Moritz Bosse Biskup

Darstellung von Kohlenhydrat-Arrays

Studium von Kohlenhydrat-Lectin-Wechselwirkungen

Cuvillier Verlag Göttingen

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Darstellung von Kohlenhydrat-Arrays

Studium von

Kohlenhydrat-Lectin-Wechselwirkungen

Moritz Bosse Biskup

2006

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek
Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über http://dnb.ddb.de abrufbar.
1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2006
Zugl.: Konstanz, Univ., Diss., 2006
ISBN 3-86727-004-X

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2006
Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen
Telefon: 0551-54724-0
Telefax: 0551-54724-21
www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.
1. Auflage, 2006
Gedruckt auf säurefreiem Papier

ISBN 3-86727-004-X

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Darstellung von Kohlenhydrat-Arrays

Studium von

Kohlenhydrat-Lectin-Wechselwirkungen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
an der Universität Konstanz
Mathematisch-Naturwissenschaftliche Sektion
Fachbereich Chemie

vorgelegt von
Moritz Bosse Biskup
aus Kiel

2006

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Bibliographische Informationen:

Alle Rechte beim Autor und Prof. Dr. Richard R. Schmidt.

Dissertation der Universität Konstanz
Tag der mündlichen Prüfung: 9. August 2006
Referent: Prof. Dr. Richard R. Schmidt
Referent: Prof. Dr. Thomas Exner

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Der praktische Teil dieser Arbeit wurde vom April 2002 bis April 2006 am Fachbereich Chemie der Universität Konstanz in der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Richard R. Schmidt angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Richard R. Schmidt danke ich für die Überlassung des Themas, sowie die freundliche Betreuung und Unterstützung während der gesamten Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Thomas Exner danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Schmidt bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit.

Frau Anke Friemel und Herrn Ulrich Haunz danke ich für die Unterstützung bei der NMR-spektroskopischen Strukturbestimmung.

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis **xi**

1 Einleitung **1**

1.1 Kohlenhydrate 1

1.1.1 Vorkommen von Saccharidstrukturen 3

1.1.2 Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen 6

1.2 Analytik von Kohlenhydrat–Protein–Wechselwirkungen 11

1.2.1 Microarray-Technik 12

1.2.1.1 Lectin-Microarrays 13

1.2.1.2 Kohlenhydrat-Microarrays 14

1.3 Aufgabenstellung 15

2 Allgemeine Betrachtungen **19**

2.1 Wahl der Methode zur Kohlenhydratderivatisierung 21

2.1.1 Verfahren zur *O*-Glycosidsynthese 21

2.1.2 Fazit 28

2.2 Wahl der Immobilisierungsmethode 30

2.2.1 Methoden zur spezifischen, kovalenten Verknüpfung . . . 30

2.2.1.1 Reduktive Aminierung 33

2.2.1.2 Amidbindungsbildung 34

2.3 Detektion der Kohlenhydrat-Lectin-Wechselwirkung 35

3 Durchgeführte Synthesen **39**

3.1 Synthesen von Linkerbausteinen 39

3.1.1 Triethylenglykolderivate mit Hydroxyfunktionen 40

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

3.1.1.1 Terminale Aminofunktionalitäten 41
3.1.1.2 Terminale Aldehydfunktionalitäten 43
3.1.1.3 Terminale Carboxylfunktionalitäten 48
3.1.2 Allylische Bromide auf Triethylenglykolbasis 50
3.1.3 Zyklische Sulfate auf Triethylenglykolbasis 54
3.2 Synthese fluoreszenzmarkierter Kohlenhydrate 58
3.2.1 Synthese des Azidoglucosyldonors **42** 59
3.2.2 Herstellung der freien Amine **45** und **49** 60
3.2.3 Einführen des Fluoreszenzlabels 63
3.2.3.1 Fluoresceinisothiocyanat als Reaktivfarbstoff . . 65
3.2.3.2 Dansylchlorid als Reaktivfarbstoff 69
3.2.3.3 Sulforhodamin B Säurechlorid als Reaktivfarbstoff 71
3.3 Glycosidsynthesen ausgehend von Trichloracetimidaten 73
3.4 Glycosidsynthesen mittels *O*-Alkylierung 78
3.4.1 Anomere *O*-Alkylierung mit Alkenylbromiden 78
3.4.1.1 Vorversuche mit dem Alkenylbromid **26** 79
3.4.1.2 Umsetzungen mit den Bromiden **25**, **26**, **27** und **28** 86
3.4.2 Anomere *O*-Alkylierung mit dem zyklischen Sulfat **36** . . 89

4 Microarray-Untersuchungen 93
4.1 Allgemeines 93
4.2 Untersuchung der Immobilisierung durch reduktive Aminierung 95
4.2.1 Messungen mit dem ELISA-Plattenreader 96
4.2.2 Messungen mit dem Fluoreszenzmikroskop 96
4.2.3 Messungen mit dem Array-Scanner 99
4.3 Kohlenhydrat-Lectin-Wechselwirkungen 102

5 Experimental Section 107
5.1 Reagents and Equipment 107
5.2 General Procedures 110
5.3 Substances 112

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

6 Selected Spectra **183**

7 Zusammenfassung **241**

Lebenslauf **251**

Literaturverzeichnis **253**

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Abkürzungsverzeichnis

AC	acetone / Aceton
Ac	Acetyl-
Ac_2O	Essigsäureanhydrid
Bn	Benzyl-
ConA	Concanavalin A
CRD	carbohydrat recognizing domain / Kohlenhydrat-Bindestelle
DBU	1,8-Diazabicyclo[5,4,0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	dichlormethane / Methylenchlorid
DIPEA	Hünigs Base / *N,N*-Diisopropylethylamin
DMAP	Steglichs Base / 4-Dimethylaminopyridin
DMF	*N,N*-Dimethylformamid
DMPU	Dimethylpropylenharnstoff
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EE	ethyl acetate / Essigsäureethylester
FI	Fluoreszenzintensität
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HMPT	Hexamethylphophorsäuretriamid
HPLC	high performance liquid chromatograpy / Hochleistungsflüssigchromatographie

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

IEC	ion exchange chromatography / Ionenaustauschchromatographie
Im	Imidazol
IR	infrared / Infrarot
MALDI	matrix assisted laser desorption ionisation
MeCN	Acetonitril
MeIm	Methylimidazol
MPLC	medium pressure liquid chromatography / Mitteldruckflüssigchromatographie
MS-4Å	Molekularsieb 4 Å Porengröße
NHSS	*N*-Hydroxysulfosuccinimid
NMR	nuclear magnetic resonance / magnet. Kernresonanz
PDB	Protein DataBase
PE	petroleum ether / Petroleumbenzin (leichtsiedend)
PNA	peanut agglutinin / Erdnuss Agglutinin
Pyr	Pyridin
RID	refractive index detector / Brechungsindexdetektor
RP	reversed phase
TBAB	Tetrabutylammoniumbromid
$TBAHSO_4$	Tetrabutylammoniumbisulfat
TBAI	Tetrabutylammoniumiodid
TBDPS	*tert*-Butyldiphenylsilyl-
TCM	trichloromethane/ Chloroform
TEA	triethylamine / Triethylamin
TEG	Triethylenglykol
Tf	Trifluormethansulfonyl
TFA	Trifluoressigsäure
TFAA	Trifluoressigsäureanhydrid

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

THF	Tetrahydrofuran
TLC	thinlayer chromatography / Dünnschichtchromatographie
TMS	Trimethylsilyl-
Tol	toluene / Toluol
Troc	Trichlorethoxycarbonyl-
Ts	*p*-Toluolsulfonyl-
UV	ultraviolet / Ultraviolett
VIS	visible / sichtbar
WGA	wheat germ agglutinin / Weizenkeim Agglutinin

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

1 Einleitung

In den letzten Jahren haben die Aktivitäten im Bereich der Glycobiologie und der Kohlenhydratchemie zugenommen. Durch Fortschritte in der Aufklärung natürlicher Kohlenhydratstrukturen, in der Synthese zunehmend komplexer Kohlenhydrate oder deren Mimetika, sowie wegen ersten therapeutischen Anwendungen auf Kohlenhydratbasis werden zunehmend rascher Einblicke in die vielfältigen Rollen der Kohlenhydrate in biologischen Systemen gewonnen[1]. Diese Entwicklung stellt neue Anforderungen an die Entwicklung und Etablierung neuer synthetischer, aber auch analytischer Methoden.

1.1 Kohlenhydrate

Kohlenhydrate, Saccharide, sind, bezogen auf die Masse, die am häufigsten vorkommenden Biomoleküle. Sie werden in Mengen von einigen 100 Milliarden Jahrestonnen durch Photosynthese produziert. Die photosynthetisch gewonnene Energie wird in Form der Kohlenhydrate chemisch gespeichert und steht den Organismen durch Glycolyse wieder zur Verfügung[2].

Die Bezeichnung „Kohlenhydrat“ stammt aus dem 18. Jahrhundert und lässt sich auf die allgemeine Summenformel $C_n(H_2O)_n$ der meisten Saccharide zurückführen. Man schloss daraus, dass es sich um Wasseraddukte / Hydrate der Kohle handele. Rasch zeigte sich jedoch, dass Kohlenhydrate Alkohol- und Carbonylfunktionalitäten enthalten. Daher werden heutzutage Monosaccharide als

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Aldehyd- (vgl. **A1**, **A2**, **A3**) oder Keton-Derivate (vgl. **A4**) von Polyhydroxyalkoholen mit Kettenlängen von wenigstens drei Kohlenstoffatomen definiert, die in der Regel in Form der cyclischen Halbacetale vorliegen (siehe Abbildung 1.1). Ferner zählt man deren Derivate, die man durch Oxidation zu Zuckersäuren, durch Reduktion zu Polyalkoholen oder durch Derivatisierung der Hydroxygruppen erhalten kann, zu den Kohlenhydraten; so erhält man Aminozucker (vgl. **A5**), Desoxyzucker (vgl. **A6**), phosphorylierte oder sulfatierte Zucker. Verknüpft man zwei Monosaccharide unter Wasserabspaltung führt dies zu Disacchariden (vgl. **A7** oder **A8**); wird dies fortgesetzt erhält man Oligo- oder Polysaccharide[3]. Kohlenhydrate bilden neben den Lipiden, Peptiden und Nucleinsäuren eine weitere Klasse an bedeutenden Naturstoffen. Die Polysaccharide gehören neben den Proteinen und Nucleinsäuren zu den bedeutendsten natürlichen Makromolekülen[2,4].

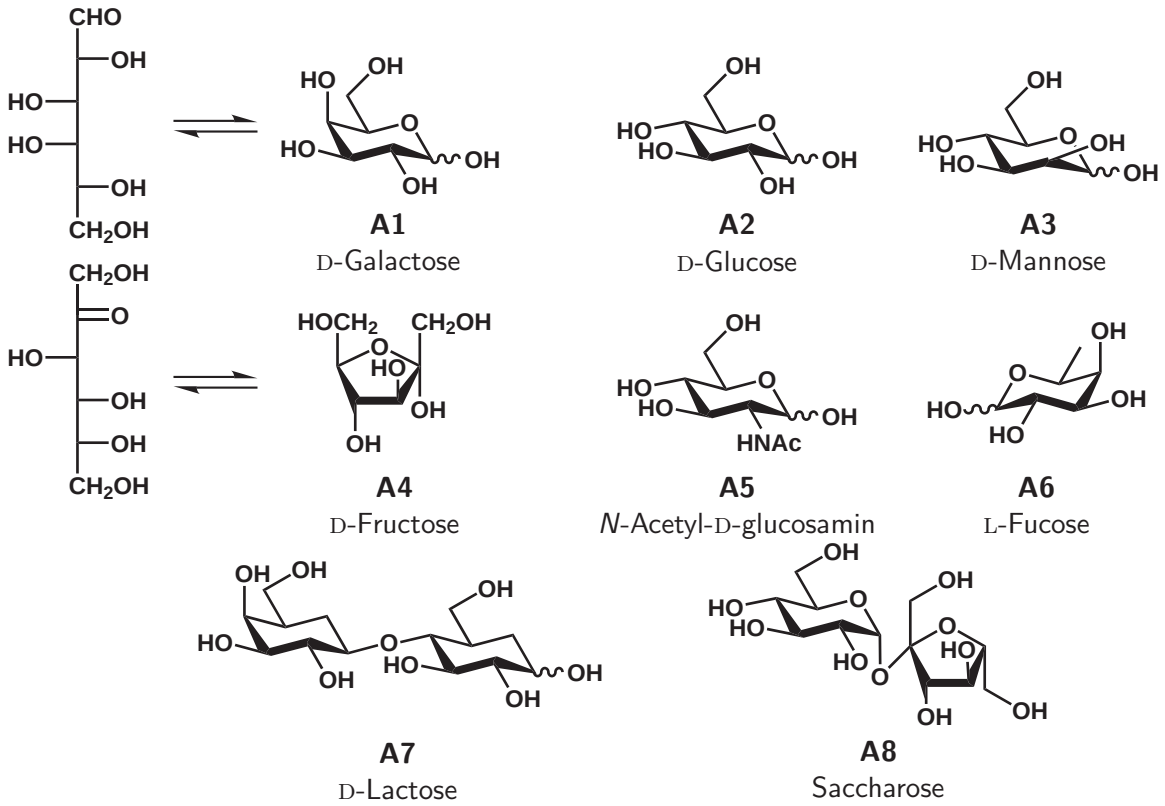

Abbildung 1.1: *Einige einfache Kohlenhydrate.*

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

1.1.1 Vorkommen von Saccharidstrukturen

Das Vorkommen und die Strukturen der großen Polysaccharide, wie zum Beispiel Chitin, Cellulose, Stärke oder Glykogen, sind seit langem bekannt. Diese aus mehreren hunderten oder tausenden einzelnen Saccharidbausteinen aufgebauten Polysaccharide haben ihre Bedeutung als Energiespeicher oder als Bestandteil von Zellgerüsten. Ihre Struktur ist bestimmt durch die repetitive, einheitliche Verknüpfung einzelner Monosaccharide oder kurzer Wiederholungssequenzen zu langen, teils verzweigten Ketten. Neben der Erforschung von Chemie und Struktur dieser Makromoleküle, lag lange Zeit ein Schwerpunkt der Kohlenhydratchemie in der Aufklärung der Stereochemie der Monosaccharide und ihrer einfachen Oligomere. Von besonderer Bedeutung sind hierbei die systematischen Arbeiten von E. FISCHER, die Ende des neunzehnten Jahrhunderts die ersten Synthesen sowie die relativen Zuweisungen der Stereochemie von Zuckern ermöglichten[5–9], sowie die im Jahre 1951 erfolgte Zuordnung der absoluten Konfiguration von Rubidiumtartrat durch J. M. BIJVOET[10].

Der Erforschung der Strukturen komplexerer Oligosaccharide kam jedoch erst deutlich später Interesse zu. Zwar sind vereinzelte Berichte über das Auffinden komplexerer Zuckerstrukturen aus den Dreißiger Jahren des letzten Jahrhunderts vorhanden; so zum Beispiel von A. NEUBERGER, der eine Substanz beschreibt, die Asparaginsäure, D-Mannose und D-Glucosamin enthält[11]. Dies ist eine der ersten Beschreibungen eines „Glycokonjugates“ in der Fachliteratur. Die Erkenntnis NEUBERGERS, dass Konjugate einer Oligosaccharidstruktur, einem Glycan, mit einem Aglycon in der Natur weit verbreitet vorkommen, setzte sich jedoch erst in der Mitte des letzten Jahrhunderts durch. Zuvor hielt man die bei der Isolierung von Proteinen anfallenden Zucker oftmals für Verunreinigungen. Heute weiss man, dass solche Glycokonjugate in allen Organismen vorkommen und dass sie eine Vielzahl an Aufgaben innerhalb der Zellen und Organismen innehaben[2].

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Am weitesten verbreitet sind die Konjugationen von Zuckern mit Lipiden zu Glycolipiden und mit Proteinen zu Glycoproteinen. Glycoproteine sind Proteine, die kovalent gebundene Kohlenhydratstrukturen tragen. Man geht heute davon aus, dass mehr als die Hälfte aller Proteine glycosyliert sind[2,12]. Die Glycanreste finden sich in allen biologischen Bereichen, in Proteinklassen unterschiedlichster Arten, bei Enzymen, Transporter- und Rezeptorproteinen, bei Hormonen und Strukturproteinen. Der Anteil des Glycans am Molekulargewicht kann von verschwindend gering (< 1 % im Collagen) bis zu deutlich überwiegend (> 90 % im Glykogen) reichen[2]. Die Verknüpfung der Glycane mit dem Proteinstrang erfolgt in der Regel *N*-glycosidisch über die Aminofunktion der Seitenkette von Asparagin oder *O*-glycosidisch über die Hydroxyfunktionen in den Seitenketten von Threonin oder Serin[13]. Seltener sind *C*-glycosidische Verknüpfungen[14].

Glycane als Informationsträger

In den Doppellipidschichten der Zellmembran findet sich eine Vielzahl an Glycokonjugaten, die ihre Glycanstrukturen in den interzellulären Raum hinein präsentieren; so zum Beispiel membranständige Glycoproteine, Glycolipide oder Glycosylphosphatidylinositole. Diese Kohlenhydratstrukturen auf der Zellmembran bilden die *Glycocalix*, eine Hülle aus Zuckermolekülen, die die Zelle umgibt (vgl. Abbildung 1.2)[2]. Eine Besonderheit der Glycanstrukturen ist ihre hohe

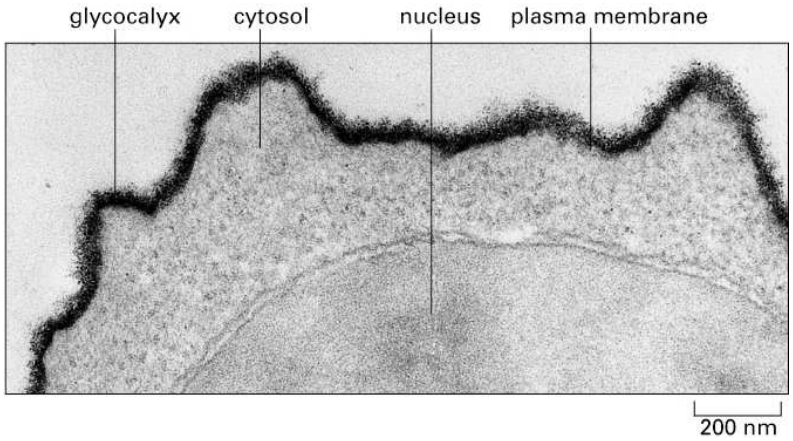

Abbildung 1.2: *Schnitt durch eine Zelle, die Glycocalix ist am Zellrand zu erkennen*[15].

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Tabelle 1.1: *Anzahl der Konstitutionsisomeren bei Peptiden und Kohlenhydraten*

Zahl der monomeren Einheiten	Konstitution	Oligopeptide	Oligosaccharide
2	AA / AB	1 / 2	11 / 20
3	AAA / ABC	1 / 6	120 / 720
4	AAAA / ABCD	1 / 24	1424 / 34 560
5	AAAAA / ABCDE	1 / 1290	17872 / 2 144 640

strukturelle Vielfalt, sowie die Komplexität der von ihnen ausgebildeten Strukturen. Vergleicht man die einzelnen Bausteine biologischer Makromoleküle, so fällt auf, dass Nucleinsäuren und Proteine aus bifunktionellen Monomereinheiten bestehen. Nucleotide tragen an ihrer 3′-Position eine Hydroxygruppe und an der 5′-Position einen Phosphorsäureester, während Aminosäuren eine Carboxylgruppe und α-ständig hierzu eine Aminogruppe tragen; dies führt zu linearen Oligomeren. Kohlenhydrate hingegen haben mehrere chemisch nahezu äquivalente Alkoholfunktionen, sowie eine Halbacetalfunktion; dies lässt eine Vielzahl unterschiedlicher Verknüpfungsmöglichkeiten bei der Kettenverlängerung zu, einschließlich der Möglichkeit, Verzweigungen zu bilden. Zusammen mit der hohen Zahl stereogener Zentren pro Monosaccharid führt dies zu einer rasch anwachsenden Zahl an Isomeren. Bereits beim Einsatz von fünf verschiedenen Monosacchariden sind über zwei Millionen Oligosaccharide möglich (vgl. Tabelle 1.1)[16–18]. Diese strukturelle Vielfalt wird in der Natur zur Ablage , bzw. Speicherung von Informationen genutzt und erklärt das ubiquitäre Erscheinen von Glycokonjugaten, sowie die vielen, von ihnen wahrgenommenen Aufgaben[19].

Das von F. CRICK postulierte *Zentrale Dogma der Molekularbiologie*, dass die Weitergabe von Information ausgehend vom Erbgut zum Protein erfolgt und dass diese Weitergabe templatbasiert ist[20], gilt nicht für die Glycanstrukturen einer Zelle. Vielmehr wird das Glycom, die Gesamtheit der Glycanstrukturen einer Zelle, dynamisch durch Enzyme aufgebaut, die Kohlenhydratbindungen knüpfen (Glycosyltransferasen), wandeln (Gylcosylisomerasen) oder spalten (Glycosidasen). Somit bestimmt sich die Struktur eines Glycoproteins durch die im

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

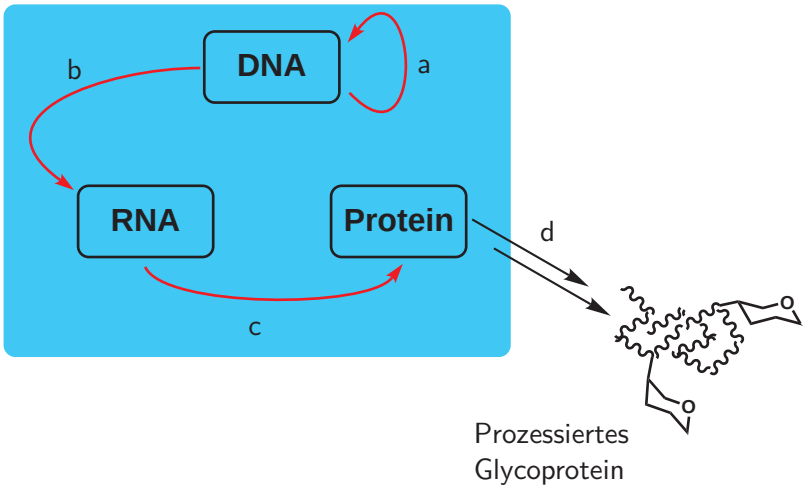

Abbildung 1.3: *Schematischer Ablauf der Informationsweitergabe bei der Synthese eines Glycoproteins. Templatbasierte Schritte (grau hinterlegt) Replikation (a), Transcription (b) & Translation (c). Posttranslationale Modifikationen (d).*

Erbgut fixierte Aminosäurensequenz des Peptidrückgrats (vgl. blau hinterlegter Teil der Abbildung 1.3), gefolgt von einer Vielzahl posttranslationaler Prozessierungen des Polypeptids zum fertigen Protein. Solche posttranslationalen Änderungen beinhalten proteolytische Spaltungen der Aminosäurensequenz, sowie kovalente Modifikationen (z. B. die Glycosylierung). Der nichttemplatgesteuerte Auf- und Umbau ermöglicht eine Variation der Glycanstruktur, je nach Alter oder Zustand der Zelle.

1.1.2 Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen

Kohlenhydrate in der molekularen Erkennung

Die in den Glycanen der Zelloberfläche gespeicherte und so der Umgebung präsentierte Information bestimmt eine Reihe physiologischer und pathologischer Prozesse. Diese, zur Wechselwirkung mit anderen Molekülen zur Verfügung stehenden Teile der Oberflächen einer Struktur, nennt man Epitope. Die Verwertung, d.h. die Entzifferung der Information erfolgt durch nichtkovalente Wech-

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

selwirkungen der Epitope der Glycanstrukturen mit anderen Strukturen im biologischen System; so zum Beispiel durch Wechselwirkungen mit kohlenhydratprozessierenden Enzymen, Antikörpern oder Lectinen. In Abbildung 1.4 ist eine Auswahl möglicher Wechselwirkungspartner für Glycokonjugate gezeigt.

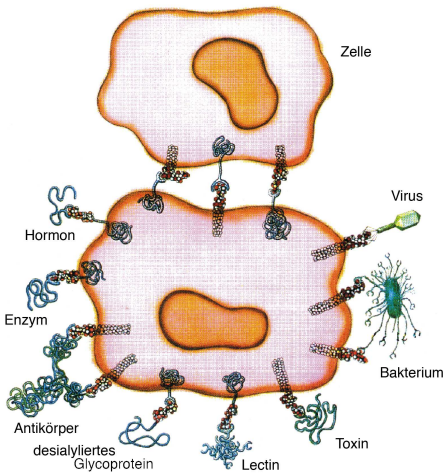

Abbildung 1.4: *Mögliche Wechselwirkungspartner für Glycokonjugate*[21].

Zu den Prozessen, an denen solche Wechselwirkungen beteiligt sind, zählen unter anderem der intrazelluläre Transport und die Lokalisation von Glycoproteinen, sowie deren Abbau aus dem Blutkreislauf. Von speziellem Interesse für diese Arbeit sind die Wechselwirkungen der auf Zelloberflächen lokalisierten Glycane mit der extrazellulären Matrix. Hierzu gehören Zellerkennungsvorgänge im Verlauf der Entwicklung, bei der Rekrutierung von Leukozyten zu Entzündungsherden, das Erkennen von Wirtszellen bei viralen oder bakteriellen Infektionen oder bei der Bildung von Tumor-Metastasen[22–26].

Multivalente Wechselwirkungen

Die Wechselwirkungen von Kohlenhydratepitopen untereinander, aber auch mit anderen Molekülen, sind in aller Regel nicht-kovalenter Natur. Die Affinitäten solcher Wechselwirkung sind im Vergleich zur Stärke einer kovalenten Bindung

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

gering (so liegen die Gleichgewichtskonstanten der Bindung von einzelnen Kohlenhydratepitopen an Proteine (K_I) im milli- bis mikromolaren Bereich[27,28]). Dennoch werden bei Experimenten zur Kohlenhydrat-Kohlenhydrat- oder Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkung selektive, stark ausgeprägte Bindungen beobachtet[18]. Bei Bindungsuntersuchungen in biologischen Systemen treten in der Regel nicht vereinzelte Wechselwirkungen zwischen zwei einzelnen Molekülen auf, vielmehr weisen die beteiligten Einheiten (Zelle, Protein, Antikörper) mehrere gleichartige Liganden, bzw. Rezeptoren auf. Solche Teilchen, die mehrere gleichgeartete Bindungsstellen besitzen, nennt man multivalent[29,30]. Bei der Interaktion multivalenter Teilchen werden die einzelnen schwachen, jedoch selektiven Wechselwirkungen verstärkt; man erhält starke Bindungen mit hoher Selektivität. Solche Wechselwirkungen sind in Abbildung 1.5 schematisch dargestellt.

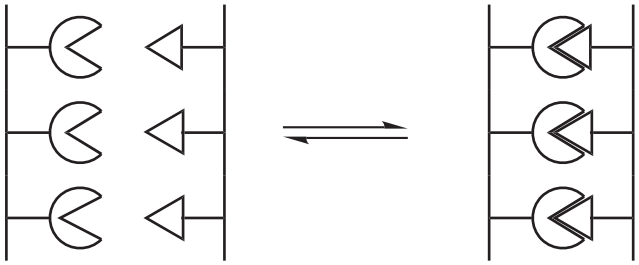

Abbildung 1.5: *Schematische Darstellung der Interaktion multivalenter Teilchen*[29].

Weiterhin ist in multivalenten Komplexen zusätzlich zu den in Summe starken Wechselwirkungen der Ligand–Rezeptor–Paare eine Unterstützung der Komplexbildung durch Kooperativitätseffekte möglich. Dieses Phänomen tritt bei multivalenten Bindungen auf, wenn die Bindung eines ersten Liganden die Bindung weiterer Liganden begünstigt (positiver homotroper allosterischer Effekt). Zurückzuführen ist dies entweder auf Änderungen der Konformation des Rezeptors nach dem ersten Bindeereignis, oder auf die Anwesenheit eines weiteren Liganden eines polyvalenten Binders im richtigen Abstand zur nächsten Bindestelle. Ferner sind die folgenden Bindungsereignisse entropisch begünstigt, da

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

der wesentliche Entropieverlust (Zusammenlagern zweier Teilchen) bereits beim ersten Binden erfolgte.

Lectine

Ein Protein, das Kohlenhydrate bindet, wurden erstmals vor 140 Jahren im Giftserum der Klapperschlange entdeckt und *Agglutinin* genannt, da es rote Blutkörperchen zum Zusammenklumpen bringt[31]. Am Ende des neunzehnten Jahrhunderts isolierte man Proteine mit ähnlichen Eigenschaften aus Pflanzen[32]. Mittlerweile hat man in vielen anderen Organismen, von Viren und Bakterien bis zu Pflanzen und höheren Tieren, Proteine mit kohlenhydrat-bindenden Eigenschaften nachgewiesen. In der Literatur hat sich für Proteine dieser Art der Sammelname *Lectine* eingebürgert[33]. Seit der Mitte des zwanzigsten Jahrhunderts ist ein stetig steigendes Wachstum der Lectin-Forschung zu beobachten[24]. Die aktuelle Definition von Lectinen lautet: „*Alle Proteine mit kohlenhydrat-bindenden Domänen, die keine Enzyme oder Immunoglobuline sind, werden als Lectine bezeichnet.*“[19] Aufgrund dieser umfassenden Definition und ihrer weiten Verbreitung gehören zu den Lectinen viele verschiedene Proteine. Sie können je nach Bedarf unter verschiedenen Gesichtspunkten sortiert werden; zum Beispiel nach Herkunft, Sequenzhomologie, Molekulargewicht oder Art des gebundenen Kohlenhydrates. Bei Untersuchungen von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen hat sich eine Lectinklassifizierung nach gebundenem Kohlenhydratepitop durchgesetzt. Aufgrund dieser Spezifität werde Lectine nach dem Monosaccharid, das sie mit der höchsten Affinität binden, in fünf Klassen eingeteilt: D-Mannose, D-Galactose / *N*-Acetyl-D-galactosamin, *N*-Acetyl-D-glucosamin, L-Fucose und *N*-Acetylneuraminsäure. Dies sind zugleich die in Glycanstrukturen am häufigsten auftretenden Zucker. In dieser Arbeit kommen je ein Vertreter der ersten drei Klassen zum Einsatz:

- **Concanavalin A** (ConA), ein mannosebindendes Lectin,
- **Erdnuss Agglutinin** (PNA), ein galactosebindendes Lectin,

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

- und **Weizenkeim Agglutinin** (WGA), ein glucosaminbindendes Lectin.

Sie gehören alle zu den sogenannten *einfachen* Lectinen, d.h. sie bestehen aus mehreren kleinen Untereinheiten mit Molekulargewichten bis 40 kDa, die jeweils Bindestellen (CRD) für das gleiche Kohlenhydratepitop aufweisen. In den Abbildungen 1.6 - 1.8 sind die Strukturen dieser drei Lectine gezeigt.

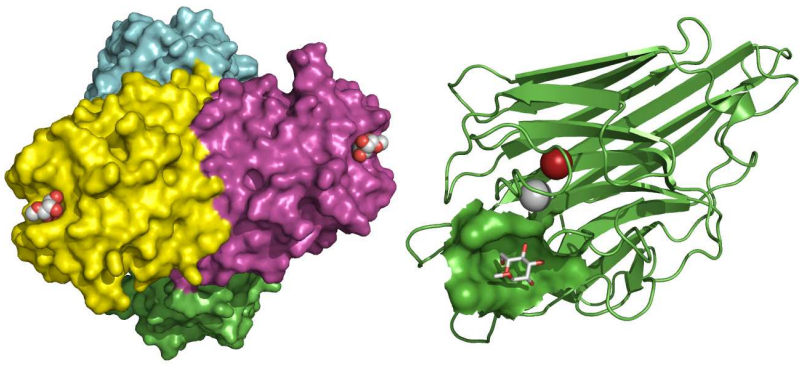

Abbildung 1.6: *Röntgenstruktur von Concanavalin A. links) aus vier Untereinheiten bestehendes Tetramer, mit zwei sichtbaren Liganden (Methyl-α-D-mannosid); rechts) einzelne Untereinheit mit Ligand in der Bindungstasche und Ca^{2+}- (hellgrau) und Mn^{2+}-Ionen (dunkelgrau). PDB-Eintrag: 5CNA*[34].

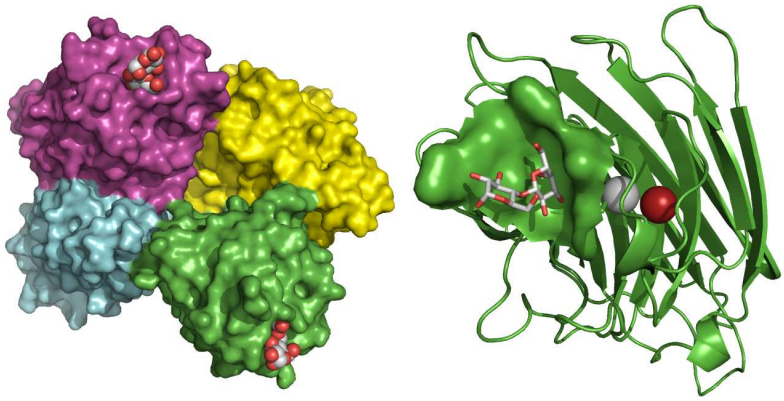

Abbildung 1.7: *Röntgenstruktur von Erdnuss Agglutinin. links) aus vier Untereinheiten bestehendes Tetramer, mit zwei sichtbaren Liganden (α-D-Lactose); rechts) einzelne Untereinheit mit Ligand in der Bindungstasche und Ca^{2+}- (hellgrau) und Mn^{2+}-Ionen (dunkelgrau). PDB-Eintrag: 2PEL*[35].

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

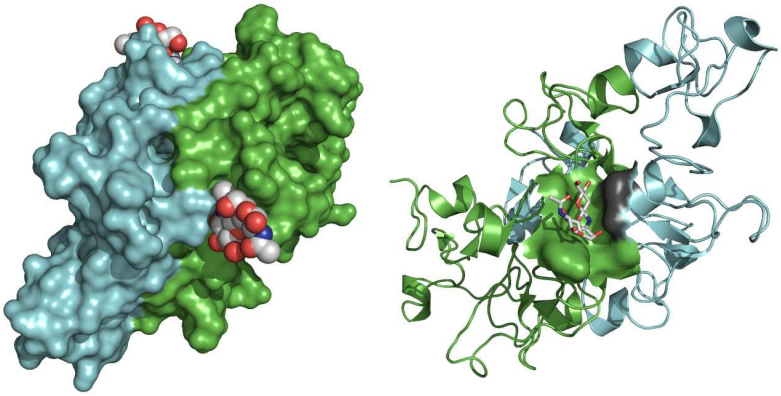

Abbildung 1.8: *Röntgenstruktur von Weizenkeim Agglutinin. links) aus zwei Untereinheiten bestehendes Tetramer, mit zwei sichtbaren Liganden (D-GlcNAc-β-1,4-D-GlcNAc); rechts) Bindungstasche mit gebundenem Kohlenhydrat (Beitrag der „anderen" Untereinheit in dunkelgrau eingefärbt). PDB-Eintrag: 1K7U*[36].

Man erkennt, dass Concanavalin A als Tetramer vier gleichwertiger Untereinheiten vorliegt und so auch vier Kohlenhydrat-Bindestellen (CRD) hat. Erdnuss Agglutinin ist ebenfalls ein Tetramer, während das Weizenkeim Agglutinin nur zwei Untereinheiten hat. Im Fall des WGA wird das Bindeepitop für den Liganden nicht ausschließlich von einer Untereinheit aufgebaut, vielmehr liegt die Bindetasche hier zwischen den beiden Untereinheiten. In den Strukturen von ConA und PNA kann man die in der Nähe der CRD gebundenen Metallionen (Ca^{2+}, Mn^{2+}) erkennen. Diese sind nicht direkt an der Kohlenhydratbindung beteiligt, aber sie sind dennoch zur Stabilisierung der Kohlenhydratbindung nötig. Werden sie entfernt, so führt dies zum völligen Verlust der Affinität für den Kohlenhydratliganden[37].

1.2 Analytik von Kohlenhydrat–Protein–Wechselwirkungen

Um bessere Aussagen über die Funktionen von Lectinen in biologischen Systemen treffen zu können, müssen mehr als qualitative Aussagen über das Binde-

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

verhalten von Lectinen an Liganden ermittelt werden. Hierzu sind in den letzten Jahrzehnten unterschiedliche analytische Methoden verwendet worden, die die Bestimmung der Spezifität der Bindung, sowie zur Ermittlung der Stärke der Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung erlauben. Zu erwähnen sind:

- **moderne Kernresonanzexperimente**, in denen durch Kohärenztransfer zwischen Proteinen und dem gebundenen Kohlenhydrat direkt die Bindeepitope ermittelt werden können,
- **Oberflächenplasmonenresonanzuntersuchungen**, mittels derer der zeitliche Verlauf der Bindung eines Analyten (Lectin) aus einer Lösung an eine immobilisierte Sonde beobachtet werden kann,
- **spektroskopische Methoden**, in denen unter Ausnutzung von FRET-Paaren das Binden von Liganden an Rezeptoren untersucht werden kann,
- **isotherme, calorimetrische Methoden**, mit denen die thermodynamischen Daten der Kohlenhydrat-Lectin-Bindung bestimmt werden können.

In all diesen Methoden kann jedoch immer nur die Wechselwirkung eines Lectins mit einem Kohlenhydrat untersucht werden. Erwägt man nun die in Abschnitt 1.1.1 erwähnte Verbreitung von Glycanstrukturen, so wird offensichtlich, dass Methoden benötigt werden, die eine parallele Untersuchung solcher Wechselwirkungen gestatten. Eine der ersten Methoden, um parallel mehrere Bindungsstudien durchzuführen waren ELLA-Experimente (enzyme-linked lectin assay), die das gleichzeitige Testen von mehreren synthetisierten Inhibitoren oder von modifizierten Liganden erlaubten[38].

1.2.1 Microarray-Technik

Soll der Durchsatz an Untersuchungen von Wechselwirkungen zwischen Kohlenhydraten und Proteinen erhöht werden, bietet sich eine Übertragung der zur

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.