mit UV-Licht ist es notwendig, Licht eines definierten Wellenlängenbereiches, welcher den maximalen Absorptionsbereich der entsprechenden photoaktiven Verbindungen abdeckt, zu verwenden. Die Zufuhr der Bestrahlungsenergie muss in kontrollierter und somit auch in reproduzierbarer Art und Weise erfolgen. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit eine geeignete Bestrahlungsapparatur angefertigt und eingesetzt. Im Kern der entworfenen Bestrahlungsapparatur befindet sich eine von einem Quarzglaskühler umgebene UV-Quecksilberdampflampe der Firma Peschl Consulting in Mainz, die UV-Licht mit einer Leistung von 150 Watt abgibt. Die UV-Lampe sowie der Probenhalter sind von einer Metallbox umschlossen, um Tageslicht von außen abzuschirmen. Der Abstand zwischen Lampe und Probe ist hierbei auf konstant 12 cm eingestellt und zwischen Probe und Lampe können entsprechende Glasfilter (Schott AG) für die erforderlichen Wellenlängenbereiche eingesetzt werden.

Zur Bestrahlung wurde die Probe in GC-Probengläschen (Eydam, Kiel) mit Septum eingefüllt, so dass eine Bestrahlung der einzelnen Proben sowohl in Umgebungsatmosphäre als auch in Inertgas-Atmosphäre möglich war. Als Bestrahlungstemperatur wurde stets Raumtemperatur gewählt; die Bestrahlungen erfolgten zunächst mit Licht der Wellenlängenbereiche $\lambda \geq 305$ nm sowie $\lambda \geq 320$ nm. Zur Einstellung des verwendeten Wellenlängenbereichs wurden spezielle

Glasfilter der Firma Schott in die Bestrahlungsappartur eingebaut, die für die energiereichen Lichtstrahlen unterhalb von 305 nm bzw. 320 nm nicht passierbar sind.

Nachdem sich aus den ersten Bestrahlungsexperimenten jedoch keine Unterschiede der jeweils resultierenden UV-VIS-Spektren ergaben (vgl. Kapitel 4.2.2), erfolgten alle weiteren Bestrahlungen mit UV-Licht des Wellenlängenbereiches $\lambda \geq 320$ nm. Diese Maßnahme wurde getroffen, um die Gefahr der möglichen Zerstörung der später eingesetzten Biomoleküle so gering wie möglich zu halten. Die anschließende massenspektrometrische Analyse der Insertionsprodukte erfolgte auf den folgenden Geräten:

Die Aufnahme der MALDI-TOF-Massenspektren erfolgte entweder wie in Kapitel 6.7.5 beschrieben oder im Arbeitskreis Leippe am Institut für Physiologische Zoologie (Christian Albrecht Universität, Kiel) auf einem 4700 Proteomics Analyzer MALDI-TOF-TOF-Massenspektrometer der Firma Applied Biosystems (siehe Kapitel 6.7.7).

ESI-MS-Massenspektren wurden im Falle der photomarkierten Peptide mit einem 7 Tesla Apex II Massenspektrometer der Firma Bruker in der Arbeitsgruppe PD B. Lindner am Forschungszentrum Borstel gemessen. Ebenso die ESI-FT-ICR-MS/MS-Massenspektren (siehe Kapitel 6.7.6). Alle Massenspektren wurden zur besseren Übersicht im „positiv-Modus“ gemessen. Die Fragmentierungsmuster und die Sequenzanalyse erfolgten mit Hilfe der Online-Suchmasken *ProteinProspector*^[155] und *Prowl*^[178] sowie unter Verwendung der Online-Datenbank SwissProt.^[179]

Zur Vorbereitung der Proben für die massenspektrometrischen Messungen wurden C₁₈-Pipettenspitzen der Firma Millipore für die ZipTipTM-Präparation verwendet. Für die Reinigung biotinylierter Insertionsprodukte wurde eine ICAT-Avidin Affinitätssäule der Firma Applied Biosystems eingesetzt.

7.3.2 Ermittlung der Absorptionsmaxima und der Zerfallsdauer der photoaktiven Substanzen

Folgende Stammlösungen der photoaktiven Mannoside wurden angesetzt:

- | | |
|--|-------------------------|
| a) Diazirin 14 (Kapitel 6.2.1.4): | 0.10 mM in Aqua bidest |
| b) Azid 12 (Kapitel 6.2.1.2): | 0.10 mM in MeOH |
| c) Benzophenon 16 (Kapitel 6.2.1.5): | 0.25 mM in Aqua bidest. |
| d) Biotinyliertes Bep 19 (Kapitel 6.2.2.1): | 0.75 mM in Aqua bidest. |
| e) Biotinyliertes α -Asp 23 (Kapitel 6.2.2.8): | 0.10 mM in Aqua bidest. |
| f) Biotinyliertes β -Asp 26 (Kapitel 6.2.2.13): | 0.10 mM in Aqua bidest. |

Die Absorptionsmaxima der einzelnen Verbindungen wurden mittels UV-VIS-Spektrometrie auf dem in Kapitel 6.1.1 beschriebenen Gerät bestimmt.

Zur Ermittlung der Zerfallsdauer der photoaktiven Mannoside wurden jeweils 2.5 ml der entsprechend vorbereiteten Probelösungen über einen definierten Zeitraum mit UV-Licht der Wellenlänge $\lambda \geq 320$ nm bestrahlt und in regelmäßigen Zeitintervallen von 5 min die Abnahme der Absorptionsmaxima mittels UV-VIS-Spektroskopie bestimmt. Die Bestrahlungszeit, nach der die entsprechenden Absorptionsmaxima jeweils auf Null abgesunken waren, wurde als Dauer des Zerfalls definiert.

Die nach der Bestrahlung gebildeten kovalenten Insertionsprodukte wurden massenspektrometrisch mittels MALDI-TOF-MS oder ESI-MS nachgewiesen:

Die **Bestrahlung des Diazirins 14** in MeOH lieferte das entsprechende kovalente Insertionsprodukt des intermediär erzeugten Carbens mit MeOH:

MALDI-TOF-MS: $m/z = 381.4$ $[M - N_2 + MeOH]^+$, (M = 382.3 ber. für $C_{16}H_{21}F_3O_7$);

ESI-MS: $m/z = 405.12 [M - N_2 + MeOH + Na]^+$.

Die **Bestrahlung des Diazirins 14** in Aqua bidest. lieferte das entsprechende Insertionsprodukt des intermediär erzeugten Carbens mit Wasser:

MALDI-TOF-MS: $m/z = 367.4 [M - N_2 + H_2O]^+$, (M = 368.3 ber. für $C_{15}H_{19}F_3O_7$);

ESI-MS: $m/z = 391.10 [M - N_2 + H_2O + Na]^+$.

Die **Bestrahlung des Azids 12** in MeOH führte zur Bildung des entsprechenden Insertionsproduktes mit MeOH:

ESI-MS: $m/z = 410.17 [M - N_2 + MeOH + Na]^+$, (M = 387.3 ber. für $C_{14}H_{17}F_4NO_7$).

In Aqua dest. bildete sich mit dem Azid **12** kein entsprechendes Insertionsprodukt.

7.3.3 Bestrahlung der synthetisierten photoaktiven Mannoside unter physiologischen Bedingungen

Für die Untersuchung, ob die synthetisierten photoaktiven Mannoside auch unter physiologischen Bedingungen zur Photoaffinitätsmarkierung eingesetzt werden können, wurden zunächst folgende Stammlösungen vorbereitet:

Phosphat-Puffer:	50	mM NaH_2PO_4 Mit 10 % NaOH auf pH 7.4 eingestellt Aqua bidest.
Diazirin 14 :	0.1	mM in Phosphatpuffer pH 7.4
Azid 12 :	0.1	mM in Phosphatpuffer pH 7.4
Benzophenon 16 :	0.1	mM in Phosphatpuffer pH 7.4
Benzophenon 19 :	0.1	mM in Phosphatpuffer pH 7.4
Diazirin 23 :	0.1	mM in Phosphatpuffer pH 7.4
Diazirin 26 :	0.1	mM in Phosphatpuffer pH 7.4

Im Allgemeinen dient PBS-Puffer als generelles Medium für die meisten Proteine bzw. zum Nachstellen physiologischer Bedingungen. Um die spätere massenspektrometrische Analyse jedoch aufgrund der hohen Anzahl an Ionen in PBS-Puffer nicht unnötig zu erschweren, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Natrium-di-hydrogenphosphat-Puffer mit einem pH-Wert von 7.4 eingesetzt, um die physiologischen Bedingungen zu mimikrieren.

Außer dem Azid **12** sind alle anderen photoaktiven Mannoside vollständig im verwendeten Phosphat-Puffer löslich. Die Bestrahlungsdauer der einzelnen Proben ergab sich aus den in Kapitel 6.3.2 ermittelten Zerfallsdauern; für die Diazirin-Derivate jeweils 10 min und für die Benzophenone jeweils 60 min bei RT. Das Probevolumen betrug jeweils 500 μL . Im Anschluss an die Bestrahlung wurden die einzelnen Proben massenspektrometrisch untersucht und die analysierten Produkte sind im Folgenden aufgelistet:

Die **Bestrahlung des Diazirins 14 in Phosphatpuffer** lieferte die folgenden massenspektrometrisch nachweisbaren Produkte:

ESI-MS: $m/z = 142.91$ $[\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{H}]^+$, $m/z = 164.92$ $[\text{Na}_3\text{PO}_4 + \text{H}]^+$, 391.20 $[\text{M} - \text{N}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{Na}]^+$, (M = 378.10 ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_6$).

Die **Bestrahlung des Diazirins 23 in Phosphatpuffer** lieferte die folgenden massenspektrometrisch nachweisbaren Produkte:

ESI-MS: $m/z = 142.91$ $[\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{H}]^+$, $m/z = 164.92$ $[\text{Na}_3\text{PO}_4 + \text{H}]^+$, $m/z = 845.84$ $[\text{M} - \text{N}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{Na}]^+$, (M = 832.84 ber. für $\text{C}_{34}\text{H}_{46}\text{F}_3\text{N}_8\text{O}_{11}\text{S}$).

Die **Bestrahlung des Diazirins 26 in Phosphatpuffer** lieferte die folgenden massenspektrometrisch nachweisbaren Produkte:

ESI-MS: $m/z = 142.91$ $[\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{H}]^+$, $m/z = 164.92$ $[\text{Na}_3\text{PO}_4 + \text{H}]^+$, $m/z = 845.82$ $[\text{M} - \text{N}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{Na}]^+$, (M = 832.84 ber. für $\text{C}_{34}\text{H}_{46}\text{F}_3\text{N}_8\text{O}_{11}\text{S}$).

Die **Bestrahlung des Benzophenons 16 in Phosphatpuffer** lieferte die folgenden massenspektrometrisch nachweisbaren Addukte:

ESI-MS: $m/z = 142.91$ $[\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{H}]^+$, $m/z = 164.92$ $[\text{Na}_3\text{PO}_4 + \text{H}]^+$, $m/z = 454.15$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$, (M = 431.16 ber. für $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{NO}_8$).

Die **Bestrahlung des Benzophenons 19 in Phosphatpuffer** lieferte die folgenden massenspektrometrisch nachweisbaren Addukte:

ESI-MS: $m/z = 142.91$ $[\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{H}]^+$, $m/z = 164.92$ $[\text{Na}_3\text{PO}_4 + \text{H}]^+$, $m/z = 808.33$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$, (M = 785.90 ber. für $\text{C}_{38}\text{H}_{51}\text{N}_5\text{O}_{11}\text{S}$).

7.3.4 Bestrahlung der synthetisierten photoaktiven Mannoside in Gegenwart verschiedener Aminosäuren

Die Bestrahlung der einzelnen Proben erfolgte im Falle des Diazirins **14**, des Benzophenons **16** und des biotinylierten Benzophenons **19** in Aqua bidest., während für das Azid **12** MeOH als entsprechendes LM gewählt wurde, da es in Wasser nahezu unlöslich ist.

Als Gesamtvolumen für die einzelnen zu bestrahlenden Proben wurde 0.5 ml gewählt; die einzelnen photoaktiven Mannoside sowie die verwendeten Aminosäuren wurden in den Verhältnissen 2:1, 1:2, 1:5 und 1:10 eingesetzt. Die Bestrahlungszeiten der einzelnen Proben wurden wie in Kapitel 6.3.2 beschrieben bestimmt und betragen im Falle des Diazirins **14** 10 min, im Falle des Azids **12** 30 min und im Falle der Benzophenon-Derivate **16** und **19** 60 min bei RT. Nach der Photolyse wurden nicht biotinylierte Proben mit ZipTipTM gereinigt bzw. angereichert und anschließend massenspektrometrisch untersucht. Biotinylierte Proben wurden vor der massenspektrometrischen Analyse mit Hilfe einer ICAT-Avidin-Affinitätssäule der Firma Applied Biosystems gereinigt und konzentriert.

Die MALDI-TOF-MS-Analyse lieferte die folgenden Ergebnisse:

Insertionsprodukte, die mit dem Azid 12 gefunden wurden:

MALDI-TOF-MS: $m/z = 709.3$ [$C_{34}H_{36}F_4N_2O_{10} + H$]⁺, kovalentes Insertionsprodukt mit Fmoc-Ile-OH, (M = 708.5 ber. für $C_{34}H_{36}F_4N_2O_{10}$).

Insertionsprodukte, die mit dem Diazirin 14 gefunden wurden:

MALDI-TOF-MS: $m/z = 570.5$ [$C_{24}H_{34}F_3NO_{11} + H$]⁺, kovalentes Insertionsprodukt mit Boc-Thr-OH, (M = 569.5 ber. für $C_{24}H_{34}F_3NO_{11}$);

$m/z = 525.3$ [$C_{21}H_{31}F_3N_4O_8 + H$]⁺, kovalentes Insertionsprodukt mit H-Arg-OH, (M = 524.5 ber. für $C_{21}H_{31}F_3N_4O_8$);

$m/z = 631.4$ [$C_{29}H_{37}F_3N_2O_{10} + H$]⁺, kovalentes Insertionsprodukt mit Z-Lys-OH, (M = 630.6 ber. für $C_{29}H_{37}F_3N_2O_{10}$).

Insertionsprodukte, die mit dem Benzophenon 16 gefunden wurden:

MALDI-TOF-MS: $m/z = 712.8$ [$C_{36}H_{45}N_3O_{12} + H$]⁺, Insertionsprodukt mit Z-Lys-OH, (M = 711.8 ber. für $C_{36}H_{45}N_3O_{12}$).

Insertionsprodukte, die mit dem biotinylierten Benzophenon 19 gefunden wurden:

MALDI-TOF-MS: $m/z = 1067.2$ [$C_{52}H_{71}N_7O_{15}S + H$]⁺, kovalentes Insertionsprodukt mit Z-Lys-OH, (M = 1066.2 ber. für $C_{52}H_{71}N_7O_{15}S$).

7.3.5 Bestrahlung der synthetisierten photoaktiven Mannoside in Gegenwart ausgewählter Modell-Peptide

Als Modell-Peptide wurden Angiotensin II, PTHIKWGD („Peptid MW“) und Pentaglycin gewählt. Um das Potenzial der PALs in Gegenwart verschiedener Peptide zu untersuchen, wurden Probenmischungen mit einem 10fachen Überschuss an Peptid gegenüber den PALs vorbereitet ($c[\text{PAL}] = 0.1 \text{ mM}$, $c[\text{Peptid}] = 1.0 \text{ mM}$). Als Lösungsmittel diente Aqua bidest.; das Gesamtvolumen der jeweiligen Proben betrug 0.5 ml. Die einzelnen Proben wurden mit UV-Licht des definierten Wellenlängenbereiches $\lambda \geq 320 \text{ nm}$ bei RT für folgende Zeit bestrahlt: Diazirin-tragende PAL **14**, **23** und **26** für 10 min, Azid-tragender PAL **12** für 30 min und Benzophenon-tragende PAL **16** und **19** für 60 min.

Für die massenspektrometrische Analyse der gebildeten Insertionsprodukte wurden die einzelnen Proben mit Hilfe spezieller Pipettenaufsätze, welche mit C₁₈-RP-Material gefüllt waren, präpariert und im Anschluss entweder per MALDI-TOF oder ESI-MS vermessen.

Bestrahlung des Azids 12 mit Angiotensin II:

MALDI-TOF-MS: $m/z = 1415.5$ [$\text{C}_{63}\text{H}_{83}\text{F}_4\text{N}_{15}\text{O}_{18} + \text{H}$]⁺, ESI-MS: $m/z = 707.29$, (M = 1414.42 ber. für $\text{C}_{63}\text{H}_{83}\text{F}_4\text{N}_{15}\text{O}_{18}$);

ESI-FT-ICR-MS/MS: $m/z = 1046.51$ [$\text{C}_{63}\text{H}_{83}\text{F}_4\text{N}_{15}\text{O}_{18} - \text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{F}_4\text{N}_2\text{O}_6 + \text{H}$]⁺, 931.46 [y7], 707.30 [$\text{C}_{63}\text{H}_{83}\text{F}_4\text{N}_{15}\text{O}_{18} + 2\text{H}$]²⁺, 669.38 [RVYIH (intern)], 465.74 [y7]²⁺, 263.36 [y₂], 136.40 [Y], 110.42 [H].

Bestrahlung des Azids 12 mit PTHIKWGD:

MALDI-TOF-MS: $m/z = 1309.7$ [$\text{C}_{57}\text{H}_{77}\text{F}_4\text{N}_{13}\text{O}_{18} + \text{H}$]⁺, (M = 1308.3 ber. für $\text{C}_{57}\text{H}_{77}\text{F}_4\text{N}_{13}\text{O}_{18}$).

Bestrahlung des Diazirins 14 mit Angiotensin II:

MALDI-TOF-MS: $m/z = 1397.6$ [$\text{C}_{65}\text{H}_{88}\text{F}_3\text{N}_{13}\text{O}_{18} + \text{H}$]⁺, ESI-MS: $m/z = 698.82$, (M = 1396.47 ber. für $\text{C}_{65}\text{H}_{88}\text{F}_3\text{N}_{13}\text{O}_{18}$);

ESI-FT-ICR-MS/MS: $m/z = 698.82$ [$\text{C}_{65}\text{H}_{88}\text{F}_3\text{N}_{13}\text{O}_{18} + 2\text{H}$]²⁺, 582.34 [VYIHP-28], 323.57 [b₅²⁺], 138.08 [H].

Bestrahlung des Diazirins 14 mit PTHIKWGD:

MALDI-TOF-MS: $m/z = 1326.6$ [$\text{C}_{59}\text{H}_{81}\text{F}_3\text{N}_{12}\text{O}_{18} + \text{Na}$]⁺, (M = 1303.34 ber. für $\text{C}_{59}\text{H}_{81}\text{F}_3\text{N}_{12}\text{O}_{18}$), ESI-MS: $m/z = 671.29$ [$\text{C}_{59}\text{H}_{81}\text{F}_3\text{N}_{12}\text{O}_{18} + \text{K}$]⁺.

Bestrahlung des Benzophenons 16 mit Pentaglycin:

MALDI-TOF-MS: $m/z = 735.8$ [$C_{32}H_{42}N_6O_{14} + H$]⁺, (M = 734.70 ber. für $C_{32}H_{42}N_6O_{14}$).

Bestrahlung des biotinylierten Benzophenons 19 mit Angiotensin II:

MALDI-TOF-MS: $m/z = 1849.2$ [$C_{88}H_{122}N_{18}O_{24}S + H$]⁺, (M = 1848.08 ber. für $C_{88}H_{122}N_{18}O_{24}S$).

7.3.6 Bestrahlung der synthetisierten photoaktiven Mannoside in Gegenwart des bakteriellen Adhäsins FimH

Im Rahmen dieser Arbeit sollten photoaktive α -D-Mannoside synthetisiert werden, die vor allem als Liganden für das bakterielle Adhäsins FimH fungieren sollten, um zur Aufklärung der Kohlenhydrat-Bindungseigenschaften dieses Proteins mittels Photoaffinitätsmarkierung eingesetzt zu werden. Um das Photomarkierungspotenzial der synthetisierten photoaktiven Mannoside **12**, **14**, **16**, **19**, **23** und **26** gegenüber FimH zu untersuchen, wurde das Protein in Gegenwart von jeweils einem dieser sechs Photolabels bestrahlt. Als Kontrollen wurden hierbei sowohl eine Probe mit unbestrahltem Protein als auch eine Probe mit bestrahltem Protein, jedoch ohne Photophor verwendet. Wie bereits im allgemeinen Teil dieser Arbeit erwähnt (Kapitel 4.2.7.1), wurde hier nicht das Protein FimH mit seiner vollständigen Sequenz und Länge verwendet, sondern ein „Teilstück“, das sog. *FimH truncate* (*FimH_{tr}*). Dieses wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe S. D. Knight, Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Molecular Biology, Uppsala (Schweden) zur Verfügung gestellt.

Verwendete Stammlösungen:

<i>FimH truncate</i> :	0.8 mg / mL FimH truncate in PBS-Puffer
Azid 12 :	1.5 mg in 1.0 ml Aqua bidest. / 0.5 ml MeOH (c = 2.61 mM)
Diazirin 14 :	1.8 mg in 1.5 ml Aqua bidest. (c = 3.17 mM)

Benzophenon **16**: 1.7 mg in 1.5 ml Aqua bidest. (c = 2.62 mM)

Benzophenon **19**: 2.6 mg in 1.5 ml Aqua bidest. (c = 2.20 mM)

Diazirin **23**: 1.2 mg in 1.5 ml Aqua bidest. (c = 0.96 mM)

Diazirin **26**: 1.2 mg in 1.5 ml Aqua bidest. (c = 0.96 mM)

Zunächst wurden Probelösungen für die Bestrahlung vorbereitet, wobei das Mengenverhältnis Protein zu Photomarker jeweils 5:1 betrug. Das Gesamtvolumen der einzelnen Proben betrug 500 μL ; die Verdünnung erfolgte stets mit Aqua bidest. Zur Einstellung des Protein-Ligand-Komplexes, in dem sich der entsprechende Ligand in der Bindetasche des Proteins befindet, wurde jede Probe vor der Bestrahlung für 12 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die einzelnen Proben unter Einsatz der in Kapitel 6.3.2 ermittelten Bestrahlungsdauern (Diazirine 10 min, Azid 30 min und Benzophenone 60 min bei $\lambda \geq 320$ nm) in der entwickelten Bestrahlungsapparatur ohne Durchmischung belichtet. Das Protein *FimH_{tr}* ohne Photophor wurde für 20 min bei $\lambda \geq 320$ nm bestrahlt.

Vorbereitete Probelösungen:

Probe 1: 125 μl Protein-Stammlösung (100 μg , 5.62 nmol)

0.40 μl Diazirin-**14**-Stammlösung (0.43 μg , 1.14 nmol)

Aqua bidest.

Probe 2: 125 μl Protein-Stammlösung (100 μg , 5.62 nmol)

0.44 μl Azid-**12**-Stammlösung (0.44 μg , 1.14 nmol)

Aqua bidest.

Probe 3: 125 μl Protein-Stammlösung (100 μg , 5.62 nmol)

1.20 μl Diazirin-**23**-Stammlösung (0.96 μg , 1.15 nmol)

Aqua bidest.

Probe 4: 125 μl Protein-Stammlösung (100 μg , 5.62 nmol)

0.51 μl Benzophenon-**19**-Stammlösung (0.88 μg , 1.12 nmol)

Aqua bidest.

- Probe 5:* 125 µl Protein-Stammlösung (100 µg, 5.62 nmol)
1.20 µl Diazirin-**26**-Stammlösung (0.96 µg, 1.15 nmol)
Aqua bidest.
- Probe 6:* 125 µl Protein-Stammlösung (100 µg, 5.62 nmol)
0.50 µL Benzophenon-**16**-Stammlösung (0.50 µg, 1.15 nmol)
Aqua bidest.
- Probe 7:* 62.5 µl Protein-Stammlösung (50 µg, 2.81 nmol)
Aqua bidest.

Nach der Bestrahlung wurden die einzelnen Proben zunächst massenspektrometrisch auf die Bildung von entsprechenden Insertionsprodukten untersucht. Des Weiteren wurden die Proben auf ein SDS-Gel aufgetragen und aufgetrennt, um im Anschluss proteolytisch verdaut zu werden. Die daraus resultierenden Peptid-Fragmente wurden ebenfalls massenspektrometrisch untersucht, um eventuell Hinweise auf den Ort, an dem die Photomarker gebunden haben, zu erhalten. Vor jeder massenspektrometrischen Messung wurde das Gerät extern mit Protein Calibration Standard II der Firma Bruker Daltonics kalibriert (s. Kapitel 6.7.5).

Im Folgenden sind die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse des photomarkierten Proteins aufgeführt; die Messungen erfolgten alle im Linear-Modus und die gefundenen Massen sind jeweils als „Average-Massen“ angegeben.

Protein FimH truncate (nicht bestrahlt):

MALDI-TOF-MS: $m/z = 17865 [M + H]^+, 8921 [M + 2H]^{2+}$,
(M = 17845 ber. für FimH_{tr});

gemessen im Linearmodus mit einer Auflösung (R) von ~ 550
(4700 Proteomics Analyzer von Applied Biosystems);

MALDI-TOF-MS: $m/z = 17839 [M + H]^+, 8914 [M + 2H]^{2+}$;

gemessen im Linearmodus mit einer Auflösung (R) von ~ 600
(Biflex II Massenspektrometer von Bruker).

MALDI-TOF-MS: $m/z = 17863 [M + H]^+$, $8919 [M + 2H]^{2+}$;
gemessen im Linearmodus mit einer Auflösung (R) von ~ 120
(Biflex III Massenspektrometer von Bruker).

ESI-MS: $m/z = 1785.29 [M + 10H]^{10+}$, $1983.69 [M + 9H]^{9+}$;
Auflösung (R) $\sim 60\,000$
(ESI-FT-ICR Massenspektrometer von Bruker).

Protein FimH truncate (bestrahlt):

MALDI-TOF-MS: $m/z = 35782 [2M + H]^+$, $17867 [M + H]^+$, $8911 [M + 2H]^{2+}$,
 $5929 [M + 3H]^{3+}$, (M = 17845 ber. für FimH_{tr});
Gemessen im Linearmodus mit einer Auflösung (R)
von ~ 250 (Biflex III Massenspektrometer von Bruker);

MALDI-TOF-MS: $m/z = 17865 [M + H]^+$, $8921 [M + 2H]^{2+}$;
gemessen im Linearmodus mit einer Auflösung (R) von ~ 550
(4700 Proteomics Analyzer von Applied Biosystems);

MALDI-TOF-MS: $m/z = 17839 [M + H]^+$, $8914 [M + 2H]^{2+}$;
gemessen im Linearmodus mit einer Auflösung (R) von ~ 600
(Biflex II Massenspektrometer von Bruker);

Protein FimH truncate mit Diazirin 14:

MALDI-TOF-MS: $m/z = 18200 [M + H + C_{15}H_{17}F_3O_6]^+$, $17858 [M + H]^+$,
 $8919 [M + 2H]^{2+}$, (M = 18195 ber. für [FimH_{tr} + C₁₅H₁₇F₃O₆ +
H]⁺)
gemessen im Linearmodus mit einer Auflösung (R) von ~ 550
(4700 Proteomics Analyzer von Applied Biosystems).

Protein FimH truncate mit Azid 12:

MALDI-TOF-MS: $m/z = 18205 [M + H + C_{13}H_{13}F_4NO_6]^+$, $17863 [M + H]^+$,
($M = 18200$ ber. für $[FimH_{tr} + C_{13}H_{13}F_4NO_6 + H]^+$);
gemessen im Linearmodus mit einer Auflösung (R) von
 ~ 1500 (4700 Proteomics Analyzer von Applied Biosystems).

Protein FimH truncate mit Diazirin 23:

MALDI-TOF-MS: $m/z = 18672 [M + H + C_{34}H_{47}F_3N_6O_{12}S]^+$, $17905 [M + H]^+$,
 $8977 [M + 2H]^{2+}$,
($M = 18666$ ber. für $[FimH_{tr} + C_{34}H_{46}F_3N_6O_{12}S + H]^+$);
gemessen im Linearmodus mit einer Auflösung (R) von ~ 600
(Biflex III Massenspektrometer von Bruker).

Protein FimH truncate mit Diazirin 26:

MALDI-TOF-MS: $m/z = 18500 [M + H + C_{34}H_{47}F_3N_6O_{11}S]^+$, $17697 [M + H]^+$,
($M = 18666$ ber. für $[FimH_{tr} + C_{34}H_{46}F_3N_6O_{12}S + H]^+$);
gemessen im Linearmodus mit einer Auflösung (R) von ~ 150
(Biflex III Massenspektrometer von Bruker).

Protein FimH truncate mit Benzophenon 19:

MALDI-TOF-MS: $m/z = 17865 [M + H]^+$, $8923 [M + 2H]^{2+}$,
($M = 18631$ ber. für $[FimH_{tr} + C_{38}H_{51}N_5O_{11}S + H]^+$);
gemessen im Linearmodus mit einer Auflösung (R) von ~ 800
(4700 Proteomics Analyzer von Applied Biosystems).

Protein FimH truncate mit Benzophenon 16:

MALDI-TOF-MS: $m/z = 17799 [M + H]^+$,
($M = 18277$ ber. für $[FimH_{tr} + C_{22}H_{25}NO_8 + H]^+$);
gemessen im Linearmodus mit einer Auflösung (R) von ~ 600

(Biflex III Massenspektrometer von Bruker).

MALDI-TOF-MS: $m/z = 17865 [M + H]^+$, $8921.3 [M + 2H]^{2+}$;
gemessen im Linearmodus mit einer Auflösung (R) von ~ 550
(4700 Proteomics Analyzer von Applied Biosystems);

MALDI-TOF-MS: $m/z = 17839 [M + H]^+$, $8914.1 [M + 2H]^{2+}$;
gemessen im Linearmodus mit einer Auflösung (R) von ~ 600
(Biflex II Massenspektrometer von Bruker).

7.3.7 Bestrahlung der synthetisierten photoaktiven Mannoside in Gegenwart der Mannose-spezifischen Lektine FimCH und Concanavalin A

Um das Potenzial der synthetisierten photoaktiven Mannoside erweiternd im Hinblick auf weitere Mannose-spezifische Lektine zu untersuchen, wurden sowohl der natürlich vorkommende Lektin-Komplex FimCH als auch das Lektin Concanavalin A als sog. „*Target-Proteine*“ eingesetzt. Im Rahmen dieser Markierungs-Experimente galt das Interesse jedoch vorwiegend den Markierungseigenschaften der bifunktionellen Mannoside **19**, **23** und **26**, da hier die Analyse mit Hilfe der Affinitätsfärbung erfolgen konnte. Zur Durchführung dieser Versuchsreihe wurden die Proteine zunächst in Anwesenheit jeweils eines der drei ausgewählten Photolabel bestrahlt und anschließend mittels bioanalytischer Methoden untersucht. Das für diese Studien verwendete Concanavalin A wurde von der Firma Bachem bezogen; der eingesetzte Protein-Komplex FimCH wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe S. D. Knight, Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Molecular Biology, Uppsala (Schweden) gereinigt und zur Verfügung gestellt.

Verwendete Stammlösungen:

FimCH-Stammlösung: 1.0 mg Protein pro mL PBS-Puffer

ConA-Stammlösung: 2.7 mg Protein pro mL PBS-Puffer

Benzophenon **19**: 2.6 mg in 1.5 ml Aqua bidest. (c = 2.20 mM)

Diazirin **23**: 1.2 mg in 1.5 ml Aqua bidest. (c = 0.96 mM)

Diazirin **26**: 1.2 mg in 1.5 ml Aqua bidest. (c = 0.96 mM)

Zunächst wurden Probelösungen für die Bestrahlung vorbereitet, wobei das Mengenverhältnis Protein zu Photolabel jeweils 5:1 betrug. Das Gesamtvolumen der einzelnen Proben betrug für das Protein FimCH jeweils 250 μL und für das Lektin Concanavalin A jeweils 500 μL ; die Verdünnung erfolgte stets mit Aqua bidest.

Zur Einstellung des Protein-Ligand-Komplexes, in dem sich der entsprechende Ligand in der Bindetasche des Proteins befindet, wurde jede Probe vor der Bestrahlung für 12 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die einzelnen Proben unter Einsatz der in Kapitel 6.3.2 ermittelten Bestrahlungsdauern (Diazirine 10 min und Benzophenone 60 min bei $\lambda \geq 320$ nm) in der entwickelten Bestrahlungsapparatur ohne Durchmischung belichtet. Zur Kontrolle wurden Probelösungen der beiden Proteine vorbereitet, die ebenfalls bestrahlt wurden, wobei die Bestrahlungsdauer hierbei 30 min betrug.

Vorbereitete Probelösungen:

FimCH: 100 μL FimCH-Stammlösung (1.82 nmol)

150 μL Aqua bidest.

FimCH + **23**: 100 μL FimCH-Stammlösung (1.82 nmol)

2.0 μL Stammlösung Diazirin **23** (0.36 nmol)

148 μL Aqua bidest.

FimCH + **26**: 100 μL FimCH-Stammlösung (1.82 nmol)

1.9 μL Stammlösung Diazirin **26** (0.36 nmol)

148 μL Aqua bidest.

- ConA: 63 μL ConA-Stammlösung (5.62 nmol)
 437 μL Aqua bidest.
- ConA + **19**: 63 μL ConA-Stammlösung (5.62 nmol)
 4.5 μL Stammlösung Diazirin **26** (1.1 nmol)
 432.5 μL Aqua bidest.
- ConA + **23**: 63 μL ConA-Stammlösung (5.62 nmol)
 12 μL Stammlösung Diazirin **23** (1.1 nmol)
 425 μL Aqua bidest.
- ConA + **26**: 63 μL ConA-Stammlösung (5.62 nmol)
 12 μL Stammlösung Diazirin **26** (1.1 nmol)
 425 μL Aqua bidest.

Die bestrahlten Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 bis -30 °C im Gefrierschrank aufbewahrt. Für die Analyse wurden die Proben per SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (s. Kapitel 6.5) zunächst aufgetrennt, die einzelnen Banden mittels Silberfärbung visualisiert und die Gele anschließend zur Dokumentation eingescannt.

Weiterhin wurden aus den angefertigten Gelen eine Reihe von Banden ausgeschnitten und anschließend einem proteolytischen Verdau mit Trypsin unterzogen (s. Kapitel 6.7.2.). Die daraus resultierenden Proben wurden schließlich massenspektrometrisch untersucht.

7.4 Affinitätschromatographie

7.4.1 Allgemeine Vorbemerkungen

Bei der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Methode der Affinitätschromatographie wurde das Avidin-Biotin-System verwendet. Im Gegensatz zu gängigen Chromatographie-Verfahren (HPLC, MPLC, etc.) bedient sich die Methode der hohen Bindungskonstanten zwischen Biotin und Avidin unter neutralen Bedingungen. Die stationäre Phase ist in diesem Fall mit dem Protein Avidin immobilisiert, während sich die zu reinigenden biotinylierten Substanzen in der mobilen Phase befinden. Durch Variation unterschiedlicher Pufferlösungen ist es möglich, eventuelle Verunreinigungen durch Waschen zu entfernen und die gewünschte biotinylierte Verbindung im Anschluss selektiv zu eluieren.

Daher wurde diese Methode im Rahmen dieser Arbeit zur Reinigung biotinylierter Substanzen sowie zur Isolierung und Aufkonzentration biotinylierter Insertionsprodukte zur Vorbereitung auf die folgende massenspektrometrische Analyse angewendet.

7.4.2 Verwendete Lösungen

Elutionspuffer:	30	% MeCN
	0.4	% TFA
		Aqua bidest.
Beladungspuffer:	20	mM NaH ₂ PO ₄
	300	mM NaCl
		Aqua bidest.
		eingestellt auf pH 7.2
Puffer Waschen 1:	10	mM NaH ₂ PO ₄
	150	mM NaCl
		Aqua bidest.
		eingestellt auf pH 7.2

- 5) Waschen 1: Waschen der Säule mit 1 ml (12 μ l) Affinity-buffer Wash 1 zur Erniedrigung der Salzkonzentration
- 6) Waschen 2: Waschen der Säule mit 1 ml (12 μ l) Affinity-buffer Wash 2 zur Entfernung unspezifisch gebundener Substanzen.
- 7) Waschen 3: Waschen mit 1 ml (12 μ l) Aqua bidest.
- 8) Elution: Spülen der Säule mit 800 μ l (2 x 6 μ l) Affinity-buffer Elute zum Eluieren der gewünschten biotinylierten Substanzen.
- 9) Reinigung der Säule: Spülen der Säule mit 2 ml Affinity-buffer Elute, sowie mit 2 ml Affinity-buffer Storage; Lagerung bei 4 bis 8 °C im Kühlschrank.

Nach diesem Reinigungsschritt wurden die Substanzen entweder bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C bis -30 °C gelagert oder direkt für die massenspektrometrische Analyse präpariert.

7.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

7.5.1 Allgemeines

Mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese können Peptide und Proteine im elektrischen Feld nach ihrer Größe getrennt werden. Abhängig vom jeweils aufzutrennenden Massenbereich existieren verschiedene Arten von Gelen mit wiederum unterschiedlicher Zusammensetzung. Durch die Verwendung von SDS als

Detergenz erfolgte die Trennung der Proteine aufgrund des konstanten Masse- / Ladungsverhältnisses ausschließlich nach der Größe der Proteine. Idealerweise sind alle Proteine gleichförmig denaturiert, daher entspricht die Trennung nach der Größe in diesem Fall einer Trennung nach der Masse.

Die am weitesten verbreitete Methode ist die SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli^[180]; hierbei wird ein Tris-Glycin-Puffersystem mit SDS als Detergenz verwendet. Für die Auftrennung der Proteine, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, kamen überwiegend Tris-Glycin-Fertiggele (Anamed, Darmstadt) zum Einsatz, die einen Acrylamid-Gehalt von 16 % bzw. einen Acrylamid-Gradienten von 10-20 % enthielten.

Die in dieser Arbeit untersuchten Modell-Peptide wurden anhand der Methode nach Schägger^[181] unter Verwendung von Tris-Tricin-Gelen mit einem Acrylamid-Gehalt von 10 % getrennt. Durch das hierbei eingesetzte variable Puffersystem ist es möglich, eine feinere Auftrennung der Peptide im kleineren Molmassen-Bereich (ab 1000 Da) zu erreichen.

7.5.2 SDS-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Proteinen nach Laemmli^[180]

Mit dieser Methode wurden hauptsächlich Proteine im Massenbereich 15 bis 50 kDa aufgetrennt. Die einzelnen, durch Anfärben detektierten Banden wurden im Anschluss an die Färbung ausgeschnitten und die darin enthaltenen Proteine einem proteolytischen Verdau unterzogen.

7.5.2.1 Verwendete Pufferlösungen

Auftragspuffer für die Proben:	62.5	mM Tris-HCl
	4.0	% (w/v) SDS
	20.0	% (w/v) Glycerin
	5.0	% (v/v) Mercaptoethanol
	0.025	% (w/v) Bromphenolblau
		Aqua bidest.

Laufpuffer für die Gele: 190 mM Glycin
 50 mM Tris-HCl
 0.1 % (w/v) SDS
 Aqua bidest.

7.5.2.2 Durchführung der Gelelektrophorese

Die Vorbereitung der einzelnen Proben erfolgte durch Zugabe von Auftragspuffer, anschließendem Denaturieren bei 95°C für 5 min. und das Eintragen in die Geltaschen mit Hilfe einer Hamilton-Spritze. Spur 1 und Spur 6 wurden dabei mit jeweils 8 µl des entsprechenden Größenstandards (Prestained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas) beschickt. Die übrigen Geltaschen wurden mit den Probelösungen in Mengen zwischen 10 und 20 µl pro Tasche beschickt. Die Menge der jeweiligen Proteine lag hierbei jeweils zwischen 2 und 7 µg.

Beim Einlaufen der Proteine in das Sammelgel ist eine Spannung von 100 V angelegt worden, die beim Eintritt der Lauffront in das Trenngel kontinuierlich über 150 V, 200 V bis 250 V erhöht wurde.

Der Lauf wurde bei Austritt der Bromphenolfront abgestoppt und das Gel entweder gefärbt oder geblottet (siehe Kapitel 6.5.4 und Kapitel 6.6.2).



Abb. 6.1. Prestained Protein Molecular Weight Marker;
für Coomassie- und Silberfärbung (Fermentas).

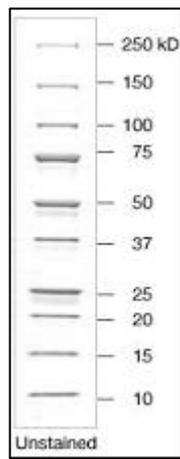


Abb. 6.2. SilverStain-Standard für Tris-Glycin-Gele (BioRad).

7.5.3 SDS-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Proteinen nach Schagger^[181]

7.5.3.1 Verwendete Pufferlösungen

Auftragspuffer für die Proben:

4	% (w/v) SDS
12	% (w/v) Glycerin
2	% (v/v) Mercaptoethanol
50	mM Tris-HCl
0.01	% Serva Blue G

Aqua bidest.

Mit HCl auf pH 6.8 einstellen

Kathodenpuffer für die Gele:

0.1	M Tris-HCl
0.1	M Tricin
0.1	% (w/v) SDS

Aqua bidest.
pH 8.2

Anodenpuffer für die Gele:

0.2	M Tris-HCl
-----	------------

Aqua bidest.
Einstellen mit HCl p. a. auf pH 8.9

7.5.4 Färbemethoden zur Visualisierung der Proteinbanden in SDS-Gelen

Zur Visualisierung der einzelnen Peptid- oder Protein-Banden nach der Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel existieren verschiedene Möglichkeiten der Anfärbung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Färbemethoden, die Coomassie-Färbung und die Silberfärbung, angewendet.

7.5.4.1. Coomassie-Färbung (modifiziert nach Burnette, 1981)^[182]

Die Coomassie-Färbung ist eine häufig durchgeführte Färbemethode von Proteinen, die im Polyacrylamid-Gel aufgetrennt wurden. Der Farbstoff bindet stöchiometrisch an Proteine, wodurch die relative Menge an Protein im Gel leicht zu bestimmen ist. Die Färbemethode ist weniger sensitiv als die Silberfärbung, aber sie besitzt einen höheren dynamischen Bereich, was Quantifizierungen der einzelnen Proteine ermöglicht. Außerdem stellt die Methode eine Endpunktsfärbung dar, d.h. nach einer bestimmten Färbezeit ist eine Sättigung der Färbung erreicht, und sie kann somit leicht reproduziert werden. Während des Färbevorgangs mit dem Coomassie-Farbstoff werden die Proteine zusätzlich im Gel fixiert. Im Folgenden sind die eingesetzten Reagenzien und die Durchführung der Färbung beschrieben.

Verwendete Reagenzien:

Färbelösung:	0.25	% Coomassie Brilliant Blau R 250
	45	% EtOH
	5	% AcOH
Entfärbelösung:	45	% EtOH
	5	% HOAc

Durchführung der Färbung:

Direkt nach der Elektrophorese wurden die Gele in die Färbelösung gegeben und durch kontinuierliches Schütteln für 30 bis 60 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden sie durch mehrmaligen Wechsel der Entfärbelösung bis zum Sichtbarwerden der Banden und gewünschter Intensität bei RT entfärbt und durch Scannen dokumentiert.

7.5.4.2 Silberfärbung (modifiziert nach Blum, 1987)^[183]

Die Silberfärbung ist eine der sensitivsten Methoden zur Detektion von Peptiden und Proteinen in Gelen. Bereits Mengen von 1 bis 5 ng pro Bande können hier erkannt werden. Vor dem eigentlichen Färbe-Vorgang müssen die Proteine im Gel fixiert werden, um eine Diffusion der Moleküle aus dem Gel, was zu einer Fehlfärbung führen würde, zu verhindern.

Sind die Proteine im Gel fixiert, dann sind die an der Geloberfläche lokalisierten Aminosäureseitenketten, die mit reduzierenden Gruppen ausgestattet sind, in der Lage, Silberionen zu elementarem Silber zu reduzieren. Diese so entstehenden Silberkeime werden im Anschluss entwickelt und die einzelnen Proteinbanden erscheinen grau-braun gefärbt.

Verwendete Reagenzien und die einzelnen Arbeitsschritte sind im Folgenden aufgeführt:

Verwendete Reagenzien:

Fixierlösung: 50 % (v/v) EtOH
 12 % (v/v) HOAc

Waschlösung I: 50 %
 Aqua bidest.

Waschlösung II: Aqua bidest.

- Imprägnierlösung: 0.02 % (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$
Aqua bidest.
- Färbelösung: 0.2 % (w/v) AgNO_3
0.05 % (v/v) Formaldehyd
Aqua bidest.
- Entwicklerlösung: 6 % (w/v) Na_2CO_3
0.05 % (v/v) Formaldehyd
Aqua bidest.

Durchführung der Färbung:

1) Fixieren:

Das Polyacrylamid-Gel wurde mind. 60 min bei RT in Fixierlösung geschüttelt.

2) Waschen I:

Das Gel wurde zweimal für je 20 min in Waschlösung I bei RT geschüttelt.

3) Waschen II:

Das Gel wurde dreimal je 10 sec bei RT in Aqua bidest. geschüttelt.

4) Imprägnieren:

Das Gel wurde 1 min bei RT in Imprägnierlösung geschüttelt.

5) Waschen II:

Das Gel wurde dreimal je 10 sec in Aqua bidest. bei RT geschüttelt.

6) Färben:

Das Gel wurde 20 min bei RT in Färbelösung geschüttelt.

7) Waschen II:

Das Gel wurde dreimal je 10 sec bei RT in Aqua bidest. geschüttelt.

8) Entwickeln:

Das Gel wurde bis zur gewünschten Färbeintensität bei RT in Entwicklerlösung geschüttelt.

9) Waschen II:

Das Gel wurde dreimal für je 10 sec in Aqua bidest. geschüttelt.

10) Abstoppen:

Zum Abstoppen des Färbvorgangs wurde das Gel für 20 min in Fixierlösung bei RT geschüttelt.

Das gefärbte Gel wird durch Scannen dokumentiert.

Die Nachteile dieser äußerst sensitiven Methode bestehen zum einen darin, dass sich die Reproduzierbarkeit durch die Vielzahl der einzelnen Arbeitsschritte schwierig gestaltet. Zum anderen ergeben sich Unterschiede in der Färbeintensität verschiedener Proteine trotz gleicher Konzentration, da nur an der Geloberfläche befindliche reduzierende Elemente detektiert werden. Weiterhin ist auch eine Linearität der Färbeintensität eines Proteins in unterschiedlichen Konzentrationen nicht immer gewährleistet.

7.6 Immunchemische Methoden

7.6.1 Dot-Immunoassay (Dot Blot)

7.6.1.1 Allgemeine Vorbemerkungen

Der hochempfindliche Nachweis von Proteinen ist mit Hilfe der Affinitätsfärbung möglich. Der Vorteil hierbei besteht darin, dass ein spezifischer Nachweis des gewünschten Proteins direkt aus der vorliegenden Probe, d.h. ohne vorheriges Auftrennen im SDS-Gel, erfolgen kann. Die Konzentration des entsprechenden Proteins kann hierbei semi-quantitativ bestimmt werden. Für die Erstellung eines Dot-Immunoassays wird eine bestimmte Menge einer Protein- haltigen Probe (ng-Bereich) auf eine Nitrocellulose-Membran aufgebracht. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wird die Membran anschließend mit einer BSA-Lösung geblockt und im Folgenden mit Hilfe des Streptavidin-HRP-Systems detektiert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte der Dot Blot zum Nachweis biotinylierter Proteine dienen, daher wurde als Detektionssystem ein Streptavidin-HRP-Konjugat in Verbindung mit dem Farbstoff 3,3'-Diaminobenzidin verwendet.

7.6.1.2 Verwendete Reagenzien

TBST-Puffer: 10 mM Tris-HCl
 150 mM NaCl
 0.05 % Tween 20
 Aqua bidest.

Fixierlösung: 2 % TCA
 in Aqua bidest.

Blocklösung: 2 % BSA
 in TBST-Puffer

Inkubationslösung: Streptavidin-HRP-Konjugat
 1:500 in TBST-Puffer

Färbelösung: 1 DAB-Puffertablette (3,3' - Diaminobenzidin)
 1 Harnstoff-Tablette
 Aqua bidest.

7.6.1.3 Experimentelle Durchführung des Dot-Immunoassays

Ein Streifen einer Nitrocellulose-Membran wurde auf ein Stück Whatman-Papier gelegt und jeweils 2 μ l der entsprechenden Probelösungen punktförmig auf entsprechend gekennzeichnete Bereiche aufgetragen. Im Folgenden ist der genaue Ablauf der Dot Blot-Affinitätsfärbung tabellarisch aufgeführt.

Fixieren: die aufgetragenen Probespots werden durch 30 min Schwenken der Membran bei RT in Fixierlösung auf der Nitrocellulose-Membran fixiert.

Waschen: 3 x 5 min mit TBST-Puffer bei RT

Blocken: 30 min mit 2% BSA-Lösung in TBST-Puffer bei RT

Waschen: 3 x 5 min in TBST-Puffer bei RT

Inkubieren: 30 min mit Streptavidin-HRP-Konjugat (1:500 in TBST-Puffer) bei RT

Waschen: 3 x 5 min in TBST-Puffer

Färben: 5-6 min mit 3,3'-Diaminobenzidin-Puffertablette in Aqua bidest. bei RT

Anschließend war es möglich, die biotinylierten Proteine durch Anfärbung zu identifizieren und die Blots wurden nach vollständiger Trocknung zur Dokumentation eingescannt.

7.6.2 Western Blot^[184]

7.6.2.1 Allgemeine Vorbemerkungen

Der Western Blot umfasst den Elektrotransfer von Proteinen. Meist werden die entsprechenden Proteine vorher in einem SDS-Gel aufgetrennt und anschließend mittels Immunfärbung detektiert. Im Allgemeinen folgt die Technik des Western Blottings den Prinzipien des Dot-Immunoassays, nur werden hierbei die entsprechenden Proteine, die vorher in einem Polyacrylamid aufgetrennt wurden, durch das sog. „Semidry-Verfahren“ aus dem Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch auf eine NC-Membran übertragen. Nach entsprechender Fixierung der transferierten Proteine, können diese durch unterschiedliche Färbemethoden sichtbar gemacht werden.

7.6.2.2 Experimentelle Durchführung des Western Blots

Verwendete Puffer:

Kathodenpuffer:	25	mM Tris-HCl
	40	mM ϵ -Aminocapronsäure
	0.01	% (w/v) SDS
	20	% (v/v) MeOH
Anodenpuffer I:	300	mM Tris-HCl
	20	% (v/v) MeOH
Anodenpuffer II:	25	mM Tris-HCl
	20	% (v/v) MeOH
Ponceau S-Lösung:	0.2	% (w/v) Ponceau S
	2	% (w/v) TCA

Durchführung des Western Blots:

Zunächst wurden die Proteine mit Hilfe eines Polyacrylamid-Geles nach ihrer Größe aufgetrennt (Kapitel 6.5.2). Zur Vorbereitung des Elektroblobs wurden 7 *Gelblotting paper* und die jeweilige Membran in der Größe des Trenngeles ausgeschnitten. Trockene NC-Membran war vor allen Arbeitsschritten mit MeOH zu benetzen. Von den Papieren wurden 3 mit Kathodenpuffer und jeweils 2 mit Anodenpuffer I und II getränkt. Die Membranen wurden 10 sec in Anodenpuffer II inkubiert. Unmittelbar nach der gelektrophoretischen Trennung der Proteine wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel mit Aqua bidest. abgespült. Die einzelnen Komponenten wurden in folgender Reihenfolge exakt von unten (Anode) nach oben (Kathode) in der Elektroblob-Apparatur übereinander so angeordnet, dass ein Einschluss von Luftblasen unbedingt vermieden wurde: 2 x *Gelblotting paper* Anodenpuffer I, 2 x *Gelblotting paper* Anodenpuffer II, Nitrocellulose-Membran, Polyacrylamid-Gel und 3 x *Gelblotting paper* Kathodenpuffer. Es war ebenso darauf zu achten, dass bei der Übertragung die Proteine auf dem Träger in derselben geometrische Anordnung

erscheinen, wie sie nach dem Auftrennen im Gel vorlagen. Nach Verschließen der Apparatur wurde für den Proteintransfer eine Spannung von 20 V für die Dauer von 60 min angelegt.

Im Anschluss an den Blot wurde die Nitrocellulose-Membran getrocknet und danach bei RT für 10 min unter leichtem Schütteln in Ponceau S-Lösung inkubiert. Zum Hervorheben der gefärbten Banden wurde die Membran mit Aqua bidest. bis zur gewünschten Färbeintensität entfärbt, getrocknet und zur Dokumentation eingescannt.

Die Ponceau S-Färbung ist ein reversibler Vorgang, so dass eine vollständige Entfärbung der Nitrocellulose-Membran für die nachfolgende Affinitätsfärbung durch mehrmaliges Schütteln mit Aqua bidest. erreicht werden konnte.

7.6.3 Immunchemische Färbung ^[185]

Mit Hilfe der Immunfärbung werden einzelne Proteine auf einer Nitrocellulose- oder PVDF-Membran mit Antikörpern und einer anschließenden charakteristischen Farbreaktion spezifisch detektiert.

7.6.3.1 Verwendete Reagenzien

TBST-Puffer: 10 mM Tris-HCl
 150 mM NaCl
 0.05 % Tween
 Aqua bidest.

Blocklösung: 2% BSA in TBST-Puffer

Inkubationslösung: 1:500 Streptavidin-HRP-Konjugat
 in TBST-Puffer

Färbelösung: 3,3'-Diaminobenzidin-Puffertablette
 in Aqua bidest.

7.6.3.2 Durchführung der Immunfärbung

Die direkt nach dem Elektrotransfer durchgeführte unspezifische Ponceau S-Färbung dient gleichzeitig der Fixierung der Proteine auf der NC-Membran. Für die folgende spezifische Immunfärbung der biotinylierten Proteine müssen die Ponceau S gefärbten Protein-Banden zunächst wieder durch wiederholtes Schwenken mit Aqua bidest. entfärbt werden. Nach Entfärben der Protein-Banden wurden die nächsten Arbeitsschritte nach folgendem tabellarisch aufgeführten Protokoll durchgeführt:

Vorgehen bei der Durchführung der Affinitätsfärbung nach Elektrotransfer

Färben I / Fixieren: Schwenken der Membran in Ponceau S-Färbelösung

Entfärben: Schwenken der gefärbten Membran in Aqua bidest. bis zur gewünschten Banden-Intensität

Zur Dokumentation werden die getrockneten Membranen eingescannt.

Waschen I: Schwenken der Membran in Aqua bidest. bis zur vollständigen Entfärbung der Ponceau S-Banden

Waschen II: 3 x 5 min mit TBST-Puffer bei RT

Blocken: 30 min mit 2 % BSA-Lösung in TBST-Puffer bei RT

Waschen III: 3 x 5 min mit TBST-Puffer bei RT

Inkubieren: 30 min mit Streptavidin-HRP-Konjugat (1:500 in TBST-Puffer) bei RT

Waschen IV: 3 x 5 min mit TBST-Puffer bei RT

Färben: 5-6 min mit 3,3'-Diaminobenzidin-Puffertablette in Aqua bidest. bei RT

Die getrockneten Membranen wurden zur Dokumentation eingescannt.

7.7 Methoden für die massenspektrometrische Analyse

7.7.1 Allgemeines

Für die massenspektrometrische Analyse von Biomolekülen existiert eine Vielzahl an Methoden, um die zu untersuchenden Proben für die Messung vorzubereiten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl Proteine im Massenbereich um 20 kDa, als auch Peptide und Peptidfragmente des Massenbereichs 1 bis 10 kDa vermessen, wobei in Abhängigkeit der jeweils vorliegenden Massen eine geeignete Präparations-Methode gewählt wurde. Im Folgenden sind die angewendeten Präparationen bezüglich ihrer experimentellen Durchführung beschrieben.

7.7.2 Proteolytischer Verdau im Gel^[186]

7.7.2.1 Allgemeines

Nach der Auftrennung der zu untersuchenden Proteine durch SDS-Gelelektrophorese und Anfärben der einzelnen Banden wurden einzelne Banden ausgewählt, die massenspektrometrisch analysiert werden sollten. Hierbei lag das Interesse vorwiegend auf der Ermittlung der Position, an welcher die einzelnen photoaktiven Mannoside an das entsprechende Protein gebunden hatten. Dazu mussten die ausgewählten Proteine zunächst einmal aus dem Gel herausgelöst und in kleinere Peptidfragmente gespalten werden, damit eine massenspektrometrische Analyse hinsichtlich der genannten Fragestellung möglich war.

Um dies zu erreichen, wurden die ausgewählten Proteinbanden aus dem Gel ausgeschnitten und einem proteolytischen Verdau unterzogen. Für den Verdau wurden die drei unterschiedlich „schneidenden“ Enzyme Trypsin, Endoproteinase Glu-C und Chymotrypsin eingesetzt. Im Folgenden sind die einzelnen Arbeitsschritte zur Durchführung des Verdaus aufgelistet und beschrieben.

7.7.2.2 *Verwendete Proteasen*

Trypsin: Sequencing Grade modified Trypsin (aus Schwein, Promega)

Glu-C: Sequencing Grade (aus Staphylococcus aureus V8,
Roche Diagnostics)

Chymotrypsin: Sequencing Grade (aus Schweine-Pankreas,
Roche Diagnostics)

7.7.2.3 *Verwendete Hydrolyse-Puffer*

Trypsin-Puffer: 50 mM NH_4HCO_3
Aqua bidest.

Glu-C-Puffer: 100 mM Na_2HPO_4
Aqua bidest.

Chymotrypsin-Puffer: 100 mM NH_4HCO_3
Aqua bidest.

7.7.2.4 *Allgemein verwendete Reagenzien*

Waschlösung 1: Aqua bidest.

Waschlösung 2: 50 % (v/v) Acetonitril / Aqua bidest.

Waschlösung 3: 100 % Acetonitril (gradient grade)

Resuspensions-Puffer: 1 mM HCl (Chymotrypsin)

Resuspensions-Puffer: 50 mM AcOH (Trypsin)

Abstopp-Lösung: 0.2 % (v/v) TFA in Aqua bidest.

7.7.2.5 Präparation der einzelnen Proteasen

Trypsin

25 µg Trypsin wurden in 100 µl 50 mM Essigsäure gelöst und in Aliquots zu 10 µl aufgeteilt. Diese wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -20 bis -30 °C gelagert. Zur Aktivierung wurde ein 10 µl Aliquot mit 300 µl 50 mM NH₄HCO₃-Puffer verdünnt und davon jeweils 10 bis 40 µl für den Verdau entnommen. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 16 h.

Glu-C

25 µg Endoproteinase Glu-C wurden in 100 µl Aqua bidest. gelöst und in 10 Aliquots á 10 µl aufgeteilt; diese wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20 bis -30 °C gelagert. Zur Aktivierung wurde ein 10 µl Aliquot in 300 µl 100 mM Na₂HPO₄-Puffer gelöst und davon jeweils 10 bis 40 µl pro Verdau eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 16 h.

Chymotrypsin

25 µg Chymotrypsin wurden in 100 µl 1 mM HCl gelöst und in 10 Aliquots á 10 µl aufgeteilt; die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20 bis -30 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Zur Aktivierung wurde ein 10 µl Aliquot in 300 µl 100 mM NH₄HCO₃-Puffer gelöst und davon jeweils 10 bis 40 µl pro Verdau verwendet. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 16 h.

7.7.2.6 Protokoll für den proteolytischen Verdau von Proteinen aus dem SDS-Gel (Coomassie-Färbung)

Nach dem Ausschneiden der einzelnen Proteinbanden aus den entsprechenden Gelen mit Hilfe eines Skalpells und Überführen in saubere Eppendorf Reaktionsgefäße wurden die Gel-Stücke auf folgende Weise behandelt:

- Waschen I: Die Gel-Stücke wurden jeweils mit 100 µl Aqua bidest. versetzt und für 15 min geschüttelt; der Überstand wurde abgenommen.
- Waschen II: Die Gel-Stücke wurden mit 100 µl Aqua bidest. versetzt und für 15 min geschüttelt; der Überstand wurde abgenommen.
- Waschen III: Die Gel-Stücke wurden mit 100 µl 50 % MeCN / Aqua bidest. versetzt und 15 min geschüttelt; der Überstand wurde abgenommen.
- Dehydratisieren: Die Gel-Stücke wurden mit 100 µl 100 % MeCN versetzt und für 15 min geschüttelt; der Überstand wurde abgenommen.
- Trocknen: Die Gel-Stücke wurden 15 min getrocknet.
- Inkubation: Die Gel-Stücke wurden jeweils mit 10 bis 40 µl der vorher präparierten Protease-Lösung versetzt und für 16 h bei 37 °C inkubiert.

Nach der proteolytischen Spaltung befinden sich die Peptidfragmente vorwiegend im Gel-Stück, und der pH-Wert liegt noch im schwach basischen Bereich, was für die nachfolgende Analyse nicht optimal ist. Daher wurden die Proben zum vollständigen Abbruch des Verdau und zum Einstellen des optimalen pH-Wertes jeweils mit 10

bis 40 µl 0.2 % aqu. TFA versetzt und für 60 min bei RT auf einem Vortexer geschüttelt. Die Proben wurden entweder in flüssigem Stickstoff eingefroren und danach bei -20 °C bis -30 °C im Gefrierschrank gelagert oder direkt für die MALDI-TOF-MS Analyse vorbereitet.

7.7.2.7 Protokoll für den proteolytischen Verdau von Proteinen aus dem SDS-Gel (Silber-Färbung)

Der proteolytische Verdau aus silber-gefärbten Gelen wurde nur unter Verwendung von Trypsin durchgeführt, da die Fragmentierung hierbei am eindeutigsten und daher am aussagekräftigsten war.

Verwendete Lösungen und Reagenzien:

Entfärbelösungen: a) Ag-Destain I (10 mg $K_3Fe(CN)_6$ in 1ml Aqua bidest.)
b) Ag-Destain II (25 mg $Na_2S_2O_3$ in 1 ml Aqua bidest.);
beide kurz vor Gebrauch 1:1 mischen

Waschlösung I: Aqua bidest.

Waschlösung II: 50 % Acetonitril (HPLC gradient grade) in Aqua bidest.

Waschlösung III: 100 % Acetonitril (HPLC gradient grade)

Durchführung:

Entfärben: die entsprechenden Gel-Stücke wurden mit je 50 µl der frisch angesetzten Entfärbelösung versetzt und für 10 min bei RT kräftig geschüttelt.

Entfärbung Stop: die Gel-Stücke wurden mit je 250 µl Aqua bidest. versetzt und für 10 min bei RT kräftig geschüttelt.

- Waschen I: die Gel-Stücke wurden mit je 250 μ l Aqua bidest. versetzt und bei RT für 20 min kräftig geschüttelt.
- Waschen II: die Gel-Stücke wurden mit je 100 μ l Waschlösung II versetzt und für 30 min bei RT kräftig geschüttelt.
- Dehydratisierung: Pro Gel-Stück wurden 100 μ l Waschlösung III hinzugegeben und für 5 min kräftig bei RT geschüttelt; die Gel-Stücke wurden anschließend getrocknet.
- Inkubation: Jedes Gel-Stück wurde mit je 15-25 μ l Trypsin-Lösung (siehe oben) versetzt und für 16 h bei 37°C inkubiert.
- Abstoppen: Jede Probe wurde mit 15-25 μ l 0.2 % aqu. TFA-Lösung versetzt und bei RT für 60 min kräftig geschüttelt.

Die Proben wurden im Anschluss entweder bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -20 bis -30°C gelagert oder direkt für die massenspektrometrische Analyse präpariert.

7.7.3 Direkter proteolytischer Verdau mit Trypsin

Ein proteolytischer Verdau kann auch direkt aus der Lösung durchgeführt werden, ohne die entsprechenden Proteine vorher auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufzutrennen. Dies kann dann von Vorteil sein, wenn die auf das Gel aufgetragenen Mengen an Protein nicht ausreichen, um eine vollständige enzymatische Spaltung zu erreichen. Die Arbeitsschritte zur Durchführung des tryptischen Verdaus in Lösung sind im Folgenden beschrieben.

Verwendete Lösungen

- Denaturierungs-Puffer: 6 M Harnstoff
50 mM Tris-HCl (pH 8)
Aqua bidest.

Resuspensions-Puffer: 50 mM AcOH

Hydrolyse-Puffer: 50 mM NH₄HCO₃
Aqua bidest.

Abstopp-Lösung: 0.2 % (v/v) TFA in Aqua bidest.

Durchführung des tryptischen Verdaus in Lösung

Denaturierung: 25 µL Protein-Stammlösung (FimH, s. Kapitel 4.3.6) wurden in 25 µL Denaturierungs-Puffer gelöst und für 20 min bei 95°C inkubiert.

Verdünnung: Nach Abkühlen auf RT wurden die Proben jeweils mit 125 µL Hydrolyse-Puffer versetzt, um die Harnstoff-Konzentration herabzusetzen.

Inkubation: Die Proben wurden jeweils mit 30 µL präparierter Trypsin-Lösung (s. Kapitel 4.7.2.5) versetzt, geschüttelt und bei 37°C für 18 h inkubiert.

Abstoppen: Zum Abstoppen des Verdaus wurden die Proben jeweils mit 50 µL 0.2 % aqu. TFA versetzt und für 1h stark geschüttelt.

Die Proben wurden entweder bis zur weiteren Verarbeitung in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20 bis -30°C im Gefrierschrank gelagert oder direkt mittels ZipTip™-Präparation (s. Kapitel 6.7.4) für die massenspektrometrische Analyse vorbereitet.

7.7.4 Probenvorbereitung mit ZipTipTM^[187]

Die Anwendung eines ZipTipTM-Protokolls (Millipore) ermöglicht das Aufkonzentrieren der zu analysierenden Peptide, die zusätzlich entsalzt wurden, um ein optimales Signal-Rausch-Verhältnis im MS-Spektrum zu gewährleisten. Dieser Reinigungsschritt kann sowohl mit C₁₈-RP-Material oder auch mit C₄-RP-Material, welches sich jeweils am Auslass einer Pipettenspitze befindet, erreicht werden. Das Volumen der Pipettenspitze beträgt etwa 0.5 bis 1.0 µl.

Verwendete Lösungen

ZipTip TM -Wetting-Lösung:	100 % (v/v) Acetonitril (HPLC grade)
ZipTip TM -Equilibrating-Lösung:	0.1 % (v/v) TFA Aqua bidest.
ZipTip TM -Wash-Lösung:	5 % (v/v) MeOH 0.1 % TFA Aqua bidest.
ZipTip TM -Eluting-Lösung:	0.1 % (v/v) TFA 50 % (v/v) Acetonitril (HPLC grade) Aqua bidest.
Matrix-Stammlösung:	α-Cyano-4-hydroxymethylsäure ges. in 33 % (v/v) Acetonitril (HPLC grade) 0.1 % (v/v) TFA Aqua bidest.

Matrix-Arbeitslösung:	50	% (v/v) Matrix-Stammlösung
	33	% (v/v) Acetonitril (HPLC grade)
	0.1	% (v/v) TFA
		Aqua bidest.

Im Folgenden sind die Arbeitsschritte für die Reinigung der Peptide und Proteine aufgeführt; das Protokoll bezieht sich sowohl auf C₁₈-RP- als auch auf C₄-RP-Material. Für die ZipTipTM-Prozedur wurde an der Pipette ein Volumen von 10.5 µL eingestellt.

Aktivierung: 10.5 µL Wetting-Lösung aufziehen und verwerfen; Vorgang wiederholen.

Equilibrierung: 10.5 µL Equilibrating-Lösung aufziehen und verwerfen; Vorgang wiederholen.

Proben-Aufnahme: durch 10-20maliges Auf- und Abziehen der Pipette in der Probelösung gelangt die Probe auf das RP-Material.

Waschen: dreimaliges Aufziehen und Verwerfen von 10.5 µL Wasch-Lösung zum Entsalzen der Proben.

Elution: Die Proben wurden direkt durch Aufziehen von 2 µL Matrix-Arbeitslösung und fünfmaliges Auf- und Abziehen direkt auf die MALDI-Probenteller eluiert.

7.7.5 Probenvorbereitung für MALDI-TOF-Messungen

Für die MALDI-Analysen ist es erforderlich, eine kokristalline Schicht aus Analyt- und Matrix-Bestandteilen zu erzeugen. Dies wird durch Mischen von jeweils wässrig-organischen Lösungsmitteln erreicht. Nach Verdampfen des Lösungsmittels bleibt eine kokristalline Schicht zurück. Um - abgestimmt auf die jeweilige Probe -

ein optimales Kristallwachstum zu erreichen, wurden unterschiedliche Matrix-Lösungen angewendet, die im Folgenden aufgeführt sind:

Matrix-Lösung I:	α -Cyano-4-hydroxymizimtsäure ges. in
	33 % (v/v) Acetonitril (HPLC grade)
	0.1 % (v/v) TFA
	Aqua bidest.
Matrix-Lösung II:	50 % (v/v) Matrix-Stammlösung
	33 % (v/v) Acetonitril (HPLC grade)
	0.1 % (v/v) TFA
	Aqua bidest.
Matrix-Lösung III:	Sinapinsäure ges. in
	Aceton (p.a.)
Kalibriersubstanz Peptide:	Peptide Calibration Standard (Bruker Daltonics)
	Angiotensin II ($[M + H]^+ = 1046.5418$)
	Angiotensin I ($[M + H]^+ = 1296.6848$)
	Substance P ($[M + H]^+ = 1347.7354$)
	Bombesin ($[M + H]^+ = 1619.8223$)
	ACTH clip 1-17 ($[M + H]^+ = 2093.0862$)
	ACTH clip 18-39 ($[M + H]^+ = 2465.1983$)
	Somatostatin 28 ($[M + H]^+ = 3147.4710$)
Kalibriersubstanz Proteine:	Protein Calibration Standard II (Bruker Daltonics)
	Trypsinogen ($[M + H]^+ = 23982$)
	Protein A ($[M + H]^+ = 44613$)
	BSA ($[M + H]^+ = 66431$)
	Protein A ($[M + 2H]^{2+} = 22306$)
	BSA ($[M + 2H]^{2+} = 33216$)

Zunächst war der Edelstahl-Probenteller zu reinigen und vorzubereiten. Hierzu wurde er je einmal in Acetonitril (HPLC grade), in 50 % (v/v) Acetonitril und in Aqua bidest. für 10 min im Ultraschallbad gereinigt und anschließend getrocknet. Anschließend wurden die Proben entweder mit der ZipTipTM-Präparation (siehe Kapitel 6.7.4), nach der sog. „Dried droplet-Methode“ oder per Dünnschicht-Präparation auf die entsprechenden Positionen auf dem Probenteller aufgebracht.

Für die „Dried droplet-Methode“ wurden im Deckel eines Eppendorf-Probengefäßes jeweils 1 µL Probelösung mit 1 µL Matrixlösung I oder Matrixlösung II gemischt und davon schließlich 0.5 µL auf die gewünschte Position auf dem Probenteller aufgebracht.

Für die Dünnschicht-Präparation, die nur bei Proteinen angewendet wurde, wurden zunächst 2 µL Matrix-Lösung III auf der Probenplatte verteilt und bei RT getrocknet, so dass sich eine dünne Schicht aus Matrix-Kristallen bildete. Die Probenaufgabe erfolgte anschließend nach der „Dried droplet-Methode“ direkt auf die vorbereitete Schicht. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass sich hierbei eine dünnere Kristallschicht auf der vorher gleichmäßig aufgetragenen Dünnschicht ausbilden kann. Aus diesem Grunde ist es möglich, die Analyt-Moleküle durch sehr geringe Laserintensitäten, also sehr schonend zu aktivieren. Das Trocknen der Proben auf dem Probenteller erfolgte nach dem Auftragen im Allgemeinen bei RT. In der vorliegenden Arbeit sind Massen von Verbindungen mit $m/z = 1000$ sowie Massen von Peptiden jeweils als monoisotopische Massen angegeben, während Massen von Proteinen als „Average-Massen“ angegeben sind.

7.7.6 ESI-FT-ICR-MS/MS-Messungen

Diese MS-Methode wurde angewandt, um das photochemisch markierte Modell-Peptid Angiotensin II vor allem hinsichtlich der Position, an der die photoaktiven Spezies kovalent an das Peptid gebunden hatten, zu untersuchen. Hierzu wurde das in Kapitel 6.1.1 erwähnte Apex II Electrospray Fouriertransformations Ionen Cyclotron Resonanz (ESI-FT-ICR) Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Billerica, USA) verwendet, welches mit einem 7 Tesla aktiv abgeschirmten Magneten sowie einer Apollo Ionenquelle ausgestattet ist. Dieses Gerät erlaubt es, interessante

„Analyt-Ionen“ in einer sog. „Ionenfalle“ festzuhalten und daraus selektiv bestimmte Ionen für weitere MS / MS-Analysen zu entlassen.

Die zu untersuchenden Proben (siehe Kapitel 4.2.6) wurden dazu nach ZipTip™-Präparation mit einer Konzentration von $10 \mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$ in einem 50 : 50 : 0.001 (v/v/v) Gemisch aus MeOH, Aqua bidest. und AcOH gelöst und mit einer Flußrate von $2 \mu\text{L}\text{min}^{-1}$ eingesprüht. Die MS/MS-Messungen wurden über ein doppelt geladenes „Mutterion“ und „sustained off-resonance irradiation-collision induced dissociation“ (SORI-CID) mit Argon als Kollisionsgas durchgeführt, wobei die daraus erhaltenen Fragmentierungsmuster bzw. MS/MS-Spektren im Anschluß an die Messungen mit Hilfe der Online-Suchmaske ProteinProspector^[155] ausgewertet wurden (Ergebnisse siehe Kapitel 4.2.6, Tabellen 4.5 / 4.6 und Abbildung 4.7).

7.7.7 MALDI-TOF/TOF-Messungen

Die massenspektrometrische Analyse mittels MALDI-TOF/TOF-Messungen wurde durchgeführt, um das Protein *FimH truncate* hinsichtlich seiner photoinduzierten Markierung durch die synthetisierten photoaktiven Mannoside zu untersuchen. Zusätzlich wurde diese Methode eingesetzt, um mittels MS/MS-Fragmentierungen des markierten Modell-Peptides Angiotensin II weitere Informationen über die Positionen zu erhalten, an denen die photoaktiven Spezies kovalent gebunden haben. Für die einzelnen Studien wurde das in Kapitel 6.1.1 erwähnte 4700 Proteomics Analyzer MALDI-TOF-TOF-Massenspektrometer der Firma Applied Biosystems (Arbeitskreis Leippe am Institut für Physiologische Zoologie (Christian Albrecht Universität, Kiel) eingesetzt, um eventuell höhere Auflösungen im Linearmodus zu erreichen als mit dem Bruker Biflex III Gerät. Gleichzeitig können anhand MALDI-TOF/TOF-Technik MS/MS-Fragmentierungen durchgeführt werden, wobei die Erhöhung der Stoßenergie in der Kollisionszelle stufenweise und somit schonend erfolgen kann. Diese Behandlung ermöglicht eine verbesserte Untersuchung und Analyse der gebildeten Fragmentierungsmuster von Peptiden.

Die zu untersuchenden Proben (siehe Kapitel 4.2.6 und Kapitel 4.2.7.2) wurden für die Durchführung der massenspektrometrischen Analyse nach ZipTip™-Präparation auf die vorher gereinigte Probenplatte aufgebracht und im Analysator unter Hochvakuum vermessen. Für markiertes *FimH truncate* Protein wurde der Linear-

Modus gewählt, während die einzelnen Peptidfragmente aus den MS/MS-Experimenten im Reflektor-Modus detektiert wurden. Die aus den einzelnen Messungen erhaltenen Fragmentierungsmuster bzw. MS/MS-Spektren wurden mit Hilfe der Online-Suchmaske ProteinProspector^[155] ausgewertet (Ergebnisse siehe Kapitel 4.2.6 und Kapitel 4.2.7.2).

7.8 Untersuchung der biologischen Aktivität der photoaktiven Liganden

7.8.1 ELISA

7.8.1.1 Verwendete Materialien

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten ELISA-Tests wurden ausschließlich *E. coli*-Bakterien des Stammes HB101 pPK14 verwendet.

Nährmedium

Nähr-Agar	2 g Nähr-Agar in 100 ml Wasser lösen kurz aufkochen 15 min bei 121°C autoklavieren
-----------	--

Nähr-Agar + 0,1 mg/ml Ampicillin	100 ml steriler Nähr-Agar 0,5 ml 20 mg/ml Ampicillin-Lösung
----------------------------------	--

weitere Materialien

Mannan-Lösung	1 mg/ml in Carbonat-Puffer
---------------	----------------------------

Magermilch	5%ig in PBSE 2%ig in PBSE
------------	------------------------------

1. Antikörper	polyklonaler Antikörper (rabbit) gegen die Typ-1-Fimbrien von <i>E. coli</i> gerichtet (1:2000 Verdünnung in 2%iger Magermilch)
2. Antikörper	polyklonaler Antikörper (goat-anti-rabbit) konjugiert mit Meeresrettichperoxidase (HPR) (1:4000 Verdünnung in 2%iger Magermilch)
Substratlösung	2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure) ABTS 1 mg/ml ABTS in H ₂ O ₂ (25 µl/ml; 0,1%); in Aqua bidest.
Oxalsäure-Lösung	2%ig in Aqua bidest.

7.8.1.2 Verwendete Pufferlösungen

alle Angaben pro Liter

PBS-Puffer	8.0 g Natriumchlorid 0,2 g Kaliumchlorid 0,2 g Kalium-di-hydrogenphosphat 1,44 g di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat mit Kalium-dihydrogenphosphat auf pH 7,2 einstellen
PBSE-Puffer	1 l PBS 100 mg Thimerosal
PBSET-Puffer	1 l PBSE 200 µl Tween 20

Carbonat-Puffer	1,59 g Natriumcarbonat 2,52 g Natriumhydrogencarbonat 100 mg Thimerosal mit Natriumhydrogencarbonat auf pH 9,5 einstellen
Citrat-Puffer	29,41 g tri-Natriumcitrat-dihydrat mit Citronensäure auf pH 4,5 einstellen

7.8.1.3 Vorbereitung der verwendeten *E. coli* -Bakterien

Die *E. coli*-Kultur pPK1 4 mit Ampicillin-Resistenz (als Glycerin-Dauerkultur bei -30°C gelagert) wurde auf Nähr-Agar (plus 0.1 mg/mL Ampicillin) angeimpft. Dazu wurden jeweils 200 µL der Glycerin-Dauerkultur auf die mit Nähr-Agar beschichteten Petrischalen ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Mit einer Impföse wurden 100 mg Bakterienkultur abgenommen, in ein Sarstedt-Röhrchen überführt und zweimal in je 10 mL PBS-Puffer suspendiert und anschließend bei 5000 U / min für 5 min zentrifugiert. Das entstandene Bakterien-Pellet wurde anschließend, je nach in 10 mL PBS-Puffer suspendiert und für die weiteren Tests noch einmal 1:40 mit PBS-Puffer verdünnt.

Die optische Dichte beider Bakterien-Suspensionen wurde bestimmt:

1) Konzentrierte Suspension: $A = 1.08$ bei $\lambda = 600$ nm;

2) 1:40 Verdünnung: $A = 0.03$ bei $\lambda = 600$ nm.

7.8.1.4 Durchführung des ELISA-Testes

Für die Durchführung des ELISA wurden von den als Inhibitoren eingesetzten Mannosiden MeMan, *p*NPMan, Azid **12**, Diazirin **14**, Benophenon **16** und Benzophenon **19** wurden jeweils wässrige Stammlösungen mit einer Konzentration von 1 mgml⁻¹ vorbereitet. Anschließend erfolgten die einzelnen Arbeitsschritte in der beschriebenen Reihenfolge:

- 1) Coaten der Mikrotiter-Platten:
Pro „Well“ wurden 100 μL Mannan-Lösung (1 mg/mL in Carbonat-Puffer mit Thimerosal ohne Azid) pipettiert und die Platten für 2 h bei 37 °C im Brutschrank gecoatet.
- 2) Blocken der Mikrotiter-Platten:
Zum Blocken noch freier Bindestellen - um unspezifische Adhäsion zu vermeiden - wurde jedes „Well“ mit 150 μL 5 %iger Magermilchlösung (Firma Uelzena) in PBSE-Puffer versetzt und die Platten im Anschluss für 4 h im Brutschrank gelagert.
- 3) Waschen der Mikrotiter-Platten:
Die geblockten Mikrotiter-Platten wurden je zweimal mit 150 μL PBSE-Puffer pro „Well“ gewaschen.
- 4) Die Mikrotiter-Platten wurden mit 50 μL PBSE-Puffer pro „Well“ versetzt.
- 5) Die Mikotiter-Platten wurden mit je 50 μL Inhibitorlösung (Stammlösung mit $c = 1\text{mgml}^{-1}$) pro „Well“ versetzt. Als Standarts wurden α -D-Methylmannosid (MeMan) und *p*-Nitrophenyl- α -D-mannosid (*p*NPMan) verwendet; alle Inhibitoren wurden als 1 mg/mL-Stammlösung in Aqua bidest. angesetzt. Die Inhibitoren wurden dann serienweise im Verhältnis 1:2 verdünnt.
- 6) In jedes Well wurden 50 μL der verdünnten Bakterien-Suspension (1:40 in PBS) pipettiert. Die Mikrotiter-Platten wurden im Anschluss für 1 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.
- 7) Waschen der Mikrotiter-Platten:
Die Mikrotiter-Platten wurden viermal mit je 150 μL PBSE-Puffer pro „Well“ gewaschen.

- 8) Zugabe des Antikörpers I:
In jedes „Well“ wurden 50 μL Antikörper I (1:2000 verdünnt in 2 % Magermilch in PBSE) pipettiert und die Mikrotiter-Platten für 30 min bei 37 $^{\circ}\text{C}$ im Brutschrank inkubiert.
- 9) Waschen:
Die Mikrotiter-Platten wurden zweimal mit je 150 μL PBSET-Puffer pro „Well“ gewaschen.
- 10) Zugabe des Antikörpers II:
In jedes „Well“ wurden 50 μL Antikörper II (1:4000 verdünnt in 2 % Magermilch in PBSE) pipettiert und die Platten für 30 min bei 37 $^{\circ}\text{C}$ im Brutschrank inkubiert.
- 11) Waschen:
Zunächst wurden die einzelnen Platten dreimal mit je 150 μL PBSET-Puffer pro „Well“ gewaschen; dann einmal mit je 150 μL PBSE-Puffer pro „Well“ und dann noch einmal mit je 150 μL Citrat-Puffer pro „Well“.
- 12) Färbung:
In jedes „Well“ wurden 50 μL einer frisch angesetzten ABTS-Lösung (1 mg/mL in 0.1 % H_2O_2 in Aqua bidest.) pipettiert und die Mikrotiter-Platten für 30 min bei 37 $^{\circ}\text{C}$ im Brutschrank inkubiert.
- 13) Abstoppen der Färbereaktion:
Jedes „Well“ wurde mit 50 μL 2%iger aq. Oxalsäure versetzt und die Mikrotiter-Platten für 30 min bei 37 $^{\circ}\text{C}$ im Brutschrank inkubiert.
- 14) Photometrische Messung der optischen Dichte
Zur Bestimmung der optischen Dichten pro „Well“ wurden die Mikrotiter-Platten im ELISA-Reader bei 405 nm (Referenzfilter 490 nm) vermessen.

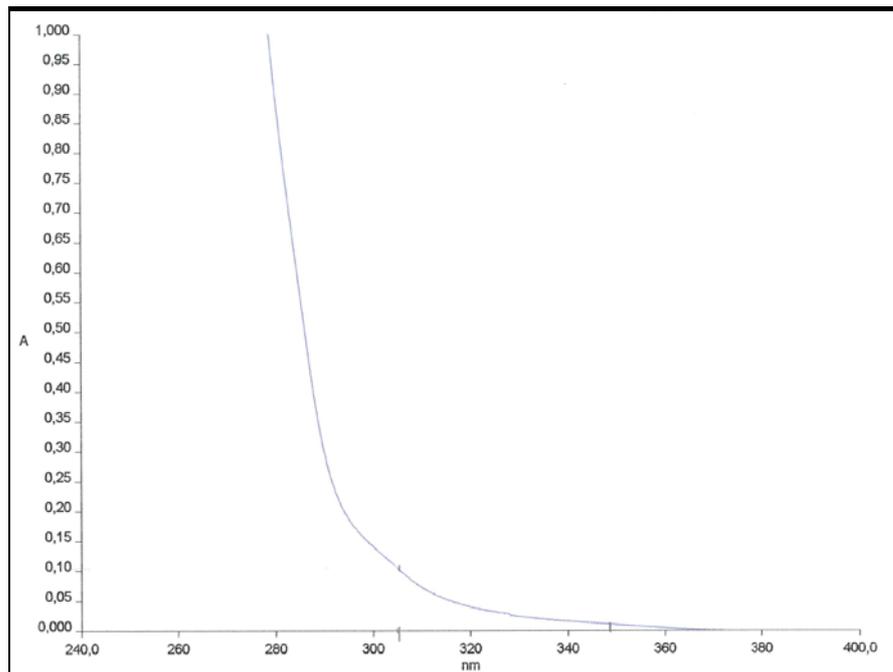
Aus den erhaltenen Ergebnissen für die optischen Dichten wurden im Anschluss die jeweiligen IC_{50} - bzw. IP-Werte berechnet und ausgewertet. Es wurden drei Testreihen durchgeführt, von denen jeweils die Durchschnittswerte ermittelt wurden (Ergebnisse siehe Kapitel 4.4.2).

7.9 Computer-gestützte Docking-Studien

Die Computer-gestützten Docking-Studien zur theoretischen Verdeutlichung der Bindungsaffinitäten der photoaktiven mannosidischen Liganden **12**, **14**, **16** und **19** wurden in Kooperation mit Dr. Andreas Fuchs im Arbeitskreis Prof. Lindhorst durchgeführt.^[165] Die Ermittlung der in Tabelle 4.xx des Kapitels 4.xx präsentierten Scoring-Werte erfolgte dabei durch Andreas Fuchs. Die Anwendung der Methode des FlexX-Dockings ermöglichte hierbei eine vollständige und flexible Behandlung der untersuchten Liganden auf der Basis eines inkrementellen Aufbaus der Liganden in der CRD des FimH-Proteins. Der entsprechende CRD-Bereich des FimH-Proteins wurde über das im Rechenprogramm Sybyl^[171, 172] implementierte FlexX als fixierter Rezeptor definiert. Ausgehend von dieser starren Bindungstasche wurde anhand des FlexX-Docking-Algorithmus^[167, 168, 169, 170] versucht, eine Evaluierung der Protein-Ligand-Interaktion mit einem flexiblen Liganden zu erreichen. Die Anwendung der FlexX-Scoring-Funktion wurde zur Evaluierung der Bindungsstärke zusätzlich durch weitere Scoring-Funktionen des Consensus-Verfahrens^[188, 189] nach Sybyl erweitert, was eine größere Verlässlichkeit der Bewertung der gedockten Konformation für einen entsprechenden Liganden bewirkte. Durch Kombination beider Scoring-Programme resultierte eine Reihe dimensionsloser „Scoring-Werte“, die das Interaktionspotenzial der zu untersuchenden Liganden in unterschiedlichen Konformationen gegenüber der starren Bindungstasche wiedergaben. Die berechneten Scoring-Werte beziehen sich auf die entsprechenden Bindungsenergien, kleinere Scoring-Werte weisen dabei auf einen stärker bindenden Liganden hin. Den Docking-Studien wurden die beiden von Knight et al. publizierten Kristallstrukturen des FimH-Proteins^[47, 52] zugrunde gelegt.

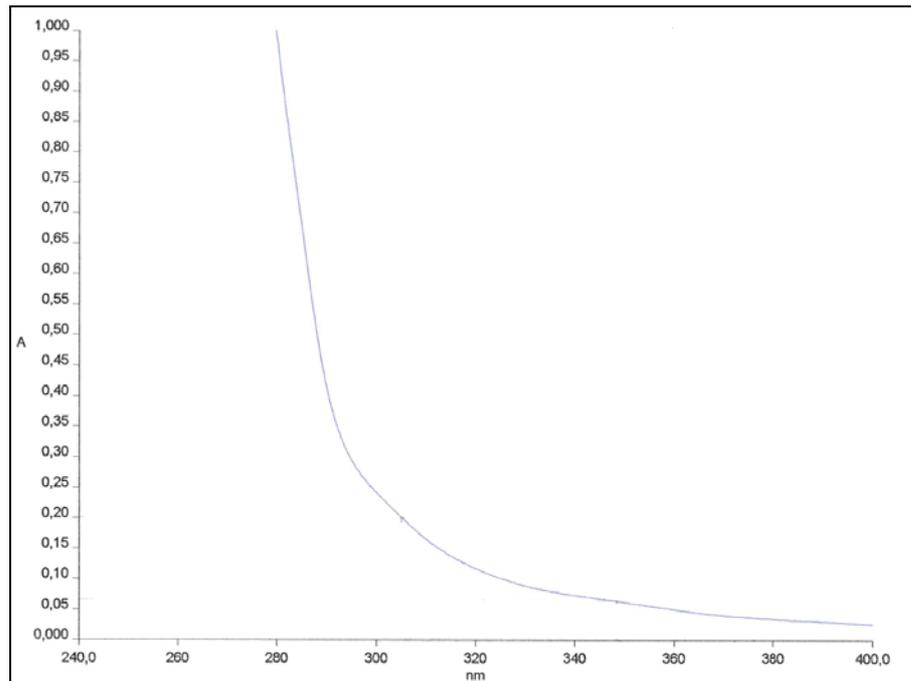
8. Anhang

A UV-VIS-Spektren der photoaktiven Mannoside 12, 14, 16, 19, 23 und 26

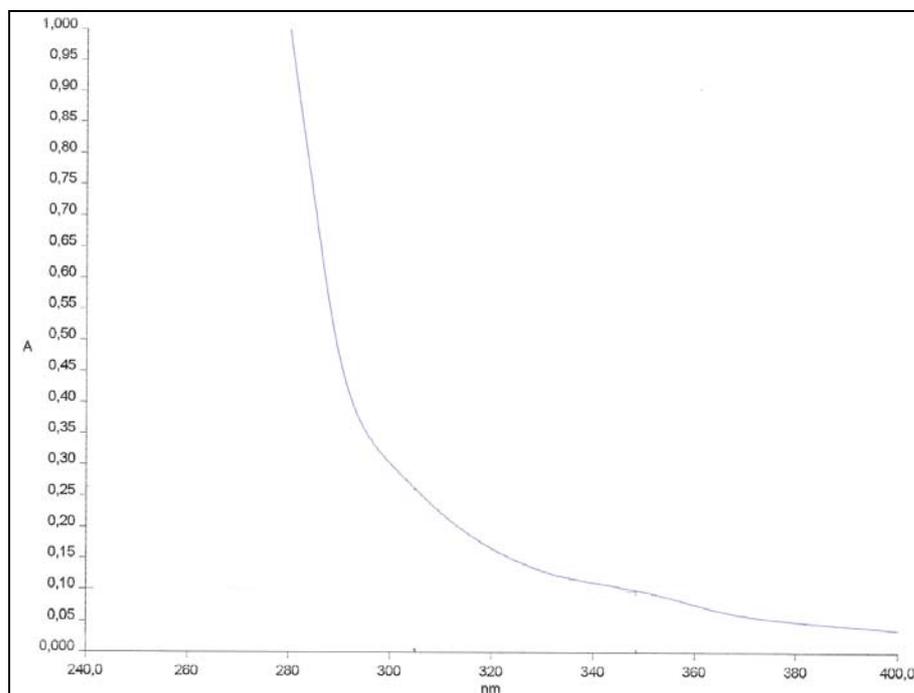


UV-VIS-Spektrum des photoaktiven Azides 12 in MeOH;

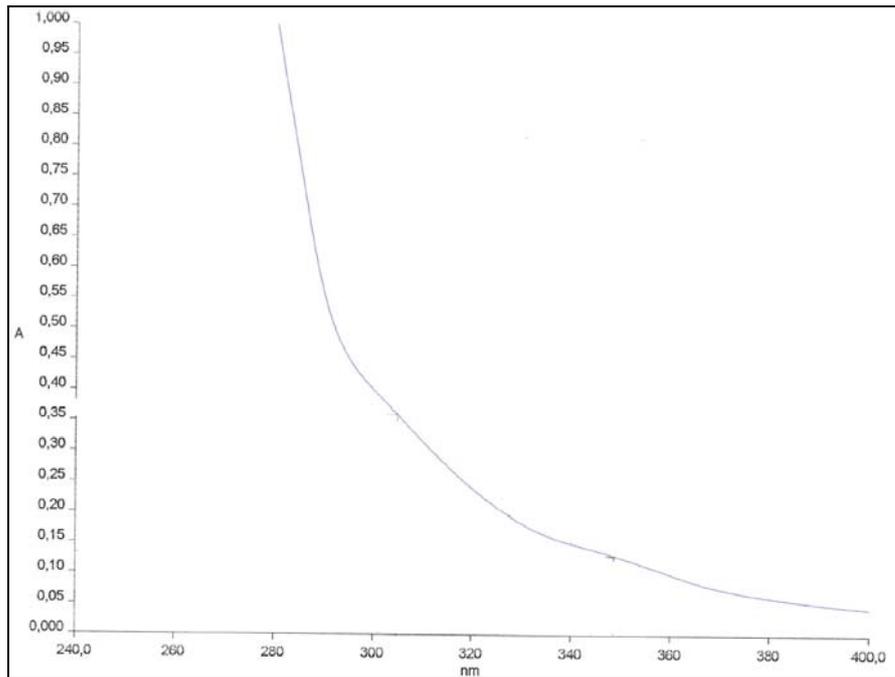
Bestrahlungsdauer: 0 Minuten



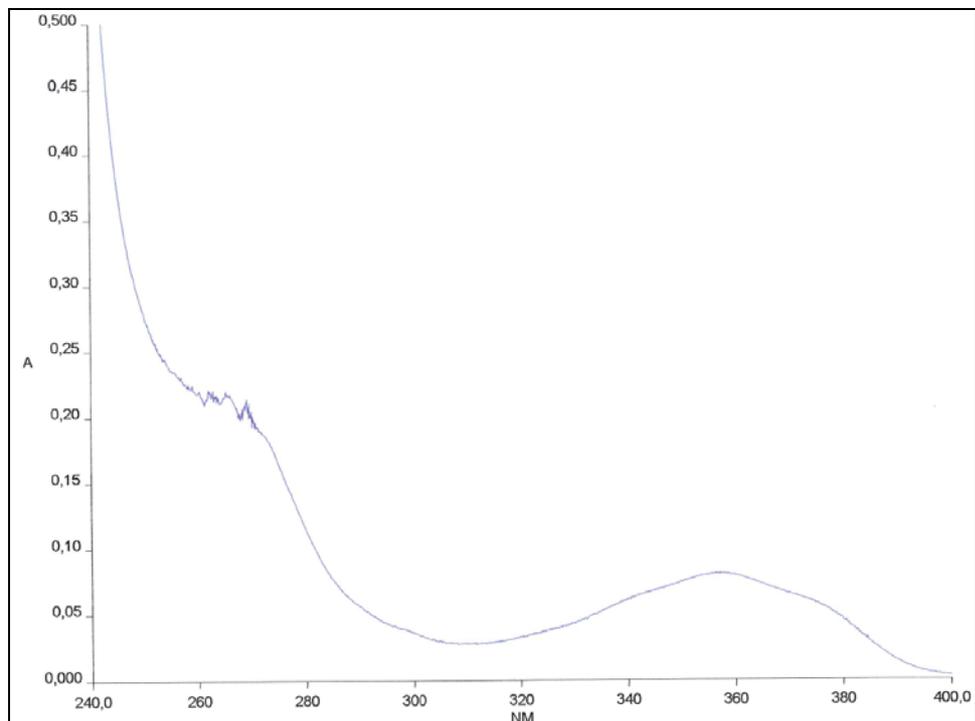
*UV-VIS-Spektrum des photoaktiven Azides **12** in MeOH;
Bestrahlungsdauer: 5 Minuten*



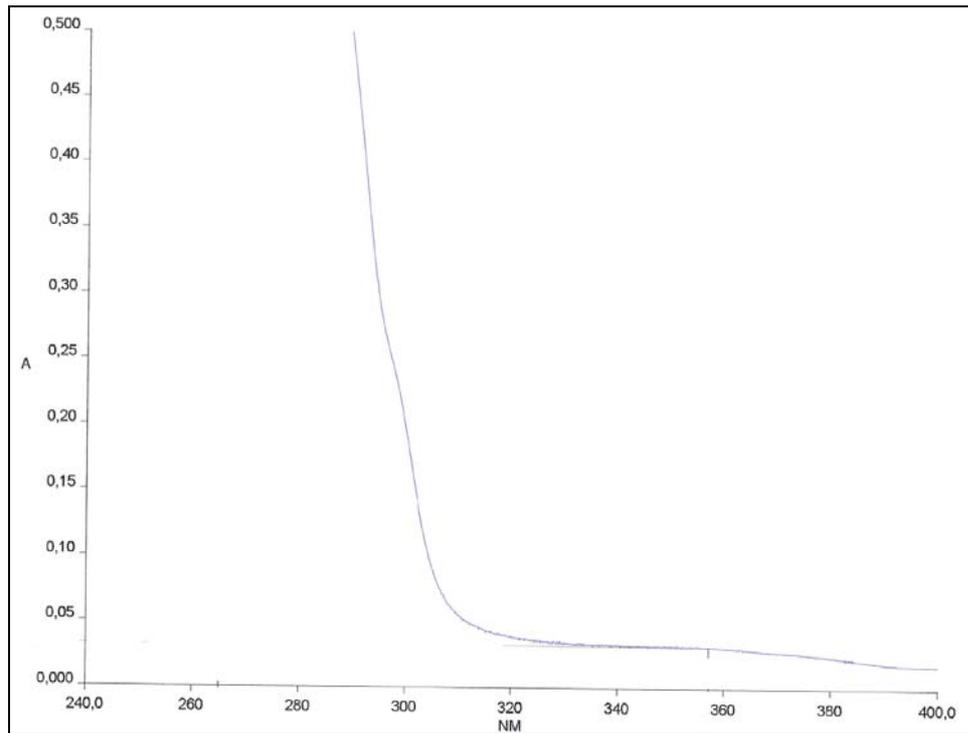
*UV-VIS-Spektrum des photoaktiven Azides **12** in MeOH;
Bestrahlungsdauer: 10 Minuten*



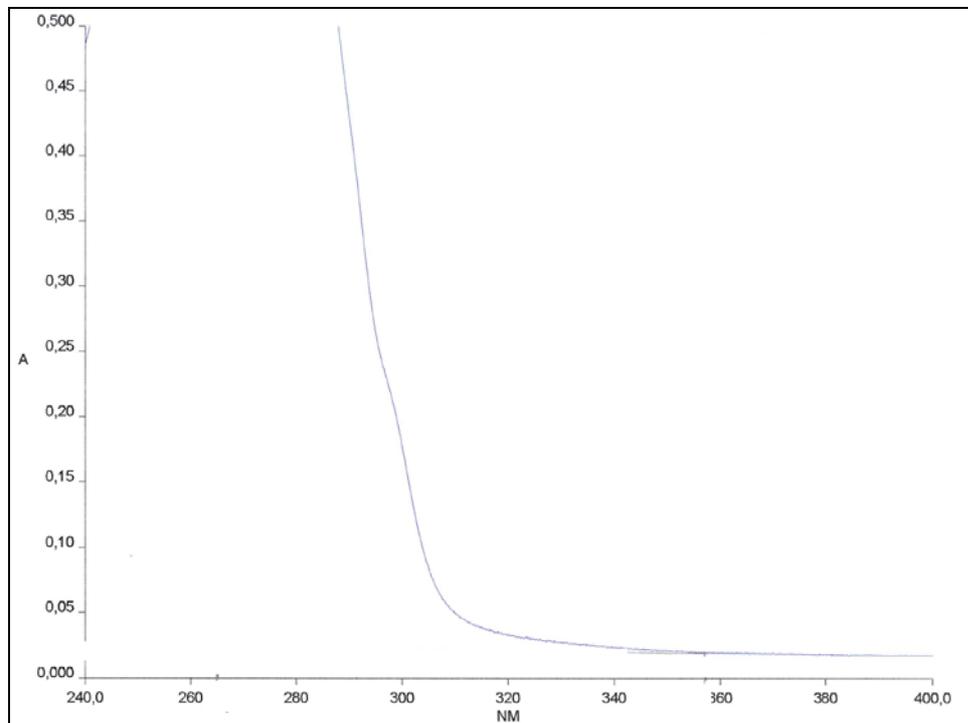
*UV-VIS-Spektrum des photoaktiven Azides 12 in MeOH;
Bestrahlungsdauer: 30 Minuten*



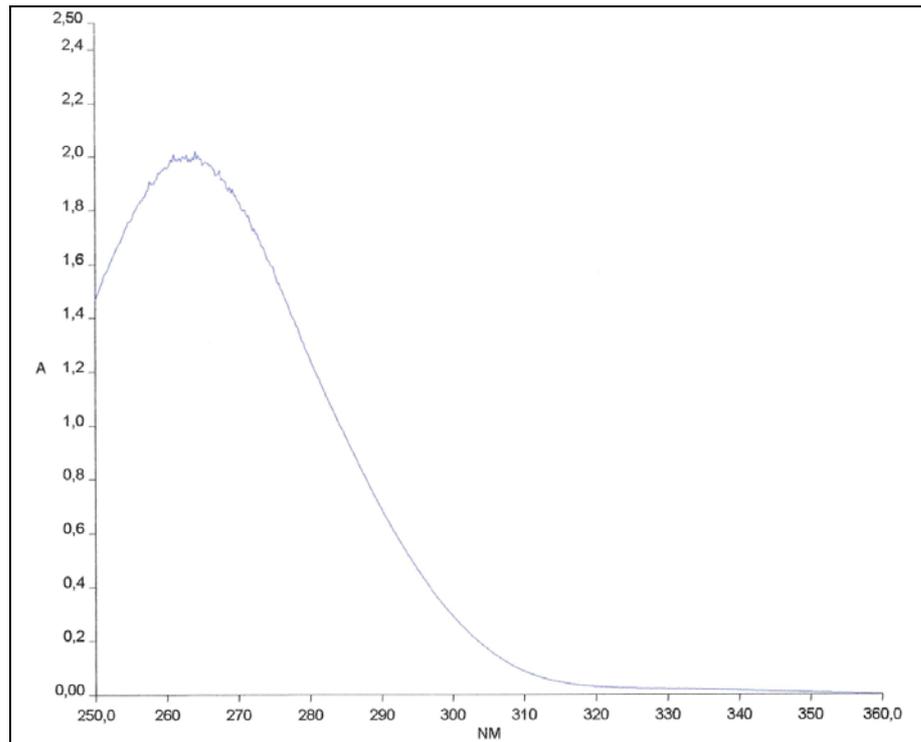
*UV-VIS-Spektrum des photoaktiven Diazirins 14 in H₂O;
Bestrahlungsdauer: 0 Minuten*



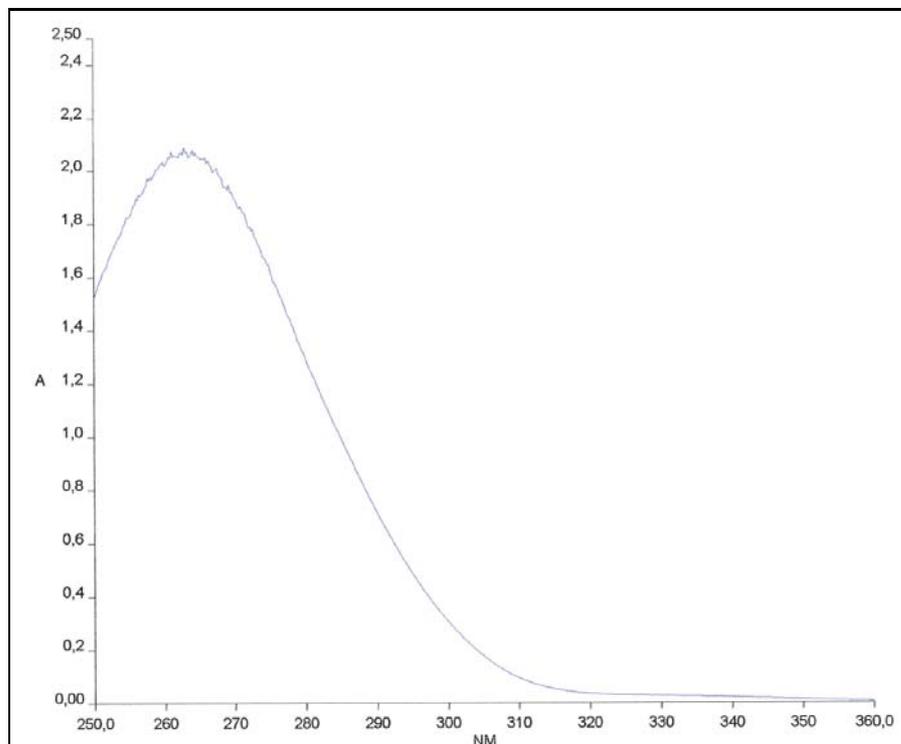
*UV-VIS-Spektrum des photoaktiven Diazirins **14** in H_2O ;
Bestrahlungsdauer: 5 Minuten*



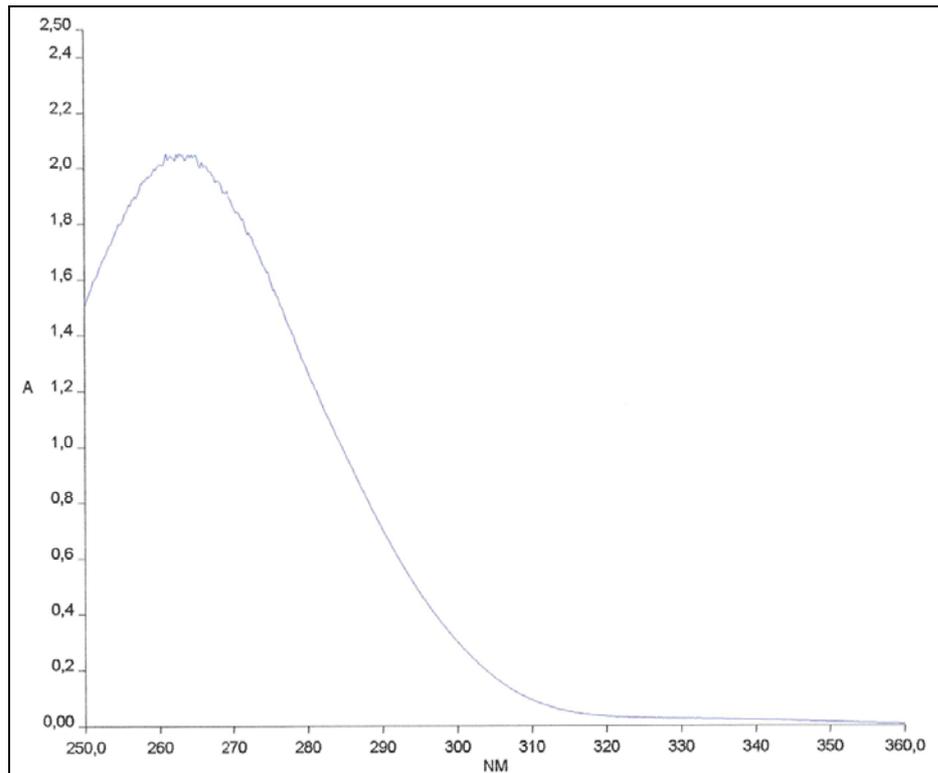
*UV-VIS-Spektrum des photoaktiven Diazirins **14** in H_2O ;
Bestrahlungsdauer: 10 Minuten*



*UV-VIS-Spektrum des photoaktiven Benzophenons 16 in H₂O;
Bestrahlungsdauer: 0 Minuten*

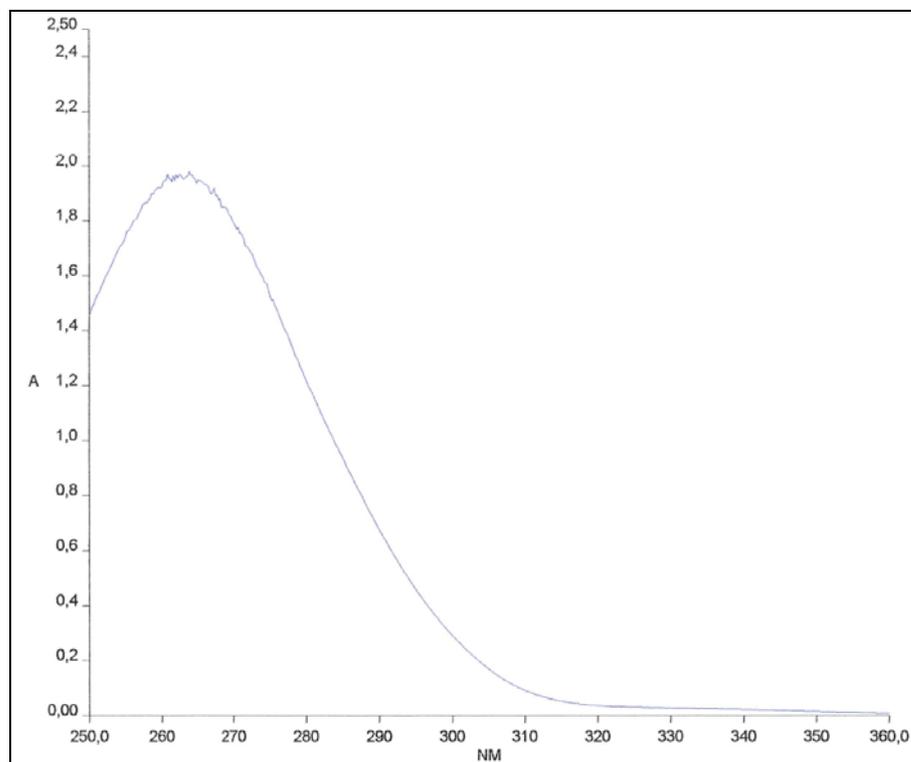


*UV-VIS-Spektrum des photoaktiven Benzophenons 16 in H₂O;
Bestrahlungsdauer: 10 Minuten*



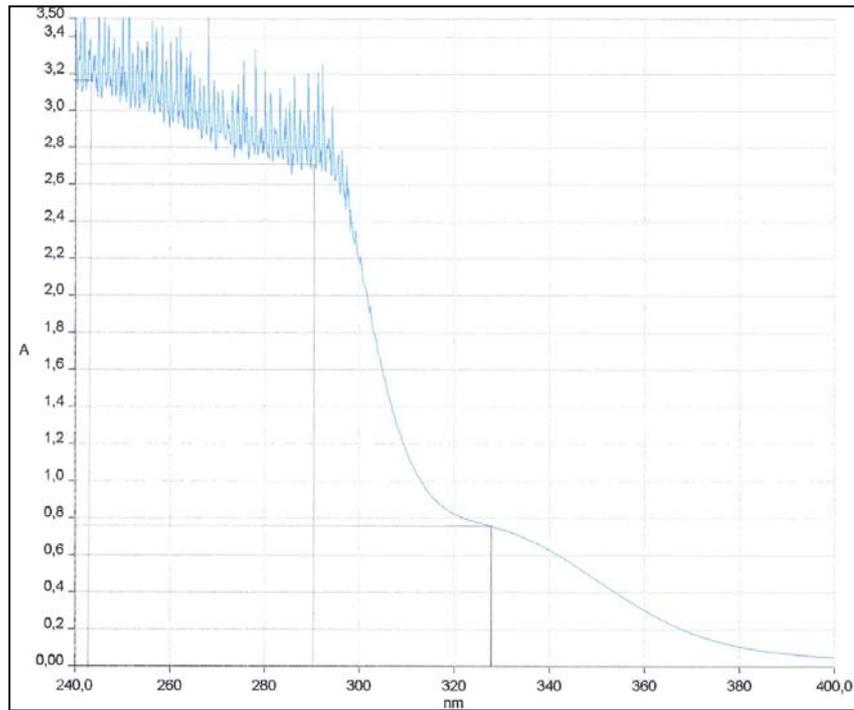
UV-VIS-Spektrum des photoaktiven Benzophenons 16 in H₂O;

Bestrahlungsdauer: 20 Minuten



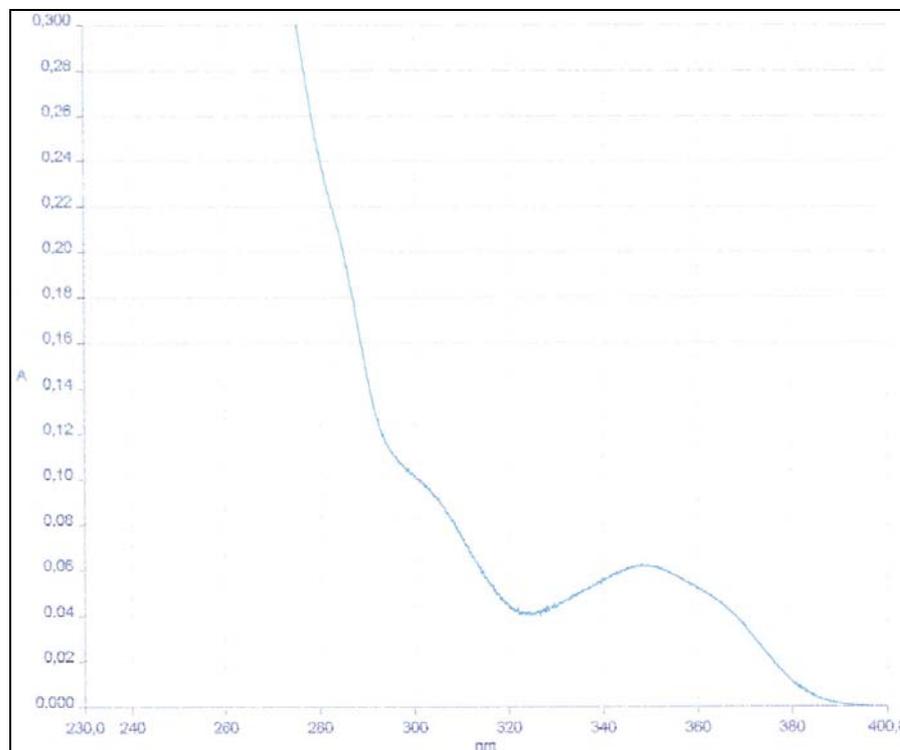
UV-VIS-Spektrum des photoaktiven Benzophenons 16 in H₂O;

Bestrahlungsdauer: 30 Minuten



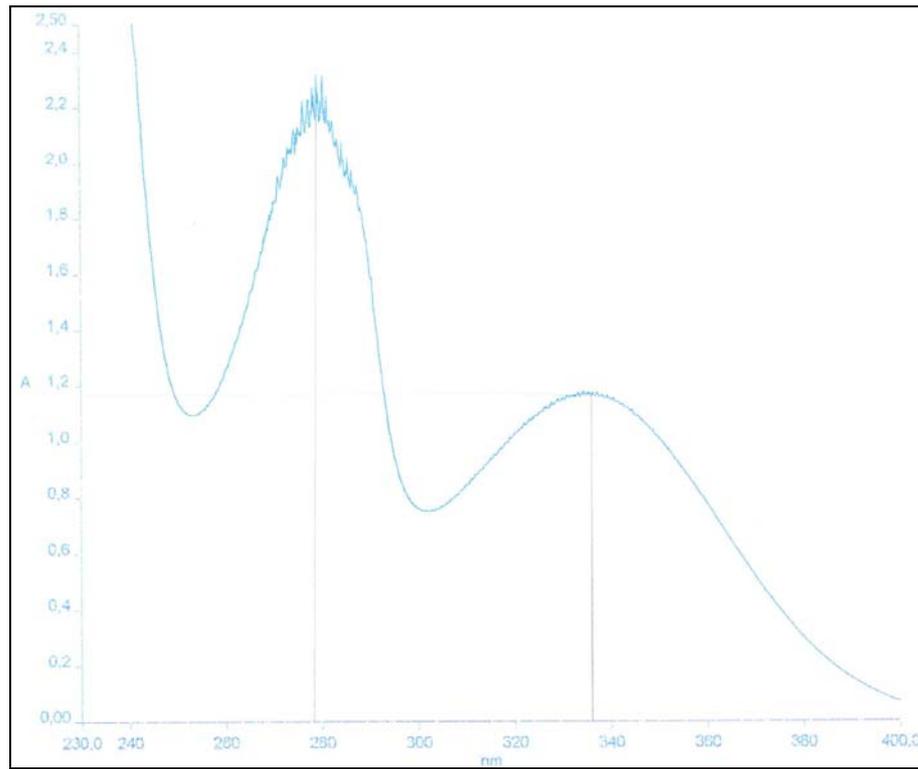
UV-VIS-Spektrum des photoaktiven Benzophenons 19 in H₂O;

Bestrahlungsdauer: 0 Minuten



UV-VIS-Spektrum des photoaktiven Diazirins 23 in H₂O/MeCN (50%);

Bestrahlungsdauer: 0 Minuten



*UV-VIS-Spektrum des photoaktiven Diazirins 26 in H₂O/MeCN (50%);
Bestrahlungsdauer: 0 Minuten*

B Abkürzungsverzeichnis

Allgemeine Begriffe

Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
ber.	berechnet
c	Konzentration
CI-MS	Chemische Ionisation (Massenspektrometrie)
COSY	Correlated Spectroscopy
CRD	Carbohydrate Recognition Domain
Da	Dalton
DC	Dünnschicht-Chromatographie
E. coli	Escherichia coli-Bakterien
EI-MS	Elektronische Ionisation (Massenspektrometrie)
ELISA	Enzyme-linked Immunosobent assay
ESI-FT-ICR-MS	Electron Spray Ionisation Fourier Transformation Ion Cyclotron Resonance MS
ESI-HR-MS	Electron Spray Ionisation High Resolution MS
ESI-MS	Electron Spray Ionisation Mass Spectrometry
Eq., eq.	Equivalent
FT-IR	Fourier Transform Infrarot-Spektroskopie
g	Gramm
GC	Gas-Chromatographie
gef.	gefunden
ges.	gesättigt

h	Stunde
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz	Hertz
IC	Inhibitions-Konzentration
ICAT	Isotope coded affinity tag
i. Vak.	im Vakuum
k. I.	keine Insertion
KK	Kreuzkupplungsprodukt
LM	Lösungsmittel
Lsg.	Lösung
M	Molmasse
MALDI-TOF-MS	Time of Flight Mass Spectrometry
man	Mannosyl-
mg	Milligramm
μg	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
mM	Millimolar (mmol / L)
μM	Mikromolar (μmol / L)
MPLC	Middle Pressure liquid Chromatography
MS	Massenspektrometrie
n. b.	nicht bestimmt

NC	Nitrocellulose
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
PAFG	Photoaktive funktionelle Gruppe
PAL	Photoaffinitätslabel
PMF	peptide mass fingerprint
ppm	parts per million
R _f	retention factor
IP	inhibitory potency
RP	Reversed Phase
RT	Raumtemperatur
sog.	sogenannt
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
T _{Photolyse}	Bestrahlungsdauer
UV-VIS	Ultraviolett-Visual Spektroskopie

Abkürzungen chemischer Verbindungen

AA	Anisaldehyd-Reagenz
ABTS	2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)
Ac	Acetyl-
AcOH	Essigsäure
Boc-	<i>tert</i> Butyloxycarbonyl-

Cbz-	Carbobenzoxycarbonyl-
CD ₃ CN	Deutero-Acetonitril
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DCM	Dichlormethan
DIPEA	<i>N</i> -Ethyl- <i>N</i> -diisopropylamin
<i>N, N</i> -DMAP	<i>N, N</i> -Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
EE	Essigsäureethylester
EtOH	Ethanol
Fmoc-	Fluorenyl-methoxycarbonyl-
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N, N, N', N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorophosphat
MeCN	Acetonitril
MeMan	Methyl- α -D-mannosid
MeOD	Deutero-Methanol
MeOH	Methanol
NaOMe	Natriummethanolat
<i>n</i> -BuLi	<i>n</i> -Butyllithium
NC	Nitrocellulose
NEt ₃	Triethylamin
<i>p</i> NPMan	<i>para</i> -Nitrophenyl- α -D-mannosid
PS	Polystyrol
PVDF	Polyvinylidendifluorid
SDS	Sodium dodecyl sulfat
TBDMS	<i>tert</i> Butyl-dimethylsilyl
TBDMSCl	<i>tert</i> Butyl-dimethylsilylchlorid

TCA	Trichloressigsäure
TFA	Trifluoressigsäure
TMS	Tetramethylsilan
TMSOTf	Trimethylsilyl-trifluoromethansulfonat

Abkürzungen biochemischer Substanzen und Pufferlösungen

ACTH	Adreno-Corticotropes-Hormon
Angio II	Angiotensin II
BSA	Bovines Serum Albumin
ConA	Concanavalin A
HRP	Horse-Radish-Peroxidase
PBS	Phosphate buffered sodium
PBSE	Phosphate buffered sodium mit Thimerosal
PBSET	Phosphate buffered sodium mit Thimerosal und Tween 20
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TBST	Trishydroxyaminomethan buffered sodium mit Tween 20
Tris	Trishydroxyaminomethan

C Lebenslauf

Michaela Märten (geb. Wiegand)

Geboren am 08. September 1972 in Osterode am Harz

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet, 2 Kinder

Schulbildung

08/1979-07/1983	Grundschule Wilhelm-Hauff-Schule Neu-Isenburg
08/1983-07/1985	Förderstufe Brüder-Grimm-Schule Neu-Isenburg
08/1985-06/1992	Gymnasium Goethe-Schule Neu-Isenburg

Berufliche Ausbildung

09/1992-06/1995	Ausbildung zur Chemielaborantin bei der Firma DuPont de Nemours Deutschland GmbH in Neu- Isenburg
06/1995-10/1995	Laborassistentin Abteilung Filmherstellung Silberhalogenidprodukte bei der Firma DuPont de Nemours Deutschland GmbH in Neu-Isenburg

Hochschulausbildung

10/1995-09/2003	Studiengang Chemie-Diplom an der Technischen Universität in Darmstadt
09/1997	Diplomvorprüfung

- 03/2003-09/2003 Diplom-Ingenieur (summa cum laude)
- Diplomarbeit am Clemens-Schöpf-Institut für
Organische Chemie und Biochemie der Technischen
Universität Darmstadt im Arbeitskreis Prof. Dr. W.-D.
Fessner
Neue Synthesestrategie für Hexokinase-Inhibitoren
- 12/2003-02/2010 Promotion am Otto-Diels-Institut für Organische
Chemie der Christian-Albechts-Universität zu Kiel im
Arbeitskreis Prof. Th. K. Lindhorst
*Mono- und bifunktionelle mannosidische
Photoaffinitätsliganden für das bakterielle Lektin
FimH: Design, Synthese und Anwendung*

Tätigkeiten

- 01/2004-11/2006 wiss. Mitarbeiter an der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel; Betreuung des organisch-chemischen
Fortgeschrittenen-Praktikums
- 10/2006-11/2006 Betreuung des organisch-chemischen Grundpraktikums

Fortbildungen

- 12/2004 3-day training course for MALDI-TOF-MS-Analysis in
der Firma Bruker Daltonics in Bremen

Poster

- 09/2006 ORCHEM 2006 in Bad-Nauheim
*Photoactive Mannose Derivatives and Their Evaluation
for Lectin Labelling*

Vorträge

- 09/2006 ORCHEM, Bad-Nauheim
*Photoactive Mannose Derivatives and Their Evaluation
for Lectin Labeling*
- 10/2006 Baltic Meeting on Microbial Carbohydrates, Rostock
*Photoactive Mannose Derivatives and Their Evaluation
for Lectin Labeling*

Publikationen

Synthesis of Cluster Mannosides Carrying a Photolabile Diazirine Group, M. Walter,
M. Wiegand, Th. K. Lindhorst, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 719-728.

*Synthesis of Photoactive α -Mannosides and Mannosyl Peptides and Their
Evaluation for Lectin Labeling*, M. Wiegand, Th. K. Lindhorst, *Eur. J. Org. Chem.*
2006, 4841-4851.

*Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen auf den Punkt gebracht – Zur Methode der
Photomarkierung*, M. Märten, Th. K. Lindhorst, *Bioforum* **2009**, 2, 32-34.

Herzlichen Dank

Mein herzlicher Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. Ulrich Lünig für die freundliche Übernahme der Zweitkorrektur.

Für die Reinigung und Lieferung des in dieser Arbeit untersuchten Protein-Teilstückes *FimH truncate* geht mein besonderer Dank nach Schweden an die SLU (Sveriges Landbruksuniversitet) in Uppsala zu Prof. Stefan D. Knight. Vielen Dank auch für den netten email-Kontakt und so manchen hilfreichen Tipp bezüglich des Proteins FimH.

Im Bereich der massenspektrometrischen Analysen bedanke ich mich besonders bei PD Buko Lindner am Research Institut Borstel, der mir viele Stunden seiner kostbaren Zeit schenkte, um das photomarkierte FimH-Protein massenspektrometrisch zu untersuchen. Außerdem stellte er mir das Bruker Biflex II MALDI-Gerät für meine Arbeit zur Verfügung; herzlichen Dank dafür. Ebenso danke ich in diesem Zusammenhang Dr. Christoph Gelhaus aus dem Arbeitskreis Prof. Leippe des Institutes für Zoophysiologie der Christian Albrecht Universität zu Kiel für die nette Kooperation und für die sehr gelungenen MS/MS-Analysen am MALDI-TOF-TOF-Gerät von Applied Biosystems.

Dank auch an PD Uta Wille für die großzügige Überlassung der UV-Filter, die den essentiellen Teil der Bestrahlungsapparatur ausmachten.

Den Mitgliedern des „AK Li“ - sei es den bereits in ganz Europa verstreuten als auch denen, die noch an der CAU weilen - danke ich herzlich für ein aufgeschlossenes teils freundschaftliches Arbeitsklima und für den ein oder anderen netten Abend in gemütlicher Runde (beim Fußball schauen, beim Kochen, beim Rollenspielen oder im Kino). Besonderer Dank gilt hierbei dem Kollegen Dr. Andreas Fuchs für die Zusammenarbeit im Rahmen der Computer-gestützten Docking-Studien meiner synthetisierten photoaktiven Liganden.

Dem AK Herges sei Dank für die Dauer-Leihgabe eines Transformator-Gerätes zum Betreiben der UV-Strahlungsquelle in der Bestrahlungsapparatur. Lieben Dank auch an Dr. Torsten Winkler für seine stete Hilfsbereitschaft und sein goldenes Händchen bei „software-Problemen“ jeglicher Art.

Elwira Klima-Bartczak gilt mein ganz besonderer Dank für ihre Hilfsbereitschaft sowie die vielen wichtigen Dinge, die sie stets für das Miteinander im AK organisiert hat. Ebenso danke ich ihr sehr für alles, was sie zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat und natürlich auch für viele viele liebe Worte.

Arbeitskreisübergreifend danke ich auch dem OCF-Praktikums-Assistenten-Team (Dr. Friedericke Eggers, Dr. Christoph Heidecke, Dr. Serge Konrad, Dr. Dietmund Peters, Dr. Jan Siegwarth, Dr. Oliver Sperling und Dr. Bengt Buchheim-Stehn) für die gute Zusammenarbeit und die stets lockere und sehr angenehme Praktikums-Atmosphäre.

Meinem Schwerpunktpraktikanten Björn Fiedler danke ich für seine engagierte und interessierte Mitarbeit.

Herzlichen Dank auch an alle Mitarbeiter, die im Institut für Organische Chemie für einen reibungslosen Ablauf sorgten und auch immer noch sorgen:

- Ganz besonders Herrn Dr. Christian Wolff für das gelungene „Fortgeschrittenen Seminar zur NMR-Spektroskopie“ im „sehr kleinen Kreise“, sowie seine stete Bereitschaft, mir bei der Aufklärung so mancher kniffliger NMR-Spektren hilfreich mit seinem Wissen und seiner Erfahrung zur Seite zu stehen.
- Gitta Kohlmeyer-Yilmaz, Marion Höftmann und Holger Franzen für die Aufnahme der NMR-Spektren.
- Dirk Meyer für die Aufnahme der ESI-MS-Spektren.
- Ulrike Drieling und Dipl. Ing. Rolf Schmied für die Aufnahme der EI-/CI-Spektren.
- Christine Haug und Regina Meinschmidt für die administrative Verwaltung sowie für ihre Hilfe bei Bestellungen und organisatorischen Fragen aller Art; meinen herzlichen Dank auch für die Mithilfe bei der Organisation meiner Disputation über eine Entfernung von etwa 650 km.

- Manuela Krannich, Nikola Schmitz und Kirstin Stark für die immer schnelle und gute Versorgung mit Fachartikeln, auch per email nach Hause.
- Rüdiger Kargoll (Werkstatt) für die Anfertigung der im Rahmen der vorliegenden Arbeit entworfenen Bestrahlungsapparatur.
- Andreas Wilms (Chemikalienausgabe / Glas-Ausgabe) und Monika Bänsch für ihre stete Hilfsbereitschaft.

Für eine ganz besondere Zeit der Freundschaft möchte ich mich bei Dr. Sonja Lüthje bedanken; wir haben sehr viel Spaß zusammen gehabt und viele tolle Dinge gemeinsam erlebt!

Und zum Schluss dem wichtigsten Menschen in meinem Leben:

Meinem geliebten Mann Stefan danke ich von ganzem Herzen für seine Liebe, seine stete Geduld mit mir, vor allem während der Entstehung dieser Dissertationsschrift; ich danke ihm von Herzen für die wundervollen gemeinsamen Erlebnisse außerhalb der Arbeitswelt und dafür, dass er immer an mich glaubt.

Literaturverzeichnis

- ¹ W. I. Weis, M. E. Taylor, K. Drickamer, *Immunol. Rev.* **1992**, 98, 637-674.
- ² T. Feizi, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1993**, 3, 701-710.
- ³ H. Lis, N. Sharon, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 637-674.
- ⁴ Th. K. Lindhorst, *Chem. Unserer Zeit* **2000**, 1, 38-52.
- ⁵ H. Kogelberg, T. Feizi, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, 11, 635-643.
- ⁶ R. A. Dwek, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 683-720.
- ⁷ H.-J. Gabius, H.-C. Siebert, *ChemBioChem* **2004**, 5, 740-764.
- ⁸ R. A. Lane, *Glycobiology* **1994**, 4, 759-767.
- ⁹ M. G. Paulick, C. R. Bertozzi, *Biochemistry* **2008**, 47, 6991-7000.
- ¹⁰ E. D. Korn, *Federation Proc.* **1969**, 28, 6-11.
- ¹¹ H. S. Bennett, *J. Histochem. Cytochem.* **1963**, 11, 14-23.
- ¹² E. Reitter R. C. D. E. Means, *Nat. Med.* **1998**, 4, 679-684.
- ¹³ H. Lis, N. Sharon, *Science* **1989**, 246, 227-234.
- ¹⁴ H. D. Ward, S. G. H. H.-J. Gabius, *Glycosciences* **1997**, 399-413.
- ¹⁵ S.-I. Hakomori in: *Glycoproteins and Disease*; J. Montreuil, J. F. G. Vliegthart, H. Schachter (eds.), Elsevier, Amsterdam, **1996**, 243-276.
- ¹⁶ G. F. Springer, *Science* **1984**, 224, 1198-1206.
- ¹⁷ W. C. Boyd: The Lectins. Their present status. In: Neurath H., Baileys K. (Eds.): *The Proteins*, Academic Press, New York, **1954**, 2, 756-884.
- ¹⁸ W. C. Boyd, E. Shapleigh, *Science* **1954**, 119, 419.
- ¹⁹ S. W. Mitchell, *Smithsonian Contrib. Knowledge* **1860**, XII, 89-90.
- ²⁰ H. Stillmark, *Inaugural Dissertation* **1888**, Schnackenburgs Buchdruckerei, Dorpat.
- ²¹ S. Sheriff, C. Y. Chang, R. A. B. Ezekowitz, *Nat. Struct. Biol.* **1994**, 789-794.
- ²² S. T. Iobst, M. R. Wormald, W. I. Weis, R. A. Dwek, K. Drickamer, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 15505-15511.
- ²³ M. W. Turner, *Mol. Immun.* **2003**, 40, 423-429
- ²⁴ J. L. Wang, B. A. Cunningham, M. J. Waxdal, G. M. Edelman, *J. Biol. Chem.* **1975**, 250, 1490-1502.
- ²⁵ B. A. Cunningham, J. L. Wang, M. J. Waxdal, G. M. Edelman, *J. Biol. Chem.* **1975**, 250, 1503-1512.
- ²⁶ G. M. Edelman, B. A. Cunningham, G. N. Reeke, J. W. Becker, M. J. Waxdal, J. L. Wang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1972**, 69, 2580-2584.
- ²⁷ K. D. Hardman, C. F. Ainsworth, *Biochemistry* **1972**, 11, 4910-4919.
- ²⁸ W. Min, A. J. Dunn, D. H. Jones, *EMBO J.* **1992**, 11, 1303-1307.
- ²⁹ K. D. Hardman, R. C. Agarwal, M. J. Freiser, *J. Mol. Biol.* **1982**, 157, 69-89.
- ³⁰ <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>
- ³¹ J. H. Naismith, C. Emmerich, J. Habash, S. J. Harrop, *Acta Cryst.* **1994**, D50, 847-858.
- ³² A. D. Sherry, A. E. Buck, C. A. Peterson, *Biochemistry* **1978**, 17, 2169-2173.
- ³³ A. R. Palmer, D. B. Bailey, W. D. Behnke, A. D. Cardin, P. P. Yang, P. D. Ellis, *Biochemistry* **1980**, 19, 5063-5070.
- ³⁴ I. Bertini, M. S. Viezzoli, C. Luchinat, E. Stafford, A. D. Cardin, W. D. Behnke, *J. Mol. Biol.* **1987**, 262, 16985-16994.
- ³⁵ C. Emmerich, J. R. Helliwell, M. Redshaw, J. H. Naismith, S. J. Harrop, J. Raftery, A. J. Kalb, J. Yariv, Z. Dauter, K. S. Wilson, *Acta Crystallogr.* **1994**, D50, 749-756.

- ³⁶ J. Bouckaert, R. Loris, F. Poortmans, L. Wyns, *Proteins: Structure, Function and Genetics* **1995**, *23*, 510-524.
- ³⁷ J. H. Naismith, C. Emmerich, J. Habash, S. J. Harrop, J. R. Helliwell, W. N. Hunter, J. Raftery, J. Kalb, J. Yariv, *Acta Crystallogr.* **1994**, *D50*, 847-858.
- ³⁸ A. Andreau, M. Xercavins, F. Fernandez, *Med. Clin. (Barc.)* **1989**, *92*, 409-412.
- ³⁹ J. A. Snyder, A. L. Lloyd, C. V. Lockatell, D. E. Johnson, H. L. T. Mobley, *Inf. Immun.* **2006**, *74*, 1387-1393.
- ⁴⁰ T. M. Hooton, W. E. Stamm, *Infect. Dis. Clin. North. Am.* **1997**, *11*, 551-81.
- ⁴¹ E. H. Beachey, *J. Infect. Dis.* **1981**, *143*, 325-345.
- ⁴² J. Berglund, S. D. Knight, *Adv. Exp. Med. Biol.* **2003**, *535*, 33-52.
- ⁴³ C. Bavington, C. Page, *Respiration* **2005**, *72*, 335-344.
- ⁴⁴ S. J. Hultgren, S. Normark, *Annu. Rev. Microbiol.* **1991**, *45*, 383-415.
- ⁴⁵ M. M. Barnhart, F. G. Sauer, J. S. Pinkner, S. J. Hultgren, *J. Bacteriol.* **2003**, *May*, 2723-2730.
- ⁴⁶ Vetsch, C. Puorger, T. Spirig, U. Grauschopf, E. U. Weber-Ban, R. Glockshuber, *Nature* **2004**, *431*, 329-332.
- ⁴⁷ D. Choudhury, A. Thompson, V. Stojanoff, S. Langermann, J. Pinkner, S. J. Hultgren, S. D. Knight, *Science* **1999**, *285*, 1061-1066.
- ⁴⁸ C. S. Hung, J. Bouckaert, D. Hung, J. Pinkner, C. Widberg, A. Defusco, C. G. Auguste, R. Strouse, S. Langermann, G. Waksman, S. J. Hultgren, *Mol. Micro.* **2002**, *44*, 903-915.
- ⁴⁹ M. A. Shembri, H. Hasman, P. Klemm, *FEMS Microbiol. Lett.* **2000**, *188*, 147-151.
- ⁵⁰ K. W. Dodson, J. S. Pinkner, T. Rose, G. Magnusson, S. J. Hultgren, G. Waksman, *Cell* **2001**, *105*, 733-743.
- ⁵¹ L. Buts, J. Bouckaert, E. D. Genst, R. Loris, S. Oscarson, M. Lahmann, *Mol. Micro.* **2003**, *49*, 705-715.
- ⁵² J. Bouckaert, J. Berglund, M. Shembri, E. D. Genst, L. Cools, M. Wuhrer, C.-S. Hung, J. Pinkner, R. Slättegård, A. Zavialov, D. Choudhury, S. Langermann, S. J. Hultgren, L. Wyns, P. Klemm, S. Oscarson, S. D. Knight, H. D. Greve, *Mol. Micro.* **2005**, *55*, 441-455.
- ⁵³ W. Kramer, K. Sauber, K.-H. Baringhaus, M. Kurz, Siegfried Stengelin, G. Lange, D. Corsiero, F. Girbig, W. König, C. Weyland, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 7291-7301.
- ⁵⁴ C. Jossart, M. Coupal, N. McNicoll, A. Fournier, B. C. Wilkes, A. De Léan, *Biochemistry* **2005**, *44*, 2397-2408.
- ⁵⁵ A. C. Bhasikuttan, A. K. Singh, D. K. Palit, A. V. Sapre, J. P. Mittal, *J. Phys. Chem. A.* **1999**, *103*, 4703-4711.
- ⁵⁶ M. Walter, *Dissertation*, Kiel **2004**.
- ⁵⁷ L. B. Shih, H. Bayley, *Anal. Biochem.* **1985**, *144*, 132-141.
- ⁵⁸ J. Brunner, H. Senn, F. M. Richards, *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 3313-3318.
- ⁵⁹ H. Bayley, J. V. Staros, *Azides and Nitrenes; Scriven E. F. V.* **1984**, Ed. Academic Press, San Diego Cal., *47*, 497-515.
- ⁶⁰ J. F. W. Keana, S. X. Cai, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 3640-3647.
- ⁶¹ C. J. Shields, D. R. Chrisope, G. B. Schuster, A. J. Dixon, M. Poliakoff, J. J. Turner, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 4723-4731.
- ⁶² Y.-Z. Li, J. P. Kirby, M. W. George, M. Poliakoff, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 8092ff.
- ⁶³ M. S. Platz, *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 487-492
- ⁶⁴ N. Soundararajan, M. S. Platz, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 2034-2044.

- ⁶⁵ M. T. J. Young, M. S. Platz, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 6403-6406.
- ⁶⁶ E. W. Meijer, S. Nijhuis, F. C. B. M. Van Vroonhoven, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 7209ff.
- ⁶⁷ M. J. T. Young, M. S. Platz, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 2199-2202.
- ⁶⁸ M. C. Smith, T. C. Furman, T. D. Ingolia, C. Pidgeon, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 7211-5.
- ⁶⁹ T. Meier, *A Laboratory Guide to Biotin-Labeling in Biomolecule Analysis* **1996**; B. F. Fahrenholz Eds.; Birkhäuser.
- ⁷⁰ R. A. Ezekowitz, P. D. Stahl, *J Cell Sci Suppl.* **1988**, *9*, 121-33.
- ⁷¹ *The Recombinant Protein Handbook* **2001**, Amersham, pg. 41.
- ⁷² F. Kogl, B. Tonnis, *Z. Physiol. Chem.* **1936**, *242*, 43-73.
- ⁷³ A. D. Landman, N. N. Landman, *J. Chem. Rev.* **1976**, *53*, 591-592.
- ⁷⁴ L. Pugliese A. Coda, M. Malcovati, M. Bolognesi, *J. Mol. Biol.* **1993**, *231*, 698.
- ⁷⁵ M. Karas, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 2299-2301.
- ⁷⁶ M. Yamashita, J. B. Fenn, *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 4451-4459.
- ⁷⁷ M. Yamashita, J. B. Fenn, *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 4671-4675.
- ⁷⁸ R. Krüger, A. Pfenniger, I. Fourier, M. Gluckmann, M. Karas, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5812-5821.
- ⁷⁹ M. Mann, R. C. Hendrickson, A. Pandey, *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, *70*, 437-473.
- ⁸⁰ S. Schuerch, M. Schaer, K. O. Boernsen, U. P. Schlunegger, *Biol. Mass Spectrom.* **1994**, *23*, 695-700.
- ⁸¹ R. N. Hayes, M. L. Gross, *Methods Enzymol.* **1990**, *193*, 237-263.
- ⁸² M. L. Vestal, J. M. Campbell, *Methods Enzymol.* **2005**, *402*, 79-108.
- ⁸³ K. Biemann, *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **1988**, *16*, 99-111.
- ⁸⁴ J. B. Fenn, M. Mann, C. J. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse, *Science* **1989**, *246*, 64-71.
- ⁸⁵ W. D. Lehmann, *Massenspektrometrie in der Biochemie* **1996**, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- ⁸⁶ Wolf D. Lehmann, *Massenspektrometrie in der Biochemie*, Spektrum Analytik-Verlag, Heidelberg, 1996, S. 100.
- ⁸⁷ S. C. Beu, M. W. Senko, J. P. Quinn, F. M. Wampler, F. W. McLafferty, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1993**, *4*, 557-565.
- ⁸⁸ B. E. Winger, S. A. Hofstadler, J. E. Bruce, H. R. Udseth, R. D. Smith, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1993**, *4*, 566-577.
- ⁸⁹ J. Rosenfeld, J. Capdevielle, J. C. Guillemot, P. Ferrara, *Anal. Biochem.* **1992**, *203*, 173-179.
- ⁹⁰ B. Granvogl, A. Masanek, L. A. Eichacker, *Laborwelt* **2006**, *3*, 12-15.
- ⁹¹ B. Thiede, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2000**, *14*, 496-502.
- ⁹² L. Hedstrom, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4501-4524.
- ⁹³ W. Ma, C. Tang, L. Lai, *Biophys. J.* **2005**, *89*, 1183-1193.
- ⁹⁴ M. P. Bansal, R. G. Cook, K. G. Danielson, D. Medina, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 13780-13784.
- ⁹⁵ J. Houmard, G. R. Drapeau, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1972**, *69*, 3506-3509.
- ⁹⁶ D. W. Cleveland, S. G. Fischer, M. W. Kirschner, U. K. Laemmli, *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 1102-1106.
- ⁹⁷ C. Scheler, S. Lamers, Z. Pan, P. Jungblut, *Electrophoresis* **1998**, *19*, 918-927.
- ⁹⁸ P. A. Jekel, W. J. Weijer, J. J. Beintema, *Anal. Biochem.* **1983**, *134*, 347-354.
- ⁹⁹ W. P. Michalski, B. J. Shiell, *Analytica Chimica Acta* **1999**, *383*, 27-46.
- ¹⁰⁰ S. D. Patterson, *Electrophoresis* **1995**, *16*, 1104-1114.

- ¹⁰¹ L. Wang, G. Amphlett, W. Zhang, *Pharm. Res.* **2005**, *22*, 1338-1349.
- ¹⁰² G. Choudhary, W. S. Hancock, *J. Proteom Res.* **2003**, *2*, 59-67.
- ¹⁰³ C. Wa, D. S. Hage, *Anal. Biochem.* **2006**, *349*, 229-241.
- ¹⁰⁴ M. Walter, M. Wiegand, Th. K. Lindhorst, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 719-728.
- ¹⁰⁵ J. Brunner, *Ann. Rev. Biochem.* **1993**, *62*, 483-514.
- ¹⁰⁶ J. Brunner, H. Senn, F. M. Richards, *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 3313-3318.
- ¹⁰⁷ M. Nassal, *Liebigs Ann. Chem.* **1983**, 1510-1523.
- ¹⁰⁸ Y. Hatanaka, M. Hashimoto, H. Kurihara, H. Nakayama, Y. Kanaoka, *J. Org. Chem* **1994**, *59*, 383-387.
- ¹⁰⁹ Y. Hatanaka, M. Hashimoto, Y. Kanaoka, *Bioorg. Med. Chem.* **1994**, *2*, 1367-1373.
- ¹¹⁰ G. H. Posner, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 940-951.
- ¹¹¹ H. Schuttenberg, R. C. Schulz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1976**, *24*, 848-849; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1976**, *15*, 777-778.
- ¹¹² R. F. R. Church M.J. Weiss, *J. Org. Chem.* **1970**, *35*, 2465-2471.
- ¹¹³ A. Reiser, H. M. Wagner, *The Chemistry of the Azido Group (Ed.: S. Patai)*, Wiley New York **1973**, 441-501.
- ¹¹⁴ R. Abramovich, *Organic Reactive Intermediates (Ed.: S. P. McManus)*, Academic Press, New York **1973**, 127-192.
- ¹¹⁵ G. B. Schuster, M. S. Platz, *Adv. Photochem.* **1992**, *17*, 69-107.
- ¹¹⁶ J. Keana, S. X. Cai, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 3640-3647.
- ¹¹⁷ K. Stromgaard, D. R. Saito, H. Shindou, S. Ishii, T. Shimizu, K. Nakanishi, **2002**, *45*, 4038-4046.
- ¹¹⁸ T. Autrey, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 5814-5820.
- ¹¹⁹ I. Woelfle, B. Sauerwein, T. Autrey, *Photochem. Photobiol.* **1988**, *47*, 497-501.
- ¹²⁰ M. E. Sigman, T. Autrey, G. M. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4297-4305.
- ¹²¹ M. J. T. Young, M. S. Platz, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 2199-2202.
- ¹²² W. L. Karney, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 3347-3350.
- ¹²³ K. A. H. Chehade, H. P. Spielmann, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 4949-4953.
- ¹²⁴ R. Poe, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 5054-5067.
- ¹²⁵ J. Michalak, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 14028-14036.
- ¹²⁶ J. H. Billmann, J. W. McDowell, *contribution from the Chemistry Laboratory of Indiana University* **1961**, *26*, 1437-1440.
- ¹²⁷ R. R. Schmidt, J. Michel, M. Roos, *Liebigs Ann. Chem.* **1984**, 1342-1357.
- ¹²⁸ R. R. Schmidt, W. Kinzy, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1994**, *50*, 21-123.
- ¹²⁹ G. Zemplén, E. Pascu, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1929**, *62*, 1613-1614.
- ¹³⁰ A. Y. Chernyak, G. V. M. Sharma, L. Kononov, P. R. Krishna, A. B. Levinsky, N. K. Kochetkov, *Carbohydr. Res.* **1992**, *223*, 303-309.
- ¹³¹ R. Roy, J. M. Kim, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *111*, 380-384; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 369-372.
- ¹³² J. Dahmen, T. Frejd, G. Grönberg, T. Lave, G. Magnusson, G. Noori, *Carbohydr. Res.* **1983**, *116*, 303-307.
- ¹³³ L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397-4398.
- ¹³⁴ M. Wiegand, Th. K. Lindhorst, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 4841-4851.
- ¹³⁵ G. D. Prestwich, G. Dorman, *Biochemistry* **1994**, *33*, 5661-5673.
- ¹³⁶ Y. Hatanaka, Y. Sadakane, *Curr. Top. Med. Chem.* **2002**, *2*, 271-88.
- ¹³⁷ T. Weber, J. Brunner, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3084-3095.
- ¹³⁸ T. Nakayama, H. G. Khorana, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 15762-15769.

- ¹³⁹ J. J. Tate, J. Persinger, B. Bartholomew, *Nucleic Acid Res.* **1998**, *26*, 1421-1426.
- ¹⁴⁰ P. J. A. Weber, A. G. Beck-Sickinger, *J. Peptide Res.* **1997**, *49*, 375-383.
- ¹⁴¹ M. D. Gasparo, *Pharmacol Rev.* **2000**, *52*, 415-472.
- ¹⁴² R. Touyz, C. Berry, *J. Med. Biol. Res.* **2002**, *35*, 1001-1015.
- ¹⁴³ M. Liebau, *Dissertation, Göttingen* **2005**.
- ¹⁴⁴ Die entsprechenden ESI-FT-ICR-MS/MS-Spektren wurden in Kooperation mit PD Dr. B. Lindner am Forschungszentrum Borstel aufgenommen.
- ¹⁴⁵ A. Sinz, *J. Mass. Spectrom.* **2003**, *38*, 1225-1237.
- ¹⁴⁶ M. B. Comisarov, A. G. Marshall, *Chem. Phys. Lett.* **1974**, *25*, 282-283.
- ¹⁴⁷ Q. Wu, S. Van Orden, X. Cheng, R. Bakhtiar, R.D. Smith, *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 2498-509.
- ¹⁴⁸ K. Biemann, *Biomed. Environ. Mass. Spectrom.* **1988**, *16*, 99-111.
- ¹⁴⁹ Die entsprechenden MALDI-TOF-TOF-Spektren wurden in Kooperation mit Dr. Christoph Gelhaus am Institut für Zoophysiologie der Christian-Albrechts-Universität Kiel aufgenommen.
- ¹⁵⁰ M. Lubeck, *ABRF Poster Präsentation* **2006**.
- ¹⁵¹ R. S. Johnson, *Int. J. Mass. Spectrom. and Ion Proc.* **1988**, *86*, 137-154.
- ¹⁵² A. Holmberg, A. Blomstergren, O. Nord, M. Lukacs, J. Lundeberg, M. Uhlen, *Electrophoresis* **2005**, *26*, 501-510.
- ¹⁵³ M. Blum, H. Beier, H. J. Gross, *Electrophoresis* **1987**, *8*, 93-99.
- ¹⁵⁴ J. Kyse-Anderson, *J. Biochem. Biophys. Methods* **1984**, *10*, 203-209.
- ¹⁵⁵ <http://prospector.ucsf.edu/>
- ¹⁵⁶ K. E. Doucette, F. Y. Aoki, *Expert Opin. Pharmacother.* **2001**, *2*, 1671-1683.
- ¹⁵⁷ Y. Okubo, N. Shibata, T. Matsumoto, M. Suzuki, C. Schuerch, S. Suzuki, *J. Bacteriol.* **1980**, *144*, 92-96.
- ¹⁵⁸ K. A. Krogfeld, P. Klemm, *Microb. Path.* **1988**, *4*, 231-238.
- ¹⁵⁹ P. Klemm, *Methods in Microbiol.* **1998**, *27*, 239-248.
- ¹⁶⁰ C. H. Jones, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1993**, *90*, 8397-8401.
- ¹⁶¹ N. Firon, *Infect. Immun.* **1987**, *55*, 472-476.
- ¹⁶² Th. K. Lindhorst, C. Kieburg, U. Krallmann-Wenzel, *Glycoconjugate J.* **1998**, *15*, 605-613.
- ¹⁶³ N. Röckendorf, O. Sperling, Th. K. Lindhorst, *Austr. J. Chem.* **2002**, *55*, 87-93.
- ¹⁶⁴ N. Sharon, *FEBS Lett.* **1987**, *217*, 145-157.
- ¹⁶⁵ Die Molekül-Dynamik-Simulationen wurden im Rahmen einer Arbeitskreis-internen Kooperation mit Herrn Dr. rer. nat. Andreas Fuchs durchgeführt.
- ¹⁶⁶ A. Fuchs, *Dissertation, Kiel* **2006**.
- ¹⁶⁷ M. Rarey, B. Kramer, T. Lengauer, G. Klebe, *J. Mol. Biol.* **1996**, *261*, 470-489.
- ¹⁶⁸ M. Rarey, S. Wefing, T. Lengauer, *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1996**, *10*, 41-54.
- ¹⁶⁹ M. Rarey, B. Kramer, T. Lengauer, *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1997**, *11*, 369-384.
- ¹⁷⁰ B. Kramer, M. Rarey, T. Lengauer, *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **1999**, *37*, 228-241.
- ¹⁷¹ Tripos Inc. SYBYL, *Version 6.8* **2001**, *Tripos Inc.*
- ¹⁷² T. I. SYBYL, *Version 6.9* **2002**, *Tripos Inc.*
- ¹⁷³ P. S. Charifson, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 5100-5109.
- ¹⁷⁴ R. D. Clark, *J. Mol. Graphics Modell.* **2002**, *20*, 281-295.
- ¹⁷⁵ M. L. Conolly, *Science* **1983**, *221*, 709-713.
- ¹⁷⁶ O. Sperling, *Dissertation, Kiel* **2006**.
- ¹⁷⁷ O. Sperling, A. Fuchs, Th. K. Lindhorst, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 3913-3922.

- ¹⁷⁸ <http://prowl.rockefeller.edu/>
¹⁷⁹ <http://www.expasy.ch/sprot/>
¹⁸⁰ U. K. Laemmli, *Nature* **1970**, 227, 680-685.
¹⁸¹ H. Schägger, G. von Jagow, *Anal. Biochem.* **1987**, 166,368-379.
¹⁸² W. N. Burnette, *Anal. Biochem.* **1981**, 112, 195-203.
¹⁸³ M. Blum, *Electrophoresis* **1987**, 8, 93-99.
¹⁸⁴ J. Kyse-Anderson, *J. Biochem. Biophys. Methods* **1984**, 10, 203-209.
¹⁸⁵ L. Harlowe, M.A.Lane: *Antibodies: A laboratory manual* **1988**, Cold Spring Harbour.
¹⁸⁶ A. Schevchenko, *Procl. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 14440-14445.
¹⁸⁷ Millipore, *Application Manual*.
¹⁸⁸ P. S. Charifson, *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 5100-5109.
¹⁸⁹ R. D. Clark, *J. Mol. Graphics Modell.* **2002**, 20, 281-295.