

Jan Uwe Müller

---

## **Darstellung von Kohlenhydrat-Arrays**

– Untersuchungen zur Kohlenhydrat-  
Ligand-Wechselwirkung –

---



Cuvillier Verlag Göttingen  
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag

# Darstellung von Kohlenhydrat-Arrays

– Untersuchungen zur Kohlenhydrat-Ligand-Wechselwirkung –

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

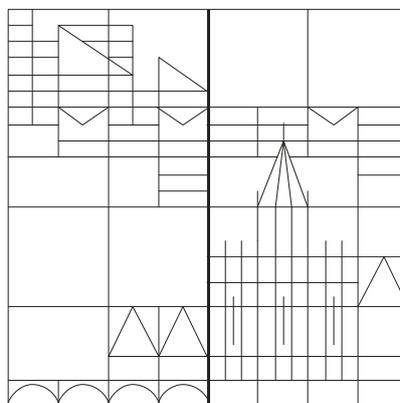
des Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

an der Universität Konstanz

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Sektion

Fachbereich Chemie



vorgelegt von

**Jan Uwe Müller**

aus Stuttgart-Bad Cannstatt

Konstanz 2007

### **Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek**

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2009  
Zugl.: Konstanz, Univ., Diss., 2008  
978-3-86727-861-4

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

Dissertation der Universität Konstanz

Tag der mündlichen Prüfung: 25. April 2008

Referent: Prof. Dr. Richard R. Schmidt

Referent: Prof. Dr. Jörg S. Hartig

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2009  
Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen  
Telefon: 0551-54724-0  
Telefax: 0551-54724-21  
[www.cuvillier.de](http://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, 2009  
Gedruckt auf säurefreiem Papier

978-3-86727-861-4

Die experimentellen Arbeiten zu dieser Dissertation wurden von Mai 2002 bis September 2006 im Fachbereich Chemie der naturwissenschaftlichen Sektion der Universität Konstanz in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Richard R. Schmidt durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Richard R. Schmidt danke ich für die außerordentlich interessante und zugleich herausfordernde Themenstellung, für die weitreichenden Handlungsfreiheiten, die mir bei der Bearbeitung der Thematik gewährt wurden, sowie für die Möglichkeit, die Ergebnisse meiner Arbeit mehrmals international präsentieren zu können. Seine freundliche Betreuung und Diskussionsbereitschaft haben entscheidend zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Jörg S. Hartig danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Albrecht Wendel und seiner Arbeitsgruppe danke ich für die Möglichkeit Messungen mit dem ELISA-Plattenreader durchzuführen.

Frau Prof. Dr. Claudia Stürmer und ihrer Arbeitsgruppe danke ich für die Möglichkeit Messungen mit dem Fluoreszenzmikroskop durchzuführen.

Herrn Prof. Dr. Axel Meyer und seiner Arbeitsgruppe danke ich für die Möglichkeit Messungen mit dem Array-Scanner durchzuführen. Ganz besonders danke ich in diesem Zusammenhang Dr. Walter Salzburger, der mich nicht nur in die Bedienung des Gerätes eingewiesen hat, sondern mich darüber hinaus jederzeit mit seiner Fachkompetenz auf dem Gebiet der Array-Methodik unterstützt hat. Die ausgiebigen Diskussionen haben sich entscheidend auf diese Arbeit ausgewirkt.

Herrn Prof. Dr. Ulrich E. Steiner danke ich für wertvolle Diskussionen und Anregungen bei der Planung von Array-Experimenten und der Interpretation von Messergebnissen.

Herrn Prof. Dr. A. Marx und seiner gesamten Arbeitsgruppe inklusive Herrn Prof. Dr. J. S. Hartig und seinen Mitarbeitern gilt mein Dank nicht nur, weil ich ihre Gerätschaften mitbenutzen durfte, sondern auch dafür, dass ich am Ende dieser Arbeit mehr als nur geduldet wurde. Insbesondere danken möchte ich Benjamin Bornemann und Samuel Weisbrod für die Messung von MALDI- und ESI-Spektren.

Katja Drexler, Jens Gaster und Christian Risinger möchte ich für die Zusammenarbeit und den Austausch praktischer Erfahrungen bei der Durchführung von Array-Experimenten danken.

Anke Friemel danke ich für die Messung der 600 MHz NMR-Spektren sowie für die Hilfe bei deren Interpretation.

Philipp Langenbach und Michael Burgert danke ich für die Messung einiger 400 MHz NMR-Spektren.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Schmidt, insbesondere bei meinen Laborkollegen Moritz Biskup, Yuehua Cong, Jürgen Geiger, Gopal Reddy, Christoph Röhrig, Katharina Sauter, Florian Stolz und Xiang-Yang Wu für das gute Arbeitsklima und die stets vorhandene Hilfsbereitschaft bedanken. Mein besonderer Dank gilt meinem langjährigen Laborkollegen Jürgen Geiger für sein geduldiges Zuhören und die zahlreichen pikanten Diskussionen. Christoph Röhrig danke ich weiterhin für die Messung von MALDI-Spektren.

Den „Aktivisten“ der Fachschaft Chemie danke ich für die vielen fruchtbaren Diskussionen und die moralische Unterstützung während des gesamten Studiums.

Christoph Röhrig, der etliche Stunden konzentrierter Arbeit in die sorgfältige Durchsicht und inhaltliche Prüfung des Manuskripts einbrachte, danke ich für seine kollegiale Begeisterung und seinen urteilssicheren fachlichen Beistand, der wesentlich zu Form, Struktur und inhaltlicher Klarheit der vorliegenden Arbeit beigetragen hat.

Andreas Ehlers gilt mein Dank für seine kompetente, effektive und unbürokratische Hilfe bei allen Arten von „Computerproblemen“.

Dem noch amtierenden Deutschen Meister VfB Stuttgart danke ich für die emotionalen Hoch- und Tiefpunkte, die er mir im Laufe dieser Arbeit und darüber hinaus bereitet hat.

Mein letzter und innigster Dank gilt meinen Eltern, die durch ihre Unterstützung und Hilfe zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>XI</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Die Bedeutung von Kohlenhydrat-Wechselwirkungen .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Struktur und Aufbau der Plasmamembran eukaryotischer Zellen .....	1
1.1.2 Der Informationsgehalt der Glycokalix.....	2
1.1.3 Polyvalente Wechselwirkungen .....	4
1.1.4 Kohlenhydrat-Wechselwirkungen bei zellulären Erkennungs- und Adhäsionsprozessen .....	6
1.1.5 Lektine und die Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkung.....	7
1.1.5.1 Definition und Klassifizierung von Lektinen .....	7
1.1.5.2 Die pflanzlichen Lektine Con A, PNA und RCA I.....	9
1.1.5.3 Das bakterielle Lektin Cyanovirin N.....	12
1.1.6 Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen .....	13
1.1.6.1 Eigenschaften von Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen .....	13
1.1.6.2 Die homophile Lewis X-Lewis X-Wechselwirkung .....	15
<b>1.2 Analytik von Kohlenhydrat-Wechselwirkungen.....</b>	<b>16</b>
1.2.1 Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen.....	16
1.2.1.1 Hämagglutinations-Assay.....	16
1.2.1.2 Affinitätschromatographie.....	17
1.2.1.3 Affinitätsselektrophorese .....	17
1.2.1.4 Isothermische Titrationskalorimetrie (ITC).....	18
1.2.1.5 Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR) .....	18
1.2.1.6 NMR-Methoden .....	19
1.2.1.7 Enzymgekoppelter Lektintest (ELLA) .....	20
1.2.2 Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen .....	21
<b>1.3 Array-Verfahren und Kohlenhydrat-Arrays .....</b>	<b>23</b>
1.3.1 Grundprinzip der Array-Verfahren .....	23
1.3.2 Klassifizierung von Array-Verfahren und Immobilisierungsmethoden .....	24
1.3.3 Detektionsmethoden .....	26
1.3.4 Anwendung von Array-Methoden .....	27
1.3.5 Kohlenhydrat-Arrays .....	27
1.3.5.1 Allgemeiner Überblick .....	27
1.3.5.2 Immobilisierungsmethoden .....	30
1.3.5.3 Immobilisierung nicht-funktionalisierter Kohlenhydrate .....	34
1.3.5.4 Anwendung von Kohlenhydrat-Arrays.....	36

<b>2</b>	<b>Aufgabenstellung.....</b>	<b>37</b>
2.1	<b>Darstellung von Kohlenhydrat-Arrays und Untersuchung von Kohlenhydrat-Wechselwirkungen ..</b>	<b>37</b>
2.2	<b>Synthese von Mannoseglycolipiden.....</b>	<b>41</b>
<b>3</b>	<b>Chemische Synthesen.....</b>	<b>43</b>
3.1	<b>Synthese von Linkerbausteinen.....</b>	<b>43</b>
3.2	<b>Synthese von Kohlenhydratbausteinen.....</b>	<b>47</b>
3.2.1	Acetylierte Trichloracetimidat-Donoren.....	48
3.2.2	Der Glucosamin-Donor .....	49
3.2.3	Der Fucosedonor.....	49
3.2.4	Der Mannosedonor .....	52
3.3	<b>Synthese funktionalisierter Kohlenhydrate .....</b>	<b>53</b>
3.4	<b>Synthese von Lewis X-Derivaten.....</b>	<b>56</b>
3.5	<b>Synthese von Mannose-Glycolipiden .....</b>	<b>64</b>
<b>4</b>	<b>Array Untersuchungen.....</b>	<b>71</b>
4.1	<b>Allgemeine Betrachtungen.....</b>	<b>71</b>
4.1.1	Reduktive Aminierung.....	72
4.1.2	Amidbindungsbildung durch Carbodiimide und PyBOP.....	73
4.1.3	Standardprotokoll zur Darstellung von Kohlenhydrat-Arrays durch reduktive Aminierung (SP 1).....	75
4.1.4	Verwendung von Silikonmasken.....	76
4.1.5	Standardprotokoll zur Untersuchung von Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkungen (SP 2).....	78
4.1.6	Quantitative Auswertung der Fluoreszenzmessungen .....	79
4.2	<b>Untersuchungen zur Immobilisierung von Kohlenhydraten auf funktionalisierten Glaträgern.....</b>	<b>80</b>
4.2.1	Fluoreszenzmarkierte Kohlenhydrate .....	80
4.2.2	Messungen mit dem ELISA-Plattenreader .....	82
4.2.2.1	Messungen von Flüssigkeitstropfen bzw. Messungen in Lösung .....	83
4.2.2.2	Trockene Messungen .....	84
4.2.2.3	Fazit.....	85
4.2.3	Messungen mit dem Fluoreszenzmikroskop.....	85
4.2.3.1	Messungen von versiegelten Spots .....	86
4.2.3.2	Trockene Messungen .....	87
4.2.3.3	Fazit.....	88
4.2.4	Messungen mit dem Array-Scanner .....	89
4.2.4.1	Untersuchungen zur Kovalenz der Immobilisierung.....	89

4.2.4.2	Fazit.....	94
4.2.4.3	Untersuchungen zur Kinetik der Immobilisierung .....	95
4.2.4.4	Fazit.....	103
<b>4.3</b>	<b>Untersuchungen von Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkungen.....</b>	<b>103</b>
4.3.1	Untersuchungen zur Immobilisierung von $\alpha$ -Mannopyranosiden und ihrer Wechselwirkung mit dem Lektin Concanavalin A.....	104
4.3.1.1	Immobilisierung durch reduktive Aminierung .....	104
4.3.1.2	Untersuchungen zur nicht-spezifischen Adsorption von Kohlenhydraten.....	110
4.3.1.3	Untersuchungen zum Detektionslimit .....	113
4.3.1.4	Immobilisierung durch Ausbildung von Carbonsäureamidbindungen .....	116
4.3.1.5	Fazit.....	119
4.3.2	Untersuchungen zur Selektivität der Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkung .....	120
4.3.2.1	Fazit.....	123
4.3.3	Untersuchungen zur Reversibilität der Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkung .....	123
4.3.3.1	Untersuchung von eluierenden Reagenzien.....	124
4.3.3.2	Untersuchungen zur Rehybridisierung .....	128
4.3.3.3	Untersuchung von denaturierenden Reagenzien und proteolytischem Abbau .....	131
4.3.3.4	Fazit.....	137
4.3.4	Untersuchungen zur Polyvalenz der Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkung.....	138
4.3.4.1	Fazit.....	141
<b>5</b>	<b>Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkung an einer Micelloberfläche .....</b>	<b>143</b>
<b>6</b>	<b>Experimental Part .....</b>	<b>147</b>
6.1	General Methods and Equipment .....	147
6.2	Experiments .....	150
6.2.1	General Procedures .....	150
6.2.2	Substances and synthesised compounds .....	151
6.2.3	Array Experiments .....	207
<b>7</b>	<b>Abbildung der Spektren .....</b>	<b>209</b>
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>273</b>
8.1	Chemische Synthesen .....	275
8.2	Array Untersuchungen.....	280
<b>9</b>	<b>Literatur- und Quellenverzeichnis .....</b>	<b>287</b>



## Abkürzungsverzeichnis

Ac	Acetyl
AcOH	Essigsäure
AFM	Kraftfeldmikroskopie (engl.: Atomic Force Microscopy)
All	Allyl
ATP	Adenosintriphosphat
Bn	Benzyl
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: Bovine Serum Albumin)
bzw.	beziehungsweise
calcd.	engl.: calculated
Cer	Ceramid
CHCA	$\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamsäure (engl.: $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid)
Con A	Concanavalin A
conc.	engl.: concentrated
COSY	engl.: Correlated Spectroscopy
CRD	Kohlenhydratbindestelle (engl.: Carbohydrate Recognition Domain)
CV-N	Cyanovirin N
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
d. h.	das heisst
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure (engl.: 2,5-Dihydroxybenzoic acid)
DMAP	<i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT-MM	4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholiniumchlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: Deoxyribonucleic Acid)
DPC	Dodecylphosphocholin
EDC	<i>N</i> -Ethyl- <i>N'</i> -(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EE	Essigsäureethylester
e. g.	engl.: example given
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (engl.: Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
ELLA	Enzymgekoppelter Lektintest (engl.: Enzyme Linked Lectin Assay)

eq.	engl.: equivalents
Et	Ethyl
EtOH	Ethanol
FC	Flashchromatographie, Säulenchromatographie (engl.: Flash Column Chromatography)
Fmoc	Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl
Fuc	Fucose
ges.	gesättigt
Gal	Galactose
GalNAc	<i>N</i> -Acetylgalactosamin
Glc	Glucose
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin
GP	allgemeine Arbeitsvorschrift (engl.: General Procedure)
GSL	Glycosphingolipide
h	Stunden (engl.: hours)
HMQC	engl.: Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HOBT	Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: High Performance Liquid Chromatography)
HSQC	engl.: Heteronuclear Single Quantum Coherence
i. e.	das heisst (lat.: id est)
ITC	Isothermische Titrationskalorimetrie (engl.: Isothermic Titration Calorimetry)
k. A.	keine Angabe
L	Liter
Lit.	Literatur
MALDI	engl.: Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
Man	Mannose
Me	Methyl
MeOH	Methanol
MES	2-( <i>N</i> -Morpholino)-ethansulfonsäure
MIC	minimale Inhibitorkonzentration (engl.: Minimal Inhibitor Concentration)
min	Minuten (engl.: minutes)
MPLC	Mitteldruckflüssigkeitschromatographie (engl.: Medium Pressure Liquid Chromatography)

MS	Massenspektrometrie (engl.: Mass Spectrometry)
Neu5Ac	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure
NMR	Kernresonanz (-Spektroskopie) (engl.: Nuclear Magnetic Resonance)
NOE	Kern-Overhauser-Effekt (engl.: Nuclear Overhauser Effect)
NOESY	engl.: Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
PBS	engl.: phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: Polymerase Chain Reaction)
PE	Petrolether
PG	Schutzgruppe (engl.: Protecting Group)
PNA	Erdnuss Agglutinin (engl.: Peanut Agglutinin)
<sup>i</sup> Pr	Isopropyl
PyBOP	(Benzotriazol-1-yloxy)-tripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
Pyr	Pyridin
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
RCA I (RCA <sub>120</sub> )	Ricinus Communis Agglutinin I
RCA II (RCA <sub>60</sub> )	Ricinus Communis Agglutinin I, Ricin
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: Ribonucleic Acid)
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure (engl.: transfer RNA)
ROESY	engl.: Rotating Frame NOE Spetrocopy
RP	Umkehrphase(n) (engl.: Reversed Phase)
RT	Raumtemperatur
RU	Resonanzeinheit (engl.: Resonance Unit)
SAM	Selbstorganisierte Monomolekulare Schicht (engl.: Self Assembled Monolayer)
SBH	Sequenzierung durch Hybridisierung (engl.: Sequencing By Hybridisation)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: Sodium Dodecylsulphate)
SP	Standardprotokoll
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz (-Spektroskopie) (engl.: Surface Plasmon Resonance)
SSEA-1	Stadium-spezifisches embryonales Antigen
t <sub>R</sub>	Retentionszeit
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TDS	Thexyldimethylsilyl
TFA	Trifluoressigsäure
TFAA	Trifluoressigsäureanhydrid

THF	Tetrahydrofuran
TLC	engl.: Thin Layer Chromatography
TMS	Trimethylsilyl
TMSOTf	Trimethylsilyl-trifluormethansulfonat
TOF	engl.: Time Of Flight
Tol	Toluol
Troc	2,2,2-Trichlorethoxycarbonyl
Trt	Trityl
Ts	Tosyl
TsOH	Toluolsulfonsäure
u. a.	unter anderem
UV	ultraviolett
vgl.	vergleiche
WGA	Weizenkeim Agglutinin (engl.: Wheat Germ Agglutinin)
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

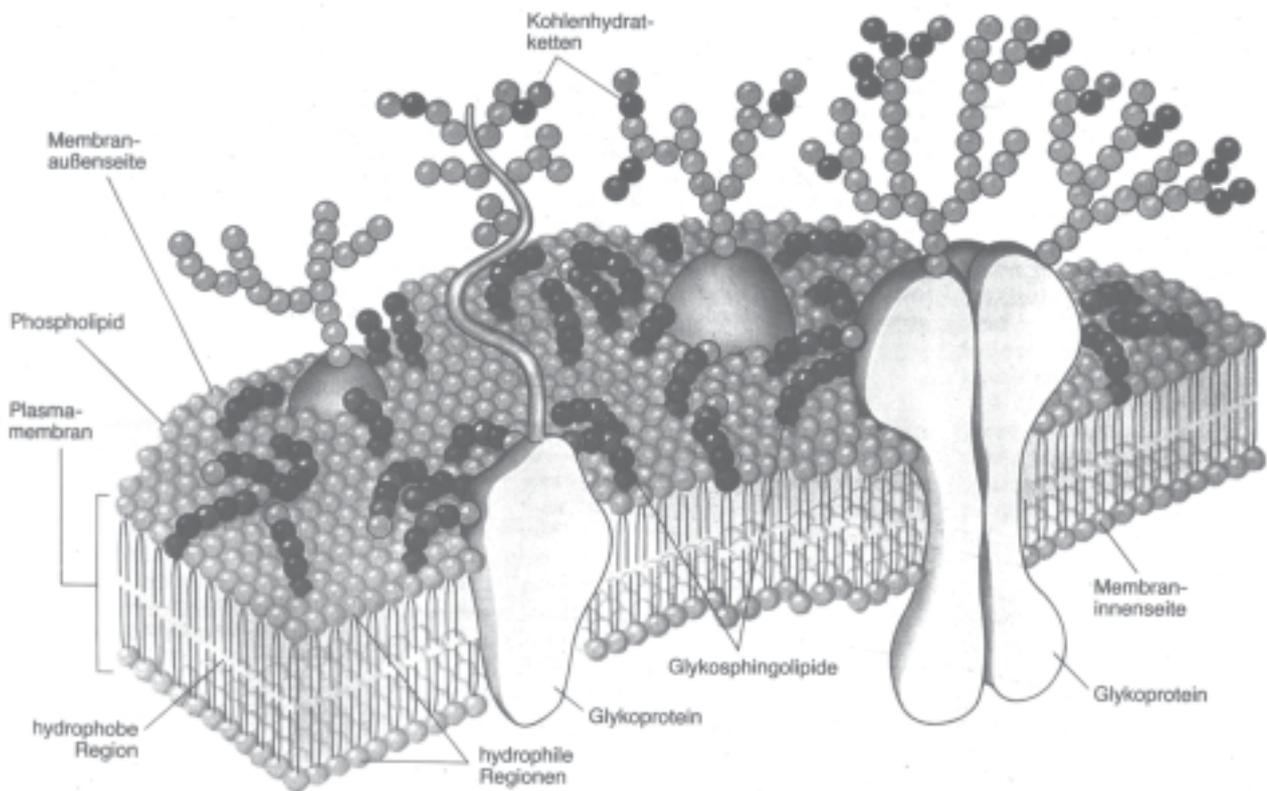
# 1 Einleitung

In dieser Arbeit wurden Kohlenhydrat-Arrays dargestellt und zur Untersuchung von Kohlenhydrat-Wechselwirkungen herangezogen. Die folgende Einleitung soll den Leser mit der Bedeutung, dem wissenschaftlichen Hintergrund und den notwendigen Konzepten des Themas vertraut machen, um die beschriebenen Ergebnisse angemessen beurteilen zu können.

## 1.1 Die Bedeutung von Kohlenhydrat-Wechselwirkungen

### 1.1.1 Struktur und Aufbau der Plasmamembran eukaryotischer Zellen

Die Plasmamembran ist eine Lipiddoppelschicht, die alle eukaryotischen Zellen umgibt und so das Zellinnere (Cytoplasma) vom Extrazellularraum abtrennt.<sup>[1]</sup> Die Lipidmoleküle zeigen einen amphiphilen Aufbau aus einer hydrophilen Kopfgruppe und langen hydrophoben Kohlenwasserstoffketten. In wässrigem Milieu lagern sie sich deshalb spontan zu einer etwa 6 nm dicken Doppelschicht zusammen, bei der sich die hydrophoben Alkylreste im Inneren anordnen und die hydrophilen Gruppen auf den beiden dem Wasser zugewandten Außenseiten. Die Lipidkomponenten tierischer Zellemembranen bestehen aus Phospholipiden (Glycerophospholipide und Sphingomyeline) und Glycolipiden, deren hydrophile Kopfgruppe aus einem Kohlenhydrat besteht. Ferner ist das hydrophobe Cholesterin in die Membran eingebettet. Proteine durchdringen mit ihren hydrophoben Bereichen die Zellmembran ganz oder teilweise; auch sie können mit Kohlenhydratresten kovalent verknüpft sein (Membranglycoproteine). Die Zuckerreste der Glycolipide und Glycoproteine treten ausschließlich auf der Zelloberfläche auf und bilden dort die so genannte Glycokalix. Abbildung 1 veranschaulicht den Aufbau der Plasmamembran.

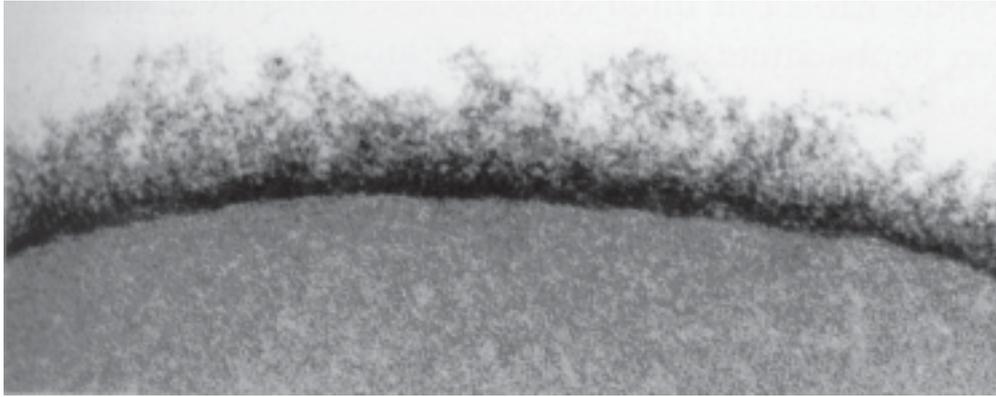


**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der Plasmamembran im Querschnitt.<sup>[2]</sup>

Der Anteil der verschiedenen Membrankomponenten hängt von der Art des Organismus und des Gewebes ab und differiert teilweise erheblich. Sowohl die Lipid- als auch die Proteinkomponenten können sich innerhalb einer Ebene der Doppelschicht frei bewegen (laterale Diffusion), während ein Transfer durch die Doppelschicht hindurch (transversale Diffusion) nicht möglich ist. Es resultiert eine flüssig-fluide Struktur der Membran, bei der „die Membranproteine wie Eisberge in einem zweidimensionalen Lipidmeer umherschwimmen“.<sup>[3]</sup>

## 1.1.2 Der Informationsgehalt der Glycokalix

Die Glycokalix bildet eine äußere Hülle aus Zuckermolekülen, die die Zelle umgibt. Ihre Kohlenhydratstrukturen (Glycanstrukturen) reichen in den intrazellulären Raum hinein (vgl. Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Erythrocyten-Glycokalix unter dem Elektronenmikroskop.<sup>[1]</sup>

Sie zeichnen sich durch eine hohe strukturelle Vielfalt und Komplexität aus, die zur Speicherung von (biologischer) Information genutzt wird.<sup>[4, 5]</sup> Oligosaccharide besitzen gegenüber anderen zur Informationsvermittlung verwendeten Biomolekülen, wie Nukleinsäuren, Peptiden oder Proteinen, den entscheidenden Vorteil, dass die Verknüpfungsmöglichkeiten zwischen ihren Monomerbausteinen (hier Monosacchariden) sehr zahlreich sind.<sup>[6, 7]</sup> Im Gegensatz zu den genannten linearen Oligomeren mit nur einer Verknüpfungsmöglichkeit können sie auf Grund der mehrfach vorhandenen Hydroxylgruppen ihrer Monomere unterschiedliche Regioisomere und insbesondere auch verzweigte Strukturen bilden. Darüber hinaus erhöht die Zahl an stereogenen Zentren pro Monosaccharideinheit auch die Zahl der möglichen Isomere deutlich. Oligosaccharide können folglich pro Gewichtseinheit sehr viel mehr Information speichern als lineare Oligomere.

Die Entschlüsselung dieser in den Glycanstrukturen der Glycokalix gespeicherten Information erfolgt durch nicht-kovalente Wechselwirkung mit anderen Biomolekülen.<sup>[8-10]</sup> Diesen Prozess kann man als molekulare Erkennung unter Beteiligung von Glycanstrukturen bezeichnen. In der Terminologie der molekularen Erkennung wird derjenige Teil einer biologischen Einheit, der zur Wechselwirkung mit einem Bindungspartner notwendig ist, Epitop genannt. Im Falle von Zuckern spricht man entsprechend von Kohlenhydratepitopen. Die interagierenden Bindungspartner werden als Rezeptor und Ligand bezeichnet, wobei der erste Begriff in der Regel für die größere Einheit verwendet wird (meistens Proteine); die Nomenklatur ist hier aber nicht immer einheitlich. Die Beteiligung von Glycanstrukturen bzw. Glycokonjugaten in der molekularen Erkennung ist sehr vielgestaltig und in Abbildung 3 als anschaulicher Cartoon zusammengefasst. Als Glycokonjugate bezeichnet man allgemein Verbindungen, die aus einer Kohlenhydratstruktur (dem Glycan) und einer aus einer anderen Naturstoffklasse stammenden Einheit (dem Aglycon) aufgebaut sind.

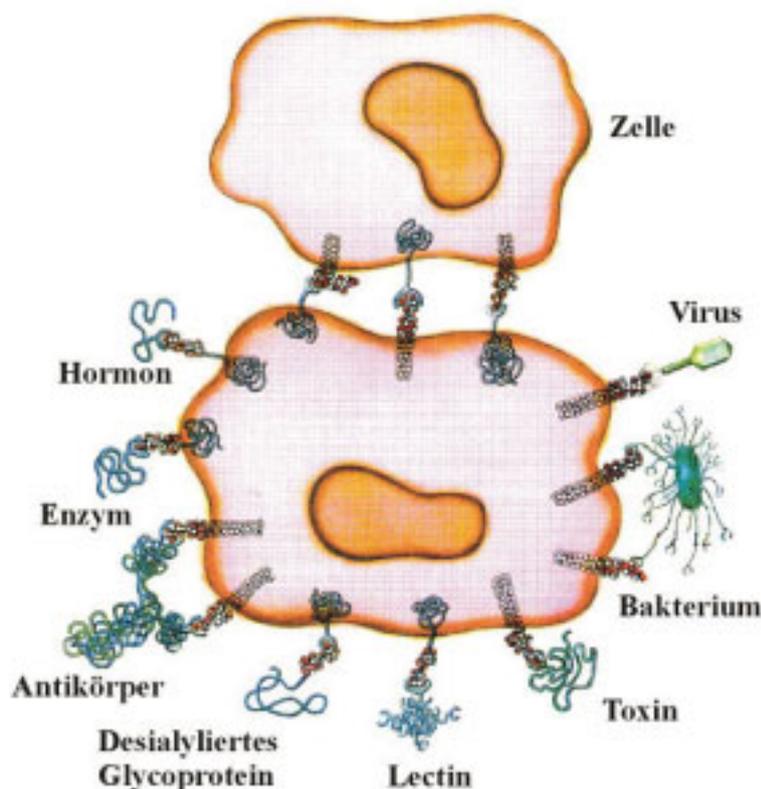


Abbildung 3: Molekulare Erkennung durch Glycokonjugate an Zelloberflächen.<sup>[11]</sup>

Glycane dienen auf der Zelloberfläche als Rezeptorstellen für Enzyme, Hormone, Antikörper, Lektine (kohlenhydratbindende Proteine), Toxine sowie für ganze Mikroorganismen wie Bakterien oder Viren.<sup>[12]</sup> Außerdem spielen sie eine wichtige Rolle bei der Kommunikation von Zellen untereinander, d.h. bei Zell-Zell-Erkennungs- und Adhäsionsprozessen. Hierzu gehören physiologische und pathologische Prozesse im Verlauf von Befruchtung, Zellentwicklung- und differenzierung, Aggregation zu Geweben und Organen (Morphogenese) und Immunabwehr. Zu letztgenanntem Bereich gehören unter anderem die Rekrutierung von Leukozyten zu Entzündungsherden und das Erkennen von befallenen Zellen bei bakteriellen oder viralen Infektionen oder von Krebszellen. Auf die Rolle von Kohlenhydraten bei zellulären Erkennungs- und Adhäsionsprozessen wird in Abschnitt 1.1.4 näher eingegangen.

### 1.1.3 Polyvalente Wechselwirkungen

Das Bindungsgleichgewicht eines Liganden an seinen zugehörigen Rezeptor



wird durch die zugehörige Bindungskonstante  $K$  quantitativ charakterisiert, die über die Konzentrationen der beteiligten Bindungspartner im Gleichgewicht definiert ist:

$$K = \frac{[\text{Rezeptor - Ligand - Komplex}]}{[\text{Rezeptor}][\text{Ligand}]}$$

Polyvalente Wechselwirkungen (auch multivalente Wechselwirkungen genannt) zeichnen sich durch die gleichzeitige Bindung mehrerer Liganden einer biologischen Einheit an mehrere Rezeptoren einer anderen biologischen Einheit aus.<sup>[13, 14]</sup> Sie treten auf bei der Bindung von Viren oder Bakterien an ihre Wirtszelle und bei der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten, ferner bei der Bindung von Zellen an Moleküle mit mehreren Bindungsstellen (polyvalente Moleküle, z.B. Antikörper oder Toxine) oder schließlich bei der Bindung polyvalenter Moleküle aneinander (z.B. Transkriptionsfaktoren und DNA). Die genannten Bindungen werden auf molekularer Ebene durch mehrere nicht-kovalente Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen vermittelt. Einzelne Rezeptor-Ligand-Paare besitzen in der Regel nur eine geringe, jedoch selektive Affinität zueinander; durch das Zusammenwirken vieler gleichartiger Bindungspartner im passenden räumlichen Abstand lassen sich dagegen starke und selektive Bindungen erhalten. Kurz gesagt lassen sich durch polyvalente Wechselwirkungen viele einzeln betrachtet schwache Affinitäten zu einer festen, selektiven Bindung verstärken.

Polyvalente Wechselwirkungen sind außerdem entropisch begünstigt, da ein größerer Verlust an Entropie nur durch das Bindungsereignis zwischen der ersten Ligand- und Rezeptoreinheit hervorgerufen wird (Zusammenlagerung zweier Teilchen zu einem Komplex), nicht aber durch die Ausbildung weiterer Bindungen durch benachbarte Ligand-Rezeptor-Paare.

Das Phänomen der Polyvalenz ist dabei unabhängig von der Kooperativität einer Wechselwirkung zu sehen; eine polyvalente Wechselwirkung kann, muss aber nicht notwendigerweise positiv kooperativ (synergistisch, allosterisch) sein. Von einem kooperativen Effekt spricht man, wenn die Bindung eines Liganden die Bindung weiterer Liganden begünstigt, z.B. durch Konformationsänderung des Rezeptors nach der Bindung des ersten Liganden.

Polyvalenz wird durch das Verhältnis der Affinität des multivalenten Rezeptors zur Affinität der monovalenten Bindung definiert, den Verstärkungsfaktor  $\beta$ . Eines der am besten untersuchten polyvalenten Bindungssysteme ist die Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkung zwischen Sialinsäure und Hämagglutinin, die bei der Anlagerung des Influenzaviruses an die bronchiale Epithelzelle auftritt.<sup>[13]</sup> Während die Bindungskonstante zwischen einem einzelnen Sialinsäuremolekül und einem einzigen Hämagglutinin-Rezeptor  $K = 4 \cdot 10^2 \text{ L mol}^{-1}$  beträgt, ist diejenige zwischen Influenzavirus und Wirtszelle auf mindestens  $K \approx 10^{13} \text{ L mol}^{-1}$  geschätzt worden. Damit ergibt sich für den Verstärkungsfaktor  $\beta$

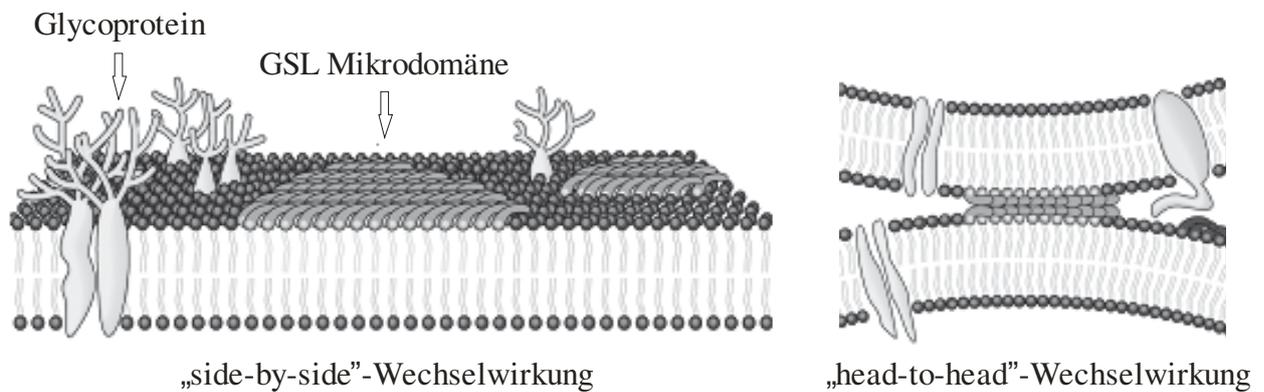
$$\beta = \frac{10^{13} \text{ L mol}^{-1}}{4 \cdot 10^2 \text{ L mol}^{-1}} \approx 10^{10}.$$

### 1.1.4 Kohlenhydrat-Wechselwirkungen bei zellulären Erkennungs- und Adhäsionsprozessen

Zellen sind im Gewebe normalerweise in Kontakt mit einem komplexen Netzwerk extrazellulärer Makromoleküle, der so genannten extrazellulären Matrix.<sup>[15]</sup> Diese stabilisiert den Zellverbund und stellt eine Plattform dar, innerhalb derer Zellen geordnet wandern und miteinander kommunizieren können. Zelluläre Erkennungs- und Adhäsionsprozesse müssen selektiv und flexibel ablaufen, um den fehlerfreien Fortgang der in Abschnitt 1.1.2 kurz angesprochenen vielfältigen biologischen Prozesse zu garantieren. Neben der schon länger bekannten und recht gut verstandenen Protein-Protein-Wechselwirkung ist an vielen dieser Prozesse eine schwächere aber spezifischere Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkung beteiligt.<sup>[8, 10, 16]</sup> Diese wird zwischen kohlenhydratbindenden Proteinen (Lektinen) und ihren entsprechenden spezifischen Kohlenhydratrezeptoren vermittelt. Sie zeigt in vielen Fällen multi- oder polyvalenten Charakter und ist oft von der Anwesenheit zweiwertiger Kationen (z.B.  $\text{Ca}^{2+}$ ) abhängig. Auf sie wird in Abschnitt 1.1.5 näher eingegangen.

Darüber hinaus ist in jüngster Zeit (seit dem Jahr 1989 gab es erste Hinweise<sup>[17]</sup>) die wichtige Rolle von Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen bei zellulären Erkennungsprozessen entdeckt worden.<sup>[18-20]</sup> Grundlegende Arbeiten auf diesem Gebiet wurden von *S.-I. Hakomori* und seinen Mitarbeitern durchgeführt. Diese Affinitäten sind noch schwächer als Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen, treten deshalb, nach heutigem Wissenstand, ausschließlich in Form von polyvalenten Bindungen auf und benötigen zwingend zweiwertige Kationen. Auf sie wird in Abschnitt 1.1.6 näher eingegangen.

Die Konformationen von komplexen Kohlenhydraten (Oligosacchariden) in Lösung werden durch die Art der Anordnung und der glycosidischen Verknüpfung der einzelnen Monosaccharid-Bausteine bestimmt.<sup>[21]</sup> Dadurch wird auch die Konformation der Zuckerepitope der Glycokalix auf Zelloberflächen bestimmt. Im Allgemeinen besitzen Oligosaccharide flexiblere Konformationen als Peptide. Glycoproteine präsentieren ihre Kohlenhydratepitope oft wiederholt in bestimmten räumlichen Abständen, Glycosphingolipide (GSL, vgl. Abschnitt 1.1.1) organisieren sich in Clustern (Mikrodomänen) auf der Zellmembran.<sup>[22]</sup> Diese Mikrodomänenbildung wird nicht nur durch physikalische Entmischung, sondern auch durch spezifische Erkennung zwischen bestimmten Glycolipiden (so genannte „side-by-side“- oder cis-Wechselwirkung) hervorgerufen (vgl. Abbildung 4, links). Mit Hilfe der Kraftfeldmikroskopie (AFM) konnten GSL-Mikrodomänen sogar direkt beobachtet werden.<sup>[23]</sup>



**Abbildung 4:** „side-to-side“- und „head-to-head“-Wechselwirkungen von Glycosphingolipiden in Zellmembranen.<sup>[24]</sup>

Dadurch wird eine definierte Kohlenhydratoberfläche erzeugt, die als Rezeptor für polyvalente Wechselwirkungen mit Proteinen (Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkung) oder anderen Kohlenhydraten (Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Wechselwirkung) zur Verfügung steht. Auf dieser Oberfläche sind hydrophile und hydrophobe Bereiche durch die räumliche Anordnung der funktionellen Gruppen der Kohlenhydrate definiert, so dass diese Oberfläche nach *Lemieux* als polyamphiphil bezeichnet werden kann.<sup>[25]</sup> Proteine mit komplementären Bindungsdomänen oder definierte komplementäre Kohlenhydratoberflächen anderer Zellen können an diese Rezeptoroberfläche über nicht-kovalente Wechselwirkungen spezifisch binden. Dieser Vorgang wird als „head-to-head“- oder trans-Wechselwirkung bezeichnet (vgl. Abbildung 4, rechts). Die Komplementarität ist entscheidend für die hohe Spezifität der Bindung; diese erfolgt, in der Terminologie von Enzymen, nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip. Die Hydroxylgruppen der Kohlenhydrate können sowohl als Donor als auch als Akzeptor für Wasserstoffbrückenbindungen wirken, daneben können sich van der Waals-Wechselwirkungen zwischen hydrophoben Bereichen ausbilden. In vielen Fällen werden zweiwertige Kationen wie  $Mg^{2+}$  und besonders  $Ca^{2+}$  von bestimmten Hydroxylgruppen oder anionischen Gruppen der Kohlenhydrate koordiniert und festigen so die Bindung. Für die thermodynamische Stabilität von Kohlenhydrat-Protein oder Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen ist wie bei Protein-Protein-Wechselwirkungen der hydrophobe Effekt entscheidend.<sup>[25, 26]</sup>

## 1.1.5 Lektine und die Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkung

### 1.1.5.1 Definition und Klassifizierung von Lektinen

Seit dem Ende des 19. Jahrhunderts wurden vor allem aus Pflanzen und Schlangensera Proteine isoliert, die in der Lage waren, rote Blutkörperchen (Erythrocyten) zum Zusammenklumpen zu

bringen (zu agglutinieren).<sup>[5]</sup> Der Begriff Lektin für diese Proteine wurde von *Boyd* jedoch erst im Jahre 1954 geprägt<sup>[27]</sup> und später von *Goldstein* genauer definiert: „Alle Proteine mit kohlenhydrat-bindenden Domänen, die keine Enzyme oder Immunglobuline sind, werden als Lektine bezeichnet.“<sup>[28]</sup> Mittlerweile wurden Lektine in vielen Organismen, von Viren und Bakterien bis hin zu Pflanzen und höheren Tieren, nachgewiesen. Mehrere Übersichtsartikel sind auf dem Gebiet der Lektin-Forschung veröffentlicht worden.<sup>[5, 10, 29-31]</sup> Unabhängig von ihrer Herkunft bestehen sie meist aus mehreren Untereinheiten und mindestens zwei Kohlenhydratbindungsstellen (CRD, carbohydrate recognition domain).<sup>[30]</sup> Durch Bindung von Glycokonjugaten der Zelloberfläche können Lektine Zellen, wie z.B. Erythrocyten, vernetzen und agglutinieren.<sup>[28]</sup> Die Einteilung der Lektine kann nach verschiedenen Gesichtspunkten erfolgen:

- Einteilung nach Strukturklassen bzw. nach Molekulargewicht<sup>[10]</sup>

Lektine kommen in unterschiedlichen Größen und Strukturen vor, wobei eine Einteilung in drei Kategorien vorgenommen werden kann. Die so genannten „einfachen Strukturen“ bestehen aus wenigen Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von unter 40 kD pro Untereinheit (fast alle Pflanzenlektine und Galectine). Die Vertreter der Gruppe der Lektine in Mosaikform setzen sich im Allgemeinen aus mehreren Domänen zusammen, wobei nicht jede Untereinheit eine CRD enthält (z.B. virale Hämagglutinine oder Lektine tierischen Ursprungs). Die dritte Strukturklasse umfasst alle makromolekularen Lektine, die aus streng symmetrisch und helixartig angeordneten Untereinheiten bestehen (oft bakterielle Lektine).

- Einteilung nach Herkunft<sup>[30]</sup>

Aufgrund ihrer weiten Verbreitung kann man Lektine nach ihrer Herkunft einteilen. Mikrobielle Lektine kommen auf Oberflächen von Viren, Bakterien und Protozoen vor. Pflanzenlektine werden weiter in die jeweiligen Familien unterteilt, in denen sie gefunden werden z.B. in Leguminosen (Hülsenfrüchten), Cerealien (Getreide) oder Solanaceae (Nachtschattengewächse). Im Tierreich vorkommende Lektine werden weiter nach strukturellen Eigenschaften unterteilt in Galectine (Galactose spezifisch), P-Typ-Lektine (Mannose-6-Phosphat spezifisch), I-Typ-Lektine (immunoglobulinartig), L-Typ-Lektine (sequenzhomolog zu Leguminosenlektinen) und C-Typ-Lektine ( $\text{Ca}^{2+}$  abhängig). Zu letzterem Typ gehören u.a. auch Selectine und Collectine.

- Einteilung nach Sequenzhomologien

Eine Einteilung der Lektine nach Homologien in der Sequenz ihrer Aminosäuren kann für das Verständnis der molekularen Mechanismen der Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkung hilfreich sein. In vielen Fällen gleichen sich die Sequenzen innerhalb taxonomischer

Kategorien, manchmal gibt es allerdings auch Ähnlichkeiten über phylogenetische Grenzen hinweg.

- Einteilung nach Art des kovalent gebundenen Kohlenhydrates<sup>[32]</sup>

Viele Lektine sind selbst Glycoproteine. Nach der Art der kovalent gebundenen Kohlenhydrate unterscheidet man zwei Typen. Der Typ I enthält hauptsächlich D-Mannose, N-Acetyl-D-glucosamin, manchmal auch L-Fucose und D-Xylose, der Typ II L-Arabinose und D-Galactose.

- Einteilung nach Bindungsspezifität<sup>[10]</sup>

Lektine könne bezüglich ihrer Bindungsspezifität klassifiziert werden. Aufgrund dieses Kriteriums werden Lektine in fünf Spezifitätsklassen nach dem Monosaccharid eingeteilt, das sie mit der höchsten Affinität binden bzw. das die Agglutinationsaktivität spezifisch inhibiert: D-Mannose, N-Acetyl-D-glucosamin, D-Galactose / N-Acetyl-D-galactosamin, L-Fucose und N-Acetyl-D-neuraminsäure. Ein Nachteil dieser Einteilung besteht darin, dass kein eindeutiger Zusammenhang mehr zwischen Spezifitätsklasse einerseits und molekularer Struktur andererseits besteht; Kohlenhydratbindungsstellen mit derselben Bindungsspezifität können sich aus unterschiedlichen Strukturgerüsten unter Beteiligung verschiedener funktioneller Gruppen ihrer Aminosäuren zusammensetzen.<sup>[33]</sup>

Im Rahmen dieser Arbeit soll aus praktischen Erwägungen auf die letztgenannte Klassifizierungsmethode zurückgegriffen werden.

Die Bindungskonstanten von Lektin-Monosaccharid-Komplexen sind normalerweise gering und liegen im Bereich zwischen  $10^3 \text{ L mol}^{-1}$  und  $5 \cdot 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ .<sup>[10, 34]</sup> Jedoch sind trotz der relativ geringen Affinitäten zu Monosacchariden die Bindungen oft hoch spezifisch bezüglich des erkannten Monosaccharids. In der Regel binden Lektine einer Spezifitätsklasse außerdem bevorzugt oder ausschließlich entweder das  $\alpha$ - oder das  $\beta$ -Glycosid des entsprechenden Kohlenhydrates, es gibt aber auch Lektine ohne Präferenz für eine anomere Konfiguration. Im Fall von Lektin-Oligosaccharid-Komplexen steigen die Bindungskonstanten auf Werte von  $10^4 \text{ L mol}^{-1}$  bis  $10^7 \text{ L mol}^{-1}$  an, manche Lektine binden sogar ausschließlich Oligosaccharide. Lektine der gleichen Spezifitätsklasse können sich in ihrer Affinität zu verschiedenen Oligosacchariden deutlich unterscheiden.

## 1.1.5.2 Die pflanzlichen Lektine Con A, PNA und RCA I

Im Folgenden soll auf die Lektine, die im Rahmen dieser Arbeit zur Untersuchung auf Arrayoberflächen verwendet wurden, näher eingegangen werden: Concanavalin A (Con A),

## 1 Einleitung

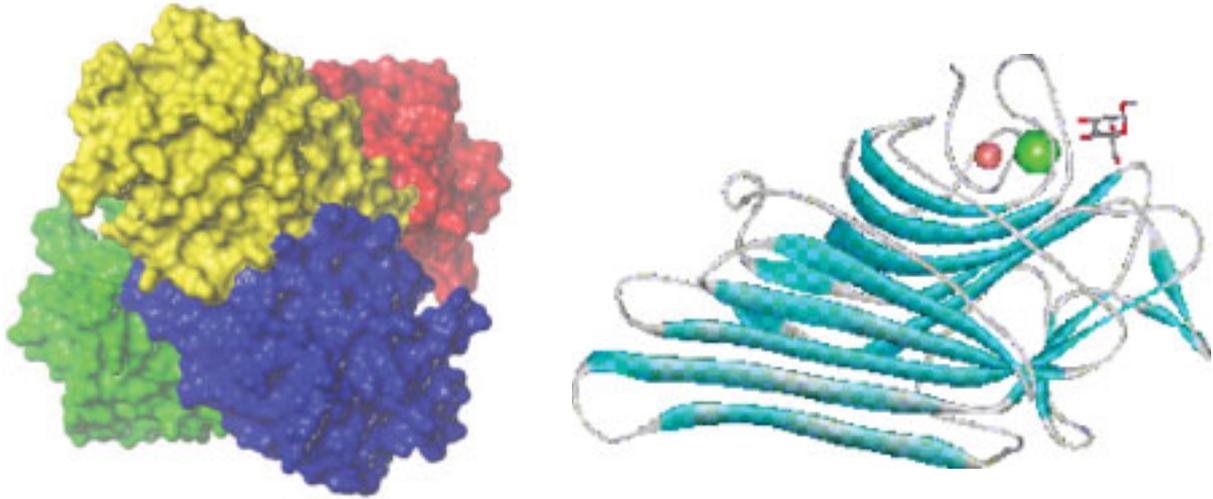
Erdnuss Agglutinin (peanut agglutinin, PNA), Ricinus Communis Agglutinin I (RCA I) und Weizenkeim Agglutinin (wheat germ agglutinin, WGA). Die Bindungsspezifitäten dieser Lektine sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Lektin	Herkunft	bevorzugt gebundenes Monosaccharidepitop
Concanavalin A (Con A)	Schwertbohne ( <i>canavalia ensiformis</i> )	D-Mannose, D-Glucose
Erdnuss Agglutinin (Peanut Agglutinin, PNA)	Erdnuss ( <i>arachis hypogaea</i> )	D-Galactose (damit auch D-Lactose)
Ricinus Communis Agglutinin I (RCA I, RCA <sub>120</sub> )	Rizinus-Bohne ( <i>ricinus communis</i> )	D-Galactose (damit auch D-Lactose), N-Acetyl-D-galactosamin
Weizenkeim Agglutinin (Wheat Germ Agglutinin, WGA)	Weizen ( <i>triticum vulgare</i> )	N-Acetyl-D-glucosamin

**Tabelle 1:** Übersicht über die in der Arbeit verwendeten Lektine mit ihren Bindungsspezifitäten.

Bei allen vier handelt es sich um Lektine pflanzlicher Herkunft mit einfacher Struktur. Con A und PNA gehören zur Familie der Leguminosen (Hülsenfrüchte), der am besten untersuchten Pflanzenlektine, von denen um die hundert Vertreter charakterisiert worden sind.<sup>[10, 31, 34]</sup> Von ihnen sind außerdem Kristallstrukturen mit und ohne gebundenen Kohlenhydratligand bekannt. Die Homologie der Leguminosenlektine untereinander ist sehr groß, etwa 40% der Aminosäuren sind invariant oder konservativ substituiert. Das vorherrschende Sekundärstrukturelement ist das  $\beta$ -Faltblatt,  $\alpha$ -Helices kommen dagegen nur selten vor. Leguminosenlektine bestehen aus zwei oder vier gleichartigen Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 25 kD bis 30 kD pro Untereinheit. Jede Untereinheit besitzt eine Kohlenhydratbindungsstelle. Die Bindung der Kohlenhydrate erfolgt an der primären Bindungsstelle, welche in Form einer flachen Vertiefung an der Oberfläche des Proteins liegt. Zusätzliche Kohlenhydratmoleküle von gebundenen Oligosacchariden wechselwirken mit Aminosäuren in der näheren Umgebung, der so genannten erweiterten oder Sub-Bindungsstelle.<sup>[35]</sup> Der Kohlenhydratligand wird durch sieben Wasserstoffbrücken, manche durch Wassermoleküle überbrückt, und einige hydrophobe Wechselwirkungen gebunden.<sup>[36]</sup> Zur Bindung der Kohlenhydrate werden pro Untereinheit ein  $\text{Ca}^{2+}$ - und ein  $\text{Mn}^{2+}$ -Ion benötigt, die in der Nähe der CRD relativ fest gebunden sind (Abstand 9-13 Å).<sup>[37]</sup> Sie nehmen selbst nicht direkt an der Bindung des Kohlenhydrates teil, helfen jedoch die an der Bindung beteiligten Aminosäuren in einer bindungsaktiven Konformation zu halten.

Concanavalin A wurde bereits im Jahr 1919 von *J. Sumner* (Nobelpreis für Chemie 1946) aus der Schwertbohne isoliert und kristallisiert.<sup>[38]</sup> 1936 wies er zudem die Bindungsspezifität zu D-Mannose und D-Glucose nach.<sup>[39]</sup> Eine Kristallstruktur von Con A mit Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid als Ligand ist in Abbildung 5 gezeigt (PDB-Code: 5CNA).<sup>[40]</sup>



**Abbildung 5:** Röntgenstruktur des Lektins Concanavalin A (Con A).<sup>[40]</sup> links: Tetramer aus vier identischen Untereinheiten; rechts: einzelne Untereinheit mit Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid als Kohlenhydratligand und  $\text{Ca}^{2+}$ - bzw.  $\text{Mn}^{2+}$ -Ionen.

Concanavalin A ist bis heute das am besten untersuchte Lektin überhaupt. Es besteht aus vier gleichartigen Untereinheiten (Homotetramer), die im neutralen oder basischen pH-Bereich zu einer symmetrischen Quartärstruktur zusammengelagert sind („Dimer von Dimeren“).<sup>[35]</sup> Unterhalb eines pH-Wertes von 5.6 dissoziiert es ohne Verlust der Kohlenhydratbindungsaktivität in zwei Dimere. Im Falle von Con A wurde gezeigt, dass der Verlust der Metallionen  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mn}^{2+}$  zu einer Verzerrung der Kristallstruktur und zum Verschwinden der Kohlenhydratbindungsfähigkeit führt.<sup>[41]</sup> Der Abstand zwischen benachbarten Bindestellen beträgt für das tetramere Lektin Con A ungefähr 100 Å (Abschätzung mit Hilfe der Kristallstruktur).

Erdnuss Agglutinin (PNA) bindet spezifisch D-Galactose ist aber eines der wenigen Galactose-spezifischen Lektine, das nicht zugleich auch Affinität für N-Acetyl-D-galactosamin aufweist. Dafür bindet es das in vielen Glykokonjugaten auftretende Thomson-Friedenreich-Antigen (T-Antigen,  $\text{Gal}\beta(1\rightarrow3)\text{GalNAc}$ ) mit hoher Affinität.<sup>[42]</sup> Eine Kristallstruktur von PNA mit Lactose als Ligand ist bekannt (PDB-Code: 2PEL).<sup>[43]</sup> Es ist ebenfalls ein Tetramer besitzt aber eine unsymmetrische offene Quartärstruktur.<sup>[44]</sup> Zudem ist PNA im Gegensatz zu den meisten anderen Lektinen kein Glycoprotein.

Ricinus Communis Agglutinin I (RCA I, RCA<sub>120</sub>) gehört zur Familie der Euphorbiaceae (Wolfsmilchgewächse). Es bindet spezifisch D-Galactose und N-Acetyl-D-Galactosamin. Es ist ein Dimer aus zwei verschiedenen Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von jeweils 60 kD.<sup>[45]</sup> Im Gegensatz zum extrem toxischen Ricin (RCA II, RCA<sub>60</sub>), das ebenfalls aus der Rizinusbohne gewonnen wird, ist RCA I ungiftig. Auch von RCA I ist eine Kristallstruktur mit Galactose als gebundenem Liganden bekannt (PDB-Code: 1RZO).<sup>[46]</sup>

Weizenkeim Agglutinin (WGA) gehört zur Familie der Cerealien (Getreide), gleichzeitig ist es das am besten untersuchte Lektin dieser Familie. Es bindet spezifisch N-Acetyl-D-glucosamin. WGA besteht aus einer Mischung dreier Isolektine, die sich in ihrer Aminosäuresequenz geringfügig unterscheiden. Eine Kristallstruktur von WGA mit dem Kohlenhydratliganden GlcNAc $\beta$ (1 $\rightarrow$ 6)Gal ist bekannt (PDB-Code: 1K7U).<sup>[47]</sup> Seine Struktur ist insofern ungewöhnlich, dass es weder  $\alpha$ -Helix- noch  $\beta$ -Faltblatt-Sekundärstrukturelemente besitzt; stattdessen wird jede Untereinheit durch 16 intramolekulare Disulfidbrücken stabilisiert. WGA ist ein C<sub>2</sub>-symmetrisches Dimer aus zwei gleichartigen Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von jeweils 17 kD und es benötigt zur Bindung seiner Kohlenhydratliganden keine Metallionen.<sup>[48]</sup> Im Gegensatz zu den Leguminosenlektinen liegen die Kohlenhydratbindungsstellen nicht auf einer Untereinheit, sondern sie werden an der Schnittstelle beider Untereinheiten aufgebaut. Insgesamt ergeben sich dort acht Bindungsstellen, wovon infolge der Symmetrie jeweils zwei identisch sind.<sup>[49]</sup>

### 1.1.5.3 Das bakterielle Lektin Cyanovirin N

Cyanovirin N (CV-N) ist ein Lektin aus dem Cyanobakterium *Nostoc ellipsosporum*, das spezifisch  $\alpha$ -verknüpfte Oligomannoside erkennt.<sup>[50, 51]</sup> Mit hoher Affinität bindet es „high-mannose“-Oligosaccharide, die als Vorläufer-Kohlenhydratstrukturen bei der Biosynthese von N-Glycoproteinen auftreten. Seine Struktur und seine Bindungseigenschaften konnten durch Kristallisation<sup>[52, 53]</sup> (PDB-Code: 3EZM) und durch NMR-spektroskopische Methoden<sup>[54-56]</sup> mit und ohne gebundenen Mannoseliganden aufgeklärt werden. Es ist in Lösung ein Monomer mit einer ellipsoiden Form und einem Molekulargewicht von 11 kD. CV-N besitzt zwei Kohlenhydratbindungsstellen, die Liganden mit unterschiedlichen Affinitäten binden (so genannte „high-affinity“- und „low-affinity“-Bindestelle). Die Bindungskonstanten betragen  $K = 7,2 \cdot 10^6 \text{ L mol}^{-1}$  bzw.  $K = 6,8 \cdot 10^5 \text{ L mol}^{-1}$  für  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2)-verknüpfte Mannobiose<sup>[57]</sup> und  $K = 6,6 \cdot 10^6 \text{ L mol}^{-1}$  bzw.  $K = 3,7 \cdot 10^5 \text{ L mol}^{-1}$  für  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2)-verknüpfte Mannotriose.<sup>[58]</sup>

Das Interesse an Cyanovirin N ist der Tatsache zu verdanken, dass es an die „high-mannose“-Oligosaccharidstrukturen des HIV-Glycoproteins gp120 spezifisch bindet und dadurch die Infektion der Wirtszelle durch das HI-Virus verhindert.<sup>[59]</sup> Es konnte gezeigt werden, dass natürliche und rekombinante Formen des CV-N eine Vielzahl von HIV-Stämmen inaktivieren und gleichzeitig nur eine geringe Toxizität für die Wirtszellen aufweisen.<sup>[50]</sup> CV-N wird deshalb zurzeit in präklinischen Studien als HIV-Medikament getestet.

### 1.1.6 Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen

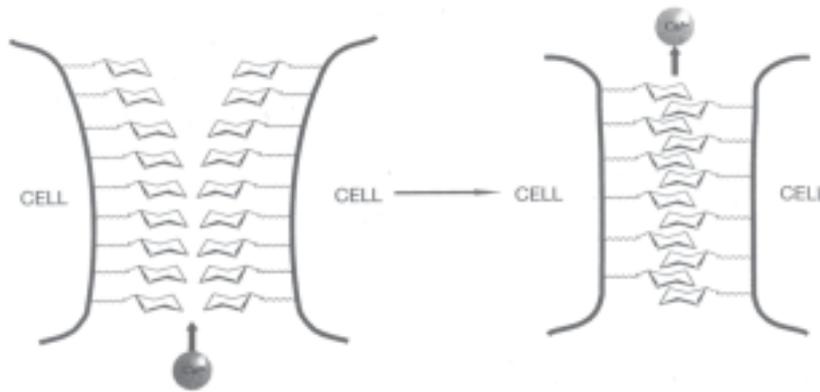
#### 1.1.6.1 Eigenschaften von Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen

Im Zusammenhang mit spezifischen Zell-Zell-Adhäsions- und Erkennungsprozessen wurden Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen zuerst bei artspezifischen Zell-Adhäsionsprozessen von marinen Schwämmen nachgewiesen.<sup>[60, 61]</sup> Diese werden durch ein Proteoglycan ( $M \approx 20$  kD) vermittelt, das extrazellulär an die Zellmembran gebunden vorliegt. Seine Kohlenhydrat-epitope wechselwirken in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen mit denjenigen des Proteoglycans der Nachbarzelle. Es konnte gezeigt werden, dass der Kohlenhydratanteil für die Wechselwirkung verantwortlich ist, während der Proteinanteil für die geordnete polyvalente Präsentation der Zuckerepitope sorgt. Die Bindungskonstante eines einzelnen Glycanbindungspaares beträgt  $K \leq 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ ; dagegen zeigt das intakte Proteoglycan eine Bindungskonstante von  $K = 1.6 \cdot 10^9 \text{ L mol}^{-1}$ .

Eukaryotische Zellen exprimieren neben Glycoproteinen große Mengen verschiedener Glycosphingolipide (GSL) auf ihrer Zellmembran (vgl. Abschnitt 1.1.1), die sich in Clustern (Mikrodomänen) organisieren.<sup>[22]</sup> Das Expressionsmuster der GSL hängt dabei stark vom Entwicklungsstand der Zelle ab; insbesondere embryonale Zellen und Tumorzellen zeigen deutliche Unterschiede im Vergleich zu normal entwickelten Zellen. Zahlreiche GSL stehen im Verdacht, an Zell-Adhäsionsprozessen durch Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Wechselwirkung beteiligt zu sein, nur für wenige konnte dies jedoch bisher experimentell bestätigt werden. Man unterscheidet allgemein heterophile Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen, bei denen zwei unterschiedliche Zuckerepitope miteinander wechselwirken von homophilen mit zwei gleichartigen Bindungspartnern. Beispiele sind die spezifische heterophile Wechselwirkung zwischen den GSL-Epitopen GM3 ( $\text{Neu5Ac}\alpha(2\rightarrow3)\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{Glc}\beta$ ) und Gg3 ( $\text{GalNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{Glc}\beta$ )<sup>[62]</sup>, sowie die spezifische homophile Wechselwirkung zwischen zwei Lewis X-Epitopen ( $\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)[\text{Fuc}\alpha(1\rightarrow3)]\text{GlcNAc}\beta$ ).<sup>[63]</sup> Auf letztere wird im

folgenden Abschnitt kurz eingegangen. Daneben konnten auch abstoßende Effekte z.B. bei der homophilen GM3-Wechselwirkung festgestellt werden.<sup>[64]</sup>

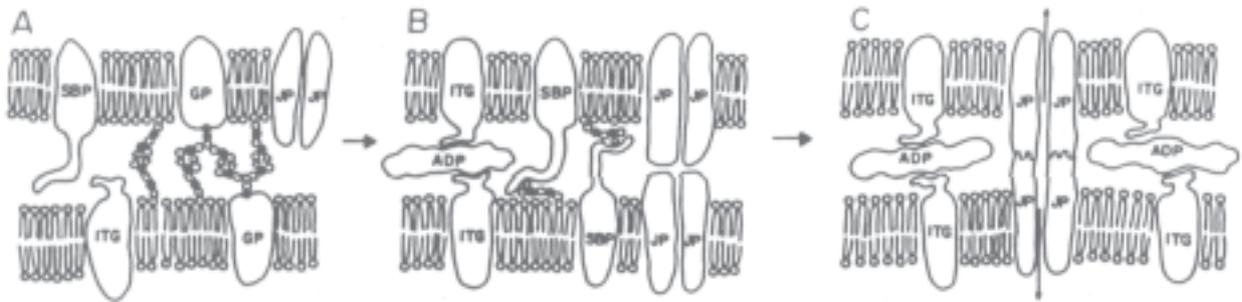
Die polyvalente Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Wechselwirkung kann auf makroskopischer Ebene mit einem Reiß- oder Klettverschluss verglichen werden (vgl. Abbildung 6).<sup>[65]</sup>



**Abbildung 6:** Model der polyvalenten Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Wechselwirkung nach *Spillman*.<sup>[65]</sup>

Die Kohlenhydratepitope repräsentieren dabei die komplementären Metallhäkchen bzw. Fasern, während die Ca<sup>2+</sup>-Ionen durch Koordination die räumliche Nähe der komplementären funktionellen Gruppen aufrechterhalten und so als „Klebstoff“ dafür sorgen, dass der Verschluss hält. Die Zellmembran selbst ist dagegen nicht direkt an der Bindung beteiligt, sondern sorgt lediglich für eine polyvalente Anordnung und Orientierung der wechselwirkenden Kohlenhydratepitope.

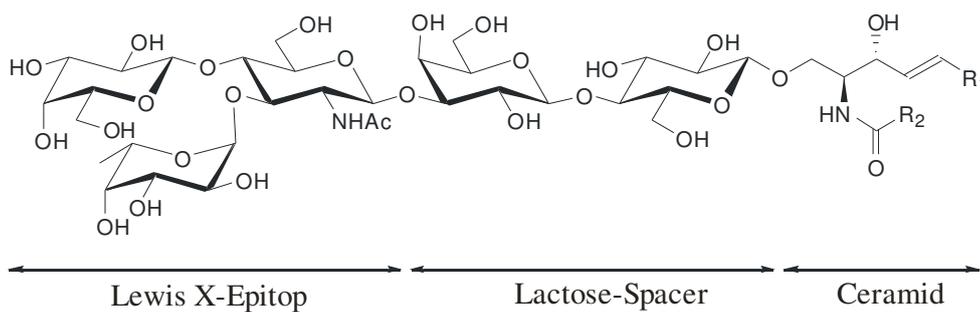
Die Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Wechselwirkung kann als erster Schritt in einem mehrstufigen Prozess der Zell-Zell-Erkennung oder Zell-Zell-Adhäsion angesehen werden (Abbildung 7, A).<sup>[22, 66]</sup> Durch ihre hohe Spezifität aber gleichzeitige relative Schwäche können Bindungen schnell gebildet, aber „falsche“ Kontakte auch leicht wieder gelöst werden. Zellen können auf diese Weise bei Migrations- oder Gewebsbildungsprozessen zuerst reversible Kontakte zu ihrer Umgebung ausbilden. In folgenden Schritten werden dann stärkere, oft unspezifischere Kohlenhydrat-Protein- oder Protein-Protein-Wechselwirkungen ausgebildet, die die Bindung insgesamt verstärken und eventuell biochemische Signalketten auslösen (Abbildung 7, B). Im letzten Schritt werden schließlich über spezielle Transmembranproteine („gap junctions“) Verbindungskanäle zwischen Zellen ausgebildet, wodurch direkte Zell-Zell-Kommunikation ermöglicht wird (Abbildung 7, C).



**Abbildung 7:** Modell der Zell-Zell-Erkennung nach Hakomori.<sup>[66]</sup>

## 1.1.6.2 Die homophile Lewis X-Lewis X-Wechselwirkung

Die Einteilung der Glycosphingolipide (GSL) erfolgt nach der Zusammensetzung ihres polaren Kohlenhydratanteils bzw. nach ihrer Kohlenhydratstruktur (Sequenz, Verzweigung und anomere Verknüpfung der Monosaccharidbausteine).<sup>[67, 68]</sup> Das Lewis X-Glycosphingolipid (Gal $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)[Fuc $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 3)]GlcNAc $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3)Gal $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)Glc $\beta$ 1 $\rightarrow$ Cer) gehört zur so genannten *neolacto*-Reihe (vgl. Abbildung 8).



**Abbildung 8:** Aufbau des Lewis X-Glycosphingolipids (R: Alkylreste).

Das endständige verzweigte Trisaccharid (Gal $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)[Fuc $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 3)]GlcNAc $\beta$ ) ist für die spezifische Erkennung durch einen Rezeptor ausreichend (Lewis X-Epitop); die Lactoseeinheit (Gal $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)Glc $\beta$ 1) dient lediglich als Abstandhalter (Spacer) zur Zellmembran, in die das Glykokonjugat über die Ceramid-Einheit eingebettet ist. Das Lewis X-Epitop ist das am besten untersuchte neutrale Zelloberflächen-Kohlenhydrat. Es ist auf einer großen Zahl verschiedener eukaryotischer Zellen identifiziert worden. Neben seinem Vorkommen in Glycosphingolipiden ist es auch als endständiges Epitop in Glycoproteinen zu finden. Wie zahlreiche andere Glycosphingolipide tritt es auch als Blutgruppenantigen und als tumorassoziiertes Antigen auf. Bei vielen Säugetieren wird es im frühen embryonalen Entwicklungsstadium auf der Zelloberfläche exprimiert, weshalb es auch den Namen SSEA-1 (stadiums-spezifisches embryonales Antigen) trägt.<sup>[63, 69]</sup> Es erreicht seine höchste Konzentration im 8- bis 16-Zell-Stadium (Morula-Stadium), wenn der zuvor recht lose Zellverband ein

kugelförmiges Aggregat bildet (Kompaktion). Die Zellen haften stärker aneinander und bilden möglichst viele Kontakte untereinander aus. Sobald dieser Prozess abgeschlossen ist, sinkt die Lewis X-Konzentration auf den Zelloberflächen wieder rapide ab. Wie unterschiedliche Experimente mit verschiedenen Zelllinien ergaben, wird der Kompaktionsprozess durch die homophile Lewis X-Wechselwirkung eingeleitet.<sup>[17]</sup> Das Lewis X-Epitop zeigt folglich eine spezifische nicht-kovalente Wechselwirkung mit sich selbst. Für diese ist die Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen notwendig; die Selektivität konnte durch Vergleichsexperimente mit ähnlichen Kohlenhydratepitopen nachgewiesen werden, die keine Wechselwirkung mit dem Lewis X-Epitop zeigten. Ebenso konnte bewiesen werden, dass nicht der Lipidanteil für die Aggregation verantwortlich ist.<sup>[70]</sup> Modellrechnungen haben ergeben, dass das Oberflächenprofil des Lewis X-Epitops eine hydrophile und eine hydrophobe Seite aufweist, deren komplementäre Moleküloberflächen gut zusammenpassen.<sup>[17]</sup> Weiterhin wurde festgestellt, dass zwischen dem Lewis X-Epitop und Lactose keine spezifische Wechselwirkung existiert.

## 1.2 Analytik von Kohlenhydrat-Wechselwirkungen

Die zahlreichen und vielfältigen Funktionen von Glycokonjugaten in biologischen Systemen - wie beispielhaft in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben - verlangen nach einer leistungsfähigen Analytik. Der Untersuchung von Kohlenhydrat-Protein- und Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen kommt deshalb in der Kohlenhydratchemie und -biologie eine Schlüsselrolle zu.<sup>[16]</sup> In diesem Abschnitt soll auf die wichtigsten Methoden eingegangen werden.

### 1.2.1 Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen

#### 1.2.1.1 Hämagglutinations-Assay

Die älteste und gleichzeitig auch einfachste Methode zur Abschätzung von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen beruht auf dem Agglutinationsprozess von roten Blutkörperchen (Erythrocyten) in der Gegenwart von Lektinen.<sup>[16]</sup> Bei einem Agglutinationsassay<sup>[71]</sup> werden verschiedene Konzentrationen gelöster Kohlenhydrate mit Lösungen aus roten Blutkörperchen und dem entsprechenden Lektin in Mikrotiterplatten vermischt. Die Glykokonjugate auf der

Erythrocytenoberfläche und die Kohlenhydrate in Lösung konkurrieren nun um die Bindestellen des Lektins. Bei niedrigen Konzentrationen an gelöstem Kohlenhydrat werden auch die Kohlenhydratepitope auf den Zelloberflächen von den polyvalenten Lektinen gebunden, wodurch sich ein gelartiges, quervernetztes Zell-Lektin-Gerüst ausbildet; dieser Prozess wird Agglutination oder Hämagglutination genannt. Bei hinreichend hoher Konzentration an gelöstem Kohlenhydrat wird dagegen der Agglutinationsprozess vollständig inhibiert, weil alle Lektinbindestellen von gelöstem Kohlenhydrat abgesättigt werden. Die minimale Inhibitionskonzentration (MIC) ist diejenige Konzentration an gelöstem Kohlenhydrat, die gerade noch zur vollständigen Inhibition der Agglutination führt. Sie ist für jede Lektin-Kohlenhydrat-Kombination eine charakteristische Größe. Da die Agglutination ein irreversibler Prozess ist, dürfen die ermittelten MIC-Werte nicht als Bindungskonstanten  $K$  aufgefasst werden. Letztere beziehen sich stets auf ein reversibles Gleichgewicht.

### 1.2.1.2 Affinitätschromatographie

Diese Methode beruht auf der Eigenschaft von Lektinen, spezifische, nicht-kovalente und reversible Bindungen zu ihren Kohlenhydratliganden auszubilden. Derjenige Kohlenhydratligand, der von dem gewünschten Lektin spezifisch erkannt wird, wird kovalent an eine inerte und poröse Matrix gebunden.<sup>[72]</sup> Als Matrix dient z.B. funktionalisierte Sepharose, an die Mono- oder Oligosaccharide gekuppelt werden. Auch verschiedene Polysaccharide oder matrixgebundene Glycoproteine werden als Affinitätsgel eingesetzt. Nach der Auftragung des Lektins auf die Affinitätssäule wird dieses durch eine Lösung des bindenden Kohlenhydrates wieder von dieser eluiert. Wiederholt man diesen Vorgang mit verschiedenen Kohlenhydratkonzentrationen in der Elutionslösung so lässt sich die Bindungskonstante  $K$  zwischen Kohlenhydrat und Lektin aus dem benötigten Elutionsvolumen in Abhängigkeit von der Zucker-Konzentration der Elutionslösung bestimmen.<sup>[73, 74]</sup>

### 1.2.1.3 Affinitätselektrophorese

Diese Methode ist eine Variante der Affinitätschromatographie.<sup>[75]</sup> Die elektrophoretische Mobilität von Lektinen in Affinitätsgelen, die spezifisch bindende immobilisierte Kohlenhydrate enthalten, nimmt mit zunehmender Konzentration an immobilisiertem Zucker ab. Dagegen wird die Wanderung der Lektine im elektrischen Feld durch die Zugaben von freiem Kohlenhydrat beschleunigt. Die Bindungskonstante  $K$  zwischen Kohlenhydrat und Lektin lässt sich aus der

elektrophoretischen Mobilität des Lektins in Abhängigkeit von der zugegebenen Konzentration an freiem Zucker ermitteln.<sup>[76]</sup>

### 1.2.1.4 Isothermische Titrationskalorimetrie (ITC)

Die isothermische Titrationskalorimetrie (ITC) wurde 1985 erstmals als Instrument zur Bestimmung von Bindungskonstanten  $K$  eingesetzt.<sup>[77]</sup> Bei dieser Methode wird die Wärmetönung bei der Interaktion verschiedener Substanzen untereinander gemessen (z.B. Lektin und Kohlenhydrat). Für ein ITC-Experiment wird das Kohlenhydrat in eine Spritze gefüllt und in die Probenzelle titriert, die eine Lösung des bindenden Lektins enthält. Der Wärmeaustausch, der durch die Wechselwirkung der beiden Substanzen stattfindet, wird mit einem Sensor gemessen. Dieser kann zur Bestimmung der Bindungskonstante  $K$ , der Stöchiometrie  $n$  und der Bindungsenthalpie  $\Delta H$  verwendet werden.<sup>[78, 79]</sup> Durch temperaturabhängige Messungen lassen sich über die van't Hoff-Beziehung zudem die Bindungsentropie  $\Delta S$  und die freie Reaktionsenthalpie  $\Delta G$  ermitteln. Die ITC ist eine genaue, schnelle und direkte Methode zur Bestimmung thermodynamischer Daten, die ohne die Immobilisierung von Liganden auskommt. Allerdings ist es bisher technisch nur möglich Bindungskonstanten  $K$  in einem Bereich von  $10^3 \text{ L mol}^{-1}$  bis  $10^7 \text{ L mol}^{-1}$  zu bestimmen.

### 1.2.1.5 Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR)

Bei dieser Methode wird die zeitliche Veränderung des Brechungsindex in der Nähe einer planaren Sensoroberfläche während des Bindungsprozesses eines gelösten Liganden an einen immobilisierten Rezeptor gemessen.<sup>[80-82]</sup> Der Sensorchip besteht dabei aus einem Glaträger, der mit einer dünnen Goldschicht überzogen ist, an die wiederum ein Bindungspartner (z.B. ein thiolderivatisiertes Kohlenhydrat) immobilisiert ist. Durch Einstrahlung von polarisiertem Licht auf die Rückseite des Sensorchips wird ein evaneszentes Feld erzeugt, welches bis zu 300 nm weit in die Lösung in einem Fließkanal auf der Vorderseite reicht. Dieses kann mit dem Brechungsindex der dort fließenden Analytlösung (z.B. einer Lektinlösung) wechselwirken. Das elektromagnetische Phänomen der Plasmonenresonanzschwingung (surface plasmon resonance, SPR) im Goldfilm wird durch die gebundenen Massen auf der Sensoroberfläche beeinflusst, was sich in einer Änderung des Brechungsindex bzw. einer Änderung des Austrittswinkels des reflektierten Lichtstrahls zeigt. Bindet der Analyt aus der Lösung an die Oberfläche des Sensorchips, so ändert sich die Masse und folglich auch das aufgezeichnete Reflexionsspektrum.

Die Änderung des Brechungsindex, gemessen in so genannten Resonanzeinheiten (resonance unit RU), korreliert direkt mit der Änderung der gebundenen Massenbeladung des Sensorchips und ist von der Art der Bindungspartner unabhängig. Zur Messung von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen muss deshalb die kleinere Kohlenhydrateinheit immobilisiert werden, um eine ausreichend hohe Sensitivität zu erzielen. Die Bindungskonstante  $K$  zwischen Kohlenhydrat und Lektin lässt sich aus den gemessenen Resonanzeinheiten in Abhängigkeit von der zugegebenen Lektinkonzentration ermitteln.<sup>[83]</sup>

### 1.2.1.6 NMR-Methoden

Durch die NMR-Spektroskopie kann die chemische Umgebung bestimmter Kerne von Proteinen anhand ihrer chemischen Verschiebung bestimmt und durch Titrationsexperimente mit Liganden deren Veränderung untersucht werden („chemical shift mapping“).<sup>[84]</sup> Dadurch können Informationen über die Spezifität und Affinität der Bindung, Bindungskonstanten sowie thermodynamische Daten ermittelt werden. Zur Bestimmung der Bindungskonstanten  $K$  eines Kohlenhydrat-Lektin-Komplexes wird zuerst ein  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des reinen Proteins aufgenommen, um die chemischen Verschiebungen der Proteinprotonen in ungebundenem Zustand zu bestimmen. Anschließend wird durch sequentielle Zugabe kleiner Aliquote des bindenden Kohlenhydrats und Messung der resultierenden chemischen Verschiebungen der Proteinprotonen eine Titrationskurve bestimmt. Dadurch können nicht nur die an der Bindung beteiligten Protonen (das Bindungsepitop) identifiziert werden, sondern aus der Abhängigkeit der Änderung der chemischen Verschiebung von der zugegebenen Kohlenhydratkonzentration kann zudem die Bindungskonstante  $K$  bestimmt werden. Die Bestimmung von kinetischen und thermodynamischen Daten (z.B.  $\Delta H$ ,  $\Delta S$ ,  $\Delta G$ ) ist durch temperaturabhängige Messungen und Auswertung über die van 't Hoff-Beziehung möglich.

Auf der Basis des so genannten Transfer Nuklear Overhauser Effektes (trNOE)<sup>[85, 86]</sup> können molekulare Erkennungsprozesse, wie z.B. Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen detaillierter untersucht werden.<sup>[87]</sup> Ein Magnetisierungstransfer kann nicht nur über chemische Bindungen (skalare Kopplung), sondern auch über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen durch den Raum erfolgen. Diese Eigenschaft wird bei der NOESY-Spektroskopie zur Messung von Proton-Proton-Abständen ausgenutzt. Die NOE-Intensität ist dabei abhängig von der Brownschen Bewegung des untersuchten Moleküls. Kleine Moleküle (z.B. Kohlenhydratliganden) bewegen sich schnell und führen zu geringen positiven NOE-Signalen, während sich große Moleküle (z.B. Proteine) oder gar Molekülaggregate (z.B. Liposome oder Micellen) langsam bewegen und große negative NOE-Intensitäten zeigen. Bei der Bindung eines freien Liganden in Lösung an

ein Protein verringert sich die Geschwindigkeit seiner Bewegung und die negativen NOE-Intensitäten des gebundenen Liganden werden auf die NOE-Signale des freien Liganden übertragen. Die unter diesen Bedingungen gemessenen NOE-Signale des Liganden werden als transferNOEs (trNOEs) bezeichnet. Sie können zur Bestimmung der Bindungskonstanten  $K$  genutzt werden.<sup>[84]</sup> Zusätzlich lassen sich aus trNOE-Signalen Informationen über die bioaktive Konformation eines an ein Protein gebundenen Liganden erhalten.<sup>[87]</sup>

### 1.2.1.7 Enzymgekoppelter Lektintest (ELLA)

Diese Methode ist eine Variante des ELISA-Verfahrens (enzyme-linked immunosorbant assay). Dabei wird die Bindung von Lektinen an Kohlenhydrate indirekt durch eine enzymatisch katalysierte Farbreaktion in einer Mikrotiterplatte nachgewiesen. Das Lektin wird auf der Oberfläche einer Mikrotiterplatte nicht-kovalent immobilisiert und mit einem Glycokonjugat in Lösung versetzt.<sup>[88, 89]</sup> Letzteres besteht aus dem bindenden Kohlenhydrat und einem Enzym, welches spezifisch die Reaktion einer farblosen Verbindung zu einem Farbstoff katalysiert. Nicht gebundenes Glycokonjugat wird durch Waschprozesse entfernt bevor die Farbstoffvorläuferverbindung zugegeben wird. Die Intensität der folgenden Farbreaktion ist ein Maß für die Affinität der Kohlenhydrat-Lektin-Bindung und kann spektroskopisch gemessen werden. Alternativ kann auch die Kohlenhydrat-Komponente immobilisiert und ein Lektin-Enzym-Konjugat verwendet werden.<sup>[90]</sup>

Zur Bestimmung von quantitativen Werten wird wie im Hämagglutinations-Assay die kompetitive Bindung zwischen Lektin und immobilisiertem bzw. löslichem Kohlenhydratliganden ausgenutzt. Hierbei wird ein Glycoprotein durch Adsorption an der Oberfläche von Mikrotiterplatten immobilisiert und mit Lektin-Konjugaten und verschiedenen Konzentrationen an löslichem Kohlenhydrat inkubiert.<sup>[91-93]</sup> Die Kohlenhydratliganden konkurrieren nun mit den Zuckerepitopen auf den Glycoproteinen um die Bindungsstellen auf den markierten Lektinen. Nach dem Entfernen von nicht gebundenem Lektin-Konjugat durch Waschen wird über eine Farbreaktion das Ausmaß der Lektinimmobilisation ermittelt. Die Farbintensität ist proportional zur Konzentration des in der Mikrotiterplatte gebundenen Lektins und umgekehrt proportional zur Affinität des Kohlenhydratliganden in Lösung zum Lektin. Aus der Abhängigkeit der Farbintensität von der Konzentration an zugegebenem Kohlenhydrat kann der  $IC_{50}$ -Wert bestimmt werden. Dieser entspricht definitionsgemäß derjenigen Konzentration an zugegebenem Inhibitor (hier Kohlenhydratligand), bei der 50% der Bindung des immobilisierten Liganden an das Lektin inhibiert wird.

Beim ELLA-Verfahren werden die Lektin-Kohlenhydrat-Komplexe im Gegensatz zum Hämagglutinations-Assay reversibel gebildet. Zu einem geringen Teil binden die Lektine jedoch auch unspezifisch und irreversibel an die Plastikoberfläche der Mikrotiterplatten. Dennoch stimmen die im ELLA-Verfahren ermittelten  $IC_{50}$ -Werte im Allgemeinen mit den Bindungskonstanten  $K$ , die durch andere biophysikalische Methoden bestimmt wurden, gut überein.<sup>[94]</sup> Der ELLA-Test kann als Vorläufermethode von Kohlenhydrat-Arrays bzw. Lektin-Arrays betrachtet werden (vgl. Abschnitt 1.3.5).

### 1.2.2 Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen

Prinzipiell lassen sich die im vorigen Abschnitt beschriebenen Methoden auch zur Untersuchung von Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen heranziehen. Allerdings erschwert die Schwäche der Wechselwirkung ihre Untersuchung; dabei ist vor allem die Unterscheidung zwischen spezifischen und unspezifischen Wechselwirkungsanteilen problematisch. In biologischen Systemen treten Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen zudem nur in Zusammenhang mit stärkeren Kohlenhydrat-Protein und Protein-Protein-Wechselwirkungen auf, so dass ihr Beitrag nur schwer zu messen ist. Tatsächlich gibt es in biologischen Systemen nur qualitative Beweise für ihre Existenz, aber keine thermodynamischen oder kinetischen Daten<sup>[20]</sup> (für die Anwendung der ITC sind die Affinitäten zu gering). Von den bereits erwähnten Verfahren spielen deshalb nur die Affinitätschromatographie, die Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) und NMR-Methoden eine Rolle. Weiterhin eingesetzt werden die Elektronenmikroskopie und die Kraftfeldmikroskopie (AFM), in Spezialfällen gelang auch die Kristallisation komplexer Kohlenhydratstrukturen, der massenspektrometrische Nachweis von Kohlenhydrat-Dimeren durch ESI-MS oder der qualitative Nachweis von Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen durch Messung von Verteilungsgleichgewichten.

Verschiedene Modellsysteme, die für die stärkere Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkung entwickelt worden sind, wurden auch zur Untersuchung von Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen eingesetzt. Viele vermutete Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen konnten erst in solchen Modellsystemen zweifelsfrei nachgewiesen werden. Natürliche Glycosphingolipide oder Neoglycolipide können z.B. in die Membranen von Zellen oder Liposomen eingebaut werden. Die spezifische Wechselwirkung dieser präparierten Zellen bzw. Liposomen untereinander oder gegenüber Oberflächen, die mit den interessierenden Kohlenhydrat-Epitopen beschichtet sind, kann auf diese Weise untersucht werden (Zell-Assay bzw. Liposomen-Assay).

Auf Untersuchungen der spezifischen homophilen Lewis X-Wechselwirkung durch die Kraftfeldmikroskopie und durch NMR-Methoden soll im Folgenden kurz eingegangen werden.

Die Stärke der homophilen Lewis X-Wechselwirkung konnte durch die Kraftfeldmikroskopie (AFM) quantifiziert werden.<sup>[95, 96]</sup> Dazu wurden Lewis X-Neoglycokonjugate synthetisiert, die über einen Alkyllinker mit einer Thiolgruppe funktionalisiert waren. Mit diesen konnte auf einer Goldoberfläche eine monomolekulare selbstorganisierte Schicht (SAM) erzeugt werden, gleichzeitig konnte ebenfalls die mit Gold beschichtete Spitze des Kraftfeldmikroskops mit ihnen funktionalisiert werden. Die Adhäsionskraft pro Lewis X-Epitop betrug ungefähr 20 pN, was einer Bindungsenergie von  $5.7 \text{ kJmol}^{-1}$  entspricht.

Eine direkte NMR-spektroskopische Beobachtung der homophilen Lewis X-Wechselwirkung war nicht möglich, da einzelne Lewis X-Epitope in wässriger Lösung aufgrund der Schwäche ihrer Wechselwirkung hauptsächlich dissoziiert vorliegen (das gilt sowohl in calciumhaltiger als auch in calciumfreier Lösung).<sup>[97]</sup> Jedoch synthetisierte C. Gege aus unserer Arbeitsgruppe Lewis X-Glycolipide, die sich an der Oberfläche von Liposomenmembranen durch Insertion ihrer hydrophoben Alkylreste verankern ließen.<sup>[98, 99]</sup> Durch NMR-spektroskopische Untersuchungen (Bestimmung von NOE-Kreuzsignalen bzw. NOESY-Spektren mit und ohne Calciumionen) konnte für die Bindung der auf diese Art präparierten Liposomen eine Affinitätskonstante von  $K = 2\text{-}3 \text{ L mol}^{-1}$  in Gegenwart eines Calciumüberschusses bestimmt werden.<sup>[100]</sup>

Weiterhin synthetisierte er ein Neoglycokonjugat, bei dem zwei Lewis X-Trisaccharide über eine Methylengruppe zwischen den 6-Hydroxylgruppen der Glucosamineinheiten verknüpft sind.<sup>[98, 99]</sup>

Diese hält die beiden Trisaccharide in direkter Nachbarschaft, ohne sie jedoch in eine definierte relative Anordnung zu zwingen. Analoge Verbindungen aus einem Lewis X-Trisaccharid und Lactose bzw. zwei Lactoseeinheiten wurden ebenfalls dargestellt. Durch NMR-spektroskopische Untersuchungen dieser Verbindungen (Titrationsexperimente mit Calciumionen, Bestimmung von NOE-Kreuzsignalen bzw. ROESY-Spektren mit und ohne Calciumionen) konnte die Spezifität der homophilen Wechselwirkung des Lewis X-Epitops bestätigt werden, ebenso deren Calciumabhängigkeit.<sup>[101]</sup> Die Kooperativität der Calciumkomplexierung durch beide Lewis X-Einheiten konnte nachgewiesen werden und der molekulare Erkennungsprozess, d.h. die Anordnung der wechselwirkenden Lewis X-Kontaktflächen konnte genauer bestimmt werden: Die beiden Lewis X-Trisaccharide nehmen eine gekreuzte, fast rechtwinklig relative Anordnung zueinander ein, in einer definierten, „eingefrorenen“ Konformation der Kohlenhydratpyranosen. Dadurch bildet sich eine polare Bindungstasche, in die sich das Calciumion passend einfügt. Dieses wird durch insgesamt fünf Hydroxylgruppen der beiden Kohlenhydratepitope koordiniert,

zusätzlich stabilisiert ein hydrophober Kontakt zwischen den beiden Trisaccharideinheiten den Komplex.

### 1.3 Array-Verfahren und Kohlenhydrat-Arrays

#### 1.3.1 Grundprinzip der Array-Verfahren

Die Array-Technologie ist eine relativ neuartige Methode zur Analytik nicht-kovalenter Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen.<sup>[102-104]</sup> Ihr Grundprinzip besteht in der Immobilisation verschiedener Varianten eines Bindungspartners auf einem festen Träger in räumlich getrennter Anordnung (orts aufgelöste adressierbare Immobilisation); dieser immobilisierte Teil des Rezeptor-Ligand-Paares wird Sonde genannt. Der korrespondierende Bindungspartner, der als Probe bezeichnet wird, wird in Lösung und in markierter Form auf den so präparierten Träger aufgebracht und bindet dort spezifisch an seinen Wechselwirkungspartner. Auch die Probe kann aus einem Gemisch verschiedener Varianten des zweiten Bindungspartners bestehen, wobei die verschiedenen Formen in diesem Fall auch unterscheidbare Markierungen tragen müssen. Nach der Entfernung von nicht-gebundenen Molekülen durch Waschprozesse können verbliebene spezifisch gebundene Proben aufgrund ihrer Markierung orts aufgelöst detektiert werden. Da die räumliche Anordnung der immobilisierten Sonden bekannt ist, können auf diese Weise Bindungspartner einander zugeordnet werden.

In vielen Fällen sind die Array-Methoden bezüglich Geschwindigkeit und Effizienz herkömmlichen Verfahren überlegen, da bei einem Array-Experiment zahlreiche Analysen parallel durchgeführt und in einem Arbeitsschritt ausgewertet werden können. In vielen Fällen sind die Verfahren zudem automatisierbar; sie ermöglichen so ein kostengünstiges und leistungsfähiges Screening nicht-kovalenter Wechselwirkungen. Die Array-Verfahren können als Weiterentwicklung des ELISA- bzw. ELLA-Verfahrens betrachtet werden, bei denen die orts aufgelöste Immobilisierung der Sonden in verschiedene Vertiefungen von Mikrotiterplatten erfolgt. Die Sondendichte und damit auch die Anzahl der in einem Experiment parallel durchführbaren Analysen sind dabei jedoch durch die Anzahl der Vertiefungen beschränkt (routinemäßig Verwendung finden Mikrotiterplatten mit 96 oder 384 Vertiefungen). Die Array-Technik erlaubt dagegen eine weitere Miniaturisierung durch die Immobilisierung kleiner Probenmengen, so genannter Probenspots. Probenlösungen in Volumina im Mikro- oder

Nanolitermaßstab können durch Pipettierroboter auf dem Träger aufgebracht werden. Als Trägermaterial werden u.a. Polystyrol, Nitrocellulose, Gold, Quarz- oder Siliciumwafer und Glas verwendet, häufig in zur Immobilisierung geeigneter derivatisierter Form. Besonders Glasträger weisen einige Vorteile auf: Sie sind hart, flach, für Flüssigkeiten undurchlässig und sie halten höheren Temperaturen und Ionenstärken bei der Aufbringung der Proben oder bei Bindungs- und Waschprozessen stand.

### 1.3.2 Klassifizierung von Array-Verfahren und Immobilisierungsmethoden

Array-Verfahren (auch Mikroarray-Verfahren oder Chip-Verfahren genannt) können auf verschiedene Weise klassifiziert werden.<sup>[104-106]</sup>

Nach der Herkunft des zu immobilisierenden Materials unterscheidet man Bioarrays (oder Biochips) von chemischen Arrays. Bei ersteren werden Substanzen aus biologischen oder biochemischen Quellen verwendet, z.B. Proteine (inklusive Enzyme und Antikörper, Protein-Arrays) und isolierte DNA (DNA-Arrays), aber auch ganze Zellen (Zell-Arrays) oder Gewebebestandteile (Gewebe-Arrays, „tissue arrays“). Chemische Arrays bestehen dagegen aus einer Anordnung synthetisierter organischer Verbindungen wie z.B. Peptide (Peptid-Arrays), Oligonukleotide (DNA-Arrays), Kohlenhydrate (Kohlenhydrat-Arrays) oder sonstiger kleiner organischer Moleküle („small molecule arrays“).

Nach der Art der Immobilisierung kann man unterscheiden zwischen den *in situ* Synthesemethoden und den *ex situ* Synthesemethoden.

Bei den ersten Methoden werden die verschiedenen Sonden direkt auf der festen Arrayoberfläche parallel synthetisiert, wobei durch kombinatorische Verfahren eine Vielfalt verschiedener Sondenmoleküle auf kleinstem Raum erreicht wird. Diese Verfahren sind (bisher) auf lineare Oligomere wie Oligonukleotide und Peptide beschränkt, für die ausgereifte Methoden zur Festphasensynthese inklusive passender Schutzgruppen zur Verfügung stehen. Mit Hilfe des SPOT-Verfahrens können z.B. Peptid-Arrays unter Verwendung von Fmoc-geschützten Aminosäuren auf Papier oder Membranen automatisiert dargestellt werden.<sup>[107, 108]</sup> Methoden zur lichtgesteuerten parallelen Synthese unter Verwendung photolabiler Schutzgruppen wurden zuerst gleichfalls für die Synthese von Peptid-Arrays entwickelt<sup>[109]</sup> und werden inzwischen zur Darstellung von DNA-Arrays routinemäßig eingesetzt.<sup>[110, 111]</sup>

Bei den *ex situ* Methoden werden die Sonden zuerst einzeln synthetisiert bzw. aus biologischem Material isoliert und dann in einer festgelegten räumlichen Anordnung auf einem festen Träger

immobilisiert. Diese Verfahren unterliegen prinzipiell keiner Beschränkung und sind auf alle Arten von Arrays anwendbar. Sie lassen sich weiter unterscheiden nach der Art der Verknüpfung zwischen der Trägeroberfläche und den zu immobilisierenden Sondenmolekülen. Man unterscheidet dabei einerseits zwischen kovalenter und nicht-kovalenter und andererseits zwischen spezifischer (chemoselektiver) und nicht-spezifischer (nicht selektiver) Immobilisierung.

Bei der nicht-kovalenten nicht-spezifischen Immobilisierung werden die Sondenmoleküle lediglich durch physikalische Adsorption (hydrophobe oder ionische Wechselwirkung) mit einer Trägeroberfläche verbunden. Dieser einfache Ansatz wird in der Regel für Proteine verwendet, die z.B. auf hydrophoben Plastikoberflächen (z.B. Polystyrol), auf Nitrozellulose-Membranen<sup>[112]</sup> oder auf kationischen Aminosilanen<sup>[113]</sup> adsorbiert wurden.

Bei der nicht-kovalenten spezifischen Immobilisierung werden die Sonden zuerst mit einem Anker-molekül („tag“) kovalent verknüpft, das wiederum spezifisch aber nicht-kovalent an seinen immobilisierten Partner („capturing molecule“) auf der Trägeroberfläche bindet. Ein typisches Beispiel hierfür ist das Biotin-Streptavidin System zur Immobilisierung von biotinylierten Sonden (Proteine, Peptide oder auch kleinere organischen Moleküle) auf Streptavidin-derivatisierten Oberflächen.<sup>[114]</sup> Weitere derartige nicht-kovalente Bindungssysteme sind bekannt. Bei den kovalenten Immobilisierungsmethoden muss eine chemisch modifizierte (derivatisierte) Trägeroberfläche mit passenden Funktionalitäten vorliegen, um eine kovalente Bindung zu bestimmten funktionellen Gruppen der Sondenmoleküle zu ermöglichen.

Bei der nicht-spezifischen Variante sind diese Gruppen in den Sondenmolekülen mehrfach vorhanden, wobei eine nicht näher definierte mit der entsprechend komplementären Funktionalität auf der Trägeroberfläche reagiert und so die Sonde kovalent verknüpft. Beispiele hierfür sind die Reaktion terminaler Aminofunktionen in Lysinseitenketten von Proteinen mit Aldehyd-<sup>[115]</sup>, Isocyanat-<sup>[116]</sup>, Epoxy-<sup>[117]</sup> oder *N*-Hydroxy-succinimidylester-Gruppen<sup>[116, 118]</sup> zur Darstellung von Proteinarrays.

Bei der spezifischen Variante dagegen wird die Verknüpfung durch die Reaktion zweier definierter funktioneller Gruppen auf der Sonde und der Trägeroberfläche unter Ausbildung einer definierten kovalenten chemischen Bindung erreicht. Hierfür wurde eine große Vielfalt verschiedener Methoden eingesetzt, auf die an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden soll. Viele dieser Methoden wurden auch zur Darstellung von Kohlenhydrat-Arrays verwendet, diese werden in Abschnitt 1.3.5 besprochen.

Die spezifischen Methoden benötigen einerseits einen größeren Arbeitsaufwand, da die Sonden vor dem Immobilisierungsprozess erst passend funktionalisiert werden müssen. Dafür wird andererseits eine definierte Anordnung der Sonden auf dem Träger erhalten. Insbesondere kann

vermieden werden, dass das Bindungssepitop selbst mit der Trägeroberfläche reagiert bzw. sterisch auf dieser unzugänglich präsentiert wird, so dass es nicht mehr mit seinem Probenpartner in Lösung interagieren kann. Bei den nicht-kovalenten Methoden besteht die Gefahr, dass die Sonden im Verlauf von Waschprozessen unter Umständen wieder vom Träger entfernt werden und auf diese Weise das Array-Experiment misslingt. Diese Gefahr besteht vor allem bei kleineren Molekülen (kleine Peptide, Kohlenhydrate oder sonstige organische Moleküle). Dementsprechend ist spezifisch kovalenten Immobilisierungsmethoden wenn möglich der Vorzug zu geben.

Eine weitere Art der Oberflächenmodifikation zur Herstellung von Arrays sind selbstorganisierte monomolekulare Schichten (SAM, „self-assembled monolayers“). Dazu werden thiol- bzw. silanderivatisierte bifunktionelle Linkermoleküle aus Ethylenglykol oder Alkanketten auf Gold- bzw. Glasoberflächen immobilisiert; diese tragen am anderen Ende eine funktionelle Gruppe zur spezifischen kovalenten Verknüpfung mit entsprechenden Sondenmolekülen. Die Linkermoleküle ordnen sich selbstorganisierend als definierte monomolekulare Schichten an. Im Fall von thiolderivatisierten Linkern und Goldoberflächen können Array-Methode und SPR- bzw. AFM-Verfahren miteinander kombiniert werden (vgl. Abschnitt 1.2.1.5). SAMs thiolderivatisierter Kohlenhydrate sind schon länger bekannt als Kohlenhydrat-Arrays.<sup>[119]</sup>

### 1.3.3 Detektionsmethoden

Array-Methoden lassen sich weiterhin nach der Art der Detektion des Bindungsereignisses klassifizieren. Diese richten sich in der Regel nach der Art der Probe bzw. ihrer Herkunft (Synthese oder Isolation aus biologischem Material). Die Probenmoleküle können einerseits direkt markiert werden, z. B. mit einem Fluoreszenzfarbstoff oder einem radioaktiven Isotop. Dies ist in der Regel der Fall bei DNA-Array-Experimenten, bei denen die Oligonukleotidproben während ihrer PCR-Amplifikation mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 oder Cy5 (vgl. Abschnitt 4.2) oder aber mit dem radioaktivem <sup>32</sup>P-Isotop markiert werden. Die Detektion der Bindung erfolgt in diesen Fällen durch Fluoreszenzmessung oder Autoradiographie. Proteine u.a. auch Lektine können z.B. über die Aminofunktion ihrer Lysinseitenketten mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden; viele fluoreszenzmarkierte Proteine, insbesondere auch Lektine, sind inzwischen kommerziell erhältlich. Andererseits existiert auch eine Vielzahl an indirekten Detektionsmethoden, bei denen das auf dem Träger gebundene Probenmolekül spezifisch weitere markierte Konjugate bindet, die wiederum in der Regel spektroskopisch detektiert werden. Diese Methoden sind häufig für ELISA-Experimente entwickelt und auf die Array-Verfahren übertragen worden. So können z.B. Proteinproben mit Biotin markiert sein und

dadurch ihrerseits Streptavidin-Konjugate spezifisch binden. Diese sind dann entweder mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert oder aber mit einem Enzym, das wiederum eine Farbreaktion katalysiert. Proteinproben können entsprechend auch spezifisch durch Antikörper-Konjugate gebunden und über diese detektiert werden. Weitere Nachweismöglichkeiten für die spezifische Bindung von Proteinproben bestehen in der Massenspektroskopie und der Kombination von Array-Methode mit der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR, vgl. Abschnitt 1.2.1.5) oder mit FRET-Methoden.

### 1.3.4 Anwendung von Array-Methoden

Array-Experimente sind zur Untersuchung einer Vielzahl bioanalytischer Fragestellungen durchgeführt worden.

DNA-Arrays werden in der Genomik eingesetzt. Als Genomik bezeichnet man die Erforschung des Genoms und der Wechselwirkungen der darin enthaltenen Gene. DNA-Arrays finden dabei Verwendung in der Genexpressionsanalyse, zur Entdeckung neuer Gene, zum Nachweis von Mutationen (Genotyping), zur Genkartierung und in der DNA-Sequenzierung (SBH).<sup>[120-122]</sup>

Protein-Arrays werden in der Proteomik eingesetzt, d.h. der Erforschung der Gesamtheit aller Proteine einer Zelle und deren Wechselwirkungen untereinander. Sie dienen dabei als analytisches Werkzeug u.a. für ein leistungsfähiges Screening der Proteinaktivität und den Nachweis von Protein-Protein-, Protein-DNA- und Protein-Ligand-Wechselwirkungen.<sup>[123-125]</sup>

Daneben wurden in den letzten Jahren auch Kohlenhydrat-Arrays entwickelt, um nicht-kovalente Wechselwirkungen mit diesen wichtigen Biomolekülen zu untersuchen. Für dieses Forschungsgebiet hat sich in Analogie zu den beiden anderen Gebieten der Begriff Glycomik (oder auch Glycoproteomik) eingebürgert. Die Darstellung von Kohlenhydrat-Arrays war die Hauptaufgabe dieser Arbeit; auf Kohlenhydrat-Arrays soll deshalb im folgenden Abschnitt genauer eingegangen werden.

### 1.3.5 Kohlenhydrat-Arrays

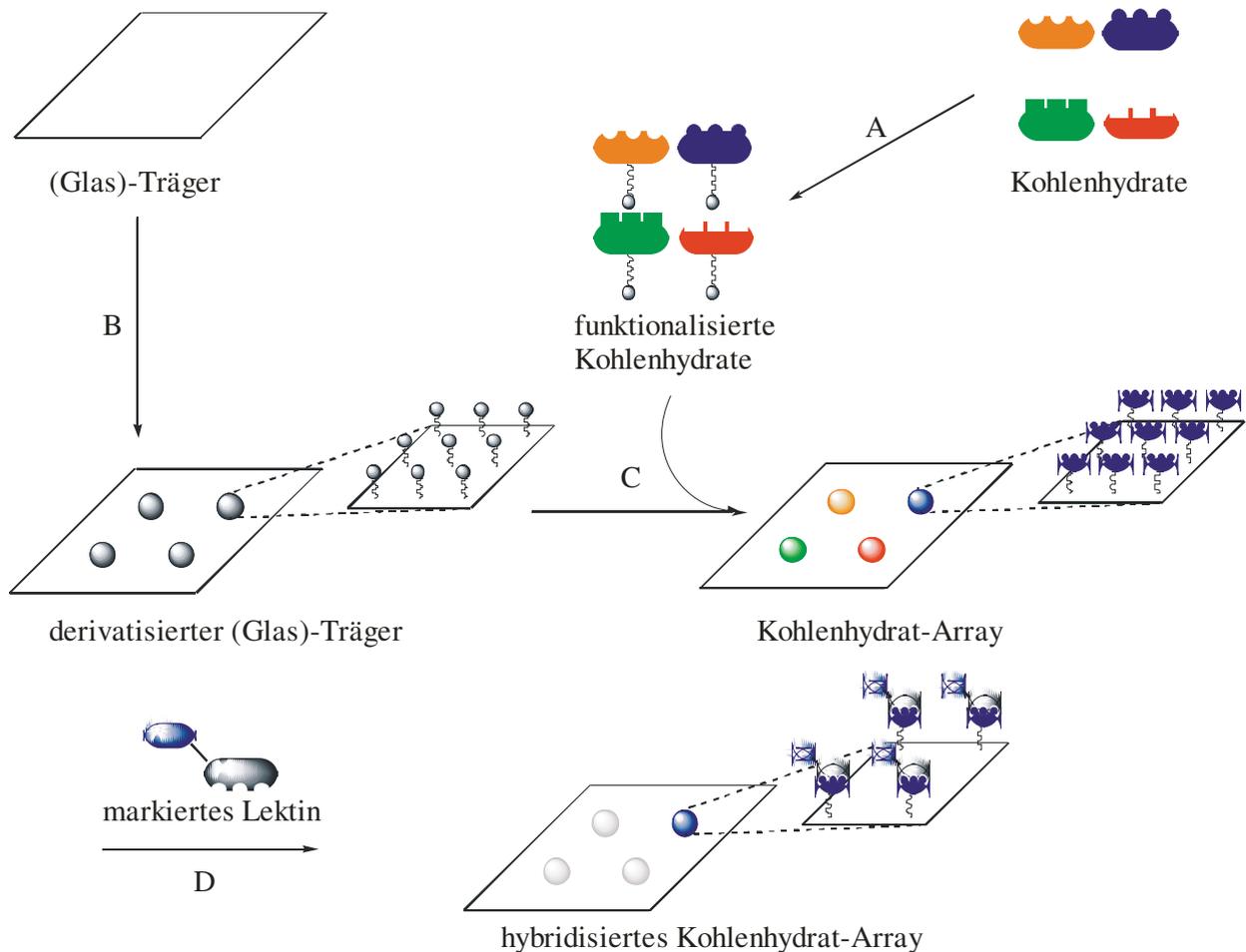
#### 1.3.5.1 Allgemeiner Überblick

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit (Mai 2002) waren gerade vier Arbeiten über Kohlenhydrat-Arrays veröffentlicht<sup>[126-129]</sup> - im Laufe der letzten Jahre sind mehr als 70 weitere Arbeiten

erschienen, die sich im engeren Sinne mit der Darstellung von Kohlenhydrat-Arrays und ihrer Verwendung zur Untersuchung von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen beschäftigen. Mehr als 30 weitere Arbeiten wurden veröffentlicht, bei denen Kohlenhydrat-Arrays als Untersuchungsmethode eingesetzt wurden; mit ihrer Hilfe konnten nicht nur bekannte Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkungen nachgewiesen, sondern auch bisher unbekannte neu entdeckt werden. Eine Art von Kohlenhydrat-Array ist zudem kommerziell erhältlich („GlycoChip“ von der Firma *Glycominds*).<sup>[130, 131]</sup> Weiterhin sind bereits zahlreiche Übersichtsartikel zu diesem Themenkomplex erschienen.<sup>[132-148]</sup> Diese Aufzählung mag die wachsende Bedeutung dieses aktuellen Forschungsgebietes widerspiegeln.

Um exakt zu sein sollten als Kohlenhydrat-Arrays nur solche bezeichnet werden, bei denen tatsächlich Kohlenhydratstrukturen auf einem festen Träger als Sonde immobilisiert sind und deren spezifische Wechselwirkung zu anderen Proben-Biomolekülen, in der Regel Lektinen, in Lösung untersucht wird. Im Gegensatz dazu sind in jüngster Zeit (seit dem Jahr 2005) auch Arbeiten zu so genannten Lektin-Arrays erschienen. Dabei werden kohlenhydratbindende Proteine (Lektine) auf einem festen Träger als Sonde immobilisiert und ihre Wechselwirkung mit Kohlenhydraten oder Glycokonjugaten als Probe untersucht. Lektin-Arrays sind folglich den Protein-Arrays zuzuordnen. Mit Hilfe von Lektin-Arrays wurden die Wechselwirkungen zwischen Lektinen und fluoreszenzmarkierten Kohlenhydraten<sup>[149, 150]</sup>, Polysacchariden<sup>[150]</sup>, Glycopeptiden<sup>[149]</sup> und Glycoproteinen<sup>[149, 151-153]</sup> untersucht. Die Bindung ganzer Zellen über ihre Oberflächenglycanstrukturen konnte ebenfalls nachgewiesen werden.<sup>[150, 154]</sup> Mit Hilfe immobilisierter fluoreszenzmarkierter Lektine konnte auch die Wechselwirkung nicht-markierter Kohlenhydrate über einen FRET-Prozess untersucht werden.<sup>[155]</sup> Eine Art von Lektin-Array ist kommerziell erhältlich („Qproteome GlycoArray Kit“ von der Firma *Qiagen*).<sup>[106]</sup>

Die Herstellung eines Kohlenhydrat-Arrays und seine Verwendung zur Untersuchung von Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkungen ist in Abbildung 9 schematisch dargestellt. Die interessierenden Kohlenhydrate müssen in der Regel funktionalisiert werden (Schritt A), genauso wie die Trägeroberfläche (Schritt B), bevor die Immobilisierung der verschiedenen Epitope in räumlich getrennter Anordnung stattfinden kann (Schritt C). Nach der Hybridisierung mit markiertem Lektin (Schritt D) und anschließenden Waschprozessen kann die spezifische Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkung aufgrund des sich ergebenden Hybridisierungsmusters detektiert werden. Zwischen Immobilisation (Schritt C) und Hybridisierung (Schritt D) kann noch ein Blockierungsschritt liegen, bei dem diejenigen funktionellen Gruppen auf der Trägeroberfläche, die im vorherigen Schritt nicht reagiert haben, mit einem Blockierungsreagenz abgesättigt werden.



**Abbildung 9:** Herstellung eines Kohlenhydrat-Arrays und Hybridisierungsexperiment mit markierten Lektinen.

Die veröffentlichten Arbeiten über Kohlenhydrat-Arrays unterscheiden sich im Wesentlichen in folgenden Aspekten:

- Quelle der zu immobilisierenden Kohlenhydratstrukturen  
Neben der z.T. aufwändigen chemischen Synthese wurden Kohlenhydratepitope auch durch Isolation aus biologischem Material erhalten.
- Art der Immobilisierung auf dem festen Träger  
Die Verknüpfung von Kohlenhydrat und Träger erfolgte kovalent oder nicht-kovalent, spezifisch oder nicht-spezifisch (Schritt C).
- Art der Detektion der Immobilisierung  
In den meisten Arbeiten wurde die Immobilisation der Kohlenhydratepitope auf dem Träger (Schritt C) nicht weiter kontrolliert, sondern lediglich indirekt durch das folgende Hybridisierungsexperiment nachgewiesen. In einigen Fällen wurden fluoreszenzmarkierte Oligo- oder Polysaccharide<sup>[126, 156-159]</sup> oder derivatisierte Fluoreszenzfarbstoffe<sup>[151, 160, 161]</sup> verwendet, um die Immobilisierungsmethode zu überprüfen. Daneben konnte die

Immobilisierung direkt durch Massenspektrometrie<sup>[162-164]</sup>, IR-Spektroskopie<sup>[165-167]</sup> oder Photoelektronenspektroskopie<sup>[165]</sup> nachgewiesen werden.

- Art der Detektion der Kohlenhydrat-Ligand-Wechselwirkung:

Zum Nachweis der Hybridisierung (Schritt D) wurden in den meisten Fällen fluoreszenzmarkierte Lektine oder fluoreszenzmarkierte Antikörper verwendet. Letztere waren dabei entweder direkt gegen das immobilisierte Kohlenhydratepitop selbst oder aber indirekt gegen ein spezifisch gebundenes (unmarkiertes) Lektin gerichtet. Weiterhin konnte die spezifische Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkung durch SPR<sup>[128, 166, 168, 169]</sup> oder massenspektrometrische Analyse von gebundenem Lektin<sup>[162]</sup> detektiert werden.

### 1.3.5.2 Immobilisierungsmethoden

Im Folgenden soll auf die bekannten Immobilisierungsmethoden zur Darstellung von Kohlenhydrat-Arrays genauer eingegangen werden.

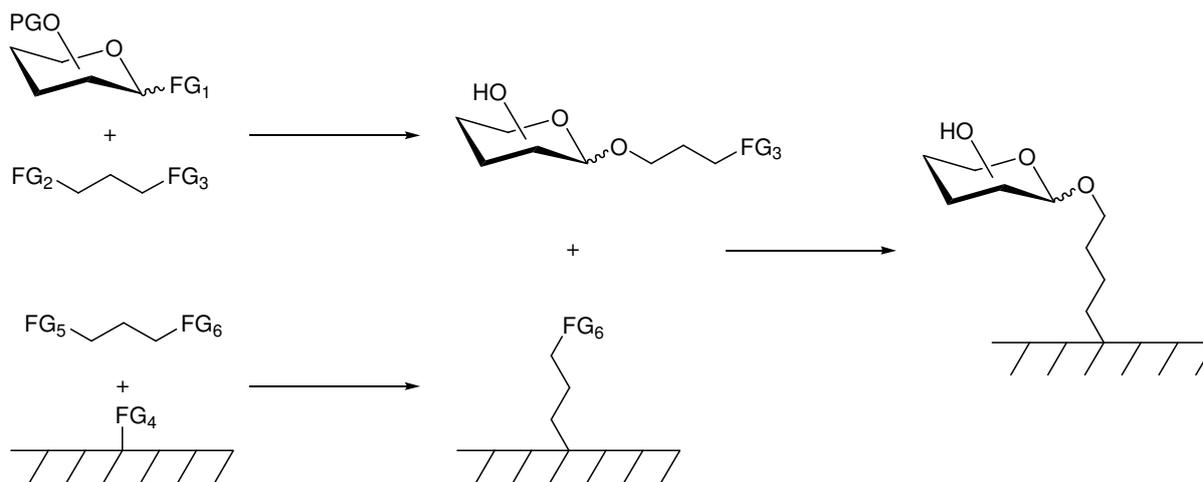
Im Falle der nicht-kovalenten nicht-spezifischen Immobilisierung wurden Polysaccharide<sup>[126, 129, 156, 170]</sup>, Glycopeptide<sup>[171]</sup>, Glycoproteine<sup>[126, 129, 156, 170, 172]</sup>, Neoglycoproteine<sup>[129, 170]</sup> und Proteoglycane<sup>[129]</sup> auf Polystyrol<sup>[129]</sup> oder Nitrocelluloseoberflächen<sup>[126, 156, 170, 172]</sup> adsorbiert. Des Weiteren wurden hochmolekulare Polyacrylamid-Neoglycokonjugate auf Polystyrolträgern immobilisiert.<sup>[173]</sup> Diese Art der Immobilisierung ist für niedermolekulare Oligosaccharide oder gar Monosaccharide ungeeignet, da diese wieder leicht von der Trägeroberfläche abgewaschen werden können. Dementsprechend wurde z.B. eine Zunahme der Adsorptionseffizienz von Dextranen auf Nitrocellulose mit steigendem Molekulargewicht beobachtet.<sup>[126]</sup>

Bei den Verfahren zur nicht-kovalenten spezifischen Immobilisierung wurden verschiedene Anker-moleküle eingesetzt, mit denen Kohlenhydratstrukturen durch Synthese kovalent verknüpft wurden. So wurden beispielsweise durch Funktionalisierung von Mono- oder Oligosacchariden mit verschiedenen hydrophoben Alkyl-linkern Neoglycolipide synthetisiert, die nicht-kovalent auf Polystyrol<sup>[164, 174-178]</sup>, Nitrocellulose<sup>[170, 179]</sup> oder Glas<sup>[157]</sup> adsorbiert wurden. Ebenso wurden biotinylierte Mono- oder Oligosaccharide<sup>[180, 181]</sup> und biotinylierte Polyacrylamid-Glycokonjugate<sup>[182]</sup> auf Streptavidin-derivatisierten Oberflächen gebunden. Des Weiteren konnte ein polyanionisches Glycopolymer durch mehrlagige ionische Wechselwirkung auf einer Goldoberfläche immobilisiert werden.<sup>[167]</sup> Darüber hinaus wurde die spezifische Wechselwirkung von Fluorphasen benutzt, um Kohlenhydrate, die mit einem perfluorierten Alkyl-linker derivatisiert worden waren, auf Teflonoberflächen zu adsorbieren.<sup>[183, 184]</sup> Schließlich wurden Kohlenhydratderivate mit Linkereinheiten synthetisiert, die an ihrem Ende mit Carbonsäuregruppen funktionalisiert waren. Nach Überführung in die entsprechenden

*N*-Hydroxysuccinimidester (NHS-Ester) konnten diese kovalent an Lysin-derivatisierte BSA-Moleküle gekuppelt werden. Die auf diese Weise erhaltenen Neoglycokonjugate wurden auf epoxidderivatisierten Glaträgern immobilisiert.<sup>[185, 186]</sup>

Die wenigen kovalent nicht-spezifischen Immobilisierungsmethoden beruhen auf photochemischen Reaktionen von mit Phthalimid<sup>[158]</sup>- oder Diazirin-Molekülen<sup>[151, 160]</sup> derivatisierten Trägeroberflächen mit nicht-funktionalisierten Kohlenhydraten.

Die prinzipielle Vorgehensweise bei den häufigeren Methoden zur kovalenten spezifischen Immobilisierung von Kohlenhydraten<sup>[187]</sup> ist in Abbildung 10 schematisch dargestellt.



**Abbildung 10:** Schema der kovalent spezifischen Immobilisierung von Kohlenhydraten (FG: funktionelle Gruppe).

Neben der Funktionalisierung der zu immobilisierenden Kohlenhydrate durch bifunktionelle Linker in Lösung (Abbildung 10 oben) müssen in der Regel auch die Trägeroberflächen derivatisiert werden, da nicht alle benötigten funktionalisierten Glaträger kommerziell erhältlich sind. Dies geschieht normalerweise gleichfalls durch Reaktion mit bifunktionellen Linkern, die auf der einen Seite eine komplementäre Funktionalität zur Trägeroberfläche und auf der anderen Seite zum synthetisierten Kohlenhydratderivat besitzen. (Abbildung 10 unten). Die eigentliche kovalente Verknüpfung erfolgt durch die Reaktion von funktionalisiertem Kohlenhydrat und komplementär derivatisiertem Träger (Abbildung 10 rechts). Durch die Einführung von Linkereinheiten auf beiden Seiten wird gleichzeitig gewährleistet, dass ein für die molekulare Erkennung durch Lektine hinreichend großer Abstand zwischen Kohlenhydrat und Trägeroberfläche gewährleistet ist.

Die wichtigsten Methoden zur kovalenten spezifischen Immobilisierung sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

# 1 Einleitung

Trägermaterial	Funktionalität Träger (FG <sub>6</sub> )	Funktionalität Kohlenhydrat (FG <sub>3</sub> )	Resultierende Bindung	Reaktionsbedingungen	Lit.
Silizium	—SiH <sub>3</sub>			Rückfluss, Mesitylen (2 h)/DMSO (5 h); Licht (15 h)	[165, 188, 189]
Glas	—SH			pH = 6.8, RT, 5 h–10 h, H <sub>2</sub> O/Glycerin	[127, 190]
Polymer Gold Glas		—SH		pH = 7.5, RT (12 h)/37°C (4h), H <sub>2</sub> O	[169, 191-195]
Gold		—SH	—S—S—		[166]
Gold				37°C, 2 h, H <sub>2</sub> O	[128]
Plastik	—C≡CH	—N <sub>3</sub>		CuI, DIEA, MeOH	[163]
Glas Gold		—N <sub>3</sub>		H <sub>2</sub> O/Dioxan oder MeOH	[168, 196]
Plastik				Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	[130, 131]
Glas		—NH <sub>2</sub>		DMF/H <sub>2</sub> O, RT, 12 h	[197]

**Tabelle 2:** Übersicht über kovalent spezifische Immobilisierungsmethoden für die Herstellung von Kohlenhydrat-Arrays.

Träger- material	Funktionalität Träger (FG <sub>6</sub> )	Funktionalität Kohlenhydrat (FG <sub>3</sub> )	Resultierende Bindung	Reaktions- Bedingungen	Lit.
Glas		 (Kohlenhydrat)		DMF, 80°C, 36 h; Mikrowelle, 15 min	[159, 198]
Glas					[199]
Glas		 (Kohlenhydrat)		pH = 5.0, 37°C (12 h), H <sub>2</sub> O; RT (12 h) H <sub>2</sub> O/DMSO/ CH <sub>3</sub> CN	[200, 201]
Glas Gold		 (Kohlenhydrat)		pH = 5.0, 37°C (12 h), H <sub>2</sub> O; RT (12 h), H <sub>2</sub> O	[161, 200]
Glas Plastik				pH = 7.4–8.5, RT (30 min–2 h), H <sub>2</sub> O; pH = 9.0, RT (12 h), H <sub>2</sub> O/DMF	[197, 202- 206]
Plastik				DMT-MM, NaHCO <sub>3</sub> , RT, 2 h, H <sub>2</sub> O	[206]
Plastik				NHS, EDC, RT, 6 h, H <sub>2</sub> O	[207]
Gold				pH = 6.0, NHS, EDC, RT, H <sub>2</sub> O	[168]

**Tabelle 2 (Fortsetzung):** Übersicht über kovalent spezifische Immobilisierungsmethoden für die Herstellung von Kohlenhydrat-Arrays.

Wie bereits erwähnt waren zu Beginn der vorliegenden Arbeit gerade einmal vier Veröffentlichungen zum Thema Kohlenhydrat-Arrays erschienen und davon lediglich zwei zur kovalenten spezifischen Immobilisierung – die Michael-Addition von Maleinimid-funktionalisierten Kohlenhydraten auf thiolderivatisierten Glasträgern<sup>[127]</sup> sowie die Diels-Alder-Reaktion von Kohlenhydrat-Cyclopentadien-Konjugaten mit Benzochinon-derivatisierten selbstorganisierten monomolekularen Schichten (SAMs) von Linkermolekülen auf

Goldoberflächen.<sup>[128]</sup> Im Gegensatz dazu waren weitaus mehr Methoden zur kovalenten spezifischen Immobilisierung funktionalisierter Oligonukleotide bekannt.<sup>[111, 208]</sup> Am 5'-Ende phosphorylierte<sup>[209, 210]</sup> oder carboxylierte DNA<sup>[211]</sup> wurde z.B. mit Hilfe von Carbodiimiden an aminderivatisierte Glaträger gebunden (Ausbildung von Phosphorsäureamid- oder Carbonsäureamidbindungen). Umgekehrt konnte am 5'-Ende aminfunktionalisierte DNA an Glasoberflächen immobilisiert werden, die mit Carboxyl-<sup>[210]</sup> oder Aldehydgruppen<sup>[212]</sup> funktionalisiert waren. Im letzteren Fall erfolgte die kovalente Verknüpfung durch Iminbildung oder, bei Zugabe von Natriumcyanoborhydrid als Reduktionsmittel, durch reduktive Aminierung. Systematische Untersuchungen zeigten, dass bei Verwendung von aminfunktionalisierter DNA und aldehydfunktionalisierten Glaträgern die besten Ergebnisse erzielt wurden.<sup>[208]</sup> Die Darstellung von Kohlenhydrat-Arrays durch kovalent spezifische Immobilisierung mittels reduktiver Aminierung oder Ausbildung von Carbonsäureamidbindungen sollte deshalb die Hauptaufgabe der vorliegenden Arbeit sein.

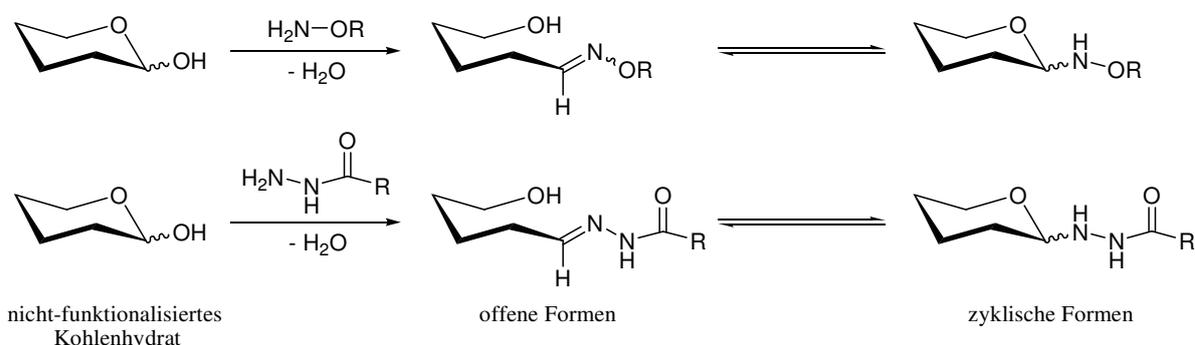
Während dieser Arbeit sind mehrere Veröffentlichungen zur Immobilisierung von Kohlenhydraten durch Iminbildung oder Ausbildung von Carbonsäureamiden erschienen. Die aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit hervorgegangene Veröffentlichung im Jahr 2005 war die erste zur Darstellung von Kohlenhydrat-Arrays mittels reduktiver Aminierung.<sup>[213]</sup> Bei den übrigen Arbeiten erfolgte die Verknüpfung durch Iminbildung entweder über die Aldehydgruppe nicht-funktionalisierter Kohlenhydrate (vgl. folgender Abschnitt) oder die Aminofunktion nicht-funktionalisierter Aminoglycoside;<sup>[197]</sup> lediglich in einer kürzlich erschienenen Arbeit wurde über die Verknüpfung von Kohlenhydraten, die über eine Linkereinheit mit einer Oxyaminogruppe funktionalisiert waren, auf aldehydderivatisierten Glaträgern berichtet.<sup>[199]</sup> Die Arbeiten, bei denen die Immobilisierung durch Ausbildung einer Carbonsäureamidbindung erreicht wurde, lassen sich in drei Kategorien unterteilen: Die Bindungsbildung erfolgte erstens durch Staudinger-Ligation von azidofunktionalisierten Kohlenhydraten auf phosphanderivatisierten Trägern,<sup>[168, 196]</sup> zweitens durch Reaktion von aminofunktionalisierten Kohlenhydraten auf aktivierten *N*-Hydroxysuccinimid-derivatisierten Trägern<sup>[197, 202-206]</sup> oder aber drittens durch Reaktion von amino- oder carboxylfunktionalisierten Kohlenhydraten auf entsprechend komplementär derivatisierten Trägern mit Hilfe von Aktivierungsreagenzien (DMT-MM<sup>[206]</sup> bzw. NHS/EDC<sup>[168, 207]</sup>).

### 1.3.5.3 Immobilisierung nicht-funktionalisierter Kohlenhydrate

Der Einsatz von Kohlenhydrat-Arrays für ein schnelles und effizientes Screening von Glycan-Wechselwirkungen ist besonders dann viel versprechend, wenn eine große Anzahl verschiedener

Kohlenhydratepitope immobilisiert werden kann.<sup>[144]</sup> Die Synthese komplexer Kohlenhydrate ist jedoch aufwändig und in der Regel muss für jede Glycanstruktur ein eigener Syntheseweg entwickelt werden. Dafür bietet sie die Möglichkeit der passenden Funktionalisierung der Epitope zur kovalenten spezifischen Immobilisierung und kann zudem ausreichende Mengen an Kohlenhydraten liefern. Aus biologischen Quellen kann dagegen eine große Vielfalt an Glycanstrukturen isoliert werden, allerdings in der Regel nur in sehr kleinen Mengen und ohne eine Derivatisierung zur spezifischen Immobilisierung auf dem Array.

Aus diesem Grund beschäftigen sich mehrere Arbeiten mit der Immobilisierung von nicht-funktionalisierten Kohlenhydraten zur Darstellung von Kohlenhydrat-Arrays. Dabei wird die Tatsache ausgenutzt, dass Kohlenhydrate am reduzierenden Ende eine Aldehydfunktion besitzen, die mit Nucleophilen reagieren kann, ohne dass die Hydroxylgruppen zuvor geschützt werden müssen. Nicht-funktionalisierte Kohlenhydrate konnten auf diese Weise auf Amin-<sup>[159, 198]</sup>, Hydrazid-<sup>[161, 200]</sup> oder aminoxyderivatisierten Oberflächen<sup>[200, 201]</sup> immobilisiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass diese Methoden zu stabilen Bindungen führten. Ihr Nachteil besteht darin, dass die Kohlenhydrateinheit am reduzierenden Ende im Gleichgewicht zwischen offenen und zyklischen Formen steht (vgl. Abbildung 11).<sup>[200]</sup> Bei den gewünschten Ringformen können zudem  $\alpha$ - und  $\beta$ -Konfigurationen auftreten.



**Abbildung 11:** Gleichgewichte bei der Reaktion nicht-funktionalisierter Kohlenhydrate mit Oxyaminen oder Hydraziden.<sup>[200]</sup>

Ein einheitliches Kohlenhydratepitop auf der Arrayoberfläche ist damit nicht mehr gegeben. Dies kann in denjenigen Fällen ein Problem darstellen, in denen die Kohlenhydrateinheit am reduzierenden Ende für die molekulare Erkennung durch ein Lektin erforderlich ist. Untersuchungen zur kovalenten spezifischen Derivatisierung nicht-funktionalisierter Kohlenhydrate durch anomere *O*-Alkylierung wurden in unserer Arbeitsgruppe von *M. B. Biskup* im Rahmen seiner Dissertation durchgeführt.<sup>[214]</sup>

### 1.3.5.4 Anwendung von Kohlenhydrat-Arrays

Kohlenhydrat-Arrays sind bereits auf vielfältige Weise zur Untersuchung von Kohlenhydrat-Wechselwirkungen eingesetzt worden.<sup>[144]</sup> Neben dem Nachweis bekannter Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkungen gelang es mit ihrer Hilfe neue kohlenhydratbindende Proteine zu entdecken. Kohlenhydrat-Arrays eignen sich daher zur Hochdurchsatzanalyse von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen und zur Identifikation bzw. Charakterisierung der Bindungseigenschaften von Lektinen. Durch Zugabe löslicher Kohlenhydrate während des Hybridisierungsvorganges auf dem Array konnten zudem in einigen Fällen Bindungskonstanten in Form von  $IC_{50}$ -Werte bestimmt werden.<sup>[128, 131, 190, 201, 206]</sup> Kohlenhydrat-Arrays wurden weiterhin zur Untersuchung von Kohlenhydrat-Antikörper-Wechselwirkungen bzw. zum Nachweis von kohlenhydratspezifischen Antikörpern in menschlichem Serum als Mittel zur Krankheitsdiagnose eingesetzt.<sup>[126, 129]</sup> Weiterhin konnte die spezifische Bindung ganzer Zellen auf Kohlenhydrat-Arrays nachgewiesen werden;<sup>[130, 203]</sup> diese beruht auf der Expression von Lektinen auf den Zelloberflächen. Kohlenhydratspezifische Enzyme wurden gleichfalls mit Hilfe von Kohlenhydrat-Arrays untersucht. So konnte die enzymatische Aktivität bzw. die Substratspezifität von Glycosyltransferasen durch die spezifische Verlängerung von immobilisierten Kohlenhydrat-epitopen auf einem Array bestimmt werden.<sup>[128, 162, 174, 175, 190]</sup> Umgekehrt konnte dieser Prozess durch Zugabe von Inhibitormolekülen in Lösung unterdrückt werden, wodurch eine Untersuchungsmethode für Glycosyltransferaseinhibitoren gegeben ist.<sup>[176]</sup> Schließlich konnten mit der Kombination aus Kohlenhydrat-Array und massenspektrometrischen Methoden Sequenzanalysen von Glycanstrukturen durchgeführt werden.<sup>[179]</sup>

## 2 Aufgabenstellung

### 2.1 Darstellung von Kohlenhydrat-Arrays und Untersuchung von Kohlenhydrat-Wechselwirkungen

In den vorangegangenen Kapiteln wurde die Bedeutung von Kohlenhydrat-Wechselwirkungen und Methoden zu ihrer Analyse aufgezeigt. Ein neuartiges besonders leistungsfähiges Analyseverfahren stellen dabei Kohlenhydrat-Arrays dar, die beispielsweise ein schnelles und effizientes Screening von Lektinen erlauben.

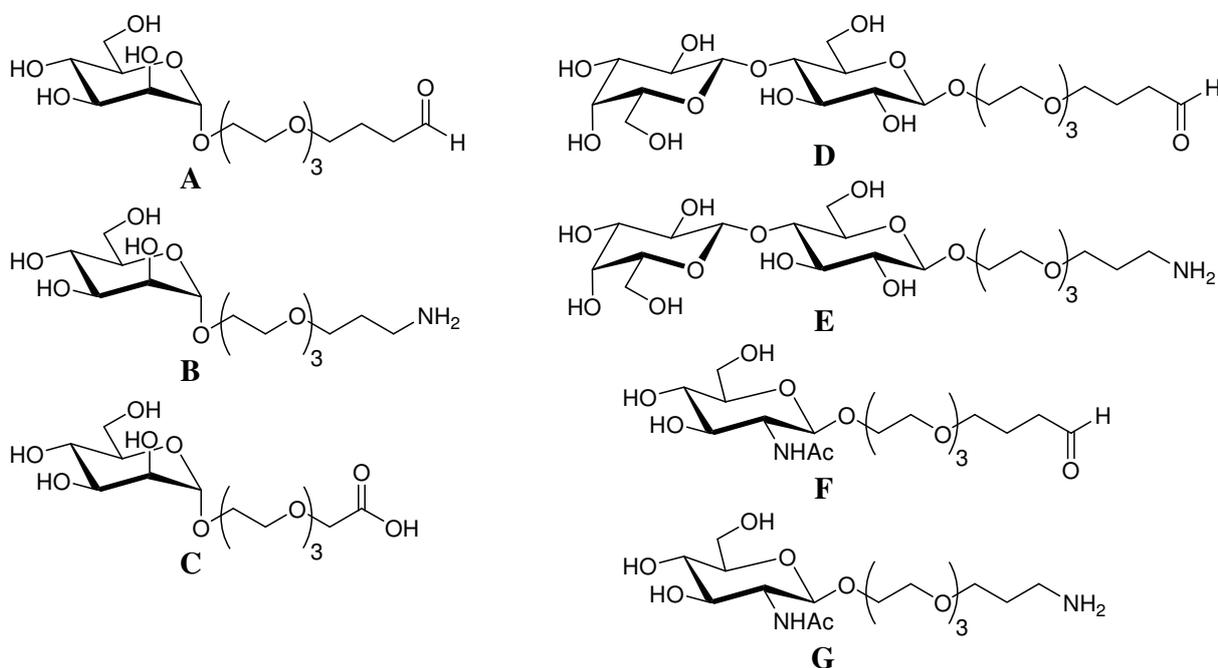
Ziel dieser Arbeit war die Darstellung von Kohlenhydrat-Arrays zur Untersuchung von Kohlenhydrat-Protein bzw. Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen. Dabei sollten folgende Anforderungen erfüllt werden:

- Die Kohlenhydratepitope sollten durch kovalente spezifische Immobilisierung mittels reduktiver Aminierung oder Ausbildung von Carbonsäureamidbindungen auf dem Träger gebunden werden.
- Als Trägermaterial sollten kommerziell erhältliche aldehyd- oder aminfunktionalisierte Glasträger verwendet werden.
- Zur Detektion von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen sollten kommerziell erhältliche fluoreszenzmarkierte Lektine eingesetzt werden.
- Weiterhin sollte untersucht werden, ob sich Kohlenhydrat-Arrays auch zur Untersuchung von Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen eignen. Dazu sollte die homophile Lewis X-Wechselwirkung auf einem Kohlenhydrat-Array nachgewiesen werden.

Aus diesen Anforderungen ergaben sich folgende konkrete Aufgaben:

- Synthese von fluoreszenzmarkierten Kohlenhydraten, die über eine geeignete Linkereinheit mit einer Amin- bzw. Aldehydgruppe funktionalisiert sind:  
Diese Synthesen wurden in unserer Arbeitsgruppe von *M. B. Biskup* im Rahmen seiner Dissertation durchgeführt.<sup>[214]</sup>

- Untersuchungen zur kovalenten Immobilisierung dieser Verbindungen auf aldehyd- oder aminfunktionalisierten Glaträgern mittels reduktiver Aminierung:  
Auf Grund der Fluoreszenzmarkierung sollte eine direkte Beobachtung des Immobilisierungsschrittes (vgl. Abbildung 9, Schritt C) möglich sein. Diese Arbeiten sollten zur Überprüfung und Optimierung der Immobilisierungsmethode dienen. Insbesondere sollte der Konzentrationsbereich ermittelt werden, innerhalb dessen Kohlenhydrate immobilisiert werden können, und die Reaktionsdauer der Immobilisierungsreaktion sollte abgeschätzt werden. Dieser Teil der Arbeit wird in Abschnitt 4.2 beschrieben.
- Synthese von Kohlenhydraten, die über eine Linkereinheit mit einer Aldehyd-, Amin- oder Carbonsäuregruppe funktionalisiert sind (vgl. Abbildung 12):



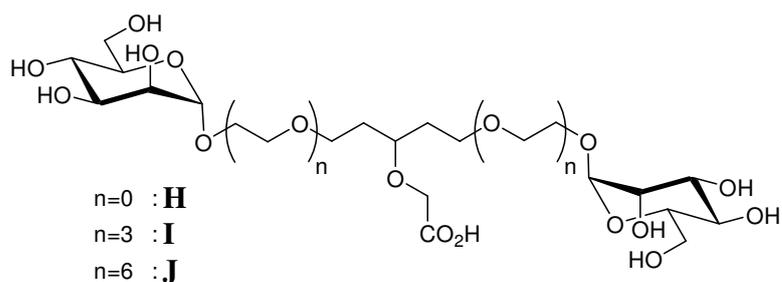
**Abbildung 12:** Funktionalisierte Kohlenhydrate zur Untersuchung von Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkungen.

Mannose-, *N*-Acetylglucosamin- bzw. Lactosederivate wurden gewählt, da fluoreszenzmarkierte Lektine mit passender Bindungsspezifität kommerziell erhältlich waren. Triethylenglykoleinheiten sollten als hydrophile flexible Abstandhalter (Spacer) zwischen den Kohlenhydratstrukturen und der Arrayoberfläche dienen und so die zur molekularen Erkennung notwendige Distanz sicherstellen. Ethylenglykolspacer werden auch bei der kovalenten Immobilisierung von Oligonukleotiden auf Glasoberflächen verwendet.

Die Synthese der Aldehydderivate **A**, **D** und **F** sowie der Aminderivate **B**, **E** und **G** wurde zuerst von *R. Weingart* in unserer Arbeitsgruppe entwickelt und durchgeführt,<sup>[215]</sup> jedoch wurden die End- und Zwischenverbindungen von ihm nicht vollständig charakterisiert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten in Zusammenarbeit mit *M. B. Biskup*<sup>[214]</sup> auf diesen synthetischen Routen die Verbindungen **A**, **B**, **D** und **F** in den für die Arrayuntersuchungen erforderlichen Mengen dargestellt und vollständig charakterisiert werden. Weiterhin sollte die mit einer Carbonsäure funktionalisierte Verbindung **C** dargestellt werden. Die Synthese der Triethylenglykol-Linkerbausteine wird in Abschnitt 3.1, der benötigten Kohlenhydratdonoren in Abschnitt 3.2 und der Endverbindungen in Abschnitt 3.3 beschrieben.

- Untersuchungen von Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkungen auf Kohlenhydrat-Arrays:  
Die Verbindungen **A**, **B**, **D-G** sollten mittels reduktiver Aminierung auf aldehyd- bzw. aminderivatisierten Glaträgern immobilisiert werden, wobei auf die zuvor mit den markierten Kohlenhydraten gewonnen Erkenntnisse zurückgegriffen werden sollte. Analog sollte Verbindung **C** durch Ausbildung einer Carbonsäureamidbindung auf einem aminderivatisierten Glaträger immobilisiert werden. Mit den auf diese Weise dargestellten Kohlenhydrat-Arrays sollte die spezifische Wechselwirkung zu Lektinen (Hybridisierung) nachgewiesen werden (Abbildung 9, Schritt D). Dabei sollte die Konzentration an immobilisiertem Kohlenhydrat, bei dem spezifisch gebundenes Lektin gerade noch nachgewiesen werden kann (Detektionslimit), ermittelt werden. Ferner sollte der Einfluss gängiger Blockierungsreagenzien auf die Qualität der Ergebnisse untersucht werden. Dieser Teil der Arbeit wird in Abschnitten 4.3.1 und 4.3.2 beschrieben.
- Untersuchungen zur Reversibilität der Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkungen auf Kohlenhydrat-Arrays:  
Zur Immobilisierung von komplexen Kohlenhydratstrukturen aus biologischen Quellen stehen häufig nur geringe Substanzmengen zur Verfügung. Durch Wasch- bzw. Elutionsprozesse sollte deshalb überprüft werden, ob sich gebundenes Lektin wieder von der Kohlenhydrat-Array-Oberfläche entfernen lässt, und ob es dadurch möglich ist, ein Kohlenhydrat-Array mehrmals zu Hybridisierungsexperimenten zu verwenden. Dieser Teil der Arbeit wird in Abschnitt 4.3.3 beschrieben.
- Synthese von dimeren funktionalisierten Mannosederivaten (vgl. Abbildung 13):



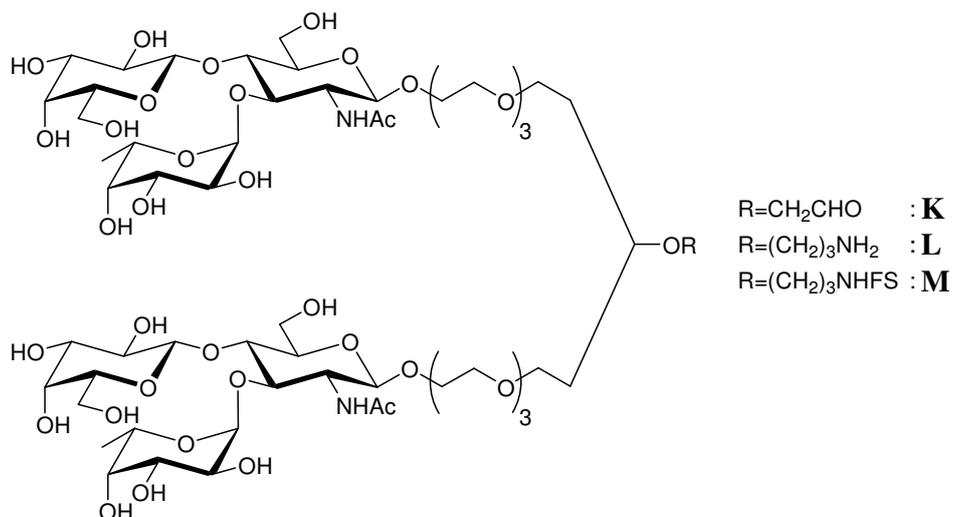
**Abbildung 13:** Dimere Mannosederivate zur Untersuchung von Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkungen.

Die Verbindungen **H**, **I** und **J** wurden von *X.-H. Jiang* in unserer Arbeitsgruppe synthetisiert.<sup>[216]</sup> Sie unterscheiden sich durch den Abstand der beiden Mannoseeinheiten und sollten sich über ihre Carbonsäurefunktion auf aminderivatisierten Glasträgern immobilisieren lassen.

- Untersuchungen zur Polyvalenz der Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkung auf Kohlenhydrat-Arrays:

Es ist die Vermutung geäußert worden, dass ein Kohlenhydrat-Array eine polyvalente Anordnung von Zuckermolekülen darstellt, wodurch die Bindungsaffinität von Lektinen auf solchen Arrays erhöht sein sollte. Allerdings ist über den Abstand der einzelnen Epitope auf einem Kohlenhydrat-Array in der Regel nichts bekannt. Es sollte deshalb untersucht werden, ob bei der Immobilisierung der dimeren Verbindungen **H**, **I** und **J** im Vergleich zur monomeren Verbindung **C** höhere Bindungsaffinitäten des Mannosebindenden Lektins Concanavalin A beobachtet werden können. Dieser Teil der Arbeit wird in Abschnitt 4.3.4 beschrieben.

- Synthese von dimeren Lewis X-Derivaten, die über eine Linkereinheit mit einer Aldehyd- oder Aminogruppe funktionalisiert sind (vgl. Abbildung 14):



**Abbildung 14:** Dimere Lewis X-Derivate zur Untersuchung von Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen (FS: Fluoreszenzfarbstoff).

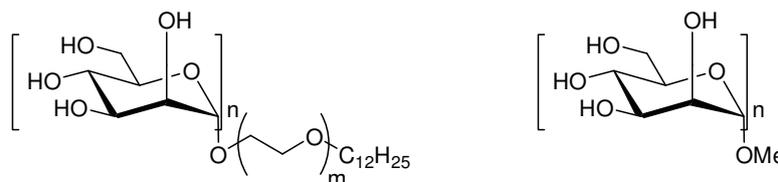
Die über Triethylglykolspacer verknüpften dimeren Lewis X-Derivate **K** und **L** sollten dargestellt werden. Durch Kupplung mit einem aminoreaktiven Fluoreszenzfarbstoff sollte außerdem aus Verbindung **L** ein fluoreszenzmarkiertes Lewis X-Derivat **M** dargestellt werden. Die Arbeiten zur Synthese dieser Verbindungen werden in Abschnitt 3.4 beschrieben.

- Untersuchungen von Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen auf Kohlenhydrat-Arrays:

Die Lewis X-Derivate **K** und **L** sollten mittels reduktiver Aminierung auf aldehyd- bzw. aminderivatisierten Glaträgern immobilisiert werden. Mit dem fluoreszenzmarkierten Lewis X-Derivat **M** in Lösung sollte die spezifische homophile Lewis X-Wechselwirkung nachgewiesen werden.

## 2.2 Synthese von Mannoseglycolipiden

Zur Untersuchung von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen durch die NMR-Spektroskopie in Lösung sollten Mannoseglycolipide synthetisiert werden, die sich in Phospholipid-Micellen integrieren lassen (vgl. Abbildung 15, links).



**Abbildung 15:** Mannoseglycolipide zur Untersuchung von Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkungen an Phospholipid-Micellen.

Dabei sollte sowohl die Länge des flexiblen Ethylenglykolspacers ( $m = 0, 1$  oder  $2$ ) als auch die Anzahl der  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2)-verknüpften Mannoseeinheiten ( $n$ ) variiert werden. Der lipophile Dodecylrest dient als Ankereinheit, durch die das Glycolipid nicht-kovalent und reversibel an die Oberfläche einer Dodecylphosphocholin-Micelle gebunden werden kann. Als Kontrollsubstanzen sollten zudem Methylmannoside synthetisiert werden, die sich nicht entsprechend in Micellen integrieren lassen (vgl. Abbildung 15, rechts). Die Synthese dieser Verbindungen wird in Abschnitt 3.5 beschrieben.

Die NMR-spektroskopischen Untersuchungen (Titrationsexperimente und trNOE-Messungen) mit Hilfe dieser Verbindungen wurden in der Arbeitsgruppe von *O. Zerbe* an der Universität Zürich durchgeführt.<sup>[217]</sup> Als Protein wurde das Lektin Cyanovirin N verwendet, sowohl als *wild type* Protein als auch in Form einer Mutante mit nur einer Mannosebindestelle. Eine kurze Zusammenfassung der dort erzielten Ergebnisse wird in Abschnitt 5 gegeben.



# 3 Chemische Synthesen

## 3.1 Synthese von Linkerbausteinen

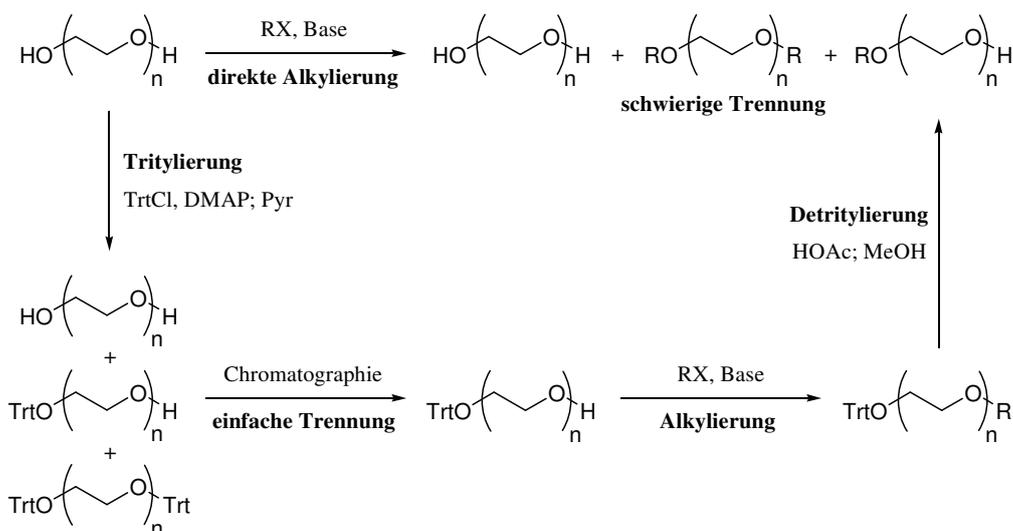
Ethylenglykoleinheiten sollen als flexible Abstandhalter (Spacer) zwischen den Kohlenhydratstrukturen und der Array- bzw. der Micelloberfläche dienen. Auf diese Weise soll die zur molekularen Erkennung notwendige Distanz sichergestellt werden. Der erste Schritt in der Synthese der benötigten Derivate ist die Monofunktionalisierung der kommerziell erhältlichen Ethylenglykole. Da die beiden endständigen Hydroxylgruppen chemisch äquivalent sind und sich folglich in ihrer Reaktivität nicht unterscheiden, erhält man bei direkter stöchiometrischer Alkylierung stets ein Gemisch aus nicht-umgesetztem Ethylenglykol, dem gewünschten monofunktionalisierten Produkt und unerwünschtem difunktionalisiertem Nebenprodukt. Die Trennung dieses Gemisches ist aufgrund der Hydrophilie der Ethylenglykoleinheiten und den häufig geringen Polaritätsunterschieden zwischen den drei Komponenten in der Regel schwierig. Nach Zugabe von Wasser zu einem organischen Reaktionsgemisch verteilt sich das gewünschte monosubstituierte Produkt in beiden Phasen und kann erst nach mehreren Extraktions- bzw. Rückextraktionsschritten in ausreichender Reinheit erhalten werden. Bei der säulenchromatographischen Trennung tritt neben dem Problem der geringen Polaritätsunterschiede der so genannte Tailing-Effekt auf, d.h. die Tatsache, dass die Elution der Glykole bei einem zur Trennung geeigneten Retentionsfaktor unsymmetrisch zum Elutionsmaximum erfolgt.

Die Trennung durch Destillation ist insbesondere im Fall von längerkettigen Ethylenglykolen nur bei hohen Temperaturen im Feinvakuum möglich, was bei empfindlichen Funktionalitäten problematisch ist.

Eine Möglichkeit zur Lösung dieses Problems ist die substöchiometrische Alkylierung, d.h. die Verwendung großer Überschüsse des Ethylenglykoleduktes (z.B. als Lösungsmittel). Dadurch wird die Bildung des difunktionalisierten Nebenproduktes praktisch vermieden und es müssen nur noch zwei Substanzen voneinander getrennt werden. Dieser Ansatz wurde von *M. B. Biskup* zur Synthese monofunktionalisierter Triethylglykolderivate verfolgt.<sup>[214]</sup> Allerdings wird bei diesem Verfahren nur ein geringer Reaktionsumsatz bezüglich der Glykolkomponente erreicht.

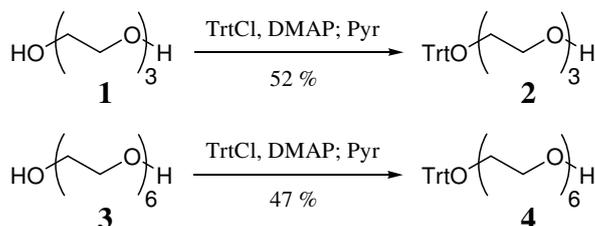
Sofern diese nicht wiedergewonnen werden kann ist dieser Ansatz für teurere höhere Ethylenglykole unbefriedigend.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf ein dreistufiges Verfahren zurückgegriffen, das bereits in der Diplomarbeit des Verfassers erfolgreich verwendet wurde (vgl. Abbildung 16).<sup>[218]</sup> Dabei werden die Ethylenglykole in einem ersten Schritt in die entsprechenden Monotriyl-derivate übergeführt, anschließend alkyliert und schließlich wieder entschützt. Der problematische Schritt der Reinigung wird auf die Trennung von Ethylenglykol-Edukt, Monotriylethylenglykol-Produkt und Ditritylethylenglykol-Nebenprodukt verlagert. Durch den unpolaren Charakter der Tritylschutzgruppe wird der Polaritätsunterschied zwischen diesen drei Substanzen deutlich erhöht. Außerdem können Produkt und Nebenprodukt dünn-schichtchromatographisch unter UV-Licht leicht detektiert werden. Durch diese beiden Eigenschaften wird die säulenchromatographische Reinigung erheblich vereinfacht. Die Tritylschutzgruppe ist unter den basischen Bedingungen des folgenden Alkylierungsschrittes stabil und sie kann unter mild sauren Bedingungen im letzten Schritt wieder entfernt werden. Auf diese Weise können größere Mengen monofunktionalisierter Ethylenglykolderivate erhalten werden.



**Abbildung 16:** Darstellung monoalkylierter Ethylenglykole.

Triethylenglykol **1** und Hexaethylenglykol **2** wurden analog einer Vorschrift von *Kaats-Richters et al.*<sup>[219]</sup> trityliert und anschließend säulenchromatographisch gereinigt (vgl. Abbildung 17).

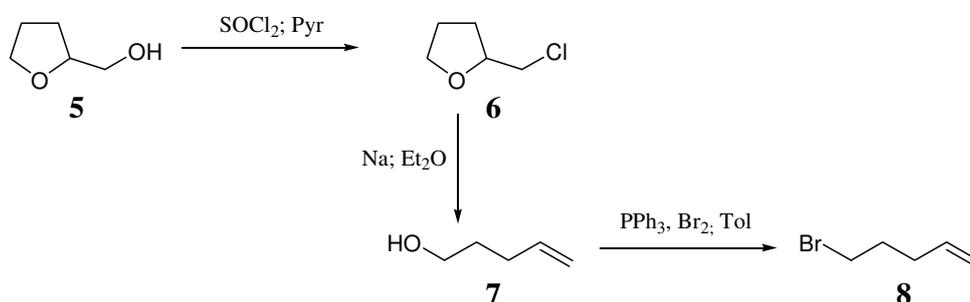


**Abbildung 17:** Monotriylierung von Ethylenglykolen.

Die Ausbeuten lagen für die Triethylenglykol-Verbindung **2** und die Hexaethylenglykol-Verbindung **4** im Bereich von 50%, wobei im zweiten Fall nicht-umgesetztes Hexaethylenglykol **3** in 37% Ausbeute wiedergewonnen werden konnte.

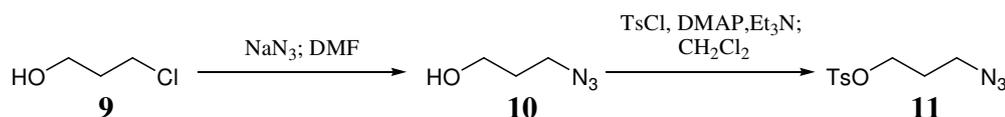
Zur weiteren Funktionalisierung der Linkerverbindungen wurden Alkylierungsmittel dargestellt, sofern diese nicht kommerziell erhältlich waren.

Ausgehend von Tetrahydrofurfurylalkohol **5** wurde das Pentenylbromid **8** in 4 Syntheseschritten dargestellt (vgl. Abbildung 18). Nach einer Vorschrift von *Brooks* und *Snyder*<sup>[220]</sup> wurde der Alkohol **5** zunächst mit Thionylchlorid in das Chlorid **6** übergeführt, welches mit elementarem Natrium unter Ringöffnung zum Pentenol **7** reagierte. Dieser wurde in einer Mukaiyama-Redoxkondensation nach einer Vorschrift von *Antczak et al.*<sup>[221]</sup> zum gewünschten Bromid **8** umgesetzt.



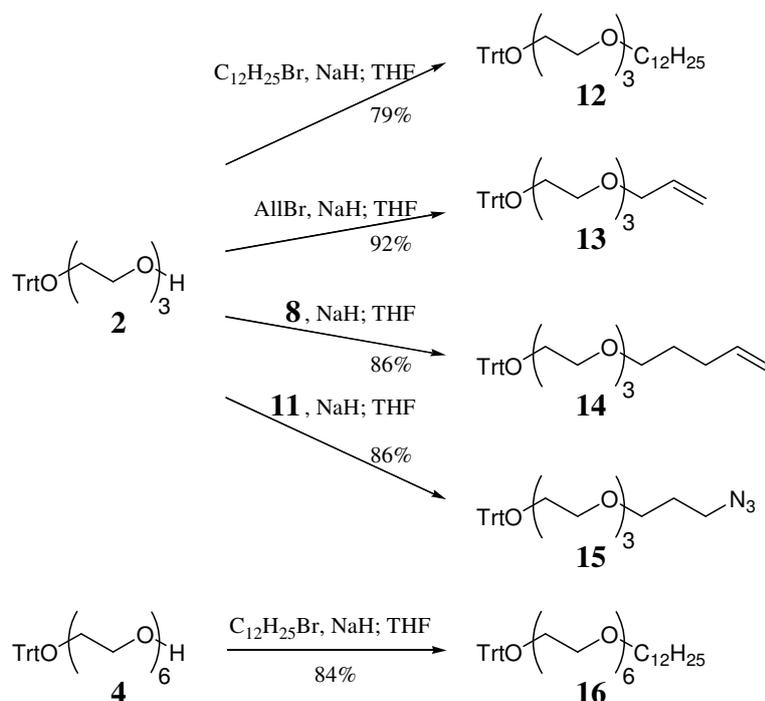
**Abbildung 18:** Darstellung der Pentenylbromids **8**.

Weiterhin wurde 3-Chlorpropanol **9** nach einer Vorschrift von *Pak* und *Hesse*<sup>[222]</sup> zunächst durch nukleophile Substitution in die entsprechende Azidoverbindung **10** übergeführt. Anschließend wurde die Hydroxyfunktion mit p-Toluolsulfonsäurechlorid zur Tosylverbindung **11** umgesetzt. (vgl. Abbildung 19).



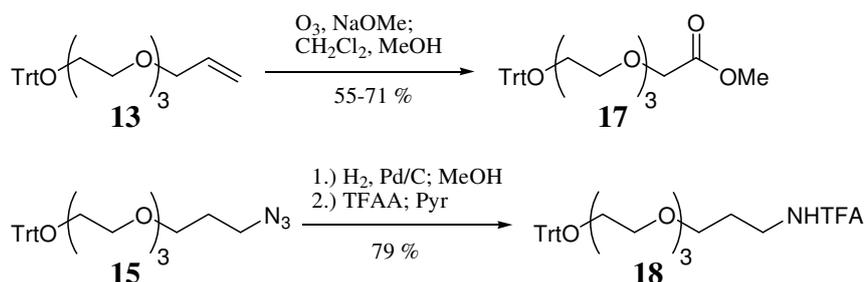
**Abbildung 19:** Darstellung des Azidosulfates **11**.

Die Alkylierung der einfach geschützten Ethylenglykolverbindungen wurde mit Natriumhydrid als Base in trockenem THF als Lösungsmittel durchgeführt und gelang in Ausbeuten von 79% bis 92% (vgl. Abbildung 20). Triethylenglykol **2** wurde mit Dodecylbromid zu Verbindung **12**, mit Allylbromid zu Verbindung **13**, mit dem Pentenylbromid **8** zu Verbindung **14** sowie mit dem Azidosulfat **11** zu Verbindung **15** umgesetzt. Die Hexaethylenglykol-Verbindung **4** wurde analog mit Dodecylbromid in Verbindung **16** übergeführt.



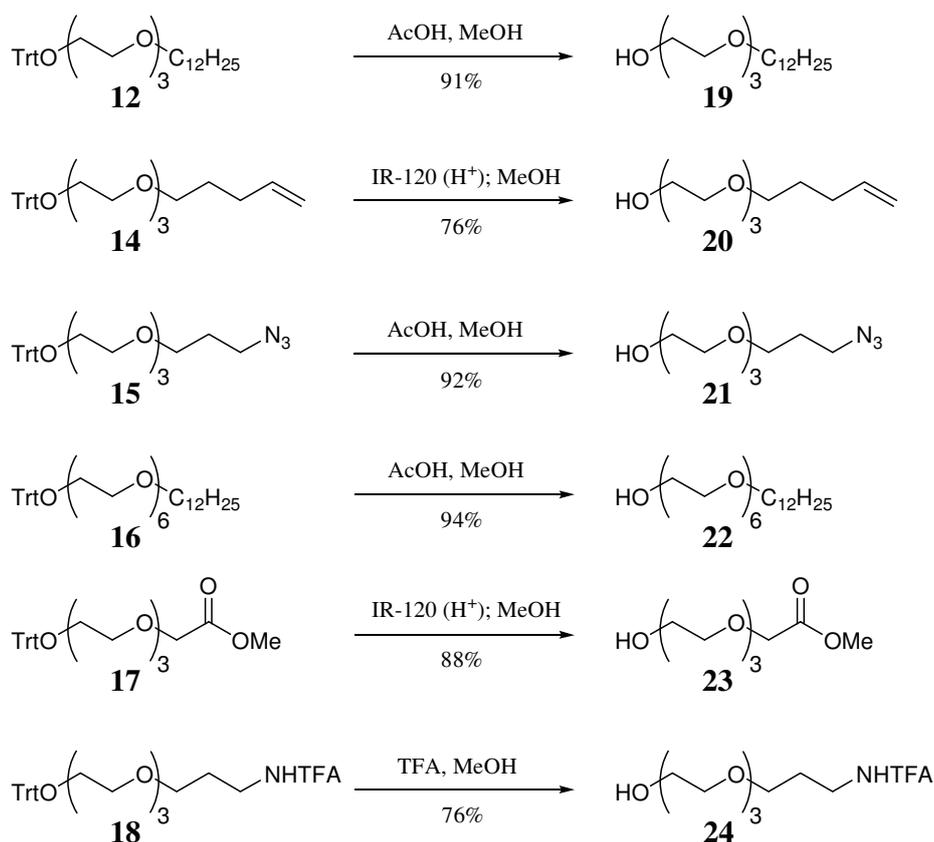
**Abbildung 20:** Alkylierung von monotritylierten Ethylenglykolen.

Vor dem Entschützungsschritt wurden die Verbindungen **13** und **15** weiter funktionalisiert (vgl. Abbildung 21). Analog einer Methode von *Marshall* und *Garofalo*<sup>[223]</sup> wurde die Allylverbindung **13** durch Ozonolyse in methanolischer Natriumhydroxidlösung direkt in den Methyl ester **17** transformiert. Die Azidoverbindung **15** konnte durch Reduktion des Azides mit Wasserstoff zum freien Amin und anschließender Reaktion mit Trifluoressigsäureanhydrid in Pyridin zu Verbindung **18** umgesetzt werden. Dabei konnte unter den gewählten milden Reaktionsbedingungen ( $p(\text{H}_2) = 1 \text{ bar}$ , Pd/C als Katalysator, 1 h Reaktionszeit) keine hydrogenolytische Abspaltung der Tritylschutzgruppe beobachtet werden.



**Abbildung 21:** Darstellung der Triethylenglykole **17** und **18**.

Schließlich wurden die verschiedenen funktionalisierten Ethylenglykolverbindungen unter sauren Bedingungen wieder entschützt (vgl. Abbildung 22). Dies gelang in Ausbeuten von 76-94%.



**Abbildung 22:** Entschützung von funktionalisierten Ethylenglykolen.

Die Reaktionsabfolge  $1 \rightarrow 2 \rightarrow 13 \rightarrow 17 \rightarrow 23$  wurde erstmals bereits in der Diplomarbeit des Verfassers durchgeführt, soll jedoch an dieser Stelle aus Gründen der Vollständigkeit erwähnt werden.<sup>[218]</sup>

## 3.2 Synthese von Kohlenhydratbausteinen

Zur Synthese funktionalisierter Kohlenhydratstrukturen, die entweder auf einer Chipoberfläche oder auf einer Micelloberfläche immobilisiert werden sollten, wurden neben geeigneten Linkerverbindungen auch entsprechende Kohlenhydratderivate benötigt. Dabei konnte im Rahmen dieser Arbeit auf literaturbekannte Kohlenhydratbausteine zurückgegriffen werden. Ihre Synthese und Verwendung zum Aufbau komplexer Kohlenhydratstrukturen sind teilweise in unserer Arbeitsgruppe entwickelt worden. Alle besitzen ein für die weitere Synthese passendes Schutzgruppenmuster, das ihre Eigenschaften bezüglich Reaktivität bzw. Nachbargruppeneffekten maßgeblich beeinflusst. In diesem Abschnitt soll auf die Synthese dieser Kohlenhydratbausteine kurz eingegangen werden.

### 3.2.1 Acetylierte Trichloracetimidat-Donoren

Ausgehend von den ungeschützten, kommerziell erhältlichen Kohlenhydraten D-Mannose **25**, D-Galactose **29** und D-Lactose **33** wurden die Trichloracetimide **28**<sup>[224-226]</sup>, **32**<sup>[227, 228]</sup> bzw. **36**<sup>[228, 229]</sup> in jeweils drei Synthesestufen erhalten (Abbildung 23). In einem ersten Schritt erfolgte die Peracetylierung mit Essigsäureanhydrid in Pyridin bei Raumtemperatur oder alternativ mit Natriumacetat in Essigsäureanhydrid in der Siedehitze. Aufgrund der höheren Reaktivität der anomeren Acetylschutzgruppe ließ sich diese nun in einem zweiten Schritt mittels Hydrazinacetat in DMF selektiv entfernen<sup>[230]</sup>, so dass anomere entschützte Kohlenhydrate erhalten wurden. Diese konnten schließlich mit Trichloracetonitril und DBU als Base in trockenem Dichlormethan in die gewünschten Trichloracetimide übergeführt werden.

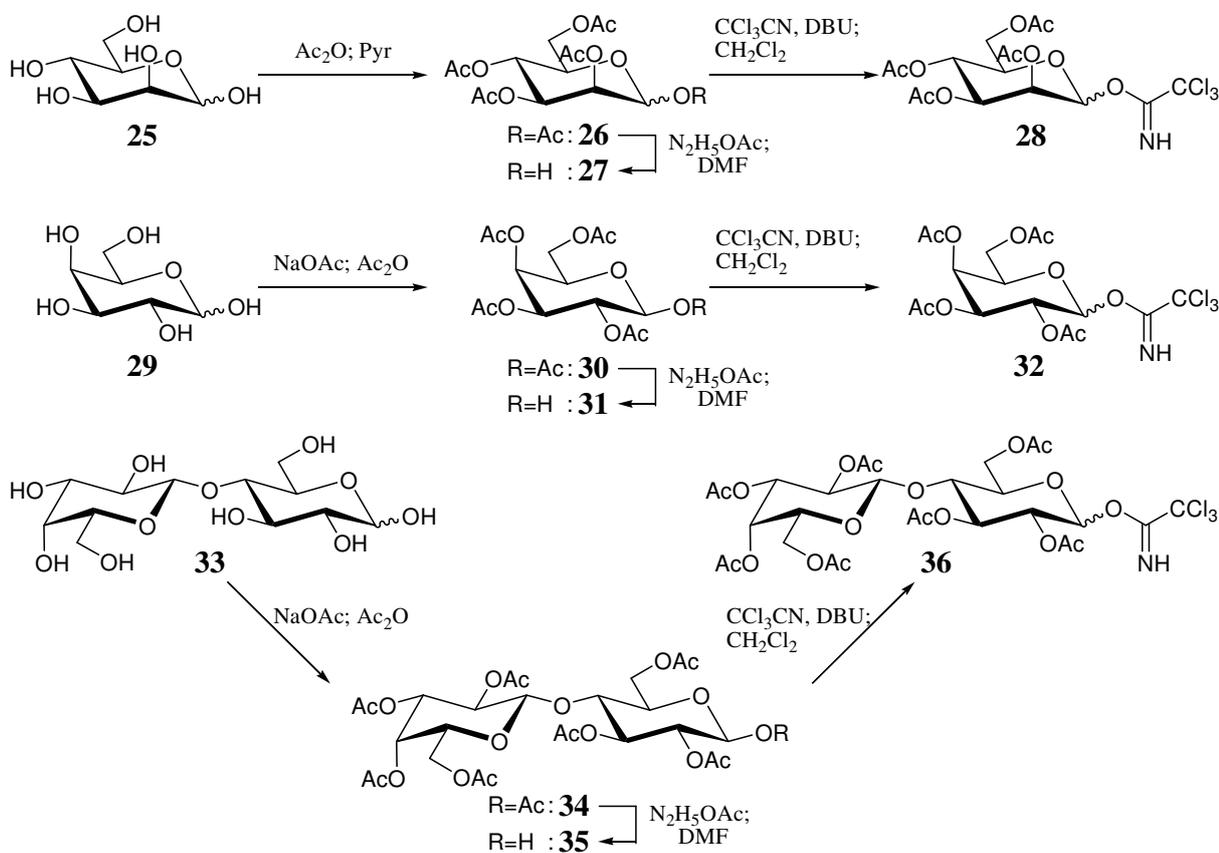


Abbildung 23: Darstellung der Trichloracetimidatdonoren **28**, **32** und **36**.

Alle drei Kohlenhydrat-Donoren besitzen eine nachbargruppenaktive Acetylschutzgruppe in der 2-Position, so dass die  $\alpha$ -Selektivität (Verbindung **28**) bzw.  $\beta$ -Selektivität (Verbindungen **32** und **36**) bei der Glycosylierungsreaktion gewährleistet ist. Durch den elektronenziehenden Charakter der Acetylschutzgruppen ist die Reaktivität dieser Bausteine relativ gering.

### 3.2.2 Der Glucosamin-Donor

Aus kommerziell erhältlichem D-Glucosamin Hydrochlorid **37** konnte nach einer Vorschrift von *W. Dullenkopf* der Glucosamindonor **40** in vier Stufen dargestellt werden<sup>[231, 232]</sup> (Abbildung 24). Zunächst wurde unter Schotten-Baumann Bedingungen mit Trichlorethoxycarbonylchlorid die Troc-Schutzgruppe selektiv an die Aminofunktion eingeführt. Nach Peracetylierung mit Essigsäureanhydrid in Pyridin ( $\rightarrow$ **38**) und anomerer Desacetylierung wurde die 1-OH entschützte Verbindung **39** erhalten. Bei dieser Reaktion konnten durch Verwendung des milderer Nukleophils Ethylendiammoniumacetat an Stelle des Hydrazinacetates etwas höhere Ausbeuten erzielt werden, wenn auch auf Kosten einer verlängerten Reaktionszeit.<sup>[233]</sup> Schließlich wurde auch diese Verbindung durch Reaktion mit Trichloracetonitril und DBU in Dichlormethan in das Imidat **40** übergeführt.

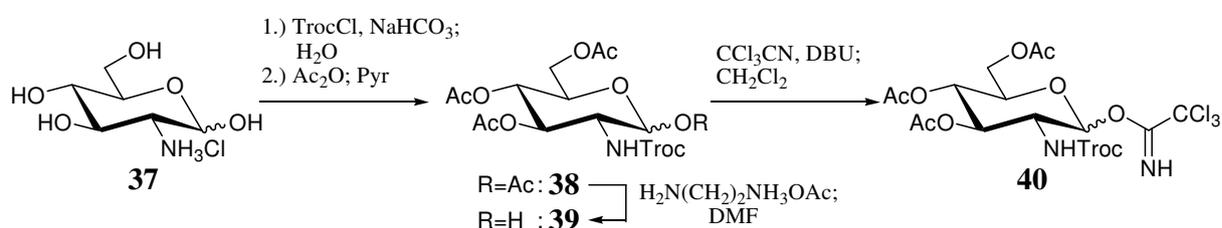


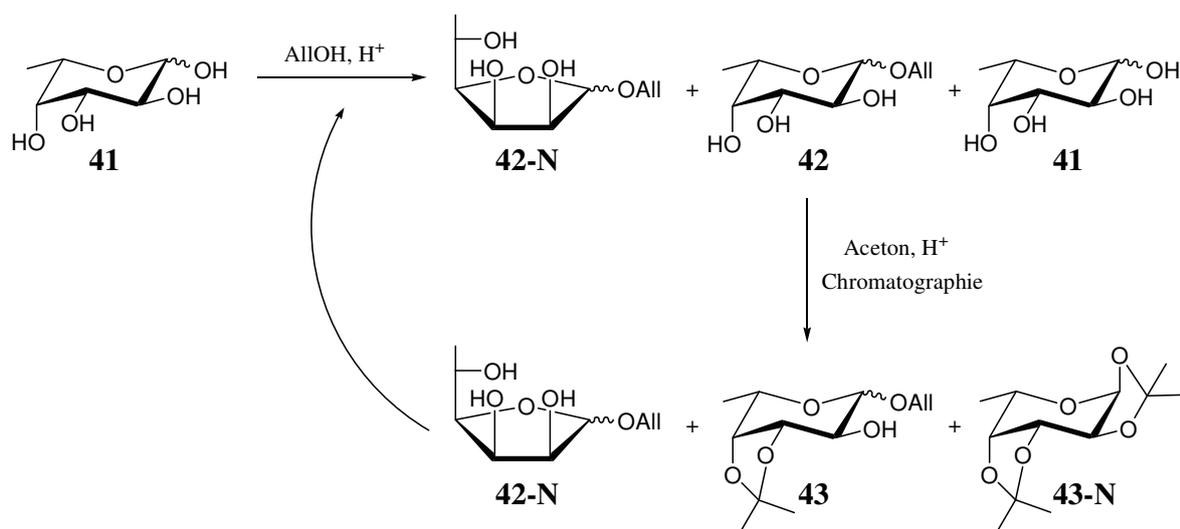
Abbildung 24: Synthese des *N*-Troc-geschützten Glucosamindonors **40**.

Der Glucosamindonor **40** ist an seiner Aminofunktion in 2-Position durch die nachbargruppenaktive elektronenziehende Trichlorethoxycarbonylgruppe (Troc-Gruppe) geschützt. Er zeichnet sich durch hohe Reaktivitäten und hohe  $\beta$ -Selektivitäten bei Glycosylierungsreaktionen aus. Weitere Eigenschaften der Troc-Gruppe werden in Abschnitt 3.4 diskutiert.

### 3.2.3 Der Fucosedonor

Aus L-Fucose (6-Desoxy-L-galactose) **41** wurde in sieben Synthesestufen der Fucosyldonor **48** mit einigen Variationen nach einer Vorschrift von *R. Windmüller* dargestellt.<sup>[234]</sup> Durch Reaktion des Eduktes mit Allylalkohol unter saurer Katalyse in der Siedehitze wurde ein Gemisch der Pyranoseform **42** (thermodynamisches Produkt) und der Furanoseform **42-N** (kinetisches Produkt) erhalten (vgl. Abbildung 25). Im Gegensatz zur Vorschrift von *Windmüller* wurde das  $\alpha$ -Pyranoseprodukt an dieser Stelle nicht durch Kristallisation abgetrennt, sondern das Reaktionsgemisch nach Entfernung des überschüssigen Allylalkohols direkt in absolutem Aceton suspendiert und unter saurer Katalyse zur Reaktion gebracht. Erst nach erfolgter

Isopropylenidierung wurden die Komponenten säulenchromatographisch getrennt. Neben geringen Mengen an Diisopropyliden-L-fucose **43-N** (entstanden aus nicht umgesetzter L-Fucose aus dem ersten Reaktionsschritt) wurden das gewünschte Pyranoseprodukt **43** und das im zweiten Schritt nicht umgesetzte Furanoseprodukt **42-N** erhalten. Letzteres konnte wieder in Allylalkohol suspendiert und unter saurer Katalyse in der Siedehitze zur Reaktion gebracht werden bis sich ein neues Gleichgewicht aus Allyl-Pyranose- und Allyl-Furanoseprodukten einstellte. Da L-Fucose ein relativ teures Kohlenhydrat ist, lohnte sich dieser Recyclingschritt.



**Abbildung 25:** Synthese der Fucopyranose **43** und Recycling der Fucofuranose **42-N**.

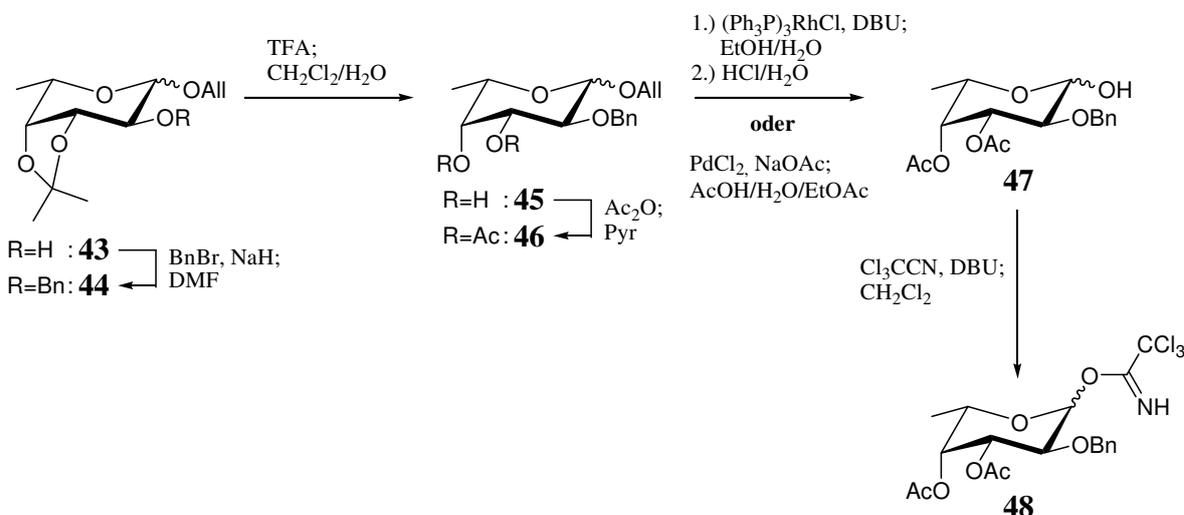
Im weiteren Verlauf der Synthese wurde die Pyranose **43** durch Benzylierung mit Benzylbromid und Natriumhydrid als Base in DMF zu Verbindung **44** umgesetzt (vgl. Abbildung 26). Anschließend wurde die Isopropylidenschutzgruppe mit Hilfe von Trifluoressigsäure im Zweiphasensystem Dichlormethan/Wasser wieder abgespalten ( $\rightarrow$ **45**) und die dadurch ungeschützten Hydroxylgruppen wurden mit Essigsäureanhydrid in Pyridin zu Verbindung **46** acetyliert.

Die Abspaltung der Allylgruppe<sup>[235]</sup> zu Verbindung **47** erfolgte nach zwei Varianten:

- 1.) Nach der Originalvorschrift von *Windmüller*<sup>[234]</sup> wurde die Allylgruppe mit dem Wilkinson-Katalysator  $(\text{Ph}_3\text{P})_3\text{RhCl}$  unter basischen Bedingungen (DBU) zum Propenylether isomerisiert<sup>[236]</sup> und dieser unter sauren Bedingungen (1 M HCl) in die anomer entschützte Verbindung **47** übergeführt. Diese Reaktion gelang nur in Ausbeuten zwischen 30% und 50% (Literatur 61%), wobei allerdings nicht umgesetztes Edukt **46** nach säulenchromatographischer Reinigung wieder zurückgewonnen werden konnte. Daneben wurden auch geringe Mengen an desacetyliertem Nebenprodukt isoliert.
- 2.) Analog zu einer Vorschrift von *Ogawa et al.*<sup>[237]</sup> erfolgte die Entschützung in einer Eintopfreaktion mit Hilfe von Palladiumdichlorid  $\text{PdCl}_2$  unter sauren Bedingungen. Sie

gelang in Ausbeuten von 77%, wobei auch in diesem Fall nicht umgesetztes Edukt **46** nach säulenchromatographischer Reinigung wieder zurückgewonnen werden konnte. Diese Reaktion erforderte zwar stöchiometrische Mengen oder sogar einen kleinen Überschuss an teurem Edelmetallkatalysator, der jedoch weitgehend recycelt werden konnte. Ausgefallenes elementares Palladium wurde aus dem Reaktionsgemisch abfiltriert, mit Essigsäureethylester gewaschen und in Königswasser wieder gelöst. Nach Eindampfen der Lösung und Trocknung des ausgefallenen PdCl<sub>2</sub> konnte dieses für dieselbe Reaktion wieder verwendet werden.

Schließlich wurde Verbindung **47** durch Reaktion mit Trichloracetonitril und DBU in Dichlormethan in das Imidat **48** übergeführt.



**Abbildung 26:** Darstellung des Fucosedonors **48**.

Aufgrund der fehlenden elektronenziehenden Hydroxylgruppe in 6-Position sind Fucosedonoren sehr reaktiv; die beiden elektronenziehenden Acetylgruppen stabilisieren jedoch das Imidat **48**. Bei Glycosylierungsreaktionen mit dem Donor **48** werden aus mehreren Gründen hohe  $\alpha$ -Selektivitäten erzielt:

- 1) Die Benzylgruppe in 2-Position übt keine Nachbargruppenbeteiligung aus.
- 2) Die Acetylgruppe in 4-Position ist dagegen möglicherweise in der Lage einen stereoelektronischen Effekt auszuüben. Die positive Ladung des Oxocarbeniumions, das bei der Glycosylierung als Intermediat auftritt, kann durch das freie Elektronenpaar des Sauerstoffs dieser Acetylgruppe stabilisiert werden. Dadurch wird gleichzeitig die  $\beta$ -Seite sterisch abgeschirmt, so dass der Angriff des Akzeptors bevorzugt von der  $\alpha$ -Seite erfolgt (vgl. Abbildung 27).

- 3) Der Angriff des Akzeptors auf das Oxocarbeniumion führt zudem von der  $\alpha$ -Seite über einen sesselförmigen Übergangszustand, der nach der Fürst-Plattner-Regel energetisch bevorzugt ist.<sup>[238]</sup>

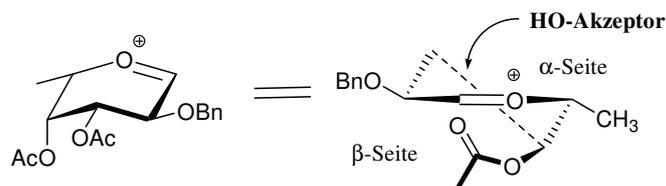


Abbildung 27: Konformation des Intermediats bei der Fucosylierung mit dem Fucosedonor **48** nach Windmüller.<sup>[234]</sup>

### 3.2.4 Der Mannosedonor

Ausgehend von D-Mannose **25** wurde der Mannosedonor **54** in sechs Synthesestufen dargestellt (vgl. Abbildung 28). Durch Reaktion des Eduktes mit HBr in Eisessig und Essigsäureanhydrid wurde zuerst in einer Eintopfreaktion das peracetylierte  $\alpha$ -Bromid **49** synthetisiert,<sup>[239]</sup> das im Basischen mit Methanol zum Orthoester **50** umgesetzt wurde.<sup>[240]</sup> Nach Desacetylierung in ammoniakalischem Methanol ( $\rightarrow$ **51**) wurde durch Benzylierung mit Benzylbromid und Natriumhydrid als Base in DMF Verbindung **52** erhalten.<sup>[241]</sup> Durch saure Orthoesterspaltung (in Essigsäure/Wasser) konnte die anomer entschützte Mannose **53** dargestellt werden,<sup>[242]</sup> die schließlich durch Reaktion mit Trichloracetonitril und DBU in Dichlormethan in das Imidat **54** übergeführt wurde.<sup>[243, 244]</sup>

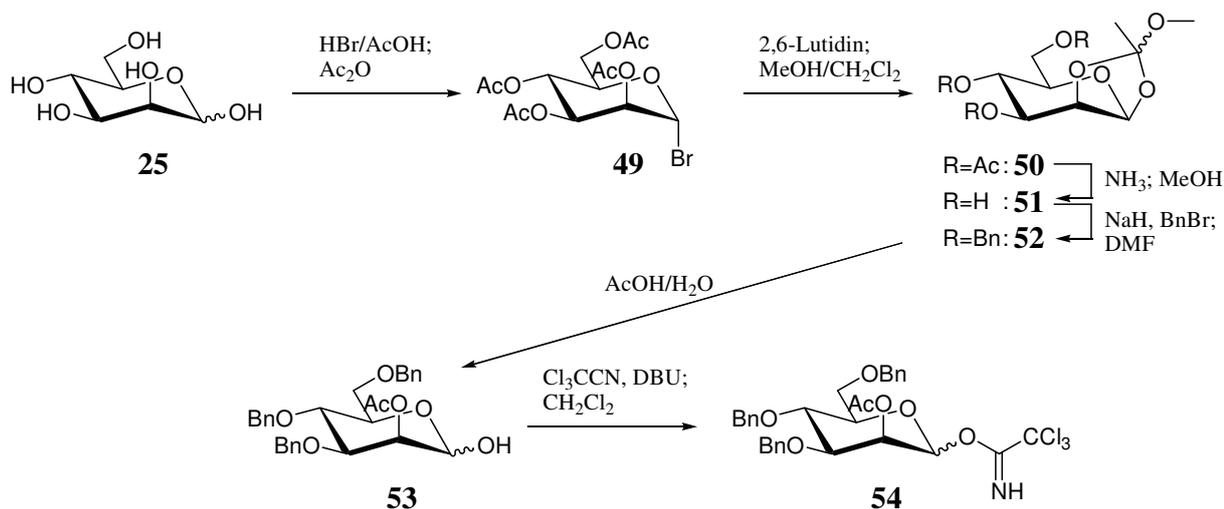


Abbildung 28: Darstellung des Mannosedonors **54**.

Die Acetylschutzgruppe in 2-Position des Mannosedonors **57** führt wegen ihres Nachbargruppeneffektes zur selektiven Ausbildung  $\alpha$ -glycosidischer Bindungen bei der Glycosylierungsreaktion. Auf Grund ihres induktiv elektronenschiebenden Charakters führen die

drei Benzylschutzgruppen gleichzeitig zu einer relativ hohen Reaktivität, wodurch die Bildung von unerwünschtem Orthoester-Nebenprodukt vermieden wird.

### 3.3 Synthese funktionalisierter Kohlenhydrate

Zur Untersuchung von Kohlenhydrat-Protein Wechselwirkungen auf einer Arrayoberfläche sollten funktionalisierte Kohlenhydratderivate dargestellt werden, die mittels reduktiver Aminierung oder Carbonsäureamid-Kupplung auf entsprechend funktionalisierten Glaträgern immobilisiert werden können. Die Synthesen dieser Verbindungen werden in diesem Abschnitt beschrieben. Sie wurden für die Aldehydderivate **58**, **60** und **61** und das Aminderivat **64** zuerst von *R. Weingart* in unserer Arbeitsgruppe entwickelt und durchgeführt,<sup>[215]</sup> jedoch wurden die End- und Zwischenverbindungen von ihm nicht vollständig charakterisiert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden in Zusammenarbeit mit *M. B. Biskup*<sup>[214]</sup> auf dieser synthetischen Route diese Verbindungen in den für die Arrayuntersuchungen erforderlichen Mengen dargestellt und vollständig charakterisiert.

Der Pentenyllinker **20** diente als Ausgangspunkt zur Darstellung von Kohlenhydratderivaten mit terminaler Aldehydfunktion (vgl. Abbildung 29).

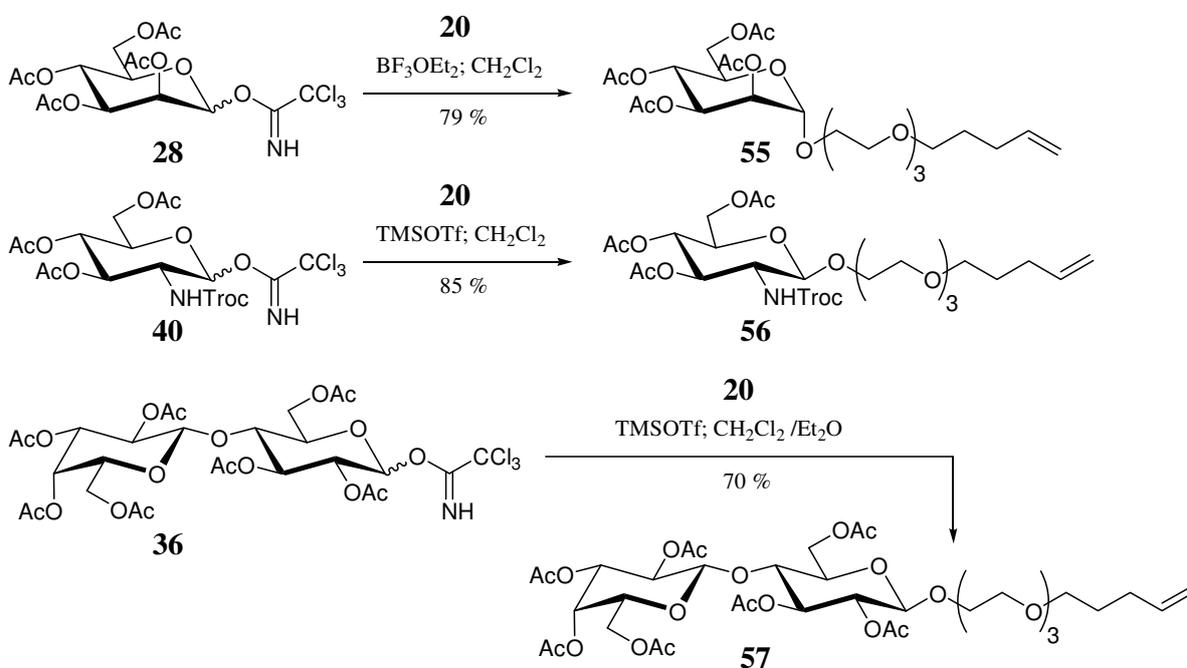
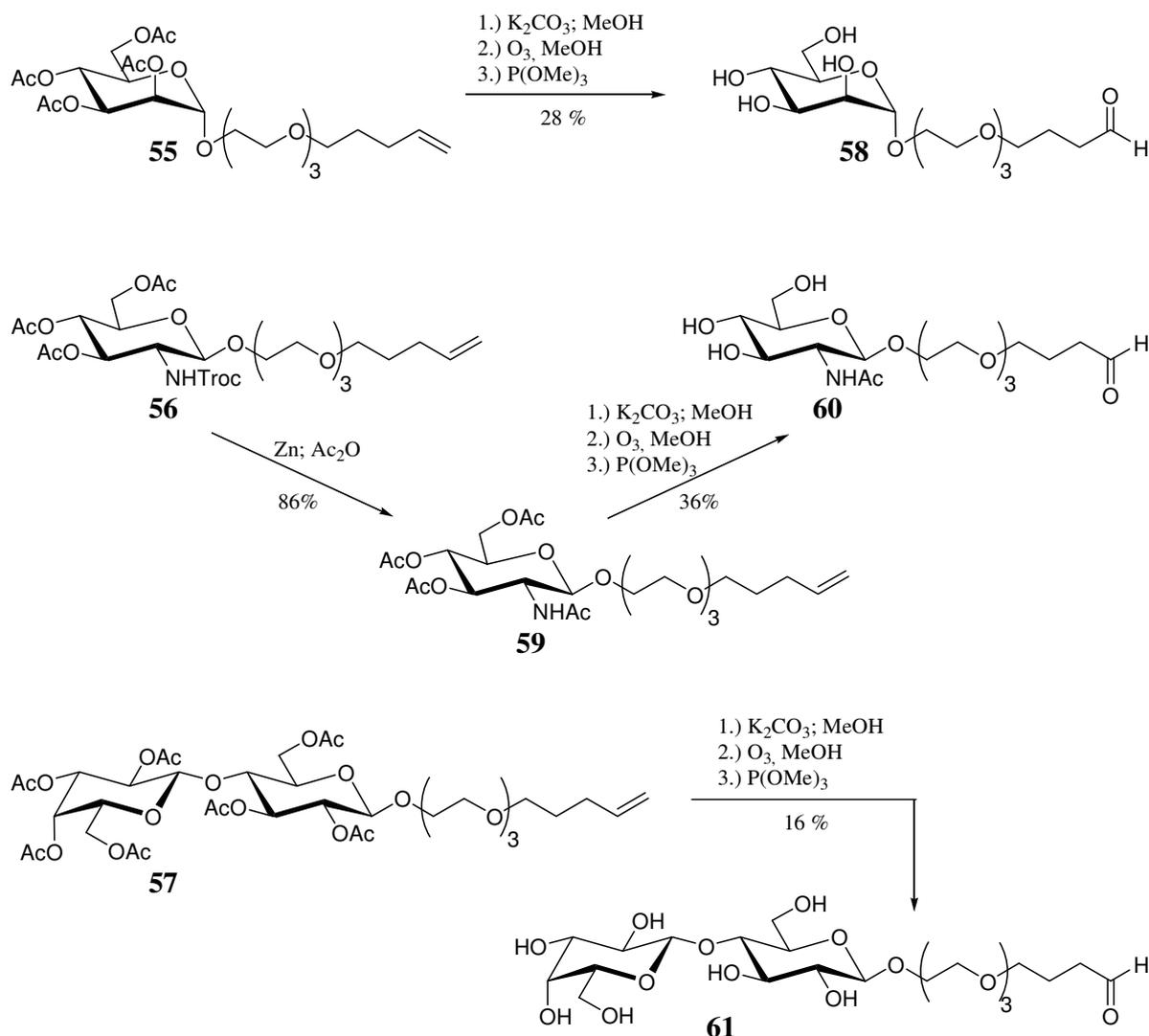


Abbildung 29: Glycosylierungsreaktionen zu den Verbindungen **55**, **56** und **57**.

Die Glycosylierung von **20** mit den Trichloroacetimidatdonoren **28**, **36** bzw. **40** erfolgte mit Bortrifluorid-Etherat oder Trimethylsilyltrifluormethansulfonat als Katalysator in trockenem

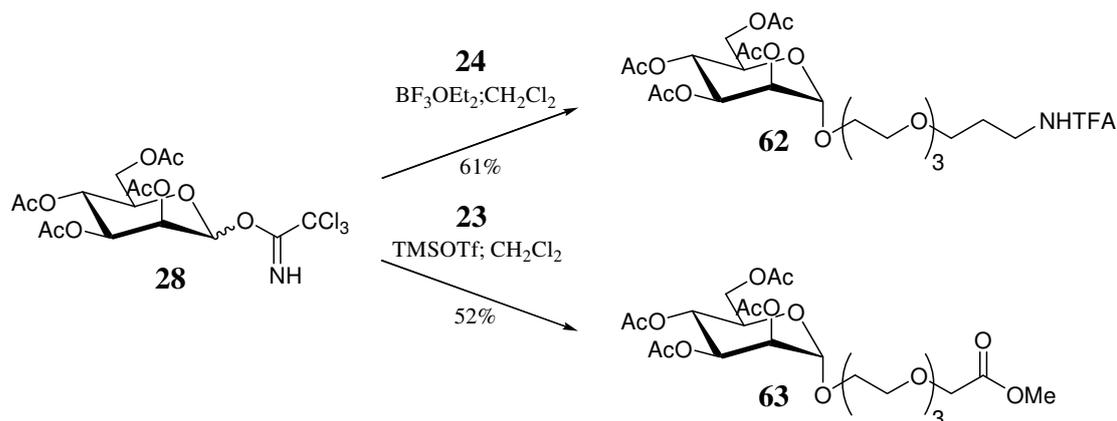
Dichlormethan als Lösungsmittel. Im Falle der Lactoseverbindung **36** war zudem die Zugabe von trockenem Diethylether notwendig, um die Bildung des Orthoester-Nebenproduktes zu unterdrücken. Die acetylgeschützten Verbindungen wurden in Ausbeuten von 79% (**55**), 85% (**56**) bzw. 70% (**57**) nach flashchromatographischer Reinigung erhalten. Im nächsten Schritt wurden die Acetylschutzgruppen entfernt und die terminale Doppelbindung durch Ozonolyse in die gewünschte Aldehydfunktion transformiert (Abbildung 30).



**Abbildung 30:** Synthese der aldehydfunktionalisierten Endverbindungen **58**, **60** und **61**.

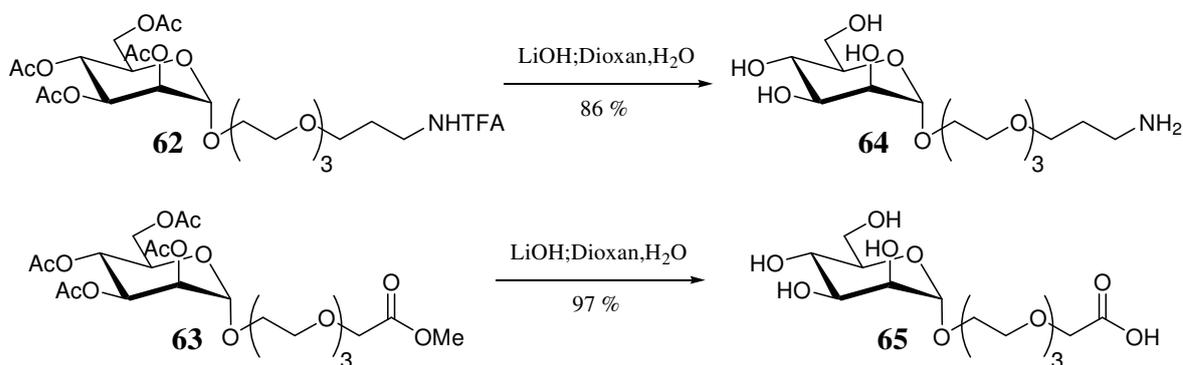
Im Fall der Glucosaminverbindung **56** musste die *N*-Trichlorethoxycarbonyl-Schutzgruppe vor dem Entschützungsschritt in die *N*-Acetylschutzgruppe übergeführt werden, was mit elementarem Zink in Essigsäureanhydrid in 86% Ausbeute erfolgte. Die Desacetylierung wurde mit Kaliumcarbonat in Methanol durchgeführt, ohne weitere Aufreinigung wurden die entschützten Alkene in Methanol ozonolysiert und mit Trimethylphosphit reaktiv aufgearbeitet. Nach RP-18 HPLC Reinigung wurden die gewünschten Aldehyde in 28% (**58**), 36% (**60**) bzw. 16% (**61**) Ausbeute erhalten.

Zur Synthese von Kohlenhydratderivaten mit terminaler Amino- bzw. Carbonsäurefunktion wurden die beiden Glykollinker **23** und **24** verwendet (vgl. Abbildung 31).



**Abbildung 31:** Glycosylierungsreaktionen zu den Verbindungen **62** und **63**.

Die Glycosylierung mit dem Mannosidonor **28** erfolgte mit Bortrifluorid-Etherat oder Trimethylsilyltrifluormethansulfonat als Katalysator in trockenem Dichlormethan als Lösungsmittel. Die acetylgeschützten Verbindungen **62** und **63** wurden in Ausbeuten von 61% bzw. 52% nach flashchromatographischer Reinigung erhalten. Im nächsten Schritt erfolgte die Entschützung zu den gewünschten Zielverbindungen (Abbildung 32).



**Abbildung 32:** Entschützung zu den Endverbindungen **64** und **65**.

Die Entschützung gelang in einem Schritt durch Reaktion mit Lithiumhydroxidlösung im Lösungsmittelgemisch Dioxan/Wasser. Unter diesen Bedingungen wurden neben den *O*-Acetylschutzgruppen auch die *N*-Trifluoracetylschutzgruppe entfernt (Verbindung **62**) bzw. der Methyl ester verseift (Verbindung **63**). Die Endverbindungen **64** und **65** konnten somit in 86% bzw. 97% Ausbeute erhalten werden.

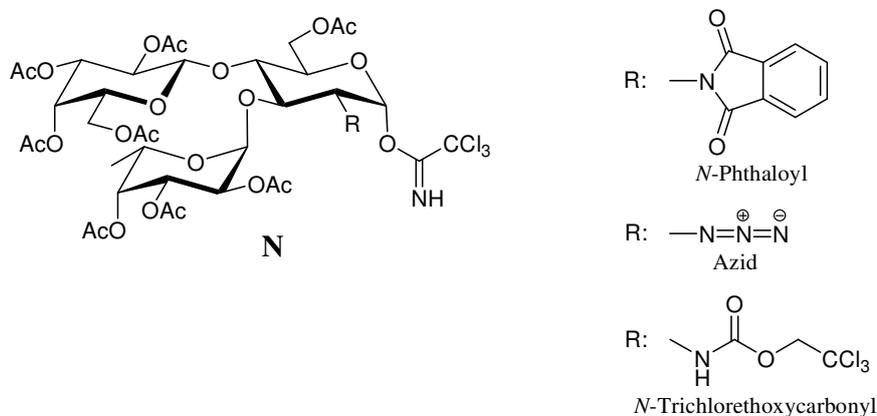
Die Immobilisation der funktionalisierten Kohlenhydrate **58**, **60**, **61**, **63**, **64** und **65** auf Glaträgern wird in den Abschnitten 4.3.1 und 4.3.2 beschrieben.

### 3.4 Synthese von Lewis X-Derivaten

Die Untersuchung von Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen auf einer Arrayoberfläche sollte am Beispiel der homophilen Lewis X-Wechselwirkung erfolgen. Dazu sollten dimere Lewis X-Verbindungen synthetisiert werden, die über eine Linkereinheit mit einer Aldehyd- oder Aminogruppe funktionalisiert sind.

Zur chemischen Darstellung des Lewis X-Trisaccharides sind mehrere Syntheserouten entwickelt worden, die sich insbesondere in der Wahl der Schutzgruppe für die Aminofunktion der Glucosamineinheit unterscheiden. Diese spielt nicht nur eine Rolle beim Aufbau des Lewis X-Epitops, sondern insbesondere auch zur Darstellung von Lewis X-Derivaten bei der folgenden Verknüpfung mit einem Aglycon durch eine Glycosylierungsreaktion. Neben der *N*-Phthaloylgruppe<sup>[245-247]</sup> und der *N*-Trichlorethoxycarbonylgruppe (Troc-Gruppe)<sup>[248]</sup> wurde auch der Weg über die Maskierung der Aminogruppe durch eine Azidofunktion<sup>[249-251]</sup> beschritten.

Die Synthese der Lewis X-Dimere **K** und **L** führt über den Lewis X-Donor **N**, der neben der *N*-Aminoschutzgruppe lediglich *O*-Acetylschutzgruppen besitzt (vgl. Abbildung 33).



**Abbildung 33:** Der Lewis X-Donor **N** mit möglichen Aminoschutzgruppen.

Nach der Glycosylierungsreaktion des Donors **N** mit geeigneten bifunktionellen Linkerbausteinen, Umschüttung der Aminofunktion zur gewünschten Acetamidgruppe und flashchromatographischer Reinigung sollten sich die *O*-Acetylschutzgruppen in einem Schritt in sehr guter Ausbeute unter milden Standardbedingungen (NaOMe, Methanol, RT) abspalten lassen.

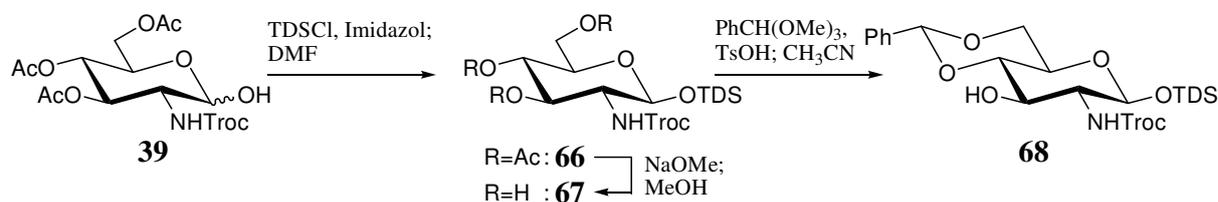
Die Phthaloylgruppe führt zwar allgemein zu hohen Reaktivitäten und  $\beta$ -Selektivitäten bei der Glycosylierungsreaktion, aber ihre Abspaltung erfordert drastische Bedingungen (Hydrazin, hohe Temperaturen) und gelingt teilweise nur in mäßigen Ausbeuten. Zur Darstellung der

Lewis X-Dimere **K** und **L** ist jedoch die gleichzeitige Abspaltung zweier Aminschutzgruppen notwendig.

Die Azidogruppe wurde zuerst von *G. Hummel* in unserer Arbeitsgruppe zur Synthese eines Lewis X-Trisaccharides verwendet.<sup>[252, 253]</sup> Unter Ausnutzung des Nitril-Effektes konnte er bei der Glycosylierung mit einem azidomaskierten Lewis X-Donor gute Ausbeuten und  $\beta$ -Selektivitäten erzielen, obwohl eine Azidogruppe keinen dirigierenden Nachbargruppeneffekt besitzt. Zur Darstellung des Donors **N** müssen jedoch temporär notwendige *O*-Benzylschutzgruppen in *O*-Acetylschutzgruppen umgewandelt werden. Dies gelingt unter Standardbedingungen durch reduktive Debenzylierung mit Wasserstoff unter Pd-Katalyse und anschließender Acetylierung der freien Hydroxylgruppen. Unter diesen Bedingungen wird jedoch auch eine Azidofunktion irreversibel in eine Acetamidfunktion übergeführt und der Donor **N** kann nicht erhalten werden. Damit war diese Syntheseroute ungeeignet.

Die *N*-Trichlorethoxycarbonylgruppe wurde von *L. Manzoni*<sup>[248]</sup>, *C. Gege*<sup>[98, 99, 254]</sup> und *Y. Cong*<sup>[255]</sup> in unserer Arbeitsgruppe zur Synthese von Lewis X-Derivaten eingesetzt. Dabei konnten gute Reaktivitäten und hohe  $\beta$ -Selektivitäten bei Glycosylierungsreaktionen erzielt werden. Zudem lässt sich die Troc-Schutzgruppe nach der Glycosylierung mit Zink unter acetylierenden Bedingungen direkt in das gewünschte Acetamid umwandeln, so dass das zu Nebenreaktionen neigende freie Amin nur intermediär auftritt. Außerdem ist sie stabil unter den reduktiven bzw. acetylierenden Bedingungen bei der Transformation von *O*-Benzylschutzgruppen zu *O*-Acetylschutzgruppen. Aus diesen Gründen fiel zur Synthese des Lewis X-Donors **N** die Wahl auf die Troc-Schutzgruppe.

Ausgehend von der Troc-geschützten Verbindung **39** wurde der Glucosamin-Akzeptor **68** nach Vorschriften von *C. Gege* und *L. Manzoni* in drei Stufen und sehr guten Ausbeuten dargestellt<sup>[248, 254]</sup> (vgl. Abbildung 34).

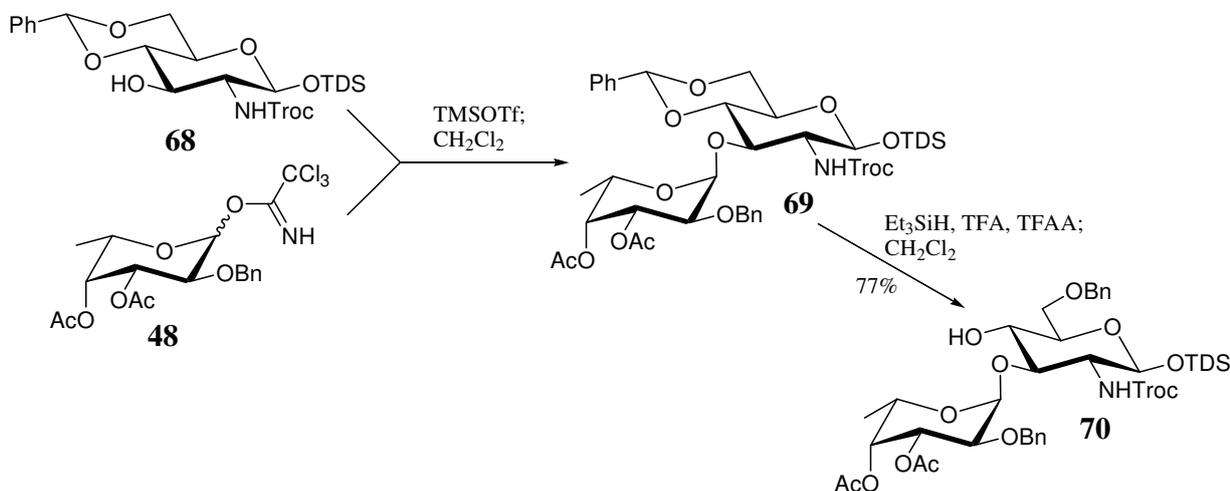


**Abbildung 34:** Darstellung des *N*-Troc-geschützten Glucosaminbausteins **68**.

Die anomer entschützte Verbindung **39** wurde zunächst mit Thexyldimethylsilylchlorid und Imidazol als Base zur vollständig geschützten Verbindung **66** umgesetzt; dabei wurde ausschließlich das  $\beta$ -Isomer erhalten. Nach Desacetylierung unter Standardbedingungen (NaOMe in Methanol) wurden die Hydroxylgruppen von Verbindung **67** in 4- und 6-Position

durch säurekatalysierte Umacetalisierung mit Benzaldehyddimethylacetal selektiv geschützt und der Glucosamin-Akzeptor **68** wurde erhalten.

Im nächsten Schritt erfolgte die Glycosylierung des Akzeptors **68** mit dem Fucose-Donor **48** zum Disaccharid **69**, gefolgt von der reduktiven Öffnung der Benzylidenschutzgruppe zum Akzeptor **70** (vgl. Abbildung 35).



**Abbildung 35:** Darstellung des Disaccharid-Akzeptors **70**.

Bei der Glycosylierungsreaktion konnten bei einem Donor/Akzeptor-Verhältnis von 1,15-1,20 unter sonst gleichartigen Reaktionsbedingungen (Lösungsmittel  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C}$ , 5-10 min Reaktionsdauer bis zum Abbruch der Reaktion durch Zugabe der Base Triethylamin) die von *L. Manzoni* und *C. Gege* berichteten Ausbeuten nicht erreicht werden (vgl. Tabelle 3).

Method	Akzeptor <b>68</b>	Donor <b>48</b>	TMSOTf	T	Zeit	Ausbeute <b>69</b>
<i>L. Manzoni</i> <sup>[248]</sup>	1,0 Äqu.	2,4 Äqu.	0,01 Äqu.	RT	5 min	88% (nur $\alpha$ )
<i>C. Gege</i> <sup>[254]</sup>	1,0 Äqu.	1,25 Äqu.	0,01 Äqu.	$0^\circ\text{C}$	10 min	94% (nur $\alpha$ )
diese Arbeit	1,0 Äqu.	1,19 Äqu.	0,01 Äqu.	$0^\circ\text{C}$	10 min	63% $\alpha$ -Produkt 18% $\alpha/\beta$ Gemisch
diese Arbeit	1,0 Äqu.	1,17 Äqu.	0,01 Äqu.	$0^\circ\text{C}$	5 min	59% $\alpha$ -Produkt 31% $\alpha/\beta$ Gemisch

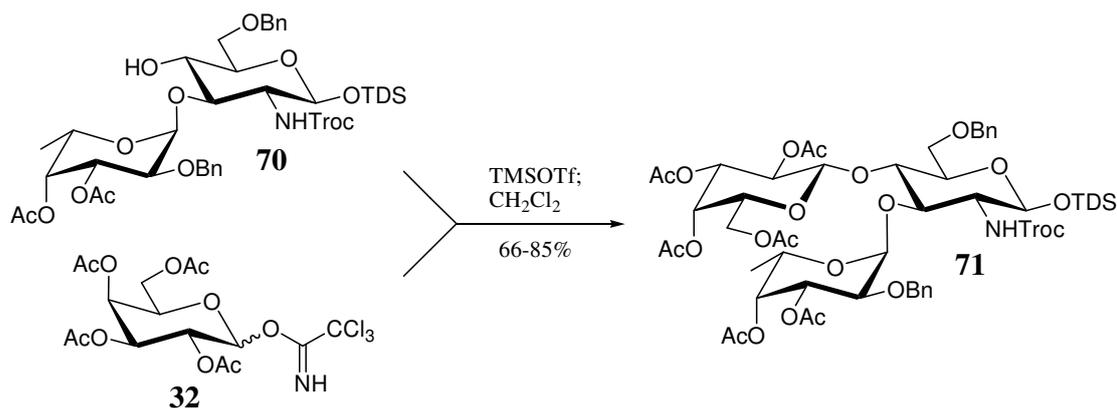
**Tabelle 3:** Reaktionsbedingungen und Ausbeuten bei der Glycosylierungsreaktion zum Disaccharid **69**.

Neben dem erwünschten  $\alpha$ -Produkt wurden auch kleinere Mengen des  $\beta$ -Produktes erhalten, dessen vollständige Abtrennung sich als schwierig erwies. Nach zweimaliger flashchromatographischer Reinigung konnte reines  $\alpha$ -Produkt in einer Ausbeute von etwa 60% erhalten werden, außerdem konnte eine Mischfraktion aus  $\alpha$ - und  $\beta$  Produkt in Ausbeuten von

ca. 20-30% isoliert werden. Aufgrund des NMR-Spektrums konnte das  $\alpha/\beta$ -Verhältnis in der Mischfraktion auf ca. 2/1 abgeschätzt werden; auf eine weitere flashchromatographische Trennung wurde verzichtet. Die Verwendung hoher Donor/Akzeptor-Verhältnisse, wie von *L. Manzoni* berichtet, ist wenig sinnvoll, da der Fucosedonor **48** den wertvolleren Kohlenhydratbaustein darstellt, sowohl was den synthetischen Aufwand für seine Synthese als auch den Preis der zugrunde liegenden L-Fucose angeht. Nach der Glycosylierungsreaktion kann der Donor **48** jedoch nicht mehr isoliert werden, sondern nur das aus ihm durch Umlagerung hervorgegangene synthetisch wertlose Fucosyltrichloracetamid.

Die regioselektive reduktive Ringöffnung der Benzylidenacetalschutzgruppe von Verbindung **69** wurde nicht mit den Standardreagenzien NaCNBH<sub>3</sub>/HCl in THF durchgeführt (*L. Manzoni*), sondern mit Triethylsilan/TFA/TFAA in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> als milder Alternative<sup>[256]</sup> (vgl. Abbildung 35). Der Disaccharidakzeptor **70** konnte in einer Ausbeute von 77% erhalten werden.

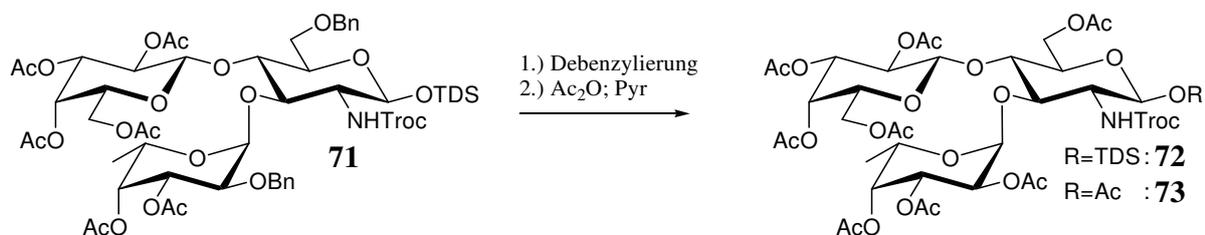
Die Glycosylierungsreaktion zwischen dem Galactose-Donor **32** und dem Akzeptor **70** wurde wiederum nach einer Vorschrift von *L. Manzoni* durchgeführt<sup>[248]</sup> (vgl. Abbildung 36).



**Abbildung 36:** Glycosylierung zum geschützten Lewis X-Trisaccharid **71**.

Nach flashchromatographischer Reinigung konnte das geschützte Lewis X-Trisaccharid **71** in Ausbeuten von 66-85% erhalten werden.

Nach dem Aufbau des Lewis X-Grundkörpers sollten die beiden Benzylschutzgruppen in Verbindung **71** in Acetylschutzgruppen transformiert werden. Bei einer Reaktionsführung unter Standardbedingungen (Debenzylierung mit Wasserstoff unter Palladiumkatalyse und anschließender Acetylierung mit Essigsäureanhydrid in Pyridin, vgl. Tabelle 4, Eintrag A) wurde jedoch neben dem erwünschten Produkt **72** auch das anomer acetylierte Nebenprodukt **73** erhalten (vgl. Abbildung 37).



**Abbildung 37:** Umschüttung des Lewis X-Trisaccharides.

Offensichtlich war die TDS-Schutzgruppe unter den Standardbedingungen der Debenzylierung nicht stabil; nach ihrer Abspaltung wurde die anomere Hydroxylgruppe gleichfalls acetyliert. Tatsächlich konnte ein stark saures pH-Milieu unter diesen Bedingungen gemessen werden, das vermutlich für die Desilylierung verantwortlich war. Daraufhin wurden mehrere Methoden zur Debenzylierung untersucht, die geeignet erschienen, eine Silylschutzgruppe zu tolerieren (vgl. Tabelle 4).

	Katalysator	Lösungsmittel Zusätze, T	Druck (H <sub>2</sub> )	Zeit	Ausbeute 72	Ausbeute 73	Edukt 71 reisoliert
A	Pd/C	THF/MeOH, RT	1 bar	12 h	49%	28%	-
B	Pd/C	THF, NEt <sub>3</sub> , RT	1 bar	12 h	43%	24%	5%
C	Pd/C	THF, K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , RT	1 bar	2 h	-	-	85%
D	Pd/C	THF, Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , RT	50 psi	24 h	-	-	79%
E	Pd(OH) <sub>2</sub> /C	THF/MeOH, RT	1 bar	2 h	36%	47%	(< 10%)*
F	Raney-Ni	Ethanol, RT	1 bar	24 h	-	-	90%
G	Raney-Ni	Ethanol, RT	50 psi	12 h	-	-	90%
H	Pd/C	MeOH, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> Rückfluss	-	12 h	Zersetzung		(< 20%)*
I	Pd(OH) <sub>2</sub> /C	EtOH, Cyclohexadien, RT	-	12 h	(< 10%)*	-	74%
J	Pd/C	THF, RT	50 psi	2 h- 12 h	53%-57%	5%-19%	8%-34%

**Tabelle 4:** Reaktionsbedingungen und Ausbeuten bei der Umschüttung von Verbindung **71**,\*: nicht isoliert, Abschätzung der Ausbeute mittels Dünnschichtchromatographie.

Die Verwendung von Triethylamin (Eintrag B) als basischer Zusatz brachte keine Verbesserung. Das Reaktionsgemisch konnte zu Beginn der Reaktion neutralisiert werden, jedoch wurde am Ende der Reaktion wieder ein deutlich saurer pH-Wert gemessen. Eine Inhibition der Debenzylierungsreaktion, wie in der Literatur durch Zusatz von nicht-aromatischen Aminen

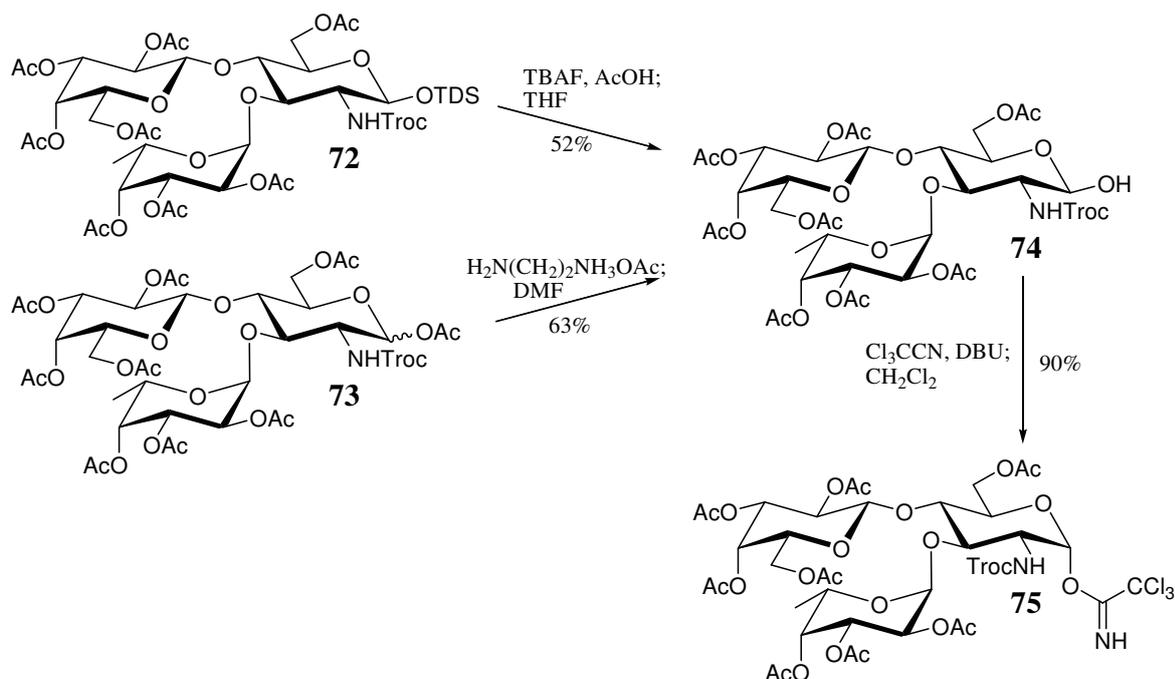
berichtet<sup>[257]</sup>, konnte dagegen nicht beobachtet werden. Die Zugabe von festem  $K_2CO_3$  (Eintrag C) oder  $Na_2CO_3$  (Eintrag D) verhinderte zwar die säurekatalysierte Abspaltung der TDS-Gruppe unterdrückte aber gleichfalls die gewünschte Debenzylierungsreaktion, auch bei hohem Druck und langer Reaktionszeit. Die Inhibition der Debenzylierung durch  $Na_2CO_3$  ist literaturbekannt.<sup>[258]</sup>

Die Verwendung des reaktiveren Pearlman-Katalysators  $Pd(OH)_2$  (Eintrag E) führte, neben der erwarteten *O*-Debenzylierung, ebenfalls zur partiellen Desilylierung. Mit Raney-Nickel W2 als Katalysator (Einträge F und G) konnte keine Reaktion beobachtet werden.<sup>[259]</sup>

Als mildere Variante wurde die Transferhydrogenierung mit zwei verschiedenen Methoden untersucht. Bei der Reaktion mit Ammoniumcarbonat in siedendem Methanol<sup>[260]</sup> (Eintrag H) wurden lediglich nicht näher charakterisierte Zersetzungsprodukte erhalten, bei der Reaktion mit Cyclohexadien (Eintrag I) konnte hingegen nur ein sehr geringer Umsatz beobachtet werden.<sup>[261]</sup>

Schließlich wurde versucht durch Anwendung eines hohen Wasserstoff-Drucks bei der Debenzylierungsreaktion im ursprünglichen Reaktionssystem ( $Pd/C$  als Katalysator, THF, RT) die Reaktionsdauer kurz zu halten (Eintrag J). Damit sollte die TDS-Gruppe dem schädlichen sauren Reaktionsmilieu nur möglichst kurzfristig ausgesetzt sein. Auch die Katalysatorkonzentration wurde zu diesem Zweck variiert. Es gelang jedoch nicht, Bedingungen zu finden, bei denen im Reaktionsverlauf dünnschichtchromatographisch kein Edukt mehr und gleichzeitig noch kein Nebenprodukt ohne Silylschutzgruppe detektierbar war. Im besten Fall konnten, nach Acetylierung, Ausbeuten an erwünschtem Produkt **72** im Bereich von 53-57% erhalten werden. Dabei wurden gleichzeitig bis zu 20% Nebenprodukt **73** isoliert und bis zu 34% Edukt **71** zurückgewonnen. Die dünnschichtchromatographisch verfolgten Reaktionsgeschwindigkeiten der Debenzylierungsreaktion waren darüber hinaus sehr unterschiedlich; ein Umstand, der für heterogen-katalysierte Reaktionen nicht unüblich ist.

Im nächsten Schritt der Synthese wurde die anomere Schutzgruppe des Lewis X-Trisaccharids abgespalten und schließlich die Transformation in das benötigte Trichloracetimidat durchgeführt (vgl. Abbildung 38).



**Abbildung 38:** Darstellung des Troc-geschützten acetylierten Lewis X-Trichloracetimidatdonors **75**.

Im Fall der TDS-geschützten Verbindung **72** gelang die anomere Entschützung mit TBAF unter Zugabe von Essigsäure<sup>[262]</sup> in THF als Lösungsmittel nur in einer mäßigen Ausbeute von 52%. Neben dem Produkt **74** konnten massenspektrometrisch Nebenprodukte identifiziert werden, bei denen die Troc-Schutzgruppe abgespalten worden war (Fehlen des charakteristischen Isotopenmuster der Troc-Gruppe mit 3 Chloratomen). Offensichtlich wurde die Troc-Gruppe auch unter den gewählten milden nicht-nukleophilen Reaktionsbedingungen angegriffen.

Die zunächst als Nebenprodukt erhaltene acetylierte Verbindung **73** konnte gleichfalls weiter verwendet werden. Durch selektive anomere Desacetylierung von **73** mit Ethylendiaminacetat konnte die gewünschte Verbindung **74** in 63% Ausbeute erhalten werden.

Verbindung **74** konnte schließlich mit Trichloracetonitril und DBU als Base in trockenem Dichlormethan in 90% Ausbeute in den gewünschten Lewis X-Donorbaustein **75** (= N) übergeführt werden.

Zur Darstellung dimerer Lewis X-Verbindungen sollte der Donorbaustein **75** mit symmetrischen Glykollinker-Akzeptoren glycosyliert werden. Zu diesem Zweck wurde Verbindung **O** von X.-H. Jiang in unserer Arbeitsgruppe synthetisiert.<sup>[216]</sup> Die Glycosylierung wurde unter Standardbedingungen (TMSOTf als Katalysator, Dichlormethan als Lösungsmittel, Raumtemperatur) durchgeführt (vgl. Abbildung 39).

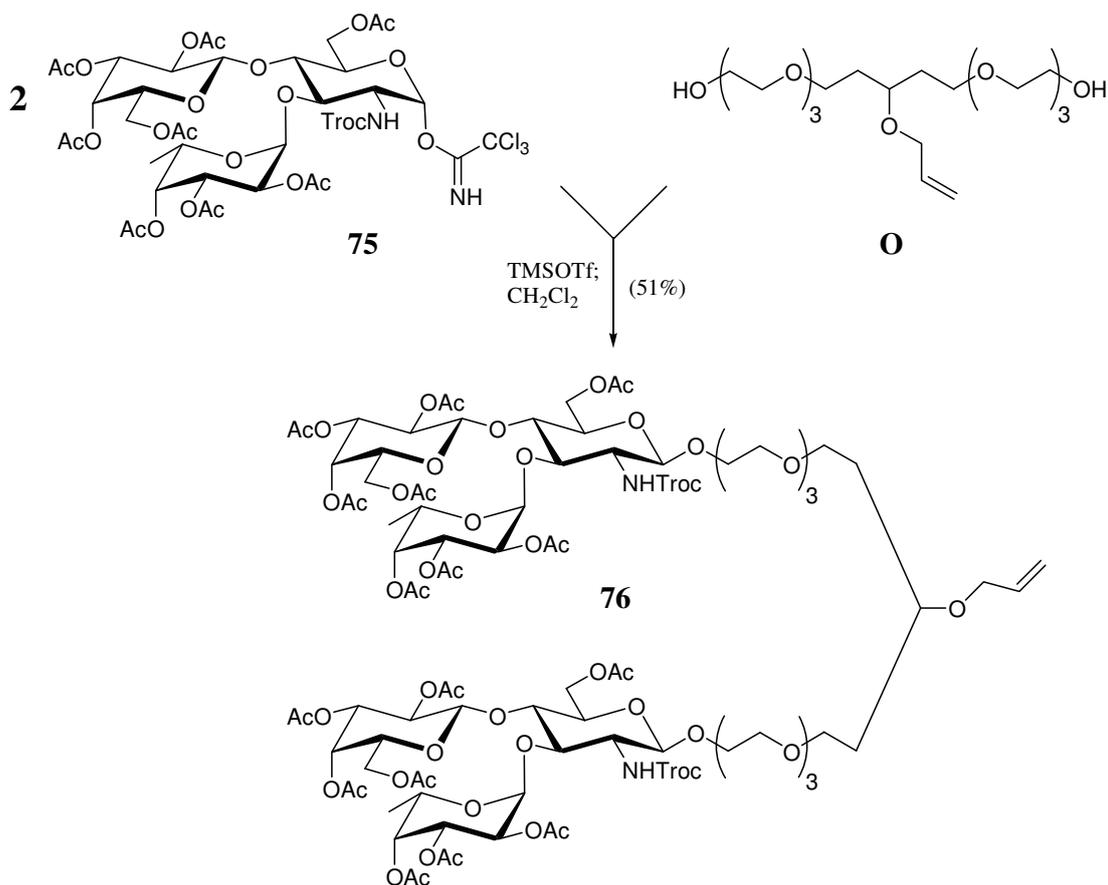


Abbildung 39: Synthese der dimeren Lewis X-Verbindung **76**.

Dabei wurde ein Donor/Akzeptor-Verhältnis von 3 zu 1 gewählt, entsprechend 1.5 Äquivalenten Lewis X-Trichloracetimidat bezogen auf eine Hydroxylgruppe der Glykolverbindung. Das Glycosylierungsprodukt **76** konnte zwar in 51% Ausbeute erhalten werden, jedoch konnten auch nach mehrmaliger flashchromatographischer Reinigung Spuren des Monoglycosylierungsnebenproduktes nicht vollständig abgetrennt werden. Dieses unterscheidet sich in seiner Polarität zu wenig vom dimeren Produkt **76**, zudem wird die chromatographische Trennung mittels Kieselgel durch den stark ausgeprägten Tailing-Effekt beider Verbindungen deutlich erschwert (vgl. Abschnitt 3.1). Möglicherweise wäre eine vollständige Auftrennung durch Größenausschlusschromatographie möglich. Ebenso sollte die Verwendung noch größerer Überschüsse des Glycosyldonors **76** zu weniger Monoglycosylierungsnebenprodukt und damit zu weniger Reinigungsproblemen führen; allerdings stellt der Donorbaustein **76** den wertvolleren Baustein der beiden Edukte dar, dessen Überschussanteil nach der Glycosylierungsreaktion nicht mehr zurückgewonnen werden kann.

Da es im gegebenen Zeitrahmen dieser Dissertation nicht mehr gelang Verbindung **76** in der notwendigen Reinheit darzustellen und darüber hinaus auch keine ausreichenden Mengen mehr des Lewis X-Donorbausteins **75** zur Verfügung standen – und dessen Resynthese zu diesem

Zeitpunkt wiederum nicht mehr realisierbar war -, mussten die Synthese und die weitergehenden Untersuchungen an dieser Stelle unterbrochen werden.

### 3.5 Synthese von Mannose-Glycolipiden

Zur NMR-spektroskopischen Untersuchung von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen in Lösung sollten Mannose-Glycolipide dargestellt werden, die über einen Dodecylrest in einer Micellmembran verankert werden können. Die Synthesen dieser Verbindungen werden im folgenden Abschnitt beschrieben. Als Abstandhalter (Spacer) zwischen Kohlenhydrat und Alkylrest sollten keine, eine oder zwei Triethylglykol-Einheiten dienen. Als Kontrollsubstanzen sollten weiterhin entsprechende Methylmannoside synthetisiert werden, so dass insgesamt vier verschiedene Aglycone (Methanol, Dodecanol, Triethylglykol **19** und Hexaethylglykol **22**) verwendet werden sollten.

Diese Aufgabenstellung legt zunächst eine konvergente Synthesestrategie nahe (vgl. Abbildung 40, Weg A).

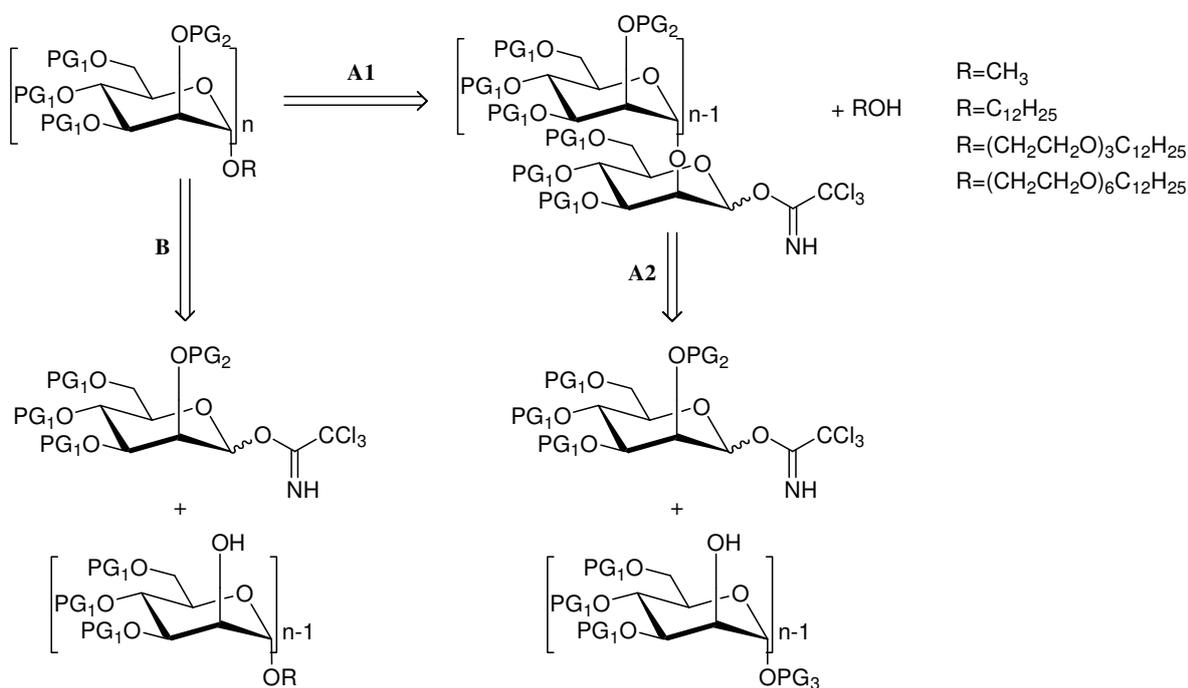


Abbildung 40: Retrosynthetische Überlegungen zur Darstellung der Mannose-Glycolipide.

Dabei werden verschieden lange Oligomannoside im letzten Glycosylierungsschritt jeweils kombinatorisch mit den vier Aglyconen ROH verknüpft (Weg A1). Die Oligomannoside selbst werden sukzessive aus einem Mannosyldonor und einem um eine Mannoseeinheit verkürzten

Mannoseakzeptor aufgebaut (Weg A2). Insgesamt sind drei verschiedene Schutzgruppen notwendig, eine permanente ( $PG_1$ ) und zwei temporäre ( $PG_2$  und  $PG_3$ ). Die Weg A folgende Strategie scheitert allerdings an der erforderlichen  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2)-glycosidischen Verknüpfung der Mannoseeinheit am reduzierenden Ende mit den Aglyconen. Ohne eine Schutzgruppe mit Nachbargruppeneffekt an der 2-Position des Glycosyldonors werden in der Regel  $\alpha/\beta$ -Gemische erhalten, deren Auftrennung große Schwierigkeiten bereiten kann.

Stattdessen wurde eine lineare Synthesestrategie verfolgt (Weg B), die, jeweils von einem Aglycon ROH ausgehend, in einer wechselnden Abfolge von Glycosylierungs- und Entschützungsstufen zu den gewünschten Produkten führt. Dies entspricht im Grunde dem Weg A2, wobei das jeweilige Aglycon R selbst die Funktion der permanenten Schutzgruppe  $PG_3$  übernimmt. Mit dieser Strategie sind folglich zwei Schutzgruppen ausreichend, allerdings muss im Gegensatz zum konvergenten Ansatz A für jedes Aglycon ROH eine eigene Synthese vom Monomannosid bis zum gewünschten Oligomannosid durchgeführt werden.

Die Synthesen erfolgten mit dem Mannosetrichloracetimidat **54** als Glycosyldonor, dessen Synthese in Abschnitt 3.2.4 bereits beschrieben worden ist. Dieser Baustein wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits zur Synthese von Oligomannosiden sowohl in Lösung<sup>[243, 263]</sup> als auch an der festen Phase<sup>[264]</sup> erfolgreich eingesetzt.

Die Acetylschutzgruppe in 2-Position dient einerseits als temporäre Schutzgruppe während der Synthese, andererseits führt sie auf Grund ihres Nachbargruppeneffektes zur selektiven Ausbildung  $\alpha$ -glycosidischer Bindungen. Die Benzylschutzgruppen werden als permanente Schutzgruppen erst nach dem letzten Glycosylierungsschritt abgespalten. Auf Grund dieser Eigenschaften war zur Synthese aller benötigten Mannoseglycolipide nur dieser eine Kohlenhydratbaustein notwendig.

Ausgehend von den vier Aglyconen Methanol, Dodecanol, Triethylenglykol **19** und Hexaethylenglykol **22** wurden abwechselnd Glycosylierungs- und Desacetylierungsreaktionen durchgeführt, wodurch sich ein zyklisches Syntheschema ergab (vgl. Abbildung 41).

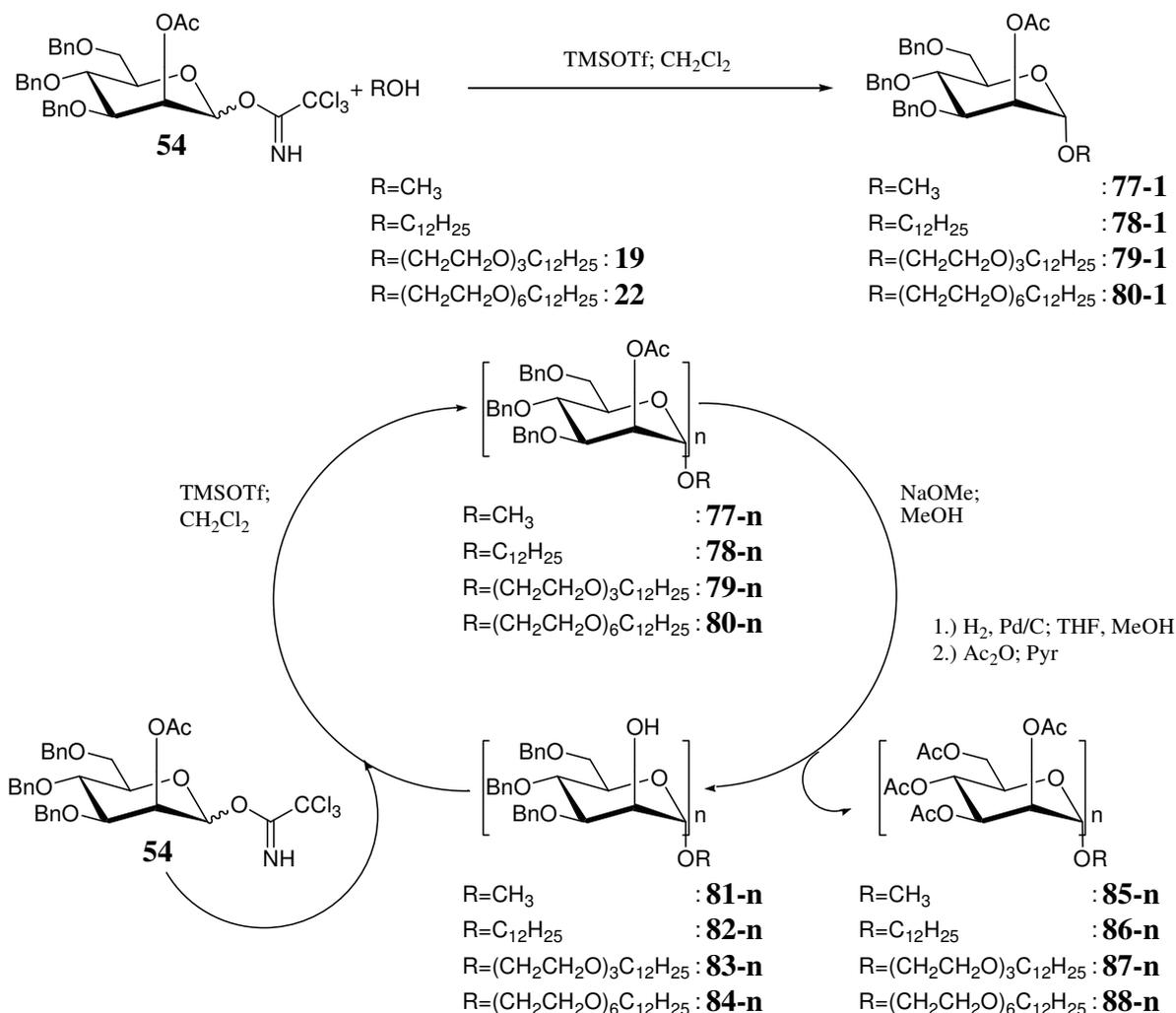
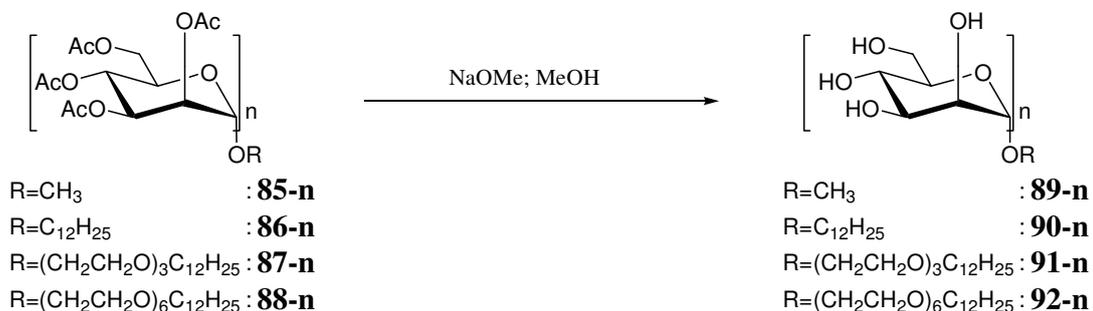


Abbildung 41: Zyklisches Syntheschema zur Darstellung der Mannose-Glycolipide.

Die Glycosylierung erfolgte mit 1.2-1.3 Äquivalenten des Donors **54** und mit 0.1 Äquivalenten Trimethylsilyltrifluormethansulfonat als Katalysator (bezogen auf die Menge an Donor) in trockenem Dichlormethan als Lösungsmittel. Wie zu erwarten verliefen alle Glycosylierungen  $\alpha$ -selektiv zu den Produkten **77-n**, **78-n**, **79-n** und **80-n** ohne Ausbildung von Orthoester-Nebenprodukten. Die Desacetylierung wurde unter Standardbedingungen (NaOMe in Methanol) durchgeführt und verlief praktisch quantitativ, so dass auf die Reinigung der 2-*O*-entschützten Verbindungen **81-n**, **82-n**, **83-n** und **84-n** verzichtet werden konnte. Sie wurden unmittelbar als Akzeptoren im nächsten Glycosylierungsschritt verwendet. Auf diese Weise konnten sukzessive vollständig geschützte Oligomannoside erhalten werden.

Um zu den gewünschten Produkten zu gelangen wurden kleinere Mengen der vollständig geschützten Verbindungen **77-n**, **78-n**, **79-n** und **80-n** aus dem Syntheseyklus entnommen. Zur Vereinfachung der Reinigung wurde ein zweistufiges Verfahren angewandt. Zunächst wurden die Benzylschutzgruppen hydrogenolytisch mit Hilfe des Pearlman-Katalysators ( $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ ) abgespalten. Ohne vorherige Aufreinigung erfolgte im zweiten Schritt die Peracetylierung der

Reaktionsprodukte unter Standardbedingungen (Essigsäureanhydrid in Pyridin) zu den acetylgeschützten Verbindungen **85-n**, **86-n**, **87-n** und **88-n**, die chromatographisch gereinigt werden konnten. Den Abschluss der Synthesen (vgl. Abbildung 42) bildete die Desacetylierung unter Standardbedingungen (NaOMe in Methanol).



**Abbildung 42:** Entschützung der Mannose-Glycolipide.

Auf diese Weise wurden zunächst die Dimannoside **89-2**, **90-2**, **91-2** und **92-2** synthetisiert. Erste NMR-spektroskopische Untersuchungen, die in der Arbeitsgruppe von *O. Zerbe* an der Universität Zürich durchgeführt worden waren, zeigten die vielversprechendsten Ergebnisse für die Verbindung **92-2**, die eine Hexaethylenglykoleinheit als Abstandhalter trägt. Daraufhin wurden das (Mono-) Mannosid **92-1**, die Trimannoside **92-3** und **89-3** (letzteres als Kontrollsubstanz), das Tetramannosid **92-4** und das Pentamannosid **92-5** dargestellt. Auf die Ergebnisse der NMR-spektroskopischen Untersuchungen zur Kohlenhydrat-Protein Wechselwirkung wird in Abschnitt 5 näher eingegangen.

Die Ausbeuten der einzelnen Reaktionen sind in den Tabellen 5-7 gezeigt. Die Schwierigkeiten bei diesen Synthesen lagen nicht in den Ausbeuten oder Selektivitäten der Reaktionen, sondern in der Reinigung mancher Produkte.

Für die Glycosylierungsreaktionen (Tabelle 5) erwies sich Standard-Flashchromatographie zur Abtrennung von nicht-umgesetztem Akzeptor bei den Verbindungen **80-2**, **77-3**, **80-3**, **80-4** und **80-5** nicht mehr als ausreichend. Hierbei trat ein ausgesprochen starker Tailing-Effekt bei den Verbindungen mit Glykoleinheiten auf (vgl. Abschnitt 3.1). Kleinere Mengen dieser Substanzen wurden deshalb zur Charakterisierung zusätzlich durch Mitteldruckchromatographie (MPLC) gereinigt, während die Hauptmenge nach einfacher flashchromatographischer Reinigung weiter umgesetzt wurde.

### 3 Chemische Synthesen

Akzeptor	Produkt	Ausbeuten	Art der Reinigung
CH <sub>3</sub> OH	<b>77-1</b>	88%	Flash Chromatographie (FC)
	<b>77-1</b>	91%	Flash Chromatographie (FC)
	<b>77-2</b>	76%	Flash Chromatographie (FC); Mitteldruck-Chromatographie (MPLC), analytisch
C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> OH	<b>78-1</b>	87%	Flash Chromatographie (FC)
	<b>78-1</b>	78%	Flash Chromatographie (FC)
	<b>19</b>	94%	Flash Chromatographie (FC)
	<b>79-1</b>	60%	Flash Chromatographie (FC)
	<b>22</b>	87%	Flash Chromatographie (FC)
	<b>80-1</b>	67%	Flash Chromatographie (FC); Mitteldruck-Chromatographie (MPLC), analytisch
	<b>80-2</b>	75%	Flash Chromatographie (FC); Mitteldruck-Chromatographie (MPLC), analytisch
	<b>80-3</b>	77%	Flash Chromatographie (FC); Mitteldruck-Chromatographie (MPLC), analytisch
	<b>80-4</b>	75%	Flash Chromatographie (FC); Mitteldruck-Chromatographie (MPLC), analytisch

**Tabelle 5:** Ausbeuten und Aufreinigungsschritte bei der Glycosylierungsreaktion zur Darstellung der Mannose-Glycolipide.

Für die Reaktionen zu den peracetylierten Verbindungen ergab sich ein ähnliches Bild (vgl. Tabelle 6). Lediglich die Mono- bzw. Dimannoside **88-1**, **88-2** und **86-2** konnten durch Standard-Flashchromatographie gereinigt werden, alle anderen Substanzen mussten durch präparative Mitteldruckchromatographie (MPLC) gereinigt werden. Als Nebenprodukte traten hierbei kleine Mengen verschiedener unpolarerer Substanzen auf, bei denen einzelne Benzylgruppen im ersten Reaktionsschritt nicht abgespalten und damit nicht durch Acetylgruppen substituiert worden waren.

<b>Edukt</b>	<b>Produkt</b>	<b>Ausbeute (2 Stufen)</b>	<b>Art der Reinigung</b>
77-2	85-2	61%	Flash Chromatographie (FC)
77-3	85-3	45%	Mitteldruck-Chromatographie (MPLC), präparativ
78-2	86-2	89%	Flash Chromatographie (FC)
79-2	87-2	38%	Mitteldruck-Chromatographie (MPLC), präparativ
80-1	88-1	61%	Flash Chromatographie (FC)
80-2	88-2	35%	Mitteldruck-Chromatographie (MPLC), präparativ
80-3	88-3	60%	Mitteldruck-Chromatographie (MPLC), präparativ
80-4	88-4	83%	Mitteldruck-Chromatographie (MPLC), präparativ
80-5	88-5	71%	Mitteldruck-Chromatographie (MPLC), präparativ

**Tabelle 6:** Ausbeuten und Aufreinigungsschritte bei der Umschützungsreaktion zur Darstellung der Mannose-Glycolipide.

Die letzten Entschützungs-schritte verliefen für alle Verbindungen nahezu quantitativ. In Tabelle 7 dargestellt sind die Ausbeuten nach Gefriertrocknung.

<b>Edukt</b>	<b>Produkt</b>	<b>Ausbeute</b>
85-2	89-2	96%
85-3	89-3	97%
86-2	90-2	98%
87-2	91-2	93%
88-1	92-1	95%
88-2	92-2	97%
88-3	92-3	79%
88-4	92-4	94%
88-5	92-5	86%

**Tabelle 7:** Ausbeuten bei der Entschützungsreaktion zur Darstellung der Mannose-Glycolipide.



# 4 Array Untersuchungen

## 4.1 Allgemeine Betrachtungen

Die durchgeführten Array-Untersuchungen lassen sich in zwei Teile gliedern:

- 1.) Untersuchungen zur Immobilisierung von Kohlenhydraten auf funktionalisierten Glasträgern
- 2.) Untersuchungen von Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkungen

Im ersten Teil wurde die reduktive Aminierung als Möglichkeit zur kovalenten Verknüpfung von Kohlenhydraten auf funktionalisierten Glasträgern untersucht. Dazu wurden fluoreszenzmarkierte Kohlenhydratderivate benutzt, die von *M. B. Biskup* im Rahmen seiner Dissertation in unserer Arbeitsgruppe synthetisiert wurden.<sup>[214]</sup> Diese Verbindungen wurden verwendet, um einerseits die Immobilisierung durch reduktive Aminierung zu optimieren, andererseits aber auch um die Möglichkeiten bzw. Grenzen der verwendeten Messgeräte für die Fragestellung dieser Arbeit zu erkunden.

Im zweiten Teil wurde mit Hilfe der Verbindungen **58**, **60**, **61**, **64**, **E** und **F** die Kohlenhydrat-Lektin Wechselwirkung auf Glasträgern untersucht. Dabei konnte im Wesentlichen auf die Verknüpfungsbedingungen zurückgegriffen werden, die im ersten Teil optimiert worden waren. Die Variationen in diesen Experimenten erstreckten sich in erster Linie auf die Hybridisierungs- und Waschvorgänge nach der Wechselwirkung mit dem Protein. Daneben wurde auch die Immobilisierung durch Amidbindung (Verbindung **65**) untersucht.

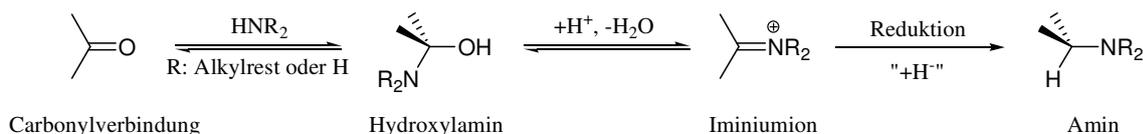
Die Arbeiten begannen mit dem ersten Teilgebiet, wurden nach ersten Erfolgen auf das zweite Teilgebiet ausgeweitet und schließlich parallel durchgeführt. Zur besseren Übersichtlichkeit und zum besseren Verständnis dieser Arbeit soll in diesem Kapitel keine streng chronologische Beschreibung der durchgeführten Array-Experimente erfolgen. Stattdessen soll in diesem Abschnitt 4.1 nach einer kurzen Übersicht über reduktive Aminierung und Amidbindungsbildung je ein allgemeines Standardprotokoll zur Darstellung von Kohlenhydratarrays durch reduktive Aminierung und zur Hybridisierung dieser Arrays mit fluoreszenzmarkierten Lektinen beschrieben werden. Darüber hinaus wird auf die Verwendung

von Silikonmasken eingegangen, durch die wesentlich bessere Ergebnisse erhalten werden konnten. Schließlich wird die quantitative Auswertung der Messergebnisse erläutert.

In Abschnitt 4.2 wird detaillierter auf das erste Teilgebiet eingegangen; dabei werden auch die Eigenschaften der verwendeten Messgeräte (ELISA-Plattenreader, Fluoreszenzmikroskop und DNA-Array-Scanner) besprochen, insofern diese für das Verständnis der Experimente wichtig sind. In Abschnitt 4.3 werden schließlich die Versuche zum zweiten Teilgebiet genauer beschrieben.

### 4.1.1 Reduktive Aminierung

Aldehyde oder Ketone können mit Ammoniak, primären oder sekundären Aminen in Gegenwart bestimmter Reduktionsmittel direkt zu primären, sekundären oder tertiären Aminen reagieren. Diese Reaktion wird als reduktive Aminierung (aus der Sicht der Carbonylkomponente) bzw. als reduktive Alkylierung (aus der Sicht der Aminkomponente) bezeichnet.<sup>[265, 266]</sup> Der Mechanismus der Reaktion ist in Abbildung 43 dargestellt.<sup>[267, 268]</sup>



**Abbildung 43:** Mechanismus der reduktiven Aminierung.

Die Carbonylverbindung reagiert mit dem Amin in einer Gleichgewichtsreaktion zu einem Hydroxylamin-Intermediat, aus dem unter Wasserabspaltung eine Schiffsche Base (ein Imin) erhalten wird. Diese liegt unter den neutralen bis schwach sauren Reaktionsbedingungen (pH = 3-7) als Iminiumion vor, dessen irreversible Reduktion schließlich zur Bildung des alkylierten Aminproduktes führt. Das Reduktionsmittel muss dabei so selektiv reagieren, dass zwar das Iminiumion hinreichend schnell reduziert, die (nicht-protonierte) Carbonylkomponente jedoch nicht angegriffen wird. Diese Selektivität wird einerseits durch katalytische Hydrierung mit Hilfe von Platin-, Palladium- oder Nickelkatalysatoren<sup>[267, 269, 270]</sup> oder aber durch den Einsatz von löslichen Metallhydriden, insbesondere Natriumcyanoborhydrid  $\text{NaCNBH}_3$ , erreicht. Letzteres reduziert Aldehyde und Ketone unter sauren Bedingungen (pH = 3-4) schnell, unter neutralen Bedingungen (pH = 6-8) dagegen nur sehr langsam, während Iminiumionen bei Raumtemperatur hinreichend schnell reagieren.<sup>[271, 272]</sup> Außerdem toleriert es eine Vielzahl funktioneller Gruppen und kann in vielen Lösungsmitteln wie z.B. Methanol, Ethanol, Wasser, THF, DMF oder Acetonitril eingesetzt werden. Durch Kombination mit Lewis-Säuren wie  $\text{Ti}(\text{OPr}^i)_4$  oder  $\text{MgCl}_2$  können auch säurelabile Carbonylverbindungen selektiv umgesetzt werden.

Weitere Hydridreagenzien, die zur reduktiven Aminierung verwendet wurden, sind  $\text{Zn}(\text{BH}_3\text{CN})_2$ <sup>[273]</sup>,  $\text{R}_4\text{N}(\text{CNBH}_3)$ <sup>[274]</sup>,  $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ <sup>[275]</sup>,  $\text{Pyridin BH}_3$ <sup>[276]</sup>,  $\text{NaBH}_4/\text{NH}_3$ <sup>[277]</sup> und Natriumtriacetoxyborhydrid  $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ <sup>[266]</sup>.

### 4.1.2 Amidbindungsbildung durch Carbodiimide und PyBOP

Die (formale) Verknüpfung einer Carbonsäure mit einem Amin zu einem (Carbonsäure-)Amid gehört zu den biochemisch bedeutendsten Reaktionen. Alle  $\alpha$ -Aminosäuren, Grundbausteine der Proteine, enthalten sowohl Carbonsäure- als auch Aminfunktionen. Durch Amidbindungen werden die  $\alpha$ -Aminosäuren miteinander verknüpft, wodurch die Primärstruktur eines Proteins festgelegt wird. Die Reaktion zwischen einer Carbonsäure und einem Amin verläuft nicht spontan, sondern erfordert im allgemeinen die Aktivierung der Carbonsäurekomponente.<sup>[278, 279]</sup>

Im Rahmen der Proteinbiosynthese geschieht dies durch die Beladung der tRNA mit ihrer freien Aminosäure katalysiert durch Aminoacyl-tRNA-Synthetasen unter Aufwendung von ATP.<sup>[280]</sup> In der gebildeten Aminoacyl-tRNA ist die Carbonsäurefunktion der  $\alpha$ -Aminosäure mit der 3'-Hydroxygruppe der tRNA verestert und somit aktiviert. Durch den nukleophilen Angriff der freien Aminogruppe der wachsenden Peptidkette an den Carbonylkohlenstoff erfolgt am Ribosom schließlich die Ausbildung der Peptidbindung (Amidbindung).

Auf Grund der Bedeutung der Peptide und Proteine sind zahlreiche chemische Methoden zur Ausbildung von Amidbindungen entwickelt worden, die zur Grundlage der automatisierten Peptidsynthese wurden. Ein wichtiges und häufig genutztes Verfahren beruht auf der Aktivierung der Carbonsäurefunktion durch Carbodiimide (vgl. Abbildung 44).

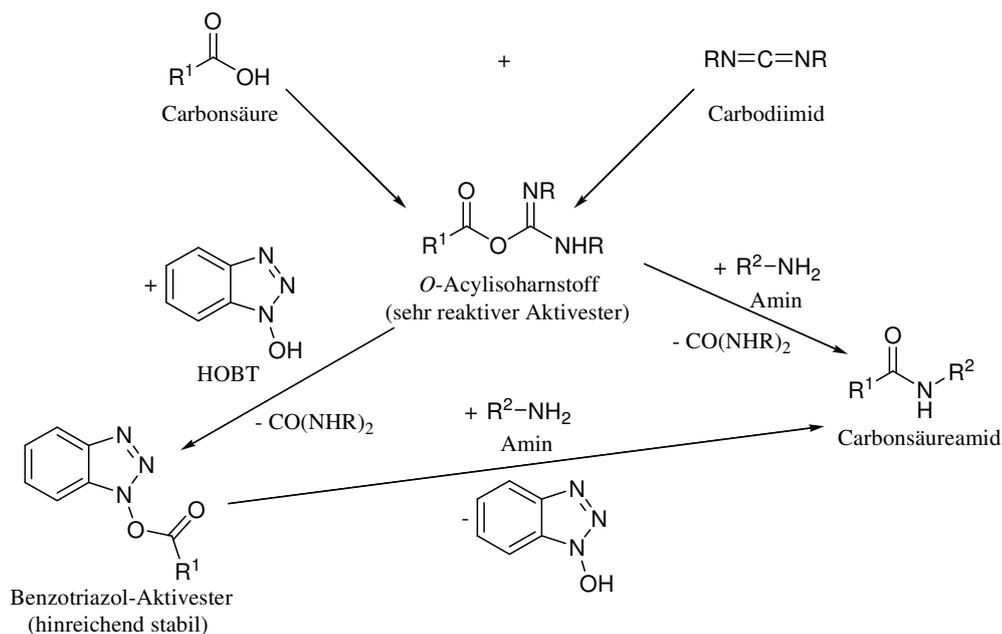
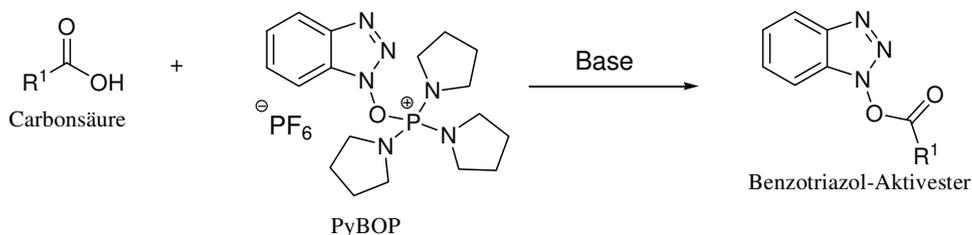


Abbildung 44: Mechanismus der Bildung von Carbonsäureamiden mit Hilfe von Carbodiimid.

Dabei reagiert die Carbonsäurekomponente zunächst mit dem Carbodiimid zu einem *O*-Acylisoharnstoffderivat, das auch als Aktivester bezeichnet wird. Dieses kann nun durch die Aminkomponente nukleophil angegriffen werden, wodurch die Amidbindung unter Freisetzung eines energiearmen Harnstoffderivates gebildet wird (Abbildung 44, rechts). Als Carbodiimid wird klassisch Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in organischen Lösungsmitteln verwendet, in Wasser kann das dort lösliche *N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC)<sup>[281]</sup> eingesetzt werden. Letzteres wurde in dieser Arbeit verwendet. Die als Zwischenprodukt gebildeten *O*-Acylharnstoffderivate sind sehr reaktiv; sie lagern sich leicht zu unreaktiven Produkten um und neigen zudem zur Racemisierung unter Verlust der Chiralitätsinformation der  $\alpha$ -Aminosäure. Um diese Probleme zu vermeiden, werden in der Regel aromatische Hydroxylamin-Derivate (*N*-Hydroxybenzotriazole) als Kupplungsreagenz zugegeben, wie z.B. Hydroxybenzotriazol (HOBT, Abbildung 44, links).<sup>[282]</sup> Sie fangen den zuerst gebildeten sehr reaktiven Aktivester ab und bilden ihrerseits stabilere Aktivesterderivate. Diese können dann entweder isoliert werden oder aber mit dem gewünschten Amin *in situ* zur Reaktion gebracht werden. Je nach Schwierigkeit der durchzuführenden Kupplungsreaktion (sterischer Anspruch der Reaktanden, Racemisierungstendenz der Carbonsäurekomponente) ist ein ganzes Arsenal von Kupplungsreagenzien mit abgestufter Reaktivität entwickelt worden.<sup>[282, 283]</sup>

Die als Zwischenprodukt auf diesem Weg gebildeten stabilen Aktivester können jedoch auch auf direktem Wege ohne Carbodiimid und *O*-Acylisoharnstoff erhalten werden (vgl. Abbildung 45).



**Abbildung 45:** Bildung von Aktivestern mit Hilfe des Kupplungsreagenzes PyBOP.

Dazu wird die Carbonsäurekomponente in Gegenwart einer Base mit Aminium-, Uronium -oder Phosphonium-Salzen des Kupplungsreagenzes umgesetzt. Zur letzten Gruppe gehört u. a. das (Benzotriazol-1-yloxy)-tripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat (PyBOP)<sup>[284]</sup>, das in dieser Arbeit verwendet wurde. Neben den genannten salzartigen Kupplungsreagenzien werden auch organische Phosphorsäureester der Benzotriazolderivate eingesetzt. Alle Kupplungsreaktionen mit den genannten Reagenzien müssen unter striktem Feuchtigkeitsausschluss erfolgen.

### 4.1.3 Standardprotokoll zur Darstellung von Kohlenhydrat-

#### Arrays durch reduktive Aminierung (SP 1)

- (1) Herstellung einer Verdünnungsreihe des zu immobilisierenden Kohlenhydrates  
Ausgehend von einer wässrigen Stammlösung wurde eine Verdünnungsreihe des zu immobilisierenden Kohlenhydrates in einer wässrigen 0.1 M MES-Pufferlösung hergestellt. MES (2-(*N*-Morpholino)ethansulfonsäure) puffert die Lösungen bei einem nahezu neutralen pH-Wert von 6.5, bei dem die Iminbildung als erster Schritt der reduktiven Aminierung begünstigt ist. Es wurden in der Regel Lösungen mit Konzentrationen im Bereich von  $10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> bis  $10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup> dargestellt, wobei jeweils um einen Faktor 10 verdünnt wurde.
- (2) Reinigung des funktionalisierten Objektträgers  
Aldehyd- bzw. aminfunktionalisierte Glasträger wurden von der Firma *Genetix* bezogen. Unmittelbar vor dem Gebrauch wurden sie durch Eintauchen in Aceton gereinigt bzw. entfettet und im Luftstrom getrocknet.
- (3) Auftragen der Kohlenhydratlösungen auf einen funktionalisierten Objektträger  
Die in Schritt (1) erhaltenen Lösungen wurden tropfenweise in Volumina von 5 µl oder 10 µl mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette auf einen funktionalisierten Glasträger aufgetragen. Durch die hydrophobe Oberfläche des aldehyd- bzw. aminderivatisierten Objektträgers wurden einzelne Flüssigkeitstropfen (Spots) erhalten, die in einem Volumen von wenigen Mikrolitern nicht „ineinander laufen“.
- (4) Auftragen der Natriumcyanoborhydridlösung auf die Kohlenhydrattropfen  
Wässrige Natriumcyanoborhydrid-Lösung (10 mg mL<sup>-1</sup>) wurde jeweils im selben Volumen auf die in Schritt (2) erhaltenen Spots mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette aufgebracht. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurden die Tropfen anschließend homogenisiert.
- (5) Reaktion in einer Feuchtekammer über Nacht  
Der auf diese Weise präparierte Objektträger wurde in eine Feuchtekammer gelegt und dort während einer Reaktionszeit von 12 bis 16 Stunden über Nacht bei Raumtemperatur gelagert.
- (6) Entfernung der überstehenden Reaktionslösung  
Die überstehende Reaktionslösung wurde durch Absaugen von der Objektträgeroberfläche entfernt. Dies geschah mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe, an deren Plastikschauchende eine Pipettenspitze angebracht war.

### (7) Waschen des Objektträgers

Der Objektträger wurde für einige Minuten in eine 0.1% SDS-Waschlösung getaucht, um Reste der Reaktionslösung zu entfernen. Teilweise erfolgte auch eine Behandlung für 30 Sekunden in SDS-Lösung im Ultraschallbad.

### (8) Trocknen des Objektträgers

Der feuchte Objektträger wurde vorsichtig mit Hilfe eines sauberen Zellstofftuches getrocknet.

### (9) Messung der Fluoreszenzintensitäten und deren Auswertung

Anhand dieses Standardprotokolls wurden die Array-Experimente zur Untersuchung der Immobilisierung durch reduktive Aminierung durchgeführt. Es orientiert sich an einem Protokoll von *Zammatteo et al.*, das zur Immobilisierung von aminderivatisierten Oligonukleotiden auf aldehydderivatisierten Glasträgern entwickelt worden ist.<sup>[208]</sup> Entscheidende Abweichungen von diesem Standardprotokoll werden bei der Diskussion der einzelnen Experimente in den Abschnitten 4.2 und 4.3 besprochen.

## 4.1.4 Verwendung von Silikonmasken

Im Laufe der Durchführung und Auswertung der Array-Experimente stellte sich ein wesentliches Problem heraus. Es gelang nicht mit Hilfe einer geeichten Pipette exakt gleichförmige Flüssigkeitstropfen mit einem Volumen von 5  $\mu$ l oder 10  $\mu$ l auf einem entfetteten derivatisierten Glasträger aufzubringen (SP 1, Schritt 3). Die Spots unterschieden sich bei gleichen Volumina geringfügig in der Größe der durch sie benetzten Oberfläche und folglich auch in ihrer maximalen Tropfenhöhe. Infolgedessen trat bei der Reaktion in der Feuchtekammer über Nacht (Schritt 5) eine ungleichmäßige Verdampfung der Reaktionslösung auf. In manchen Fällen war die Reaktionslösung sogar vollständig abgedampft. Dies führte einerseits zu inhomogeneren Verteilungen der gemessenen Fluoreszenzintensitäten innerhalb eines Spots und andererseits zu einer sehr schlechten Reproduzierbarkeit der Messergebnisse.

Um diese Probleme zu umgehen, wurden Silikonmasken eingesetzt, die für die Immobilisierungsreaktion mehrere abgeschlossene Reaktionskammern auf einem Objektträger bereitstellen. Von *K. Drexler* aus der Arbeitsgruppe Steiner wurde eine Halterung entwickelt, bei der eine Silikonmaske mit mehreren Löchern durch zwei Metallplatten fest auf einem Objektträger befestigt werden kann.<sup>[285]</sup> Die beiden Metallplatten lassen sich mit Hilfe von Fixierschrauben so aneinanderdrücken, dass die dazwischenliegende Silikonmaske fest auf den

Objektträger gepresst wird. Die obere der beiden Metallplatten besitzt Öffnungen an denselben Stellen wie die darunterliegende Maske, so dass sich durch diese die einzelnen Reaktionskavitäten mit der zu immobilisierenden Lösung befüllen lassen. Die Verbindung zwischen Silikon und Glas ist dicht genug, um ein Eindringen der Lösung unter die Maske bzw. in andere Reaktionskammern zu verhindern. Für die Versuche im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Masken dieser Art verwendet. Diese besaßen entweder 6 Reaktionskammern mit einem Volumen von jeweils 25 µl oder 24 Reaktionskammern mit einem Volumen von jeweils 6 µl. Nach dem Befüllen mit der Reaktionslösung (Schritt 3 und 4) wurden alle Reaktionskammern durch einen zweiten nicht-funktionalisierten Objektträger abgedeckt und der gesamte Aufbau zur Reaktion in eine Feuchtekammer gelegt (Schritt 5). Nach der Reaktion wurde der zweite Objektträger abgenommen, die überstehende Lösung aus den einzelnen Reaktionskammern abgesaugt (Schritt 6) und die Silikonmaske wieder entfernt. Die übrigen Schritte entsprachen wieder dem Standardprotokoll.

Durch die Verwendung dieses Maskensystems konnte die (ungleichmäßige) Verdampfung der Reaktionslösung zwar vermieden und dadurch die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse verbessert werden, aber es erwies sich andererseits auch als umständlich in der Handhabung. Zudem konnten immer nur Immobilisierungen auf einem Objektträger gleichzeitig getestet werden, da nur ein Halterungssystem zur Verfügung stand.

Aus diesem Grund wurden schließlich kommerziell erhältliche Silikonmasken der Firma *Schleicher & Schuell* verwendet („press-to-seal silicon isolators“). Diese sind auf einer Seite mit einer Klebefläche versehen und lassen sich damit fest auf einer entfetteten Glasoberfläche ankleben. Es wurden Masken mit 6 Reaktionskammern und einem Reaktionsvolumen von jeweils 25 µl oder mit 24 Reaktionskammern mit einem Volumen von jeweils 6 µl verwendet. Die Arbeitsschritte entsprachen den bei den nicht-klebenden Silikonmasken beschriebenen; allerdings musste vor dem Entfernen der Maske ein weiterer Arbeitsschritt eingefügt werden. Der Objektträger wurde mit Maske 30 Sekunden lang in 0.1% SDS-Lösung im Ultraschallbad gewaschen. Nur mit dieser Vorbehandlung ließ sich die Silikonmaske mit ihrer gesamten Klebeschicht auf einmal vom Objektträger ablösen. Eine Wiederverwendung einmal gebrauchter Masken war nicht mehr möglich.

Die Untersuchungen zur Immobilisierung von Kohlenhydraten mittels Amidbindung wurden in DMF, d.h. einem organischen hydrophoben Lösungsmittel durchgeführt (vgl. Abschnitt 4.1.2). Diese Versuche konnten nur unter Verwendung von Silikonmasken durchgeführt werden, da das Aufbringen von definierten Flüssigkeitstropfen hydrophober Lösungen auf den gleichfalls hydrophoben derivatisierten Glasträgern nicht möglich war.

### 4.1.5 Standardprotokoll zur Untersuchung von Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkungen (SP 2)

(1) Darstellung der Lektin-Hybridisierungslösung

PBS-Puffer wurde mit 1 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung, 1 M  $\text{MnCl}_2$ -Lösung und Tween 20 Detergens versetzt, so dass eine Gesamtkonzentration an  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mn}^{2+}$  von  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  bzw. an Tween 20 von 0,1% erreicht wurde. Anschließend wurde der pH-Wert des Puffers mit 1M HCl- bzw. 1M NaOH-Lösung auf einen Wert von 7.4 bis 7.5 eingestellt. Mit dieser Hybridisierungspufferlösung wurde eine Stammlösung des rhodaminmarkierten Lektins ( $c = 2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), das von der Firma *Vector Laboratories* bezogen wurde, auf eine Konzentration von  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  verdünnt.

(2) Hybridisierung des Kohlenhydrat-Arrays

In eine Plastik-Reaktionskammer wurden 50 ml der Lektin-Hybridisierungslösung gegeben. Der Kohlenhydrat-derivatisierte Glasträger wurde anschließend vollständig in die Lösung eingetaucht und die gesamte Hybridisierungskammer eine Stunde lang vorsichtig auf einem Schüttler geschwenkt.

(3) Waschen des Objektträgers

Der Objektträger wurde in einer Waschkammer mit Hybridisierungspufferlösung (ohne Lektin) 30 Minuten lang vorsichtig auf einem Schüttler geschwenkt. Anschließend wurde er kurz in destilliertes Wasser getaucht.

(4) Trocknen des Objektträgers

Der feuchte Objektträger wurde vorsichtig mit Hilfe eines sauberen Zellstofftuches getrocknet.

(5) Messung der Fluoreszenzintensitäten und deren Auswertung

Dieses Standardprotokoll orientiert sich an einem Hybridisierungsprotokoll von *Park* und *Shin*, der ersten Veröffentlichung zum Thema Kohlenhydrat-Arrays aus dem Jahre 2002.<sup>[127]</sup> Entscheidende Abweichungen von diesem Standardprotokoll werden bei der Diskussion der einzelnen Experimente in Abschnitt 4.3 besprochen.

### 4.1.6 Quantitative Auswertung der Fluoreszenzmessungen

Zur quantitativen Diskussion der Messergebnisse ist die dimensionslose Größe „Fluoreszenzintensität“ (FI) notwendig, die folgendermaßen bestimmt wurde:

Die Software des ELISA-Plattenreaders gab für jeden gemessenen Spot direkt eine Fluoreszenzintensität  $I_{SP}$  aus. Durch Messung eines Kontrollspots ohne Substanz wurde ein Wert für die Fluoreszenzintensität des Hintergrundes  $I_H$  bestimmt. Dieser Wert wurde für jeden Spot von der gemessenen Fluoreszenzintensität subtrahiert:  $FI = I_{SP} - I_H$ .

Die Messung mit dem Fluoreszenzmikroskop ergab Fluoreszenzbilder für jeden einzelnen Spot mit einer Helligkeitsauflösung auf einer 8-bit Graustufenskala (entsprechend  $2^8 = 256$  Graustufen). Diese Bilder wurden mit dem Programm *Adobe Photoshop 6.0* ausgewertet.

Die Messung mit dem Array-Scanner ergab ein Fluoreszenzbild für den gesamten Objektträger auf einer 16-bit Graustufenskala (entsprechend  $2^{16} = 65536$  Graustufen). Diese Bilder wurden mit der zum Array-Scanner zugehörigen Software *GenePix Pro 4.1* ausgewertet.

Dabei wurde für jeden Spot der Medianwert der Fluoreszenzintensitäten innerhalb eines Spots ( $I_{SP}$ ) bestimmt. Weiterhin wurde der Medianwert der Fluoreszenzintensität eines Kontrollspots ohne Substanz als Wert für die Hintergrundfluoreszenz ( $I_H$ ) bestimmt. Alternativ wurde  $I_H$  ermittelt, indem der Medianwert der Fluoreszenzintensität einer Fläche zwischen verschiedenen Spots bestimmt wurde. Die Fluoreszenzintensität FI wurde wiederum für jeden Spot durch Subtraktion erhalten:  $FI = I_{SP} - I_H$ .

Als Kriterium für das Vorhandensein eines Spots bei schwachen Fluoreszenzintensitäten wurde die Beziehung  $I_{SP} > 2I_H$  vorausgesetzt.

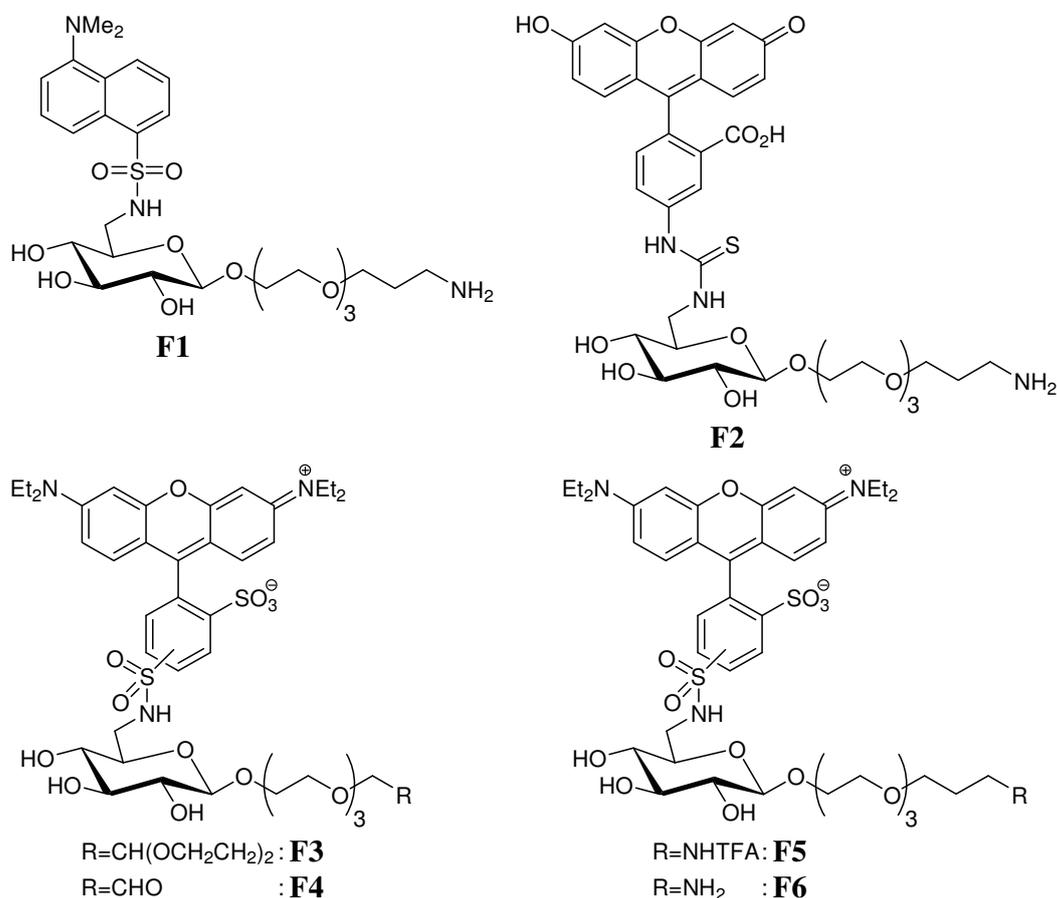
Wurden  $n$  gleichartig präparierte Spots vermessen (z.B. zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit) so wurde zunächst für jeden einzelnen Spot eine Fluoreszenzintensität  $FI_n$  auf die beschriebene Art bestimmt. Aus den einzelnen Fluoreszenzintensitäten  $FI_n$  wurde dann das arithmetische Mittel FI gebildet.

Zur quantitativen Auswertung wurden die Fluoreszenzbilder ohne Filterung oder Veränderung der Helligkeit oder des Kontrastes herangezogen. Fluoreszenzbilder, die in diesem Kapitel abgebildet sind, wurden dagegen teilweise in ihrer Helligkeit oder ihrem Kontrast verändert.

## 4.2 Untersuchungen zur Immobilisierung von Kohlenhydraten auf funktionalisierten Glaträgern

### 4.2.1 Fluoreszenzmarkierte Kohlenhydrate

Zur Untersuchung der reduktiven Aminierung als Immobilisierungsmethode für amino- bzw. aldehydfunktionalisierte Kohlenhydratderivate auf Glaträgern wurden die fluoreszenzmarkierten Verbindungen **F1 – F6** eingesetzt (vgl. Abbildung 46). Diese Verbindungen wurden von *M. B. Biskup* im Rahmen seiner Dissertation in unserer Arbeitsgruppe synthetisiert.<sup>[214]</sup>



**Abbildung 46:** Fluoreszenzmarkierte Kohlenhydrate zur Untersuchung der Immobilisierung auf Glaträgern.

Alle Verbindungen weisen dieselben Strukturmerkmale auf:

- 1.) D-Glucose diente als einfaches Modellkohlenhydrat, an dessen 6-Position ein Fluoreszenzfarbstoff kovalent gebunden ist, entweder über eine Sulfonamid- oder eine Thioharnstoffgruppe.

- 2.) Eine Triethylglykoleinheit diente als Abstandhalter (Spacer) zwischen der Glucoseeinheit und der terminalen Amin- (**F1**, **F2** und **F6**) bzw. Aldehydgruppe (**F4**), die mit den entsprechend entgegengesetzten Gruppen auf der Glasoberfläche reagieren sollen. Als Kontrollsubstanzen wurden die Verbindungen **F3** und **F5** eingesetzt; sie waren in der Synthese die unmittelbaren Vorläufer der Verbindungen **F4** bzw. **F5** und sind selektiv an der Aldehyd- bzw. Aminfunktion geschützt. Damit war eine Reaktion durch reduktive Aminierung bei diesen Substanzen nicht möglich.

Die Auswahl der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe richtete sich einerseits nach ihrer kommerziellen Verfügbarkeit andererseits nach den vorhandenen Wellenlängenfiltern in den zur Messung benutzten Geräten. Die spektroskopischen Eigenschaften der drei verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Zum Vergleich sind auch die in der DNA-Array Technologie standardmäßig verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe Cy3 und Cy5 in die Tabelle aufgenommen.

Farbstoff	Extinktionsmaximum $\lambda_{\max}$	Fluoreszenzmaximum $\lambda_{\max}$
Dansylbutylamin	337 nm	496 nm (Dioxan)
( <i>N</i> -Butyl-5-dimethylamino-1-naphthalin-sulfonamid)		536 nm (MeOH) 557 nm (H <sub>2</sub> O)
Fluorescein (pH = 9)	490 nm	514 nm (DMF) 519 nm (H <sub>2</sub> O)
Lissamin (Sulforhodamin B Säurechlorid)	568 nm	583 nm (MeOH)
Cy3	550 nm	570 nm (H <sub>2</sub> O)
Cy5	650 nm	670 nm (H <sub>2</sub> O)

**Tabelle 8:** Spektroskopische Eigenschaften der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe.

Fluorescein bzw. seine Derivate zeigen nur in basischem Milieu die in Tabelle 8 angegebene langwellige Fluoreszenz. Im neutralen oder sauren pH-Bereich liegen diese Verbindungen in verschiedenen Protonierungsstufen **P2-P5** vor, die in kurzwelligeren Spektrenbereichen fluoreszieren (vgl. Abbildung 47).

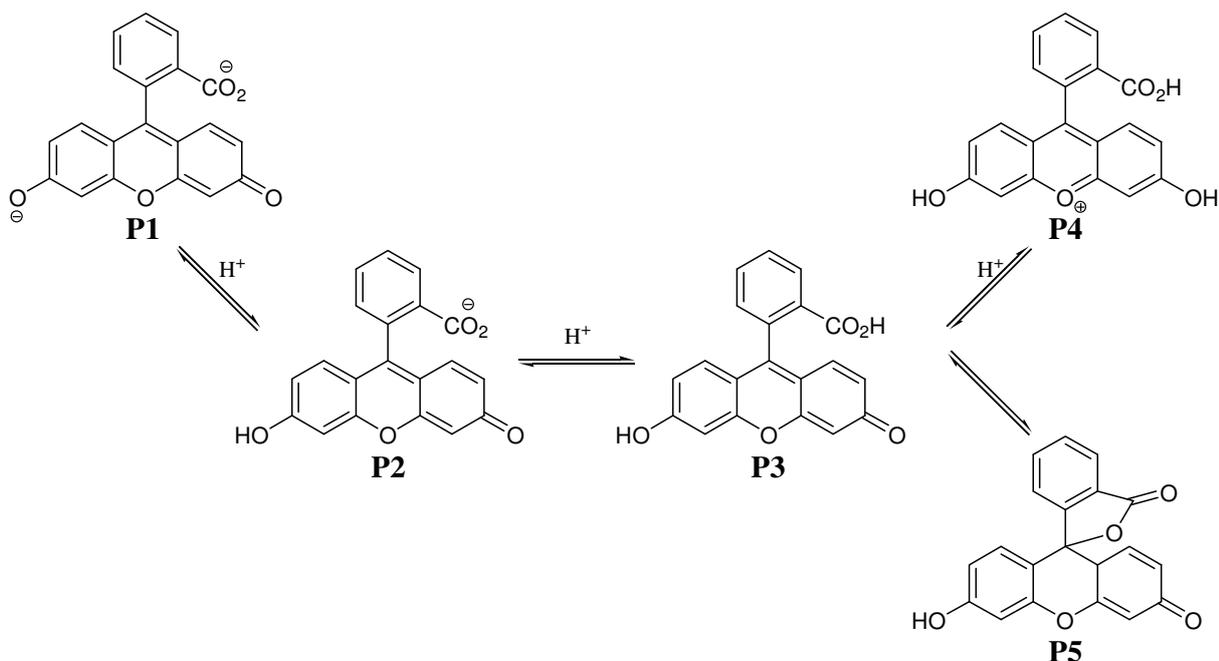


Abbildung 47: Verschiedene Protonierungsformen des Fluoresceins in Lösung in Abhängigkeit vom pH-Wert.

Verantwortlich für die langwellige Fluoreszenz im basischen Bereich ist die Dianionform **P1**, bei der ein durchgängiges  $\pi$ -Elektronensystem zwischen einer Donor- ( $-\text{O}^-$ ) und einer Akzeptor-Gruppe ( $=\text{O}$ )-vorliegt, wie es für Triarylmethanfarbstoffe bzw. allgemein für polymethinartige Farbstoffe charakteristisch ist.<sup>[286]</sup> Die höher protonierten Formen **P2-P4** zeigen dagegen deutlich niedrigere Fluoreszenzquantenausbeuten. Bei der Laktonform **P5** ist das  $\pi$ -Elektronensystem unterbrochen und Absorption bzw. Fluoreszenz treten nur im UV-Bereich auf. Diese Form liegt auch bei ungelöstem, kristallinem Fluorescein vor, weshalb seine langwellige Fluoreszenz nur in (basischer) Lösung gemessen werden kann.

## 4.2.2 Messungen mit dem ELISA-Plattenreader

Erste Messungen wurden mit dem Plattenreader *Wallac Victor*<sup>2</sup> 1420 der Firma *PerkinElmer* in der Arbeitsgruppe Wendel im Fachbereich Biologie durchgeführt. Dieses Gerät dient normalerweise zur Absorptions- oder Fluoreszenzmessung in Lösung, z.B. für ELISA oder ELLA-Messungen. Dazu werden ELISA-Platten mit in der Regel 96 oder 384 Vertiefungen (well plates) verwendet, in denen spektrometrische Nachweisreaktionen durchgeführt werden können. In eine Vertiefung werden wenige Mikroliter Analyt und Nachweisreagenz gegeben, die Reaktionslösungen in jeder Vertiefung können von dem Gerät einzeln spektroskopisch untersucht werden. Von *R. Weingart* aus unserer Arbeitsgruppe wurde eine Plastikschiene entwickelt, mit deren Hilfe Objektträger im Plattenreader vermessen werden können. Die

Schablone besitzt die normierten äußeren Abmessungen einer ELISA-Platte und in ihrer Mitte eine passende Einfassung für einen Objektträger. Das benutzte Gerät besitzt für Fluoreszenzmessungen verschiedene Filtersätze aus Anregungs- und Emissionsfiltern, so dass Dansyl-, Fluorescein- und Rhodaminverbindungen vermessen werden konnten. Der Strahlengang erfolgte bei der Fluoreszenzmessung „von oben“ d.h. der Anregungsstrahl trifft von oben auf den Objektträger und das Fluoreszenz-Emissionslicht wird gleichfalls oberhalb des Objektträgers detektiert.

### 4.2.2.1 Messungen von Flüssigkeitstropfen bzw. Messungen in Lösung

In einem ersten Vorversuch konnte sichergestellt werden, dass die verwendeten aldehyd- bzw. aminderivatisierten Glasträger bei verschiedenen Anregungsenergien und Filterkombinationen keine höhere Hintergrundfluoreszenz zeigten als nicht-funktionalisierte Objektträger.

In weiteren Vorversuchen wurde mit Hilfe von Fluoresceinlösungen in Wasser unter Zugabe von Kaliumtertbutanolat als Base Geräteparameter optimiert. Dazu wurden Verdünnungsreihen von  $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  bis  $10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$  hergestellt, wobei jeweils um einen Faktor 10 verdünnt wurde. Diese Lösungen wurden tropfenweise in Volumina von 5  $\mu\text{l}$  oder 10  $\mu\text{l}$  auf einen funktionalisierten Objektträger aufgetragen. Es wurden zunächst die Fokussierung des Strahlenganges und die Blendenform (Apertur) so optimiert, dass bei gleicher Farbstoffkonzentration der höchste Messwert erhalten wurde. Anschließend wurden die Anregungsenergie und die Messdauer unabhängig voneinander variiert. Dabei zeigte sich, dass bei höherer Anregungsenergie oder verlängerter Messdauer zwar absolut höhere Messwerte erhalten wurden, die Empfindlichkeit der Messung jedoch nicht verbessert wurde, da das Hintergrundfluoreszenzsignal in gleichem Maße zunahm.

Mit den optimierten Geräteparametern wurden folgende Ergebnisse erhalten:

- Die Nachweisgrenze lag bei einer Konzentration von ungefähr  $10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  und damit um eine Zehnerpotenz über den Angaben des Geräteherstellers für eine Messung in Lösung ( $10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ ).
- Im Konzentrationsbereich von  $10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  bis  $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  bei jeweils 10-facher Verdünnung von Spot zu Spot konnte eine Signalzunahme bei zunehmender Konzentration festgestellt werden. Diese verhielt sich aber über diesen großen Konzentrationsbereich nicht linear.
- In einem engeren Konzentrationsbereich von  $10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  bis  $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  bzw. von  $10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  bis  $10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  wurde ungefähr ein linearer Zusammenhang zwischen Signalintensität und aufgetragener Konzentration erhalten. Allerdings gab es bei allen

Messungen deutliche Ausreißerwerte und die Reproduzierbarkeit der absoluten Messwerte war kaum gegeben.

Eine Vergleichsmessung in Lösung (Konzentrationsreihe in einer ELISA-Platte) ergab, dass dort Linearität zwischen gemessenen Signalintensitäten und Konzentrationen weitgehend gegeben war, und sich die Messwerte zudem bei mehreren Messungen gut reproduzieren ließen.

Eine mögliche Erklärung für die Unterschiede im Vergleich beider Messverfahren könnte in den unterschiedlichen Flüssigkeitshöhen liegen:

Es gelang nicht mit Hilfe einer geeichten Eppendorf-Pipette exakt gleichförmige Flüssigkeitstropfen mit einem Volumen von 5  $\mu\text{l}$  oder 10  $\mu\text{l}$  auf einem derivatisierten Glaträger aufzubringen. Die Spots unterschieden sich bei gleichen Volumina in der Größe der durch sie benetzten Oberfläche und folglich auch in ihrer maximalen Tropfenhöhe. Dies kann bei einem fokussierten Strahlengang des Anregungslichtes zu Unterschieden in der Eindringtiefe des Lichtes und zu unterschiedlichen Reflexions- bzw. Streueffekten führen.

In der ELISA-Platte hingegen konnte bei gleichen Volumina in den gleichartig geformten Vertiefungen reproduzierbare Flüssigkeitshöhen erhalten werden.

### 4.2.2.2 Trockene Messungen

Da die Messung von Fluoreszenzintensitäten in Flüssigkeitstropfen mit Hilfe des Plattenreaders sich als nicht praktikabel erwies, wurden Versuche zur Messung in trockener Form durchgeführt. Diese erfolgten mit der dansylmarkierten Verbindung **F1** und der lissaminmarkierten Verbindung **F6** auf aldehydderivatisierten Glaträgern. Fluorescein bzw. die fluoresceinmarkierte Verbindung **F2** zeigen nur in Lösung eine langwellige Fluoreszenz (vgl. Abschnitt 4.2.1). Von den Verbindungen **F1** bzw. **F6** wurden wässrige Verdünnungsreihen im Konzentrationsbereich von  $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  bis  $10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$  hergestellt, wobei jeweils um einen Faktor 10 verdünnt wurde. Diese Lösungen wurden wiederum tropfenweise in Volumina von 2  $\mu\text{l}$  bis 5  $\mu\text{l}$  auf aldehydfunktionalisierte Objektträger aufgetragen. Die Messung erfolgte erst nachdem die Flüssigkeit vollständig verdampft war (bei Raumtemperatur nach einer Zeitspanne von wenigen Minuten). In keinem Fall konnten bei diesen Messungen Fluoreszenzintensitäten gemessen werden, die oberhalb der Hintergrundfluoreszenz lagen. Offensichtlich ist eine „trockene Messung“ mit diesem Gerät nicht möglich.

### 4.2.2.3 Fazit

Fluoreszenzmessungen ließen sich mit dem Plattenreader *Wallac Victor<sup>2</sup> 1420* nur in Lösung durchführen, nicht aber auf einer trockenen Objektträgeroberfläche. Reproduzierbare Messerergebnisse ließen sich nur bei Messung in einer ELISA-Platte erhalten. Für die Fluoreszenzmessung von Objektträgern wie sie im Rahmen dieser Arbeit erforderlich war, war dieses Gerät nicht geeignet.

### 4.2.3 Messungen mit dem Fluoreszenzmikroskop

In der Folge wurden die Messungen an einem Fluoreszenzmikroskop *Axioplan 2 imaging* der Firma *Zeiss* in der Arbeitsgruppe Stürmer im Fachbereich Biologie durchgeführt. Dieses Gerät dient normalerweise zur Abbildung fluoreszenzmarkierter Zellbestandteile. So lassen sich z.B. durch fluoreszenzmarkierte Antikörper, die gegen bestimmte Zellstrukturen gerichtet sind, letztere im Fluoreszenzmikroskop sichtbar machen.

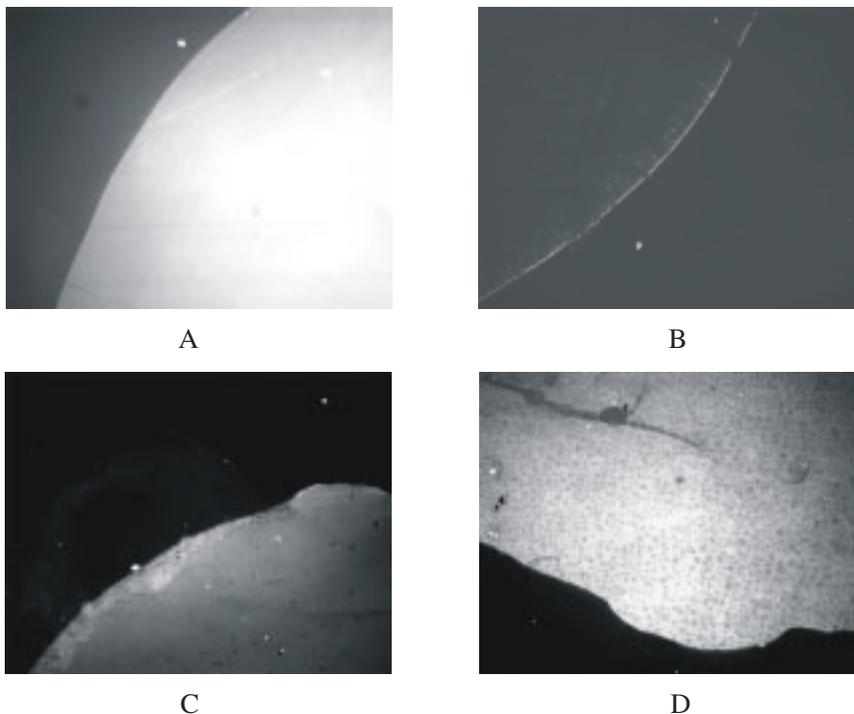
Das Mikroskop besitzt verschiedene Filtersätze aus Anregungs- und Emissionsfiltern, so dass zur Messung von Dansyl-, Fluorescein- und Rhodaminverbindungen jeweils passende Filterkombinationen vorhanden waren.

Wegen der Vergrößerungsoptik des Fluoreszenzmikroskops konnten jeweils nur kleinere Bereiche des Objektträgers vermessen werden, d.h. jeder Spot musste einzeln vom Objektiv angefahren und seine Fluoreszenzintensität separat gemessen werden.

Alle Messungen wurden mit der kleinstmöglichen 10-fachen optischen Vergrößerung durchgeführt, um ein möglichst lichtstarkes Bild zu erhalten. Die gemessene Fluoreszenzintensität war zudem von der Belichtungsdauer abhängig. Die Messungen von Spots auf einem Objektträger wurden deshalb mit gleicher, möglichst kurzer Belichtungszeit durchgeführt, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Bei längeren Belichtungszeiten traten deutliche Ausbleicheffekte auf, d.h. der Fluoreszenzfarbstoff wurde an den belichteten Stellen durch Photoreaktion zerstört.

Abbildung 48 zeigt beispielhaft einige Bilder, die mit dem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen wurden; dargestellt sind jeweils die Ränder der fluoreszierenden Spots. Die Bilder A und B zeigen Spots mit hoher bzw. niedriger Signalintensität. Bei hohen Intensitäten war die Helligkeitsverteilung innerhalb der Spotfläche nicht homogen (Bild A), da die Belichtung durch das Mikroskop in der Spotmitte maximal und zu den Spoträndern hin geringer war. Bei der quantitativen Auswertung wurde dieser Effekt durch die Bildung des Medianwertes

berücksichtigt. (vgl. Abschnitt 4.1.6). Die Bilder C und D zeigen inhomogene Spots mit Salzbildung entweder am Spotrand (Bild C) oder innerhalb der Spotfläche (Bild D). Diese Effekte traten auf, wenn während der Immobilisierungsreaktion merkliche Verdunstung der Reaktionslösung am Spotrand erfolgte (C) oder aber die Waschprozesse nach der Immobilisierungsreaktion nicht ausreichend lange durchgeführt wurden (D).



**Abbildung 48:** Aufnahmen von immobilisierten fluoreszenzmarkierten Kohlenhydraten mit dem Fluoreszenzmikroskop.

### 4.2.3.1 Messungen von versiegelten Spots

Die fluoresceinmarkierte Verbindung **F2** wurde auf aldehydderivatisierten Glaträgern nach dem Standardprotokoll I im Konzentrationsbereich von  $10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> bis  $10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> immobilisiert. Dabei wurden Volumina von 5 µl ohne Verwendung von Masken aufgetragen. Da Fluoresceinderivate nur in Lösung eine langwellige Fluoreszenz zeigen (vgl. Abschnitt 4.2.1) konnten die so präparierten Objektträger nicht trocken vermessen werden. Stattdessen wurden zwei Methoden ausprobiert, bei denen die zu vermessenden Spots mit einem dünnen Flüssigkeitsfilm überzogen und anschließend mit einem Deckglas versiegelt wurden:

#### (1) Versiegelung mit Mowiol

Jeder Spot wurde mit einem dünnen viskosen Flüssigkeitsfilm aus Mowiol bedeckt. Dieser wurde mit einem Deckglas fixiert und der ganze Objektträger wurde über Nacht im Kühlschrank gelagert. Mowiol ist ein viskoses Gemisch aus Polyvinylalkoholen verschiedener Polymerisationsgrade, das bei niedrigen Temperaturen amorph erstarrt und

dabei transparent bleibt. Es wird routinemäßig in der Mikroskopie zur Fixierung von Präparaten zwischen Objektträger und Deckglas eingesetzt.

### (2) Versiegelung mit Nagellack

Jeder Spot wurde mit einem dünnen Flüssigkeitsfilm einer 0.1 M Lösung von Natriumhydrogencarbonat in Wasser/Glycerin (2:1 v/v) bedeckt. Nach Fixierung mit einem Deckglas wurde dieses mit Nagellack versiegelt, d.h. die Deckglasränder wurden mit dem Objektträger verklebt.

Bei beiden Versiegelungsmethoden musste darauf geachtet werden, dass keine Luftbläschen zwischen Objektträger und Deckglas vorhanden waren.

Mit beiden Methoden wurden gleichartige Ergebnisse erhalten. Die untere Nachweisgrenze lag bei einer Konzentration von  $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ , und die Fluoreszenzintensität nahm im Konzentrationsbereich von  $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  bis  $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  zu. Im Vergleich der beiden Versiegelungsmethoden konnten bei Verwendung der Mowiol-Methode höhere Fluoreszenzintensitäten bei gleicher Konzentration beobachtet werden.

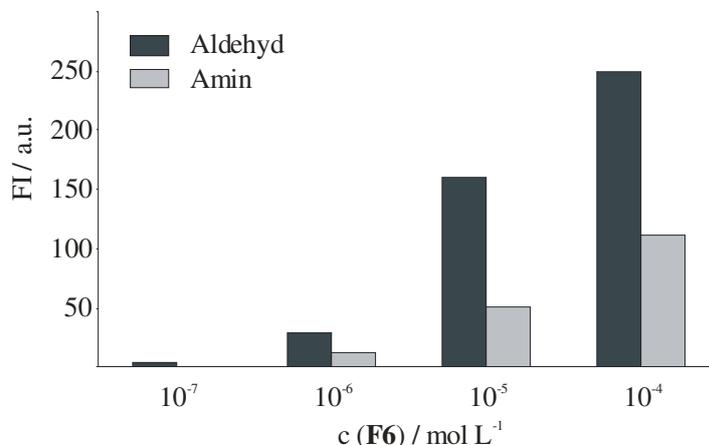
Zum Vergleich wurde Verbindung **F2** im selben Konzentrationsbereich auf aminderivatisierten Glasträgern aufgebracht und mit der Mowiol-Methode versiegelt. Bei dieser Immobilisierung wurde eine Aminverbindung auf eine Aminoberfläche aufgebracht, so dass eine kovalente Verknüpfung durch reduktive Aminierung nicht möglich war. Trotzdem konnten auch in diesem Experiment Fluoreszenzintensitäten ab einer aufgetragenen Konzentration von  $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  beobachtet werden. Diese nahmen im Konzentrationsbereich von  $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  bis  $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  gleichfalls zu. Allerdings war die gemessene Fluoreszenzintensität bei jeder aufgetragenen Konzentration im Falle des Aldehyd-Glasträgers (kovalente Bindung möglich) höher als beim Amin-Glasträger (keine kovalente Bindung möglich). Offensichtlich wird ein Teil der fluoreszenzmarkierten Kohlenhydrate auf der Oberfläche des Objektträgers unspezifisch adsorbiert und kann nicht mehr vollständig abgewaschen werden.

Weitere Messungen mit der Fluoresceinverbindung **F2** wurden nicht durchgeführt, da es inzwischen gelungen war, mit der Lissaminverbindung **F6** trockene Messungen durchzuführen. Damit konnte auf das aufwändige Versiegelungsverfahren verzichtet werden.

### 4.2.3.2 Trockene Messungen

Die dansylmarkierte Verbindung **F1** wurde auf aldehydderivatisierten Glasträgern nach dem Standardprotokoll 1 im Konzentrationsbereich von  $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  bis  $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  immobilisiert. Dabei konnte auch bei langen Belichtungszeiten bei keiner Konzentration eine Fluoreszenzintensität oberhalb des Hintergrundsignales detektiert werden.

Daraufhin wurde die lissaminmarkierte Verbindung **F6** sowohl auf aldehydfunktionalisierten als auch auf aminfunktionalisierten Glaträgern im Konzentrationsbereich von  $10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> bis  $10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> immobilisiert. Die Messergebnisse sind in Abbildung 49 dargestellt.



**Abbildung 49:** Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenzintensität der immobilisierten Verbindung **F6** auf Aldehyd- bzw. Aminoberfläche (Messwerte, Messung mit Fluoreszenzmikroskop).

Wie bei der Fluoresceinverbindung **F2** waren Signalintensitäten zu beobachten, die mit der Konzentration an aufgetragener Substanz zunahmen. Dies traf sowohl für die Aldehyd- als auch die Aminoberfläche zu, wobei bei jeder Konzentration das Fluoreszenzsignal auf dem Aldehydchip größer war. Auch die Lissamin-Verbindung **F6** schien in gewissem Maße unspezifisch (nicht-kovalent) auf der Chipoberfläche adsorbiert zu werden. Das Detektionslimit lag bei einer Konzentration von  $10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> und damit nochmals eine Größenordnung unterhalb des Wertes für die Fluoresceinverbindung **F2**.

Weitere Messungen mit dem Fluoreszenzmikroskop wurden nicht durchgeführt, da es inzwischen gelungen war, mit der Lissaminverbindung **F6** Messungen mit Hilfe eines DNA-Array-Scanners durchzuführen.

### 4.2.3.3 Fazit

Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes ließ sich die kovalente Immobilisierung der fluoreszenzmarkierten aminoterminalen Kohlenhydrate **F2** und **F6** durch reduktive Aminierung auf einem aldehydderivatisierten Glaträger nachweisen. Die fluoresceinmarkierte Verbindung **F2** musste dabei durch Versiegelung unter einem Deckglas für die Messung mit einem dünnen Flüssigkeitsfilm überzogen werden. Die lissaminmarkierte Verbindung **F6** konnte direkt auf einem trockenen Objektträger vermessen werden. Die untere Nachweisgrenze lag bei einer Konzentration von  $10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> (**F2**) bzw.  $10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> (**F6**), die gemessenen

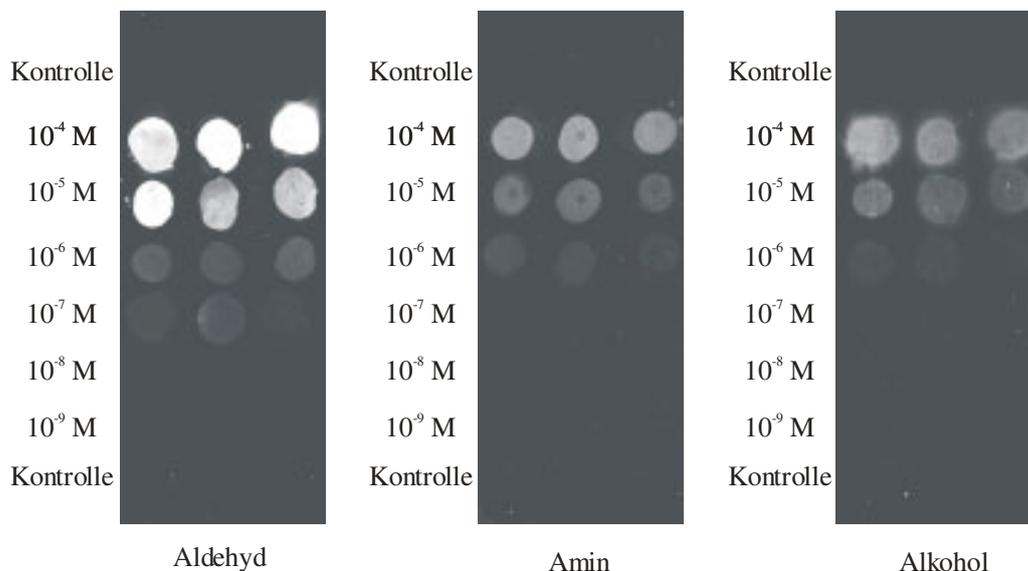
Fluoreszenzintensitäten nahmen bis zu einer Konzentration von  $10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> hin zu. Beide Verbindungen werden auf der Oberfläche des aldehydderivatisierten Glasträgers zu einem gewissen Teil auch unspezifisch (nicht-kovalent) adsorbiert, wie durch Vergleichsmessungen auf aminderivatisierten Glasträgern gezeigt werden konnte.

### 4.2.4 Messungen mit dem Array-Scanner

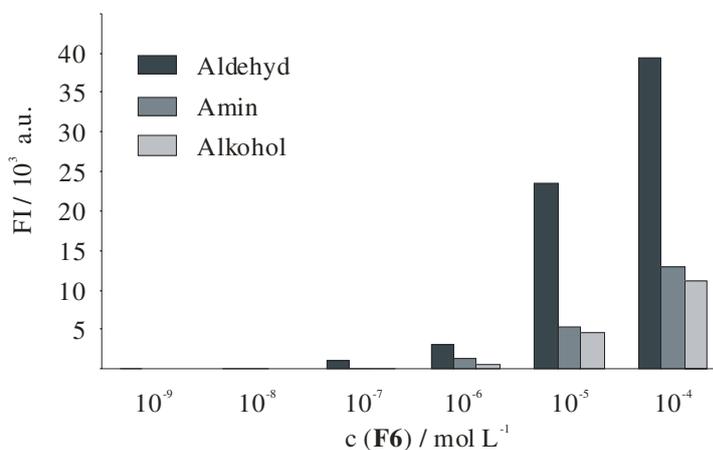
Letztlich wurden die Messungen an einem DNA-Array-Scanner *GenePix Personal 4100A* der Firma *Axon Instruments* in der Arbeitsgruppe Meyer im Fachbereich Biologie durchgeführt. Dieses Gerät ist für die Messung von trockenen Glasträgern (DNA-Chips) ausgelegt. Es besitzt zwei Filtersätze zur Messung der Fluoreszenzfarbstoffe Cy3 und Cy5, die routinemäßig in der DNA-Chiptechnologie verwendet werden. Mit dem Filtersatz für Cy3 können auch rhodaminartige Fluoreszenzfarbstoffe wie Lissamin vermessen werden (vgl. Tabelle 8, Abschnitt 4.2.1). Die Messung ergibt ein Fluoreszenzbild für den gesamten Objektträger auf einer 16-bit Graustufenskala (entsprechend  $2^{16} = 65536$  Graustufen). Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten sind von der Empfindlichkeit des Photomultiplier-Detektors abhängig. Ein präparierter Objektträger wurde in der Regel bei verschiedenen Detektorempfindlichkeiten vermessen. Die quantitative Auswertung erfolgte dann bei einer Empfindlichkeit, bei der bei den höchsten Signalintensitäten der Sättigungswert von 65536 gerade oder gerade noch nicht erreicht wurde. Sollten verschiedene Reaktionsbedingungen zur Immobilisierung oder Hybridisierung direkt miteinander verglichen werden oder wurde ein Objektträger nach verschiedenen Behandlungen (z. B. bei sukzessiven Waschprozessen) mehrmals vermessen, so geschah dies in jedem Fall mit derselben Detektorempfindlichkeit.

#### 4.2.4.1 Untersuchungen zur Kovalenz der Immobilisierung

Zunächst wurde der Versuch zur Immobilisierung der lissaminmarkierten Verbindung **F6** auf verschiedenen Oberflächen mit dem DNA-Array-Scanner wiederholt. Die Immobilisierung erfolgte auf einer Aldehydoberfläche, einer Aminoberfläche und einer Hydroxyoberfläche durch reduktive Aminierung. Die letztgenannte Funktionalität wurde erhalten, indem ein aldehydderivatisierter Glasträger in einer wässrigen Lösung von Natriumborhydrid ( $2.5$  mg mL<sup>-1</sup>) über Nacht reduziert wurde. Die gemessenen Chipbilder sind in Abbildung 50 zu sehen, wo in jeder Reihe eines Chipbildes drei identisch präparierte Spots einer Konzentration (Replikate) aufgetragen wurden. Die zugehörige quantitative Auswertung ist in Abbildung 51 gezeigt.



**Abbildung 50:** Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenzintensität der immobilisierten Verbindung **F6** auf Aldehyd-, Amin- und Hydroxyoberflächen (Aufnahmen mit Array-Scanner).



**Abbildung 51:** Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenzintensität der immobilisierten Verbindung **F6** auf Aldehyd-, Amin- und Hydroxyoberflächen (Messwerte).

Die Ergebnisse entsprechen denjenigen, die bei der Messung mit dem Fluoreszenzmikroskop erhalten wurden. Die untere Nachweisgrenze der Immobilisierung auf dem aldehydderivatisierten Glsträger konnte dank der höheren Messempfindlichkeit des Array-Scanners auf eine Konzentration von  $10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  abgesenkt werden. Das Ausmaß der unspezifischen (nicht-kovalenten) Immobilisierung war für die Amin- oder Hydroxyoberfläche ungefähr gleich groß. Sie führte zu deutlich geringeren Signalintensitäten als bei der Bindung auf der Aldehydoberfläche, wo eine kovalente Verknüpfung durch reduktive Aminierung möglich war. Die Signalintensität wies bei gleicher Konzentration zum Teil erhebliche Schwankungen (bis zu 50%) auf, d.h. die Reproduzierbarkeit der absoluten Fluoreszenzwerte unter sonst gleichen Bedingungen gelang nur bedingt. Dies war teilweise auf die unterschiedlich starke

Verdunstung der Reaktionslösungen der einzelnen Spots während der Immobilisierungsreaktion zurückzuführen.

Um das Ausmaß der unspezifischen Adsorption auf der Chipoberfläche zu verringern, wurden verschiedene Waschprozesse nach der Immobilisierungsreaktion ausprobiert (SP 1, Schritt 7).

Folgende Maßnahmen wurden untersucht:

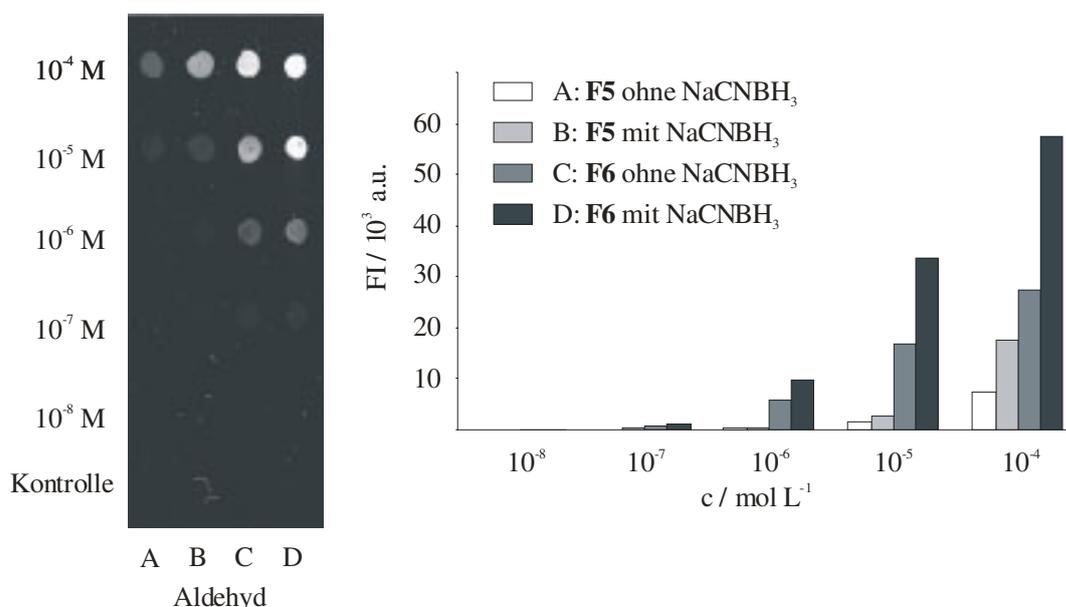
- Verlängerung der Waschdauer mit 0.1% SDS-Lösung (10 min bis 2 h)
- Behandlung im Ultraschallbad (0.1% SDS-Lösung, 10 min bis 30 min)
- Waschen mit Natriumchlorid/Zitronensäure ( $\text{pH} \approx 3$ , 10 min bis 30 min)
- Behandlung in siedendem Wasser (10 min)

In keinem Fall konnte eine Abnahme der gemessenen Fluoreszenzintensität nach dem entsprechenden Waschprozess beobachtet werden. Dies galt sowohl für die Immobilisierung auf der Aldehyd- als auch auf der Aminoberfläche. Offensichtlich war die unspezifische Adsorption der fluoreszenzmarkierten Verbindungen oder zumindest ihrer Farbstoffe auf der Chipoberfläche selbst unter drastischen Waschbedingungen irreversibel.

Eine deutliche Verbesserung der Reproduzierbarkeit der Messergebnisse konnte durch Verwendung von Silikonmasken erreicht werden (vgl. Abschnitt 4.1.4). Alle folgenden in diesem Abschnitt gezeigten Versuche sind mit Hilfe von Silikonmasken durchgeführt worden.

Außerdem zeigte sich, dass die Arbeitsschritte 3 und 4 aus dem SP 1 ohne Qualitätsverlust kombiniert werden konnten: In der Folge wurden die Kohlenhydratlösung und die Reduktionslösung in einer Eppendorf-Pipette vorgemischt bevor die so erhaltenen Reaktionslösung auf den Glasträger aufgetragen wurde; dadurch entfiel der umständliche Schritt des Mischens der beiden Lösungen auf dem Glasträger durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren. Wie bereits in Abschnitt 4.1.1 dargelegt werden Aldehyde unter neutralen Bedingungen nur sehr langsam von Natriumcyanoborhydrid reduziert, während Iminiumionen schnell reagieren.

In weiteren Experimenten wurde die Kovalenz der Immobilisierung durch reduktive Aminierung unter Verwendung von Verbindung **F5** getestet. So wurde das freie Amin **F6** und die *N*-Trifluoracetylgeschützte Vorstufe **F5** im Konzentrationsbereich von  $10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  bis  $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  auf einem aldehydderivatisierten Objektträger immobilisiert (vgl. Abbildung 52). Dabei wurden teilweise nach dem Standardprotokoll 1 mit dem Reduktionsmittel Natriumcyanoborhydrid behandelt (Spur B und D), teilweise wurde dieses durch eine entsprechende Menge an Pufferlösung ersetzt (Spur A und C).

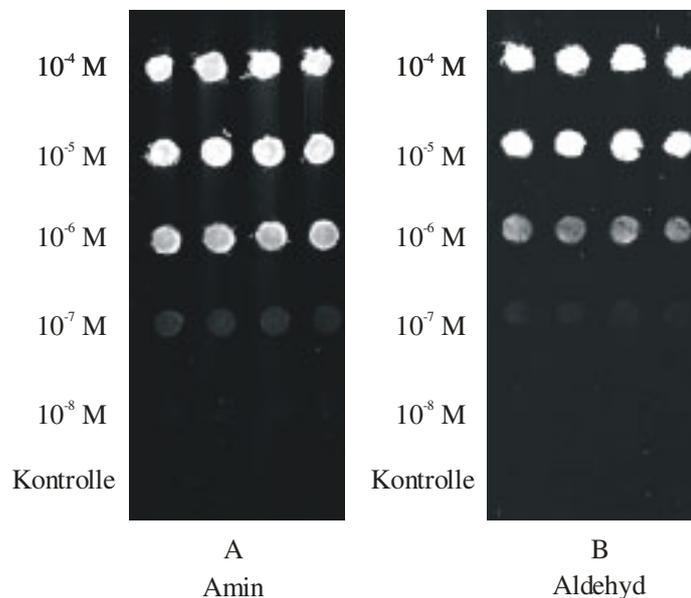


**Abbildung 52:** Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenzintensität der immobilisierten Verbindungen **F5** und **F6** auf einer Aldehydoberfläche; Immobilisierung mit und ohne Verwendung des Reduktionsmittels NaCNBH<sub>3</sub> (links: Aufnahmen mit Array-Scanner, rechts: Messwerte).

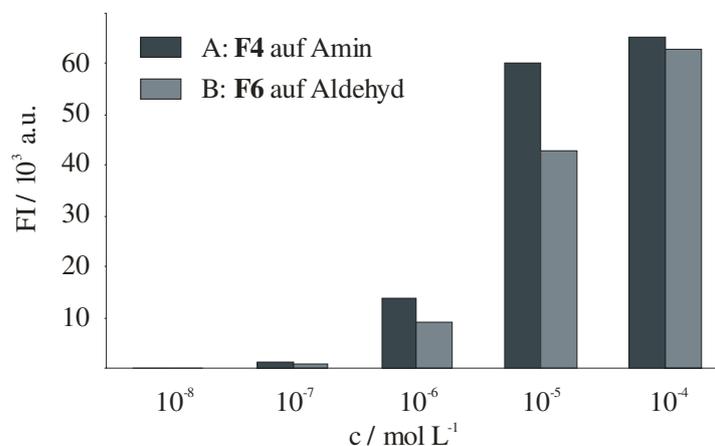
Die höchsten Fluoreszenzintensitäten konnten bei der kovalenten Verknüpfung der Aminverbindung **F6** mit dem Reduktionsmittel beobachtet werden (Spur D). Nur unter diesen Bedingungen ist die reduktive Aminierung möglich, es bildet sich eine stabile Aminbindung zwischen dem markierten Kohlenhydrat und der Chipoberfläche aus. Wird das Reduktionsmittel weggelassen (Spur C), ist eine kovalente Immobilisierung durch Ausbildung einer Schiffschen Base immer noch möglich; die Bindungsbildung ist jedoch ohne Reduktion reversibel, da die Iminofunktion durch Wasser wieder angegriffen werden und das markierte Kohlenhydrat auf diese Weise wieder abgespalten werden kann. Entsprechend geringer waren die gemessenen Signalintensitäten in diesem Fall. Bei Verwendung der geschützten Verbindung **F5** ist die Ausbildung einer kovalenten Bindung nicht möglich unabhängig von der Verwendung des Reduktionsmittels. Erwartungsgemäß waren die beobachteten Fluoreszenzintensitäten geringer (Spur A und Spur B). Überraschenderweise wurden jedoch auch in diesem Fall leicht höhere Intensitäten gemessen, wenn das Reduktionsmittel zugegen war. Möglicherweise sorgte es für eine teilweise Abspaltung der Trifluoracetylenschutzgruppen während der Reaktionszeit, so dass auch hier teilweise kovalente Verknüpfungen durch Ausbildung von Iminbindungen vorlagen (Spur B).

In den bisherigen Versuchen wurde die kovalente Verknüpfung der aminfunktionalisierten Verbindung **F6** auf einem aldehydderivatisierten Glasträger durch reduktive Aminierung untersucht. Im Folgenden wurde der umgekehrte Fall untersucht, die kovalente Immobilisierung der aldehydfunktionalisierten Verbindung **F4** auf einem aminderivatisierten Glasträger. Unter

den optimierten Immobilisierungsbedingungen unter Verwendung von Silikonmasken wurden gleichartige Ergebnisse erhalten. In Abbildung 53 sind zwei Chipbilder abgebildet, bei denen beide Methoden gegenübergestellt sind. Chipbild A zeigt die Immobilisierung von Verbindung **F4** auf einer Aminoberfläche, Chipbild B zum Vergleich diejenige von Verbindung **F6** auf einer Aldehydoberfläche. Die zugehörige quantitative Auswertung ist in Abbildung 54 dargestellt.



**Abbildung 53:** Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenzintensität der immobilisierten Verbindung **F4** und **F6** auf Amin- bzw. Aldehydoberfläche (Aufnahmen mit Array-Scanner).



**Abbildung 54:** Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenzintensität der immobilisierten Verbindung **F4** und **F6** auf Amin- bzw. Aldehydoberfläche (Messwerte).

Im direkten Vergleich erkennt man, dass im ersten Fall (Chip A) bei jeder Konzentration unter sonst gleichen Immobilisierungsbedingungen systematisch geringfügig höhere Fluoreszenzintensitäten als im zweiten Fall (Chip B) erzielt wurden. Die reduktive Aminierung scheint folglich auf der Aminoberfläche schneller abzulaufen als auf der Aldehydoberfläche; möglicherweise ist dieser Unterschied lediglich auf vergleichsweise höhere Dichte an funktionellen Gruppen auf der Aminoberfläche zurückzuführen. Die untere Nachweisgrenze der

Immobilisierung (das Detektionslimit) lag im ersten Fall (Chip A) gleichfalls bei einer Konzentration von  $10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>.

In weiteren Versuchen wurde das Ausmaß der nicht-kovalenten Immobilisierung der aldehydfunktionalisierten Verbindung **F4** bzw. ihrer geschützten Vorstufe **F3** auf Amin- bzw. Aldehydoberflächen untersucht. Diese Experimente entsprachen im Wesentlichen denjenigen, die bereits mit den aminfunktionalisierten Verbindungen **F5** bzw. **F6** durchgeführt worden waren. Sie führten qualitativ zu gleichartigen Ergebnissen, die ohne Abbildung der einzelnen Chipbilder kurz zusammengefasst werden sollen:

- Im Konzentrationsbereich von  $10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> bis  $10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> wurde die Verbindung **F4** auch unspezifisch (nicht-kovalent) auf einer Aldehydoberfläche gebunden; die gemessenen Fluoreszenzintensitäten waren jedoch bei gleicher aufgetragener Konzentration wiederum deutlich geringer als auf einer Aminoberfläche (kovalente Bindung möglich).
- Die geschützte Verbindung **F3** wurde gleichfalls im betrachteten Konzentrationsbereich bis zu einer Konzentration von  $10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> unspezifisch auf einem Aldehydchip gebunden.
- Ohne Verwendung des Reduktionsmittels Natriumcyanoborhydrid wurden bei der Immobilisierung der aldehydfunktionalisierten Verbindung **F4** auf einer Aldehydoberfläche signifikant geringere Signalintensitäten erhalten (reversible Ausbildung einer kovalenten Iminbindung).
- Unspezifisch gebundene Kohlenhydrate konnten auch durch z.T. drastische Waschprozesse nicht mehr von der Chipoberfläche entfernt werden.

### 4.2.4.2 Fazit

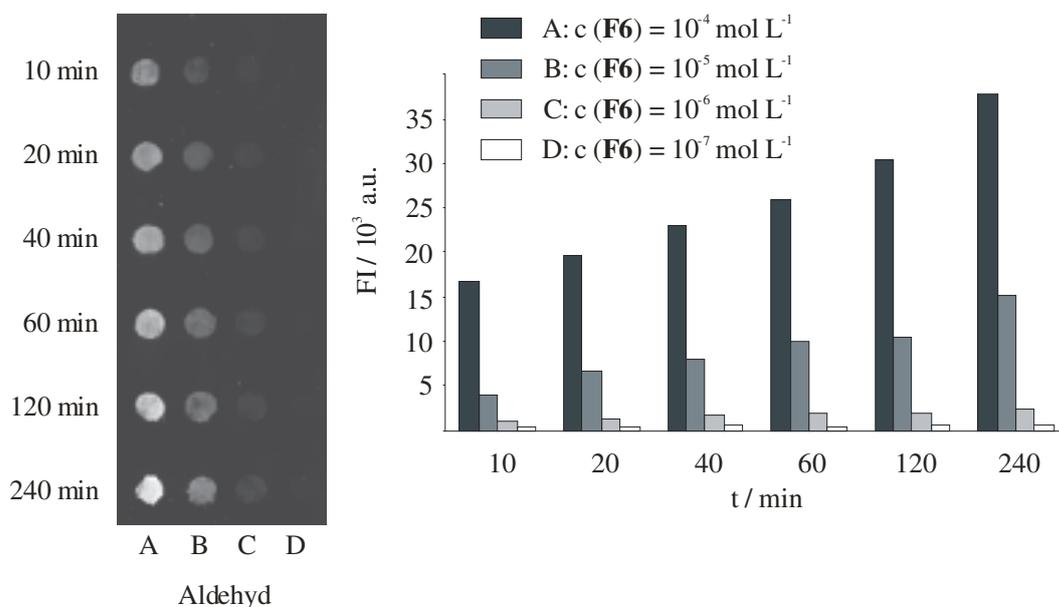
Mit Hilfe eines DNA-Array-Scanners konnte die Immobilisierung der fluoreszenzmarkierten Kohlenhydrate **F4** und **F6** auf derivatisierten Glasträgern durch reduktive Aminierung nachgewiesen werden. Dabei erfolgte die Anknüpfung an die Chipoberfläche durch die irreversible Ausbildung einer kovalenten Bindung. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten nahmen bei der passenden Kombination der funktionellen Gruppen (Aldehydverbindung **F4** auf Aminchip bzw. Aminverbindung **F6** auf Aldehydchip) im Konzentrationsbereich von  $10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> bis  $10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> zu. Bei nicht-passenden Kombinationen funktioneller Gruppen oder bei der Auftragung der geschützten Verbindungen **F3** oder **F5** wurden geringere Signalintensitäten erhalten, die auf unspezifische (nicht-kovalente) Bindung auf der Chipoberfläche zurückzuführen waren. Gleichfalls geringere Fluoreszenzsignale wurden bei

Verzicht auf das Reduktionsmittel während der Immobilisierungsreaktion erhalten, da in diesem Fall lediglich die reversible Ausbildung einer kovalenten Iminbindung möglich war. Unspezifisch gebundene Kohlenhydrate konnten durch Waschen nicht mehr entfernt werden. Durch Verwendung von Silikonmasken konnte die Reproduzierbarkeit der Messwerte verbessert werden; dennoch lagen Schwankungen in den gemessenen Intensitäten gleichartig präparierter Kohlenhydratspots bei bis zu 30%.

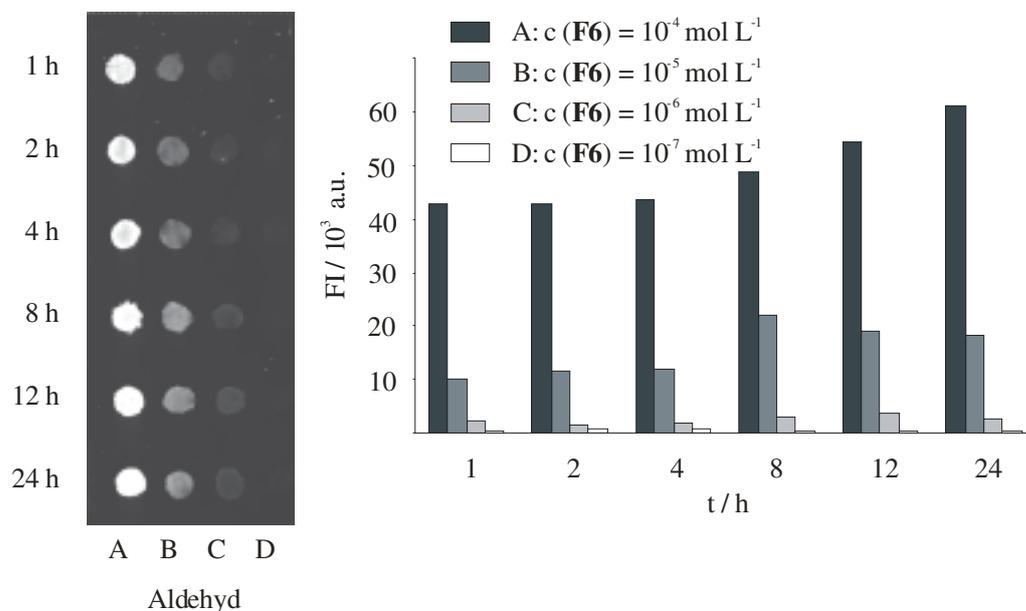
### 4.2.4.3 Untersuchungen zur Kinetik der Immobilisierung

Bei den bisher gezeigten Experimenten wurde eine Reaktionszeit von 12 bis 16 Stunden eingehalten (vgl. SP 1, Schritt 5). In weiteren Versuchen sollte die Reaktionsdauer der reduktiven Aminierung als Immobilisierungsmethode auf der Arrayoberfläche untersucht werden. Dazu wurde die Aminverbindung **F6** in verschiedenen Spots auf Aldehydarrays zur gleichen Startzeit  $t = 0$  aufgetragen und der Chip zur Reaktion in eine Feuchtekammer gelegt. Nach definierten Zeitintervallen wurde durch Absaugen bestimmter Spots die Reaktion unterbrochen. Unmittelbar nach dem Absaugen der Reaktionslösung wurden die entsprechenden Vertiefungen (Reaktionskammern) in der Silikonmaske gewaschen, bevor der Chip wieder für die Reaktionsdauer in den übrigen Vertiefungen in die Feuchtekammer zurückgelegt wurde. Neben der Reaktionsdauer wurde gleichzeitig die aufgetragene Konzentration an **F6** im Bereich von  $10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  bis  $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  variiert. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 55 für Reaktionszeiten von 10 min bis 240 min (4h) und in Abbildung 56 für Reaktionszeiten von 1 h bis 24 h dargestellt. Beide Fluoreszenzmessungen wurden bei gleicher Detektorempfindlichkeit durchgeführt.

## 4 Array Untersuchungen



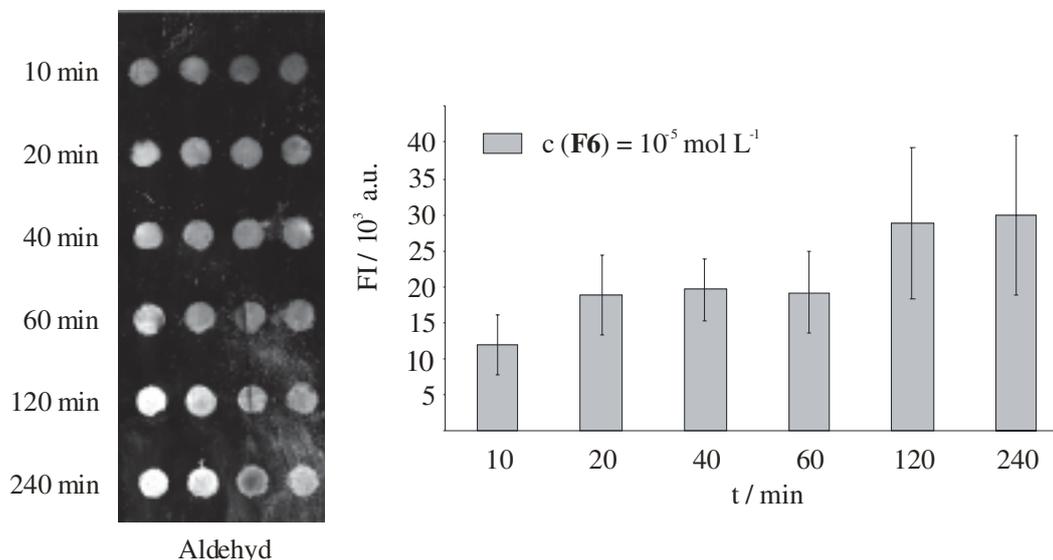
**Abbildung 55:** Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenzintensität der immobilisierten Verbindung **F6** auf Aldehydoberfläche (Zeitfenster 10-240 min, links: Aufnahmen mit Array-Scanner, rechts: Messwerte).



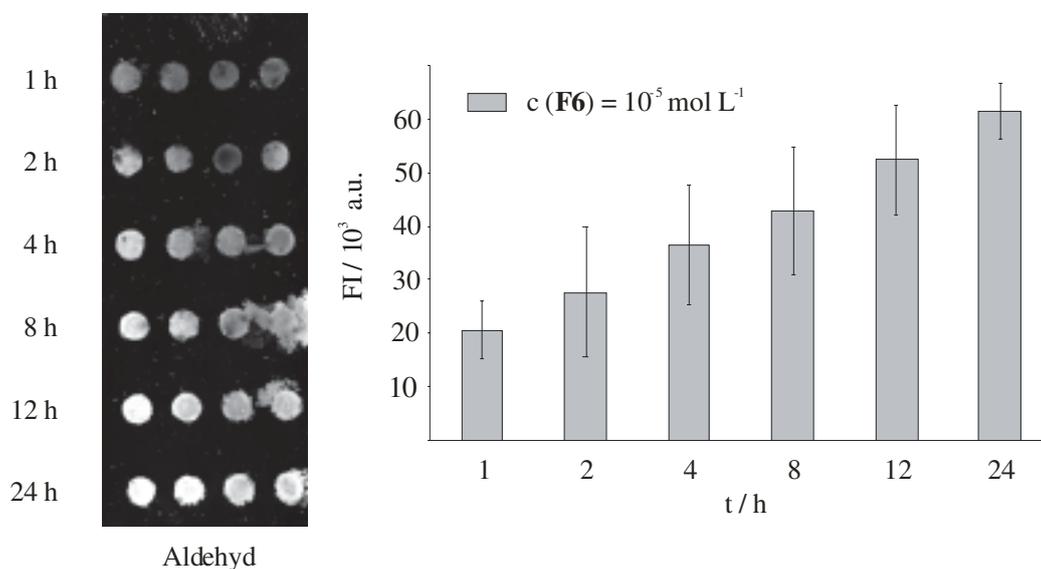
**Abbildung 56:** Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenzintensität der immobilisierten Verbindung **F6** auf Aldehydoberfläche (Zeitfenster 1 -24 h, links: Aufnahmen mit Array-Scanner, rechts: Messwerte).

Wie zu erwarten, stieg die gemessene Fluoreszenzintensität bei jeder aufgetragenen Konzentration mit steigender Reaktionsdauer an. Während der Anstieg innerhalb der ersten 4 Stunden relativ deutlich war, schien nach 8 bis 12 Stunden nur noch ein langsamer Anstieg bzw. eine Stagnation der gemessenen Signalintensität stattzufinden. Es zeigten sich aber auch deutliche Unterschiede im Vergleich der absoluten Messwerte unter sonst gleichen Bedingungen bei beiden Experimenten (z. B.  $c(\mathbf{F6}) = 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $t = 1 \text{ h}$ :  $FI = 25900$ /Abbildung 55 und  $FI = 43000$ /Abbildung 56). Wiederholte Messungen desselben Objektträgers führten dagegen zu vergleichbaren Werten – die festgestellten Varianzen sind folglich nicht auf das Messgerät

zurückzuführen. Eine Wiederholung der Versuche führte qualitativ zu denselben Ergebnissen bei wiederum unterschiedlichen absoluten Messwerten. Um die Frage der Reproduzierbarkeit bzw. Streuung der Messwerte näher zu betrachten wurden die Kinetikmessungen mit einer Konzentration von  $c(\mathbf{F6}) = 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  und 4 gleichartigen Spots (Replikaten) pro Array wiederholt (vgl. Abbildung 57 und 58).



**Abbildung 57:** Zeitabhängigkeit der Fluoreszenzintensität der immobilisierten Verbindung **F6** ( $c = 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) auf Aldehydoberfläche (Zeitfenster 10 -240 min, links: Aufnahmen mit Array-Scanner, rechts: Messwerte).



**Abbildung 58:** Zeitabhängigkeit der Fluoreszenzintensität der immobilisierten Verbindung **F6** ( $c = 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) auf Aldehydoberfläche (Zeitfenster 1 -24 h, links: Aufnahmen mit Array-Scanner, rechts: Messwerte).

Dabei konnte eine Streuung in der Intensität der Messwerte von bis zu 30% beobachtet werden unter sonst gleichen Bedingungen. Gleichzeitig konnte festgestellt werden, dass auch bei längeren Reaktionszeiten bis zu 24 Stunden noch eine leichte Zunahme der Fluoreszenzintensität zu beobachten war, wenn auch der Anstieg in den zweiten 12 Stunden der Reaktionszeit nur noch etwa 10% zu Gesamtintensität beitrug. Versuche zur weiteren Verlängerung der

Reaktionszeit wurden nicht ausgewertet, da in diesen Fällen trotz Durchführung der Reaktion in einer Feuchtekammer merkliche Verdunstung der Reaktionssspots auftrat, was die Reproduzierbarkeit und Aussagekraft der gewonnenen Werte weiter einschränkte. Auch aus praktischen Erwägungen sind längere Reaktionszeiten bei Chipexperimenten wenig sinnvoll.

Bei einer Reaktion in Lösung ist der Reaktionsfortschritt im Allgemeinen leicht zu verfolgen, wenn die Konzentrationszu- bzw. abnahme mindestens eines Reaktanden spektroskopisch eindeutig verfolgt werden kann. Dies kann im einfachsten Fall dadurch erfolgen, dass die Reaktion selbst in einer Reaktionsküvette durchgeführt wird; alternativ können aus der Reaktionslösung in bestimmten Zeiten Proben entnommen und spektroskopisch untersucht werden. Falls die spektroskopischen Daten der entsprechenden Verbindung nicht genau bekannt sind, kann über eine Eichlösung ein Zusammenhang zwischen gemessener Absorptions- bzw. Fluoreszenzintensität und der Konzentration der Verbindung hergestellt werden. Aus dem zeitlichen Verlauf der Konzentration des Reaktanden können als kinetische Daten der Reaktion die Reaktionsordnung  $n$  und die Geschwindigkeitskonstante  $k$  bestimmt werden. Die Kenntnis des zugrunde liegenden Reaktionsmechanismus ist dazu nicht erforderlich, bei Kenntnis der Stöchiometrie der Reaktion können jedoch mögliche Reaktionsmechanismen überprüft werden.

Bei den hier durchgeführten kinetischen Untersuchungen zur Immobilisierungsreaktion auf einem funktionalisierten Objektträger ergaben sich im Gegensatz zu einer Reaktion in Lösung mehrere Schwierigkeiten:

- Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten stammten nicht ausschließlich von kovalent gebundenem Kohlenhydrat **F6** sondern auch von unspezifisch nicht-kovalent gebundenem (vgl. Abschnitt 4.2.4.1). Das Verhältnis der beiden Anteile war jedoch nicht quantifizierbar.
- Die Linearität zwischen gemessener Fluoreszenzintensität und der Konzentration an immobilisiertem Kohlenhydrat war nicht gesichert; eine Eichmessung mit definierter und gesicherter (Oberflächen-)Konzentration an markiertem Kohlenhydrat konnte auf dem Chip nicht verwirklicht werden. Insbesondere konnte nicht ausgeschlossen werden, dass bei hohen Konzentrationen an immobilisiertem Kohlenhydrat Fluoreszenzlöschung auftrat, d.h. dass die gemessene Fluoreszenzintensität in diesem Bereich systematisch zu klein ausfiel.
- Die Linearität zwischen gemessener Fluoreszenzintensität und der Konzentration an immobilisiertem Kohlenhydrat war gleichfalls auf der Seite des Messgerätes nicht gesichert. DNA-Array-Scanner werden routinemäßig nur für qualitative oder semi-quantitative Fluoreszenzmessungen eingesetzt.

- Während längerer Reaktionszeiten ( $> 12$  Stunden) traten, trotz Lagerung der Objektträger in einer Feuchtekammer während der Reaktion, teilweise merkliche Verdunstungseffekte auf. Zum Abbruch der Reaktion in bestimmten Reaktionskammern der Silikonmaske und für die folgenden kurzen Waschschrte musste der ganze Chip kurzzeitig aus der Kammer entnommen werden.
- Unterschiedliche Qualitäten der funktionalisierten Objektträger führten gleichfalls zu unterschiedlichen nicht vollständig reproduzierbaren Messwerten. Die Schwankungen in den Messwerten bei gleichartig präparierten Kohlenhydratspots waren zumindest teilweise auf Inhomogenitäten der Objektträgeroberfläche zurückzuführen. Weder die Dichte an funktionellen Gruppen noch die Homogenität ihrer räumlichen Verteilung sind auf einem funktionalisierten Objektträger bekannt. Weiterhin ist die Glasoberfläche eines Chips in molekularer Dimension nicht-planar, wodurch einerseits funktionelle Gruppen sterisch für ein Kohlenhydrat möglicherweise nicht zugänglich sind und andererseits die unspezifische nicht-kovalente Adsorption eines markierten Kohlenhydrates in Spalten, Kanälen oder Höhlen auf der Arrayoberfläche erfolgen kann. Über die Homogenität der Oberflächenstruktur der kommerziell erworbenen funktionalisierten Objektträger ist jedoch nichts bekannt. Um räumliche Inhomogenitäten von Objektträgern zu berücksichtigen werden in der DNA-Array-Technologie Sondenspots in vielen Replikaten auf verschiedenen Stellen eines Chips aufgetragen und die erhaltenen Messergebnisse statistisch ausgewertet. Damit ist es bei Hybridisierungsexperimenten unter idealen Bedingungen möglich, reproduzierbare Messergebnisse innerhalb einer Schwankungsbreite von 10% zu erhalten.<sup>[287]</sup>

Trotz der erwähnten Schwierigkeiten soll an dieser Stelle zumindest eine Abschätzung der Reaktionskinetik vorgenommen werden. Dabei wird von folgenden Annahmen ausgegangen:

- Linearität zwischen gemessener Fluoreszenzintensität und Konzentration an (kovalent oder nicht-kovalent) immobilisiertem Kohlenhydrat **F6** ist gegeben.
- Inhomogenitäten der Objektträgeroberfläche und Verdunstungseffekte während der Reaktion sind vernachlässigbar.
- Die Konzentration an unspezifisch nicht-kovalent gebundenem Kohlenhydrat ist zwar von der Ausgangskonzentration an aufgetragenem Kohlenhydrat abhängig, aber zugleich zeitunabhängig, d.h. konstant während der gesamten Reaktion. Oder anders ausgedrückt: Die gesamte unspezifische Bindung des Kohlenhydrates erfolgt unmittelbar nach dem Auftragen der Lösung zum Zeitpunkt  $t=0$ , der Anstieg der gemessenen Fluoreszenzintensitäten im zeitlichen Verlauf der Reaktion ist ausschließlich auf die

Zunahme an kovalent gebundenem Kohlenhydrat zurückzuführen. Diese Annahme ist zwar willkürlich, aber nicht unplausibel, wie die Untersuchungen zur Variation der Lektinkonzentration in Abschnitt 4.3.1 zeigen. In einer quantitativen Betrachtung hat sie zur Folge, dass die Fluoreszenzintensität zu Beginn der Reaktion nicht Null ist, d.h. die sonst notwendige Randbedingung  $FI(t = 0) = 0$  nicht erfüllt ist.

Die Oberflächendichte  $\sigma$  an reaktiven Gruppen auf funktionalisierten Chipoberflächen wurde mit verschiedenen Methoden bestimmt; sie liegt je nach Methode, Funktionalität und Art der Oberfläche (Glas, Silicium, Gold u.a.) zwischen  $\sigma = 10^{11}$  und  $10^{15}$  Molekülen pro  $\text{cm}^2$ .<sup>[111]</sup> Hier soll von einem mittleren Wert von  $\sigma = 8 \cdot 10^{12} \text{ cm}^{-2} = 8 \cdot 10^{10} \text{ mm}^{-2}$  ausgegangen werden, wie er von *D. Wöll* im Rahmen seiner Dissertation an der Universität Konstanz ermittelt wurde.<sup>[288, 289]</sup> Aus diesem Wert folgt zunächst ein mittlerer Abstand  $d$  zwischen zwei funktionellen Gruppen auf der Chipoberfläche von

$$d = \frac{1}{(\sigma)^{\frac{1}{2}}} = \frac{1}{(8 \cdot 10^{10} \text{ mm}^{-2})^{\frac{1}{2}}} = 3.5 \cdot 10^{-6} \text{ mm} = 3500 \text{ pm}.$$

Mit einer durch die Silikonmaske vorgegebenen benetzbaren kreisrunden Chipoberfläche  $A$  mit einem Radius von  $r = 1 \text{ mm}$  pro Vertiefung und einem Reaktionsvolumen von  $V = 5 \text{ }\mu\text{l}$  ergibt sich weiterhin die Zahl der zur Verfügung stehenden funktionellen Gruppen  $N$  pro Reaktionsspot:

$$N = \sigma \cdot A = \sigma \cdot \Pi \cdot r^2 = 8 \cdot 10^{10} \text{ mm}^{-2} \cdot \Pi \cdot (1 \text{ mm})^2 \approx 2.4 \cdot 10^{11}.$$

Dies entspricht einer Stoffmenge  $n$  von:

$$n = \frac{N}{N_A} = \sigma \cdot \frac{A}{N_A} = \frac{8 \cdot \Pi \cdot 10^{10}}{6 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}} \approx 4 \cdot 10^{-13} \text{ mol}.$$

Weiterhin ergibt sich die minimale Konzentration  $c$  der Lösung an funktionalisiertem Kohlenhydrat **F6**, die theoretisch notwendig ist, um alle funktionellen Gruppen abzusättigen:

$$c = \frac{n}{V} = \frac{4 \cdot 10^{-13} \text{ mol}}{5 \cdot 10^{-6} \text{ L}} = 8 \cdot 10^{-8} \text{ molL}^{-1} \approx 10^{-7} \text{ molL}^{-1}.$$

Ab dieser Konzentration an aufgetragenem Kohlenhydrat können alle funktionellen Gruppen auf der Chipoberfläche theoretisch zur Reaktion gebracht werden, wodurch die maximal erreichbare Fluoreszenzintensität  $FI_{\text{max}}$  gekennzeichnet ist. Tatsächlich wurden im vorigen Abschnitt

konzentrationsabhängige Fluoreszenzintensitäten bis zur einer 1000-fach höheren Konzentration von  $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  an aufgetragenem Kohlenhydrat gemessen. In Abschnitt 4.3.1 wird außerdem gezeigt, dass sich dieser Trend bei noch höheren Konzentrationen an aufgetragenem Kohlenhydrat fortsetzt (bis mindestens zu einer Konzentration von  $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ). Bei dieser beobachteten Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenzintensität handelt es sich folglich um einen kinetischen Effekt. Aus der Abschätzung lässt sich weiterhin folgern, dass ab einer Konzentration von  $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  ein großer (100-facher) Überschuss an zur Immobilisierung geeignetem Kohlenhydrat in Lösung gegenüber den reaktiven funktionellen Gruppen auf der Arrayoberfläche vorliegt. Gleiches gilt für das Reduktionsmittel Natriumcyanoborhydrid. Dementsprechend sind in diesem Fall, unabhängig vom konkreten Mechanismus der Immobilisierungsreaktion, die Voraussetzungen für eine Reaktion pseudo-erster Ordnung gegeben. Für die Reaktion



mit  $\text{KH}_{\text{Lös}}$ : Kohlenhydrat in Lösung

FG: funktionelle Gruppe auf der Chipoberfläche (nicht abgesättigt)

$\text{KH}_{\text{Immobil}}$ : auf der Chipoberfläche immobilisiertes Kohlenhydrat

und der Voraussetzung  $\text{KH}_{\text{Lös}} \gg \text{FG}$  für eine Reaktion pseudo-erster Ordnung ergibt sich als Reaktionsgeschwindigkeitsgesetz

$$[\text{KH}_{\text{Immobil}}](t) = [\text{FG}_0] \cdot (1 - e^{-kt})$$

mit  $[\text{KH}_{\text{Immobil}}](t)$ : Konzentration an spezifisch immobilisiertem Kohlenhydrat zur Zeit t

$[\text{FG}_0]$ : Anfangskonzentration an funktionellen Gruppen auf der Chipoberfläche

k: Reaktionsgeschwindigkeitskonstante.

Weiterhin gelten unter Vernachlässigung von unspezifisch nicht-kovalent gebundenem Kohlenhydrat die Proportionalitäten  $\text{FI}(t) \propto [\text{KH}_{\text{Immobil}}](t)$  und  $F_{\text{max, spez}} \propto [\text{FG}_0]$ , so dass man die Funktion

$$\text{FI}(t) = F_{\text{max, spez}} \cdot (1 - e^{-kt})$$

mit  $\text{FI}(t)$ : gemessene Fluoreszenzintensität zur Zeit t

$F_{\text{max, spez}}$ : maximale Fluoreszenzintensität durch spezifisch gebundenes Kohlenhydrat

erhält.

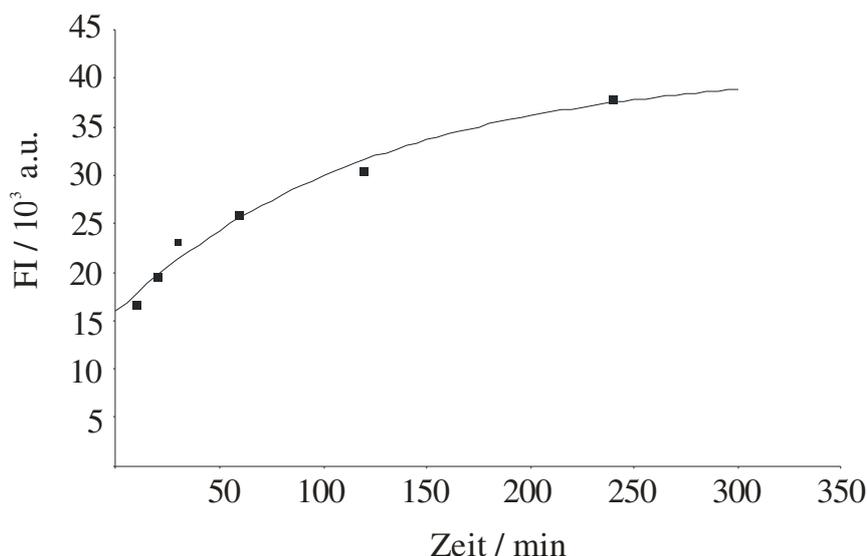
Die Intensität  $F_{\max, \text{spez}}$  wird dann erreicht, wenn alle zur Verfügung stehenden funktionellen Gruppen  $FG_0$  durch fluoreszenzmarkierte Kohlenhydrate mittels spezifischer kovalenter Bindungen abgesättigt sind.

Unter zusätzlicher Berücksichtigung der unspezifischen nicht-kovalenten Bindung  $F_{\text{unspez}}$  nach den oben definierten Voraussetzungen gilt schließlich

$$FI(t) = F_{\max, \text{spez}} \cdot (1 - e^{-kt}) + F_{\text{unspez}}$$

Zu erwarten ist bei Auftragung der gemessenen Fluoreszenzintensität  $FI(t)$  gegen die Reaktionszeit  $t$  folglich eine Sättigungskurve mit dem Endwert  $F_{\max} = F_{\max, \text{spez}} + F_{\text{unspez}}$ .

Die Messwerte für eine Anfangskonzentration von  $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  an aufgetragenem Kohlenhydrat **F6** im Zeitraum von 10 Minuten bis 240 Minuten (vgl. Abbildung 55, Spur A) sind grafisch in Abbildung 59 (Quadrate) dargestellt. Der Funktionsverlauf entspricht qualitativ den Erwartungen.



**Abbildung 59:** Zeitabhängigkeit der Fluoreszenzintensität der immobilisierten Verbindung **F6** ( $c = 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ) auf Aldehydoberfläche (Zeitfenster 10 -240 min, Messwerte (Quadrate) und gefittete Ausgleichskurve).

Durch Fitten der Messwerte (Methode der kleinsten Fehlerquadrate) lassen sich die Konstanten  $k$ ,  $F_{\max, \text{spez}}$  und  $F_{\text{unspez}}$  bestimmen. Es ergeben sich folgende Werte:

$$k = 0,0081 \text{ min}^{-1} = 0,0486 \text{ s}^{-1} \text{ (bei Raumtemperatur)}$$

$$F_{\max, \text{spez}} = 25.200$$

$$F_{\text{unspez}} = 15.900$$

und damit  $F_{\max} = 41.100$ .

Die Ausgleichskurve ist gleichfalls in Abbildung 59 dargestellt. In diesem Fall beträgt der Anteil der Intensität an unspezifisch gebundenem Kohlenhydrat  $F_{\text{unspez}}$  fast 40% der maximale erreichbaren Fluoreszenzintensität  $F_{\text{max}}$ .

### 4.2.4.4 Fazit

Eine Reaktionszeit von 12 Stunden war bei Raumtemperatur für die kovalente Verknüpfung von Kohlenhydraten durch reduktive Aminierung auf derivatisierten Objektträgern ausreichend – längere Reaktionszeiten führten nur noch zu einem geringen weiteren Anstieg der Menge an immobilisierten Sondenmolekülen. Dies konnte durch Variation der Reaktionszeit bei der Immobilisierung des fluoreszenzmarkierten Kohlenhydrats **F6** nachgewiesen werden. Die beobachtete Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenzintensitäten ist, zumindest für den Konzentrationsbereich oberhalb von  $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , ein kinetischer Effekt, da eine ausreichende Anzahl an Kohlenhydraten in Lösung zur Absättigung aller funktioneller Gruppen auf der Chipoberfläche prinzipiell zur Verfügung stand. Wegen des gleichzeitigen Auftretens unspezifischer nicht-kovalenter Bindungsanteile und aufgrund der schlechten Reproduzierbarkeit absoluter Messwerte (Schwankungen in der Intensität von bis zu 30%) waren quantitative Aussagen über die Kinetik der Reaktion nicht möglich; eine Abschätzung unter vereinfachenden Annahmen ergab jedoch den erwarteten Verlauf für eine Reaktion pseudo-erster Ordnung.

## 4.3 Untersuchungen von Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkungen

Zur Untersuchung der Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkung auf Arrays wurden die Kohlenhydratderivate **58**, **60**, **61**, **64** und **65** eingesetzt, deren Synthesen in Abschnitt 3.3 beschrieben worden sind, sowie die beiden Verbindungen **E** und **F**, die von *R. Weingart* in unserer Arbeitsgruppe synthetisiert wurden.<sup>[215]</sup>

Die aldehydfunktionalisierten Verbindungen **58**, **60** und **61** sowie die aminfunktionalisierten Verbindungen **64**, **E** und **F** wurden durch reduktive Aminierung nach dem Standardprotokoll 1 immobilisiert. Dabei konnte auf die im vorigen Abschnitt beschriebenen Erfahrungen mit der Immobilisierung der fluoreszenzmarkierten Kohlenhydrate zurückgegriffen werden.

Verbindung **65** wurde durch Ausbildung einer Carbonsäureamidbindung kovalent auf aminderivatisierten Glasträgern immobilisiert.

Nach der Immobilisierung erfolgte die Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Lektinen nach dem Standardprotokoll 2. Als Bindungspartner wurden die Lektine Concanavalin A (Con A), Wheat Germ Agglutinin (WGA) und Peanut Agglutinin (PNA) in Form ihrer kommerziell erhältlichen rhodaminmarkierten Derivate eingesetzt. Die Fluoreszenzintensitäten auf den gezeigten Chipbildern in diesem Abschnitt stammen von den markierten Lektinen und nicht von den immobilisierten Kohlenhydraten selbst wie im vorangegangenen Abschnitt.

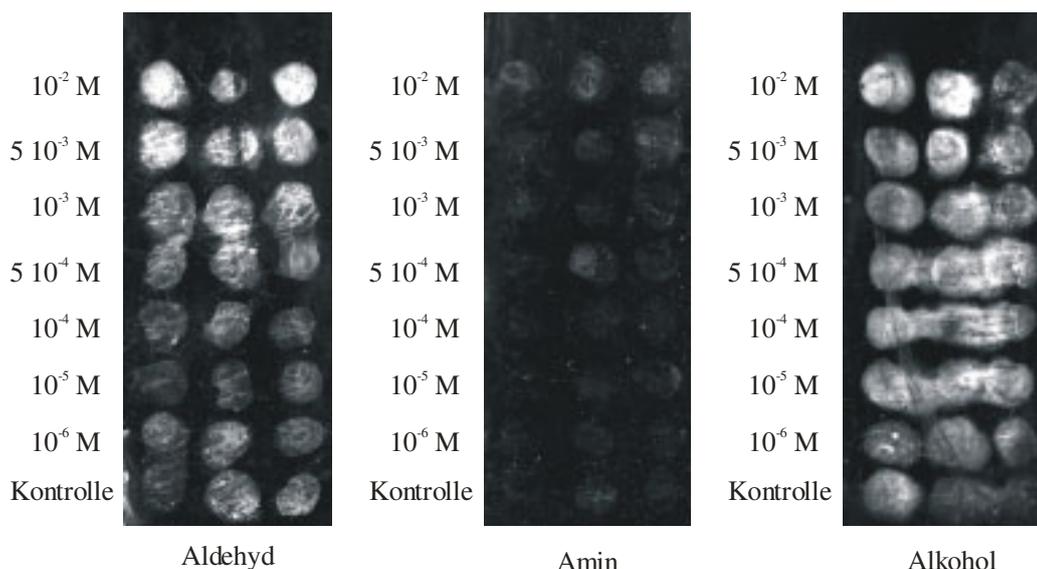
Erste Versuche zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen den durch reduktive Aminierung immobilisierten Mannosederivaten **58** oder **64** und dem rhodaminmarkierten Lektin Concanavalin A wurden mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops durchgeführt. Dabei wurden allerdings keine eindeutigen Messergebnisse erhalten. Alle in den folgenden Abschnitten beschriebenen Untersuchungen wurden mit Hilfe des DNA-Array-Scanners durchgeführt.

### **4.3.1 Untersuchungen zur Immobilisierung von $\alpha$ -Mannopyranosiden und ihrer Wechselwirkung mit dem Lektin Concanavalin A**

#### **4.3.1.1 Immobilisierung durch reduktive Aminierung**

Im ersten Experiment, das hier beschrieben werden soll, wurde die aminfunktionalisierte Mannose **64** im Konzentrationsbereich von  $10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> bis  $10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup> auf einer Aldehyd-, einer Amin- bzw. einer Hydroxyoberfläche aufgetragen und durch reduktive Aminierung immobilisiert. Dies geschah noch ohne Verwendung von Silikonmasken. Die anschließende Hybridisierung mit dem markierten Lektin Concanavalin A erfolgte spotweise, d.h. nach dem Immobilisierungsschritt wurde die Lektinlösung tropfenweise auf die Chipoberfläche aufgebracht ( $V = 2 \mu\text{L}$ ,  $c = 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Die entsprechenden Stellen auf dem Objektträger, auf denen zuvor die Kohlenhydrate aufgetragen worden waren, wurden zuvor mit einem Filzstift auf der nicht-funktionalisierten Objektträgerunterseite markiert. Nach einer Hybridisierungszeit von 1 h, während der der Objektträger in einer Feuchtekammer gelagert wurde, wurde die Hybridisierungslösung abgesaugt und der ganze Objektträger jeweils für 30 min in reinem

PBS-Puffer gewaschen. Nach Trocknung wurden bei der Fluoreszenzmessung die in Abbildung 60 gezeigten Chipbilder erhalten.



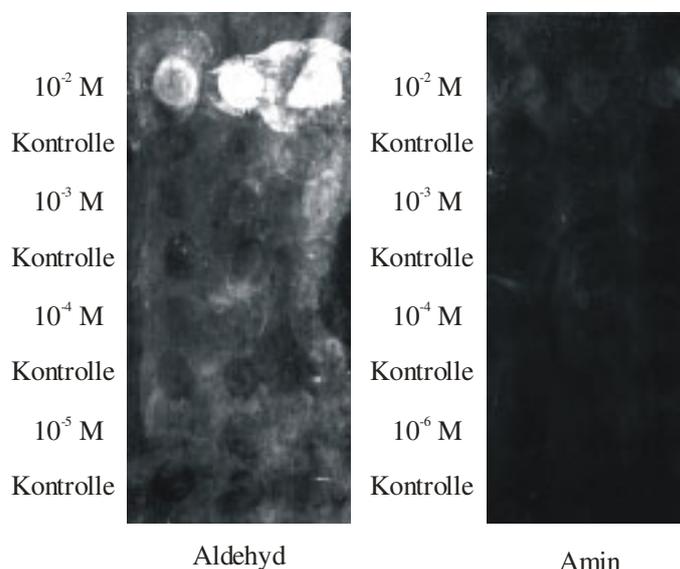
**Abbildung 60:** Fluoreszenzintensität nach Immobilisierung von Verbindung **64** durch reduktive Aminierung auf Aldehyde, Amin- und Alkoholoberflächen und **spotweiser** Hybridisierung mit fluoreszenzmarkiertem Lektin Con A ( $c = 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Auf der Aldehydoberfläche waren bei hohen Konzentrationen an immobilisierter Mannose **64** ( $c = 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  bis  $c = 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ) signifikant höhere Fluoreszenzintensitäten zu beobachten als bei niedrigeren Konzentrationen. In diesem Bereich konnte die spezifische Bindung des Lektins an seinen Kohlenhydratbindungspartner auf der Oberfläche folglich nachgewiesen werden. Dagegen waren die geringeren Signalintensitäten bei niedrigeren Konzentrationen an immobilisierter Mannose auf unspezifische Adsorption des Lektins auf der Aldehydoberfläche zurückzuführen. Dies war auch an der Intensität des Fluoreszenzsignals des Kontrollspots (reine Puffersubstanz ohne Kohlenhydrat) sichtbar.

Auf der Aminoberfläche waren nur schwache Intensitäten bei einer Konzentration von  $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  an immobilisierter Mannose **64** zu beobachten, die zudem niedriger als auf der Aldehydoberfläche ausfielen. Dies steht im Einklang mit den im vorigen Abschnitt erhaltenen Ergebnissen. Eine geringe Menge an Kohlenhydrat wurde nicht-kovalent auf der Chipoberfläche adsorbiert und konnte folglich auch geringe Mengen an Lektin spezifisch binden. Dagegen fiel die unspezifische Adsorption des Lektins auf der Aminoberfläche geringer aus als auf der Aldehydoberfläche.

Auf der polaren Hydroxyoberfläche schließlich waren mehr oder weniger intensive Fluoreszenzsignale unabhängig von der Konzentration an immobilisiertem Kohlenhydrat zu beobachten. Das Lektin wurde also relativ stark unspezifisch auf der Hydroxyoberfläche gebunden.

In einem weiteren Versuch wurde die Immobilisierung der aminfunktionalisierten Mannose **64** im selben Konzentrationsbereich auf einer Aldehyd- und einer Aminoberfläche wiederholt, aber anschließend der gesamte Objektträger jeweils in einer Lektinlösung hybridisiert (vgl. SP 2, Schritt 2). Die Chipbilder sind in Abbildung 61 dargestellt.

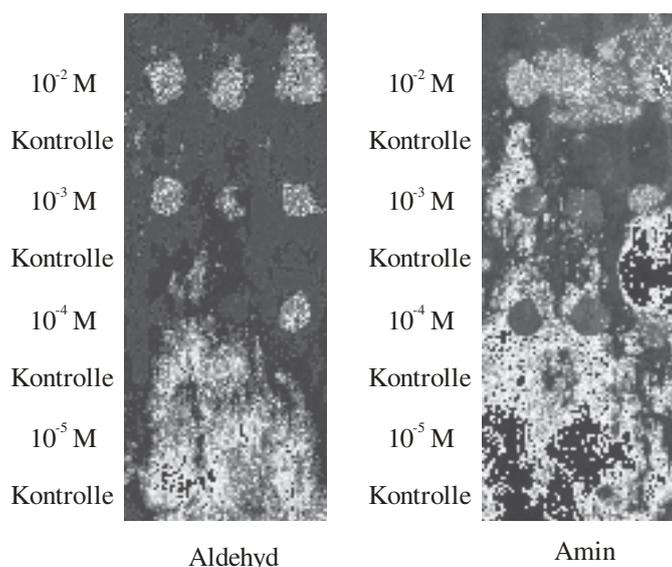


**Abbildung 61:** Fluoreszenzintensität nach Immobilisierung von Verbindung **64** durch reduktive Aminierung auf Aldehyd- und Aminoberfläche und Hybridisierung **des ganzen Arrays** mit fluoreszenzmarkiertem Lektin Con A ( $c = 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Wiederum wurden auf dem aldehydfunktionalisierten Glasträger bei einer hohen Konzentration an aufgetragener Verbindung **64** von  $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  Fluoreszenzintensität gemessen, die aber von einer hohen inhomogenen Hintergrundfluoreszenz auf den anderen Chipbereichen begleitet wurde. Auf dem aminfunktionalisierten Glasträger konnten dagegen außer einer niedrigen Intensität bei einer Konzentration von  $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  und einer sehr schwachen Hintergrundfluoreszenz keine Signale beobachtet werden, die auf eine spezifische Kohlenhydrat-Lektin Bindung hindeuteten. Offensichtlich war die unspezifische Haftung des Lektins auf der Aldehydoberfläche größer als auf der Aminoberfläche. In weiteren Versuchen wurde die Waschdauer im PBS-Puffer nach der Hybridisierung mit dem Lektin verlängert (SP 2, Schritt 3), um unspezifisch gebundenes Lektin wieder abzuwaschen. Dabei zeigte sich, dass durch längere Waschprozesse zwar das Lektin langsam abgewaschen werden konnte, aber dabei auch die Signalintensität der spezifischen Lektinbindung am Ort des immobilisierten Kohlenhydrates in gleichem Maße abnahm. Somit konnte durch eine verlängerte Waschdauer kein Vorteil im Sinne einer Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses erreicht werden.

Stattdessen wurde im Folgenden die Immobilisierung der aldehydderivatisierten Mannose **58** durch reduktive Aminierung untersucht. Diese wurde wiederum im selben Konzentrationsbereich auf aldehyd- oder aminfunktionalisierten Glasträgern durch reduktive

Aminierung immobilisiert und mit dem Lektin Concanavalin A hybridisiert. Die erhaltenen Chipbilder sind in Abbildung 62 gezeigt.



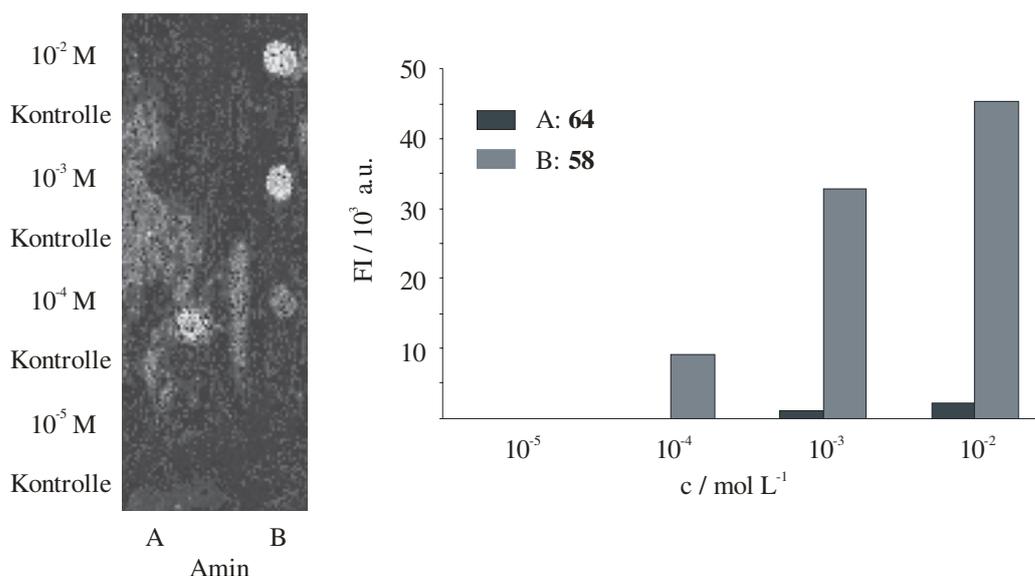
**Abbildung 62:** Fluoreszenzintensität nach Immobilisierung von Verbindung **58** durch reduktive Aminierung auf Aldehyd- und Aminoberfläche und Hybridisierung mit fluoreszenzmarkiertem Lektin Con A ( $c = 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Dabei konnte eine untere Nachweisgrenze (Detektionslimit) für die Kohlenhydrat-Lektin Bindung bei einer Konzentration des immobilisierten Kohlenhydrats **58** von  $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  auf der Aminoberfläche erreicht werden. Auch auf der Aldehydoberfläche konnten schwache Signalintensitäten beobachtet werden, obwohl hier keine kovalente Bindung des Kohlenhydratderivates möglich war. Dieser Befund deckt sich mit den in Abschnitt 4.2 berichteten Ergebnissen; teilweise erfolgte eine unspezifische (nicht-kovalente) Immobilisierung des Kohlenhydrates auf der „falschen“ Chipoberfläche. Durch dieses Experiment zur Kohlenhydrat-Lektin Wechselwirkung konnte diese Annahme bestätigt werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mit der Kombination aus Aldehydderivat **58** und Aminchip „bessere“ Ergebnisse erhalten werden konnten als mit der Kombination aus Aminderivat **64** und Aldehydchip. „Bessere“ Ergebnisse bedeutet ein niedrigeres Detektionslimit sowie geringere unspezifische Haftung des Lektins auf der Chipoberfläche. Alle folgenden Experimente wurden deshalb mit der ersten Kombination durchgeführt.

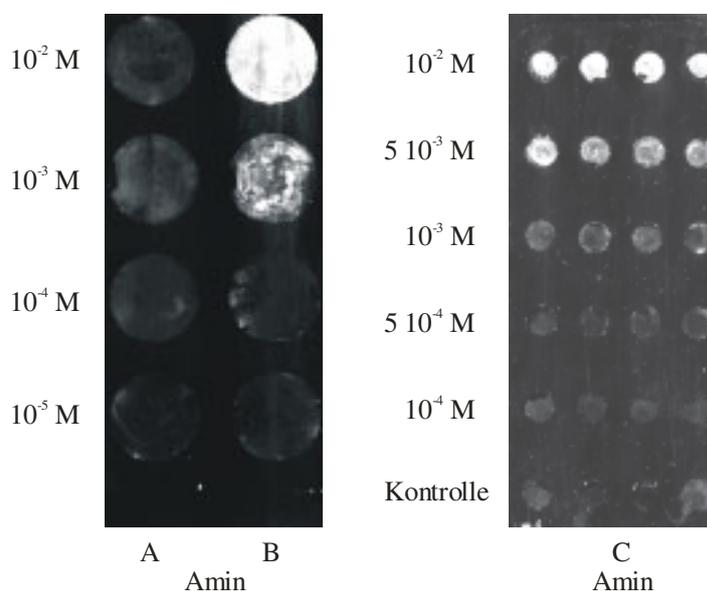
In weiteren Versuchen wurde zunächst die Kovalenz der Immobilisierungsmethode überprüft. Dazu wurden Experimente, die mit den fluoreszenzmarkierten Verbindungen durchgeführt worden waren und die im vorigen Abschnitt beschrieben worden sind, mit den Mannosederivaten **58** und **64** wiederholt. Der Nachweis der kovalenten Verknüpfung erfolgte hier allerdings indirekt über den Fluoreszenznachweis des gebundenen Lektins. In Abbildung 63 ist die Immobilisierung der beiden Verbindungen auf einem aminderivatisierten Glasträger

gezeigt. Wie erwartet zeigten sich nur im Fall der Aldehydverbindung **58** konzentrationsabhängige Signalintensitäten (Spur B).



**Abbildung 63:** Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenzintensität der immobilisierten Verbindung **64** (Spur A) und **58** (Spur B) auf einer Aminoberfläche nach Hybridisierung mit fluoreszenzmarkiertem Lektin Con A ( $c = 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ); (links: Aufnahmen mit Array-Scanner, rechts: Messwerte).

Durch Verwendung von Silikonmasken konnte die Homogenität der einzelnen Kohlenhydratspots und die Reproduzierbarkeit der Messwerte deutlich verbessert werden (vgl. Abschnitt 4.1.4). In Abbildung 64 sind entsprechende Chipbilder dargestellt.

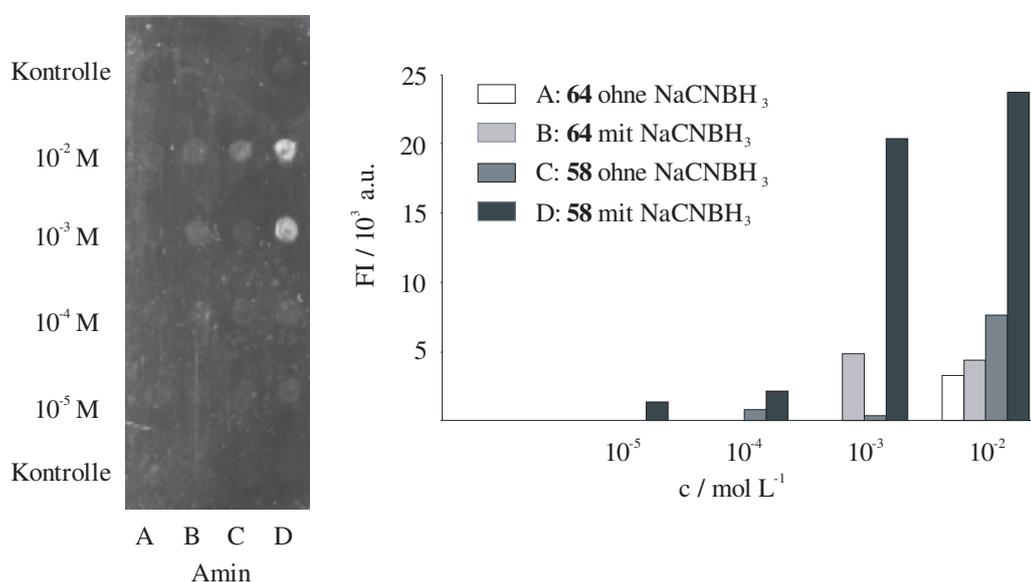


**Abbildung 64:** Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenzintensität der immobilisierten Verbindung **64** (Spur A) und **58** (Spur B und C) auf Aminoberflächen nach Hybridisierung mit fluoreszenzmarkiertem Lektin Con A ( $c = 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Verwendung von Silikonmasken mit  $25 \mu\text{L}$  bzw.  $5 \mu\text{L}$  Volumen pro Spot.

Trotz Verwendung der Masken traten Schwankungen von bis zu 30% in den gemessenen Fluoreszenzintensitäten bei Kohlenhydratspots gleicher Konzentration auf. Diese Schwankungen

zeigten sich einerseits bei der Betrachtung der Intensitätsverteilung innerhalb eines „großen“ Spots (Spur A und B, 25  $\mu\text{l}$  Volumen der Maskenvertiefung) als auch beim Vergleich verschiedener „kleiner“ Spots (Chip C, vier Replikate pro Konzentration mit jeweils 5  $\mu\text{l}$  Volumen der Maskenvertiefung). Diese Schwankungsbreite wurde bereits bei den Experimenten mit den fluoreszenzmarkierten Verbindungen beobachtet und ist wahrscheinlich auf Inhomogenitäten der Glasoberfläche zurückzuführen.

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss des Reduktionsmittels auf die Immobilisierung untersucht. Die beiden Verbindungen **58** und **64** wurden im Konzentrationsbereich von  $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  bis  $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  auf einem aminderivatisierten Objektträger immobilisiert (vgl. Abbildung 65), wobei entweder das Reduktionsmittel Natriumcyanoborhydrid zugesetzt oder dieses durch reine Pufferlösung ersetzt wurde.

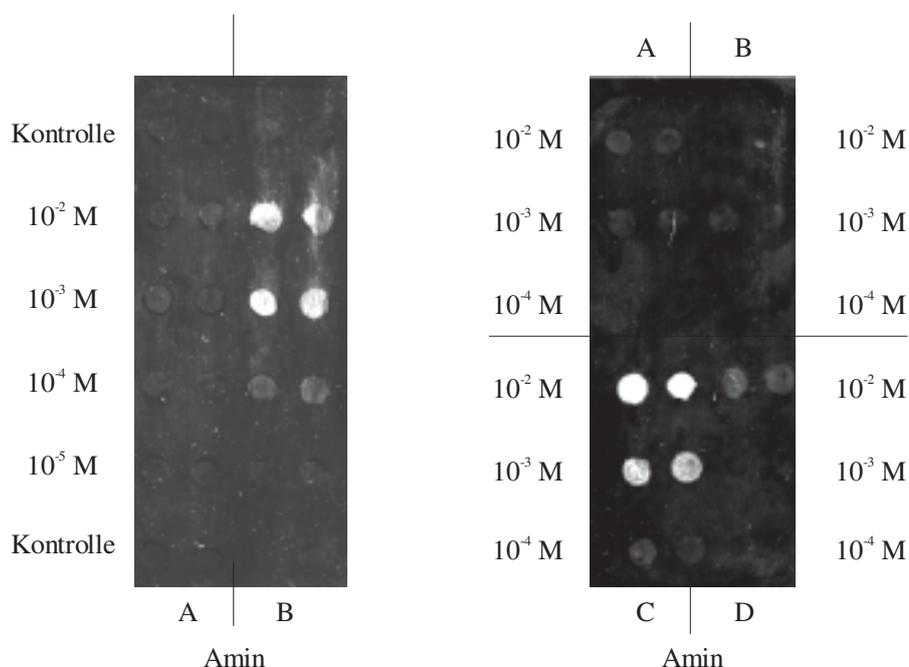


**Abbildung 65:** Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenzintensität der immobilisierten Verbindung **64** und **58** auf einer Aminoberfläche nach Hybridisierung mit fluoreszenzmarkiertem Lektin Con A ( $c = 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ); Immobilisierung mit und ohne Verwendung des Reduktionsmittels  $\text{NaCNBH}_3$  (links: Aufnahmen mit Array-Scanner, rechts: Messwerte).

Wiederum konnten erwartungsgemäß die höchsten Signalintensitäten beobachtet werden, wenn die „passende“ Verbindung **58** unter Zugabe von Natriumcyanoborhydrid immobilisiert wurde (Spur D). Schwächere Signalintensitäten resultierten entweder durch unspezifische Adsorption der „nicht-passenden“ Aminverbindung **64** (Spur A und D) oder aber durch die reversible Ausbildung einer Iminbindung im Falle der Kombination der Aldehydverbindung **58** und nicht zur Reduktion fähiger Pufferlösung (Spur B).

### 4.3.1.2 Untersuchungen zur nicht-spezifischen Adsorption von Kohlenhydraten

In weiteren Versuchen wurde das Ausmaß der nicht-spezifischen Adsorption von Kohlenhydraten auf der Arrayoberfläche durch Immobilisierung von Mannose und Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid untersucht. Dazu wurde zunächst reine Mannose und die Aldehydverbindung **58**, wiederum im Konzentrationsbereich von  $10^{-5}$  mol L $^{-1}$  bis  $10^{-2}$  mol L $^{-1}$ , auf einem aminderivatisierten Objektträger nebeneinander immobilisiert (vgl. Abbildung 66, links). Mannose kann über ihre offenkettige Aldehydform gleichfalls mittels reduktiver Aminierung auf einer Aminoberfläche spezifisch und kovalent gebunden werden. Allerdings ist nach der Reaktion die Ausbildung der Kohlenhydrat-Pyranoseform, die ein notwendiges Strukturmerkmal für die molekulare Erkennung durch das Lektin Concanavalin A darstellt, nicht mehr möglich. Alle Arbeiten, die sich mit der Immobilisierung von nicht-funktionalisierten Kohlenhydraten zur Darstellung von Kohlenhydrat-Arrays beschäftigen, verzichten deshalb auf die Reduktion der entstehenden iminartigen Bindung (vgl. Abschnitt 1.3.5.3). Dadurch ist zwar die Ausbildung der zur Erkennung des Lektins notwendigen Pyranoseform im Gleichgewicht möglich, die Bindungsbildung des Kohlenhydrates auf der Arrayoberfläche bleibt in diesem Fall aber notgedrungen reversibel.



**Abbildung 66:** Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenzintensität der immobilisierten Verbindungen Mannose, Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid, **64** und **58** auf Aminoberflächen nach Hybridisierung mit fluoreszenzmarkiertem Lektin Con A ( $c = 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ); Links: Immobilisierung von Mannose (Spur A) und **58** (Spur B); Rechts: Immobilisierung von Mannose (Sektor A), Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid (Sektor B), **58** (Sektor C) und **64** (Sektor D)

Erwartungsgemäß konnte keine Fluoreszenzintensität an den Stellen gemessen werden, an denen reine Mannose aufgetragen worden war (Spur A, links). In einem weiteren Versuch zeigte sich darüber hinaus der Einfluss des Abstands des immobilisierten Kohlenhydrates von der Arrayoberfläche (Abbildung 66, rechts). Hierbei wurden im direkten Vergleich Mannose (Sektor A), Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid (Sektor B), die „passende“ Aldehydverbindung **58** (Sektor C) und die „nicht-passende“ Aminverbindung **64** (Sektor D) im selben Konzentrationsbereich auf einem aminderivatisierten Glasträger durch reduktive Aminierung immobilisiert. Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid kann im Gegensatz zu Mannose selbst nicht kovalent gebunden werden, bei unspezifischer Adsorption an der Arrayoberfläche bleibt aber die Pyranoseform erhalten. Trotzdem konnten keine Fluoreszenzsignale bei der Auftragung von Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid beobachtet werden. Dieses Ergebnis steht zunächst im Widerspruch zur der Tatsache einer schwachen aber signifikanten Signalintensität bei Auftragung der Aminverbindung **64** in einer Konzentration von  $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ . Diese Verbindung kann gleichfalls nur durch unspezifische Adsorption gebunden werden besitzt aber zusätzlich eine Triethylenglykoleinheit. Wenn man davon ausgeht, dass die Effizienz des Waschprozesses (SP 1, Schritt 7) bei beiden Verbindungen gleich ist, oder, damit gleichbedeutend, beide Verbindungen in gleichem Maße an der Arrayoberfläche unspezifisch haften, bleibt als Erklärung nur die Annahme eines Abstandeffektes. Da Ethylenglykoleinheiten gerade wegen ihres geringen unspezifischen Adsorptionsvermögens auf Glasträgern in der Array-Technologie Verwendung finden, scheint diese Annahme plausibel. Eine Teilmenge der aufgetragenen Moleküle der Verbindung **64** wurde an ihrem Linkerende auf der Glasträgeroberfläche unspezifisch so adsorbiert, dass der zur Erkennung durch das Lektin notwendige Kohlenhydratteil hinreichend weit von der Oberfläche in die Hybridisierungslösung hineinragte. Zumindest bei einer hohen Konzentration von  $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  schien diese Teilmenge auszureichen, um Concanavalin A spezifisch zu binden. Unspezifisch gebundenes Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid haftete dagegen in zu geringem Abstand von der Arrayoberfläche und war aus sterischen Gründen für die Kohlenhydrat-Bindestellen des Lektins nicht zugänglich. Diese Hypothese wird durch die Arbeiten von *Park et al.*<sup>[127]</sup> und *Zhi et al.*<sup>[161]</sup> gestützt, die den Einfluss der Linkerlänge zwischen Arrayoberfläche und Kohlenhydrateinheit bei der molekularen Erkennung durch Lektine untersuchten. Kohlenhydratverbindungen mit kurzen Linkereinheiten führten zu geringeren Signalintensitäten nach der Bindung der korrespondierenden markierten Lektine als solche mit ausreichend langem Linker. Umgekehrt mussten größere Konzentrationen an Kohlenhydrat mit kurzer Linkereinheit immobilisiert werden, um eine vergleichbare Signalintensität nach der Hybridisierung zu erhalten, wie nach Auftragung einer geringeren Konzentration an Kohlenhydrat mit längerer Linkereinheit. Auch

aus der DNA-Array Technologie ist die Relevanz des richtigen Abstandes zwischen Oberfläche und kovalent gebundener Sonde zur fehlerfreien molekularen Erkennung bekannt.<sup>[290]</sup>

Bei allen gezeigten Experimenten zur Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkung konnte die spezifische Bindung des Lektins bei einer Konzentration an immobilisiertem Kohlenhydrat im millimolaren Bereich ( $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  -  $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ) nachgewiesen werden. Dieser Konzentrationsbereich steht im Einklang mit zahlreichen anderen Arbeiten auf dem Gebiet der Kohlenhydrat-Arrays. Von den Ergebnissen der Versuche mit den fluoreszenzmarkierten Kohlenhydraten war aber bekannt, dass eine spezifische kovalente Bindung des Kohlenhydrates auf der Arrayoberfläche bis zu einer minimalen Konzentration im nanomolaren Bereich nachgewiesen werden konnte (vgl. Abschnitt 4.2.4). Folglich müssten auch die unmarkierten funktionalisierten Kohlenhydrate **58** und **64** bei Immobilisierung in diesem geringen Konzentrationsbereich gebunden werden; allerdings reichte ihre Anzahl unterhalb des millimolaren Bereiches nicht zur spezifischen Bindung des Lektins aus. Wie bereits in Abschnitt 4.2.4.3 dargelegt, handelt es sich bei der Konzentrationsabhängigkeit der gemessenen Fluoreszenzintensitäten um einen kinetischen Effekt. Die maximal aufgetragene Konzentration an fluoreszenzmarkiertem Kohlenhydrat betrug  $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  in den entsprechenden Versuchen, die in diesem Abschnitt gezeigten Versuche zeigen aber auch eine Konzentrationsabhängigkeit der Signalintensität im millimolaren Bereich. Bis mindestens zu einer Konzentration von  $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  können bei einer Reaktionszeit von 12 bis 16 Stunden folglich nicht alle auf der Arrayoberfläche zugänglichen funktionellen Gruppen durch reduktive Aminierung mit einem passend funktionalisierten Kohlenhydrat abgesättigt werden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Experimente mit den fluoreszenzmarkierten Verbindungen ist bei den in diesem Abschnitt besprochenen Resultaten zusätzlich der Aspekt der Polyvalenz der Kohlenhydrat-Lektin-Bindung zu berücksichtigen. Concanavalin A besitzt, wie die meisten Lektine, mehrere Kohlenhydratbindestellen, wodurch sich die Bindung zu polyvalenten Liganden im Vergleich zu monovalenten drastisch verstärkt. Dieser Effekt ist bei zahlreichen Versuchen zur molekularen Erkennung in Lösung nachgewiesen worden, bei der prinzipiell jede Kohlenhydratbindestelle unabhängig von der Anzahl der bereits am Lektin gebundenen Liganden für weitere Liganden zugänglich ist. Auf einer Arrayoberfläche sollten zumindest zwei der vier Kohlenhydratbindestellen von Concanavalin A gleichzeitig an dort immobilisierte Mannoseliganden binden können, wodurch bereits ein Polyvalenzeffekt erreicht wird. Möglicherweise ist auch die gleichzeitige Bindung von drei oder allen vier Bindestellen sterisch möglich, da die Chipoberfläche, auf molekularer Ebene betrachtet, nicht planar ist. Aus diesem Grund wurde bereits die Behauptung aufgestellt, dass es sich bei einem Kohlenhydratarray prinzipiell um eine polyvalente Anordnung von Zuckerliganden handelt.<sup>[144, 291]</sup> Die festgestellte

Konzentrationsabhängigkeit der Signalintensitäten kann also nicht nur eine Folge der steigenden Reaktionsgeschwindigkeit mit zunehmender Konzentration an zur Verfügung stehendem Kohlenhydrat sein, sondern sie kann auch durch eine polyvalente Verstärkung der Bindung des Lektins hervorgerufen werden. Eine Unterscheidung der beiden Effekte war aufgrund der vorliegenden Daten jedoch nicht möglich. Da es sich bei der Immobilisierungsreaktion um eine Reaktion pseudo-erster Ordnung handelt und zudem die Reaktionszeit für alle Kohlenhydratspots auf einem Glasträger dieselbe ist, sollte die Konzentration an gebundenem Kohlenhydrat zunehmen mit der Anfangskonzentration der aufgetragenen Kohlenhydratlösung pro Spot. Damit sollte auch die gemessene Fluoreszenzintensität nach der Hybridisierung des Lektins mit der aufgetragenen Anfangskonzentration des Kohlenhydrates in gleichem Maße steigen. Tritt dagegen im betrachteten Konzentrationsbereich zusätzlich ein Polyvalenzeffekt bei der molekularen Erkennung zwischen Kohlenhydrat und Lektin auf, so sollte die gemessene Fluoreszenzintensität in stärkerem Maße steigen als allein durch die aufgetragenen Anfangskonzentrationen des Kohlenhydrates verursacht. Somit ist eine Unterscheidung der beiden Effekte prinzipiell möglich; mit der gegebenen Schwankungsbreite bzw. Reproduzierbarkeit der gemessenen Fluoreszenzsignale unter gleichartigen Bedingungen gelang dies ihm Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht.

### 4.3.1.3 Untersuchungen zum Detektionslimit

In der Folge wurde versucht durch Optimierung der Reaktionsbedingungen bzw. durch Einsatz von Blockierungsreagenzien das Detektionslimit der Kohlenhydrat-Lektin-Erkennung hin zu geringeren Konzentrationen an aufgetragenem Kohlenhydrat auszuweiten. Blockierungsreagenzien werden in der Array-Technologie eingesetzt, um die nicht-spezifische Adsorption von Probenmolekülen auf der Trägeroberfläche zu verhindern. Der Blockierungsschritt erfolgt dabei nach der Immobilisierung der Sondenmoleküle, aber vor der Hybridisierung der Probenmoleküle auf dem Chip. Zwei Arten von Blockierungsreagenzien werden eingesetzt, die auch kombiniert werden können: Einerseits werden niedermolekulare Moleküle verwendet, die mit den noch auf der Arrayoberfläche vorhandenen funktionellen Gruppen reagieren und dieses damit absättigen. Dazu werden in vielen Fällen die funktionalisierten Linkermoleküle ohne das Sondenmolekül selbst eingesetzt, z. B. monofunktionalisierte Glykole, aber auch z.B. Ethanolamin zur Absättigung elektrophiler funktioneller Gruppen auf der Arrayoberfläche. Andererseits werden höhermolekulare Proteinlösungen verwendet, die sich unspezifisch auf der Arrayoberfläche anlagern und somit die gleichfalls unspezifische Haftung des Probenmoleküls verhindern. Am häufigsten eingesetzt

wird hierfür das Rinderserumalbumin (BSA). Protein-Array-Experimente sind ohne einen Blockierungsschritt zur Vermeidung unspezifischer Haftung nicht sinnvoll durchführbar, auch bei ELISA- oder ELLA-Versuchen gehört ein Blockierungsschritt zum Standardablauf. Weil auch Lektine Proteine sind, die zur unspezifischen Adsorption auf unpolaren Oberflächen neigen, werden in den meisten in der Literatur beschriebenen Kohlenhydrat-Array Experimenten Blockierungsschritte durchgeführt, wobei in der Regel 3% BSA-Lösung als Reagenz dient.

In dieser Arbeit wurden funktionalisierte Polyethylenglykole und verschiedene Proteinlösungen getestet:

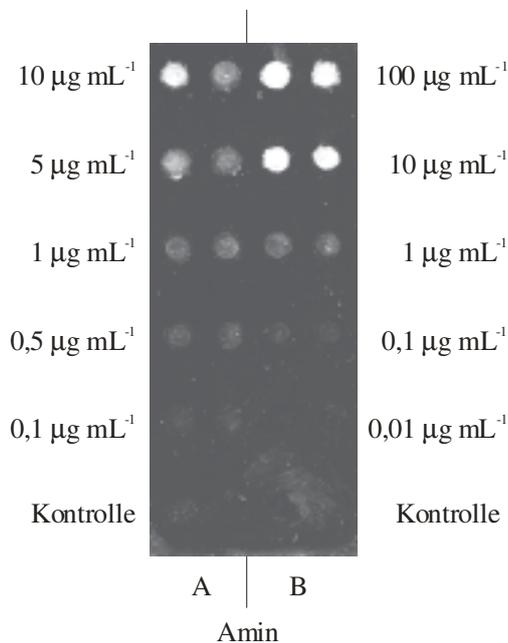
- Polyethylenglykol 1000 Dialdehyd und Polyethylenglykol 1000 Diamin sind kommerziell erhältliche bifunktionelle Mischungen von Polyethylenglykolen mit einem mittleren Molekulargewicht von  $1000 \text{ g mol}^{-1}$ . Sie wurden im Konzentrationsbereich von  $10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$  bis  $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  in PBS-Puffer unter Zusatz des Reduktionsmittels Natriumcyanoborhydrid als Blockierungsreagenzien auf amin- bzw. aldehydderivatisierten Glaträgern eingesetzt. Dabei wurde der gesamte Objektträger während einer Reaktionszeit von 12 bis 16 Stunden bei Raumtemperatur in der Blockierlösung geschwenkt. Nach der Hybridisierung mit markiertem Lektin unter Standardbedingungen (SP 2) konnte weder ein geringeres Hintergrundfluoreszenzsignal noch eine Signalintensität bei Konzentrationen an immobilisiertem Kohlenhydrat unterhalb von  $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  festgestellt werden. Insbesondere konnte auch nicht beobachtet werden, dass der vergleichsweise hohe Wert des Hintergrundfluoreszenzsignals auf aldehydfunktionalisierten Objektträgern (vgl. Abbildung 61, links) durch Verwendung von Polyethylenglykol 1000 Diamin als Blockierungsreagenz abgesenkt wurde. In einem weiteren Versuch wurde das Blockierungsreagenz vor Entfernung der Silikonmaske spotweise in einer Konzentrationsreihe zugesetzt, in einer anderen auf demselben Objektträger jedoch durch reine Pufferlösung ersetzt. Im direkten Vergleich der beiden Reihen zeigten sich nach der Hybridisierung etwas höhere Signalintensitäten bei denjenigen Spots einer bestimmten Konzentration, denen kein Blockierungsreagenz zugesetzt worden war. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die getesteten Polyethylenglykole zwar zu einer geringfügigen Verhinderung nicht-spezifischer Adsorption des Lektins beitrugen, aber weder das Signal/Hintergrund-Verhältnis verbessern noch das Detektionslimit herabsetzen konnten.
- Milchpulver (3% in PBS-Puffer) und eine kommerziell erhältliche Proteinmischung unbekannter Zusammensetzung, die als Blockierungsreagenz für Western-Blot-Experimente eingesetzt wird, (3% in PBS-Puffer) wurden ebenfalls als

Blockierungsreagenzien untersucht. Sie zeigten einen gegenteiligen Effekt, d.h. die unspezifische Adsorption des Lektins auf der Arrayoberfläche nach der Hybridisierung und damit das gemessene Hintergrundfluoreszenzsignal nahmen im Vergleich sogar zu.

- Die Verwendung von BSA-Lösungen (1-3% in PBS-Puffer) als Blockierungsreagenz hatte keine Auswirkungen auf die Stärke des Hintergrundfluoreszenzsignals oder das Detektionslimit.

Da die erhofften positiven Wirkungen eines Blockierungsschrittes nicht festgestellt werden konnten, wurde in allen weiteren Chipexperimenten auf diesen Schritt verzichtet.

Eine weitere Möglichkeit zur Herabsetzung des Detektionslimits an immobilisiertem Kohlenhydrat besteht möglicherweise in der Erhöhung der zur Hybridisierung verwendeten Lektinkonzentration (SP 2, Schritt 2). Deshalb wurde zunächst Verbindung **58** in einer Konzentration von  $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  auf einem aminderivatisierten Glasträger durch reduktive Aminierung immobilisiert. Anschließend wurde, ohne vorherige Entfernung der Silikonmaske, eine spotweise Hybridisierung mit Concanavalin A-Lösung im Konzentrationsbereich von  $0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$  bis  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  durchgeführt, gefolgt von Waschschrritten. Schließlich wurde die Silikonmaske entfernt, der Objektträger als ganzes nochmals gewaschen und mit Hilfe des Array-Scanners die resultierende Fluoreszenzintensität gemessen (vgl. Abbildung 67).



**Abbildung 67:** Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität bei Variation der Lektinkonzentration nach spotweiser Hybridisierung von immobilisierter Verbindung **58** ( $c = 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ) auf einer Aminoberfläche.

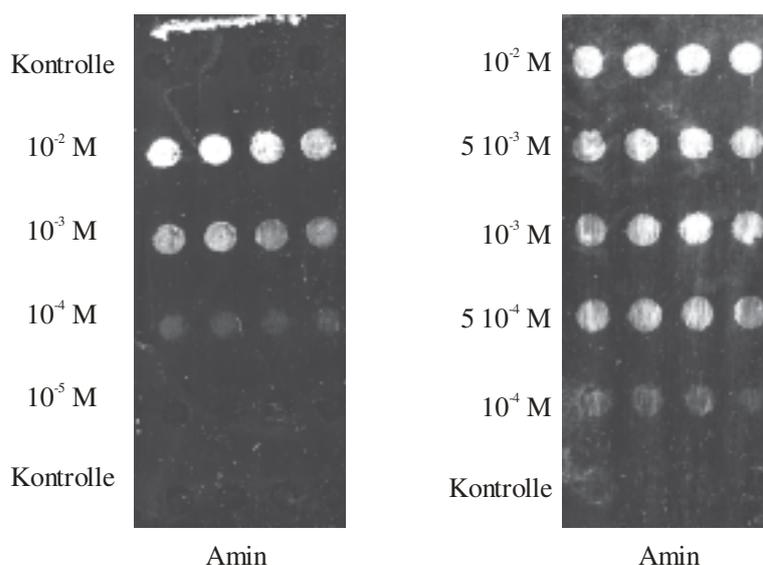
Dabei konnten, wie zu erwarten, steigende Fluoreszenzsignalintensitäten mit zunehmender Lektinkonzentration beobachtet werden. Das Detektionslimit wurde bei einer Konzentration von

0,1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  erreicht. In der Folge wurden Arrays mit geringeren Konzentrationen an immobilisiertem Kohlenhydrat **58** ( $10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> bis  $10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>) präpariert und als ganzes in Concanavalin A-Lösungen einer Konzentration von 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  oder 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  hybridisiert. Dabei zeigte sich jedoch, dass mit der steigenden Signalintensität bei einer bestimmten Konzentration an immobilisiertem Kohlenhydrat nach der Hybridisierung in konzentrierter Lektinlösung das Fluoreszenz-Hintergrundsignal in gleichem Masse anstieg. Aus dieser Tatsache kann geschlossen werden, dass eine höhere Lektinkonzentration zu höherer nicht-spezifischer Adsorption des Lektins auf der Glasoberfläche führt. Wurde die Waschzeit nach der Hybridisierung entsprechend verlängert (SP 2, Schritt 3), nahm zwar die Intensität der Hintergrundfluoreszenz wieder ab, aber in gleichem Maße verringerte sich gleichfalls die Signalintensität der Kohlenhydratspots. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass durch eine Erhöhung der Lektinkonzentration während der Hybridisierung das Detektionslimit an immobilisiertem Kohlenhydrat nicht herabgesetzt werden konnte.

### 4.3.1.4 Immobilisierung durch Ausbildung von Carbonsäureamidbindungen

Als nächstes wurde die kovalente Immobilisierung auf funktionalisierten Glaträgern durch Ausbildung einer Carbonsäureamidbindung mit Hilfe der carboxylderivatisierten Mannose **65** untersucht. Aufbauend auf den mit der reduktiven Aminierung als Verknüpfungsmethode gewonnenen Erfahrungen wurde Verbindung **65** im Konzentrationsbereich von  $10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> bis  $10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup> auf aminderivatisierten Glaträgern immobilisiert. Das dazu entwickelte Protokoll zur Darstellung von Kohlenhydrat-Arrays unterschied sich allerdings in einigen Punkten vom bisher benutzten Standardprotokoll 1. Eine Kohlenhydratstammllösung wurde zunächst in absolutem DMF hergestellt. Nach deren Verdünnung zu verschiedenen Konzentrationen wurden zu jeder Konzentration 1,1 Äquivalente einer PyBOP-Lösung in DMF als Kupplungsreagenz und 3 Äquivalente einer Lösung von Hünigs Base in DMF zugesetzt, so dass die genannten Kohlenhydratkonzentrationen schließlich bei der Auftragung auf den Chip erreicht wurden. Die Lösungen wurden unmittelbar vor jeder Präparation eines Arrays frisch hergestellt. Nach dem Transfer der Kohlenhydratlösungen in die Vertiefungen der Silikonmaske wurden diese durch einen zweiten, nicht-funktionalisierten Objektträger abgedeckt, um die Verdunstung der Reaktionslösung zu vermeiden. Nach einer Reaktionszeit von 12 bis 16 Stunden in einem nicht-evakuierten Exsikkator wurden die Spots abgesaugt, mit DMF spotweise gewaschen, die Silikonmaske entfernt und der ganze Array schließlich in 0,1% SDS-Lösung gewaschen. Die

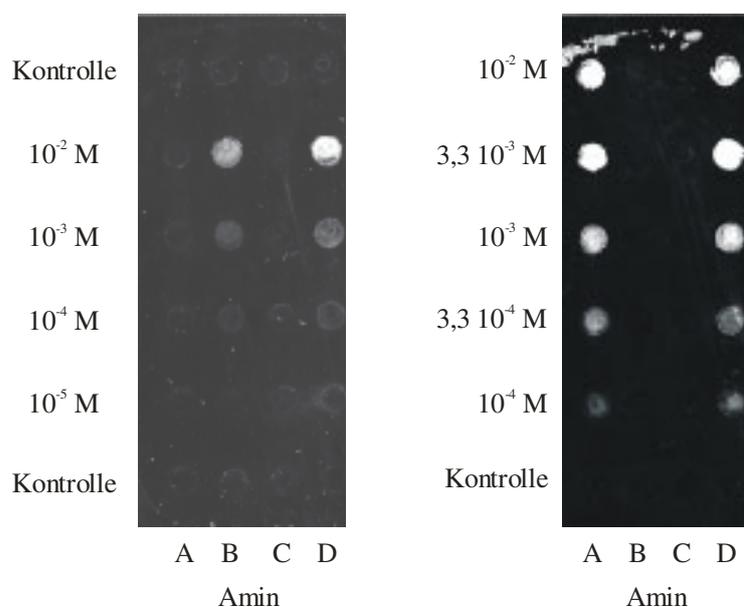
Hybridisierung mit dem Lektin Concanavalin A erfolgte anschließend nach dem Standardprotokoll 2, die dabei erhaltenen Chipbilder sind in Abbildung 68 dargestellt.



**Abbildung 68:** Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenzintensität der durch Carbonsäureamidbildung immobilisierten Verbindung **65** auf einer Aminoberflächen nach Hybridisierung mit fluoreszenzmarkiertem Lektin Con A ( $c = 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Wie im Falle der reduktiven Aminierung als Immobilisierungsmethode konnten konzentrationsabhängige Fluoreszenzsignale im Konzentrationsbereich von  $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  bis  $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  beobachtet werden. Somit konnte eine zweite Methode zur Darstellung von Kohlenhydratarrays auf aminderivatisierten Objektträgern etabliert werden. Nachteilig an diesem Verfahren ist allerdings die Tatsache, dass in wasserfreiem DMF gearbeitet werden muss; somit verbietet sich eine Lagerung der Arrays während der Reaktionszeit der Immobilisierung in einer Feuchtekammer. Als Folge trat bei manchen Experimenten eine merkliche Verdunstung der Reaktionslösung auf, was zu zusätzlichen Inhomogenitäten in den Signalintensitäten mancher Spots führte. Wenn dieses Verdunstungsproblem nicht auftrat, war die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der beiden Immobilisierungsmethoden insgesamt vergleichbar (Schwankungen von maximal 30% in der Signalintensität bei gleichartig präparierten Kohlenhydratspots).

In weiteren Versuchen wurde auch bei dieser Methode die Spezifität der kovalenten Bindungsbildung näher untersucht. Verbindung **65** wurde im Konzentrationsbereich von  $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  bis  $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  mit oder ohne Zusatz des Kupplungsreagenz PyBOP auf aminderivatisierten Glasträgern aufgetragen (vgl. Abbildung 69).



**Abbildung 69:** Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenzintensität der durch Carbonsäureamidbildung immobilisierten Verbindung **65** auf Aminoberflächen nach Hybridisierung mit fluoreszenzmarkiertem Lektin Con A ( $c = 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ); Immobilisierung mit und ohne Verwendung des Kupplungsreagenzes PyBOP bzw. von Hünigs Base; Links: nur **65** (Spur A), **65** und PyBOP (Spur B), **65** und Hünigs Base (Spur C), **65** und PyBOP und Hünigs Base (Spur D); Rechts: **65** und PyBOP und Hünigs Base (Spur A und D), **65** und Hünigs Base (Spur B und D).

Nur bei Zusatz des Kupplungsreagenzes konnten konzentrationsabhängige Signalintensitäten beobachtet werden (Spur B und D, links und Spur A und D, rechts). Ohne PyBOP konnte auch bei einer hohen Konzentration von  $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  an aufgetragenem Kohlenhydrat keine Fluoreszenz über dem Hintergrundwert gemessen werden; nicht-spezifische Adsorption scheint bei dieser Methode eine geringere Rolle zu spielen. Schwächere konzentrationsabhängige Intensitäten wurden erhalten, wenn PyBOP zugegeben, aber Hünigs Base weggelassen wurde. Die Kupplungsreaktion fand in diesem Fall offensichtlich mit verringerter Reaktionsgeschwindigkeit statt (Spur B, links).

In weiteren Versuchen wurde EDC als Kupplungsreagenz zur Ausbildung von Carbonsäureamidbindungen zwischen der carboxylierten Mannose **65** und aminderivatisierten Glaträgern untersucht. Diese Verbindung besitzt den Vorteil, dass sie in wässriger Lösung eingesetzt werden kann. Dazu wurde eine Stammlösung von Verbindung **65** in Wasser dargestellt und diese nach Zugabe von EDC (1,1 Äquivalente in Wasser) und Hünigs Base (3 Äquivalente in Wasser) und entsprechender Verdünnung analog zum oben beschriebenen Protokoll auf aminderivatisierten Glaträgern immobilisiert. Die Verdünnungen wurden dabei so gewählt, dass sich der bereits bekannte Konzentrationsbereich von  $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  bis  $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  an aufgetragenem Kohlenhydrat ergab. Nach der Hybridisierung mit rhodaminmarkiertem Concanavalin A konnten jedoch keine deutlichen Fluoreszenzintensitäten gemessen werden. Lediglich bei der hohen Konzentration von  $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  an aufgetragenem Kohlenhydrat waren

schwache Signalintensitäten feststellbar, die über das Hintergrundsignal hinausreichten (Bilder nicht gezeigt). Diese waren aber signifikant schwächer als diejenigen Intensitäten, die mit Hilfe der beiden anderen Immobilisierungsmethoden erhalten werden konnten. Weder einer Erhöhung der EDC-Konzentration, der Konzentration an Hünigs Base noch der Reaktionsdauer brachten eine deutliche Verbesserung der Ergebnisse. Dieser Befund steht in Widerspruch zu verschiedenen Arbeiten, die von der erfolgreichen Darstellung von Kohlenhydrat-Arrays mit dieser Kupplungsmethode (EDC) berichten.<sup>[168, 207]</sup>

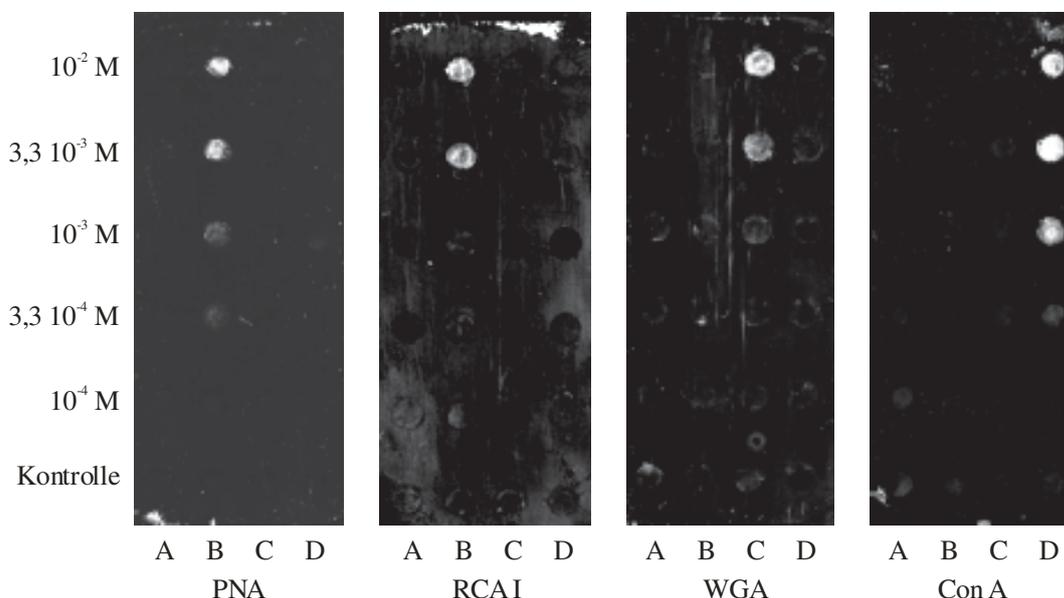
### 4.3.1.5 Fazit

Die Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkung auf Kohlenhydrat-Arrays konnte durch Immobilisierung der Mannoseverbindungen **58**, **64** und **65** durch reduktive Aminierung bzw. Ausbildung von Carbonsäureamidbindungen und anschließender Hybridisierung mit fluoreszenzmarkiertem Lektin Concanavalin A ( $c = 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) nachgewiesen werden. Dabei konnten konzentrationsabhängige Fluoreszenzintensitäten im Bereich von  $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  bis  $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  an aufgetragenem Kohlenhydrat beobachtet werden. Bei Kombination der aldehydfunktionalisierten Verbindung **58** und aminderivatisierten Objektträgern konnten im Vergleich bessere Ergebnisse (höhere Intensitäten und geringeres Fluoreszenzhintergrundsignal) erzielt werden als bei Auftragung von Verbindung **64** auf Aldehydoberflächen. Schwächere Signalintensitäten wurden bei Kombination nicht-passender funktioneller Gruppen oder bei Verzicht auf das Kupplungsreagenz (Natriumcyanoborhydrid bzw. PyBOP) festgestellt; diese waren auf unspezifische nicht-kovalente Bindungen der Kohlenhydrate auf der Chipoberfläche oder auf die zwar kovalente aber reversible Ausbildung von Iminbindungen zurückzuführen. Die Immobilisierung von Verbindung **65** durch Ausbildung von Carbonsäureamidbindungen gelang zwar mit Hilfe des Kupplungsreagenzes PyBOP in absolutem DMF als Lösungsmittel nicht jedoch mit EDC in wässriger Lösung. Auch bei den Versuchen zur Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkung konnte durch Verwendung von Silikonmasken die Reproduzierbarkeit der Messwerte verbessert werden. Unspezifische Haftung des Lektins auf der Arrayoberfläche trat bei der verwendeten Konzentration zur Hybridisierung von  $c = 1 \mu\text{g mL}^{-1}$  nur in geringem Maße auf (auf Hydroxy- und Aldehydoberflächen stärker als auf Aminoberflächen), so dass der Einsatz verschiedener Blockierungsreagenzien keine Verbesserung der Ergebnisse brachte; insbesondere konnte das Detektionslimit nicht unter eine Konzentration von  $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  an aufgetragenem Kohlenhydrat abgesenkt werden. Dies gelang gleichfalls nicht durch eine Erhöhung der Lektinkonzentration bei der Hybridisierung.

### 4.3.2 Untersuchungen zur Selektivität der Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkung

Die bisher beschriebenen Untersuchungen zur kovalenten Immobilisierung von Kohlenhydraten auf funktionalisierten Glaträgern mittels reduktiver Aminierung und Carbonsäureamidbildung und ihrer Wechselwirkung mit Lektinen wurden mit dem am besten untersuchten System zwischen den  $\alpha$ -Mannosiden **58**, **64** und **65** und dem Lektin Concanavalin A durchgeführt. Im Folgenden wird auf Array-Experimente mit anderen Lektinen eingegangen, durch die die Selektivität der Kohlenhydrat-Lektin-Bindung auf dem Chip nachgewiesen werden konnte.

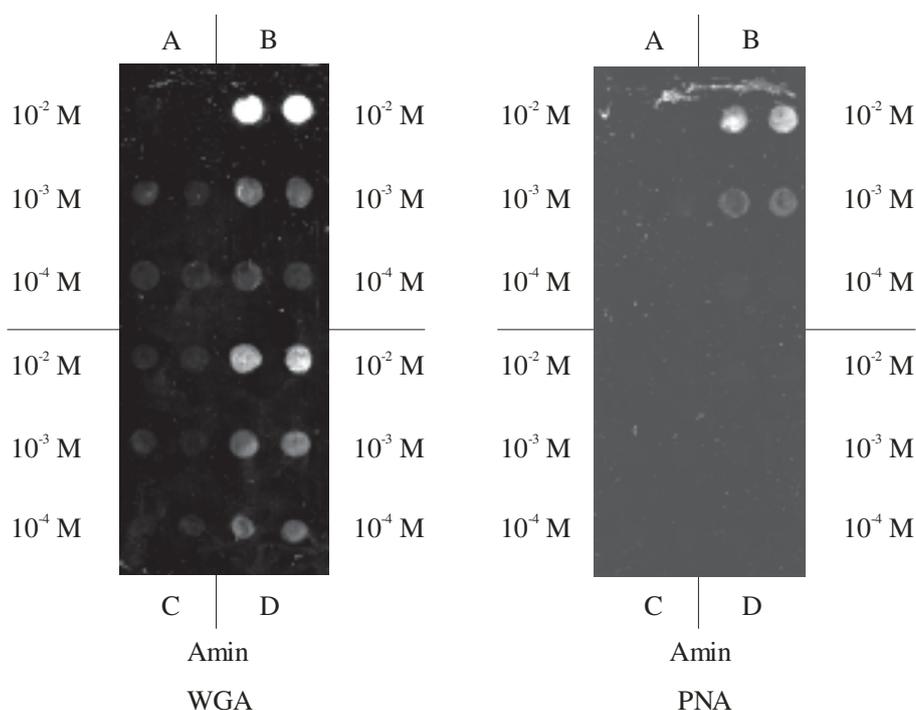
Dazu wurde ein Standard-Kohlenhydrat Array mehrmals hergestellt, bei dem die drei verschiedenen aldehydderivatisierten Kohlenhydrate **58**, **60** und **61** durch reduktive Aminierung im Konzentrationsbereich von  $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  bis  $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  nach dem SP 1 kovalent in verschiedenen Spalten auf dem Chip immobilisiert wurden. Polyethylenglykol 1000 Dialdehyd wurde als Negativkontrolle im selben Konzentrationsbereich gleichfalls kovalent gebunden. Anschließend erfolgte die Hybridisierung mit verschiedenen rhodaminmarkierten Lektinlösungen ( $c = 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) unterschiedlicher Bindungsspezifität. Die Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen sind in Abbildung 70 dargestellt.



**Abbildung 70:** Selektivität der Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkung nach Immobilisierung von Polyethylenglykol 1000 Dialdehyd (Spur A), Lactoseverbindung **61** (Spur B), *N*-Acetylglucosaminverbindung **60** (Spur C) und Mannoseverbindung **58** (Spur D) und Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Lektinen PNA (außen links), RCA I (Mitte links), WGA (Mitte rechts) und Con A (außen rechts), (jeweils  $c = 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Die bekannten Bindungsspezifitäten der Kohlenhydrat-Lektin-Erkennung konnten erwartungsgemäß bestätigt werden: Concanavalin A wurde spezifisch nur von der  $\alpha$ -Mannose **58** erkannt (außen rechts), WGA nur von der  $\beta$ -*N*-Acetylglucosaminverbindung **60** (Mitte rechts) und die beiden Lektine PNA und RCA I wurden ausschließlich von der Lactoseverbindung **61** erkannt (Mitte und außen links). Kreuzsignale konnten in keinem Fall detektiert werden. Die Kontrollverbindung Polyethylenglykol 1000 Dialdehyd führte gleichfalls zu keiner Lektinbindung. Das Detektionslimit lag bei allen untersuchten Lektinen im Idealfall bei einer Konzentration an immobilisiertem Kohlenhydrat von  $10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>. Abbildung 70 kann dabei nicht als Maßstab für einen relativen Vergleich der Bindungsstärken der einzelnen Lektine dienen: Erstens wurden die abgebildeten Chipbilder bei unterschiedlicher Detektorempfindlichkeit aufgenommen und zweitens unterschieden sich die kommerziell erworbenen Lektine laut Herstellerangaben im Grad ihrer Fluoreszenzmarkierung (WGA: durchschnittlich 2 Fluorophore pro Molekül, Con A: durchschnittlich 8 Fluorophore pro Molekül).

In weiteren Versuchen wurde das Ausmaß der nicht-spezifischen Adsorption von Kohlenhydraten auf der Arrayoberfläche in analogen Experimenten untersucht, wie sie bereits für das System Mannose/Concanavalin A durchgeführt worden waren und in Abschnitt 4.3.1 beschrieben worden sind. Dazu wurden zunächst in einem Experiment neben der Aldehydverbindung **60** auch die entsprechende Aminverbindung **G**, *N*-Acetylglucosamin und Glucose (vgl. Abbildung 71, links) sowie in einem zweiten Experiment die Aldehydverbindung **61**, die entsprechende Aminverbindung **E**, Galactose und Lactose (vgl. Abbildung 71, rechts) jeweils durch reduktive Aminierung im Konzentrationsbereich von  $10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> bis  $10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup> auf aminderivatisierten Objektträgern nebeneinander immobilisiert. Dargestellt sind die Chipbilder nach der Hybridisierung mit den fluoreszenzmarkierten Lektinen WGA (links) bzw. PNA (rechts).



**Abbildung 71:** Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenzintensität der immobilisierten Verbindungen *N*-Acetylglucosamin, Glucose, **60** und **G** bzw. Lactose, Galactose, **61** und **E** auf Aminoberflächen nach Hybridisierung mit fluoreszenzmarkiertem Lektin Con A (links) bzw. PNA (rechts), ( $c = 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ); Links: Immobilisierung von *N*-Acetylglucosamin (Sektor A), **60** (Sektor B), Glucose (Sektor C) und **G** (Sektor B). Rechts: Immobilisierung von Galactose (Sektor A), **61** (Sektor B), Lactose (Sektor C) und **E** (Sektor D).

WGA erkannte spezifisch die beiden  $\beta$ -*N*-Acetylglucosaminverbindungen **60** (Sektor B) und **G** (Sektor D) im aufgetragenen Konzentrationsbereich, obwohl nur erstere durch reduktive Aminierung kovalent auf der Arrayoberfläche immobilisiert werden konnte. Wie schon im entsprechenden Experiment mit dem Mannose/Concanavalin A-System beobachtet, wurde auch in diesem Fall die „nicht-passende“ Aminverbindung **G** auf der Chipoberfläche zu einem bestimmten Anteil nicht-kovalent gebunden und folglich durch das Lektin erkannt. *N*-Acetylglucosamin (Sektor A) und Glucose (Sektor C) können zwar durch reduktive Aminierung über ihre offenkettige Aldehydform kovalent an Amingruppen gebunden werden, jedoch nur unter Verlust ihrer für die molekulare Erkennung notwendigen Pyranoseform, weshalb keine Fluoreszenzintensitäten infolge von Lektinerkennung gemessen werden konnten. Im Fall des Lactose/PNA-Systems zeigte sich dagegen ein anderes Bild: Lediglich die „passende“ aldehydderivatisierte Lactoseverbindung **61** (Sektor B) wurde durch das Lektin erkannt, nicht jedoch die analoge aminderivatisierte Verbindung **E** (Sektor D), obwohl auch diese zu einem bestimmten Anteil nicht-kovalent gebunden auf der Arrayoberfläche vorliegen musste. Darüber hinaus wurde Galactose (Sektor A) erwartungsgemäß nicht erkannt (Verlust der Pyranoseform durch reduktive Aminierung), aber ebenso wenig Lactose (Sektor C). Dieses Resultat war nicht unbedingt zu erwarten, da für die Erkennung durch das Lektin PNA ein

$\beta$ -Galactosyl-Strukturelement ausreichend ist, wie es in der Lactose vorliegt. Durch die reduktive Aminierung ihrer offenkettigen Form wird jedoch nur der Pyranosering der Glucoseeinheit der Lactose zerstört während der  $\beta$ -Galactosylteil intakt bleibt. Offenbar reichte aber der Abstand zwischen Chipoberfläche und Galactoseeinheit nicht aus, um die Bindung des Lektins zu ermöglichen. Zusammen mit der fehlenden Erkennung der Verbindung **E** liegt die Vermutung nahe, dass das Lektin PNA verglichen mit den beiden anderen untersuchten einen größeren sterischen Anspruch bei der molekularen Erkennung seines Kohlenhydratepitopes besitzt. Um diese Vermutung zu bestätigen müssten allerdings Immobilisations- und Hybridisierungsversuche mit verschiedenen  $\beta$ -Galactosylverbindungen mit variabler Linkerlänge durchgeführt werden.

### 4.3.2.1 Fazit

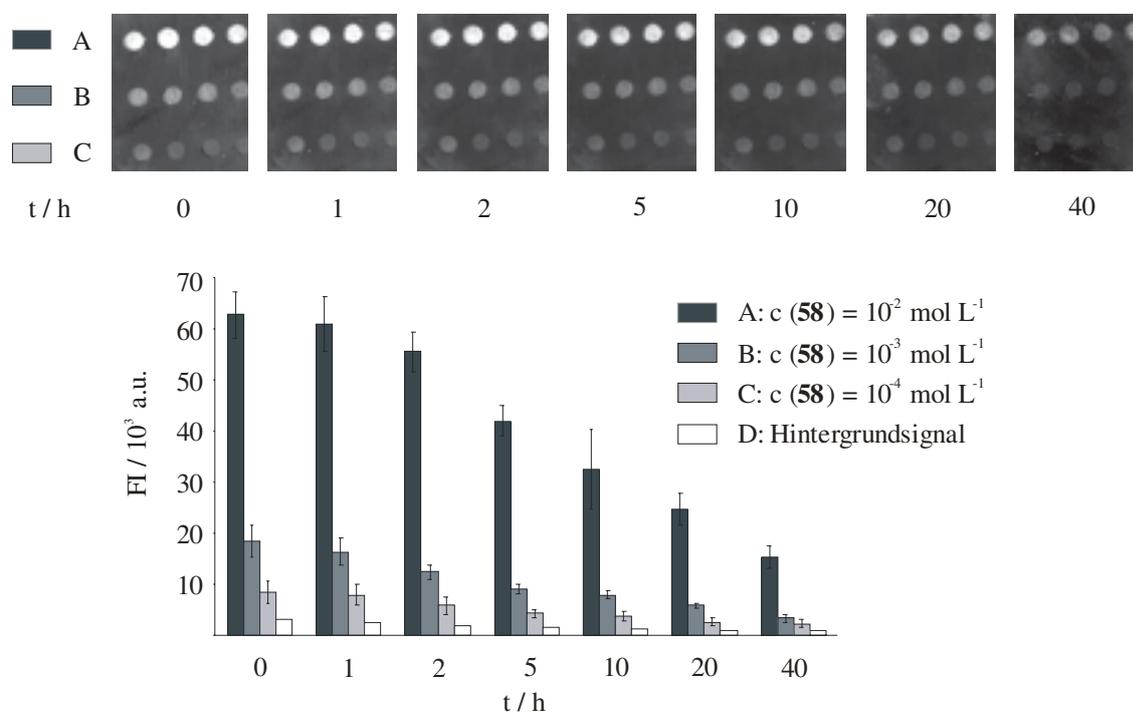
Die Selektivität der Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkung auf Kohlenhydrat-Arrays konnte durch Kreuzexperimente mit den aldehydfunktionalisierten Kohlenhydraten **58**, **60** und **61** sowie den fluoreszenzmarkierten Lektinen Con A, WGA, PNA und RCA I nachgewiesen werden. Die verschiedenen Kohlenhydrate wurden nach der Immobilisierung durch reduktive Aminierung auf aminderivatisierten Objektträgern bei Hybridisierungsexperimenten ausschließlich von ihren bekannten komplementären Lektinpartnern erkannt.

### 4.3.3 Untersuchungen zur Reversibilität der Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkung

In den beiden vorangegangenen Abschnitten wurde die Spezifität und Selektivität der Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkung auf Arrayoberflächen nachgewiesen. Die nicht-kovalente Bindung zwischen immobilisiertem Kohlenhydrat als Probe und fluoreszenzmarkiertem Lektin als Sonde sollte jedoch nicht nur spezifisch und selektiv, sondern auch reversibel sein. Gebundenes Lektin sollte sich wieder von der Arrayoberfläche entfernen lassen, die gemessene Fluoreszenzintensität sollte folglich wieder abnehmen und schließlich vollständig verschwinden. Inwiefern diese Annahmen zutreffen wurde durch verschiedene Wasch- und Elutionsexperimente überprüft.

### 4.3.3.1 Untersuchung von eluierenden Reagenzien

Dazu wurde zunächst Verbindung **58** im Konzentrationsbereich von  $10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> bis  $10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup> nach dem SP 1 auf einem aminderivatisierten Glaträger durch reduktive Aminierung immobilisiert. Nach Hybridisierung mit dem markierten Lektin Concanavalin A, Waschen des Arrays in reinem PBS-Puffer für 30 Minuten (SP 2, Schritt 3) und Trocknung (Schritt 4) wurde die resultierende Fluoreszenzintensität zum so definierten Zeitpunkt  $t = 0$  h gemessen (vgl. Abbildung 72, oben links). Nach der Messung wurde derselbe Chip in reinem PBS-Puffer gewaschen, wobei nach bestimmten Zeitintervallen der Waschprozess unterbrochen und, nach Trocknung des Arrays, die Fluoreszenzintensität gemessen wurde. Dieses Verfahren wurde bis zu einer Gesamtwaschdauer von 40 Stunden durchgeführt, die Ergebnisse sind in Abbildung 72 dargestellt.

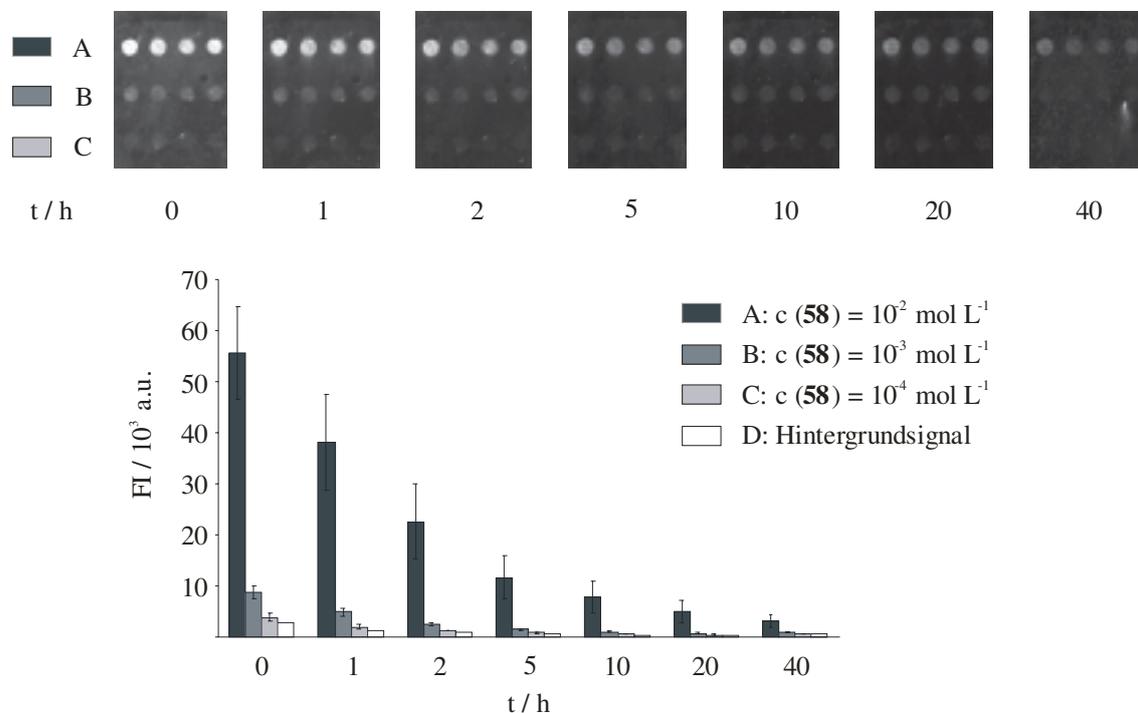


**Abbildung 72:** Reversibilität der Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkung durch Waschen des hybridisierten Arrays in reinem PBS-Puffer. Fluoreszenzintensität nach der Hybridisierung mit fluoreszenzmarkiertem Lektin Con A ( $c = 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $t = 0$  h) und Abnahme bei fortwährendem Waschprozess (1-40 h, oben: Aufnahmen mit Array-Scanner, unten: Messwerte).

Bei allen aufgetragenen Konzentrationen ließ sich wie erwartet eine Abnahme der gemessenen Signalintensitäten mit zunehmender Waschdauer feststellen. Dies galt auch für das Hintergrundsignal, das durch die Auswertung der Fluoreszenzintensität in den Gebieten zwischen den immobilisierten Kohlenhydratspots ermittelt wurde und das als Maß für die nicht-spezifische Adsorption oder Haftung des Lektins auf der Arrayoberfläche interpretiert

werden kann. Allerdings verschwand die Fluoreszenz trotz einer relativ langen Waschdauer von insgesamt 40 Stunden nicht vollständig; bei der hohen Konzentration von  $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  an aufgetragenem Kohlenhydrat lag die gemessene Intensität nach dieser Zeit immer noch auf dem gleichen Niveau wie bei der um eine Größenordnung niedrigeren Konzentration von  $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  unmittelbar nach der Hybridisierung. Selbst der absolut betrachtete niedrige Wert des Hintergrundsignals war nach 40 Stunden Waschprozess noch signifikant größer als derjenige eines unbehandelten Arrays bei gleicher Detektorempfindlichkeit (Bild nicht gezeigt). Offenbar war die Bindung zwischen Kohlenhydrat und Lektin zwar reversibel, aber dennoch so stark, dass die Ablösung des Lektins durch Waschen mit reiner Pufferlösung nur sehr langsam stattfand. Zudem musste ein geringer Anteil des Lektins auf der Arrayoberfläche unspezifisch so adsorbiert sein, dass ein Abwaschen dieser Menge nicht mehr möglich war.

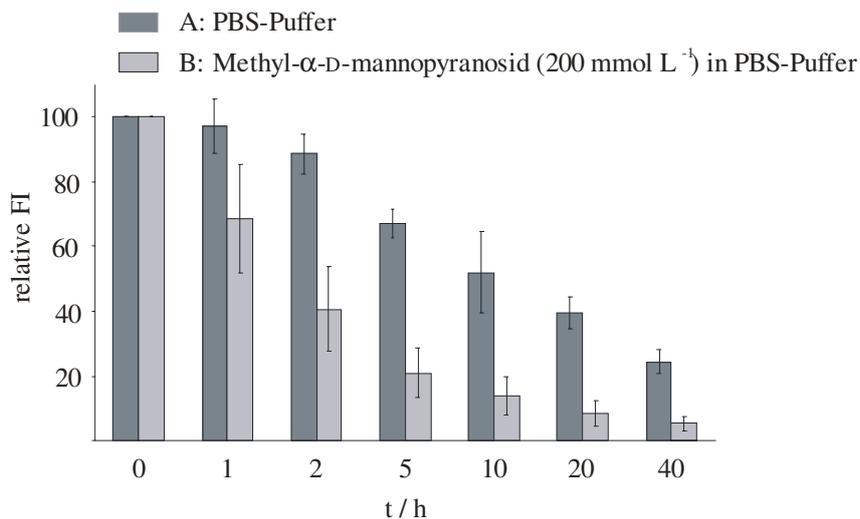
Die Entfernung von spezifisch gebundenem Lektin sollte deutlich schneller sein, wenn in der Waschlösung ein Kompetitor vorhanden ist, der mit den immobilisierten Kohlenhydrat-epitopen um die Bindestellen des Lektins konkurriert. In Analogie zur Affinitätschromatographie kann man dieses Verfahren als Elution des gebundenen Lektins bezeichnen. Das beschriebene Experiment wurde deshalb wiederholt, wobei allerdings in diesem Fall nicht mit reinem PBS-Puffer, sondern mit einer Lösung von Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid in PBS-Puffer ( $200 \text{ mmol L}^{-1}$ ) gewaschen wurde (vgl. Abbildung 73).



**Abbildung 73:** Reversibilität der Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkung durch Elution des hybridisierten Arrays mit Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid in PBS-Puffer ( $200 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Fluoreszenzintensität nach der Hybridisierung mit fluoreszenzmarkiertem Lektin Con A ( $c = 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $t = 0 \text{ h}$ ) und Abnahme bei fortwährendem Elutionsprozess (1-40 h, oben: Aufnahmen mit Array-Scanner, unten: Messwerte).

Die Abnahme der gemessenen Fluoreszenzintensitäten verlief im direkten Vergleich signifikant schneller bei allen aufgetragenen Konzentrationen an immobilisiertem Kohlenhydrat **58** sowie dem Hintergrundsignal. Diese Tatsache liefert einen zu den in den vorherigen beiden Abschnitten beschriebenen Versuchen unabhängigen Beweis für die Spezifität der Bindung zwischen Kohlenhydrat und Lektin auf der Arrayoberfläche, zudem konnte die Reversibilität der Bindung damit eindeutig nachgewiesen werden. Andererseits zeigte sich auch in diesem Experiment, dass das Lektin nicht vollständig entfernbar war. Bei allen aufgetragenen Konzentrationen konnte nach einer bestimmten Elutionszeit keine oder lediglich eine sehr geringer Abnahme in den gemessenen Signalintensitäten bei fortdauernder Elution festgestellt werden. So betrug z.B. für die Konzentration von  $10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup> die Signalintensität nach 10 Stunden Elution nur noch etwa 10% des Maximalwertes unmittelbar nach der Hybridisierung, nahm aber nach weiteren 30 Stunden Elution lediglich auf einen Wert von etwa 5% ab. Vielmehr wurde für jede Konzentration eine bestimmte Endintensität erreicht, deren absoluter Wert mit zunehmender Konzentration an aufgetragenem Kohlenhydrat ebenfalls zunahm. Die Menge an nicht-spezifisch gebundenem und damit nicht mehr entfernbarem Lektin (durch Waschen in reiner Pufferlösung oder durch Elution) scheint folglich auch von der Konzentration an aufgetragenem Kohlenhydrat (d.h. der Dichte an immobilisierten Kohlenhydratepitopen) abhängig zu sein, obwohl bei der Hybridisierung die Konzentration an Lektin für alle Flächenelemente des Arrays gleich groß ist. Oder in anderen Worten: Die gesamte Chipoberfläche ist während allen Hybridisierungs- und Waschprozessen gleichartigen Bedingungen ausgesetzt und trotzdem scheint das Maß für die unspezifische Lektinhaftung an einer bestimmten Stelle auf dem Chip von der dort bestehenden Konzentration an immobilisiertem Kohlenhydrat abzuhängen. Eine mögliche Erklärung für dieses scheinbar widersprüchliche Phänomen wird am Ende dieses Abschnittes gegeben.

In Abbildung 74 sind die Ergebnisse des Wasch- bzw. Elutionsversuches im direkten Vergleich für die Konzentration von  $10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup> dargestellt. Da sich die absoluten Messwerte für beide gleichartig präparierten Chips nach der Hybridisierung ( $t = 0$  h) im Rahmen der bereits erwähnten Reproduzierbarkeit der Signalintensitäten unterschieden, wurden sie jeweils auf einen Wert von 100 normiert. Dadurch lässt sich die prozentuale Abnahme der Werte bei fortschreitendem Waschen- bzw. Elutionsprozess gut verfolgen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Intensitäten der vier Replikate pro Array.

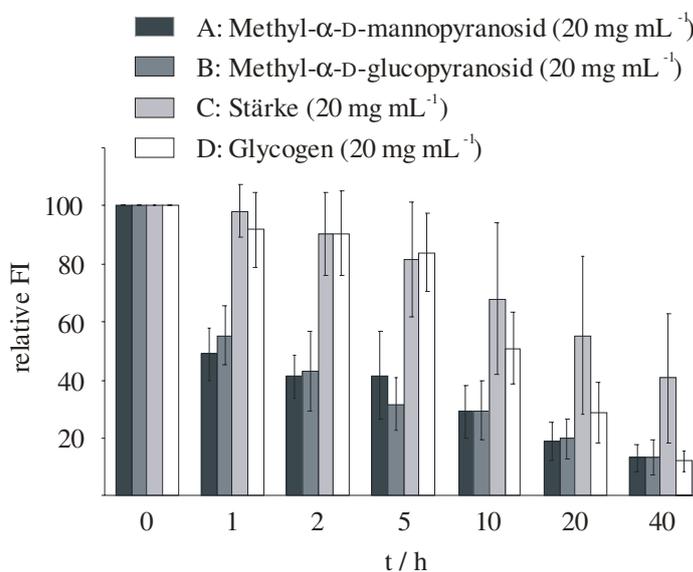


**Abbildung 74:** Vergleich der zeitlichen Abnahme der Fluoreszenzintensität nach Hybridisierung zum Zeitpunkt  $t = 0$  h und fortwährendem Wasch- bzw. Elutionsprozess (1-40 h).

Die graphische Auftragung der Werte für die anderen Konzentrationen lieferte ein gleichartiges Bild, wobei jedoch durch die geringeren absoluten Signalintensitäten ein größerer Fehlerbereich auftrat. Im Vergleich der Abnahmegeschwindigkeit der Signalintensitäten konnten jedenfalls im Rahmen der Messgenauigkeit bei den drei betrachteten Konzentrationen an immobilisiertem Kohlenhydrat keine Unterschiede beobachtet werden (dies trifft sowohl auf das Wasch- als auch auf das Elutionsexperiment zu). Wenn man den Anteil der unspezifischen Lektinhftung vernachlässigt ergab sich eine konzentrationsunabhängige Wasch- bzw. Elutionsgeschwindigkeit. Diese Ergebnisse konnten durch Wiederholung der Versuche bei geringfügig veränderte Wasch- bzw. Elutionsintervallen bestätigt werden. Eine relativ höhere Abnahmegeschwindigkeit der Signalintensität bei geringeren Konzentrationen an aufgetragenem Kohlenhydrat hätte als Hinweis auf eine polyvalente Bindung des Lektins interpretiert werden können.

In einem weiteren Versuch wurde die Wirkung verschiedener Kompetitoren bei Elutionsexperimenten miteinander verglichen. Da das Lektin Concanavalin A neben D-Mannose auch D-Glucose spezifisch bindet (vgl. Abschnitt 1.1.5.2), lag es nahe, Elutionsexperimente mit Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid als Kompetitor durchzuführen. Daneben wurden Stärke und Glycogen überprüft, die als verzweigte Kohlenhydrat-Polymere zur Lektinbindung geeignete endständig gebundene  $\alpha$ -Glucoseeinheiten enthalten. Darüber hinaus sollten sie eventuell in der Lage sein, mehrere Bindestellen eines Concanavalin A-Tetramers gleichzeitig abzusättigen und dadurch dem möglicherweise polyvalenten Kohlenhydratarray als gleichfalls polyvalenter Kompetitor entgegenzutreten – entsprechend schneller sollte die Elution verlaufen. Da die Löslichkeitsgrenze von Stärke in wässriger Lösung bei einem Wert von  $20 \text{ mg mL}^{-1}$  liegt und um die direkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten wurden alle Elutionsexperimente bei dieser Kompetitorkonzentration in PBS-Puffer durchgeführt; dies entspricht bei der Methyl-

$\alpha$ -D-mannopyranosid- und der Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosidlösung einer molaren Konzentration von  $10^3 \text{ mmol L}^{-1}$ , also ungefähr einer halbierten Konzentration verglichen mit dem zuvor beschriebenen Elutionsversuch. Die Ergebnisse dieser Versuche sind für eine Konzentration an immobilisiertem Kohlenhydrat **58** von  $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  in Abbildung 75 dargestellt. Wiederum wurden die Mittelwerte der Intensitäten von vier Replikaten aufgetragen, wobei für jedes Elutionsexperiment der Messwert unmittelbar nach der Hybridisierung auf 100 normiert wurde.



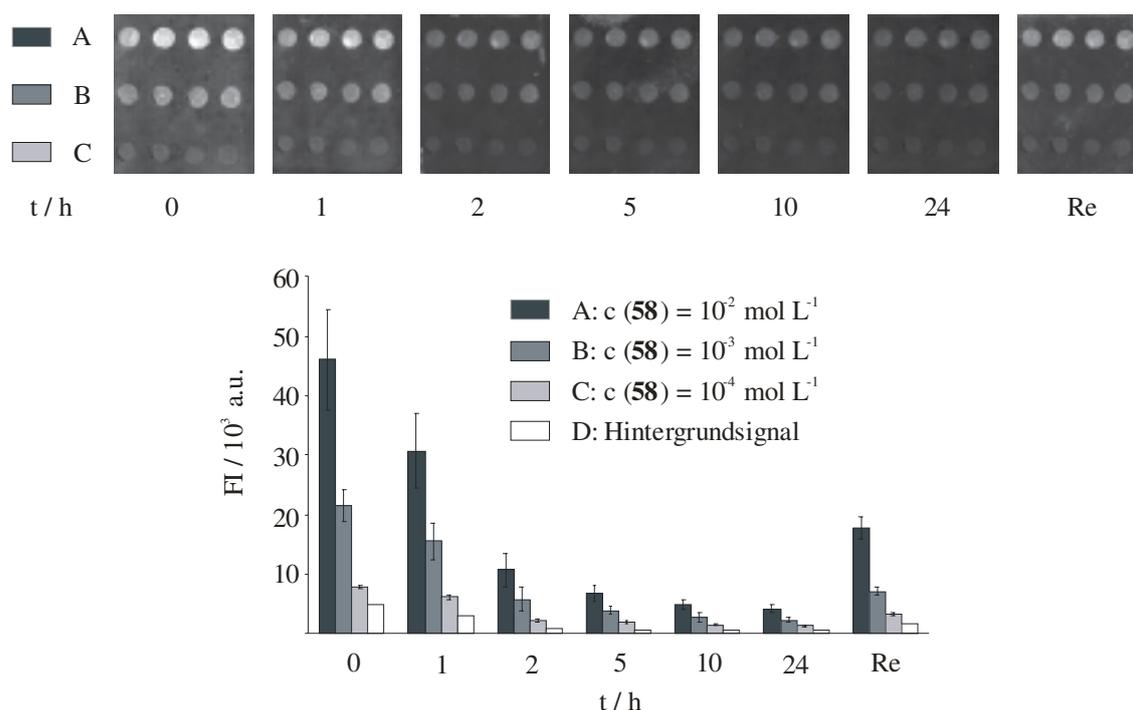
**Abbildung 75:** Vergleich der zeitlichen Abnahme der Fluoreszenzintensität nach Hybridisierung zum Zeitpunkt  $t = 0 \text{ h}$  und fortdauernden Elutionsprozessen mit verschiedenen Kompetitoren in Lösung (1-40 h).

Obwohl D-Mannose verglichen mit D-Glucose eine geringfügig höhere Affinität zu Concanavalin A in Lösung aufweist, konnte bei den durchgeführten Chipexperimenten eine vergleichbare Elutionsgeschwindigkeit mit beiden Methyl- $\alpha$ -D-glycosiden beobachtet werden. Stärke und Glycogen zeigten dagegen nicht den erhofften Effekt als polyvalente Elutionsmittel. Die Elutionsgeschwindigkeit war für beide Substanzen signifikant geringer verglichen mit Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid und lag im Rahmen der Messgenauigkeit nicht über derjenigen des Waschprozesses mit reinem PBS-Puffer.

### 4.3.3.2 Untersuchungen zur Rehybridisierung

Zur Immobilisierung von komplexen Kohlenhydratstrukturen aus biologischen Quellen stehen häufig nur geringe Substanzmengen zur Verfügung. Die mehrmalige Verwendung eines Kohlenhydrat-Arrays zu Hybridisierungsexperimenten ist deshalb wünschenswert. In weiteren Experimenten wurde deshalb untersucht, ob der Nachweis der Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkung auch nach bereits erfolgter erster Hybridisierung und anschließender Elution

des reversibel gebundenen Lektins ein weiteres Mal möglich ist. Dazu wurde zunächst wie in den bereits beschriebenen Experimenten nach Immobilisierung von Verbindung **58** ein Hybridisierungsexperiment mit Concanavalin A durchgeführt und mit Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid gebundenes Lektin wieder eluiert. In bestimmten Zeitintervallen wurde die Elution unterbrochen und die verbliebene Fluoreszenzintensität gemessen. Schließlich wurde nach einer Gesamtelutionszeit von 24 Stunden erneut ein Hybridisierungsexperiment mit fluoreszenzmarkiertem Concanavalin A unter Standardbedingungen durchgeführt und die resultierenden Signalintensitäten gemessen (vgl. Abbildung 76).



**Abbildung 76:** Reversibilität der Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkung durch Elution des hybridisierten Arrays mit Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid in PBS-Puffer ( $200 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Fluoreszenzintensität nach der Hybridisierung mit fluoreszenzmarkiertem Lektin Con A ( $c = 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $t = 0 \text{ h}$ ), Abnahme bei fortwährendem Elutionsprozess (1-24 h) und Rehybridisierung (Re); (oben: Aufnahmen mit Array-Scanner, unten: Messwerte).

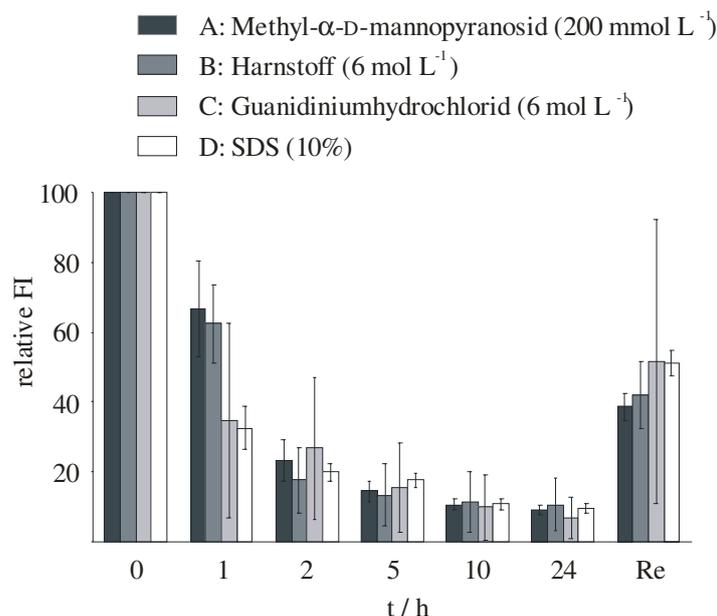
Nach erfolgter Rehybridisierung konnten tatsächlich erneut konzentrationsabhängige Fluoreszenzintensitäten festgestellt werden. Die Signalintensitäten stiegen für alle Konzentrationen an immobilisiertem Kohlenhydrat wieder signifikant an, wobei allerdings in keinem Fall der Wert nach der ersten Hybridisierung wieder erreicht werden konnte. Bei allen Konzentrationen konnten nach der zweiten Hybridisierung ungefähr 30-40% der Fluoreszenzintensitäten der ersten Hybridisierung beobachtet werden. Offenbar wurde die Chipoberfläche durch den ersten Hybridisierungsschritt und/oder die Elutionsschritte so verändert, dass eine erneute Bindung des Lektins zumindest nicht in gleichem Ausmaß möglich war. Durch mehrere Wiederholungen dieses Experimentes konnten die Ergebnisse qualitativ

bestätigt werden, wobei sich zusätzlich deutliche Schwankungen in der relativen Größe der Signalintensität nach der zweiten Hybridisierung zeigten.

Eine Schwierigkeit bei der Interpretation dieser Ergebnisse besteht darin, dass die Anteile an der gemessenen Fluoreszenzintensität zwischen dem beim zweiten Hybridisierungsschritt gebundenen Lektin einerseits und dem nicht vollständig von der Chipoberfläche eluierten Lektin aus dem ersten Hybridisierungsschritt andererseits nicht separiert werden können. Näherungsweise können die gemessenen Intensitäten nach 24 Stunden Elutionszeit herangezogen werden, um den letztgenannten Anteil zu ermitteln. Aus der Differenz der Werte nach dem zweiten Hybridisierungsschritt und diesen Werten kann in der Folge auch der erstgenannte Anteil bestimmt werden. Damit sinkt das beim zweiten Hybridisierungsschritt erreichbare Ausmaß an spezifisch gebundenem Lektin auf eine Größenordnung von etwa 25-30% bezüglich des Wertes der ersten Hybridisierung. Diese Überlegungen vernachlässigen aber die Tatsache, dass auch während des zweiten Hybridisierungsschrittes und des sich anschließenden kurzen Waschschrilles in reinem PBS-Puffer (SP 2, Schritt 3) nicht-spezifisch gebundenes Lektin, das aus dem ersten Hybridisierungsschritt stammt, entfernt bzw. durch intaktes Lektin verdrängt werden kann. Insofern wäre für eine genauere Betrachtung eine Experimentanordnung sinnvoll, bei der beide Hybridisierungsschritte getrennt vermessen und beurteilt werden können. Ein solches Experiment könnte durchgeführt werden, indem für beide Hybridisierungsschritte unterschiedlich markiertes Concanavalin A eingesetzt wird (z.B. Fluoreszenzmarkierung mit den beiden in der DNA-Array-Technologie benutzten Farbstoffen Cy3 und Cy5). Die entsprechenden Lektine waren jedoch kommerziell nicht erhältlich, so dass die Fluoreszenzmarkierung aus unmarkiertem Lektin und den sehr teuren aktivierten Farbstoffen selbst hätte durchgeführt werden müssen. Dabei hätte auch kontrolliert bzw. garantiert werden müssen, dass die beiden resultierenden Lektine sich im Grad ihrer Fluoreszenzmarkierung nicht unterscheiden, damit sinnvolle Aussagen nach den Chipexperimenten überhaupt möglich sind. Aufgrund dieser Unwägbarkeiten wurde die Fluoreszenzmarkierung von Lektinen im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Stattdessen wurden weitere Versuchen derart gestaltet, dass der erste Hybridisierungsschritt mit (kommerziell erhältlichem) unmarkiertem Concanavalin A durchgeführt wurde und, nach Elution mit Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid, die zweite Hybridisierung mit rhodaminmarkiertem Concanavalin A (Bilder nicht gezeigt). Aus diesen Experimenten konnten jedoch keine eindeutigen Schlüsse gezogen werden, da die Messergebnisse sehr unterschiedlich ausfielen. Ohne Markierung des Lektins beim ersten Hybridisierungsschritt kann weder dessen Qualität (und damit auch die Qualität des Immobilisierungsschrittes der Kohlenhydrate) noch die Wirksamkeit des Elutionsprozesses sinnvoll beurteilt werden.

### 4.3.3.3 Untersuchung von denaturierenden Reagenzien und proteolytischem Abbau

Schließlich wurde in weiteren Versuchen untersucht, ob sich spezifisch oder nicht-spezifisch gebundenes Lektin durch aggressive Waschreagenzien wieder entfernen lässt und im Anschluss an diese Behandlung eine vollständige Rehybridisierung des Kohlenhydrat-Arrays möglich wird. Diese Experimente wurden wiederum mit der durch reduktive Aminierung auf aminderivatisierten Glasträgern immobilisierten Verbindung **58** im Konzentrationsbereich von  $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  bis  $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  und folgender Hybridisierung mit rhodaminmarkiertem Concanavalin A durchgeführt. Zunächst wurden Harnstoff ( $6 \text{ mol L}^{-1}$  in Wasser), Guanidiniumhydrochlorid ( $6 \text{ mol L}^{-1}$  in Wasser) und SDS (10% in Wasser) als denaturierende Reagenzien auf ihre Eignung hin untersucht. Die Ergebnisse sind für eine Konzentration an immobilisiertem Kohlenhydrat von  $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  im direkten Vergleich mit Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid als Elutionsmittel in Abbildung 77 wiederum in normierter Form dargestellt.

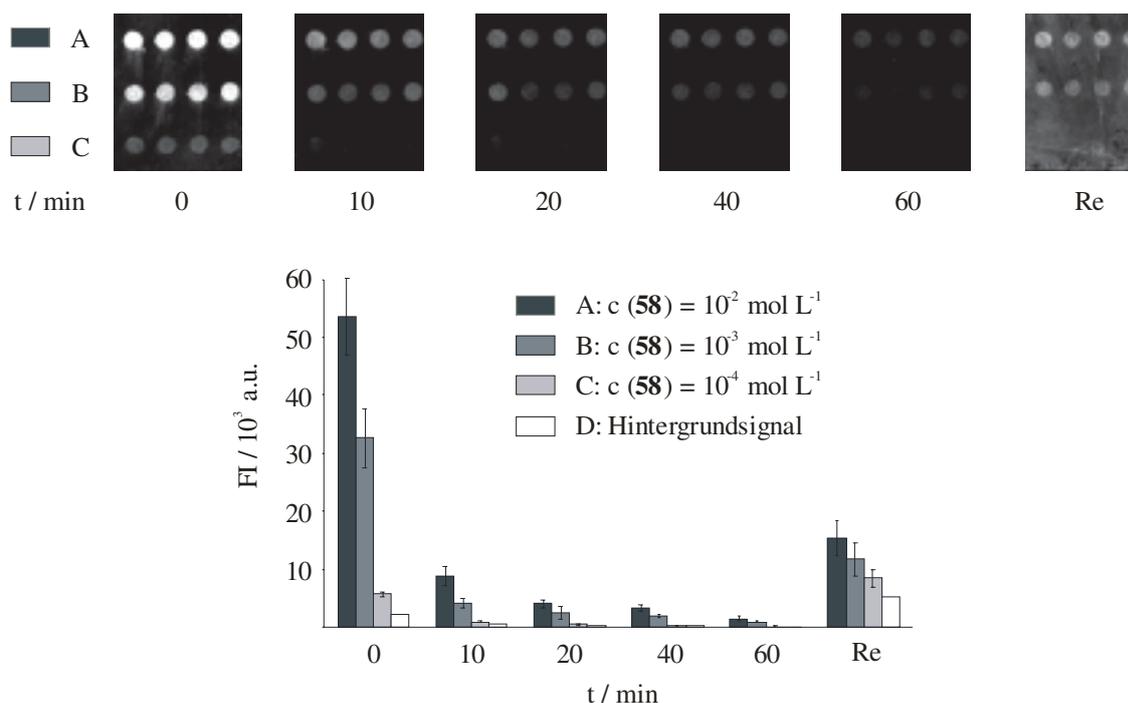


**Abbildung 77:** Vergleich der zeitlichen Abnahme der Fluoreszenzintensität nach Hybridisierung zum Zeitpunkt  $t = 0 \text{ h}$ , fortdauerndem Wasch- bzw. Elutionsprozess mit verschiedenen denaturierenden Reagenzien und Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid (1-24 h) und Rehybridisierung (Re).

Alle drei Reagenzien zeigten im Rahmen der Messgenauigkeit denselben Effekt: Die gemessenen Signalintensitäten nahmen mehr oder weniger in gleichem Maße ab und näherten sich einer Endintensität an, die auch bei fortdauerndem Waschprozess nicht weiter unterschritten werden konnte. Die Geschwindigkeit der Abnahme der Fluoreszenzintensität bewegte sich im

Rahmen der Elutionsgeschwindigkeit mit Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid ( $200 \text{ mmol L}^{-1}$  in PBS) als Kompetitor und war damit signifikant höher als beim einfachen Waschprozess mit reinem PBS-Puffer. Nach der Rehybridisierung konnten gleichfalls nicht die volle Intensitäten zurückgewonnen werden, sondern nur etwa 35-50% der Werte nach der ersten Hybridisierung. Diese Reagenzien scheinen also durchaus geeignet zu sein, spezifisch gebundenes Lektin durch Denaturierung wieder von der Chipoberfläche zu entfernen. Dies gelang aber wie bei der Elution mit Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid nicht vollständig und/oder nicht (vollständig) bei nicht-spezifisch auf der Oberfläche haftendem Lektin.

In einem weiteren Versuch wurde die Behandlung in siedendem Wasser als drastische Methode zur Entfernung des gebundenen Lektins untersucht. Im Gegensatz zu Mikrotiterplatten oder vielen anderen Trägern zur Immobilisierung von Molekülen zeichnen sich Glaträger durch Resistenz bei höheren Temperaturen aus. Nach der Behandlung wurde wiederum ein Rehybridisierungsschritt durchgeführt. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Abbildung 78 gezeigt.

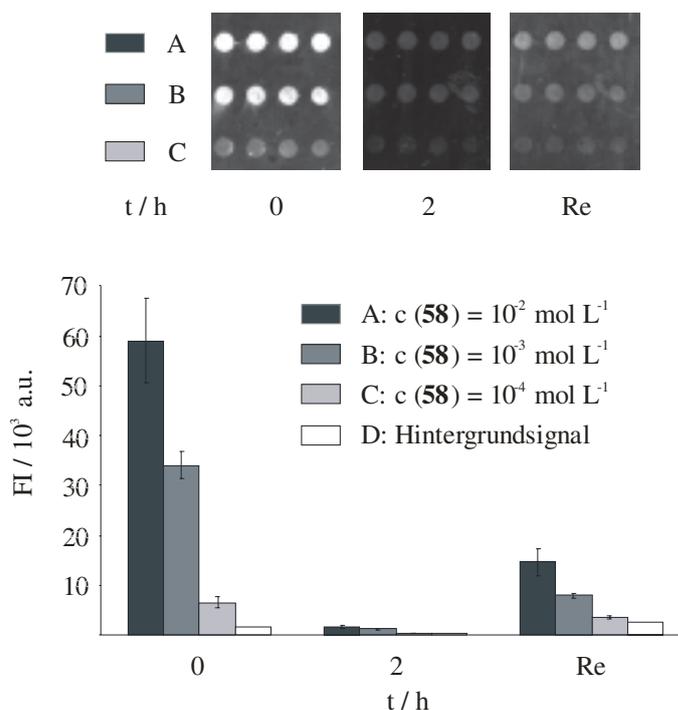


**Abbildung 78:** Reversibilität der Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkung durch Behandlung des hybridisierten Arrays in siedendem Wasser. Fluoreszenzintensität nach der Hybridisierung mit fluoreszenzmarkiertem Lektin Con A ( $c = 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $t = 0 \text{ min}$ ), Abnahme bei fortwährendem Behandlungsprozess (10-60 min) und Rehybridisierung (Re); (oben: Aufnahmen mit Array-Scanner, unten: Messwerte).

Bereits nach einer kurzen Behandlungszeit in siedendem Wasser von nur 10 Minuten konnte eine drastische Reduktion der gemessenen Fluoreszenzintensitäten beobachtet werden; nach einer Stunde war die Signalintensität auch bei der hohen Konzentration von  $10^2 \text{ mol L}^{-1}$  nahezu vollständig verschwunden. Die anschließende Rehybridisierung verlief dagegen deutlich

schlechter, d.h. es wurden einerseits bei einer Konzentration von  $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  nur ungefähr 25% der Signalintensität des ersten Hybridisierungsschrittes erreicht und andererseits nahm das Hintergrundsignal sehr stark zu und lag ungefähr bei dem 4-fachen Wert nach der ersten Hybridisierung. Siedendes Wasser ist folglich ein sehr effektives Mittel zur Denaturierung und Entfernung von gebundenem Lektin, aber es verändert die Chipoberfläche auch in starkem Maße, so dass die Rehybridisierung nur noch schlecht gelang. Möglicherweise wurden kovalent gebundene Kohlenhydrate durch diese Behandlung auf der Chipoberfläche zerstört oder von dieser abgelöst, wodurch eine geringere Konzentration an gebundenem Kohlenhydrat und damit eine geringere Signalintensität nach der Rehybridisierung resultierte. Wahrscheinlicher war jedoch eine wie auch immer geartete physikochemische Veränderung der Oberflächenstruktur des Glaträgers, die zu einer höheren nicht-spezifischen Adsorption des Lektins bei der Rehybridisierung führte. Diese Schlussfolgerung legt der sehr hohe Wert des Hintergrundsignals nahe, der auch bei einer Wiederholung des Experimentes bestätigt werden konnte. Eine weitere Erklärung in der sehr raschen Abnahme der Signalintensität bei der Behandlung des hybridisierten Arrays in siedendem Wasser könnte in der Abspaltung des Fluoreszenzfarbstoffes vom Lektin oder eventuell auch in der Zerstörung des Fluoreszenzfarbstoffes selbst liegen. Die gemessene Fluoreszenz stammte ausschließlich von diesem Farbstoff; unter den bisher getesteten Bedingungen konnte davon ausgegangen werden, dass die Bindung zwischen Farbstoff und Lektin intakt blieb (auch bei dessen unspezifischer Adsorption oder Denaturierung). Deshalb konnte die Fluoreszenzintensität auch immer mit der Lektinkonzentration identifiziert werden. Bei dem zuletzt beschriebenen Versuch war diese Voraussetzung jedoch nicht mehr sicher gegeben, so dass es sich bei der gemessenen raschen Abnahme der Fluoreszenzintensität in Wirklichkeit auch um die fortlaufende Zerstörung der Farbstoff-Lektin-Bindung handeln konnte.

In einem letzten Experiment wurde schließlich eine biochemische Methode zur Entfernung des gebundenen Lektins von der Arrayoberfläche untersucht – der Abbau des Lektins durch eine Protease. Nach der Hybridisierung wurde der Chip für 2 Stunden bei einer Temperatur von  $60^\circ\text{C}$  in einer neutralen gepufferten Lösung geschwenkt, die das Enzym Proteinase K enthielt. Proteinase K ist eine unspezifische Endoprotease, die routinemäßig zum Verdau bzw. Aufschluss von biologischem Material eingesetzt wird. Die Reaktionsbedingungen wurden demnach auch von dieser Anwendung her übernommen.<sup>[287]</sup> Pepsin wurde als alternatives unspezifisches Verdauenzym verworfen, da es in stark saurem Milieu eingesetzt wird, in dem die glycosidischen Bindungen der immobilisierten Kohlenhydrate auf dem Chip möglicherweise nicht mehr stabil gewesen wären. Die Ergebnisse nach Verdau und Rehybridisierung sind in Abbildung 79 dargestellt.



**Abbildung 79:** Reversibilität der Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkung durch Behandlung des hybridisierten Arrays mit Proteinase K-Lösung. Fluoreszenzintensität nach der Hybridisierung mit fluoreszenzmarkiertem Lektin Con A ( $c = 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $t = 0 \text{ h}$ ), nach Behandlung mit der Enzymlösung ( $T = 60^\circ\text{C}$ ,  $t = 2 \text{ h}$ ) und nach Rehybridisierung (Re); (oben: Aufnahmen mit Array-Scanner, unten: Messwerte).

Mit diesem Verfahren konnte eine nahezu vollständige Entfernung des gebundenen Lektins auch bei der hohen Konzentration von  $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  an immobilisiertem Kohlenhydrat erreicht werden. Allerdings verlief der Rehybridisierungsschritt nicht erfolgreicher als bei der Elution mit Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid, es konnten ungefähr 25-30% der Fluoreszenzintensität des ersten Hybridisierungsschrittes gemessen werden. Berücksichtigt man, dass bei den Elutionsexperimenten auch nach deutlich längeren Behandlungszeiten eine größere „Restfluoreszenzintensität“ unmittelbar vor dem Rehybridisierungsschritt übrig blieb, die von der gemessenen Signalintensität am Ende subtrahiert werden muss, kann man ungefähr von einer gleichartigen Qualität der Rehybridisierung bei beiden Methoden ausgehen. Auffällig ist aber außerdem, dass die Signalintensität des Hintergrundsignales nach der Rehybridisierung deutlich größer war als nach dem ersten Hybridisierungsschritt.

Betrachtet man alle durchgeführten Experimente im Überblick zeigt sich, dass die Geschwindigkeit der Abnahme der gemessenen Fluoreszenzintensität bei den Wasch- bzw. Elutionsprozessen und damit die Geschwindigkeit der Ablösung des gebundenen Lektins von der Chipoberfläche nicht zwingend ein Maß für die Qualität des Rehybridisierungsschrittes war. Das folgende Modell kann die Ergebnisse dieses Abschnittes am besten in Einklang bringen und auch den weiter oben aufgeworfenen scheinbaren Widerspruch beseitigen:

- Beim ersten Hybridisierungsschritt wird ein Großteil des Lektins spezifisch an seinen komplementären Kohlenhydratpartner gebunden. Zu einem geringeren Anteil wird das Lektin jedoch auch nicht-spezifisch auf der Chipoberfläche adsorbiert (sichtbar am auftretenden Hintergrundsignal).
- Da während des ersten Hybridisierungsschrittes die Lektinkonzentration in der Hybridisierungslösung konstant ist, wird der gesamte Chip zu diesem Zeitpunkt gleichartigen Bedingungen ausgesetzt; insbesondere ist der erwähnte Anteil des nicht-spezifisch adsorbierten Lektins überall auf der Chipoberfläche gleich.
- Nach dem ersten Hybridisierungsschritt befinden sich an den Stellen der immobilisierten Kohlenhydrate zusätzlich zu dem nicht-spezifisch gebundenen Lektinanteil der spezifisch gebundenen Lektinanteil und zwar umso mehr, je größer die Konzentration an immobilisiertem Kohlenhydrat an dieser Stelle ist.
- Ein Teil des spezifisch gebundenen Lektins wandelt sich während der Wasch- bzw. Elutionsprozesse oder auch nur bei fortschreitender Zeit nach der ersten Hybridisierung („Alterung“ des hybridisierten Chips) in unspezifisch gebundenes Lektin um. Das zunächst spezifisch gebundene Lektin befindet sich bereits an der Chipoberfläche und kann z.B. durch die Trocknung des Chips (SP 2, Schritt 4) oder während den Waschprozessen teilweise denaturieren. Es ist plausibel, dass dieser Umwandlungsprozess konzentrationsabhängig ist d.h. dass bei einer absolut höheren Menge an spezifisch gebundenem Lektin auch absolut mehr Lektin in unspezifisch gebundenes umgewandelt wird. Folglich nimmt der Anteil an unspezifisch gebundenem Lektin an Stellen mit höherer Konzentration an immobilisiertem Kohlenhydrat zu.
- Bei Waschprozessen in reinem PBS-Puffer oder Elution mit Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid, Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid, Stärke oder Glycogen wird der noch spezifisch gebundene Anteil des Lektins bei hinreichend langer Behandlungsdauer vollständig entfernt. Der nicht-spezifisch gebundene Anteil kann dagegen mit diesen Methoden nur in geringem Ausmaß (vgl. Hintergrundsignal) oder überhaupt nicht entfernt werden. Die gemessene Fluoreszenzintensität nähert sich bei fortdauernder Behandlung einem Endwert an, der als Maß für die Menge des nicht-spezifisch gebundenen Lektins am entsprechenden Ort betrachtet werden kann.
- Durch das nicht-spezifische gebundene Lektin ist die Chipoberfläche vor dem Rehybridisierungsschritt im Vergleich zur Situation vor der ersten Hybridisierung verändert. Es blockiert sterisch die Zugänglichkeit zahlreicher Kohlenhydratepitope für

das intakte Lektin, die gemessenen Fluoreszenzintensitäten sind folglich nach dem Rehybridisierungsschritt geringer.

- Bei den Waschprozessen mit den denaturierenden Reagenzien Harnstoff, Guanidiniumhydrochlorid und SDS ist die Situation vergleichbar; spezifisch gebundenes Lektin kann weitgehend vollständig durch Denaturierung entfernt werden, nicht aber unspezifisch gebundenes mit denselben Folgen für die Rehybridisierung.
- Durch Behandlung mit siedendem Wasser kann nicht nur spezifisch gebundenes, sondern zu einem Großteil auch nicht-spezifisch gebundenes Lektin zerstört und möglicherweise auch von der Chipoberfläche entfernt werden. Diese wird dabei jedoch so verändert, dass die Rehybridisierung nur noch in geringer Qualität gelingt. Dies kann erstens möglicherweise an der Zerstörung der Kohlenhydratepitope liegen und zweitens an der Ablagerung von Lektinfragmenten auf der nicht-planaren Chipoberfläche, die dadurch den Zugang von intaktem Lektin zu seinem Kohlenhydratbindungspartner sterisch verhindern. Die Lektinfragmente werden außerdem bei der Behandlung auf der gesamten Chipoberfläche möglicherweise verteilt und führen zu einer hohen nicht-spezifischen Adsorption von intaktem Lektin (vgl. hohes Hintergrundsignal). Alternativ besteht eine Erklärungsmöglichkeit darin, dass durch siedendes Wasser ein Großteil der Farbstoff-Lektin-Bindungen gebrochen wird und sich unmarkiertes denaturiertes Lektin bzw. seine Fragmente auf der Chipoberfläche ablagern.
- Durch die Enzymbehandlung wird sowohl spezifisch als auch nicht-spezifisch gebundenes Lektin proteolytisch abgebaut und die Fragmente werden zumindest teilweise von der Chipoberfläche entfernt. Aus sterischen Gründen kann die Protease jedoch das Lektin, das sich auf der nicht-planaren Oberfläche befindet, nicht vollständig abbauen und Lektinfragmente bleiben zurück. Der hohe Wert des Hintergrundsignals nach der Rehybridisierung legt auch in diesem Falle eine Verteilung der Lektinfragmente auf der gesamten Chipoberfläche nahe. Diese blockieren wiederum sterisch den Zugang des intakten Lektins und führen zwar zu akzeptabler aber nicht vollständiger Rehybridisierung.

Weiterhin muss folgende Erklärung in Betracht gezogen werden: Da die Fluoreszenzfarbstoffe durch Reaktion ihrer elektrophilen Vorläufersubstanzen mit nukleophilen Lysin- oder Cysteinseitengruppen an der Oberfläche des Lektins an dieses gebunden sind, sind die entsprechenden Aminosäuren auch sterisch durch das Enzym leichter zugänglich als andere Aminosäuren im Lektininneren. Sie können folglich bevorzugt abgespalten werden, wodurch die gemessene Fluoreszenzintensität

stärker absinkt als es der Konzentration an Lektin oder Lektinfragmenten auf der Chipoberfläche entspricht. Daher kann die vermeintlich schnelle Abnahme der Konzentration an gebundenem Lektin auch auf die enzymatische Abspaltung des Fluoreszenzfarbstoffes vom immer noch auf der Chipoberfläche gebundenem Lektin zurückzuführen sein.

### 4.3.3.4 Fazit

Mit Hilfe von Wasch- und Elutionsexperimenten konnte die Reversibilität der Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkung auf Kohlenhydrat-Arrays nachgewiesen werden. Nach Immobilisierung von Verbindung **58** im Konzentrationsbereich von  $10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> bis  $10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup> und Hybridisierung mit fluoreszenzmarkiertem Lektin Concanavalin A nahm die gemessene Fluoreszenzintensität bei allen aufgetragenen Konzentrationen im Verlauf fortdauernder Wasch- oder Elutionsprozesse wieder ab. Die Abnahme verlief dabei relativ langsam und nicht vollständig, was auf unspezifisch gebundene Lektinanteile zurückzuführen war, die sich nicht wieder entfernen ließen. Im direkten Vergleich war sie bei der Elution mit Kompetitoren wie Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid oder Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid signifikant stärker als bei Waschvorgängen in reinem PBS-Puffer. Polyvalente Kompetitoren wie Stärke oder Glycogen führten zu keiner erhöhten Abnahmegeschwindigkeit der Fluoreszenzintensitäten im Vergleich zu reinem PBS-Puffer, bei Verwendung denaturierender Reagenzien wie SDS, Harnstoff oder Guanidiniumhydrochlorid lag diese im Bereich der Elution mit Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid. Durch siedendes Wasser oder proteolytischen Abbau konnte gebundenes Lektin gleichfalls wieder von der Chipoberfläche entfernt werden. Aufgrund zurückbleibender Reste an unspezifisch gebundenem Lektin oder von Lektinfragmenten sowie durch Veränderungen der physikochemischen Eigenschaften der Glasoberflächen durch die Wasch- bzw. Elutionsprozesse konnte bei Rehybridisierungsexperimenten die ursprünglich erhaltene Fluoreszenzintensität nicht mehr erreicht werden.

### 4.3.4 Untersuchungen zur Polyvalenz der Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkung

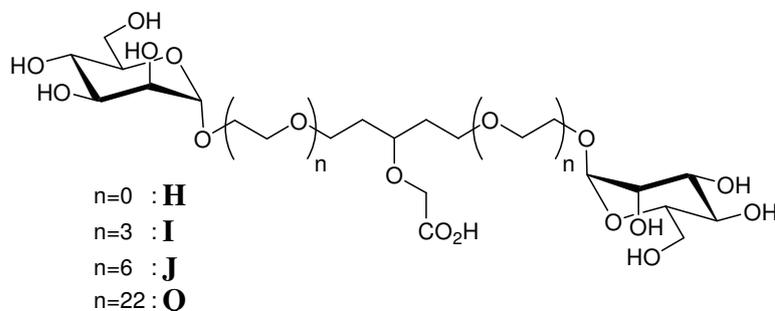
Wie bereits in den vorhergehenden Abschnitten erwähnt, ist die Vermutung geäußert worden, dass ein Kohlenhydrat-Array eine polyvalente Anordnung von Zuckermolekülen darstellt und deshalb die Bindungsaffinität von Lektinen auf solchen Arrays erhöht sein sollte.<sup>[144, 291]</sup> Allerdings ist weder die Dichte an Kohlenhydratepitopen auf der Arrayoberfläche noch die Homogenität ihrer räumlichen Verteilung im Allgemeinen genau bekannt. In Abschnitt 4.2.4.3 wurde der mittlere Abstand  $d$  zwischen zwei funktionellen Gruppen auf der Chipoberfläche auf einen Wert von  $d = 3.5 \cdot 10^{-6} \text{ mm} = 3500 \text{ pm} = 35 \text{ \AA}$  abgeschätzt. Die Länge einer C-C-Einfachbindung beträgt 153 pm, unter Berücksichtigung des Tetraeder-Bindungswinkels an einem Kohlenstoffatom kann für den Abstand zwischen zwei Kohlenstoffatomen einer linearen Kette ein Wert von ungefähr  $100 \text{ pm} = 1 \text{ \AA}$  angenommen werden. Somit entspricht der mittlere Abstand  $d$  zwischen zwei funktionellen Gruppen auf der Chipoberfläche etwa einer linearen Kette von 35 Kohlenstoffatomen. Der Abstand zwischen benachbarten Bindestellen beträgt für das Lektin Concanavalin A ungefähr  $100 \text{ \AA}$ , entsprechend einer linearen Kette von etwa 100 Kohlenstoffatomen. Ein Lektinmolekül kann folglich über zwei verschiedene Bindestellen polyvalent von zwei Kohlenhydratepitopen auf der Arrayoberfläche gebunden werden. Zu beachten ist bei dieser Überlegung allerdings, dass dazu alle möglichen vorhandenen funktionellen Gruppen auf der Chipoberfläche auch mit Kohlenhydratepitopen abgesättigt sein müssen und dass die Oberfläche auf molekularer Ebene nicht planar ist. Die relativ langsam verlaufenden Wasch- bzw. Elutionsprozesse, die im vorhergehenden Abschnitt zur Reversibilität der Kohlenhydrat-Lektin-Bindung beschrieben worden sind, können als Hinweis für eine polyvalente Bindung aufgefasst werden – einen Beweis dafür stellen sie nicht dar.

In Abschnitt 4.3.1 wurde bereits die Abhängigkeit der gemessenen Fluoreszenzintensität von der aufgetragenen Kohlenhydratkonzentration diskutiert – diese resultierte aus einem kinetischen Effekt, eine darüber hinaus reichende stärkere Konzentrationsabhängigkeit, die als Hinweis für eine polyvalente Bindung ab einer bestimmten Konzentration an immobilisiertem Kohlenhydrat gedeutet werden könnte, war im Rahmen der Messgenauigkeit und Reproduzierbarkeit der Messwerte nicht zu beobachten.

In Abschnitt 4.3.3 wurde u.a. festgestellt, dass die Abnahmegeschwindigkeiten in den gemessenen Signalintensitäten bei den durchgeführten Wasch- und Elutionsprozessen, wiederum im Rahmen der Messgenauigkeit, von der Konzentration an immobilisiertem Kohlenhydrat unabhängig waren. Im Falle einer polyvalenten Bindung des Lektins wäre eine relativ höhere

Abnahmege­schwin­dig­keit bei geringeren Konzentrationen an aufgetragenem Kohlenhydrat zu erwarten gewesen.

Zur weiteren Untersuchung der Fragestellung einer möglichen polyvalenten Bindung des Lektins Concanavalin A auf der Chipoberfläche wurden die Verbindungen **H**, **I** und **J** von X.-H. Jiang in unserer Arbeitsgruppe synthetisiert<sup>[216]</sup> (vgl. Abbildung 80).



**Abbildung 80:** Dimere Mannoseverbindungen zur Untersuchung der Polyvalenz von Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkungen auf Arrayoberflächen.

Diese dimeren Mannoseverbindungen können durch Ausbildung einer Carbonsäureamidbindung mit Hilfe von PyBOP analog zur monovalenten Mannose **65** auf aminderivatisierten Objektträgern immobilisiert werden (vgl. Abschnitt 4.3.1). Sie unterscheiden sich im Abstand der beiden Kohlenhydratepitope voneinander, die resultierenden Distanzen sind in Tabelle 9 dargestellt.

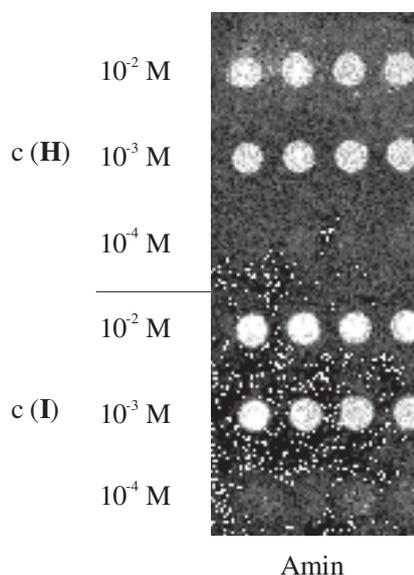
Verbindung	n	Glykollinkereinheit	Abstand zwischen Mannoseepitopen
<b>H</b>	0	-	6 Å
<b>I</b>	3	Triethylenglykol	24 Å
<b>J</b>	6	Hexaethylenglykol	42 Å
<b>Q</b>	~22	Polyethylenglykol 1000	138 Å

**Tabelle 9:** Eigenschaften der dimeren Mannoseverbindungen **H**, **I**, **J** und **Q**.

Die Synthese der Verbindung **Q** gelang nicht, da in diesem Fall die Aufreinigung der Endverbindung bzw. die Separation des gewünschten divalenten Produktes vom monovalenten Nebenprodukt nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte.<sup>[216]</sup> Neben dem ausgeprägten Tailing-Effekt, der bei längeren Ethylenglykolen die Aufreinigung erschwert (vgl. Abschnitt 3.1), handelt es sich bei Polyethylenglykol 1000 zusätzlich um ein Gemisch verschiedener Ethylenglykole mit einem mittleren Molekulargewicht von 1000 g mol<sup>-1</sup>. Diese Tatsache

erschwerte sowohl die flashchromatographische Reinigung als auch die Analytik dieser Verbindungen.

Die Verbindungen **H**, **I** und **J** wurden im Konzentrationsbereich von  $10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> bis  $10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup> in DMF auf aminderivatisierten Objektträgern aufgetragen und mit Hilfe von PyBOP und Hünigs Base, wie in Abschnitt 4.3.1 beschrieben, immobilisiert. Nach Hybridisierung mit fluoreszenzmarkiertem Concanavalin A konnten in allen durchgeführten Experimenten wiederum konzentrationsabhängige Signalintensitäten beobachtet werden. Bei Immobilisierung der Verbindungen auf einem Objektträger konnten im Rahmen der Messgenauigkeit keinerlei Unterschiede in den Fluoreszenzintensitäten bei gleicher aufgetragener Konzentration festgestellt werden; Abbildung 81 zeigt ein Beispiel eines solchen Experimentes.



**Abbildung 81:** Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenzintensität der durch Carbonsäureamidbildung immobilisierten divalenten Mannoseverbindungen **H** (oben) und **I** (unten) auf einer Aminoberfläche nach Hybridisierung mit fluoreszenzmarkiertem Lektin Con A ( $c = 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Bei Immobilisation der divalenten Verbindungen **H**, **I** oder **J** zusammen mit der monovalenten Verbindung **65** und anschließender Hybridisierung mit fluoreszenzmarkiertem Lektin konnten im direkten Vergleich gleichfalls keinerlei Unterschiede in den gemessenen Intensitäten bei gleicher aufgetragener Konzentration beobachtet werden. Die Fluoreszenzintensität war bei gleicher vorgegebener Stoffmengenkonzentration bei monovalenter und divalenter Verbindung gleich groß. Weiterhin konnte bei Auftragung geringerer Konzentrationen an divalenter Verbindung ( $c < 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> **H**, **I** oder **J**) keine Fluoreszenz über dem Hintergrundsignal detektiert werden; das Detektionslimit der Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkung konnte folglich auch durch Verwendung divalenter Mannoseverbindungen nicht weiter abgesenkt werden.

Durch Immobilisation der divalenten Verbindungen wird die Dichte der Mannoseepitope auf der Chipoberfläche im Vergleich zur monovalenten Verbindung **65** bei Auftragung gleicher

Konzentrationen erhöht. Damit ist prinzipiell eine Entkopplung des kinetischen Effektes von einem möglichen Polyvalenzeffekt bei der Beobachtung der Konzentrationsabhängigkeit der gemessenen Fluoreszenzintensitäten nach Hybridisierung des Lektins möglich. Einzige Voraussetzung ist die plausible Annahme gleicher Reaktionsgeschwindigkeiten bei der Immobilisierung von Verbindung **65** und den divalenten Verbindungen. In der Reihe **H, I, J** vergrößert sich mit zunehmender Länge der Glykoleinheiten zudem der Abstand zwischen den beiden Mannoseepitopen sowie der Abstand der Epitope von der Chipoberfläche nach der Immobilisierung. Damit nimmt gleichfalls das „Bindungsvolumen“ zu, d.h. das Volumenelement um die Anknüpfungsstelle auf der Arrayoberfläche, in dem eine Bindung an ein Lektinmolekül stattfinden kann. Weiterhin können Unebenheiten der Arrayoberfläche auf molekularer Ebene durch längere Glykoleinheiten besser ausgeglichen werden; auf die Bedeutung ausreichender Linkerlängen zur Lektinbindung auf dem Array wurde bereits in Abschnitt 4.3.1 eingegangen. Damit erhöht sich insgesamt die Wahrscheinlichkeit, dass ein Lektinmolekül über zwei (oder mehr) seiner Bindestellen an zwei (oder mehr) Mannoseepitope gleichzeitig gebunden wird, wodurch eine di- oder polyvalente Wechselwirkung vorliegt.

Da im Rahmen der Messgenauigkeit jedoch weder höhere Fluoreszenzsignale noch geringere Detektionslimite bei Immobilisierung der divalenten Verbindungen beobachtet werden konnten, konnte der Nachweis einer polyvalenten Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkung auf Chipoberflächen auch nicht erbracht werden.

Der Abstand der beiden Mannoseepitope reicht bei den Verbindungen **H, I** und **J** nicht aus, um zwei Bindestellen eines Concanavalin A-Tetramers gleichzeitig zu binden (vgl. Tabelle 9). In Verbindung **Q** wäre die notwendige Distanz dafür vorhanden, so dass nach ihrer Immobilisierung eine „echte“ polyvalente Bindung mit bekanntem Abstand der beiden Bindungsepitope möglich wäre. Wie bereits beschrieben, gelang jedoch die Synthese dieser Verbindung nicht.

### 4.3.4.1 Fazit

Durch kovalente Immobilisation der divalenten Mannoseverbindungen **H, I** und **J** und der monovalenten Verbindung **65** und anschließende vergleichende Hybridisierungsexperimente mit dem fluoreszenzmarkierten Lektin Concanavalin A konnte die vermutete Polyvalenz der Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkung auf Kohlenhydrat-Arrays nicht bestätigt werden.



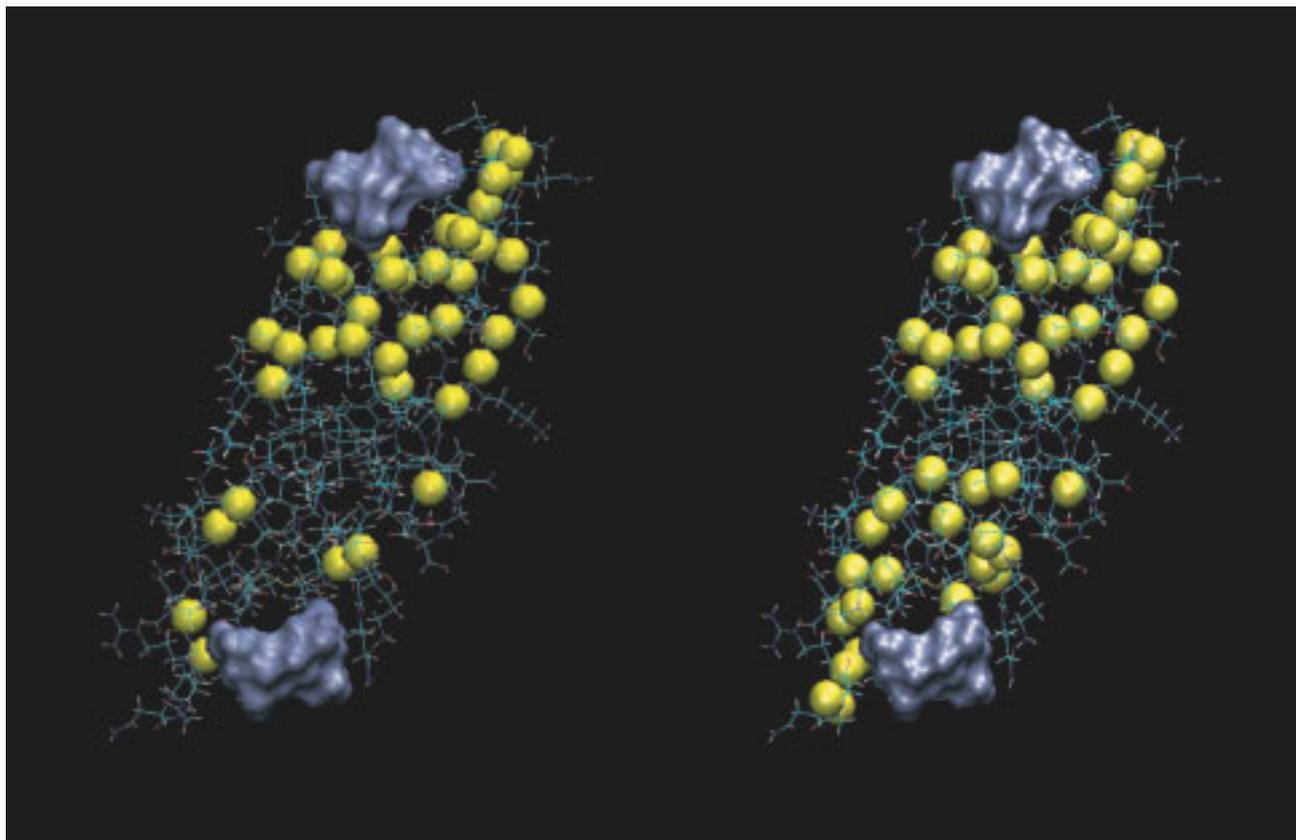
## 5 Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkung an einer Micelloberfläche

Die in diesem Abschnitt zusammengefassten NMR-spektroskopischen Untersuchungen mit Hilfe der in Abschnitt 3.5 beschriebenen Mannose-Glycolipide wurden in der Arbeitsgruppe von *O. Zerbe* an der Universität Zürich durchgeführt.<sup>[217]</sup>

Glycolipid-Micellen wurden durch Mischung der dargestellten Glycolipide (**89-2**, **89-3**, **90-2**, **91-2**, **92-1**, **92-2**, **92-3**, **92-4** oder **92-5**) und Dodecylphosphocholin (DPC) dargestellt. Dabei wurden Phospholipid/Glycolipid-Verhältnisse von mindestens 300:1 gewählt, um den Einbau der Glycolipide in DCP-Micellen zu erreichen und die Bildung bzw. Separation reiner Glycolipid-Micellen zu verhindern. Durch Messung der translationalen Diffusionsgeschwindigkeiten der Glycolipide in reinem Wasser bzw. in Gegenwart von DPC-Micellen konnte ihr Einbau in die Phospholipid-Micellen nachgewiesen werden: Die gemessenen Geschwindigkeiten waren in Gegenwart der DPC-Micelle deutlich geringer und lagen in der Größenordnung von reinen DPC-Micellen ohne „Glycolipid-Beladung“. Durch Einbau der paramagnetischen Spinlabel-Verbindung 5-Doxylstearat, von der bekannt ist, dass sie sich ebenfalls in Micellen integriert, konnte der Einbau der Glycolipide näher untersucht werden. Paramagnetismus führt allgemein zu höheren Relaxationszeiten und damit zu geringere NMR-Signalintensitäten. Die Intensitäten derjenigen Protonen, die sich an dem zur Lipidkette benachbarten Mannosering befanden, verringerten sich dabei deutlich stärker als die derjenigen Protonen an den von der Micelloberfläche weiter entfernten Mannoseringen. Die Unterschiede in den gemessenen Signaldifferenzen verringerten sich mit der Länge der Ethylenglykospacereinheit, d.h. in der Reihe **92-2**, **91-2** und **90-2**. Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen, da eine längere Spacereinheit zu mehr Flexibilität der an die Micelle gebundenen Kohlenhydrateinheiten führen sollte.

Die Bindung der auf diese Weise präparierten Glycolipid-Micellen an das bakterielle Lektin Cyanovirin N wurde durch die Messung der chemischen Verschiebung von Proteinsignalen untersucht. Dazu wurden die Differenzen der chemischen Verschiebungen der Amidprotonen in Gegenwart von DPC-Micellen mit oder ohne „Glycolipid-Beladung“ gemessen (chemical shift mapping). Die Verschiebungswerte wurden aus zweidimensionalen [<sup>15</sup>N, <sup>1</sup>H]-HSQC-Spektren<sup>[292]</sup>

entnommen. Das verwendete Cyanovirin N wurde in Zellkulturen expremiert, die mit  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  als einziger Stickstoffquelle versorgt wurden, um das NMR-relevante Isotop  $^{15}\text{N}$  anzureichern. Die größten Änderungen in den chemischen Verschiebungen der Amidprotonen zeigten sich, wie zu erwarten, in der Nähe der „high-affinity“-Bindestelle. Andererseits waren auch geringere Änderungen in von der Bindungsstelle weiter entfernten Regionen sichtbar, was auf kleinere Konformationsänderungen des Proteins beim Bindungsprozess hinweist. Entsprechende Änderungen zeigten sich analog an und in der Nähe der „low-affinity“-Bindestelle (vgl. Abbildung 82).



**Abbildung 82:** Ergebnisse der „chemical shift mapping“-Experimente für die Bindung der Glycolipide **90-2** (links) und **90-3** (rechts) an Cyanovirin N.<sup>[217]</sup> Aminosäuren, deren Amidproton die größte Resonanzänderung nach Bindung der Glycolipide zeigten, sind gelb markiert. Zusätzlich blau dargestellt sind die Bindungsoberflächen von  $\alpha$ -1,2-Mannobiose, die sich an den beiden Bindestellen des Lektins befinden. Sie sind aus der entsprechenden Röntgenstrukturanalyse entnommen.<sup>[55]</sup>

Im Vergleich der Dimannosid-Reihe **90-2**, **91-2** und **92-2** ergaben sich große Übereinstimmungen in den Verschiebungsdifferenzen bei allen Protonen an der Proteinoberfläche. Dagegen ergaben sich relativ große Unterschiede in den Differenzen bei denjenigen CV-N-Protonen, die durch die Bindung des Lektins an eine Glycolipid-Micelle in die Nähe der Phospholipid-Kopfgruppen der Micelle gezwungen wurden. Folglich nahmen die

Differenzen in der chemischen Verschiebung dieser Protonen in der Reihe **90-2**, **91-2** und **92-2** mit zunehmender Ethylenglykolspacerlänge ab.

Im Vergleich der Mannoside mit Hexaethylenglykolspacer **92-1**, **92-2**, **92-3**, **92-4** und **92-5** konnten gleichartige Ergebnisse beobachtet werden (größte chemische Verschiebungen an und in der Nähe der beiden Bindestellen). Beim Tetramannosid **92-4** und dem Pentamannosid **92-5** wurden zusätzlich größere Verschiebungsdifferenzen an den Randzonen der Bindestellen gefunden. Vermutlich ist dies auf zusätzliche Kontakte der vierten und fünften Mannoseinheit mit der Proteinoberfläche zurückzuführen, ohne dass diese am Bindungsprozess direkt teilnehmen.

Bei der Zugabe substöchiometrischer Mengen eines Glycolipids bezogen auf CV-N konnte ein doppelter Signalsatz im NMR-Spektrum beobachtet werden, der auf das Vorhandensein von freiem und gebundenem Protein hinwies. Ferner kann dieses Phänomen als Anhaltspunkt für einen langsamen Austausch (auf einer NMR-Zeitskala) beim Bindungsprozess gedeutet werden.

Im Fall des Glycolipids **92-3** wurde zudem ein großer Verlust an Signalintensität bei der Bindung von Cyanovirin N festgestellt. Um dieses Phänomen genauer zu untersuchen wurde eine CV-N-*knock out*-Mutante ohne „low-affinity“-Bindestelle expremiert. Bei der Bindung dieser Proteinvariante konnte kein Verlust an Signalintensität beobachtet werden; die gemessenen Signalintensitäten lagen in derselben Größenordnung wie diejenigen bei der Bindung der Glycolipid **92-2**-Micelle an den CV-N *wild type*. Der Intensitätsverlust kann folglich mit der simultanen Bindung eines CV-N-Proteins an zwei Glycolipid-Micellen erklärt werden, die infolge des größeren Molekulargewichtes des Bindungskomplexes zu höheren transversalen NMR-Relaxationszeiten führte.

Anhand der Veränderungen von NMR-Signalintensitäten konnte auch die Reversibilität der Kohlenhydrat-Protein-Bindung von Glycolipid-Micellen und Lektin nachgewiesen werden. Die zunächst großen Intensitäten der Proteinprotonen einer Lösung von CV-N und „unbeladenen“ DPC-Micellen verringerten sich deutlich, wenn das Glycolipid **92-2** zugeben wurde und sich, nach Integration des Glycolipids in die Micellmembran, ein Bindungskomplex aus DPC-Micelle, Glycolipid und Protein bildete. Nach Zugabe des Methylmannosids **89-3**, das selbst nicht in die Micellmembran eingebaut werden kann, konnte die ursprüngliche Signalintensität wieder gemessen werden. Die beiden Mannoseverbindungen **89-3** und **92-2** konkurrierten um die Proteinbindungsstellen; nach Zugabe der Methylverbindung **89-3** im Überschuss wurde folglich das an Micellen gebundene CV-N wieder von diesen gelöst und der Bindungskomplex zerstört. Dadurch sank das Molekulargewicht der im NMR-Experiment beobachteten Proteinkomponente wieder drastisch und in Folge dessen verringerten sich die transversalen Relaxationszeiten, was schließlich zu höheren NMR-Signalintensitäten führte.



## 6 Experimental Part

### 6.1 General Methods and Equipment

**Reactions** requiring exclusion of moisture were performed in dried glassware under an inert argon atmosphere. For reactions requiring low temperatures cooling was achieved by immersion in cooling baths (e.g. ice/sodium chloride or methanol/dry ice).

**Starting Materials and Reagents** were purchased from commercial suppliers (e.g. *ABCR, Acros, Fluka, Sigma-Aldrich, Lancaster*) and used without further purification unless otherwise indicated.

**Solvents for reactions** were purified and dried according to standard procedures. Methanol was dried by treatment with magnesium turnings and distillation. Dichloromethane was refluxed over calcium hydride for several hours and freshly distilled before use. Tetrahydrofuran was dried by treatment with sodium lumps for several days, distillation, refluxing over fresh sodium wire and distillation under an inert nitrogen atmosphere before use. Toluene was dried over sodium and distilled. Other solvents were dried with activated molecular sieves of proper pore size.

**Analytical thin layer chromatography (TLC)** was performed on *TLC plastic sheets Silica gel 60 F<sub>254</sub>* or *TLC plates RP-18 F<sub>254</sub>* from *Merck*. Detection of the spots was performed either by UV-absorption (irradiation at 254 nm), by treatment in an iodine-chamber or by immersion into one of the following dyeing reagents and subsequent heating at 150°C:

- “Mo-Stain”, a solution of  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$  (20 g) and  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$  (0.4 g) in 10% aqueous sulphuric acid (400 mL)
- 15% aqueous sulphuric acid
- para-anisaldehyde (10 mL), acetic acid (2 mL), conc. sulphuric acid (10 mL) in ethanol (180 mL)
- $\text{KMnO}_4$  (6 g),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (40 g) and  $\text{NaOH}$  (0.2 g) in water (600 mL)

- ninhydrine (1% in ethanol)

**Preparative flash column chromatography (FC)** was performed with *Silica Gel 60* (40-63  $\mu\text{m}$ , 230-400 mesh) from *Merck* or from *Machery-Nagel* with a pressure of 0.3-0.5 bar.

**Preparative medium pressure liquid chromatography (MPLC)** was performed with a continuous flow rate (10  $\text{mL min}^{-1}$ , pressure 5-10 bar) on *LiChroprep Si 60* silica (15-25  $\mu\text{m}$ ) from *Merck* with a column sized 28 $\times$ 2.5 cm. Detection was carried out with a differential refractometer from *Knauer*.

**Preparative high pressure liquid chromatography (HPLC)** was performed with a system consisting of a low-pressure gradient mixer, a *Shimadzu LC-8A* pump, a *Eurosphere 100-C18* column (5  $\mu\text{m}$ , 250 $\times$ 20 mm) from *Knauer* and a *Shimadzu RID-10* detector. All separations were performed with a continuous flow rate of 10  $\text{ml min}^{-1}$ .

**Solvents for FC and MPLC** were purchased in technical purity and distilled. The boiling range of the petroleum ether used was 35-60 $^{\circ}\text{C}$ . Toluene/acetone- and toluene/ethyl acetate mixtures were fractionated using a vacuum-mantled packed column and the separated solvents were reused. Petroleum ether/ethyl acetate mixtures were redistilled and reused after determination of the composition (via the distillate's specific density).

**Solvents for HPLC:** Acetonitrile was purchased from *Roth* or *Acros* as HPLC grade. Water was deionised by mixed-bed ion-exchange and purified in a *MilliQ*-setup from *Millipore*. Solvents were degassed by passing helium through the solvent, followed by ultrasonic agitation.

**MALDI-TOF mass spectra** were recorded on a *Kompact MALDI II* mass spectrometer from *Kratos Analytical* or a *Bruker Biflex III* instrument in positive, linear mode with a delayed extraction MALDI source and a pulsed nitrogen laser (337 nm). 2,5-Dihydroxybenzoic acid (DHB) or  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) were used as matrix compounds. For the calibration the following peptides were used: Bradykinin fragment 1-7 ( $[\text{M}+\text{H}]^+ = 757.40$ ), Angiotensin II ( $[\text{M}+\text{H}]^+ = 1046.54$ ), Angiotensin I ( $[\text{M}+\text{H}]^+ = 1296.69$ ), bovine insulin chain b oxidized ( $[\text{M}+\text{H}]^+ = 3494.56$ ) and bovine insulin ( $[\text{M}+\text{H}]^+ = 5734.56$ ). The calculated masses correspond to the monoisotopic mass if not otherwise indicated.

Measurements of **optical rotation** were performed on a *Polar-Monitor* from *Büchi* in a 1 dm cuvette at a wavelength of 589 nm and 20°C.

**Elemental analyses** were performed by the microanalytical facilities at the Universität Konstanz with a CHNS-analyzer *vario EL* from *Elementar*.

**Lyophilisation** was performed with a *Lyovac GT2* from *Leybold-Heraeus*.

**Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra** were recorded on one of the following instruments:

*Bruker AC 250 Cryospec* (250 MHz for  $^1\text{H}$ , 62.8 MHz for  $^{13}\text{C}$ )

*Jeol JNM-LA-400* (400 MHz for  $^1\text{H}$ , 100.5 MHz for  $^{13}\text{C}$ )

*Bruker DRX 600* (600 MHz for  $^1\text{H}$ , 150.8 MHz for  $^{13}\text{C}$ )

As internal standard for calibration the resonance signals of tetramethylsilane ( $\delta = 0.00$  ppm) or of the not fully deuterated solvents were used (used values are:  $\text{CDCl}_3$ :  $\delta = 7.26$  ppm,  $\text{D}_2\text{O}$ :  $\delta = 4.63$  ppm,  $\text{d}_4\text{-MeOD}$ :  $\delta = 3.31$  ppm,  $\text{d}_6\text{-DMSO}$ :  $\delta = 2.43$  ppm for  $^1\text{H}$ -spectra and  $\text{CDCl}_3$ :  $\delta = 77.00$  ppm,  $\text{d}_4\text{-MeOD}$ :  $\delta = 49.05$  ppm,  $\text{d}_6\text{-DMSO}$ :  $\delta = 39.43$  ppm for  $^{13}\text{C}$ -spectra). Chemical shifts are reported in ppm ( $\delta$ -scale) and coupling constants are given in Hertz (Hz). The assignment of signals were supported and verified by additional decoupling experiments or by two-dimensional NMR-experiments (COSY, NOESY, ROESY, HMQC, HSQC). Multiplicities are designated as followed: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, quin = quintuplet, m = multiplet, bs = broad singlet, dd = doublet of a doublet. In many cases the recognition of correct multiplicity due to scalar couplings is complicated by higher order effects (e.g., for the methyl protons of the lipid anchor) or by diastereotopism due to chirality of the sugar moieties (e.g., for protons at C-1 of the aglycon chains). Therefore the specification is purely phenomenological, i.e. the appearance of the corresponding signal in the spectra and not the theoretically expected multiplicity is indicated. The single sugar moieties of oligosaccharides are referred to by small letters beginning at the sugar's reducing end. Geminal diastereotopic protons are designated with a prime '.

**Array fluorescence measurements** were performed with a *Wallac Victor<sup>2</sup> 1420 Multilabel Counter* ELISA-reader from *PerkinElmer*, an *Axioplan 2 imaging* fluorescence microscope from *Zeiss* equipped with an *Axiocam HRm* camera from *Zeiss* or with a *GenePix Personal 4100A* array scanner from *Axon Instruments*.

Amino- and aldehyde-derivatised glass slides were purchased from *Genetix*.

Press-to-Seal silicon isolators were purchased from *Schleicher & Schuell* (no. 10485006).

## 6.2 Experiments

### 6.2.1 General Procedures

#### **General procedure I (GP I): Preparation of fully O-acetylated carbohydrate derivatives bearing linker moieties**

The glycosyl donor and the triethylene glycol derivative were dissolved in dry dichloromethane (0.75 mL per mmol of donor) under a nitrogen atmosphere and cooled to -10°C, then Lewis acid (see individual experimental details) was added. The reaction mixture was stirred at -10°C for 30 min and subsequently allowed to reach room temperature. After neutralisation with triethylamine, the reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash column chromatography (see individual experimental details) to afford the acetylated products.

#### **General procedure II (GP II): Glycosylation with glycosyl donor 54 to yield fully protected mannosides**

Under a nitrogen atmosphere the glycosyl donor **54** (1.2-1.3 eq.) and the acceptor (1 eq.) were dissolved in dry dichloromethane and TMSOTf (0.12-0.13 eq.) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 30 min, neutralised with triethylamine, and concentrated in vacuo. The remaining solid was purified by flash column chromatography (see individual experimental details) to afford the fully protected mannosides.

#### **General procedure III (GP III): Deacetylation**

The protected compound was dissolved in methanol and NaOMe was added. The mixture was stirred at room temperature until the starting material was undetectable by TLC. Subsequent neutralisation of the reaction mixture with ion-exchange resin (Amberlite IR-120 H<sup>+</sup> form) was followed by filtration. The filtrate was concentrated to obtain the deprotected compounds with yields higher than 90%. Partially benzylated compounds were sufficiently pure for the following

reactions and were used without further purification. Fully deprotected compounds were dissolved in water and subsequently lyophilised to afford the desired compounds.

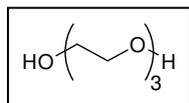
#### General procedure IV (GP IV): Replacement of benzyl protecting groups by acetyl groups

(a) A mixture of the benzylated precursor and Pearlman's catalyst in methanol/THF (1:1) was degassed and saturated with hydrogen several times. This was followed by vigorous stirring under hydrogen for 12-16 h. The catalyst was removed by filtration and concentrated *in vacuo* to yield deprotected compounds that were used without purification in the next step.

(b) The products from step a) were dissolved in pyridine/acetic anhydride (2:1) and stirred for 12-16 h. The reaction mixture was concentrated and the residue was purified by flash column chromatography (see individual experimental details). After purification, the fully acetylated mannosides were obtained as foams.

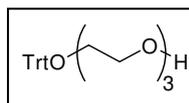
## 6.2.2 Substances and synthesised compounds

### Triethylene Glycol (1)



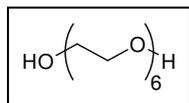
This compound was purchased from *Fluka*, dried over activated 4 Å molecular sieves and used without further purification.

### 8-Triphenylmethyloxy-3,6-dioxaoctan-1-ol (2)

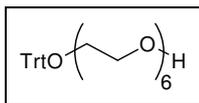


Compound **2** was synthesised according to a procedure from my diploma thesis<sup>[218]</sup>, a variation of a procedure from *Kaats-Richters et al.*<sup>[219]</sup> Triethylene glycol **1** (11.2 g, 75.2 mmol), tritylchloride (20.9 g, 75.0 mmol) and DMAP (1.0 g, 8.2 mmol) were dissolved in dry pyridine (200 mL) and stirred at room temperature for 16 h. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure to 1/3 of the original volume. Precipitated salts were removed by filtration over cellite. The filtrate was reduced and purified by flash column chromatography (silica gel, toluene/acetone 10:1 → 2:1) to afford compound **2** (15.3 g, 39.0 mmol, 52%) as an oil. The recorded physical data correspond to those reported in literature.<sup>[218, 219]</sup>

### Hexaethylene Glycol (3)



This compound was purchased from *Lancaster* and used without further purification.

**17-Triphenylmethoxy-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecan-1-ol (4)**

Hexaethylene glycol **3** (15.0 g, 53.1 mmol), tritylchloride (14.8 g, 53.1 mmol) and DMAP (650 mg, 5.32 mmol) were dissolved in dry pyridine (400 mL) and stirred at room temperature for 16 h. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure to 1/3 of the original volume. Precipitated salts were removed by filtration over cellite. The filtrate was reduced and purified by flash column chromatography (silica gel, toluene/acetone 2:1 → 1:1 → 0:1) to afford compound **4** (13.1 g, 25.0 mmol, 47%) as an oil and not consumed hexaethylene glycol **3** (5.5 g, 19.5 mmol, 37%). The recorded physical data correspond to those reported in literature.<sup>[293]</sup>

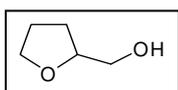
**TLC:**  $R_f = 0.32$  (toluene/ethyl acetate 2:1);

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 3.16$  (t,  $^3J = 5.2$  Hz, 2H, TrtOCH<sub>2</sub>), 3.49-3.68 (m, 22H, 11OCH<sub>2</sub>), 7.12-7.26 (m, 9H, Ph), 7.37-7.42 (m, 6H, Ph) ppm;

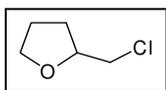
**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 61.57$  (1C, 1OCH<sub>2</sub>), 63.22 (1C, 1OCH<sub>2</sub>), 70.14 (1C, 1OCH<sub>2</sub>), 70.29-70.66 (8C, 8OCH<sub>2</sub>), 72.55 (1C, 1OCH<sub>2</sub>), 86.46 (1C, OCPH<sub>3</sub>), 126.91 (3C, Ph), 127.75 (6C, Ph), 128.70 (6C, Ph), 144.13 (3C, Ph) ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, DHB):  $m/z$  [M+Na]<sup>+</sup> calcd.: 547.3, found: 547.0; [M+K]<sup>+</sup> calcd.: 563.4, found: 563.0;

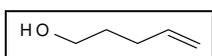
**elemental analysis** is calcd. (%) for C<sub>31</sub>H<sub>40</sub>O<sub>7</sub> (524.7): C: 70.97, H: 7.68; found: C: 70.58, H: 7.63.

**Tetrahydrofurfuryl Alcohol (5)**

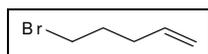
This compound was purchased from *Fluka* and used without further purification.

**Tetrahydrofurfuryl Chloride (6)**

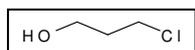
Compound **6** was prepared from **5** according to a procedure from *Brooks* and *Snyder*.<sup>[220]</sup> The recorded physical properties correspond to those reported in literature.<sup>[220]</sup>

**4-Penten-1-ol (7)**

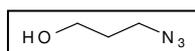
Compound **7** was prepared from **6** according to a procedure from *Brooks* and *Snyder*.<sup>[220]</sup> The recorded physical properties correspond to those reported in literature.<sup>[220]</sup>

**5-Bromo-1-pentene (8)**

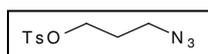
Compound **8** was prepared from pentenol **7** according to a procedure from *Antczak et al.*<sup>[221]</sup> The recorded physical properties correspond to those reported in literature.<sup>[294]</sup>

**3-Chloropropanol (9)**

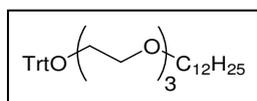
This compound was purchased from *Fluka* and used without further purification.

**3-Azidopropanol (10)**

Compound **10** was prepared from 3-chloropropanol **9** according to a procedure from *Pak and Hesse.*<sup>[222]</sup> The recorded physical properties correspond to those reported in literature.<sup>[295]</sup>

**3-Azido-1-propyl 4-Toluenesulfonate (11)**

Compound **11** was prepared from 3-azidopropanol **10** according to a procedure from *Pak and Hesse.*<sup>[222]</sup> The recorded physical properties correspond to those reported in literature.<sup>[222]</sup>

**1-Triphenylmethoxy-3,6,9-trioxahenicosane (12)**

Compound **2** (3.10 g, 7.90 mmol) and TBAI (200 mg, 0.54 mmol) were dissolved in dry THF (80 mL) and NaH (300 mg, 1.25 mol) was added in small portions. After the H<sub>2</sub> development had stopped dodecyl bromide (2.30 mL, 2.39 g, 9.60 mmol) was added. The reaction mixture was refluxed for 16 h. After cooling to RT the precipitated salts were removed by filtration. The filtrate was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by flash column chromatography (silica gel, toluene/ethyl acetate 20:1 → 10:1) to afford compound **12** (3.52 g, 6.28 mmol, 79%) as an oil.

**TLC:** R<sub>f</sub> = 0.58 (toluene/ethyl acetate 10:1);

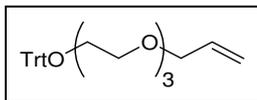
**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 0.85-0.92 (m, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.20-1.39 (m, 18H, 9CH<sub>2</sub>), 1.52-1.60 (m, 2H, 1CH<sub>2</sub>), 3.20-3.28 (m, 2H, 1OCH<sub>2</sub>), 3.40-3.48 (m, 2H, 1OCH<sub>2</sub>), 3.52-3.75 (m, 10H, 5OCH<sub>2</sub>), 7.17-7.34 (m, 9H, Ph), 7.42-7.51 (m, 6H, Ph) ppm;

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 14.05 (1C, CH<sub>3</sub>), 22.61 (1C, 1CH<sub>2</sub>), 26.06 (1C, 1CH<sub>2</sub>), 29.28-29.59 (7C, 7CH<sub>2</sub>), 31.85 (1C, 1CH<sub>2</sub>), 63.27 (1C, 1OCH<sub>2</sub>), 70.00-71.54 (6C, 6OCH<sub>2</sub>), 86.50 (1C, OCPH<sub>3</sub>), 126.94 (3C, Ph), 127.79 (6C, Ph), 128.75 (6C, Ph), 144.18 (3C, Ph) ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, DHB):  $m/z$   $[M+Na]^+$  calcd.: 583.4, found: 583.5;  $[M+K]^+$  calcd.: 599.5, found: 599.5;

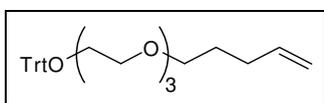
**elemental analysis** is calcd. (%) for  $C_{37}H_{52}O_4$  (560.8): C: 79.24, H: 9.35; found: C: 79.21, H: 8.87.

### 12-Triphenylmethoxy-4,7,10-trioxadodec-1-ene (13)



This compound was synthesised according to a procedure from my diploma thesis starting from compound **2** in 92% yield.<sup>[218]</sup> The recorded physical data correspond to those reported in the diploma thesis.<sup>[218]</sup>

### 14-Triphenylmethoxy-6,9,12-trioxatetradec-1-ene (14)



Compound **2** (2.16 g, 5.51 mmol) was dissolved in dry THF (30 mL) and NaH (170 mg, 7.08 mmol) was added. After the  $H_2$  development had stopped Bromopentene **8** (800  $\mu$ L, 1.01 g, 6.76 mmol) was added. The reaction mixture was refluxed for 16 h. After cooling to RT the precipitated salts were removed by filtration. The filtrate was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by flash column chromatography (silica gel, toluene/acetone 10:1  $\rightarrow$  5:1  $\rightarrow$  3:1) to afford compound **14** (2.18 g, 4.73 mmol, 86%) as an oil.

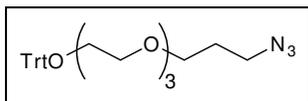
**TLC:**  $R_f$  = 0.64 (toluene/acetone 10:1);

**$^1H$ -NMR** (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 1.70 (quint,  $^3J$  = 7.1 Hz, 2H,  $OCH_2CH_2CH_2CHCH_2$ ), 2.12 (quart,  $^3J$  = 7.2 Hz, 2H,  $OCH_2CH_2CH_2CHCH_2$ ), 3.26 (t,  $^3J$  = 5.2 Hz, 2H,  $1OCH_2$ ), 3.48 (t,  $^3J$  = 6.7 Hz, 2H,  $OCH_2CH_2CH_2CHCH_2$ ), 3.59–3.62 (m, 2H,  $1OCH_2$ ), 3.68–3.74 (m, 8H,  $4OCH_2$ ), 4.97 (dd,  $^2J$  = 1.7 Hz,  $^3J_{cis}$  = 10.2 Hz, 1H,  $OCH_2CH_2CH_2CHCHH$ ), 5.03 (dd,  $^2J$  = 1.7 Hz,  $^3J_{trans}$  = 17.0 Hz, 1H,  $OCH_2CH_2CH_2CHCHH$ ), 5.82 (ddd,  $^3J_{CH,CH_2}$  = 6.6 Hz,  $^3J_{cis}$  = 10.2 Hz,  $^3J_{trans}$  = 17.0 Hz, 1H,  $OCH_2CH_2CH_2CHCH_2$ ), 7.21–7.36 (m, 9H, Ph), 7.47–7.52 (m, 6H, Ph) ppm;

**$^{13}C$ -NMR** (100 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 28.62 (1C,  $OCH_2CH_2CH_2CHCH_2$ ), 30.10 (1C,  $OCH_2CH_2CH_2CHCH_2$ ), 63.22 (1C,  $1OCH_2$ ), 70.07 (1C,  $1OCH_2$ ), 70.59 (1C,  $1OCH_2$ ), 70.64 (3C,  $3OCH_2$ ), 70.73 (1C,  $1OCH_2$ ), 86.44 (1C,  $OCPH_3$ ), 114.68 (1C,  $OCH_2CH_2CH_2CHCH_2$ ), 126.90 (3C, Ph), 127.75 (6C, Ph), 128.70 (6C, Ph), 138.30 (1C,  $OCH_2CH_2CH_2CHCH_2$ ), 144.13 (3C, Ph) ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, CHCA):  $m/z$   $[M+Na]^+$  calcd.: 483.3, found: 483.0;  $[M+K]^+$  calcd.: 499.3 found: 499.0;

**elemental analysis** is calcd. (%) for  $C_{30}H_{36}O_4$  (460.6): C: 78.23, H: 7.88; found: C: 78.09, H: 7.83.

**1-Azido-12-triphenylmethoxy-4,7,10-trioxadodecane (15)**

Compound **2** (18.3 g, 46.6 mmol) was dissolved in DMF (30 mL) and NaH (1.45 g, 60.4 mmol) was added in small portions. After the H<sub>2</sub> development had stopped Azidosylate **11** (15.5 g, 60.7 mmol) was added and the reaction mixture was stirred for 16 h at RT. After addition of NaH (800 mg, 33.3 mmol) the reaction mixture was stirred for another 5 h at RT and subsequently quenched with methanol (5 mL). The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by flash column chromatography (silica gel, toluene/ethyl acetate 10:1 → 5:1) to afford compound **15** (19.1 g, 40.2 mmol, 86%) as an oil.

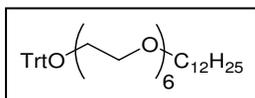
**TLC:** R<sub>f</sub> = 0.49 (toluene/ethyl acetate 5:1);

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.85 (quint, <sup>3</sup>J = 6.4 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 3.26 (t, <sup>3</sup>J = 5.2 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 3.38 (t, <sup>3</sup>J = 6.7 Hz, 2H, 1OCH<sub>2</sub>), 3.55 (t, <sup>3</sup>J = 6.0 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 3.60-3.64 (m, 2H, 1OCH<sub>2</sub>), 3.68–3.74 (m, 8H, 4OCH<sub>2</sub>), 7.22-7.35 (m, 9H, Ph), 7.47-7.52 (m, 6H, Ph), ppm;

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 28.98 (1C, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 48.33 (1C, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 63.23 (1C, 1OCH<sub>2</sub>), 67.77 (1C, 1OCH<sub>2</sub>), 70.30 (1C, 1OCH<sub>2</sub>), 70.58 (1C, 1OCH<sub>2</sub>), 70.61 (1C, 1OCH<sub>2</sub>), 70.68 (1C, 1OCH<sub>2</sub>), 70.75 (1C, 1OCH<sub>2</sub>), 86.46 (1C, CPh<sub>3</sub>), 126.93 (3C, Ph), 127.77 (6C, Ph), 128.71 (6C, Ph), 144.13 (3C, Ph) ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, CHCA): m/z [M+Na]<sup>+</sup> calcd.: 498.3, found: 498.3; [M+K]<sup>+</sup> calcd.: 514.3 found: 514.3;

**elemental analysis** is calcd. (%) for C<sub>28</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (475.6): C: 70.71, H: 6.99, N: 8.84; found: C: 70.56, H: 6.92, N: 8.16.

**1-Triphenylmethoxy-3,6,9,12,15,18-hexaoxatriacontane (16)**

Compound **4** (13.0 g, 24.8 mmol) and TBAI (900 mg, 2.44 mmol) were dissolved in dry THF (200 mL) and NaH (1.3 g (60%), 32.5 mmol) was added in small portions. After the H<sub>2</sub> development had stopped dodecyl bromide (7.70 mL, 8.01 g, 32.1 mmol) was added. The reaction mixture was refluxed for 16 h. After cooling to RT the precipitated salts were removed by filtration. The filtrate was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by flash column chromatography (silica gel, toluene/acetone 2:1) to afford compound **16** (14.4 g, 20.8 mmol, 84%) as an oil. The recorded physical data correspond to those reported in literature.<sup>[296]</sup>

**TLC:** R<sub>f</sub> = 0.23 (toluene/ethyl acetate 10:1);

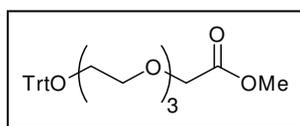
**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 0.87 (t, <sup>3</sup>J = 6.9 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.23-1.33 (m, 18H, 9CH<sub>2</sub>), 1.56 (quint, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, 2H, 1CH<sub>2</sub>), 3.23 (t, <sup>3</sup>J = 5.2 Hz, 2H, 1OCH<sub>2</sub>), 3.43 (t, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, 2H, 1OCH<sub>2</sub>), 3.54-3.74 (m, 22H, 11OCH<sub>2</sub>), 7.19-7.32 (m, 9H, Ph), 7.43-7.48 (m, 6H, Ph) ppm;

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 14.03 (1C, CH<sub>3</sub>), 22.61 (1C, 1CH<sub>2</sub>), 26.02 (1C, 1CH<sub>2</sub>), 29.28-29.65 (7C, 7CH<sub>2</sub>), 31.85 (1C, 1CH<sub>2</sub>), 63.27 (1C, 1OCH<sub>2</sub>), 70.01-71.53 (12C, 12OCH<sub>2</sub>), 86.50 (1C, OCPPh<sub>3</sub>), 126.94 (3C, Ph), 127.79 (6C, Ph), 128.75 (6C, Ph), 144.18 (3C, Ph) ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, DHB): m/z [M+Na]<sup>+</sup> calcd.: 715.5, found: 715.1; [M+K]<sup>+</sup> calcd.: 731.6, found: 731.1;

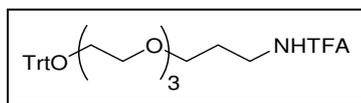
**elemental analysis** is calcd. (%) for C<sub>43</sub>H<sub>64</sub>O<sub>7</sub> (693.0): C: 74.53, H: 9.31; found: C: 74.30, H: 9.34.

### 11-Triphenylmethyloxy-3,6,9-trioxaundecanecarboxylic Acid Methyl Ester (17)



This compound was synthesised according to a procedure from my diploma thesis starting from compound **13** in yields ranging from 55% to 71%.<sup>[218]</sup> The recorded physical data correspond to those reported in the diploma thesis.<sup>[218]</sup>

### 2,2,2-Trifluoro-N-(12-triphenylmethyloxy-4,7,10-trioxadodec-1-yl)-acetamide (18)



Compound **15** (1.53 g, 3.22 mmol) was dissolved in methanol (20 mL) and Palladium (10% on carbon, ~20 mg) was added. The mixture was degassed and saturated with hydrogen several times followed by vigorous stirring under hydrogen for 1 h. The catalyst was removed by filtration and washed with methanol thoroughly. The filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was dried under vacuum for 1 h and dissolved in dry pyridine (5 mL) under a nitrogen atmosphere. The reaction mixture was cooled to 0 °C, trifluoroacetic anhydride (550 μL, 831 mg, 3.96 mmol) was added. The solution was allowed to come to RT and stirred for additional 12 h. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by flash column chromatography (silica gel, toluene/acetone 10:1 → 5:1) to afford compound **18** (1.38 g, 2.53 mmol, 79%) as an oil.

**TLC:** R<sub>f</sub> = 0.40 (toluene/acetone 5:1);

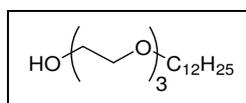
**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.80 (quint, <sup>3</sup>J = 5.7 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 3.26 (t, <sup>3</sup>J = 5.1 Hz, 2H, 1OCH<sub>2</sub>), 3.44 (quart, <sup>3</sup>J = 5.7 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 3.58-3.64 (m, 4H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH, 1OCH<sub>2</sub>), 3.66–3.72 (m, 8H, 4OCH<sub>2</sub>), 7.21-7.34 (m, 9H, Ph), 7.47-7.52 (m, 6H, Ph), 7.69 (bs, 1H, NH) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 27.63$  (1C,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ),  $38.95$  (1C,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ),  $63.11$  (1C,  $1\text{OCH}_2$ ),  $70.27$  (1C,  $1\text{OCH}_2$ ),  $70.29$  (1C,  $1\text{OCH}_2$ ),  $70.40$  (1C,  $1\text{OCH}_2$ ),  $70.44$  (1C,  $1\text{OCH}_2$ ),  $70.47$  (1C,  $1\text{OCH}_2$ ),  $70.55$  (1C,  $1\text{OCH}_2$ ),  $86.40$  (1C,  $\text{OCPh}_3$ ),  $115.91$ , (quart,  $^1J_{\text{C,F}} = 287.8$  Hz, 1C,  $\text{NHCOCF}_3$ ),  $126.87$  (3C, Ph),  $127.69$  (6C, Ph),  $128.61$  (6C, Ph),  $144.02$  (3C, Ph),  $156.89$  (quart,  $^2J_{\text{C,F}} = 36.6$  Hz, 1C,  $\text{NHCOCF}_3$ ) ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, CHCA):  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd.: 568.2, found: 567.4;  $[\text{M}+\text{K}]^+$  calcd.: 584.2 found: 583.4;

**elemental analysis** is calcd. (%) for  $\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{F}_3\text{NO}_5$  (545.6): C: 66.04, H: 6.28, N: 2.57; found: C: 66.07, H: 6.28, N: 2.47.

### 3,6,9-Trioxahenicosan-1-ol (19)



Compound **12** (7.45 g, 13.3 mmol) was dissolved in 150 mL methanol/acetic acid (2:1 v/v) and the solution was refluxed for 16 h. After cooling to RT the reaction mixture was concentrated under reduced pressure and co-evaporated with toluene. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, toluene/ethyl acetate 3:1  $\rightarrow$  1:1) to afford compound **19** (3.86 g, 12.1 mmol, 91%). The recorded physical data correspond to those reported in literature.<sup>[297, 298]</sup>

**TLC**:  $R_f = 0.32$  (toluene/ethyl acetate 1:1);

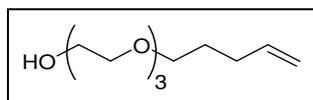
$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 0.86$  (t,  $^3J = 6.8$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.20-1.34 (m, 18H,  $9\text{CH}_2$ ), 1.56 (quint,  $^3J = 6.9$  Hz, 2H,  $1\text{CH}_2$ ), 3.43 (t,  $^3J = 6.9$  Hz, 2H,  $1\text{OCH}_2$ ), 3.55-3.76 (m, 12H,  $6\text{OCH}_2$ ) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 13.99$  (1C,  $\text{CH}_3$ ), 22.56 (1C,  $1\text{CH}_2$ ), 25.93 (1C,  $1\text{CH}_2$ ), 29.24-29.55 (7C,  $7\text{CH}_2$ ), 31.80 (1C,  $1\text{CH}_2$ ), 61.61 (1C,  $1\text{OCH}_2$ ), 69.91 (1C,  $1\text{OCH}_2$ ), 70.23 (1C,  $1\text{OCH}_2$ ), 70.50 (2C,  $2\text{OCH}_2$ ), 71.54 (1C,  $1\text{OCH}_2$ ), 72.51 (1C,  $1\text{OCH}_2$ ) ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, DHB):  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd.: 341.3, found: 341.4;  $[\text{M}+\text{K}]^+$  calcd.: 357.4, found: 357.3;

$\text{C}_{18}\text{H}_{38}\text{O}_4$  (318.5).

### 3,6,9-Trioxa-13-tetradecen-1-ol (20)



Compound **14** (3.00 g, 6.51 mmol) was dissolved in 20 mL methanol. Ion-exchanger IR-120 ( $\text{H}^+$  form) was added and the solution was refluxed for 18 h. After cooling to RT the reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by flash column chromatography (silica gel,

toluene/acetone 2:1) to afford compound **20** (1.15 g, 5.27 mmol, 81%). The recorded physical properties correspond to those reported in literature.<sup>[214, 299]</sup>

**TLC:**  $R_f = 0.45$  (toluene/acetone 4:1);

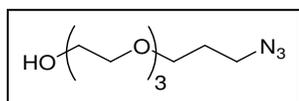
**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 1.63$  (quint,  $^3J = 6.7$  Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>), 2.05 (quart,  $^3J = 6.7$  Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>), 2.96 (bs, 1H, OH), 3.41 (t,  $^3J = 6.7$  Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>), 3.50–3.70 (m, 12H, 6OCH<sub>2</sub>), 4.91 (dd,  $^2J = 2.0$  Hz,  $^3J_{cis} = 10.1$  Hz, 1H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CHCHH), 4.96 (dd,  $^2J = 2.0$  Hz,  $^3J_{trans} = 16.6$  Hz, 1H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CHCHH), 5.75 (ddd,  $^3J_{CH,CH_2} = 6.7$  Hz,  $^3J_{cis} = 10.1$  Hz,  $^3J_{trans} = 16.6$  Hz, 1H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>) ppm;

**<sup>13</sup>C-NMR** (63 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 28.51$  (1C, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>), 30.00 (1C, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>), 61.43 (1C, 1OCH<sub>2</sub>), 69.85 (1C, 1OCH<sub>2</sub>), 70.10 (1C, 1OCH<sub>2</sub>), 70.33 (1C, 1OCH<sub>2</sub>), 70.38 (1C, 1OCH<sub>2</sub>), 70.54 (1C, 1OCH<sub>2</sub>), 72.46 (1C, 1OCH<sub>2</sub>), 114.57 (1C, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>), 138.04 (1C, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>) ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, CHCA):  $m/z$  [M+Na]<sup>+</sup> calcd.: 241.3, found: 240.9 [M+K]<sup>+</sup> calcd.: 257.4 found: 256.9;

**elemental analysis** is calcd. (%) for C<sub>11</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub> (218.3): C: 60.52, H: 10.16; found: C: 60.05, H: 9.98.

### 12-Azido-3,6,9-trioxadodecan-1-ol (**21**)



Compound **15** (2.15 g, 4.52 mmol) was dissolved in 40 mL methanol/acetic acid (1:1 v/v) and the solution was refluxed for 18 h.

After cooling to RT the reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by flash column chromatography (silica gel, toluene/acetone 2:1 → 1:1) to afford compound **21** (965 mg, 4.14 mmol, 92%). The recorded physical properties correspond to those reported in literature.<sup>[214]</sup>

**TLC:**  $R_f = 0.34$  (toluene/acetone 1:1);

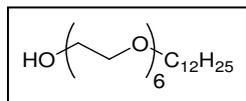
**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 1.81$  (quint,  $^3J = 6.4$  Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 2.85 (bs, 1H, OH), 3.35 (t,  $^3J = 6.7$  Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 3.50 (t,  $^3J = 6.1$  Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 3.53–3.70 (m, 12H, 6OCH<sub>2</sub>) ppm;

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 28.83$  (1C, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 48.20 (1C, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 61.46 (1C, 1OCH<sub>2</sub>), 67.68 (1C, 1OCH<sub>2</sub>), 70.07 (1C, 1OCH<sub>2</sub>), 70.12 (1C, 1OCH<sub>2</sub>), 70.30 (1C, 1OCH<sub>2</sub>), 70.42 (1C, 1OCH<sub>2</sub>), 72.36 (1C, 1OCH<sub>2</sub>) ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, CHCA):  $m/z$  [M+Na]<sup>+</sup> calcd.: 256.1, found: 256.8; [M+K]<sup>+</sup> calcd.: 272.1 found: 272.9;

$C_9H_{19}N_3O_4$  (233.3).

### 3,6,9,12,15,18-Hexaoxatriacontan-1-ol (22)



Compound **16** (14.3 g, 20.6 mmol) was dissolved in 300 mL methanol/acetic acid (2:1 v/v) and the solution was refluxed for 16 h. After cooling to RT the reaction mixture was concentrated under reduced pressure and co-evaporated with toluene. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, toluene/acetone 2:1  $\rightarrow$  1:1  $\rightarrow$  1:2) to afford compound **22** (8.7 g, 19.3 mmol, 94%).<sup>[298]</sup>

**TLC:**  $R_f$  = 0.37 (toluene/acetone 3:2);

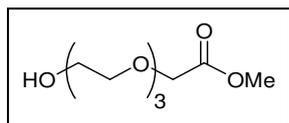
**$^1H$ -NMR** (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 0.87 (t,  $^3J$  = 6.8 Hz, 3H,  $CH_3$ ), 1.21-1.34 (m, 18H, 9 $CH_2$ ), 1.56 (quint,  $^3J$  = 6.9 Hz, 2H, 1 $CH_2$ ), 3.43 (t,  $^3J$  = 6.8 Hz, 2H, 10 $CH_2$ ), 3.55-3.77 (m, 24H, 12 $OCH_2$ ) ppm;

**$^{13}C$ -NMR** (100 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 14.02 (1C,  $CH_3$ ), 22.60 (1C, 1 $CH_2$ ), 26.00 (1C, 1 $CH_2$ ), 29.26-29.53 (7C, 7 $CH_2$ ), 31.83 (1C, 1 $CH_2$ ), 61.67 (1C, 10 $CH_2$ ), 69.98 (1C, 10 $CH_2$ ), 70.23-70.56 (9C, 9 $OCH_2$ ), 71.53 (1C, 10 $CH_2$ ), 72.55 (1C, 10 $CH_2$ ) ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, DHB):  $m/z$   $[M+Na]^+$  calcd.: 473.3, found: 473.3;  $[M+K]^+$  calcd.: 489.5, found: 489.3;

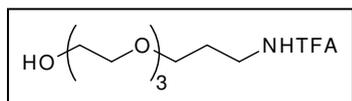
$C_{24}H_{50}O_7$  (450.7).

### 11-Hydroxy-3,6,9-trioxaundecanecarboxylic Acid Methyl Ester (23)



This compound was synthesized according to a procedure from my diploma thesis starting from compound **17** in 88% yield.<sup>[218]</sup> The recorded physical data correspond to those reported in literature.<sup>[300]</sup>

### 2,2,2-Trifluoro-*N*-(12-hydroxy-4,7,10-trioxadodecyl)-acetamide (24)



Compound **18** (1.23 g, 2.25 mmol) was dissolved in methanol (30 mL) and trifluoroacetic acid (1 mL) was added. The solution was stirred for 16 h at RT. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by flash column chromatography (silica gel, toluene/acetone 2:1  $\rightarrow$  1:1) to afford compound **24** (520 mg, 1.71 mmol, 76%). The recorded physical properties correspond to those reported in literature.<sup>[214]</sup>

**TLC:**  $R_f$  = 0.39 (toluene/acetone 1:1);

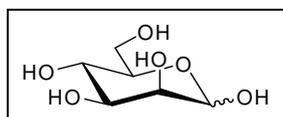
$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.73$  (quint,  $^3J = 5.7$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 3.45 (quart,  $^3J = 5.7$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 3.30 (bs, 1H, OH), 3.51–3.70 (m, 14H,  $6\text{OCH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 8.17 (bs, 1H, NH) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$  (63 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 27.75$  (1C,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 37.87 (1C,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 61.30 (1C,  $1\text{OCH}_2$ ), 69.16 (1C,  $1\text{OCH}_2$ ), 69.85 (1C,  $1\text{OCH}_2$ ), 69.96 (1C,  $1\text{OCH}_2$ ), 70.23 (1C,  $1\text{OCH}_2$ ), 70.48 (1C,  $1\text{OCH}_2$ ), 72.34 (1C,  $1\text{OCH}_2$ ), 115.91, (quart,  $^1J_{\text{C,F}} = 287.1$  Hz, 1C,  $\text{NHCOCF}_3$ ), 157.09 (quart,  $^2J_{\text{C,F}} = 36.4$  Hz, 1C,  $\text{NHCOCF}_3$ ) ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, DHB):  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd.: 326.1, found: 326.0;  $[\text{M}+\text{K}]^+$  calcd.: 342.2 found: 342.0;

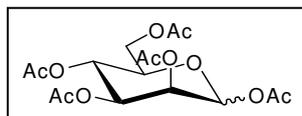
$\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{F}_3\text{NO}_5$  (303.3).

### D-Mannose (25)



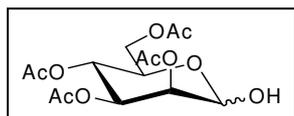
This compound was purchased from *Acros* and used without further purification.

### 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- $\alpha/\beta$ -D-mannopyranosyl Acetate (26)



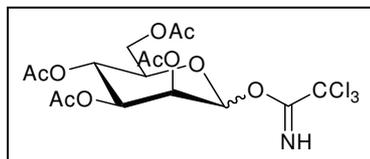
Compound **26** was prepared from **25** according to a procedure from *Fischer and Oetker*.<sup>[224]</sup> The recorded physical properties correspond to those reported in literature.<sup>[301]</sup>

### 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- $\alpha/\beta$ -D-mannopyranose (27)



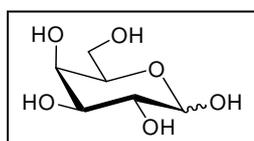
Compound **27** was prepared from **26** according to a procedure from *Kerekyarto et al.*<sup>[225]</sup> The recorded physical properties correspond to those reported in literature.<sup>[302]</sup>

### O-(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- $\alpha/\beta$ -D-mannopyranosyl) Trichloroacetimidate (28)

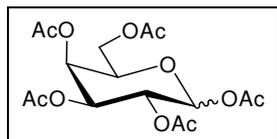


Compound **28** was prepared from **27** according to a procedure from *Upreti et al.*<sup>[226]</sup> The recorded physical properties correspond to those reported in literature.<sup>[226]</sup>

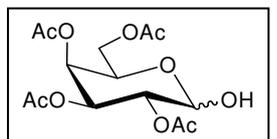
### D-Galactose (29)



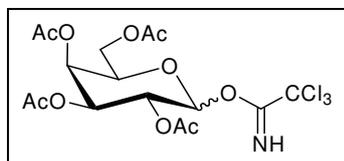
This compound was purchased from *Sigma-Aldrich* and used without further purification.

**2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ / $\beta$ -D-galactopyranosyl Acetate (30)**

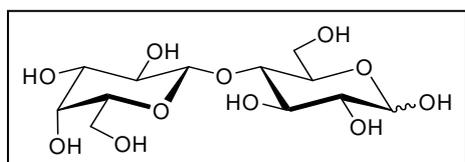
Compound **30** was prepared from **31** according to a procedure from *Wolfrom and Thompson*.<sup>[227]</sup> The recorded physical properties correspond to those reported in literature.<sup>[301, 303]</sup>

**2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ / $\beta$ -D-galactopyranose (31)**

Compound **31** was prepared from **30** according to a procedure from *Koeman et al.*<sup>[228]</sup> The recorded physical properties correspond to those reported in literature.<sup>[304]</sup>

***O*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ / $\beta$ -D-galactopyranosyl) Trichloroacetimidate (32)**

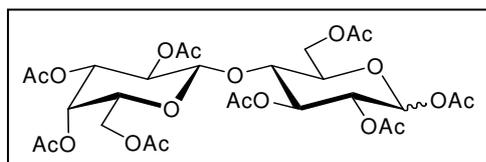
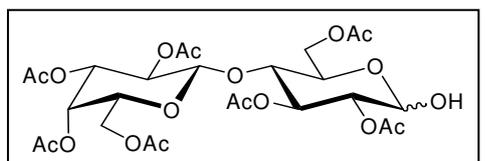
Compound **32** was prepared from **31** according to a procedure from *Koeman et al.*<sup>[228]</sup> The recorded physical properties correspond to those reported in literature.<sup>[228, 305]</sup>

**D-Lactose (33)**

This compound was purchased from *Fluka* and used without further purification.

**2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl- $\alpha$ / $\beta$ -D-glucopyranosyl Acetate (34)**

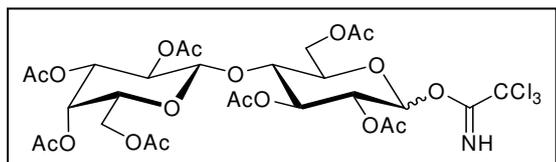
Compound **34** was prepared from **33** according to a procedure from *Critchley et al.*<sup>[229]</sup> The recorded physical properties correspond to those reported in literature.<sup>[229]</sup>

**2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl- $\alpha$ / $\beta$ -D-glucopyranose (35)**

Compound **35** was prepared from **34** according to a procedure from *Koeman et al.*<sup>[228]</sup> The recorded physical properties correspond to those reported in literature.<sup>[306]</sup>

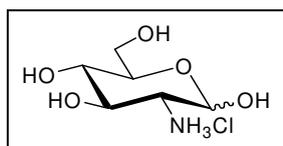
***O*-[2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl- $\alpha/\beta$ -D-glucopyranosyl] Trichloroacetimidate (36)**

Compound **36** was prepared from **35** according to a procedure from *Koeman et al.*<sup>[228]</sup> The



recorded physical properties correspond to those reported in literature.<sup>[228, 307]</sup>

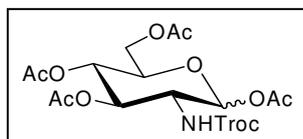
**D-Glucosamine Hydrochloride (37)**



This compound was purchased from *Glycon* and used without further purification.

**3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-(2,2,2-trichloroethoxycarbonylamino)- $\alpha/\beta$ -D-glucopyranosyl Acetate (38)**

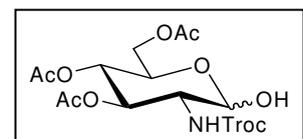
Compound **38** was prepared from Glucosamin hydrochloride **37** according to a procedure from



*Dullenkopf et al.*<sup>[232]</sup> The recorded physical properties correspond to those reported in literature.<sup>[308]</sup>

**3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-(2,2,2-trichloroethoxycarbonylamino)- $\alpha/\beta$ -D-glucopyranose (39)**

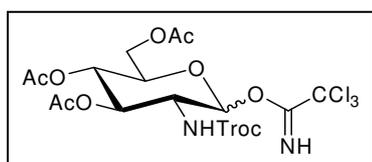
Compound **39** was prepared from **38** according to a procedure from *Zhang and Kovac* using



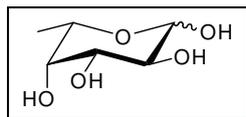
ethylendiamine acetate.<sup>[233]</sup> The recorded physical properties correspond to those reported in literature.<sup>[232]</sup>

***O*-[3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-(2,2,2-trichloroethoxycarbonylamino)- $\alpha/\beta$ -D-glucopyranosyl] Trichloroacetimidate (40)**

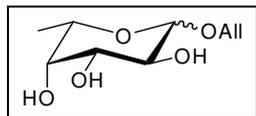
Compound **40** was prepared from **39** according to a procedure from *Dullenkopf et al.*<sup>[232]</sup> The



recorded physical properties correspond to those reported in literature.<sup>[309]</sup>

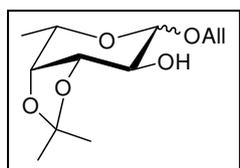
**L-Fucose (41)**

This compound was purchased from *Glycon* and used without further purification.

**Allyl  $\alpha/\beta$ -L-Fucopyranoside (42)**

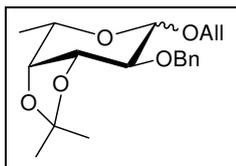
Compound **42** was prepared from **41** in a variation of a procedure from *Windmüller*.<sup>[234]</sup> Compound **41** (25 g, 152 mmol) and p-toluenesulphonic acid monohydrate (500 mg, 2.63 mmol) were suspended in allyl alcohol (300 mL). The reaction mixture was refluxed for 12 h and concentrated under reduced pressure to afford a mixture of the desired product **42**, by-product **42-N** and not consumed starting material **41**. This mixture (~30 g) was used in the next reaction step without further purification. A small portion was purified by flash column chromatography (silica gel, chloroform/methanol 4:1) to afford a mixture of  $\alpha$ -**42** and  $\beta$ -**42**. The recorded physical properties of **42** correspond to those reported in literature.<sup>[234]</sup>

**TLC:** **41**:  $R_f \approx 0.1-0.2$  ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  3:1);  $\alpha$ -**42**/ $\beta$ -**42**:  $R_f = 0.45$  ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  3:1);  $\alpha$ -**42-N**/ $\beta$ -**42-N**:  $R_f = 0.55$  ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  3:1).

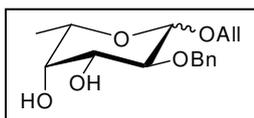
**Allyl 3,4-O-Isopropylidene- $\alpha/\beta$ -L-fucopyranoside (43)**

Compound **43** was prepared from the mixture of compounds **42**, **42-N** and **41** of the previous reaction step in a variation of a procedure from *Windmüller*.<sup>[234]</sup> The reaction mixture (~30 g) was dissolved in acetone (300 mL) and p-toluenesulphonic acid monohydrate (300 mg, 2.63 mmol) was added. The solution was refluxed for 12 h, neutralised with triethylamine and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash column chromatography (silica gel, petrol ether/ethyl acetate 2:1  $\rightarrow$  0:1  $\rightarrow$  ethyl acetate/methanol 2:1) to afford product **43** (27.1 g, 111 mmol, 73%), by-product **42-N** (5.19 g, 25.4 mmol, 17%) and by-product **43-N** (2.63 g, 10.8 mmol, 7%). The recorded physical properties of **43** correspond to those reported in literature.<sup>[234]</sup> Compound **42-N** could be used as starting material in the previous allylation reaction leading to a mixture of **42** and **42-N**.

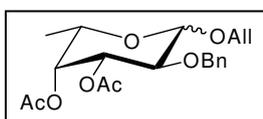
**TLC:**  $\alpha$ -**42-N**/ $\beta$ -**42-N**:  $R_f \approx 0.1$  (petroleum ether/ethyl acetate 1:1);  $\alpha$ -**43**/ $\beta$ -**43**:  $R_f \approx 0.4-0.6$  (petroleum ether/ethyl acetate 1:1); **43-N**:  $R_f = 0.90$  (petroleum ether/ethyl acetate 1:1).

**Allyl 2-O-Benzyl-3,4-O-isopropylidene- $\alpha/\beta$ -L-fucopyranoside (44)**

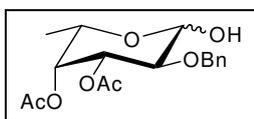
Compound **44** was prepared from **43** according to a procedure from *Windmüller*.<sup>[234]</sup> The recorded physical properties respond to those reported in literature.<sup>[234]</sup>

**Allyl 2-O-Benzyl- $\alpha/\beta$ -L-fucopyranoside (45)**

Compound **45** was prepared from **44** according to a procedure from *Windmüller*.<sup>[234]</sup> The recorded physical properties correspond to those reported in literature.<sup>[234]</sup>

**Allyl 3,4-Di-O-acetyl-2-O-benzyl- $\alpha/\beta$ -L-fucopyranoside (46)**

Compound **46** was prepared from **45** according to a procedure from *Windmüller*.<sup>[234]</sup> The recorded physical properties correspond to those reported in literature.<sup>[234]</sup>

**3,4-Di-O-acetyl-2-O-benzyl- $\alpha/\beta$ -L-fucopyranose (47)**

a) using *Wilkinson's Catalyst*:

Compound **47** was prepared from **46** according to a procedure from *Windmüller*.<sup>[234]</sup> in yields ranging from 30% to 50%.

b) using *Palladium(II)chloride*:

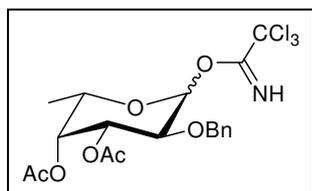
Compound **47** was prepared from **46** in a variation of a procedure from *Ogawa*.<sup>[237]</sup> PdCl<sub>2</sub> (10.0 g, 56.4 mmol) and sodium acetate (28.7 g, 350 mmol) were suspended in acetic acid/water (540 mL/60 mL) and the suspension was added to a solution of compound **46** (20.5 g, 54.2 mmol) dissolved in ethyl acetate (150 mL). The reaction mixture was stirred for 24 h at room temperature, precipitated palladium was removed by filtration and the filtrate was diluted with water (200 mL) and dichloromethane (300 mL). The organic layer was separated and carefully neutralised with cold saturated NaHCO<sub>3</sub> solution and solid NaHCO<sub>3</sub> in addition. The organic layer was again separated, the aqueous phase was extracted with dichloromethane twice and the combined organic phases were dried and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash column chromatography (silica gel, petrol ether/ethyl acetate 3:2 → 1:1) to afford **47** (14.2 g, 42.0 mmol, 77%) and not consumed starting material **46** (3.96 g, 10.5 mmol, 19%) as colourless oils.

Precipitated palladium from the reaction was dissolved in aqua regia (conc. hydrochloric acid/conc. nitric acid 3/1 (v/v), 100 mL) and water (100 mL). The reaction mixture was heated

and evaporated to dryness under vigorous stirring. The solid residue was milled and dried in a cabinet dryer ( $T = 80^{\circ}\text{C}$ ) for 48 h. The obtained crude  $\text{PdCl}_2$  could be reused for the next reaction of the same type without further purification.

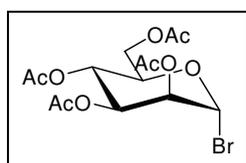
The recorded physical properties of compound **47** correspond to those reported in literature.<sup>[234]</sup>

### ***O*-(3,4-Di-*O*-acetyl-2-*O*-benzyl- $\alpha/\beta$ -L-fucopyranosyl) Trichloroacetimidate (**48**)**



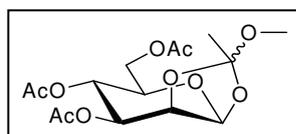
Compound **48** was prepared from **47** according to a procedure from Windmüller.<sup>[234]</sup> The recorded physical properties correspond to those reported in literature.<sup>[234]</sup>

### **2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl Bromide (**49**)**



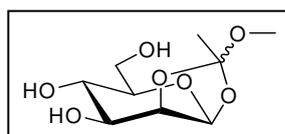
Compound **49** was prepared from **25** according to a procedure from Kartha and Jennings.<sup>[239]</sup> The recorded physical properties correspond to those reported in literature.<sup>[310]</sup>

### **3,4,6-Tri-*O*-acetyl-1,2-*O*-(1-(*R/S*)-methoxyethylidene)- $\beta$ -D-mannopyranose (**50**)**



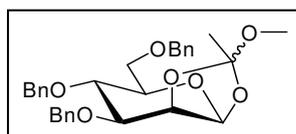
Compound **50** was prepared from **49** according to a procedure from Franks *et al.*<sup>[240]</sup> The recorded physical properties correspond to those reported in literature.<sup>[243, 310]</sup>

### **1,2-*O*-(1-(*R/S*)-Methoxyethylidene)- $\beta$ -D-mannopyranose (**51**)**



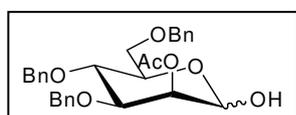
Compound **51** was prepared from **50** according to a procedure from Ponpipom<sup>[241]</sup> and used in the following step without further purification.

### **3,4,6-Tri-*O*-benzyl-1,2-*O*-(1-(*R/S*)-methoxyethylidene)- $\beta$ -D-mannopyranose (**52**)**



Compound **52** was prepared from **51** according to a procedure from Ponpipom.<sup>[241]</sup> The recorded physical properties correspond to those reported in literature.<sup>[243, 310]</sup>

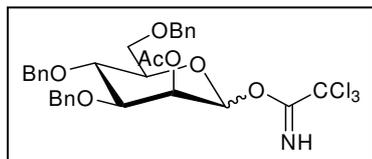
### **2-*O*-Acetyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl- $\alpha/\beta$ -D-mannopyranose (**53**)**



Compound **53** was prepared from **52** according to a procedure from Schmidt *et al.*<sup>[242]</sup> The recorded physical properties correspond to those

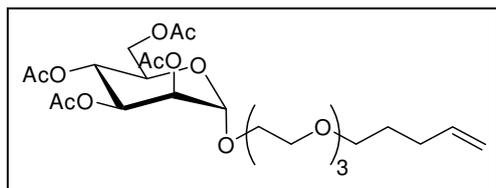
reported in literature.<sup>[242]</sup>

### *O*-(2-*O*-Acetyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl- $\alpha/\beta$ -D-mannopyranosyl) Trichloroacetimidate (**54**)



Compound **54** was prepared from **53** according to a procedure from Yamazaki *et al.*<sup>[243, 244, 311]</sup> The recorded physical properties correspond to those reported in literature.<sup>[243, 244, 311]</sup>

### 3,6,9-Trioxa-13-tetradecen-1-yl 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside (**55**)



Compound **55** was prepared from triethylene glycol derivative **20** (270 mg, 1.2 mmol) and mannosyl donor **28** (916 mg, 1.9 mmol, 1.5 eq.) according to GP I using boron trifluoride etherate (231  $\mu$ L, 1.9 mmol, 1.5 eq.) as

Lewis acid. The crude product was purified by flash column chromatography (silica gel, petroleum ether/ethyl acetate 9:1  $\rightarrow$  7:3) to afford the mannose derivative **55** (550 mg, 1.0 mmol, 79%) as a pale, colourless oil.

**TLC:**  $R_f$  = 0.55 (petroleum ether/ethyl acetate 2:1);

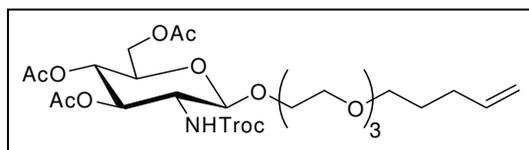
$[\alpha]_D^{20}$  = +29.0 ( $c$  = 1.0,  $\text{CHCl}_3$ );

**$^1\text{H-NMR}$**  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1.66 (quint,  $^3J$  = 6.7 Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ ), 1.98 (s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 2.02 (s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 2.06 (quart,  $^3J$  = 6.7 Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ ), 2.09 (s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 2.14 (s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 3.46 (t,  $^3J$  = 6.7 Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ ), 3.50–3.70 (m, 11H, 11/2 $\text{OCH}_2$ ), 3.75–3.86 (m, 1H, 1/2 $\text{OCH}_2$ ), 4.05 (ddd,  $^3J_{4,5}$  = 9.2 Hz,  $^3J_{5,6a}$  = 2.4 Hz,  $^3J_{5,6'a}$  = 5.1 Hz, 1H, 5-H), 4.07 (dd,  $^3J_{5,6a}$  = 2.4 Hz,  $^2J_{6a,6'a}$  = 12.4 Hz, 1H, 6a-H), 4.28 (dd,  $^3J_{5,6'a}$  = 5.1 Hz,  $^2J_{6a,6'a}$  = 12.4 Hz, 1H, 6'a-H), 4.86 (d,  $^3J_{1,2}$  = 1.7 Hz, 1H, 1-H), 4.94 (dd,  $^2J$  = 2.0 Hz,  $^3J_{cis}$  = 10.2 Hz, 1H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCHH}$ ), 5.00 (dd,  $^2J$  = 2.0 Hz,  $^3J_{trans}$  = 17.2 Hz, 1H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCHH}$ ), 5.25 (dd,  $^3J_{1,2}$  = 1.7 Hz,  $^3J_{2,3}$  = 3.1 Hz, 1H, 2-H), 5.27 (dd,  $^3J_{3,4}$  = 9.9 Hz,  $^3J_{4,5}$  = 9.2 Hz, 1H, 4-H), 5.34 (dd,  $^3J_{2,3}$  = 3.1 Hz,  $^3J_{3,4}$  = 9.9 Hz, 1H, 3-H), 5.75 (ddd,  $^3J_{CH,CH_2}$  = 6.7 Hz,  $^3J_{cis}$  = 10.2 Hz,  $^3J_{trans}$  = 17.2 Hz, 1H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ ) ppm;

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (63 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 20.64 (2C, 2 $\text{COCH}_3$ ), 20.70 (1C, 1 $\text{COCH}_3$ ), 20.84 (1C, 1 $\text{COCH}_3$ ), 28.70 (1C,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ ), 30.15 (1C,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ ), 62.41 (1C), 66.15 (1C), 67.36 (1C), 68.40 (1C), 69.08 (1C), 69.56 (1C), 69.96(2C), 70.52(2C), 70.64 (1C), 70.69 (1C), 97.66 (1C, C-1), 114.69 (1C,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ ), 138.20 (1C,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ ), 169.67 (1C,  $\text{COCH}_3$ ), 169.88 (1C,  $\text{COCH}_3$ ), 170.01 (1C,  $\text{COCH}_3$ ), 170.65 (1C,  $\text{COCH}_3$ ) ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, DHB):  $m/z$   $[M+Na]^+$  calcd.: 571.6, found: 571.5;  $[M+K]^+$  calcd.: 587.7 found: 587.6;  
 $C_{25}H_{40}O_{13}$  (548.6).

**3,6,9-Trioxa-13-tetradecen-1-yl 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-(2,2,2-trichloroethoxy-carbonylamino)- $\beta$ -D-glucopyranoside (56)**



Compound **56** was prepared from triethylene glycol derivative **20** (98 mg, 0.45 mmol) and glucosamine donor **40** (338 mg, 0.54 mmol, 1.2 eq.) according to GP I using trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate (10  $\mu$ L, 0.05 mmol, 0.12 eq.) as Lewis acid. The crude product was purified by flash column chromatography (silica gel, toluene/acetone 5:1) to afford the glucosamine derivative **56** (258 mg, 0.38 mmol, 85%) as a pale, colourless oil.

**TLC:**  $R_f$  = 0.60 (toluene/acetone 2:1);

$[\alpha]_D^{20}$  = -4.6 ( $c$  = 1.0,  $CHCl_3$ );

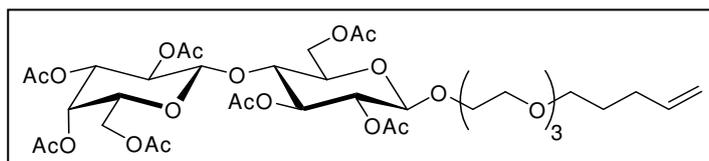
**$^1H$ -NMR** (250 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 1.66 (quint,  $^3J$  = 6.6 Hz, 2H,  $OCH_2CH_2CH_2CHCH_2$ ), 1.97 (s, 3H,  $COCH_3$ ), 1.99 (s, 3H,  $COCH_3$ ), 2.06 (s, 3H,  $COCH_3$ ), 2.07 (quart,  $^3J$  = 6.6 Hz, 2H,  $OCH_2CH_2CH_2CHCH_2$ ), 3.45 (t,  $^3J$  = 6.6 Hz, 2H,  $OCH_2CH_2CH_2CHCH_2$ ), 3.50–3.70 (m, 13H, 2-H, 6OCH<sub>2</sub>), 3.81–3.90 (m, 1H, H-5), 4.09 (dd,  $^3J_{5,6a}$  = 2.3 Hz,  $^2J_{6a,6'a}$  = 12.3 Hz, 1H, 6a-H), 4.24 (dd,  $^3J_{5,6'a}$  = 4.7 Hz,  $^2J_{6a,6'a}$  = 12.3 Hz, 1H, 6'a-H), 4.71 (s, 2H,  $CH_2CCl_3$ ), 4.81 (d,  $^3J_{1,2}$  = 8.6 Hz, 1H, 1-H), 4.94 (dd,  $^2J$  = 2.1 Hz,  $^3J_{cis}$  = 10.1 Hz, 1H,  $OCH_2CH_2CH_2CHCHH$ ), 4.99 (dd,  $^2J$  = 2.1 Hz,  $^3J_{trans}$  = 16.9 Hz, 1H,  $OCH_2CH_2CH_2CHCHH$ ), 5.00–5.15 (m, 2H, 3-H, 4-H), 5.79 (ddd,  $^3J_{CH,CH_2}$  = 6.6 Hz,  $^3J_{cis}$  = 10.1 Hz,  $^3J_{trans}$  = 16.9 Hz, 1H,  $OCH_2CH_2CH_2CHCH_2$ ), 6.57 (d,  $^3J_{2/NH}$  = 9.4 Hz, 1H, NH) ppm;

**$^{13}C$ -NMR** (63 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 20.53 (1C, 1COCH<sub>3</sub>), 20.57 (1C, 1COCH<sub>3</sub>), 20.67 (1C, 1COCH<sub>3</sub>), 28.71 (1C,  $OCH_2CH_2CH_2CHCH_2$ ), 30.14 (1C,  $OCH_2CH_2CH_2CHCH_2$ ), 58.07 (1C), 62.10 (1C), 68.72 (1C), 69.86 (1C), 70.15 (1C), 70.28 (1C), 70.5 (2C), 71.44 (2C), 71.61 (1C), 73.07 (1C), 74.41 (1C), 95.58 (1C,  $CH_2CCl_3$ ), 101.79 (1C, C-1), 114.69 (1C,  $OCH_2CH_2CH_2CHCH_2$ ), 138.15 (1C,  $OCH_2CH_2CH_2CHCH_2$ ), 154.74 (1C, NHCOO), 169.36 (1C, COCH<sub>3</sub>), 170.31 (1C, COCH<sub>3</sub>), 170.66 (1C, COCH<sub>3</sub>) ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, DHB):  $m/z$   $[M+Na]^+$  calcd.: 702.2, found: 702.7;  $[M+K]^+$  calcd.: 718.3 found: 718.8;

$C_{26}H_{40}Cl_3NO_{13}$  (681.0).

**3,6,9-Trioxa-13-tetradecen-1-yl 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-O-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (57)**



Compound **57** was prepared from triethylene glycol derivative **20** (260 mg, 1.19 mmol) and lactose donor **36** (1.33 g,

1.70 mmol, 1.4 eq.) according to GPI using trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate (11  $\mu$ L, 0.06 mmol, 0.05 eq.) as Lewis acid and adding dry Ether (1 mL) to the reaction mixture. The crude product was purified by flash column chromatography (silica gel, toluene/acetone 12:1  $\rightarrow$  3:1 acetone) to afford the lactose derivative **57** (700 mg, 0.83 mmol, 70%) as a pale, colourless oil.

**TLC:**  $R_f$  = 0.61 (toluene/acetone 1:1);

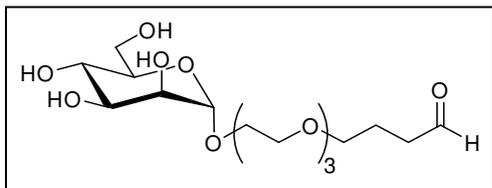
$[\alpha]_D^{20}$  = -8.3 (c = 1.0,  $\text{CHCl}_3$ );

**$^1\text{H-NMR}$**  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1.66 (quint,  $^3J$  = 6.6 Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ ), 1.97 (s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 2.04 (3s, 9H,  $3\text{COCH}_3$ ), 2.06 (s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 2.07 (quart,  $^3J$  = 6.6 Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ ), 2.12 (s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 2.15 (s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 3.45 (t,  $^3J$  = 6.6 Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ ), 3.50–3.75 (m, 14H, 4a-H, 5a-H,  $6\text{OCH}_2$ ), 3.83–3.89 (m, 1H, H-5b), 3.99–4.15 (m, 3H, 6a-H, 6b-H, 6'b-H), 4.43–4.51 (m, 1H, 6a'-H), 4.49 (d,  $^3J_{1,2}$  = 8.0 Hz, 1H, 1b-H), 4.54 (d,  $^3J_{1,2}$  = 8.0 Hz, 1H, 1a-H), 4.85–5.15 (m, 5H, 2a-H, 2b-H, 3b-H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ ), 5.19 (dd,  $^3J_{2a/3a} \approx ^3J_{3a/4a} = 7.9$  Hz, 1H, 3a-H), 5.34 (dd,  $^2J_{3b/4b} \approx ^3J_{4b/5b} = 3.4$  Hz, 1H, 4b-H), 5.81 (ddd,  $^3J_{\text{CH},\text{CH}_2} = 6.7$  Hz,  $^3J_{\text{cis}} = 10.2$  Hz,  $^3J_{\text{trans}} = 17.1$  Hz, 1H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ ) ppm;

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (63 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 20.41 (1C,  $1\text{COCH}_3$ ), 20.54 (1C,  $1\text{COCH}_3$ ), 20.60 (1C,  $1\text{COCH}_3$ ), 20.71 (2C,  $2\text{COCH}_3$ ), 20.78 (2C,  $2\text{COCH}_3$ ), 28.63 (1C,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ ), 30.13 (1C,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ ), 60.70 (1C), 61.65 (1C), 61.93 (1C), 66.51 (1C), 69.00 (1C), 69.50 (1C), 69.97 (1C), 70.16 (1C), 70.28 (1C), 70.52 (1C), 70.56 (1C), 70.64 (1C), 70.89 (1C), 71.55 (1C), 72.50 (1C), 72.72 (1C), 76.20 (1C), 100.54 (1C), 100.98 (1C), 114.60 (1C,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ ), 138.18 (1C,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ ), 168.95 (1C,  $\text{COCH}_3$ ), 169.00 (1C,  $\text{COCH}_3$ ), 169.55 (1C,  $\text{COCH}_3$ ), 169.64 (1C,  $\text{COCH}_3$ ), 169.94 (1C,  $\text{COCH}_3$ ), 170.03 (1C,  $\text{COCH}_3$ ), 170.22 (1C,  $\text{COCH}_3$ ) ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, DHB): m/z  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd.: 859.8, found: 859.6;  $[\text{M}+\text{K}]^+$  calcd.: 875.9 found: 875.6;

**elemental analysis** is calcd. (%) for  $\text{C}_{37}\text{H}_{56}\text{O}_{21}$  (836.8): C: 53.10, H: 6.75; found: C: 52.73, H: 7.00.

**12-Formyl-3,6,9-trioxadodec-1-yl  $\alpha$ -D-Mannopyranoside (58)**

Compound **55** (390 mg, 690  $\mu$ mol) was dissolved in methanol (10 mL), and potassium carbonate (380 mg, 2.8 mmol, 4.0 eq.) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 90 min. The reaction mixture was filtered and concentrated to obtain the deprotected compound, which was not further purified. A small portion of this crude product (40 mg, 105  $\mu$ mol) was dissolved in methanol (4 mL) and cooled to  $-78^{\circ}\text{C}$ , then ozone was bubbled through the reaction mixture for 15 min. Excess ozone was removed by passing an oxygen stream through the reaction mixture and subsequently trimethylphosphite (20 mL, 165 mmol, 1.5 eq.) was added, and the reaction mixture was allowed to come to room temperature. After removal of the solvent under diminished pressure and purification of the residue by RP-18 HPLC (16%  $\text{CH}_3\text{CN}$  in water, isocratic,  $t_r = 6.2$  min), the free aldehyde **58** (11 mg, 29  $\mu$ mol, 28%) was obtained as a colourless oil.

**TLC:**  $R_f = 0.05$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  5:1);

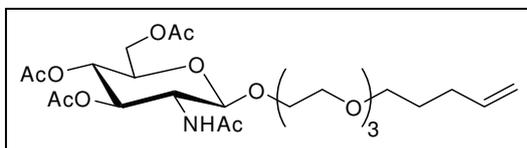
$[\alpha]_D^{20} = +34.1$  ( $c = 0.6$ , DMSO);

**$^1\text{H-NMR}$**  (600 MHz,  $d_6$ -DMSO):  $\delta = 1.74$  (tt,  $^3J = 6.6$  Hz,  $^3J = 7.2$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHO}$ ), 2.44 (dt,  $^3J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 7.2$  Hz,  $^3J_{\text{CH}_2/\text{CHO}} = 1.5$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHO}$ ), 3.38 (t,  $^3J = 6.6$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHO}$ ), 3.50–3.70 (m, 18H, 2-H, 3-H, 4-H, 5-H, 6a-H, 6'a-H,  $6\text{OCH}_2$ ), 4.44 (t,  $^3J_{6a,\text{OH}} \approx ^3J_{6'a,\text{OH}} = 6.0$  Hz, 1H, 6-OH), 4.58 (d,  $^3J_{3,\text{OH}} = 5.7$  Hz, 1H, 3-OH), 4.61 (d,  $^3J_{1,2} = 1.3$  Hz, 1H, 1-H), 4.69–4.75 (m, 2H, 2-OH, 4-OH), 9.65 (t,  $^3J_{\text{CH}_2/\text{CHO}} = 1.5$  Hz, 1H, CHO) ppm;

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (151 MHz,  $d_6$ -DMSO):  $\delta = 21.88$  (1C,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHO}$ ), 39.85 (1C,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHO}$ ), 61.05 (1C, C-6), 65.50 (1C,  $1\text{OCH}_2$ ), 66.73 (1C, C-4), 69.25 (2C,  $2\text{OCH}_2$ ), 69.30 (1C,  $1\text{OCH}_2$ ), 69.57 (1C,  $1\text{OCH}_2$ ), 69.60 (1C,  $1\text{OCH}_2$ ), 69.61 (1C,  $1\text{OCH}_2$ ), 70.08 (1C, C-2), 70.72 (1C, C-3), 73.75 (1C, C-5), 99.74 (1C, C-1), 203.06 (1C, CHO) ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, DHB):  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd.: 405.4, found: 405.6;  $[\text{M}+\text{K}]^+$  calcd.: 421.5 found: 421.6;

$\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{O}_{10}$  (382.4).

**3,6,9-Trioxa-13-tetradecen-1-yl 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-acetyl-amino)- $\beta$ -D-glucopyranoside (59)**

Compound **56** (250 mg, 367  $\mu$ mol) was dissolved in acetic anhydride, freshly activated zinc dust (560 mg)

was added and the reaction mixture was agitated by ultrasonic sound for 4 h. After filtration and repeated washing of the residue with ethyl acetate the solvent was removed under diminished pressure. The crude product was purified by flash column chromatography (silica gel, toluene/acetone 2:1) to afford the glucosamine derivative **59** (172 mg, 314  $\mu$ mol, 86%) as a pale, colourless oil.

**TLC:**  $R_f = 0.12$  (toluene/acetone 2:1);

$[\alpha]_D^{20} = -19.6$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ );

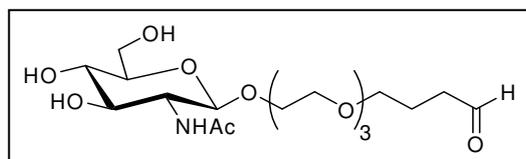
**$^1\text{H-NMR}$**  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.66$  (quint,  $^3J = 6.6$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ ), 1.95 (s, 3H,  $\text{OCOCH}_3$ ), 1.96 (s, 6H,  $2\text{OCOCH}_3$ ), 2.04 (s, 3H,  $\text{NHCOCH}_3$ ), 2.06 (quart,  $^3J = 6.6$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ ), 3.42 (t,  $^3J = 6.6$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ ), 3.50–3.70 (m, 12H,  $6\text{OCH}_2$ ), 3.81–3.85 (m, 1H, H-5), 4.00–4.07 (m, 1H, 2-H), 4.07 (dd,  $^3J_{5,6a} = 2.3$  Hz,  $^2J_{6a,6'a} = 12.3$  Hz, 1H, 6a-H), 4.22 (dd,  $^3J_{5,6'a} = 4.7$  Hz,  $^2J_{6a,6'a} = 12.3$  Hz, 1H, 6'a-H), 4.76 (d,  $^3J_{1,2} = 9.3$  Hz, 1H, 1-H), 4.91 (dd,  $^2J = 1.9$  Hz,  $^3J_{cis} = 10.3$  Hz, 1H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCHH}$ ), 4.96 (dd,  $^2J = 1.9$  Hz,  $^3J_{trans} = 17.0$  Hz, 1H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCHH}$ ), 5.00–5.10 (m, 2H, 3-H, 4-H), 5.79 (ddd,  $^3J_{CH,CH_2} = 6.6$  Hz,  $^3J_{cis} = 10.3$  Hz,  $^3J_{trans} = 17.0$  Hz, 1H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ ), 6.81 (d,  $^3J_{2/NH} = 8.4$  Hz, 1H, NH) ppm;

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (63 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 20.51$  (1C,  $1\text{COCH}_3$ ), 20.61 (1C,  $1\text{COCH}_3$ ), 20.65 (1C,  $1\text{COCH}_3$ ), 22.88 (1C,  $1\text{COCH}_3$ ), 28.61 (1C,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ ), 30.08 (1C,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ ), 53.71 (1C), 62.09 (1C), 68.58(2C), 69.93 (1C), 70.33 (1C), 70.47(3C), 71.55(2C), 73.34 (1C), 101.87 (1C, C-1), 114.73 (1C,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ ), 138.00 (1C,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ ), 169.23 (1C,  $\text{COCH}_3$ ), 170.58 (1C,  $\text{COCH}_3$ ), 170.68 (1C,  $\text{COCH}_3$ ), 170.85 (1C,  $\text{COCH}_3$ ) ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, DHB):  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd.: 570.7, found: 570.8;  $[\text{M}+\text{K}]^+$  calcd.: 586.8 found: 586.7;

**elemental analysis** is calcd. (%) for  $\text{C}_{25}\text{H}_{41}\text{NO}_{12}$  (547.6): C: 54.83, H: 7.55; N: 2.56; found: C: 53.68, H: 7.37; N 2.56.

### 12-Formyl-3,6,9-trioxadodecyl 2-Deoxy-2-acetylamino- $\beta$ -D-glucopyranoside (**60**)



Compound **60** was prepared from the fully *O*-acetylated precursor **59** as described for compound **58**. After removal of the solvent under diminished pressure and purification of the residue by RP-18 HPLC (12%  $\text{CH}_3\text{CN}$  in water, isocratic,  $t_r = 9.9$  min), the free aldehyde **60** (12 mg, 28  $\mu$ mol, 16%) was obtained as a colourless oil.

**TLC:**  $R_f = 0.58$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  2:1);

$[\alpha]_D^{20} = -22.1$  ( $c = 0.4$ , DMSO);

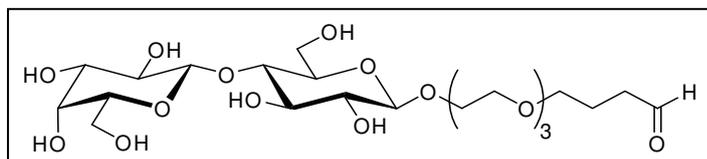
**$^1\text{H-NMR}$**  (600 MHz,  $d_6$ -DMSO):  $\delta = 1.74$  (tt,  $^3J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 6.6$  Hz,  $^3J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 7.2$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHO}$ ), 1.78 (s, 3H,  $\text{NHCOCH}_3$ ), 2.44 (dt,  $^3J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 7.2$  Hz,  $^3J_{\text{CH}_2,\text{CHO}} = 1.5$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHO}$ ), 3.02–3.10 (m, 2H, 4-H, 5-H), 3.24–3.55 (m, 16H, 2-H, 3-H, 6a-H, 11/2 $\text{OCH}_2$ ,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHO}$ ), 3.64–3.68 (m, 1H, 6a'-H), 3.76–3.81 (m, 1H, 1/2 $\text{OCH}_2$ ), 4.31 (d,  $^3J_{1,2} = 8.3$  Hz, 1H, 1-H), 4.51 (bs, 1H, 6-OH), 4.91 (bs, 1H, 3-OH), 4.99 (bs, 1H, 4-OH), 7.63 (d,  $^3J_{2,\text{NH}} = 8.0$  Hz, 1H, NH), 9.64 (t,  $^3J_{\text{CH}_2,\text{CHO}} = 1.5$  Hz, 1H, CHO) ppm;

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (151 MHz,  $d_6$ -DMSO):  $\delta = 22.05$  (1C,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHO}$ ), 23.03 (1C,  $\text{NHCOCH}_3$ ), 39.92 (1C,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHO}$ ), 55.35 (1C, C-2), 61.04 (1C, C-6), 67.76 (1C, 1 $\text{OCH}_2$ ), 68.74 (1C, 1 $\text{OCH}_2$ ), 69.42 (1C, 1 $\text{OCH}_2$ ), 69.53 (1C, 1 $\text{OCH}_2$ ), 69.71 (1C, 1 $\text{OCH}_2$ ), 69.80 (1C, 1 $\text{OCH}_2$ ), 69.83 (1C, 1 $\text{OCH}_2$ ), 70.62 (1C, C-4), 74.33 (1C, C-3), 77.02 (1C, C-5), 101.00 (1C, C-1), 169.08 (1C,  $\text{NHCOCH}_3$ ), 203.17 (1C, CHO) ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, DHB):  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd.: 446.5, found: 446.5;  $[\text{M}+\text{K}]^+$  calcd.: 462.6 found: 462.5;

$\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{O}_{10}$  (423.5).

### 12-Formyl-3,6,9-trioxadodec-1-yl $\beta$ -D-Galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopyranoside (**61**)



Compound **61** was prepared from the fully *O*-acetylated precursor **57** as described for compound **58**. After

removal of the solvent under diminished pressure and purification of the residue by RP-18 HPLC (15%  $\text{CH}_3\text{CN}$  in water, isocratic,  $t_r = 6.3$  min), the free aldehyde **61** (11 mg, 20  $\mu\text{mol}$ , 36%) was obtained as a colourless oil.

**TLC:**  $R_f = 0.20$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  3:1);

$[\alpha]_D^{20} = -13.6$  ( $c = 0.4$ , DMSO);

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz,  $d_6$ -DMSO):  $\delta = 1.74$  (tt,  $^3J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 6.6$  Hz,  $^3J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 7.2$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHO}$ ), 2.45 (dt,  $^3J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 7.2$  Hz,  $^3J_{\text{CH}_2,\text{CHO}} = 1.5$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHO}$ ), 3.00 (t,  $^3J_{1a,2a} \approx ^3J_{2a,3a'} = 7.1$  Hz, 1H, 2a-H), 3.25–3.85 (m, 25H, 2b-H, 3a-H, 3b-H, 4a-H, 4b-H, 5a-H, 5b-H, 6a-H, 6a'-H, 6b-H, 6'b-H, 6 $\text{OCH}_2$ ,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 4.21 (2d, 2H, 1a-H, 1b-H), 4.58 (bs, 1H, OH), 4.67 (bs, 1H, OH), 5.10 (bs, 1H, OH), 9.65 ( $^3J_{\text{CH}_2,\text{CHO}} = 1.5$  Hz, 1H, CHO) ppm;

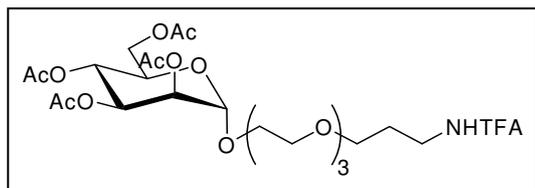
**$^{13}\text{C-NMR}$**  (100 MHz,  $d_6$ -DMSO):  $\delta = 21.67$  (1C,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHO}$ ), 39.66 (1C,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHO}$ ), 60.00 (1C), 60.01 (1C), 67.63 (1C), 67.74 (1C), 69.06 (1C), 69.28 (1C),

69.34 (1C), 69.41 (1C), 70.13 (1C), 72.68 (1C), 72.72 (1C), 72.84 (1C), 74.44 (1C), 74.60 (1C), 75.14 (1C), 80.35 (1C), 80.60 (1C), 102.28 (1C), 103.47 (1C), 202.92 (1C, CHO) ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, DHB):  $m/z$   $[M+Na]^+$  calcd.: 567.5, found: 567.8;  $[M+K]^+$  calcd.: 583.6 found: 583.9;

$C_{22}H_{40}O_{15}$  (544.5).

### 12-Trifluoroacetyl-amino-3,6,9-trioxadodec-1-yl 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside (**62**)



Compound **62** was prepared from the triethylene glycol derivative **24** (400 mg, 1.3 mmol) and the mannosyl donor **28** (975 mg, 2.0 mmol, 1.5 eq.) according to GP I using boron trifluoride etherate

(257  $\mu$ L, 2.0 mmol, 1.5 eq.) as Lewis acid. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, toluene/acetone 12:1  $\rightarrow$  3:1) to afford the mannose derivative **62** (504 mg, 0.8 mmol, 61%) as a pale, colourless oil.

**TLC:**  $R_f$  = 0.63 (toluene/acetone 1:1);

$[\alpha]_D^{20}$  = +30.8 ( $c$  = 1.0,  $CHCl_3$ );

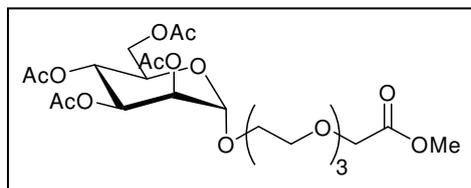
**$^1H$ -NMR** (250 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 1.89 (quint,  $^3J$  = 5.8 Hz, 2H,  $OCH_2CH_2CH_2NH$ ), 1.93 (s, 3H,  $COCH_3$ ), 1.98 (s, 3H,  $COCH_3$ ), 2.06 (s, 3H,  $COCH_3$ ), 2.10 (s, 3H,  $COCH_3$ ), 3.43 (quart,  $^3J$  = 5.8 Hz, 2H,  $OCH_2CH_2CH_2NH$ ), 3.50–3.70 (m, 13H, 11/2 $OCH_2$ ,  $OCH_2CH_2CH_2NH$ ), 3.71–3.81 (m, 1H, 1/2 $OCH_2$ ), 4.01 (ddd,  $^3J_{4,5}$  = 9.3 Hz,  $^3J_{5,6a}$  = 2.3 Hz,  $^3J_{5,6'a}$  = 5.1 Hz, 1H, 5-H), 4.03 (dd,  $^3J_{5,6a}$  = 2.3 Hz,  $^2J_{6a,6'a}$  = 12.3 Hz, 1H, 6a-H), 4.24 (dd,  $^3J_{5,6'a}$  = 5.1 Hz,  $^2J_{6a,6'a}$  = 12.3 Hz, 1H, 6'a-H), 4.81 (d,  $^3J_{1,2}$  = 1.6 Hz, 1H, 1-H), 5.20 (dd,  $^3J_{1,2}$  = 1.6 Hz,  $^3J_{2,3}$  = 3.1 Hz, 1H, 2-H), 5.23 (dd,  $^3J_{3,4} \approx ^3J_{4,5}$  = 9.8 Hz, 1H, 4-H), 5.29 (dd,  $^3J_{2,3}$  = 3.1 Hz,  $^3J_{3,4}$  = 9.8 Hz, 1H, 3-H), 7.65 (bs, 1H, NH) ppm;

**$^{13}C$ -NMR** (63 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 20.52 (2C, 2 $COCH_3$ ), 20.57 (1C, 1 $COCH_3$ ), 20.72 (1C, 1 $COCH_3$ ), 27.86 (1C,  $OCH_2CH_2CH_2NH$ ), 38.94 (1C,  $OCH_2CH_2CH_2NH$ ), 62.25 (1C), 65.97 (1C), 67.19 (1C), 68.25 (1C), 68.95 (1C), 69.38 (1C), 69.79 (1C), 70.28(2C), 70.35(2C), 70.55 (1C), 97.54 (1C, C-1), 115.88 (quart,  $^1J_{C,F}$  = 287.3 Hz, 1C,  $COCF_3$ ), 156.79 (quart,  $^2J_{C,F}$  = 36.5 Hz, 1C,  $COCF_3$ ), 169.56 (1C,  $COCH_3$ ), 169.79 (1C,  $COCH_3$ ), 169.91 (1C,  $COCH_3$ ), 170.57 (1C,  $COCH_3$ ) ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, DHB):  $m/z$   $[M+Na]^+$  calcd.: 656.6, found: 657.1;  $[M+K]^+$  calcd.: 672.7 found: 673.1;

**elemental analysis** is calcd. (%) for  $C_{25}H_{38}F_3NO_{14}$  (633.6): C: 47.39, H: 6.05; N 2.21; found: C: 47.10, H: 6.12, N 2.18.

### 10-Methoxycarbonyl-3,6,9-trioxadec-1-yl 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside (**63**)



Compound **63** was prepared from the triethylene glycol derivative **23** (500 mg, 2.3 mmol) and the mannosyl donor **28** (1.33 g, 2.7 mmol, 1.2 eq.) according to GP I using trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate (50  $\mu$ L,

0.25 mmol, 0.10 eq.) as Lewis acid. The crude product was purified by flash column chromatography (silica gel, toluene/acetone 5:2  $\rightarrow$  2:1 acetone) to afford the mannose derivative **63** (652 mg, 1.2 mmol, 52%) as a pale, colourless oil.

**TLC:**  $R_f$  = 0.39 (toluene/acetone 2:1);

$[\alpha]_D^{20}$  = +33.1 ( $c$  = 1.0,  $CHCl_3$ );

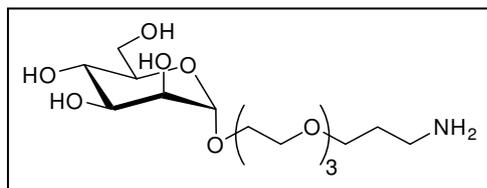
**$^1H$ -NMR** (250 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 1.97 (s, 3H,  $COCH_3$ ), 2.03 (s, 3H,  $COCH_3$ ), 2.09 (s, 3H,  $COCH_3$ ), 2.14 (s, 3H,  $COCH_3$ ), 3.50–3.84 (m, 12H,  $6OCH_2$ ), 3.73 (s, 3H,  $OCH_2CO_2CH_3$ ), 4.05 (ddd,  $^3J_{4,5}$  = 9.1 Hz,  $^3J_{5,6a}$  = 2.4 Hz,  $^3J_{5,6'a}$  = 5.0 Hz, 1H, 5-H), 4.08 (dd,  $^3J_{5,6a}$  = 2.4 Hz,  $^2J_{6a,6'a}$  = 12.3 Hz, 1H, 6a-H), 4.16 (s, 2H,  $OCH_2CO_2CH_3$ ), 4.28 (dd,  $^3J_{5,6'a}$  = 5.0 Hz,  $^2J_{6a,6'a}$  = 12.3 Hz, 1H, 6'a-H), 4.86 (d,  $^3J_{1,2}$  = 1.6 Hz, 1H, 1-H), 5.25 (dd,  $^3J_{1,2}$  = 1.6 Hz,  $^3J_{2,3}$  = 3.2 Hz, 1H, 2-H), 5.27 (dd,  $^3J_{3,4}$  = 9.9 Hz,  $^3J_{4,5}$  = 9.1 Hz, 1H, 4-H), 5.34 (dd,  $^3J_{2,3}$  = 3.2 Hz,  $^3J_{3,4}$  = 9.9 Hz, 1H, 3-H) ppm;

**$^{13}C$ -NMR** (63 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 20.63 (2C,  $2COCH_3$ ), 20.69 (1C,  $1COCH_3$ ), 20.83 (1C,  $1COCH_3$ ), 28.70 (1C,  $1COCH_3$ ), 51.71 (1C), 62.40 (1C), 66.15 (1C), 67.34 (1C), 68.39 (1C), 68.56 (1C), 69.07 (1C), 69.56 (1C), 69.96 (1C), 70.59 (1C), 70.67 (1C), 70.89 (1C), 97.68 (1C, C-1), 169.71 (1C,  $COCH_3$ ), 169.83 (1C,  $COCH_3$ ), 169.99 (1C,  $COCH_3$ ), 170.64 (1C,  $COCH_3$ ), 170.85 (1C,  $COCH_3$ ) ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, DHB):  $m/z$   $[M+Na]^+$  calcd.: 575.5, found: 575.8;  $[M+K]^+$  calcd.: 591.6 found: 591.8;

$C_{23}H_{36}O_{15}$  (552.5).

### 12-Amino-3,6,9-trioxadodec-1-yl $\alpha$ -D-Mannopyranoside (**64**)



Compound **62** (280 mg, 440  $\mu$ mol) was dissolved in water/dioxane (1:1, 5 mL), and lithium hydroxide solution (saturated, 100 mL) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 45 min. The

reaction mixture was acidified with diluted hydrochloric acid and concentrated, then the residue

was purified by ion-exchange chromatography (DOWEX 50 H<sup>+</sup> form, elution with CH<sub>3</sub>CN/0.5% aqueous ammonia (1:1 v/v)). Upon lyophilisation, the free amine **64** (140 mg, 380 μmol, 86%) was obtained as a colourless oil.

**TLC:** R<sub>f</sub> = 0.05 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 5:1);

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +30.8 (c = 1.0, MeOH);

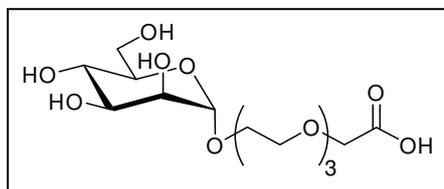
<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): δ = 1.79 (quint, <sup>3</sup>J = 7.4 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 2.80 (t, <sup>3</sup>J = 7.4 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 3.24–3.69 (m, 20H, 2-H, 3-H, 4-H, 5-H, 6a-H, 6'a-H, 6OCH<sub>2</sub>, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 4.61 (d, <sup>3</sup>J<sub>1,2</sub> = 1.4 Hz, 1H, 1-H), 7.52 (bs, 2H, NH<sub>2</sub>) ppm;

<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): δ = 26.15 (1C, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 36.54 (1C, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 61.35 (1C, C-6), 65.38 (1C, 1OCH<sub>2</sub>), 66.77 (1C, C-4), 67.08 (1C, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 69.12 (1C, 1OCH<sub>2</sub>), 69.38 (2C, 2OCH<sub>2</sub>), 70.00 (2C, 2OCH<sub>2</sub>), 70.08 (1C, C-2), 70.77 (1C, C-3), 73.92 (1C, C-5), 100.02 (1C, C-1) ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, DHB): m/z [M+H]<sup>+</sup> calcd.: 370.4, found: 370.5; [M+Na]<sup>+</sup> calcd.: 392.4, found: 392.5; [M+K]<sup>+</sup> calcd.: 408.5 found: 408.4;

C<sub>15</sub>H<sub>31</sub>O<sub>9</sub> (369.4).

### 10-Carboxyl-3,6,9-trioxadec-1-yl α-D-Mannopyranoside (**65**)



Compound **63** (850 mg, 1.54 mmol) was dissolved in water/dioxane (3:1, 30 mL), and lithium hydroxide solution (1 mol L<sup>-1</sup>, 100 mL) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 90 min. The reaction mixture

was neutralised with ion-exchange resin (DOWEX H<sup>+</sup> form), filtered, and concentrated. Upon lyophilisation, the free acid **65** (550 mg, 1.49 mmol, 97%) was obtained as an amorphous solid.

**TLC:** R<sub>f</sub> = 0.07 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 12:1);

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +39.4 (c = 1.0, MeOH);

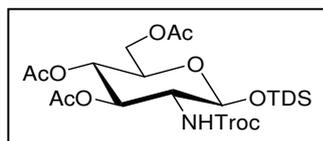
<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, d<sub>4</sub>-MeOD): δ = 3.55–3.75 (m, 15H, 3-H, 4-H, 5-H, 6a-H, 11/2OCH<sub>2</sub>), 3.81–3.87 (m, 3H, 2-H, 6'a-H, 1/2 OCH<sub>2</sub>), 4.10 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.80 ppm (s, 1H, 1-H);

<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, d<sub>4</sub>-MeOD): δ = 63.01 (1C, C-6), 67.83 (1C, 1OCH<sub>2</sub>), 68.69 (1C, C-4), 69.52 (1C, OCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 71.43 (1C, 1OCH<sub>2</sub>), 71.56 (1C, 1OCH<sub>2</sub>), 71.62 (2C, 2OCH<sub>2</sub>), 71.70 (1C, 1OCH<sub>2</sub>), 72.16 (1C, C-2), 72.61 (1C, C-3), 74.66 (1C, C-5), 101.80 (1C, C-1), 174.72 (1C, COOH) ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, DHB): m/z [M+Li]<sup>+</sup> calcd.: 377.2, found: 377.1; [M+Na]<sup>+</sup> calcd.: 393.4, found: 393.0; [M+K]<sup>+</sup> calcd.: 409.5 found: 409.0;

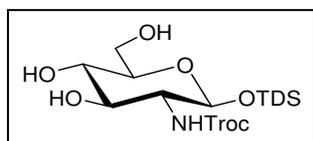
elemental analysis is calcd. (%) for  $C_{14}H_{26}O_{11}$  (370.3): C: 45.40, H: 7.08; found: C: 45.10, H: 7.13.

**Thexyldimethylsilyl 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-(2,2,2-trichloroethoxycarbonylamino)- $\beta$ -D-glucopyranoside (66)**



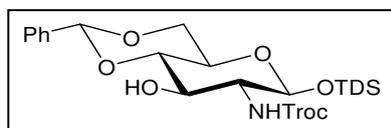
Compound **66** was prepared from **39** according to a procedure from *Gege*.<sup>[254]</sup> The recorded physical properties correspond to those reported in literature.<sup>[254]</sup>

**Thexyldimethylsilyl 2-Deoxy-2-(2,2,2-trichloroethoxycarbonylamino)- $\beta$ -D-glucopyranoside (67)**



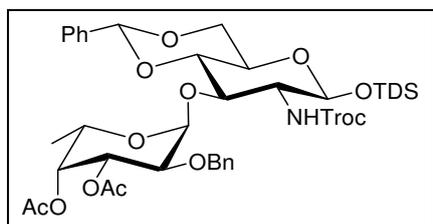
Compound **67** was prepared from **66** according to a procedure from *Gege*.<sup>[254]</sup> The recorded physical properties correspond to those reported in literature.<sup>[254]</sup>

**Thexyldimethylsilyl 4,6-*O*-Benzylidene-2-deoxy-2-(2,2,2-trichloroethoxycarbonylamino)- $\beta$ -D-glucopyranoside (68)**



Compound **68** was prepared from **67** according to a procedure from *Manzoni et al.*<sup>[248]</sup> The recorded physical properties correspond to those reported in literature.<sup>[248]</sup>

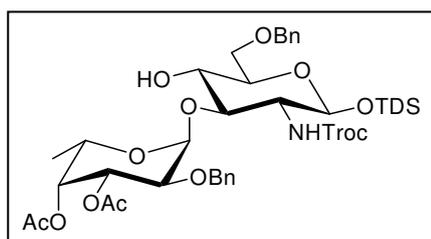
**Thexyldimethylsilyl *O*-(3,4-Di-*O*-acetyl-2-*O*-benzyl- $\alpha$ -L-fucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 3)-4,6-*O*-benzylidene-2-deoxy-2-(2,2,2-trichloroethoxycarbonylamino)- $\beta$ -D-glucopyranoside ( $\alpha$ -69)**



Compound  **$\alpha$ -69** was prepared from **68** and **48** in a variation of a procedure from *Manzoni et al.*<sup>[248]</sup> and *Gege*.<sup>[254]</sup> Compound **68** (31.6 g, 54.0 mmol) and compound **48** (30.5 g, 63.2 mmol, 1.17 eq.) were dissolved in dry dichloromethane (100 mL) under a nitrogen atmosphere. The solution was cooled to 0°C and trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate (98  $\mu$ L, 0.54 mmol, 0.01 eq.) was added under vigorous stirring. After 5 min the solution was neutralised with triethylamine and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash column chromatography (silica gel, petrol ether/ethyl acetate 4:1  $\rightarrow$  3:1) to afford pure  $\alpha$ -product  **$\alpha$ -69** (19.3 g, 21.3 mmol, 39%) as a colourless foam and a mixture of  **$\alpha$ -69** and  **$\beta$ -69** (28.7 g, 31.7 mmol, 59%) as a colourless foam. The mixture was purified again by flash column

chromatography (silica gel, petrol ether/ethyl acetate 4:1  $\rightarrow$  3:1  $\rightarrow$  1:1) to afford pure  $\alpha$ -product  **$\alpha$ -69** (9.7 g, 10.7 mmol, 34% of mixture, 20% overall) as a colourless foam and a mixture of  **$\alpha$ -69** and  **$\beta$ -69** (14.9 g, 16.5 mmol, 52% of mixture, 31% overall) as a colourless foam. The  $\alpha/\beta$ -ratio of the last-mentioned mixture represented approximately 2 to 1 (relative NMR signal intensities). The recorded physical properties correspond to those reported in literature.<sup>[248, 254]</sup>

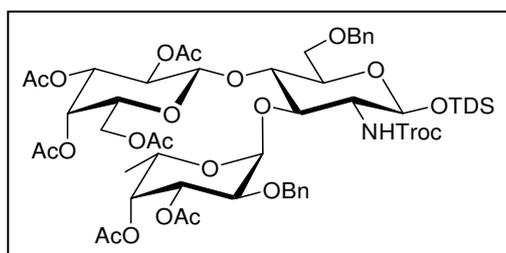
**Thexyldimethylsilyl *O*-(3,4-Di-*O*-acetyl-2-*O*-benzyl- $\alpha$ -L-fucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 3)-6-*O*-benzyl-2-deoxy-2-(2,2,2-trichloroethoxycarbonylamino)- $\beta$ -D-glucopyranoside (70)**



Compound **70** was prepared from **69** in a variation of a procedure from *Manzoni et al.*<sup>[248]</sup> using triethylsilane as reducing agent.<sup>[256]</sup> Compound **69** (36.0 g, 39.8 mmol) was dissolved in dry dichloromethane (200 mL) under a nitrogen atmosphere. The solution was cooled to 0°C and triethylsilane

(32 mL), trifluoroacetic anhydride (13 mL) and trifluoroacetic acid (15 mL) were added. The reaction mixture was stirred for 12 h allowing the solution to warm up to room temperature and carefully neutralised with cold saturated NaHCO<sub>3</sub> solution and solid NaHCO<sub>3</sub> in addition. The organic layer was separated, the aqueous phase was extracted with dichloromethane twice and the combined organic phases were dried and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash column chromatography (silica gel, petrol ether/ethyl acetate 4:1  $\rightarrow$  3:1) to afford **70** (27.8 g, 30.6 mmol, 77%) as a colourless foam. The recorded physical properties correspond to those reported in literature.<sup>[248]</sup>

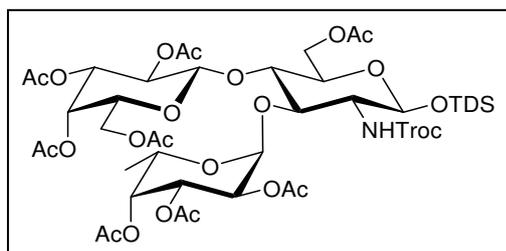
**Thexyldimethylsilyl *O*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(3,4-di-*O*-acetyl-2-*O*-benzyl- $\alpha$ -L-fucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 3)]-6-*O*-benzyl-2-deoxy-2-(2,2,2-trichloroethoxycarbonylamino)- $\beta$ -D-glucopyranoside (71)**



Compound **71** was prepared from **70** according to a procedure from *Manzoni et al.*<sup>[248]</sup> The recorded physical properties correspond to those reported in literature.<sup>[248]</sup>

**Thexyldimethylsilyl *O*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2,3,4-tri-*O*-**

**acetyl- $\alpha$ -L-fucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 3)]-6-O-acetyl-2-deoxy-2-(2,2,2-trichloroethoxycarbonyl-amino)- $\beta$ -D-glucopyranoside (72)**



Compound **71** (4.94 g, 3.99 mmol) was dissolved in THF (100 mL) and palladium on charcoal (500 mg, 10% w) was added. The reaction mixture was degassed and saturated with hydrogen under a pressure of 50 psi in a hydrogenation apparatus from *Parr* several times.

This was followed by vigorous shaking under a hydrogen pressure of 50 psi for 2-7 h. The catalyst was removed by filtration and the solution was concentrated *in vacuo*. The residue was redissolved in dry pyridine (50 mL) and acetic acid (30 mL) was added. The solution was stirred for 7 h, concentrated and co-evaporated with toluene several times. The crude product was purified by flash column chromatography (silica gel, petrol ether/ethyl acetate 2:1  $\rightarrow$  1:2) to afford product **72** (2.60 g, 2.28 mmol, 57%), by-product **73** (220 mg, 0.211 mmol, 5%) and starting material **71** (1.68 g, 1.36 mmol, 34%) as colourless foams.

**TLC:**  $R_f$  = 0.44 (petroleum ether/ethyl acetate 1:1);

$[\alpha]_D^{20}$  = -21.0 ( $c$  = 0.5,  $\text{CHCl}_3$ );

**$^1\text{H-NMR}$**  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 0.10 (s, 3H,  $\text{SiCH}_3$ ), 0.12 (s, 3H,  $\text{SiCH}_3'$ ), 0.80 (s, 6H,  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.83 (d,  $^3J$  = 1.6 Hz, 3H,  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_3$ ), 0.83 (d,  $^3J$  = 1.6 Hz, 3H,  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_3'$ ), 1.20 (d,  $^3J_{5b,6b}$  = 6.6 Hz, 3H, 6b-H), 1.58 (quint,  $^3J$  = 6.9 Hz, 1H,  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.96-2.20 (8s, 24H, 8COCH<sub>3</sub>), 3.45-3.49 (m, 1H, 5a-H), 3.62-3.69 (m, 1H, 2a-H), 3.79-3.91 (m, 3H, 3a-H, 4a-H, 5c-H), 4.04 (dd,  $^3J_{5a,6a}$  = 5.8 Hz,  $^2J_{6a,6'a}$  = 11.7 Hz, 1H, 6a-H), 4.31 (dd,  $^3J_{5c,6c}$  = 7.7 Hz,  $^2J_{6c,6'c}$  = 11.5 Hz, 1H, 6c-H), 4.48 (d,  $^2J_{1c,2c}$  = 8.1 Hz, 1H, 1c-H), 4.52 (dd,  $^3J_{5c,6'c}$  = 6.4 Hz,  $^2J_{6c,6'c}$  = 11.5 Hz, 1H, 6'c-H), 4.56-4.60 (m, 2H, 1a-H,  $\text{CHH}'\text{CCl}_3$ ), 4.66 (dd,  $^3J_{5a,6'a}$  = 2.0 Hz,  $^2J_{6a,6'a}$  = 11.7 Hz, 1H, 6'a-H), 4.75 (bd,  $^3J_{2a,NH}$  = 9.8 Hz, 1H, NH), 4.78 (d,  $^2J$  = 11.8 Hz, 1H,  $\text{CHH}'\text{CCl}_3$ ), 4.93 (quart,  $^3J_{4b,5b}$  = 6.7 Hz,  $^3J_{5b,6b}$  = 6.6 Hz, 1H, 5b-H), 4.99 (dd,  $^3J_{2c,3c}$  = 10.4 Hz,  $^3J_{3c,4c}$  = 3.5 Hz, 1H, 3c-H), 5.03 (dd,  $^3J_{1b,2b}$  = 4.0 Hz,  $^3J_{2b,3b}$  = 10.9 Hz, 1H, 2b-H), 5.09 (dd,  $^3J_{1c,2c}$  = 8.1 Hz,  $^3J_{2c,3c}$  = 10.3 Hz, 1H, 2c-H), 5.19 (dd,  $^3J_{2b,3b}$  = 10.9 Hz,  $^3J_{3b,4b}$  = 3.4 Hz, 1H, 3b-H), 5.39 (d,  $^3J$  = 3.0 Hz, 1H, 4b-H), 5.42 (d,  $^3J$  = 3.4 Hz, 1H, 4c-H), 5.48 (d,  $^3J$  = 4.0 Hz, 1H, 1b-H) ppm;

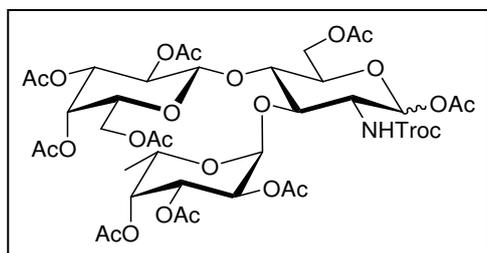
**$^{13}\text{C-NMR}$**  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = -3.42 (1C,  $\text{SiCH}_3$ ), -2.08 (1C,  $\text{SiCH}_3'$ ), 15.81 (1C, C-6b), 18.46 (2C,  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 19.93 (2C,  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_2$ ), 20.52-21.10 (8C, 8COCH<sub>3</sub>), 24.74 (1C,  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 33.91 (1C,  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 60.22 (1C, C-2a), 60.73 (1C, C-6c), 61.76 (1C, C-6a), 64.14 (1C, C-5b), 66.66 (1C, C-4c), 67.90 (1C, C-2b), 68.13 (1C, C-3b), 68.95 (1C, C-2c), 70.97 (1C, C-3c), 71.12 (1C, C-5c), 71.37 (1C, C-4b), 73.10 (1C, C-5a), 73.83 (1C,

C-3a), 75.09 (1C, C-4a), 75.16 (1C, CH<sub>2</sub>CCl<sub>3</sub>), 94.99 (1C, CH<sub>2</sub>CCl<sub>3</sub>), 95.42 (1C, C-1b), 96.09 (1C, C-1a), 100.74 (1C, C-1c), 153.92 (1C, NHCOO), 169.02-170.86 (8C, 8COCH<sub>3</sub>) ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, CHCA): m/z [M+Na]<sup>+</sup> calcd.: 1162.3, found: 1162.6; [M+K]<sup>+</sup> calcd.: 1178.3, found: 1178.5;

**elemental analysis** is calcd. (%) for C<sub>45</sub>H<sub>68</sub>Cl<sub>3</sub>NO<sub>24</sub>Si (1141.5): C: 47.35, H: 6.00, N: 1.23; found: C: 47.48, H: 6.08, N: 1.26.

**2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2,3,4-tri-*O*-acetyl- $\alpha$ -L-fucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 3)]-6-*O*-acetyl-2-deoxy-2-(2,2,2-trichloroethoxycarbonylamino)- $\alpha$ / $\beta$ -D-glucopyranosyl Acetate ( $\alpha$ -73,  $\beta$ -73)**



A mixture of compounds  $\alpha$ -73 and  $\beta$ -73 (ratio approximately 4 to 1) was obtained as by-product from the reaction of compound 71 as starting material leading to compound 72 as product.

**TLC:** R<sub>f</sub> = 0.39 (petroleum ether/ethyl acetate 2:3);

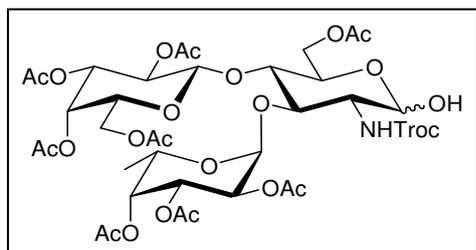
**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\alpha$ -73  $\delta$  = 1.21 (d, <sup>3</sup>J<sub>5b,6b</sub> = 6.6 Hz, 3H, 6b-H), 1.93 (s, 3H, 1COCH<sub>3</sub>), 1.95 (s, 3H, 1COCH<sub>3</sub>), 2.04 (s, 6H, 2COCH<sub>3</sub>), 2.06 (s, 3H, 1COCH<sub>3</sub>), 2.11 (s, 3H, 1COCH<sub>3</sub>), 2.13 (s, 3H, 1COCH<sub>3</sub>), 2.17 (s, 6H, 2COCH<sub>3</sub>), 3.73-3.77 (m, 1H, 5a-H), 3.83-3.94 (m, 3H, 3a-H, 4a-H, 5c-H), 4.09 (dd, <sup>3</sup>J<sub>5a,6a</sub> = 3.9 Hz, <sup>2</sup>J<sub>6a,6'a</sub> = 12.2 Hz, 1H, 6a-H), 4.19 (td, <sup>3</sup>J<sub>1a,2a</sub>  $\approx$  <sup>3</sup>J<sub>2a,NH</sub> = 10.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2a,3a</sub> = 4.5 Hz, 1H, 2a-H), 4.29 (dd, <sup>3</sup>J<sub>5c,6c</sub> = 7.8 Hz, <sup>2</sup>J<sub>6c,6'c</sub> = 11.6 Hz, 1H, 6c-H), 4.41-4.53 (m, 4H, 6a'-H, 1c-H, 6c'-H, CHH'CCl<sub>3</sub>), 4.89-5.09 (m, 6H, 2b-H, 5b-H, 2c-H, 3c-H, CHH'CCl<sub>3</sub>, NH), 5.16 (dd, <sup>3</sup>J<sub>2b,3b</sub> = 10.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3b,4b</sub> = 3.8 Hz, 1H, 3b-H), 5.34-5.48 (m, 3H, 1b-H, 4b-H, 4c-H), 5.97 (d, <sup>3</sup>J<sub>1a,2a</sub> = 3.9 Hz, 1H, 1a-H) ppm;  $\beta$ -73 (excerpt)  $\delta$  = 1.18 (d, <sup>3</sup>J<sub>5b,6b</sub> = 6.6 Hz, 3H, 6b-H), 3.58-3.64 (m, 2H, 3a-H, 4a-H), 5.56 (d, <sup>3</sup>J<sub>1a,2a</sub> = 8.2 Hz, 1H, 1a-H) ppm;  $\alpha$ -73/  $\beta$ -73  $\approx$  4/1;

**<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\alpha$ -73  $\delta$  = 15.86 (1C, C-6b), 20.55-21.05 (9C, 9COCH<sub>3</sub>), 54.56 (1C, C-2a), 60.70 (1C, C-6c), 61.32 (1C, C-6a), 64.32 (1C, C-5b), 66.63 (1C, C-4c), 67.86 (1C, C-2b), 68.13 (1C, C-3b), 69.05 (1C, C-2c), 70.77 (1C, C-5a), 71.03 (1C, C-3c), 71.15 (1C, C-5c), 71.30 (1C, C-4b), 72.03 (1C, C-3a), 73.89 (1C, C-4a), 75.04 (1C, CH<sub>2</sub>CCl<sub>3</sub>), 90.93 (1C, C-1a), 95.02 (1C, CH<sub>2</sub>CCl<sub>3</sub>), 95.65 (1C, C-1b), 100.63 (1C, C-1c), 153.95 (1C, NHCOO), 168.82-170.88 (9C, 9COCH<sub>3</sub>) ppm;  $\beta$ -73 (excerpt)  $\delta$  = 92.25 (1C, C-1a) ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, CHCA):  $m/z$   $[M+Na]^+$  calcd.: 1062.2, found: 1062.3;  $[M+K]^+$  calcd.: 1078.2, found: 1078.3;

**elemental analysis** is calcd. (%) for  $C_{39}H_{52}Cl_3NO_{25}$  (1041.2): C: 44.99, H: 5.03, N: 1.35; found: C: 44.88, H: 5.16, N: 1.42.

**2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2,3,4-tri-*O*-acetyl- $\alpha$ -L-fucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 3)]-6-*O*-acetyl-2-deoxy-2-(2,2,2-trichloroethoxycarbonylamino)- $\beta$ -D-glucopyranose (**74**)**



a) *starting from compound 72:*

Compound **72** (1.17 g, 1.03 mmol) was dissolved in THF (20 mL). Acetic acid (150  $\mu$ L) and TBAF (1.23 mL of a solution in THF ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ ), 1.23 mmol, 1.2 eq.) were added and the solution was stirred at room temperature.

The progress of the reaction was monitored by TLC. After the disappearance of the starting material on TLC ( $\sim$ 36 h) the reaction mixture was diluted and neutralised with saturated  $\text{NaHCO}_3$  solution and extracted with ethyl acetate. The organic phase was dried and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash column chromatography (silica gel, petrol ether/ethyl acetate 1:1) to afford **74** (533 mg, 0.533 mmol, 52%) as a colourless foam.

b) *starting from compound 73 (mixture of  $\alpha$ -73 /  $\beta$ -73):*

Ethylene diamine (35  $\mu$ L, 523  $\mu$ mol, 1.2 eq.) was dissolved in THF (10 mL). The solution was cooled to  $0^\circ\text{C}$  and acetic acid (35  $\mu$ L, 612  $\mu$ mol, 1.5 eq.) was added. Compound **73** (431 mg, 414  $\mu$ mol) was dissolved in THF (10 mL) and the solution was added to the former solution. The reaction mixture was stirred allowing the solution to warm up to room temperature. The progress of the reaction was monitored by TLC. After the disappearance of the starting material on TLC ( $\sim$ 24 h) the reaction mixture was diluted with water and extracted with dichloromethane. The organic phase was washed with hydrochloric acid ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ ), saturated  $\text{NaHCO}_3$  solution and water, subsequently dried and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash column chromatography (silica gel, petrol ether/ethyl acetate 2:3) to afford **74** (262 mg, 262  $\mu$ mol, 63%) as a colourless foam.

**TLC:**  $R_f = 0.30$  (petroleum ether/ethyl acetate 2:3);

**$^1\text{H-NMR}$**  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.20$  (d,  $^3J_{5b,6b} = 6.5 \text{ Hz}$ , 3H, 6b-H), 1.94 (s, 3H,  $1\text{COCH}_3$ ), 1.96 (s, 3H,  $1\text{COCH}_3$ ), 2.05 (s, 3H,  $1\text{COCH}_3$ ), 2.08 (s, 6H,  $2\text{COCH}_3$ ), 2.13 (s, 3H,  $1\text{COCH}_3$ ), 2.14 (s, 3H,  $1\text{COCH}_3$ ), 2.19 (s, 3H,  $1\text{COCH}_3$ ), 3.84-3.90 (m, 2H, 5a-H, 5c-H), 3.98-4.09 (m, 4H, 2a-H, 3a-H, 4a-H, 6a-H), 4.30 (dd,  $^3J_{5c,6c} = 8.0 \text{ Hz}$ ,  $^2J_{6c,6'c} = 11.3 \text{ Hz}$ , 1H, 6c-H), 4.44-4.56 (m,

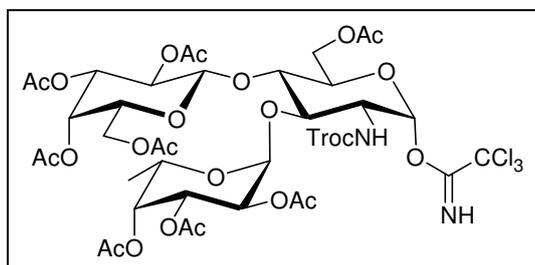
4H, 6'a-H, 1c-H, 6'c-H,  $CHH'CCl_3$ ), 4.90-5.11 (m, 6H, 1a-H, 2b-H, 5b-H, 2c-H, 3c-H,  $CHH'CCl_3$ ), 5.19 (dd,  $^3J_{2b,3b} = 10.8$  Hz,  $^3J_{3b,4b} = 3.3$  Hz, 1H, 3b-H), 5.36-5.48 (m, 4H, 1b-H, 4b-H, 4c-H, NH) ppm;

$^{13}C$ -NMR (151 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 15.74$  (1C, C-6b), 20.49-21.11 (8C, 8COCH<sub>3</sub>), 55.83 (1C, C-2a), 60.62 (1C, C-6c), 61.45 (1C, C-6a), 64.03 (1C, C-5b), 66.57 (1C, C-4c) 67.70 (1C, C-2b), 68.24 (1C, C-3b), 68.88 (1C, C-3a), 69.21 (1C, C-2c), 70.88 (1C, C-3c or C-5c), 70.96 (1C, C-3c or C-5c), 71.39 (1C, C-4b), 71.63 (1C, C-4a), 74.40 (1C, C-5a), 74.80 (1C,  $CH_2CCl_3$ ), 91.88 (1C, C-1a), 95.26 (1C,  $CH_2CCl_3$ ), 95.54 (1C, C-1b), 100.62 (1C, C-1c), 154.16 (1C, NHCOO), 169.64-170.87 (8C, 8COCH<sub>3</sub>) ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, CHCA): m/z  $[M+Na]^+$  calcd.: 1020.2, found: 1020.3;  $[M+K]^+$  calcd.: 1036.2, found: 1036.2;

**elemental analysis** is calcd. (%) for C<sub>37</sub>H<sub>50</sub>Cl<sub>3</sub>NO<sub>24</sub> (999.1): C: 44.48, H: 5.04, N: 1.40; found: C: 44.51, H: 5.14, N: 1.52.

***O*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2,3,4-tri-*O*-acetyl- $\alpha$ -L-fucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 3)]-6-*O*-acetyl-2-deoxy-2-(2,2,2-trichloroethoxycarbonylamino)- $\alpha$ -D-glucopyranosyl Trichloroacetimidate (**75**)**



Compound **74** (1.44 g, 1.44 mmol) was dissolved in dry dichloromethane (50 mL) under a nitrogen atmosphere. Trichloroacetonitrile (2 mL) and DBU (500  $\mu$ L) were added and the solution was stirred at room temperature for 12 h. The reaction mixture was concentrated and the crude product was purified by flash column chromatography (silica gel, petrol ether/ethyl acetate 1:1 containing 1% NEt<sub>3</sub>) to afford **75** (1.48 g, 1.29 mmol, 90%) as a slightly yellow foam.

**TLC**: R<sub>f</sub> = 0.44 (petroleum ether/ethyl acetate 2:3);

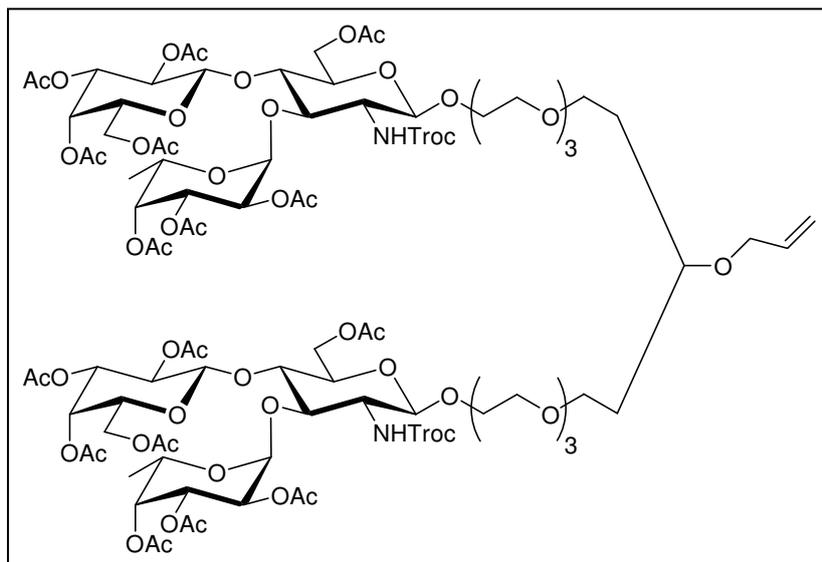
$^1H$ -NMR (600 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 1.27$  (d,  $^3J_{5b,6b} = 6.4$  Hz, 3H, 6b-H), 1.98-2.17 (8s, 24H, 8COCH<sub>3</sub>), 3.87-3.91 (m, 2H, 5a-H, 5c-H), 3.96-4.04 (m, 2H, 3a-H, 4a-H), 4.13 (dd,  $^3J_{5a,6a} = 4.1$  Hz,  $^2J_{6a,6'a} = 12.3$  Hz, 1H, 6a-H), 4.30-4.36 (m, 2H, 2a-H, 6c-H), 4.45 (d,  $^2J = 11.9$  Hz, 1H,  $CHH'CCl_3$ ), 4.51 (d,  $^3J_{1a,2a} = 11.9$  Hz, 1H, 1c-H), 4.54-4.61 (m, 2H, 6a'-H, 6c'-H), 4.94-5.03 (m, 3H, 5b-H, 3c-H,  $CHH'CCl_3$ ), 5.07 (dd,  $^3J_{1b,2b} = 3.9$  Hz,  $^3J_{2b,3b} = 12.3$  Hz, 1H, 2b-H), 5.09-5.14 (m, 2H, 2c-H, NHCOO), 5.22 (dd,  $^3J_{2b,3b} = 10.9$  Hz,  $^3J_{3b,4b} = 3.3$  Hz, 1H, 3b-H), 5.41-5.45 (m, 2H, 4b-H, 4c-H), 5.52 (d,  $^3J_{1b,2b} = 3.9$  Hz, 1H, 1b-H), 6.16 (d,  $^3J_{1a,2a} = 3.9$  Hz, 1H, 1a-H), 8.79 (bs, 1H,  $NHCCl_3$ ) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 15.82 (1C, C-6b), 20.51-21.01 (8C,  $8\text{COCH}_3$ ), 55.30 (1C, C-2a), 60.59 (1C, C-6c), 61.20 (1C, C-6a), 64.36 (1C, C-5b), 66.56 (1C, C-4c) 67.86 (1C, C-2b), 68.09 (1C, C-3b), 68.93 (1C, C-2c), 71.01 (1C, C-3c), 71.14 (1C, C-5a or C-5c), 71.29 (2C, C-5a or C-5c, C-4b), 72.46 (1C, C-3a), 73.72 (1C, C-4a), 74.87 (1C,  $\text{CH}_2\text{CCl}_3$ ), 90.68 (1C,  $\text{NHCCl}_3$ ), 95.04 (1C,  $\text{CH}_2\text{CCl}_3$ ), 95.35 (1C, C-1a), 95.78 (1C, C-1b), 100.67 (1C, C-1c), 153.90 (1C,  $\text{NHCOO}$ ), 160.44 (1C,  $\text{CNHCCl}_3$ ), 169.01-170.82 (8C,  $8\text{COCH}_3$ ) ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, CHCA):  $m/z$   $[\text{M-OCNHCCl}_3+\text{Na}]^+$  calcd.: 1003.2, found: 1002.5;  $[\text{M-OCNHCCl}_3+\text{K}]^+$  calcd.: 1019.2, found: 1018.5;

$\text{C}_{39}\text{H}_{50}\text{Cl}_6\text{N}_2\text{O}_{24}$  (1143.5).

**12-Allyloxy-1,23-di-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)]-(2,3,4-tri-*O*-acetyl- $\alpha$ -L-fucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 3)]-6-*O*-acetyl-2-deoxy-2-(2,2,2-trichloroethoxycarbonyl-amino)- $\beta$ -D-glucopyranoside] -3,6,9,15,18,21-hexaoxatricosan (76)**



Compound **75** (200 mg, 175  $\mu\text{mol}$ , 3 eq.) and compound **O** (25 mg, 59  $\mu\text{mol}$ ) were dissolved in dry dichloromethane (1 mL) under a nitrogen atmosphere. Trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate (320  $\mu\text{L}$ ) was dissolved in dry dichloromethane (10 mL) under a nitrogen atmosphere

and 100  $\mu\text{L}$  of the solution was added to the reaction mixture of the compound **75** and **O** under vigorous stirring. After 30 min the solution was neutralised with triethylamine and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash column chromatography (silica gel, petrol ether/ethyl acetate 2:3  $\rightarrow$  1:3  $\rightarrow$  0:1) to afford compound **76** (72 mg, 30  $\mu\text{mol}$ , 51%) contaminated with traces of the monoglycosylation product as an oil.

**TLC:**  $R_f$  = 0.53 (ethyl acetate);

$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1.25 (d,  $^3J_{5b,6b}$  = 8.7 Hz, 6H, 2 6b-H), 1.75-1.82 (m, 4H, 2 $\text{CH}_2$ ), 1.95 (s, 6H, 2 $\text{COCH}_3$ ), 1.97 (s, 6H, 2 $\text{COCH}_3$ ), 2.05 (s, 6H, 2 $\text{COCH}_3$ ), 2.08 (s, 12H, 4 $\text{COCH}_3$ ), 2.10 (s, 6H, 2 $\text{COCH}_3$ ), 2.14 (s, 6H, 2 $\text{COCH}_3$ ), 2.19 (s, 6H, 2 $\text{COCH}_3$ ), 3.41-3.47 (m, 2H, 2 5a-H), 3.49-3.89 (m, 31H, 2 2a-H, 2 3a-H,  $\text{OCHCH}_2$ , 13 $\text{OCH}_2$ ), 3.94-4.01 (m, 6H,  $\text{OCH}_2\text{CHCH}_2$ , 2 4a-

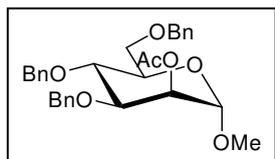
H, 2 5c-H), 4.06-4.13 (m, 2H, 2 6a-H), 4.21-4.23 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.30 (dd,  $^3J_{5c,6c} = 7.7$  Hz,  $^2J_{6c,6'c} = 11.4$  Hz, 2H, 2 6c-H), 4.44-4.50 (m, 6H, 2CH<sub>2</sub>CCl<sub>3</sub>, 2 1c-H), 4.53 (dd,  $^3J_{5c,6c} = 6.4$  Hz,  $^2J_{6c,6'c} = 11.4$  Hz, 2H, 2 6'c-H), 4.58 (d,  $^2J_{6c,6'c} = 11.7$  Hz, 2H, 2 6'a-H), 4.63-4.67 (m, 2H, 2 1a-H), 4.90-5.10 (m, 8H, 2 2b-H, 2 5b-H, 2 2c-H, 2 3c-H), 5.16 (dd,  $^3J_{cis} \approx ^3J_{trans} = 10.1$  Hz, 1H, OCH<sub>2</sub>CHCHH), 5.20 (dd,  $^3J_{2b,3b} = 10.9$  Hz,  $^3J_{3b,4b} = 3.3$  Hz, 2H, 2 3b-H), 5.21-5.30 (m, 1H, OCH<sub>2</sub>CHCHH), 5.38 (d,  $^3J_{3b,4b} \approx ^3J_{4b,5b} = 2.9$  Hz, 2H, 2 4b-H), 5.40 (d,  $^3J_{3c,4c} \approx ^3J_{4c,5c} = 3.3$  Hz, 2H, 2 4c-H), 5.48-5.56 (m, 2H, 2 1b-H), 5.85-5.89 (m, 1H, OCH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>), 6.17-6.29 (m, 2H, 2 NH) ppm;

<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 15.89$  (2C, 2C-6b), 20.58-21.25 (16C, 16COCH<sub>3</sub>), 30.37 (2C, 2CH<sub>2</sub>), 58.08 (2C, 2C-2a), 60.74 (2C, 2C-6c), 61.86 (2C, 2C-6a), 63.60 (2C, 2OCH<sub>2</sub>), 64.04 (2C, 2C-5b), 66.67 (2C, 2C-4c), 67.14 (OCH<sub>2</sub>), 67.97 (2C, 2C-2b), 68.13 (2C, 2C-3b), 68.77 (2C, 2OCH<sub>2</sub>), 69.05 (2C, 2C-2c), 69.24-70.84 (OCH<sub>2</sub>), 70.95 (2C, 2C-4a or 2C-5c), 71.05-73.06 (2C-4b, 2C-3c, 5OCH<sub>2</sub>), 74.39 (2C, 2C-3a or 2C-4a or 2C-5c), 74.46 (2C, 2C-3a or 2C-4a or 2C-5c), 74.67 (2C, 2C-5a), 74.71 (2C, 2CH<sub>2</sub>CCl<sub>3</sub>), 95.24 (2C, 2CH<sub>2</sub>CCl<sub>3</sub>), 95.78 (2C, 2C-1b), 100.63 (2C, 2C-1c), 102.16 (2C, C-1a), 116.76 (1C, OCH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>), 135.04 (1C, OCH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>), 154.85 (2C, 2NHCOO), 169.05-171.15 (16C, 16COCH<sub>3</sub>) ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, CHCA): m/z [M+Na]<sup>+</sup> calcd.: 2409.8, found: 2410.1; [M+K]<sup>+</sup> calcd.: 2425.9, found: 2425.4;

C<sub>94</sub>H<sub>136</sub>Cl<sub>6</sub>N<sub>2</sub>O<sub>55</sub> (2386.8).

### Methyl 2-O-Acetyl-3,4,6-tri-O-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside (77-1)



Compound **77-1** was prepared from methanol (20 mL, 494  $\mu$ mol) and the mannosyl donor **54** (3.64 g, 5.71 mmol) according to GP II. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, petroleum ether/ethyl acetate 8:1  $\rightarrow$  5:1) to afford **77-1** (2.54 g, 5.01 mmol, 88%) as a pale, colourless oil. The recorded physical data correspond to those reported in literature.<sup>[310, 312]</sup>

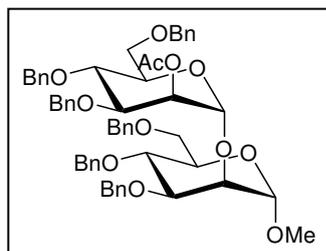
**TLC:** R<sub>f</sub> = 0.43 (petroleum ether/ethyl acetate 3:1);

**[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup>** = +22.5 (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>);

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 2.14$  (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 3.35 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.72 (d,  $^2J_{6,6'}$  = 10.1 Hz, 1H, 6-H), 3.75-3.81 (m, 2H, 5-H, 6'-H), 3.87 (t,  $^3J_{3,4} \approx ^3J_{4,5} = 9.4$  Hz, 1H, 4-H), 3.96 (dd,  $^3J_{2,3} = 3.3$  Hz,  $^3J_{3,4} = 9.3$  Hz, 1H, 3-H), 4.46-4.70 (m, 5H, 5/2PhCH<sub>2</sub>), 4.73 (s, 1H, 1-H), 4.85 (d, 1H, 1/2PhCH<sub>2</sub>), 5.35 (s, 1H, 2-H), 7.14-7.36 (m, 15H, Ph) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 21.09 (1C,  $\text{COCH}_3$ ), 54.90 (1C,  $\text{OCH}_3$ ), 68.63 (1C, C-2), 68.87 (1C, C-6), 71.21 (1C, C-5) 71.72-73.41 (2C,  $2\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 74.27 (1C, C-4), 75.09 (1C,  $1\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 78.12 (1C, C-3), 98.74 (1C, C-1), 127.55-138.37 (18C, Ph), 170.46 (1C,  $\text{COCH}_3$ ), ppm;  
**MALDI-MS** (pos. mode, DHB):  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd.: 529.2, found: 529.6;  $[\text{M}+\text{K}]^+$  calcd.: 545.2, found: 545.5;  
 $\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{O}_7$  (506.6).

**Methyl 2-*O*-Acetyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-3,4,6-tri-*O*-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside (77-2)**



Compound **77-1** (1.78 g, 3.51 mmol) was deprotected according to GP III to afford **81-1** (1.53 g, 3.29 mmol, 94%).

Compound **77-2** was prepared from **81-1** (1.53 g, 3.29 mmol) and the mannosyl donor **54** (2.73 g, 4.29 mmol) according to GP II. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, petroleum ether/ethyl acetate 5:1  $\rightarrow$  3:1) to afford **77-2** (2.83 g, 3.01 mmol, 91%) as a pale, colourless oil. The recorded physical data correspond to those reported in literature.<sup>[313, 314]</sup>

**TLC:**  $R_f$  = 0.38 (petroleum ether/ethyl acetate 3:1);

$[\alpha]_D^{20}$  = +18.7 ( $c$  = 1.0,  $\text{CHCl}_3$ );

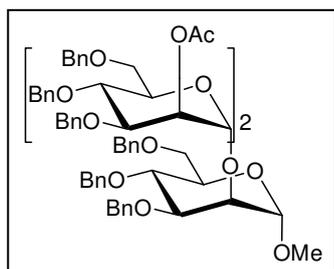
$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 2.11 (s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 3.25 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.69-3.80 (m, 5H, 5a-H or 5b-H, 6a-H, 6a'-H, 6b-H, 6'b-H), 3.81-3.86 (m, 2H, 4a-H, 4b-H), 3.89 (dd,  $^3J_{2a,3a}$  = 2.9 Hz,  $^3J_{3a,4a}$  = 9.3 Hz, 1H, 3a-H), 3.94-4.02 (m, 3H, 2a-H, 3b-H, 5a-H or 5b-H), 4.39-4.68 (m, 10H,  $5\text{PhCH}_2$ ), 4.78 (d,  $^3J_{1a,2a}$  = 1.6 Hz, 1H, 1a-H), 4.83-4.87 (m, 2H,  $1\text{PhCH}_2$ ), 5.08 (d,  $^3J_{1b,2b}$  = 1.4 Hz, 1H, 1b-H), 5.54 (dd,  $^3J_{1b,2b}$  = 1.8 Hz,  $^3J_{2b,3b}$  = 3.0 Hz, 1H, 2b-H), 7.14-7.36 (m, 30H, Ph) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 21.08 (1C,  $\text{COCH}_3$ ), 54.63 (1C,  $\text{OCH}_3$ ), 68.68 (1C, C-2b), 69.03 (1C, C-6a or C-6b), 69.24 (1C, C-6a or C-6b), 71.64 (1C, C-5a or C-5b), 71.79 (1C, C-5a or C-5b), 71.86-73.34 (4C,  $4\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 74.33 (1C, C-4a or C-4b), 74.54 (1C, C-4a or C-4b), 74.60 (1C, C-2a), 75.00-75.03 (2C,  $2\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 78.09 (1C, C-3b), 79.67 (1C, C-3a), 99.51 (1C, C-1b), 99.64 (1C, C-1a), 127.35-138.45 (36C, Ph), 170.06 (1C,  $\text{COCH}_3$ ) ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, CHCA):  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd.: 961.4, found: 961.2;  $[\text{M}+\text{K}]^+$  calcd.: 977.4, found: 977.1;

$\text{C}_{57}\text{H}_{62}\text{O}_{12}$  (939.1).

**Methyl 2-O-Acetyl-3,4,6-tri-O-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-3,4,6-tri-O-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-3,4,6-tri-O-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside (77-3)**



Compound **77-2** (1.80 g, 1.92 mmol) was deprotected according to GP III to afford **81-2** (1.59 g, 1.77 mmol, 92%).

Compound **77-3** was prepared from **81-2** (1.59 g, 1.77 mmol) and the mannosyl donor **54** (1.47 g, 2.31 mmol) according to GP II. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, petroleum ether/ethyl acetate 8:1  $\rightarrow$  3:1) to afford **77-3** (1.84 g, 1.34 mmol, 76%) as pale, colourless oil in sufficient purity for further conversions. For analytical data a small portion was purified by MPLC (silica gel, petroleum ether/ethyl acetate 4:1). The recorded physical data correspond to those reported in literature.<sup>[264]</sup>

**TLC:**  $R_f$  = 0.46 (petroleum ether/ethyl acetate 3:1);

$[\alpha]_D^{20}$  = +21.2 ( $c$  = 1.0,  $\text{CHCl}_3$ );

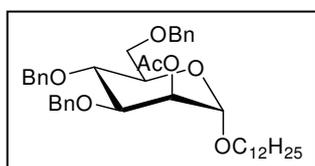
**$^1\text{H-NMR}$**  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 2.12 (s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 3.22 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.52 (dd,  $^2J_{6c,6'c}$  = 10.2 Hz,  $^3J_{5c,6c}$  = 1.2 Hz, 1H, 6c-H), 3.63-4.00 (m, 15 H, 2a-H, 3a-H, 3b-H, 3c-H, 4a-H, 4b-H, 4c-H, 5a-H, 5b-H, 5c-H, 6a-H, 6'a-H, 6b-H, 6'b-H, 6'c-H), 4.09 (t,  $^3J_{1b,2b} \approx ^3J_{1c,2c} = 2.5$  Hz, 1H, 2b-H), 4.29-4.69 (m, 15H, 15/2 $\text{PhCH}_2$ ), 4.80-4.85 (m, 4H, 1a-H, 3/2 $\text{PhCH}_2$ ), 5.04 (d,  $^3J_{1c,2c}$  = 1.8 Hz, 1H, 1c-H), 5.19 (d,  $^3J_{1b,2b}$  = 1.9 Hz, 1H, 1b-H), 5.53 (dd,  $^3J_{1c,2c}$  = 1.9 Hz,  $^3J_{2c,3c}$  = 3.3 Hz, 1H, 2c-H), 7.11-7.35 (m, 45H, Ph) ppm;

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 21.13 (1C,  $\text{COCH}_3$ ), 54.62 (1C,  $\text{OCH}_3$ ), 68.70 (1C, C-2c), 68.75 (1C, C-6c), 69.32 (1C, C-6a or C-6b), 69.49 (1C, C-6a or C-6b), 71.64 (1C, C-5a), 71.80 (1C, C-5c), 71.84 (1C, 1 $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 72.07 (1C, C-5b), 72.18-73.31 (4C, 4 $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 74.21 (1C, C-4c), 74.72 (1C, C-2a), 74.77 (2C, C-4a, C-4b), 74.93-75.00 (4C, 4 $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 75.05 (1C, C-2b), 78.09 (1C, C-3c), 79.25 (1C, C-3b), 79.48 (1C, C-3a), 99.36 (1C, C-1c), 99.71 (1C, C-1a), 100.56 (1C, C-1b), 127.35-138.53 (54C, Ph), 170.09 (1C,  $\text{COCH}_3$ ) ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, CHCA):  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd.: 1393.6, found: 1393.4;  $[\text{M}+\text{K}]^+$  calcd.: 1409.6, found: 1409.4;

$\text{C}_{84}\text{H}_{90}\text{O}_{17}$  (1371.6).

**Dodecyl 2-O-Acetyl-3,4,6-tri-O-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside (78-1)**



Compound **78-1** was prepared from dodecanol (1.10 g, 5.90 mmol) and the mannosyl donor **54** (4.45 g, 6.99 mmol) according to GP II. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel,

petroleum ether/ethyl acetate 10:1) to afford **78-1** (3.41 g, 5.16 mmol, 87%) as a pale, colourless oil.

**TLC:**  $R_f = 0.60$  (petroleum ether/ethyl acetate 4:1);

$[\alpha]_D^{20} = +19.7$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ );

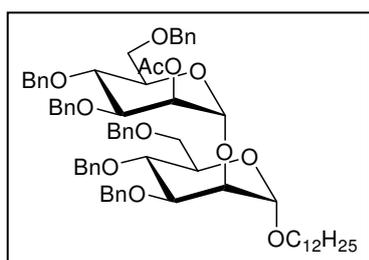
**$^1\text{H-NMR}$**  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 0.88$  (t,  $^3J = 7.1$  Hz, 3H,  $\text{OC}_{11}\text{H}_{22}\text{CH}_3$ ), 1.20-1.32 (m, 18H,  $9\text{CH}_2$ ), 1.55 (quin,  $^3J = 7.0$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{C}_{10}\text{H}_{21}$ ), 2.15 (s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 3.40 (dt,  $^2J = 9.6$  Hz,  $^3J = 6.6$  Hz, 1H,  $1/2\text{OCH}_2\text{C}_{11}\text{H}_{23}$ ), 3.63-3.72 (m, 2H, 6-H,  $1/2\text{OCH}_2\text{C}_{11}\text{H}_{23}$ ), 3.78-3.83 (m, 2H, 5-H, 6'-H), 3.88 (t,  $^3J_{3,4} \approx ^3J_{4,5} = 9.5$  Hz, 1H, 4-H), 3.99 (dd,  $^3J_{2,3} = 3.4$  Hz,  $^3J_{3,4} = 9.3$  Hz, 1H, 3-H), 4.46-4.73 (m, 4H,  $2\text{PhCH}_2$ ), 4.83 (d,  $^3J_{1,2} = 1.8$  Hz, 1 H, 1-H), 4.86 (d, 2H,  $1\text{PhCH}_2$ ), 5.36 (dd,  $^3J_{1,2} = 1.8$  Hz,  $^3J_{2,3} = 3.4$  Hz, 1H, 2-H), 7.15-7.37 (m, 15H, Ph) ppm;

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 14.11$  (1C,  $\text{CH}_3$ ), 21.15 (1C,  $\text{COCH}_3$ ), 22.68-31.97 (10C,  $10\text{CH}_2$ ), 68.01 (1C,  $\text{OCH}_2\text{C}_{11}\text{H}_{23}$ ), 68.89 (2C, C-2, C-6), 71.28 (1C, C-5), 71.78-73.41 (2C,  $2\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 74.39 (1C, C-4), 75.20 (1C,  $1\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 78.30 (1C, C-3), 97.71 (1C, C-1), 127.54-138.36 (18C, Ph), 170.55 (1C,  $\text{COCH}_3$ ), ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, CHCA):  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd.: 683.4, found: 683.8;  $[\text{M}+\text{K}]^+$  calcd.: 699.4, found: 699.8;

**elemental analysis** is calcd. (%) for  $\text{C}_{41}\text{H}_{56}\text{O}_7$  (660.9): C: 74.51, H: 8.54; found: C: 74.20, H: 8.33;  $\text{C}_{41}\text{H}_{56}\text{O}_7$  (660.9).

### Dodecyl 2-*O*-Acetyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-3,4,6-tri-*O*-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside (**78-2**)



Compound **78-1** (3.40 g, 5.14 mmol) was deprotected according to GP III to afford **82-1** (3.01 g, 4.86 mmol, 96%).

Compound **78-2** was prepared from **82-1** (780 mg, 1.26 mmol) and the mannosyl donor **54** (1.04 g, 1.63 mmol) according to GP II.

The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, petroleum ether/ethyl acetate 8:1  $\rightarrow$  5:1) to afford **78-2** (1.08 g, 988  $\mu\text{mol}$ , 78%) as a pale, colourless oil.

**TLC:**  $R_f = 0.78$  (petroleum ether/ethyl acetate 2:1);

$[\alpha]_D^{20} = +18.6$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ );

**$^1\text{H-NMR}$**  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 0.89$  (t,  $^3J = 7.0$  Hz, 3H,  $\text{OC}_{11}\text{H}_{22}\text{CH}_3$ ), 1.20-1.32 (m, 18H,  $9\text{CH}_2$ ), 1.50 (quint,  $^3J = 6.2$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{C}_{10}\text{H}_{21}$ ), 2.13 (s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 3.28 (dt,  $^2J = 9.6$

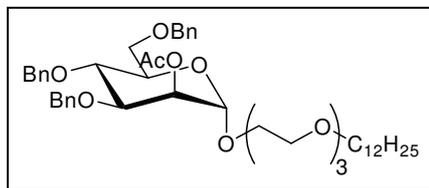
Hz,  $^3J = 6.6$  Hz, 1H,  $1/2\text{OCH}_2\text{C}_{11}\text{H}_{23}$ ), 3.60 (dt,  $^2J = 9.5$  Hz,  $^3J = 6.8$  Hz, 1H,  $1/2\text{OCH}_2\text{C}_{11}\text{H}_{23}$ ), 3.69-3.81 (m, 5H, 5a-H or 5b-H, 6a-H, 6a'-H, 6b-H, 6'b-H), 3.82-3.87 (m, 2H, 4a-H, 4b-H), 3.91-3.94 (dd,  $^3J_{2a,3a} = 3.0$  Hz,  $^3J_{3a,4a} = 9.6$  Hz, 1H, 3a-H), 3.96-4.01 (m, 3H, 2a-H, 3b-H, 5a-H or 5b-H), 4.39-4.70 (m, 10H,  $5\text{PhCH}_2$ ), 4.84-4.88 (m, 3H, 1a-H,  $1\text{PhCH}_2$ ), 5.10 (d,  $^3J_{1b,2b} = 1.6$  Hz, 1H, 1b-H), 5.55 (dd,  $^3J_{1b,2b} = 1.9$  Hz,  $^3J_{2b,3b} = 3.3$  Hz, 1H, 2b-H), 7.15-7.37 (m, 30H, Ph) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 14.11$  (1C,  $\text{CH}_3$ ), 21.12 (1C,  $\text{COCH}_3$ ), 22.67-31.91 (10C,  $10\text{CH}_2$ ), 67.72 (1C,  $\text{OCH}_2\text{C}_{11}\text{H}_{23}$ ), 68.72 (1C, C-2b), 69.03 (1C, C-6a or C-6b), 69.28 (1C, C-6a or C-6b), 71.73 (1C, C-5a or C-5b), 71.75 (1C, C-5a or C-5b), 71.88-73.35 (4C,  $4\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 74.35 (1C, C-4a or C-4b), 74.68 (1C, C-4a or C-4b), 74.94 (1C, C-2a), 75.01-75.15 (2C,  $2\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 78.13 (1C, C-3b), 79.77 (1C, C-3a), 98.61 (1C, C-1a), 99.52 (1C, C-1b), 127.34-138.53 (36C, Ph), 170.93 (1C,  $\text{COCH}_3$ ) ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, CHCA):  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd.: 1115.6, found: 1115.3;  $[\text{M}+\text{K}]^+$  calcd.: 1131.7, found: 1131.4;

**elemental analysis** is calcd. (%) for  $\text{C}_{68}\text{H}_{84}\text{O}_{12}$  (1093.4): C: 74.70, H: 7.74; found: C: 74.66, H: 8.02.

### 3,6,9-Trioxahenicosanyl 2-O-Acetyl-3,4,6-tri-O-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside (79-1)



Compound **79-1** was prepared from the glycol **19** (1.00 g, 3.14 mmol) and the mannosyl donor **54** (2.39 g, 3.75 mmol) according to GP II. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, toluene/acetone 20:1  $\rightarrow$  10:1) to afford **79-1** (2.34 g, 2.95 mmol, 94%) as a pale, colourless oil.

**TLC**:  $R_f = 0.58$  (toluene/acetone 5:1);

$[\alpha]_D^{20} = +6.0$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ );

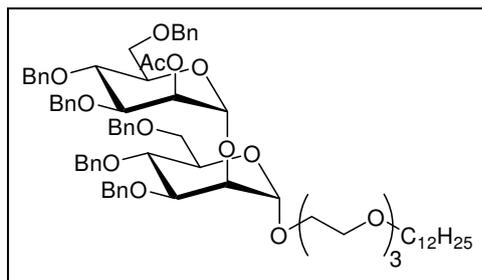
$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 0.88$  (t,  $^3J = 7.1$  Hz, 3H,  $\text{OC}_{11}\text{H}_{22}\text{CH}_3$ ), 1.21-1.34 (m, 18H,  $9\text{CH}_2$ ), 1.56 (quint,  $^3J = 7.1$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{C}_{10}\text{H}_{21}$ ), 2.14 (s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 3.42 (t,  $^3J = 6.9$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{C}_{11}\text{H}_{23}$ ), 3.54-3.57 (m, 2H,  $1\text{OCH}_2$ ), 3.60-3.65 (m, 9H,  $9/2\text{OCH}_2$ ), 3.70 (dd,  $^3J_{5,6} = 1.3$  Hz,  $^2J_{6,6'} = 10.3$  Hz, 1H, 6-H), 3.77-3.84 (m, 3H, 5-H, 6'-H,  $1/2\text{OCH}_2$ ), 3.89 (t,  $^3J_{3,4} \approx ^3J_{4,5} = 9.4$  Hz, 1H, 4-H), 3.99 (dd,  $^3J_{2,3} = 3.3$  Hz,  $^3J_{3,4} = 9.3$  Hz, 1H, 3-H), 4.46-4.86 (m, 6H,  $3\text{PhCH}_2$ ), 4.88 (d,  $^3J_{1,2} = 1.8$  Hz, 1H, 1-H), 5.41 (dd,  $^3J_{1,2} = 1.8$  Hz,  $^3J_{2,3} = 3.3$  Hz, 1H, 2-H), 7.14-7.36 (m, 15H, Ph) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 14.11$  (1C,  $\text{CH}_3$ ), 21.12 (1C,  $\text{COCH}_3$ ), 22.67-31.90 (10C,  $10\text{CH}_2$ ), 66.86 (1C,  $1\text{OCH}_2$ ), 68.68 (1C, C-2), 68.84 (1C, C-6), 70.01-70.67 (5C,  $5\text{OCH}_2$ ), 71.35

(1C, C-5), 71.53 (1C, OCH<sub>2</sub>C<sub>11</sub>H<sub>23</sub>), 71.79-73.43 (2C, 2CH<sub>2</sub>Ph), 74.29 (1C, C-4), 75.16 (1C, 1CH<sub>2</sub>Ph), 78.19 (1C, C-3), 97.87 (1C, C-1), 127.56-138.38 (18C, Ph), 170.41 (1C, COCH<sub>3</sub>), ppm;  
**MALDI-MS** (pos. mode, CHCA): m/z [M+Na]<sup>+</sup> calcd.: 815.5, found: 815.5; [M+K]<sup>+</sup> calcd.: 831.5, found: 831.5;

C<sub>47</sub>H<sub>68</sub>O<sub>10</sub> (793.0).

### 3,6,9-Trioxahenicosanyl 2-*O*-Acetyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-3,4,6-tri-*O*-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside (**79-2**)



Compound **79-1** (2.18 g, 2.75 mmol) was deprotected according to GP III to afford **83-1** (2.00 g, 2.66 mmol, 97%).

Compound **79-2** was prepared from **83-1** (1.16 g, 1.54 mmol) and the mannosyl donor **54** (1.18 g, 1.85 mmol) according to GP II. The residue was purified

by flash column chromatography (silica gel, toluene/acetone 20:1  $\rightarrow$  10:1) to afford **79-2** (1.14 g, 930  $\mu$ mol, 60%) as a pale, colourless oil.

**TLC:** R<sub>f</sub> = 0.68 (toluene/acetone 5:1);

**[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup>** = +14.4 (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>);

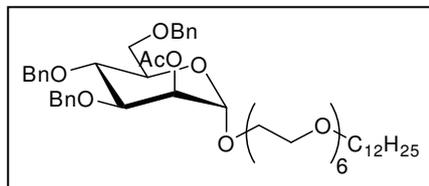
**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 0.90 (t, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, 3H, OC<sub>11</sub>H<sub>22</sub>CH<sub>3</sub>), 1.23-1.36 (m, 18H, 9CH<sub>2</sub>), 1.58 (quint, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>), 2.14 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 3.44 (t, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>C<sub>11</sub>H<sub>23</sub>), 3.48-3.52 (m, 1H, 1/2OCH<sub>2</sub>), 3.54-3.64 (m, 10H, 5OCH<sub>2</sub>), 3.70-3.82 (m, 6H, 5a-H or 5b-H, 6a-H, 6b-H, 6'a-H, 6'b-H, 1/2OCH<sub>2</sub>), 3.84-3.89 (m, 2H, 4a-H, 4b-H), 3.92-4.01 (m, 3H, 3a-H, 3b-H, 5a-H or 5b-H), 4.07 (t, <sup>3</sup>J<sub>1a,2a</sub>  $\approx$  <sup>3</sup>J<sub>2a,3a</sub> = 2.2 Hz, 1H, 2a-H), 4.40-4.88 (m, 12H, 6PhCH<sub>2</sub>), 4.92 (d, <sup>3</sup>J<sub>1a,2a</sub> = 1.5 Hz, 1H, 1a-H), 5.11 (d, <sup>3</sup>J<sub>1b,2b</sub> = 1.3 Hz, 1H, 1b-H), 5.56 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1b,2b</sub> = 1.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2b,3b</sub> = 3.0 Hz, 1H, 2b-H), 7.16-7.38 (m, 30H, Ph) ppm;

**<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 14.08 (1C, CH<sub>3</sub>), 21.09 (1C, COCH<sub>3</sub>), 22.64-31.87 (10C, 10CH<sub>2</sub>), 66.63 (1C, 1OCH<sub>2</sub>), 68.67 (1C, C-2b), 68.97 (1C, C-6a or C-6b), 69.21 (1C, C-6a or C-6b), 70.00-70.60 (5C, 5OCH<sub>2</sub>), 71.50 (1C, OCH<sub>2</sub>C<sub>11</sub>H<sub>23</sub>), 71.78 (2C, C-5a, C-5b), 71.85-73.36 (4C, 4CH<sub>2</sub>Ph), 74.29 (1C, C-4a or C-4b), 74.57 (1C, C-4a or C-4b), 74.75 (1C, C-2a), 75.00-75.09 (2C, 2CH<sub>2</sub>Ph), 78.09 (1C, C-3b), 79.62 (1C, C-3a), 98.72 (1C, C-1a), 99.52 (1C, C-1b), 127.33-138.45 (36C, Ph), 170.04 (1C, COCH<sub>3</sub>) ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, CHCA): m/z [M+Na]<sup>+</sup> calcd.: 1247.7, found: 1247.2; [M+K]<sup>+</sup> calcd.: 1263.7, found: 1263.2;

**elemental analysis** is calcd. (%) for  $C_{74}H_{96}O_{15}$  (1225.6): C: 72.52, H: 7.90; found: C: 72.11, H: 7.88.

**3,6,9,12,15,18-Hexaoxatriacontanyl 2-O-Acetyl-3,4,6-tri-O-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside (80-1)**



Compound **80-1** was prepared from the glycol **22** (1.43 g, 3.17 mmol) and the mannosyl donor **54** (2.46 g, 3.86 mmol) according to GP II. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, toluene/acetone 5:1  $\rightarrow$  3:1) to afford **80-1** (2.56 g, 2.77 mmol, 87%) as a pale, colourless oil.

**TLC:**  $R_f$  = 0.25 (toluene/acetone 5:1);

$[\alpha]_D^{20}$  = +13.1 (c = 1.0,  $CHCl_3$ );

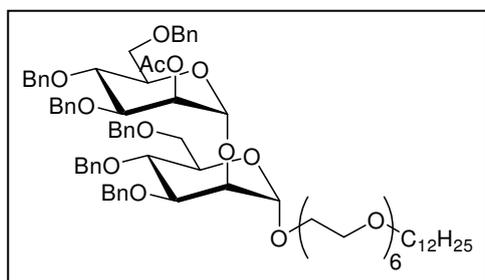
**$^1H$ -NMR** (600 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 0.88 (t,  $^3J$  = 7.1 Hz, 3H,  $OC_{11}H_{22}CH_3$ ), 1.21-1.34 (m, 18H, 9 $CH_2$ ), 1.57 (quint,  $^3J$  = 7.1 Hz, 2H,  $OCH_2CH_2C_{10}H_{21}$ ), 2.14 (s, 3H,  $COCH_3$ ), 3.44 (t,  $^3J$  = 6.8 Hz, 2H,  $OCH_2C_{11}H_{23}$ ), 3.55-3.65 (m, 23H, 23/2 $OCH_2$ ), 3.70 (dd,  $^3J_{5,6}$  = 3.7 Hz,  $^2J_{6,6'}$  = 10.1 Hz, 1H, 6-H), 3.76-3.84 (m, 3H, 5-H, 6'-H, 1/2 $OCH_2$ ), 3.89 (dd,  $^3J_{3,4} \approx ^3J_{4,5}$  = 9.4 Hz, 1H, 4-H), 3.99 (dd,  $^3J_{2,3}$  = 3.4 Hz,  $^3J_{3,4}$  = 9.3 Hz, 1H, 3-H), 4.46-4.86 (m, 6H, 3 $PhCH_2$ ), 4.88 (d,  $^3J_{1,2}$  = 1.8 Hz, 1 H, 1-H), 5.41 (dd,  $^3J_{1,2}$  = 1.8 Hz,  $^3J_{2,3}$  = 3.4 Hz, 1H, 2-H), 7.14-7.36 (m, 15H, Ph) ppm;

**$^{13}C$ -NMR** (151 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 14.11 (1C,  $CH_3$ ), 21.11 (1C,  $COCH_3$ ), 22.68-31.90 (10C, 10 $CH_2$ ), 66.84 (1C, 10 $CH_2$ ), 68.67 (1C, C-2), 68.84 (1C, C-6) 70.01-70.64 (11C, 11 $OCH_2$ ), 71.36 (1C, C-5), 71.54 (1C,  $OCH_2C_{11}H_{23}$ ) 71.78-73.43 (2C, 2 $CH_2Ph$ ), 74.29 (1C, C-4), 75.16 (1C, 1 $CH_2Ph$ ), 78.19 (1C, C-3), 97.87 (1C, C-1), 127.55-138.37 (18C, Ph), 170.40 (1C,  $COCH_3$ ), ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, CHCA): m/z  $[M+Na]^+$  calcd.: 947.6, found: 947.7;  $[M+K]^+$  calcd.: 963.6, found: 963.7;

**elemental analysis** is calcd. (%) for  $C_{53}H_{80}O_{13}$  (925.2): C: 68.80, H: 8.72; found: C: 68.59, H: 8.76.

**3,6,9,12,15,18-Hexaoxatriacontanyl 2-O-Acetyl-3,4,6-tri-O-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-3,4,6-tri-O-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside (80-2)**



Compound **80-1** (2.24 g, 2.42 mmol) was deprotected according to GP III to afford **84-1** (1.92 g, 2.17 mmol, 90%).

Compound **80-2** was prepared from **84-1** (1.60 g, 1.81 mmol) and the mannosyl donor **54** (1.51 g, 2.37 mmol) according to GP II. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, toluene/acetone 8:1) to afford **80-2** (1.66 g, 1.22 mmol, 67%) as a pale, colourless oil in sufficient purity for further conversions. For analytical data a small portion was purified by MPLC (silica gel, toluene/acetone 8:1).

**TLC:**  $R_f = 0.32$  (toluene/acetone 5:1);

$[\alpha]_D^{20} = +13.7$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ );

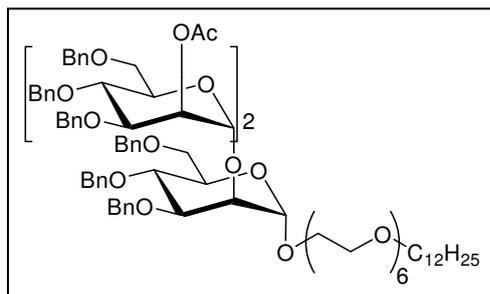
**$^1\text{H-NMR}$**  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 0.88$  (t,  $^3J = 7.0$  Hz, 3H,  $\text{OC}_{11}\text{H}_{22}\text{CH}_3$ ), 1.20-1.34 (m, 18H,  $9\text{CH}_2$ ), 1.57 (quint,  $^3J = 7.1$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{C}_{10}\text{H}_{21}$ ), 2.12 (s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 3.42-3.50 (m, 3H,  $\text{OCH}_2\text{C}_{11}\text{H}_{23}$ ,  $1/2\text{OCH}_2$ ), 3.53-3.81 (m, 28H, 5a-H or 5b-H, 6a-H, 6b-H, 6'a-H, 6'b-H,  $23/2\text{OCH}_2$ ), 3.82-3.87 (m, 2H, 4a-H, 4b-H), 3.91-3.99 (m, 3H, 3a-H, 3b-H, 5a-H or 5b-H), 4.05 (dd,  $^3J_{1a,2a} \approx ^3J_{2a,3a} = 1.9$  Hz, 1H, 2a-H), 4.37-4.86 (m, 12H,  $6\text{PhCH}_2$ ), 4.89 (d,  $^3J_{1a,2a} = 1.3$  Hz, 1H, 1a-H), 5.09 (s, 1H, 1b-H), 5.54 (dd,  $^3J_{1b,2b} = 1.8$  Hz,  $^3J_{2b,3b} = 2.7$  Hz, 1H, 2b-H), 7.13-7.36 (m, 30H, Ph) ppm;

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 14.10$  (1C,  $\text{CH}_3$ ), 21.12 (1C,  $\text{COCH}_3$ ), 22.66-31.88 (10C,  $10\text{CH}_2$ ), 66.60 (1C,  $1\text{OCH}_2$ ), 68.64 (1C, C-2b), 68.92 (1C, C-6a or C-6b), 69.17 (1C, C-6a or C-6b), 69.00-70.58 (11C,  $11\text{OCH}_2$ ), 71.52 (1C,  $\text{OCH}_2\text{C}_{11}\text{H}_{23}$ ), 71.75 (2C, C-5, C-5b), 71.85-73.36 (4C,  $4\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 74.25 (1C, C-4a or C-4b), 74.54 (1C, C-4a or C-4b), 74.68 (1C, C-2a), 75.02-75.12 (2C,  $2\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 78.09 (1C, C-3b), 79.60 (1C, C-3a), 98.71 (1C, C-1a), 99.52 (1C, C-1b), 127.32-138.42 (36C, Ph), 170.08 (1C,  $\text{COCH}_3$ ) ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, CHCA):  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd.: 1379.8, found: 1379.6;  $[\text{M}+\text{K}]^+$  calcd.: 1395.8, found: 1395.2;

$\text{C}_{80}\text{H}_{108}\text{O}_{18}$  (1356.7).

**3,6,9,12,15,18-Hexaoxatriacontanyl 2-O-Acetyl-3,4,6-tri-O-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-3,4,6-tri-O-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-3,4,6-tri-O-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside (**80-3**)**



Compound **80-2** (1.35 g, 995  $\mu\text{mol}$ ) was deprotected according to GP III to afford **84-2** (1.18 g, 897  $\mu\text{mol}$ , 90%).

Compound **80-3** was prepared from **84-2** (1.07 g, 813  $\mu\text{mol}$ ) and the mannosyl donor **54** (622 mg, 977  $\mu\text{mol}$ ) according to GP II. The residue was purified

by flash column chromatography (silica gel, toluene/acetone 10:1  $\rightarrow$  5:1) to afford **80-3** (1.09 g,

609  $\mu\text{mol}$ , 75%) as pale, colourless oil in sufficient purity for further conversions. For analytical data a small portion was purified by MPLC (silica gel, toluene/acetone 8:1).

**TLC:**  $R_f = 0.41$  (toluene/acetone 5:1);

$[\alpha]_D^{20} = +17.8$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ );

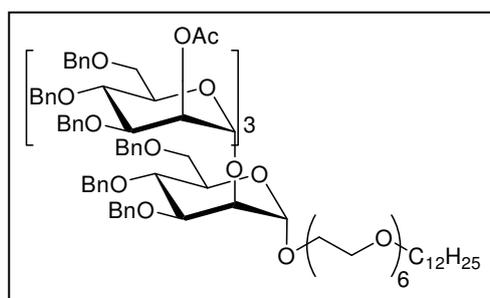
**$^1\text{H-NMR}$**  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 0.89$  (t,  $^3J = 7.1$  Hz, 3H,  $\text{OC}_{11}\text{H}_{22}\text{CH}_3$ ), 1.21-1.35 (m, 18H, 9 $\text{CH}_2$ ), 1.58 (quint,  $^3J = 7.1$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{C}_{10}\text{H}_{21}$ ), 2.14 (s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 3.43-3.47 (m, 3H,  $\text{OCH}_2\text{C}_{11}\text{H}_{23}$ , 1/2 $\text{OCH}_2$ ), 3.51-3.84 (m, 32H, 4a-H, 4b-H, 5a-H, 6a-H, 6b-H, 6c-H, 6'a-H, 6'b-H, 6'c-H, 23/2 $\text{OCH}_2$ ), 3.86-3.96 (m, 5H, 3a-H, 3b-H, 4c-H, 5b-H, 5c-H), 4.00 (dd,  $^3J_{2c,3c} = 3.3$  Hz,  $^3J_{3c,4c} = 9.3$  Hz, 1H, 3c-H), 4.03 (dd,  $^3J_{1a,2a} = 1.8$  Hz,  $^3J_{2a,3a} = 3.0$  Hz, 1H, 2a-H), 4.10 (t,  $^3J_{1b,2b} \approx ^3J_{2b,3b} = 2.4$  Hz, 1H, 2b-H), 4.30-4.86 (m, 18H, 9 $\text{PhCH}_2$ ), 4.94 (d,  $^3J_{1a,2a} = 1.8$  Hz, 1H, 1a-H), 5.05 (d,  $^3J_{1c,2c} = 1.8$  Hz, 1H, 1c-H), 5.20 (d,  $^3J_{1b,2b} = 1.8$  Hz, 1H, 1b-H), 5.54 (dd,  $^3J_{1c,2c} = 1.8$  Hz,  $^3J_{2c,3c} = 3.3$  Hz, 1H, 2c-H), 7.13-7.36 (m, 45H, Ph) ppm;

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 14.10$  (1C,  $\text{CH}_3$ ), 21.13 (1C,  $\text{COCH}_3$ ), 22.66-31.88 (10C, 10 $\text{CH}_2$ ), 66.65 (1C, 1 $\text{OCH}_2$ ), 68.69 (1C, C-2c), 68.72-69.45 (3C, C-6a, C-6b, C-6c), 70.01-70.58 (11C, 11 $\text{OCH}_2$ ), 71.52 (1C,  $\text{OCH}_2\text{C}_{11}\text{H}_{23}$ ), 71.78-72.16 (6C, C-5a, C-5b, C-5c, 3 $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 73.22-73.32 (3C, 3 $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 74.19 (1C, C-4c), 74.67 (1C, C-4b), 74.79 (1C, C-4a), 74.86-75.08 (5C, C-2a, C-2b, 3 $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 78.09 (1C, C-3c), 79.27 (1C, C-3b), 79.44 (1C, C-3a), 98.83 (1C, C-1a), 99.36 (1C, C-1c), 100.57 (1C, C-1b), 127.34-138.54 (54C, Ph), 170.09 (1C,  $\text{COCH}_3$ ) ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, CHCA):  $m/z$  (average mass)  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd.: 1813.2, found: 1812.8;  $[\text{M}+\text{K}]^+$  calcd.: 1829.3, found: 1828.6;

$\text{C}_{107}\text{H}_{136}\text{O}_{23}$  (1790.2).

**3,6,9,12,15,18-Hexaoxatriacontanyl 2-O-Acetyl-3,4,6-tri-O-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-3,4,6-tri-O-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-3,4,6-tri-O-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside (80-4)**



Compound **80-3** (795 mg, 444  $\mu\text{mol}$ ) was deprotected according to GP III to afford **84-3** (712 mg, 407  $\mu\text{mol}$ , 92%).

Compound **80-4** was prepared from **84-3** (564 mg, 323  $\mu\text{mol}$ ) and the mannosyl donor **54** (250 mg, 392  $\mu\text{mol}$ ) according to GP II. The residue was purified

by flash column chromatography (silica gel, toluene/acetone 10:1  $\rightarrow$  8:1) to afford **80-4** (552 mg, 248  $\mu$ mol, 77%) as pale colourless oil in sufficient purity for further conversions. For analytical data a small portion was purified by MPLC (silica gel, toluene/acetone 8:1).

**TLC:**  $R_f = 0.48$  (toluene/acetone 5:1);

$[\alpha]_D^{20} = +15.8$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ );

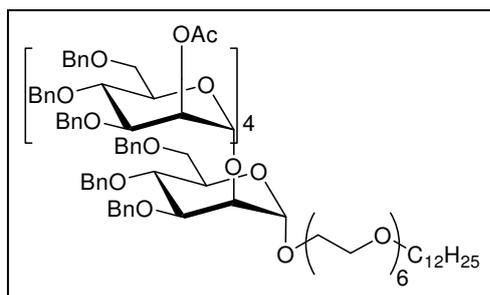
**$^1\text{H-NMR}$**  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 0.89$  (t,  $^3J = 7.0$  Hz, 3H,  $\text{OC}_{11}\text{H}_{22}\text{CH}_3$ ), 1.20-1.36 (m, 18H,  $9\text{CH}_2$ ), 1.58 (quint,  $^3J = 7.0$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{C}_{10}\text{H}_{21}$ ), 2.14 (s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 3.41-3.80 (m, 38H, 4a-H, 4b-H, 4c-H, 5a-H, 6a-H, 6b-H, 6c-H, 6d-H, 6'a-H, 6'b-H, 6'c-H, 6'd-H,  $12\text{OCH}_2$ ,  $\text{OCH}_2\text{C}_{11}\text{H}_{23}$ ), 3.83-3.98 (m, 7H, 3a-H, 3b-H, 3c-H, 4d-H, 5b-H, 5c-H, 5d-H), 4.00-4.04 (m, 2H, 2a-H, 3d-H), 4.08-4.18 (m, 3H, 2b-H, 2c-H,  $1/2\text{PhCH}_2$ ), 4.31-4.88 (m, 23H,  $23/2\text{PhCH}_2$ ), 4.96 (s, 1H, 1a-H), 5.05 (s, 1H, 1d-H), 5.18 (s, 1H, 1c-H), 5.23 (s, 1H, 1b-H), 5.57 (dd,  $^3J_{1d,2d} = 1.8$  Hz,  $^3J_{2d,3d} = 3.0$  Hz, 1H, 2d-H), 7.03-7.35 (m, 60H, Ph) ppm;

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 14.11$  (1C,  $\text{CH}_3$ ), 21.15 (1C,  $\text{COCH}_3$ ), 22.66-31.88 (10C,  $10\text{CH}_2$ ), 66.62 (1C,  $10\text{CH}_2$ ), 68.57-69.50 (5C, C-2d, C-6a, C-6b, C-6c, C-6d), 69.99-70.56 (11C,  $11\text{OCH}_2$ ), 71.51 (1C,  $\text{OCH}_2\text{C}_{11}\text{H}_{23}$ ), 71.60-72.18 (8C, C-5a, C-5b, C-5c, C-5d,  $4\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 73.19-73.29 (4C,  $4\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 74.18 (1C, C-4d), 74.58-75.14 (8C, C-2c, C-4a, C-4b, C-4c,  $4\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 75.42 (1C, C-2b), 75.50 (1C, C-2a), 78.23 (1C, C-3d), 79.21 (2C, C-3a, C-3b), 79.31 (1C, C-3c), 98.79 (1C, C-1a), 99.33 (1C, C-1d), 100.68 (1C, C-1c), 101.09 (1C, C-1b), 127.28-138.55 (72C, Ph), 170.08 (1C,  $\text{COCH}_3$ ) ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, CHCA):  $m/z$  (average mass)  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd.: 2245.7, found: 2245.4;  $[\text{M}+\text{K}]^+$  calcd.: 2261.8, found: 2261.2;

**elemental analysis** is calcd. (%) for  $\text{C}_{134}\text{H}_{164}\text{O}_{28}$  (2222.7): C: 72.41, H: 7.44; found: C: 72.43, H: 7.42.

**3,6,9,12,15,18-Hexaoxatriacontanyl 2-O-Acetyl-3,4,6-tri-O-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-3,4,6-tri-O-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-3,4,6-tri-O-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-3,4,6-tri-O-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside (**80-5**)**



Compound **80-4** (307 mg, 138  $\mu$ mol) was deprotected according to GP III to afford **84-4** (259 mg, 119  $\mu$ mol, 86%).

Compound **80-5** was prepared from **84-4** (259 mg, 119  $\mu$ mol) and the mannosyl donor **54** (100 mg,

157 mmol) according to GP II. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, toluene/acetone 10:1  $\rightarrow$  8:1) to afford **80-5** (235 mg, 89  $\mu$ mol, 75%) as pale, colourless oil in sufficient purity for further conversions. For analytical data a small portion was purified by MPLC (silica gel, toluene/acetone 8:1).

**TLC:**  $R_f = 0.47$  (toluene/acetone 5:1);

$[\alpha]_D^{20} = +15.6$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ );

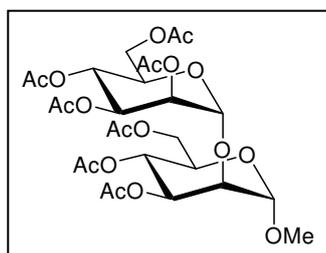
**$^1\text{H-NMR}$**  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 0.89$  (t,  $^3J = 7.1$  Hz, 3H,  $\text{OC}_{11}\text{H}_{22}\text{CH}_3$ ), 1.21-1.35 (m, 18H,  $9\text{CH}_2$ ), 1.58 (quint,  $^3J = 7.1$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{C}_{10}\text{H}_{21}$ ), 2.13 (s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 3.40-3.98 (m, 50H, 3a-H, 3b-H, 3c-H, 3d-H, 4a-H, 4b-H, 4c-H, 4d-H, 4e-H, 5a-H, 5b-H, 5c-H, 5d-H, 5e-H, 6a-H, 6b-H, 6c-H, 6d-H, 6e-H, 6'a-H, 6'b-H, 6'c-H, 6'd-H, 6'e-H,  $12\text{OCH}_2$ ,  $\text{OCH}_2\text{C}_{11}\text{H}_{23}$ ), 3.99-4.03 (m, 2H, 2a-H, 3e-H), 4.07-4.22 (m, 6H, 2b-H, 2c-H, 2d-H,  $3/2\text{PhCH}_2$ ), 4.33-4.90 (m, 27H,  $27/2\text{PhCH}_2$ ), 4.98 (d,  $^3J_{1a,2a} = 1.7$  Hz, 1H, 1a-H), 5.04 (d,  $^3J_{1e,2e} = 1.8$  Hz, 1H, 1e-H), 5.16 (d,  $^3J_{1d,2d} = 1.7$  Hz, 1H, 1d-H), 5.23 (d,  $^3J_{1,2} = 1.6$  Hz, 1H, 1b-H or 1c-H), 5.24 (d,  $^3J_{1,2} = 1.5$  Hz, 1H, 1b-H or 1c-H), 5.56 (dd,  $^3J_{1e,2e} = 1.8$  Hz,  $^3J_{2e,3e} = 3.2$  Hz, 1H, 2e-H), 6.96-7.36 (m, H, 75Ph) ppm;

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 14.11$  (1C,  $\text{CH}_3$ ), 21.15 (1C,  $\text{COCH}_3$ ), 22.67-31.90 (10C,  $10\text{CH}_2$ ), 66.65 (1C,  $10\text{OCH}_2$ ), 68.63-69.61 (6C, C-2e, C-6a, C-6b, C-6c, C-6d, C-6e), 70.02-70.60 (11C,  $11\text{OCH}_2$ ), 71.53 (1C,  $\text{OCH}_2\text{C}_{11}\text{H}_{23}$ ), 71.63-72.28 (10C, C-5a, C-5b, C-5c, C-5d, C-5e,  $5\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 73.21-73.32 (5C,  $5\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 74.24 (1C, C-4e), 74.70-75.15 (10C, C-2d, C-4a, C-4b, C-4c, C-4d,  $5\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 75.56 (1C, C-2b or C-2c), 75.79 (1C, C-2a), 76.18 (1C, C-2b or C-2c), 78.18 (1C, C-3e), 79.00-79.26 (3C, C-3a, C-3b, C-3c), 79.42 (1C, C-3d), 98.84 (1C, C-1a), 99.38 (1C, C-1e), 100.73 (1C, C-1d), 101.30 (1C, C-1b or C-1c), 101.33 (1C, C-1b or C-1c), 127.27-138.63 (90C, Ph), 170.05 (1C,  $\text{COCH}_3$ ) ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, CHCA):  $m/z$  (average mass)  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd.: 2678.2, found: 2677.4;  $[\text{M}+\text{K}]^+$  calcd.: 2694.3, found: 2694.4;

**elemental analysis** is calcd. (%) for  $\text{C}_{161}\text{H}_{192}\text{O}_{33}$  (2655.2): C: 72.83, H: 7.29; found: C: 72.30, H: 7.53.

### Methyl 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-3,4,6-tri-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside (**85-2**)



Compound **85-2** was prepared from **77-2** (1.06 g, 1.13 mmol) according to GP IV. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, petroleum ether/ethyl acetate 3:1  $\rightarrow$  1:1) to afford **85-2** (449 mg, 690  $\mu$ mol, 61%) as a foam. The recorded

physical data correspond to those reported in literature.<sup>[315]</sup>

**TLC:**  $R_f = 0.51$  (toluene/acetone 2:1);  $R_f = 0.60$  (toluene/acetone 3:2);

$[\alpha]_D^{20} = +26.2$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ );

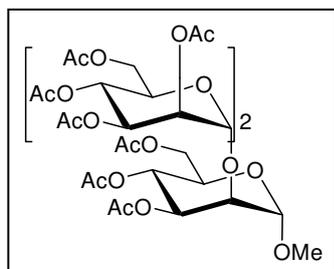
**$^1\text{H-NMR}$**  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.97$ -2.11 (7s, 21H, 7COCH<sub>3</sub>), 3.37 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.86 (ddd,  $^3J_{4a,5a} = 9.7$  Hz,  $^3J_{5a,6a} = 4.2$  Hz,  $^3J_{5a,6'a} = 2.2$  Hz, 1H, 5a-H), 3.99 (dd,  $^3J_{1a,2a} = 1.9$  Hz,  $^3J_{2a,3a} = 3.1$  Hz, 1H, 2a-H), 4.07-4.14 (m, 3H, 5b-H, 6a-H, 6b-H), 4.15-4.21 (m, 2H, 6'a-H, 6'b-H), 4.80 (d,  $^3J_{1a,2a} = 1.5$  Hz, 1H, 1a-H), 4.87 (d,  $^3J_{1b,2b} = 1.2$  Hz, 1H, 1b-H), 5.20-5.24 (m, 3H, 3a-H, 2b-H, 4b-H), 5.29 (dd,  $^3J_{3a,4a} \approx ^3J_{4a,5a} = 9.9$  Hz, 1H, 4a-H), 5.36 (dd,  $^3J_{2b,3b} = 3.4$  Hz,  $^3J_{3b,4b} = 10.0$  Hz, 1H, 3b-H) ppm;

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 20.52$ -20.74 (7C, 7COCH<sub>3</sub>), 55.12 (1C, OCH<sub>3</sub>), 62.08 (1C, C-6a), 62.49 (1C, C-6b), 66.02 (1C, C-4a), 66.31 (1C, C-4b), 68.28 (1C, C-3b), 68.34 (1C, C-5a), 69.05 (1C, C-5b), 69.65 (1C, C-2b), 70.16 (1C, C-3a), 76.89 (1C, C-2a), 99.06 (1C, C-1b), 99.14 (1C, C-1a), 169.29-170.76 (7C, 7COCH<sub>3</sub>) ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, CHCA):  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd.: 673.2, found: 673.1;  $[\text{M}+\text{K}]^+$  calcd.: 689.2, found: 689.1;

$\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{O}_{18}$  (650.6).

**Methyl 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-3,4,6-tri-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-3,4,6-tri-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside (85-3)**



Compound **85-3** was prepared from **77-3** (380 mg, 277  $\mu\text{mol}$ ) according to GP IV. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, petroleum ether/ethyl acetate 1:1  $\rightarrow$  1:2), followed by MPLC (silica gel, toluene/acetone 5:2) to afford **85-3** (116 mg, 124  $\mu\text{mol}$ , 45%) as a foam.

**TLC:**  $R_f = 0.41$  (toluene/acetone 2:1);

$[\alpha]_D^{20} = +23.3$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ );

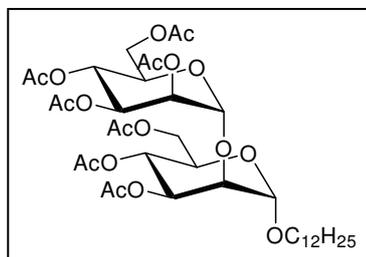
**$^1\text{H-NMR}$**  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.98$ -2.13 (10s, 30H, 10COCH<sub>3</sub>), 3.39 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.89 (ddd,  $^3J_{4a,5a} = 9.6$  Hz,  $^3J_{5a,6a} = 4.5$  Hz,  $^3J_{5a,6'a} = 2.4$  Hz, 1H, 5a-H), 4.01 (t,  $^3J_{1a,2a} \approx ^3J_{2a,3a} = 2.3$  Hz, 1H, 2a-H), 4.05-4.24 (m, 9H, 2b-H, 5b-H, 5c-H, 6a-H, 6'a-H, 6b-H, 6'b-H, 6c-H, 6'c-H), 4.84 (d,  $^3J_{1a,2a} = 2.0$  Hz, 1H, 1a-H), 4.92 (d,  $^3J_{1c,2c} = 1.8$  Hz, 1H, 1c-H), 5.08 (d,  $^3J_{1b,2b} = 2.0$  Hz, 1H, 1b-H), 5.22-5.33 (m, 6H, 2c-H, 3a-H, 3b-H, 4a-H, 4b-H, 4c-H), 5.37 (dd,  $^3J_{2c,3c} = 3.4$  Hz,  $^3J_{3c,4c} = 10.0$  Hz, 1H, 3c-H) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 20.57\text{-}20.78$  (10C,  $10\text{COCH}_3$ ), 55.19 (1C,  $\text{OCH}_3$ ), 62.09-62.54 (3C, C-6a, C-6b, C-6c), 66.16-66.26 (3C, C-4a, C-4b, C-4c), 68.34 (1C, C-3c), 68.44 (1C, C-5a), 69.21 (1C, C-5b or C-5c), 69.42 (1C, C-5b or C-5c), 69.51-70.37 (3C, C-2c, C-3a, C-3b), 76.56 (1C, C-2a), 77.36 (1C, C-2b), 99.18 (1C, C-1a), 99.33 (1C, C-1c), 99.75 (1C, C-1b), 169.33-170.81 (10C,  $10\text{COCH}_3$ ) ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, CHCA):  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd.: 961.3, found: 962.1;  $[\text{M}+\text{K}]^+$  calcd.: 977.3, found: 978.1;

$\text{C}_{39}\text{H}_{54}\text{O}_{26}$  (938.8).

### Dodecyl 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-3,4,6-tri-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside (86-2)



Compound **86-2** was prepared from **78-2** (630 mg, 576  $\mu\text{mol}$ ) according to GP IV. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, toluene/acetone 5:1  $\rightarrow$  3:1) to afford **86-2** (413 mg, 513  $\mu\text{mol}$ , 89%) as a pale, colourless oil.

**TLC**:  $R_f = 0.54$  (toluene/acetone 3:1);

$[\alpha]_D^{20} = +24.0$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ );

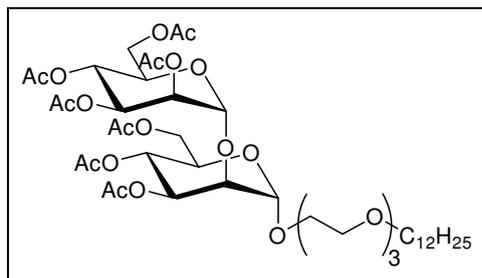
$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 0.87$  (t,  $^3J = 7.0$  Hz, 3H,  $\text{OC}_{11}\text{H}_{22}\text{CH}_3$ ), 1.19-1.37 (m, 18H, 9 $\text{CH}_2$ ), 1.59 (quint,  $^3J = 6.8$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{C}_{10}\text{H}_{21}$ ), 2.00-2.14 (7s, 21H, 7 $\text{COCH}_3$ ), 3.42 (dt,  $^2J = 9.4$  Hz,  $^3J = 6.6$  Hz, 1H,  $1/2\text{OCH}_2\text{C}_{11}\text{H}_{23}$ ), 3.67 (dt,  $^2J = 9.4$  Hz,  $^3J = 6.8$  Hz, 1H,  $1/2\text{OCH}_2\text{C}_{11}\text{H}_{23}$ ), 3.90 (ddd,  $^3J_{4a,5a} = 9.3$  Hz,  $^3J_{5a,6a} = 4.2$  Hz,  $^3J_{5a,6'a} = 2.3$  Hz, 1H, 5a-H), 4.01 (t,  $^3J_{1a,2a} \approx ^3J_{2a,3a} = 2.3$  Hz, 1H, 2a-H), 4.08-4.24 (m, 5H, 5b-H, 6a-H, 6'a-H, 6b-H, 6'b-H), 4.91 (s, 2H, 1a-H, 1b-H), 5.24-5.34 (m, 4H, 2b-H, 3a-H, 4a-H, 4b-H), 5.40 (dd,  $^3J_{2b,3b} = 3.4$  Hz,  $^3J_{3b,4b} = 10.0$  Hz, 1H, 3b-H) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 14.10$  (1C,  $\text{CH}_3$ ), 20.66-20.87 (7C, 7 $\text{COCH}_3$ ), 22.66-31.88 (10C, 10 $\text{CH}_2$ ), 62.19 (1C, C-6a), 62.52 (1C, C-6b), 66.23 (1C, C-4a), 66.34 (1C, C-4b), 68.35 (1C, C-5a or C-3b), 68.42 (1C, C-5a or C-3b), 68.53 (1C,  $\text{OCH}_2\text{C}_{11}\text{H}_{23}$ ), 69.07 (1C, C-5b), 69.75 (1C, C-2b), 70.34 (1C, C-3a), 77.18 (1C, C-2a), 98.22 (1C, C-1a or C-1b), 99.13 (1C, C-1a or C-1b), 169.42-170.88 (7C, 7 $\text{COCH}_3$ ) ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, CHCA):  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd.: 827.4, found: 827.3;  $[\text{M}+\text{K}]^+$  calcd.: 843.4, found: 843.3;

$\text{C}_{38}\text{H}_{60}\text{O}_{18}$  (804.9).

**3,6,9-Trioxahenicosanyl 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-3,4,6-tri-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside (87-2)**



Compound **87-2** was prepared from **79-2** (1.45 g, 1.18 mmol) according to GP IV. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, toluene/acetone 5:1  $\rightarrow$  3:1) to afford 770 mg of a mixture enriched in **87-2**. A portion (240 mg) was subjected to further purification by MPLC (silica gel, toluene/acetone 5:1) to afford **87-2** (132 mg, 141  $\mu$ mol, 38%) as a foam.

**TLC:**  $R_f$  = 0.47 (toluene/acetone 3:1);

$[\alpha]_D^{20}$  = +38.7 ( $c$  = 1.0,  $\text{CHCl}_3$ );

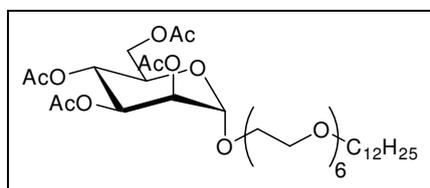
**$^1\text{H-NMR}$**  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 0.86 (t,  $^3J$  = 7.0 Hz, 3H,  $\text{OC}_{11}\text{H}_{22}\text{CH}_3$ ), 1.19-1.33 (m, 18H, 9 $\text{CH}_2$ ), 1.55 (quint,  $^3J$  = 7.0 Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{C}_{10}\text{H}_{21}$ ), 1.99-2.14 (7s, 21H, 7 $\text{COCH}_3$ ), 3.42 (t,  $^3J$  = 6.8 Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{C}_{11}\text{H}_{23}$ ), 3.54-3.57 (m, 2H,  $\text{OCH}_2$ ), 3.60-3.66 (m, 9H, 9/2 $\text{OCH}_2$ ), 3.79-3.82 (m, 1H, 1/2 $\text{OCH}_2$ ), 3.98 (ddd,  $^3J_{4a,5a}$  = 9.4 Hz,  $^3J_{5a,6a}$  = 3.7 Hz,  $^3J_{5a,6'a}$  = 2.5 Hz, 1H, 5a-H), 4.04 (t,  $^3J_{1a,2a} \approx ^3J_{2a,3a}$  = 2.3 Hz, 1H, 2a-H), 4.07-4.12 (m, 2H, 6a-H, 6b-H), 4.15 (ddd,  $^3J_{4b,5b}$  = 10.0 Hz,  $^3J_{5b,6b}$  = 5.4 Hz,  $^3J_{5b,6'b}$  = 2.1 Hz, 1H, 5b-H), 4.19-4.23 (m, 2H, 6'a-H, 6'b-H), 4.91 (d,  $^3J_{1b,2b}$  = 1.3 Hz, 1H, 1b-H), 4.96 (d,  $^3J_{1a,2a}$  = 1.3 Hz, 1H, 1a-H), 5.24-5.35 (m, 4H, 2b-H, 3a-H, 4a-H, 4b-H), 5.39 (dd,  $^3J_{2b,3b}$  = 3.4 Hz,  $^3J_{3b,4b}$  = 10.0 Hz, 1H, 3b-H) ppm;

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 14.07 (1C,  $\text{CH}_3$ ), 20.62-20.84 (7C, 7 $\text{COCH}_3$ ), 22.63-31.85 (10C, 10 $\text{CH}_2$ ), 62.02 (1C, C-6a or C-6b), 62.45 (1C, C-6a or C-6b), 66.09 (1C, C-4a), 66.32 (1C, C-4b), 67.36 (1C, 1 $\text{OCH}_2$ ), 68.32 (1C, C-3b), 68.39 (1C, C-5a), 69.06 (1C, C-5b), 69.72 (1C, C-2b), 69.92-69.97 (2C, 2 $\text{OCH}_2$ ), 70.22 (1C, C-3a), 70.54-70.66 (3C, 3 $\text{OCH}_2$ ), 71.50 (1C,  $\text{OCH}_2\text{C}_{11}\text{H}_{23}$ ), 77.04 (1C, C-2a), 98.30 (1C, C-1a), 99.12 (1C, C-1b), 169.32-170.86 (7C, 7 $\text{COCH}_3$ ) ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, CHCA):  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd.: 959.5, found: 959.0;  $[\text{M}+\text{K}]^+$  calcd.: 975.5, found: 975.0;

**elemental analysis** is calcd. (%) for  $\text{C}_{44}\text{H}_{72}\text{O}_{21}$  (937.0): C: 56.40, H: 7.74; found: C: 56.44, H: 7.58.

**3,6,9,12,15,18-Hexaoxatriacontanyl 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside (88-1)**



Compound **88-1** was prepared from **80-1** (380 mg, 411  $\mu$ mol) according to GP IV. The residue was purified by flash column

chromatography (silica gel, toluene/acetone 5:2) to afford **88-1** (196 mg, 251  $\mu$ mol, 61%) as a pale, colourless oil.

**TLC:**  $R_f = 0.55$  (toluene/acetone 3:2);

$[\alpha]_D^{20} = +21.7$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ );

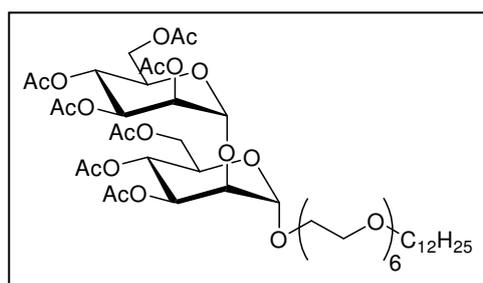
**$^1\text{H-NMR}$**  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 0.86$  (t,  $^3J = 7.1$  Hz, 3H,  $\text{OC}_{11}\text{H}_{22}\text{CH}_3$ ), 1.20-1.33 (m, 18H, 9 $\text{CH}_2$ ), 1.56 (quint,  $^3J = 7.1$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{C}_{10}\text{H}_{21}$ ), 1.97-2.14 (4s, 12H, 4 $\text{COCH}_3$ ), 3.43 (t,  $^3J = 6.8$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{C}_{11}\text{H}_{23}$ ), 3.55-3.57 (m, 2H, 1 $\text{OCH}_2$ ), 3.61-3.68 (m, 21H, 21/2 $\text{OCH}_2$ ), 3.77-3.82 (m, 1H, 1/2 $\text{OCH}_2$ ), 4.03-4.10 (m, 2H, 5-H, 6-H), 4.28 (dd,  $^3J_{5,6'} = 4.9$  Hz,  $^2J_{6,6'} = 12.2$  Hz, 1H, 6'-H), 4.86 (d,  $^3J_{1,2} = 1.7$  Hz, 1H, 1-H), 5.25 (dd,  $^3J_{1,2} = 1.7$  Hz,  $^3J_{2,3} = 3.4$  Hz, 1H, 2-H), 5.27 (t,  $^3J_{3,4} \approx ^3J_{4,5} = 9.8$  Hz, 1H, 4-H), 5.34 (dd,  $^3J_{2,3} = 3.5$  Hz,  $^3J_{3,4} = 10.0$  Hz, 1H, 3-H) ppm;

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 14.08$  (1C,  $\text{CH}_3$ ), 20.65-20.86 (4C, 4 $\text{COCH}_3$ ), 22.64-31.87 (10C, 10 $\text{CH}_2$ ), 62.37 (1C, C-6), 66.11 (1C, C-4), 67.34 (1C, 1 $\text{OCH}_2$ ), 68.35 (1C, C-5), 69.05 (1C, C-3), 69.53 (1C, C-2), 69.94-70.67 (11C, 11 $\text{OCH}_2$ ), 71.51 (1C,  $\text{OCH}_2\text{C}_{11}\text{H}_{23}$ ), 97.68 (1C, C-1), 169.68-170.62 (4C, 4 $\text{COCH}_3$ ) ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, CHCA):  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd.: 803.5, found: 803.3;  $[\text{M}+\text{K}]^+$  calcd.: 819.5, found: 819.2;

**elemental analysis** is calcd. (%) for  $\text{C}_{38}\text{H}_{68}\text{O}_{16}$  (780.9): C: 58.44, H: 8.78; found: C: 58.25, H: 9.34.

### 3,6,9,12,15,18-Hexaoxatriacontanyl 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-3,4,6-tri-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside (**88-2**)



Compound **88-2** was prepared from **80-2** (817 mg, 602  $\mu$ mol) according to GP IV. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, toluene/acetone 5:2  $\rightarrow$  2:1) followed by MPLC (silica gel, toluene/acetone 5:2) to afford **88-2** (226 mg, 211  $\mu$ mol, 35%) as a pale, colourless oil.

**TLC:**  $R_f = 0.51$  (toluene/acetone 3:2);

$[\alpha]_D^{20} = +19.9$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ );

**$^1\text{H-NMR}$**  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 0.83$  (t,  $^3J = 7.0$  Hz, 3H,  $\text{OC}_{11}\text{H}_{22}\text{CH}_3$ ), 1.16-1.30 (m, 18H, 9 $\text{CH}_2$ ), 1.53 (quint,  $^3J = 7.0$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{C}_{10}\text{H}_{21}$ ), 1.97-2.11 (7s, 21H, 7 $\text{COCH}_3$ ), 3.40 (t,  $^3J = 6.8$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{C}_{11}\text{H}_{23}$ ), 3.52-3.54 (m, 2H,  $\text{OCH}_2$ ), 3.58-3.64 (m, 21H, 21/2 $\text{OCH}_2$ ), 3.75-

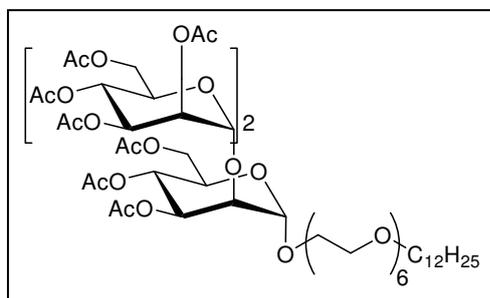
3.81 (m, 1H, 1/2OCH<sub>2</sub>), 3.94-3.97 (m, 1H, 5a-H), 4.02 (t, <sup>3</sup>J<sub>1a,2a</sub> ≈ <sup>3</sup>J<sub>2a,3a</sub> = 1.7 Hz, 1H, 2a-H), 4.05-4.14 (m, 3H, 5b-H, 6a-H, 6b-H), 4.17-4.21 (m, 2H, 6'a-H, 6'b-H), 4.88 (s, 1H, 1b-H), 4.94 (s, 1H, 1a-H), 5.21-5.33 (m, 4H, 2b-H, 3a-H, 4a-H, 4b-H), 5.37 (dd, <sup>3</sup>J<sub>2b,3b</sub> = 3.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3b,4b</sub> = 10.0 Hz, 1H, 3b-H) ppm;

<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 14.01 (1C, CH<sub>3</sub>), 20.56-20.77 (7C, 7COCH<sub>3</sub>), 22.56-31.78 (10C, 10CH<sub>2</sub>), 61.95 (1C, C-6a or C-6b), 62.39 (1C, C-6a or C-6b), 66.01 (1C, C-4a), 66.25 (1C, C-4b), 67.29 (1C, 1OCH<sub>2</sub>), 68.26 (1C, C-3b), 68.33 (1C, C-5a), 69.00 (1C, C-5b), 69.64 (1C, C-2b), 69.85-69.91 (2C, 2OCH<sub>2</sub>), 70.15 (1C, C-3a), 70.44-70.56 (9C, 9OCH<sub>2</sub>), 71.41 (1C, OCH<sub>2</sub>C<sub>11</sub>H<sub>23</sub>), 76.97 (1C, C-2a), 98.23 (1C, C-1a), 99.04 (1C, C-1b), 169.27-170.79 (7C, 7COCH<sub>3</sub>) ppm;

MALDI-MS (pos. mode, CHCA): m/z [M+Na]<sup>+</sup> calcd.: 1091.5, found: 1090.9; [M+K]<sup>+</sup> calcd.: 1107.5, found: 1106.9;

C<sub>50</sub>H<sub>84</sub>O<sub>24</sub> (1069.2).

**3,6,9,12,15,18-Hexaoxatriacontanyl 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-α-D-mannopyranosyl-(1→2)-3,4,6-tri-O-acetyl-α-D-mannopyranosyl-(1→2)-3,4,6-tri-O-acetyl-α-D-mannopyranoside (88-3)**



Compound **88-3** was prepared from **80-3** (292 mg, 163 μmol) according to GP IV. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, toluene/acetone 3:1) followed by MPLC (silica gel, toluene/acetone 3:1) to afford **88-3** (132 mg, 97 μmol, 60%) as a pale, colourless oil.

TLC: R<sub>f</sub> = 0.43 (toluene/acetone 3:2);

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +15.9 (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>);

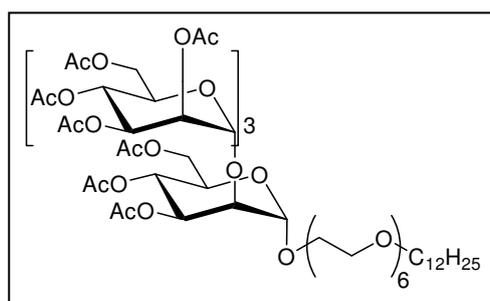
<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 0.85 (t, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, 3H, OC<sub>11</sub>H<sub>22</sub>CH<sub>3</sub>), 1.17-1.31 (m, 18H, 9CH<sub>2</sub>), 1.54 (quint, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>), 1.97-2.12 (10s, 30H, 10COCH<sub>3</sub>), 3.41 (t, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>C<sub>11</sub>H<sub>23</sub>), 3.53-3.56 (m, 2H, 1OCH<sub>2</sub>), 3.59-3.65 (m, 21H, 21/2OCH<sub>2</sub>), 3.77-3.83 (m, 1H, 1/2OCH<sub>2</sub>), 3.97 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>4a,5a</sub> = 9.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>5a,6a</sub> = 4.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>5a,6'a</sub> = 2.4 Hz, 1H, 5a-H), 4.02 (t, <sup>3</sup>J<sub>1a,2a</sub> ≈ <sup>3</sup>J<sub>2a,3a</sub> = 2.4 Hz, 1H, 2a-H), 4.05-4.23 (m, 9H, 2b-H, 5b-H, 5c-H, 6a-H, 6b-H, 6c-H, 6'a-H, 6'b-H, 6'c-H), 4.92 (d, <sup>3</sup>J<sub>1c,2c</sub> = 1.8 Hz, 1H, 1c-H), 4.96 (d, <sup>3</sup>J<sub>1a,2a</sub> = 1.8 Hz, 1H, 1a-H), 5.08 (d, <sup>3</sup>J<sub>1b,2b</sub> = 2.0 Hz, 1H, 1b-H), 5.22-5.33 (m, 6H, 2c-H, 3a-H, 3b-H, 4a-H, 4b-H, 4c-H), 5.36 (dd, <sup>3</sup>J<sub>2c,3c</sub> = 3.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3c,4c</sub> = 10.0 Hz, 1H, 3c-H) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 14.03$  (1C,  $\text{CH}_3$ ), 20.56-20.77 (10C,  $10\text{COCH}_3$ ), 22.59-31.82 (10C,  $10\text{CH}_2$ ), 61.95-62.43 (3C, C-6a, C-6b, C-6c), 66.08-66.20 (3C, C-4a, C-4b, C-4c), 67.33 (1C,  $1\text{OCH}_2$ ), 68.31 (1C, C-3c), 68.44 (1C, C-5a), 69.16 (1C, C-5c), 69.37 (1C, C-5b), 69.50 (1C, C-2c), 69.61 (1C, C-3a or C-3b), 69.88-69.95 (2C,  $2\text{OCH}_2$ ), 70.41 (1C, C-3a or C-3b), 70.47-70.57 (9C,  $9\text{OCH}_2$ ), 71.46 (1C,  $\text{OCH}_2\text{C}_{11}\text{H}_{23}$ ), 76.61 (1C, C-2a), 77.35 (1C, C-2b), 98.27 (1C, C-1a), 99.30 (1C, C-1c), 99.70 (1C, C-1b), 169.27-170.80 (10C,  $10\text{COCH}_3$ ) ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, CHCA):  $m/z$  (average mass)  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd.: 1380.4, found: 1380.1;  $[\text{M}+\text{K}]^+$  calcd.: 1396.5, found: 1396.1;

**elemental analysis** is calcd. (%) for  $\text{C}_{62}\text{H}_{100}\text{O}_{32}$  (1357.4): C: 54.86, H: 7.43; found: C: 55.04, H: 7.66.

**3,6,9,12,15,18-Hexaoxatriacontanyl 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-3,4,6-tri-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-3,4,6-tri-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-3,4,6-tri-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside (88-4)**



Compound **88-4** was prepared from **80-4** (192 mg, 86  $\mu\text{mol}$ ) according to GP IV. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, toluene/acetone 3:2) followed by MPLC (silica gel, toluene/acetone 3:2) to afford **88-4** (118 mg, 72  $\mu\text{mol}$ , 83%) as a foam.

**TLC**:  $R_f = 0.36$  (toluene/acetone 3:2);

$[\alpha]_D^{20} = +29.0$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ );

$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 0.84$  (t,  $^3J = 7.1$  Hz, 3H,  $\text{OC}_{11}\text{H}_{22}\text{CH}_3$ ), 1.17-1.31 (m, 18H,  $9\text{CH}_2$ ), 1.54 (quint,  $^3J = 7.1$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{C}_{10}\text{H}_{21}$ ), 1.97-2.13 (13s, 39H,  $13\text{COCH}_3$ ), 3.41 (t,  $^3J = 6.8$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{C}_{11}\text{H}_{23}$ ), 3.53-3.55 (m, 2H,  $\text{OCH}_2$ ), 3.59-3.65 (m, 21H,  $21/2\text{OCH}_2$ ), 3.77-3.82 (m, 1H,  $1/2\text{OCH}_2$ ), 3.97 (ddd,  $^3J_{4a,5a} = 9.9$  Hz,  $^3J_{5a,6a} = 4.1$  Hz,  $^3J_{5a,6'a} = 2.5$  Hz, 1H, 5a-H), 4.00-4.23 (m, 14H, 2a-H, 2b-H, 2c-H, 5b-H, 5c-H, 5d-H, 6a-H, 6b-H, 6c-H, 6d-H, 6'a-H, 6'b-H, 6'c-H, 6'd-H), 4.94 (d,  $^3J_{1d,2d} = 1.8$  Hz, 1H, 1d-H), 4.96 (d,  $^3J_{1a,2a} = 1.9$  Hz, 1H, 1a-H), 5.05 (d,  $^3J_{1,2} = 2.2$  Hz, 1H, 1b-H or 1c-H), 5.11 (d,  $^3J_{1,2} = 2.0$  Hz, 1H, 1b-H or 1c-H), 5.22-5.35 (m, 8H, 2d-H, 3a-H, 3b-H, 3c-H, 4a-H, 4b-H, 4c-H, 4d-H), 5.36 (dd,  $^3J_{2d,3d} = 3.4$  Hz,  $^3J_{3d,4d} = 10.0$  Hz, 1H, 3d-H) ppm;

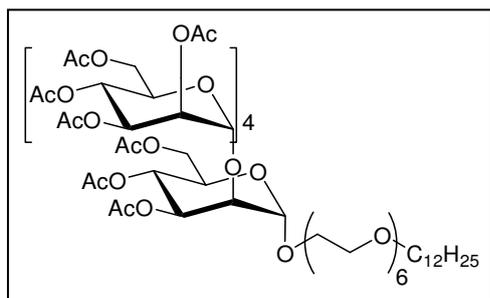
$^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 14.03$  (1C,  $\text{CH}_3$ ), 20.52-20.78 (13C,  $13\text{COCH}_3$ ), 22.59-31.81 (10C,  $10\text{CH}_2$ ), 61.97-62.37 (4C, C-6a, C-6b, C-6c, C-6d), 65.99-66.38 (4C, C-4a, C-4b, C-4c, C-

4d), 67.34 (1C, 1OCH<sub>2</sub>), 68.27 (1C, C-3d), 68.39 (1C, C-5a), 69.13-69.39 (3C, C-5b, C-5c, C-5d), 69.49 (1C, C-2d), 69.59 (1C, C-3b or C-3c), 69.71 (1C, C-3b or C-3c), 69.88-69.94 (2C, 2OCH<sub>2</sub>), 70.33 (1C, C-3a), 70.46-70.57 (9C, 9OCH<sub>2</sub>), 71.45 (1C, OCH<sub>2</sub>C<sub>11</sub>H<sub>23</sub>), 76.42-77.13 (3C, C-2a, C-2b, C-3c), 98.31 (1C, C-1a), 99.15 (1C, C-1d), 99.55 (1C, C-1b or C-1c), 99.73 (1C, C-1b or C-1c), 169.20-170.75 (13C, 13COCH<sub>3</sub>) ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, CHCA): m/z (average mass) [M+Na]<sup>+</sup> calcd.: 1668.7, found: 1668.7; [M+K]<sup>+</sup> calcd.: 1684.8, found: 1684.3;

**elemental analysis** is calcd. (%) for C<sub>74</sub>H<sub>116</sub>O<sub>40</sub> (1645.7): C: 54.01, H: 7.10; found: C: 53.95, H: 7.43.

**3,6,9,12,15,18-Hexaoxatriacontanyl 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-3,4,6-tri-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-3,4,6-tri-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-3,4,6-tri-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside (88-5)**



Compound **88-5** was prepared from **80-5** (225 mg, 85 mmol) according to GP IV. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, toluene/acetone 3:2) followed by MPLC (silica gel, toluene/acetone 3:2) to afford **88-5** (116 mg, 60 mmol, 71%) as a foam.

**TLC:** R<sub>f</sub> = 0.32 (toluene/acetone 3:2);

**[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup>** = +28.9 (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>);

**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 0.84 (t, <sup>3</sup>J = 6.9 Hz, 3H, OC<sub>11</sub>H<sub>22</sub>CH<sub>3</sub>), 1.16-1.31 (m, 18H, 9CH<sub>2</sub>), 1.54 (quint, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>), 1.97-2.13 (16s, 48H, 16COCH<sub>3</sub>), 3.41 (t, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>C<sub>11</sub>H<sub>23</sub>), 3.53-3.55 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>), 3.59-3.65 (m, 21H, 21/2OCH<sub>2</sub>), 3.77-3.82 (m, 1H, 1/2OCH<sub>2</sub>), 3.97 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>4a,5a</sub> = 9.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>5a,6a</sub> = 3.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>5a,6'a</sub> = 2.5 Hz, 1H, 5a-H), 4.01-4.24 (18H, 2a-H, 2b-H, 2c-H, 2d-H, 5b-H, 5c-H, 5d-H, 5e-H, 6a-H, 6b-H, 6c-H, 6d-H, 6e-H, 6'a-H, 6'b-H, 6'c-H, 6'd-H, 6'e-H), 4.94 (s, 1H, 1e-H), 4.96 (d, <sup>3</sup>J<sub>1a,2a</sub> = 1.6 Hz, 1H, 1a-H), 5.07 (d, <sup>3</sup>J<sub>1,2</sub> = 2.0 Hz, 1H, 1b-H or 1c-H or 1d-H), 5.09 (d, <sup>3</sup>J<sub>1,2</sub> = 1.9 Hz, 1H, 1b-H or 1c-H or 1d-H), 5.14 (d, <sup>3</sup>J<sub>1,2</sub> = 1.4 Hz, 1H, 1b-H or 1c-H or 1d-H), 5.19-5.35 (m, 10H, 2e-H, 3a-H, 3b-H, 3c-H, 3d-H, 4a-H, 4b-H, 4c-H, 4d-H, 4e-H), 5.37 (dd, <sup>3</sup>J<sub>2e,3e</sub> = 3.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3e,4e</sub> = 10.0 Hz, 1H, 3e-H) ppm;

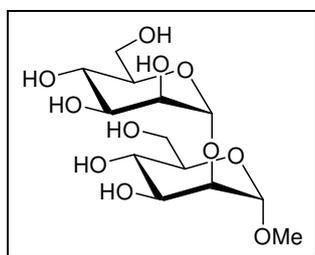
**<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 14.02 (1C, CH<sub>3</sub>), 20.51-20.75 (16C, 16COCH<sub>3</sub>), 22.58-31.81 (10C, 10CH<sub>2</sub>), 61.93-62.34 (5C, C-6a, C-6b, C-6c, C-6d, C-6e), 65.92-66.37 (5C, C-4, C-4b, C-4c, C-4d, C-4e), 67.33 (1C, 1OCH<sub>2</sub>), 68.26 (1C, C-3e), 68.40 (1C, C-5a), 69.09-69.39 (4C, C-5b,

C-5c, C-5d, C-5e), 69.50 (1C, C-2e), 69.57-69.73 (3C, C-3b, C-3c, C-3d), 69.64 (1C, C-2b), 69.87-69.94 (2C, 2OCH<sub>2</sub>), 70.33 (1C, C-3a), 70.46-70.56 (9C, 9OCH<sub>2</sub>), 71.45 (1C, OCH<sub>2</sub>C<sub>11</sub>H<sub>23</sub>), 75.89-77.1 (3C, C-2a, C-2c, C-2d), 98.33 (1C, C-1a), 99.22 (1C, C-1e), 99.36 (1C, C-1b or C-1c or C-1d), 99.48 (1C, C-1b or C-1c or C-1d), 99.78 (1C, C-1b or C-1c or C-1d), 169.14-170.75 (16C, 16COCH<sub>3</sub>) ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, CHCA): m/z (average mass) [M+Na]<sup>+</sup> calcd.: 1956.3, found: 1956.1; [M+K]<sup>+</sup> calcd.: 1972.4, found: 1972.3;

**elemental analysis** is calcd. (%) for C<sub>86</sub>H<sub>132</sub>O<sub>48</sub> (1933.9): C: 53.41, H: 6.88; found: C: 53.64, H: 7.37.

### Methyl $\alpha$ -D-Mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-mannopyranoside (**89-2**)



Compound **89-2** (58 mg, 163  $\mu$ mol, 96%) was prepared from **85-2** (110 mg, 169  $\mu$ mol) according to GP III as a colourless lyophilisate. The recorded physical data correspond to those reported in literature.<sup>[312, 313]</sup>

**TLC**: R<sub>f</sub> = 0.35 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 1:1); R<sub>f</sub> = 0.61 (RP-18 silicagel, MeCN/H<sub>2</sub>O 10:1);

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +70.9 (c = 1.0, MeOH);

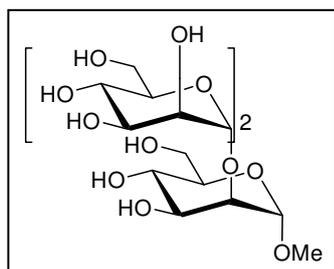
**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, d<sub>4</sub>-MeOD):  $\delta$  = 3.37 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.47 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>4a,5a</sub> = 10.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>5a,6a</sub> = 6.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>5a,6'a</sub> = 2.2 Hz, 1H, 5a-H), 3.55-3.61 (m, 2H, 4a-H, 4b-H), 3.65-3.74 (m, 4H, 3b-H, 5b-H, 6a-H, 6b-H), 3.78 (dd, <sup>3</sup>J<sub>2a,3a</sub> = 3.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3a,4a</sub> = 9.3 Hz, 1H, 3a-H), 3.81-3.86 (m, 3H, 2a-H, 6'a-H, 6'b-H), 3.98 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1b,2b</sub> = 1.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2b,3b</sub> = 3.3 Hz, 1H, 2b-H), 4.95 (d, <sup>3</sup>J<sub>1a,2a</sub> = 1.4 Hz, 1H, 1a-H), 4.97 (d, <sup>3</sup>J<sub>1b,2b</sub> = 1.5 Hz, 1H, 1b-H) ppm;

**<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, d<sub>4</sub>-MeOD):  $\delta$  = 55.31 (1C, OCH<sub>3</sub>), 63.04 (1C, C-6a or C-6b), 63.14 (1C, C-6a or C-6b), 68.82 (1C, C-4a or C-4b), 68.99 (1C, C-4a or C-4b), 71.87 (1C, C-2b), 72.17 (1C, C-3a), 72.42 (1C, C-3b), 74.50 (1C, C-5a), 75.02 (1C, C-5b), 80.42 (1C, C-2a), 101.10 (1C, C-1a), 104.17 (1C, C-1b), ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, CHCA): m/z [M+Na]<sup>+</sup> calcd.: 379.1, found: 379.3; [M+K]<sup>+</sup> calcd.: 395.1, found: 395.3;

C<sub>13</sub>H<sub>24</sub>O<sub>11</sub> (356.3).

**Methyl  $\alpha$ -D-Mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-mannopyranoside (89-3)**



Compound **89-3** (43 mg, 83  $\mu$ mol, 97%) was prepared from **85-3** (81 mg, 86  $\mu$ mol) according to GP III as a colourless lyophilisate. The recorded physical data correspond to those reported in literature.<sup>[314]</sup>

**TLC:**  $R_f$  = 0.31 (RP-18 silicagel, MeCN/H<sub>2</sub>O 10:1);  $R_f$  = 0.05 (RP-18-silicagel, MeCN/H<sub>2</sub>O 5:1);

$[\alpha]_D^{20}$  = +64.7 ( $c$  = 1.0, CHCl<sub>3</sub>);

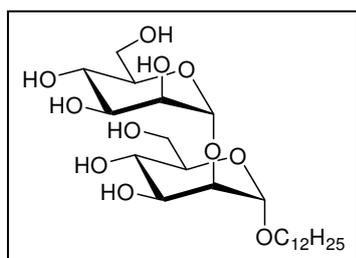
**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, d<sub>4</sub>-MeOD):  $\delta$  = 3.37 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.47 (ddd, <sup>3</sup> $J_{4a,5a}$  = 9.6 Hz, <sup>3</sup> $J_{5a,6a}$  = 6.1 Hz, <sup>3</sup> $J_{5a,6'a}$  = 2.2 Hz, 1H, 5a-H), 3.52-3.61 (m, 3H, 4a-H, 4b-H, 4c-H), 3.63-3.74 (m, 6H, 3c-H, 5b-H, 5c-H, 6a-H, 6b-H, 6c-H), 3.78 (dd, <sup>3</sup> $J_{2a,3a}$  = 3.3 Hz, <sup>3</sup> $J_{3a,4a}$  = 9.5 Hz, 1H, 3a-H), 3.81-3.88 (m, 5H, 2a-H, 3b-H, 6'a-H, 6'b-H, 6'c-H), 3.98 (dd, <sup>3</sup> $J_{1c,2c}$  = 1.7 Hz, <sup>3</sup> $J_{2c,3c}$  = 3.2 Hz, 1H, 2c-H), 4.04 (dd, <sup>3</sup> $J_{1b,2b}$  = 1.7 Hz, <sup>3</sup> $J_{2b,3b}$  = 3.1 Hz, 1H, 2b-H), 4.96 (d, <sup>3</sup> $J_{1a,2a}$  = 1.3 Hz, 1H, 1a-H), 4.98 (d, <sup>3</sup> $J_{1c,2c}$  = 1.3 Hz, 1H, 1c-H), 5.28 (d, <sup>3</sup> $J_{1b,2b}$  = 1.3 Hz, 1H, 1b-H) ppm;

**<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, d<sub>4</sub>-MeOD):  $\delta$  = 55.32 (1C, OCH<sub>3</sub>), 63.03 (1C, C-6a or C-6b or C-6c), 63.21 (1C, C-6a or C-6b or C-6c), 63.30 (1C, C-6a or C-6b or C-6c), 68.83 (1C, C-4a or C-4b or C-4c), 69.01 (1C, C-4a or C-4b or C-4c), 69.23 (1C, C-4a or C-4b or C-4c), 71.91 (1C, C-2c), 71.95 (1C, C-3b), 72.17 (1C, C-3a), 72.47 (1C, C-3c), 74.46 (1C, C-5a), 74.99 (1C, C-5b or C-5c), 75.01 (1C, C-5b or C-5c), 80.28 (1C, C-2b), 80.67 (1C, C-2a), 101.06 (1C, C-1a), 102.50 (1C, C-1b), 104.08 (1C, C-1c) ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, CHCA):  $m/z$  [M+Na]<sup>+</sup> calcd.: 541.2, found: 541.7; [M+K]<sup>+</sup> calcd.: 557.2, found: 557.7;

C<sub>19</sub>H<sub>34</sub>O<sub>16</sub> (518.5).

**Dodecyl  $\alpha$ -D-Mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-mannopyranoside (90-2)**



Compound **90-2** (43 mg, 84  $\mu$ mol, 98%) was prepared from **86-2** (69 mg, 86  $\mu$ mol) according to GP III as a colourless lyophilisate.

**TLC:**  $R_f$  = 0.62 (RP-18 silicagel, MeCN/H<sub>2</sub>O 2:1);

$[\alpha]_D^{20} = +48.1$  ( $c = 1.0$ , MeOH);

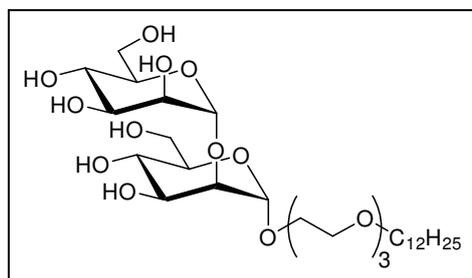
$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $d_4$ -MeOD):  $\delta = 0.90$  (t,  $^3J = 7.0$  Hz, 3H,  $\text{OC}_{11}\text{H}_{22}\text{CH}_3$ ), 1.24-1.41 (m, 18H, 9 $\text{CH}_2$ ), 1.56-1.61 (m, 2H, 1 $\text{CH}_2$ ), 3.40-3.45 (m, 1H, 1/2 $\text{OCH}_2\text{C}_{11}\text{H}_{23}$ ), 3.48-3.53 (m, 1H, 5a-H or 5b-H), 3.55-3.61 (m, 2H, 4a-H, 4b-H), 3.63-3.75 (m, 5H, 3b-H, 5a-H or 5b-H, 6a-H, 6b-H, 1/2 $\text{OCH}_2\text{C}_{11}\text{H}_{23}$ ), 3.79-3.86 (m, 4H, 2a-H, 3a-H, 6'a-H, 6'b-H), 3.98 (bs, 1H, 2b-H), 4.96 (s, 1H, 1b-H), 5.05 (s, 1H, 1a-H) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $d_4$ -MeOD):  $\delta = 14.49$  (1C,  $\text{CH}_3$ ), 23.77-33.11 (10C, 10 $\text{CH}_2$ ), 63.08 (1C, C-6a or C-6b), 63.14 (1C, C-6a or C-6b), 68.72 (1C,  $\text{OCH}_2\text{C}_{11}\text{H}_{23}$ ), 68.85 (1C, C-4a or C-4b), 69.07 (1C, C-4a or C-4b), 71.92 (1C, C-2b), 72.25 (1C, C-3a), 72.45 (1C, C-3b), 74.63 (1C, C-5a or C-5b), 75.01 (1C, C-5a or C-5b), 80.78 (1C, C-2a), 99.94 (1C, C-1a), 104.23 (1C, C-1b) ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, CHCA):  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd.: 533.3, found: 533.6;  $[\text{M}+\text{K}]^+$  calcd.: 549.3, found: 549.5;

**elemental analysis** is calcd. (%) for  $\text{C}_{24}\text{H}_{46}\text{O}_{11}$  (510.6): C: 56.45, H: 9.08; found: C: 56.44, H: 9.30.

### 3,6,9-Trioxahenicosanyl $\alpha$ -D-Mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-mannopyranoside (91-2)



Compound **91-2** (35 mg, 54  $\mu\text{mol}$ , 93%) was prepared from **87-2** (54 mg, 58  $\mu\text{mol}$ ) according to GP III as a colourless lyophilisate.

**TLC**:  $R_f = 0.33$  (RP-18 silicagel, MeCN/ $\text{H}_2\text{O}$  3:2);

$[\alpha]_D^{20} = +38.5$  ( $c = 1.0$ , MeOH);

$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $d_4$ -MeOD):  $\delta = 0.90$  (t,  $^3J = 7.1$  Hz, 3H,  $\text{OC}_{11}\text{H}_{22}\text{CH}_3$ ), 1.24-1.41 (m, 18H, 9 $\text{CH}_2$ ), 1.57 (quint,  $^3J = 6.8$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{C}_{10}\text{H}_{21}$ ), 3.47 (t,  $^3J = 6.7$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{C}_{11}\text{H}_{23}$ ), 3.53-3.75 (m, 18H, 3b-H, 4a-H, 4b-H, 5a-H, 5b-H, 6a-H, 6b-H, 11/2 $\text{OCH}_2$ ), 3.81-3.87 (m, 5H, 2a-H, 3a-H, 6'a-H, 6'b-H, 1/2 $\text{OCH}_2$ ), 3.99 (bs, 1H, 2b-H), 4.97 (bs, 1H, 1b-H), 5.11 (bs, 1H, 1a-H) ppm;

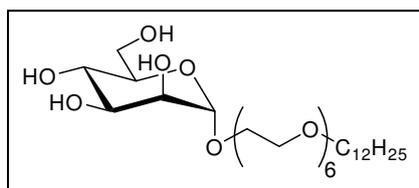
$^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $d_4$ -MeOD):  $\delta = 14.50$  (1C,  $\text{CH}_3$ ), 23.74-33.08 (10C, 10 $\text{CH}_2$ ), 63.03 (1C, C-6a or C-6b), 63.12 (1C, C-6a or C-6b), 67.89 (1C, 1 $\text{OCH}_2$ ), 68.79 (1C, C-4a or C-4b), 68.99 (1C, C-4a or C-4b), 71.14-71.55 (5C, 5 $\text{OCH}_2$ ), 71.86 (1C, C-2b), 72.08 (1C, C-3a), 72.39 (1C,

C-3b or  $\text{OCH}_2\text{C}_{11}\text{H}_{23}$ ), 72.41 (1C, C-3b or  $\text{OCH}_2\text{C}_{11}\text{H}_{23}$ ), 74.62 (1C, C-5a or C-5b), 74.98 (1C, C-5a or C-5b), 80.57 (1C, C-2a), 100.12 (1C, C-1a), 104.18 (1C, C-1b) ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, CHCA):  $[\text{M}+\text{Na}]^+$   $m/z$  calcd.: 665.4, found: 665.7;  $[\text{M}+\text{K}]^+$  calcd.: 681.4, found: 681.7;

$\text{C}_{30}\text{H}_{58}\text{O}_{14}$  (642.8).

### 3,6,9,12,15,18-Hexaoxatriacontanyl $\alpha$ -D-Mannopyranoside (92-1)



Compound **92-1** (114 mg, 186  $\mu\text{mol}$ , 95%) was prepared from **88-1** (152 mg, 195  $\mu\text{mol}$ ) according to GP III as a pale, colourless oil.

**TLC**:  $R_f = 0.24$  (RP-18 silicagel, MeCN/ $\text{H}_2\text{O}$  2:1);

$[\alpha]_D^{20} = +21.2$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ );

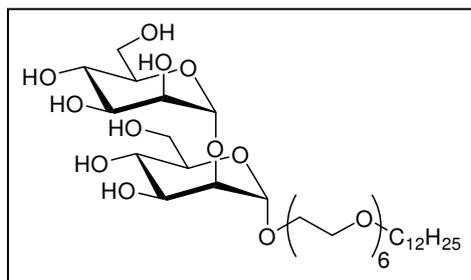
**$^1\text{H-NMR}$**  (600 MHz,  $d_4$ -MeOD):  $\delta = 0.90$  (t,  $^3J = 7.1$  Hz, 3H,  $\text{OC}_{11}\text{H}_{22}\text{CH}_3$ ), 1.23-1.39 (m, 18H, 9 $\text{CH}_2$ ), 1.57 (quint,  $^3J = 7.0$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{C}_{10}\text{H}_{21}$ ), 3.47 (t,  $^3J = 6.6$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{C}_{11}\text{H}_{23}$ ), 3.55-3.73 (m, 27H, 3-H, 4-H, 5-H, 6-H, 23/2 $\text{OCH}_2$ ), 3.80-3.86 (m, 3H, 2-H, 6'-H, 1/2 $\text{OCH}_2$ ), 4.80 (d,  $^3J_{1,2} = 1.7$  Hz, 1H, 1-H) ppm;

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (151 MHz,  $d_4$ -MeOD):  $\delta = 14.49$  (1C,  $\text{CH}_3$ ), 23.77-33.12 (10C, 10 $\text{CH}_2$ ), 63.02 (1C, C-6), 67.84 (1C, 10 $\text{CH}_2$ ), 68.69 (1C, C-5), 71.21-71.68 (11C, 11 $\text{OCH}_2$ ), 72.11 (1C, C-2), 72.43 (1C,  $\text{OCH}_2\text{C}_{11}\text{H}_{23}$ ), 72.63 (1C, C-3), 74.66 (1C, C-4), 100.82 (1C, C-1) ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, CHCA):  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd.: 635.4, found: 635.5;  $[\text{M}+\text{K}]^+$  calcd.: 651.4 found: 651.4;

**elemental analysis** is calcd. (%) for  $\text{C}_{30}\text{H}_{60}\text{O}_{12}$  (612.8): C: 58.80, H: 9.87; found: C: 58.25, H: 9.34.

### 3,6,9,12,15,18-Hexaoxatriacontanyl $\alpha$ -D-Mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-mannopyranoside (92-2)



Compound **92-2** (27 mg, 35  $\mu\text{mol}$ , 97%) was prepared from **88-2** (38 mg, 36  $\mu\text{mol}$ ) according to GP III as a colourless lyophilisate.

**TLC:**  $R_f = 0.33$  (RP-18 silicagel, MeCN/H<sub>2</sub>O 3:2);

$[\alpha]_D^{20} = +32.0$  ( $c = 1.0$ , MeOH);

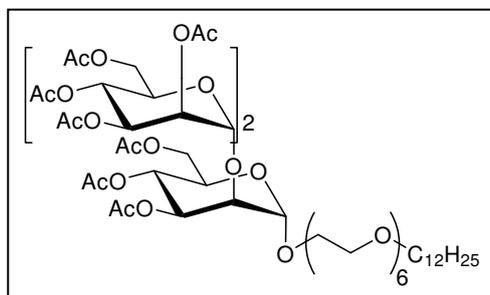
**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, d<sub>4</sub>-MeOD):  $\delta = 0.90$  (t,  $^3J = 7.1$  Hz, 3H, OC<sub>11</sub>H<sub>22</sub>CH<sub>3</sub>), 1.24-1.39 (m, 18H, 9CH<sub>2</sub>), 1.57 (quint,  $^3J = 7.0$  Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>), 3.47 (t,  $^3J = 6.6$  Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>C<sub>11</sub>H<sub>23</sub>), 3.53-3.75 (m, 30H, 3b-H, 4a-H, 4b-H, 5a-H, 5b-H, 6a-H, 6b-H, 23/2OCH<sub>2</sub>), 3.80-3.86 (m, 5H, 2a-H, 3a-H, 6'a-H, 6'b-H, 1/2OCH<sub>2</sub>), 3.98 (dd,  $^3J_{1b,2b} = 1.8$  Hz,  $^3J_{2b,3b} = 3.3$  Hz, 1H, 2b-H), 4.96 (d,  $^3J_{1b,2b} = 1.7$  Hz, 1H, 1b-H), 5.11 (d,  $^3J_{1a,2a} = 1.7$  Hz, 1H, 1a-H) ppm;

**<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, d<sub>4</sub>-MeOD):  $\delta = 14.50$  (1C, CH<sub>3</sub>), 23.79-33.13 (10C, 10CH<sub>2</sub>), 63.13 (1C, C-6a or C-6b), 63.23 (1C, C-6a or C-6b), 67.94 (1 C, 1OCH<sub>2</sub>), 68.88 (1C, C-4a or C-4b), 69.09 (1C, C-4a or C-4b), 71.19-71.61 (11C, 11OCH<sub>2</sub>), 71.93 (1C, C-2b), 72.14 (1C, C-3a), 72.43 (1C, C-3b or OCH<sub>2</sub>C<sub>11</sub>H<sub>23</sub>), 72.48 (1C, C-3b or OCH<sub>2</sub>C<sub>11</sub>H<sub>23</sub>), 74.72 (1C, C-5a or C-5b), 75.08 (1C, C-5a or C-5b), 80.66 (1C, C-2a), 100.17 (1C, C-1a), 104.28 (1C, C-1b) ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, CHCA):  $m/z$  [M+Na]<sup>+</sup> calcd.: 797.5, found: 797.5; [M+K]<sup>+</sup> calcd.: 813.5 found: 813.4;

C<sub>36</sub>H<sub>70</sub>O<sub>17</sub> (774.9).

**3,6,9,12,15,18-Hexaoxatriacontanyl  $\alpha$ -D-Mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-mannopyranoside (92-3)**



Compound **92-3** (29 mg, 31  $\mu$ mol, 79%) was prepared from **88-3** (53 mg, 39  $\mu$ mol) according to GP III as a colourless lyophilisate.

**TLC:**  $R_f = 0.60$  (RP-18 silicagel, MeCN/H<sub>2</sub>O 2:1);

$[\alpha]_D^{20} = +29.1$  ( $c = 1.0$ , MeOH);

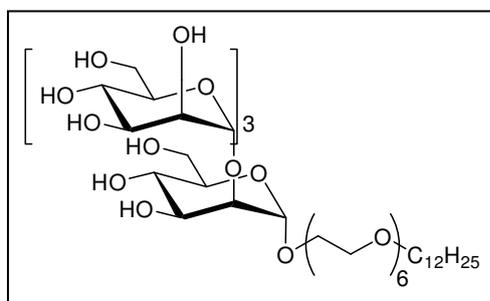
**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, d<sub>4</sub>-MeOD):  $\delta = 0.90$  (t,  $^3J = 7.0$  Hz, 3H, OC<sub>11</sub>H<sub>22</sub>CH<sub>3</sub>), 1.24-1.39 (m, 18H, 9CH<sub>2</sub>), 1.57 (quint,  $^3J = 7.0$  Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>), 3.47 (t,  $^3J = 6.7$  Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>C<sub>11</sub>H<sub>23</sub>), 3.52-3.74 (m, 33H, 3c-H, 4a-H, 4b-H, 4c-H, 5a-H, 5b-H, 5c-H, 6a-H, 6b-H, 6c-H, 23/2OCH<sub>2</sub>), 3.80-3.88 (m, 7H, 2a-H, 3a-H, 3b-H, 6'a-H, 6'b-H, 6'c-H, 1/2OCH<sub>2</sub>), 3.97 (dd,  $^3J_{1c,2c} = 1.7$  Hz,  $^3J_{2c,3c} = 3.2$  Hz, 1H, 2c-H), 4.03 (dd,  $^3J_{1b,2b} = 1.8$  Hz,  $^3J_{2b,3b} = 3.1$  Hz, 1H, 2b-H), 4.98 (d,  $^3J_{1c,2c} = 1.4$  Hz, 1H, 1c-H), 5.10 (d,  $^3J_{1a,2a} = 1.3$  Hz, 1H, 1a-H), 5.28 (d,  $^3J_{1b,2b} = 1.4$  Hz, 1H, 1b-H) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $d_4$ -MeOD):  $\delta$  = 14.50 (1C,  $\text{CH}_3$ ), 23.78-33.12 (10C,  $10\text{CH}_2$ ), 63.10-63.37 (3C, C-6a, C-6b, C-6c), 67.99 (1 C,  $1\text{OCH}_2$ ), 68.85-69.28 (3C, C-4a, C-4b, C-4c), 71.19-71.60 (11C,  $11\text{OCH}_2$ ), 71.95 (1C, C-2c), 72.01 (1C, C-3a or C-3b), 72.14 (1C, C-3a or C-3b), 72.43 (1C, C-3c or  $\text{OCH}_2\text{C}_{11}\text{H}_{23}$ ), 72.51 (1C, C-3c or  $\text{OCH}_2\text{C}_{11}\text{H}_{23}$ ), 74.67-75.06 (3C, C-5a, C-5b, C-5c), 80.29 (1C, C-2b), 80.80 (1C, C-2a), 100.13 (1C, C-1a), 102.57 (1C, C-1b), 104.15 (1C, C-1c) ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, CHCA):  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd.: 959.5, found: 959.9;  $[\text{M}+\text{K}]^+$  calcd.: 975.5 found: 975.9;

$\text{C}_{42}\text{H}_{80}\text{O}_{22}$  (937.1).

**3,6,9,12,15,18-Hexaoxatriacontanyl  $\alpha$ -D-Mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-mannopyranoside (92-4)**



Compound **92-4** (33 mg, 30  $\mu\text{mol}$ , 94%) was prepared from **88-4** (52 mg, 32  $\mu\text{mol}$ ) according to GP III as a colourless lyophilisate.

**TLC:**  $R_f$  = 0.33 (RP-18 silicagel,  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  3:2);

$[\alpha]_D^{20}$  = +30.0 ( $c$  = 1.0, MeOH);

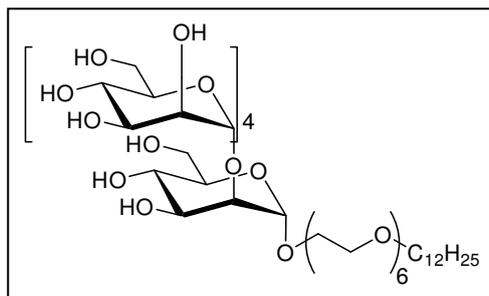
$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $d_4$ -MeOD):  $\delta$  = 0.90 (t,  $^3J$  = 7.1 Hz, 3H,  $\text{OC}_{11}\text{H}_{22}\text{CH}_3$ ), 1.24-1.38 (m, 18H,  $9\text{CH}_2$ ), 1.57 (quint,  $^3J$  = 7.0 Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{C}_{10}\text{H}_{21}$ ), 3.47 (t,  $^3J$  = 6.7 Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{C}_{11}\text{H}_{23}$ ), 3.52-3.74 (m, 36H, 3d-H, 4a-H, 4b-H, 4c-H, 4d-H, 5a-H, 5b-H, 5c-H, 5d-H, 6a-H, 6b-H, 6c-H, 6d-H,  $23/2\text{OCH}_2$ ), 3.79-3.90 (m, 9H, 2a-H, 3a-H, 3b-H, 3c-H, 6'a-H, 6'b-H, 6'c-H, 6'd-H,  $1/2\text{OCH}_2$ ), 3.97 (dd,  $^3J_{1d,2d}$  = 1.8 Hz,  $^3J_{2d,3d}$  = 3.3 Hz, 1H, 2d-H), 4.01-4.04 (m, 2H, H-2b, H-2c), 4.99 (d,  $^3J_{1d,2d}$  = 1.7 Hz, 1H, 1d-H), 5.10 (d,  $^3J_{1a,2a}$  = 1.6 Hz, 1H, 1a-H), 5.27 (d,  $^3J_{1,2}$  = 1.6 Hz, 1H, 1b-H or 1c-H), 5.28 (d,  $^3J_{1,2}$  = 1.6 Hz, 1H, 1b-H or 1c-H) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $d_4$ -MeOD):  $\delta$  = 14.50 (1C,  $\text{CH}_3$ ), 23.78-33.12 (10C,  $10\text{CH}_2$ ), 63.08-63.36 (4C, C-6a, C-6b, C-6c, C-6d), 67.99 (1C,  $1\text{OCH}_2$ ), 68.79-69.25 (4C, C-4a, C-4b, C-4c, C-4d), 71.18-71.59 (11C,  $11\text{OCH}_2$ ), 71.95 (1C, C-2d), 72.00-72.17 (3C, C-3a, C-3b, C-3c), 72.43 (1C, C-3d or  $\text{OCH}_2\text{C}_{11}\text{H}_{23}$ ), 72.51 (1C, C-3d or  $\text{OCH}_2\text{C}_{11}\text{H}_{23}$ ), 74.67-75.06 (4C, C-5a, C-5b, C-5c, C-5d), 80.19 (1C, C-2b or C-2c), 80.45 (1C, C-2b or C-2c), 80.79 (1C, C-2a), 100.11 (1C, C-1a), 102.40 (1C, C-1b or C-1c), 102.46 (1C, C-1b or C-1c), 104.11 (1C, C-1d) ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, CHCA):  $m/z$   $[M+Na]^+$  calcd.: 1121.6, found: 1121.7;  $[M+K]^+$  calcd.: 1137.6, found: 1137.7;

$C_{48}H_{90}O_{27}$  (1099.2).

**3,6,9,12,15,18-Hexaoxatriacontanyl  $\alpha$ -D-Mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-mannopyranoside (92-5)**



Compound **92-5** (23 mg, 18  $\mu$ mol, 86%) was prepared from **88-5** (41 mg, 21  $\mu$ mol) according to GP III as a colourless lyophilisate.

**TLC:**  $R_f$  = 0.38 (RP-18 silicagel, MeCN/H<sub>2</sub>O 3:2);

$[\alpha]_D^{20}$  = +27.5 ( $c$  = 1.0, MeOH);

**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, d<sub>4</sub>-MeOD):  $\delta$  = 0.90 (t,  $^3J$  = 7.0 Hz, 3H, OC<sub>11</sub>H<sub>22</sub>CH<sub>3</sub>), 1.24-1.39 (m, 18H, 9CH<sub>2</sub>), 1.57 (quint,  $^3J$  = 6.9 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>), 3.47 (t,  $^3J$  = 6.6 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>C<sub>11</sub>H<sub>23</sub>), 3.52-3.74 (m, 39H, 3e-H, 4a-H, 4b-H, 4c-H, 4d-H, 4e-H, 5a-H, 5b-H, 5c-H, 5d-H, 5e-H, 6a-H, 6b-H, 6c-H, 6d-H, 6e-H, 23/2OCH<sub>2</sub>), 3.78-3.90 (m, 11H, 2a-H, 3a-H, 3b-H, 3c-H, 3d-H, 6'a-H, 6'b-H, 6'c-H, 6'd-H, 6'e-H, 1/2OCH<sub>2</sub>), 3.97 (bs, 1H, 2e-H), 4.00-4.04 (m, 3H, 2b-H, 2c-H, 2d-H), 4.99 (s, 1H, 1e-H), 5.10 (s, 1H, 1a-H), 5.26-5.29 (m, 3H, 1b-H, 1c-H, 1d-H) ppm;

**<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, d<sub>4</sub>-MeOD):  $\delta$  = 14.50 (1C, CH<sub>3</sub>), 23.79-33.12 (10C, 10CH<sub>2</sub>), 63.09-63.32 (5C, C-6a, C-6b, C-6c, C-6d, C-6e), 67.99 (1C, 1OCH<sub>2</sub>), 68.80-69.27 (5C, C-4a, C-4b, C-4c, C-4d, C-4e), 71.20-71.61 (11C, 11OCH<sub>2</sub>), 71.95 (1C, C-2e), 72.05-72.18 (4C, C-3a, C-3b, C-3c, C-3d), 72.43 (1C, C-3e or OCH<sub>2</sub>C<sub>11</sub>H<sub>23</sub>), 72.51 (1C, C-3e or OCH<sub>2</sub>C<sub>11</sub>H<sub>23</sub>), 74.68-75.05 (5C, C-5a, C-5b, C-5c, C-5d, C-5e), 80.18-80.45 (3C, C-2b, C-2c, C-2d), 80.80 (1C, C-2a), 100.12 (1C, C-1a), 102.32 (1C, C-1b or C-1c or C-1d), 102.41 (1C, C-1b or C-1c or C-1d), 102.45 (1C, C-1b or C-1c or C-1d), 104.13 (1C, C-1e) ppm;

**MALDI-MS** (pos. mode, CHCA):  $m/z$   $[M+Na]^+$  calcd.: 1283.6, found: 1283.4;  $[M+K]^+$  calcd.: 1299.6 found: 1299.4;

$C_{54}H_{100}O_{32}$  (1261.4).

### 6.2.3 Array Experiments

#### **Protocol for the immobilisation of carbohydrates onto glass surfaces by reductive amination (SP 1)**

From stock solutions of the carbohydrate compounds (aldehyde- or amino-derivative), dilution series were prepared in  $\beta$ -morpholinoethanesulfonic acid (MES) buffer ( $10^{-1}$  mol L<sup>-1</sup>, pH 6.8) containing the carbohydrate in a 1.25-fold excess of the desired concentration. Immediately before usage sodium cyanoborohydride solution (100 mg in 50 mL of water) was added (1:4 v/v) to the dilution series. Glass slides bearing amino- or aldehyde-derivatised glass surfaces (commercially available from *Genetix*) were rinsed with acetone and patted dry with tissues. Press-to-Seal silicon isolators (*Schleicher & Schuell*, no. 10485006) were affixed to the cleaned glass slide and pressure was applied to ensure the removal of air between glass slide and isolator. The prepared solutions were spotted onto the slide (4  $\mu$ L per well), which was then sealed with a microscope slide and placed in a humidity chamber at room temperature.

After 12–16 h, the slide was taken from the humidity chamber, the microscope slide was removed, and the spotting solutions were removed from the wells by suction. Subsequently, the wells were rinsed with SDS solution (0.2% in water, 2-5  $\mu$ L). The silicon isolator was removed, and the whole slide was subjected to ultrasonic agitation in SDS solution (0.2% in water) for 10 min, rinsed with distilled water, and dried with tissues.

#### **Protocol for the immobilisation of carbohydrates onto glass surface by amide-bond formation (variation of SP 1)**

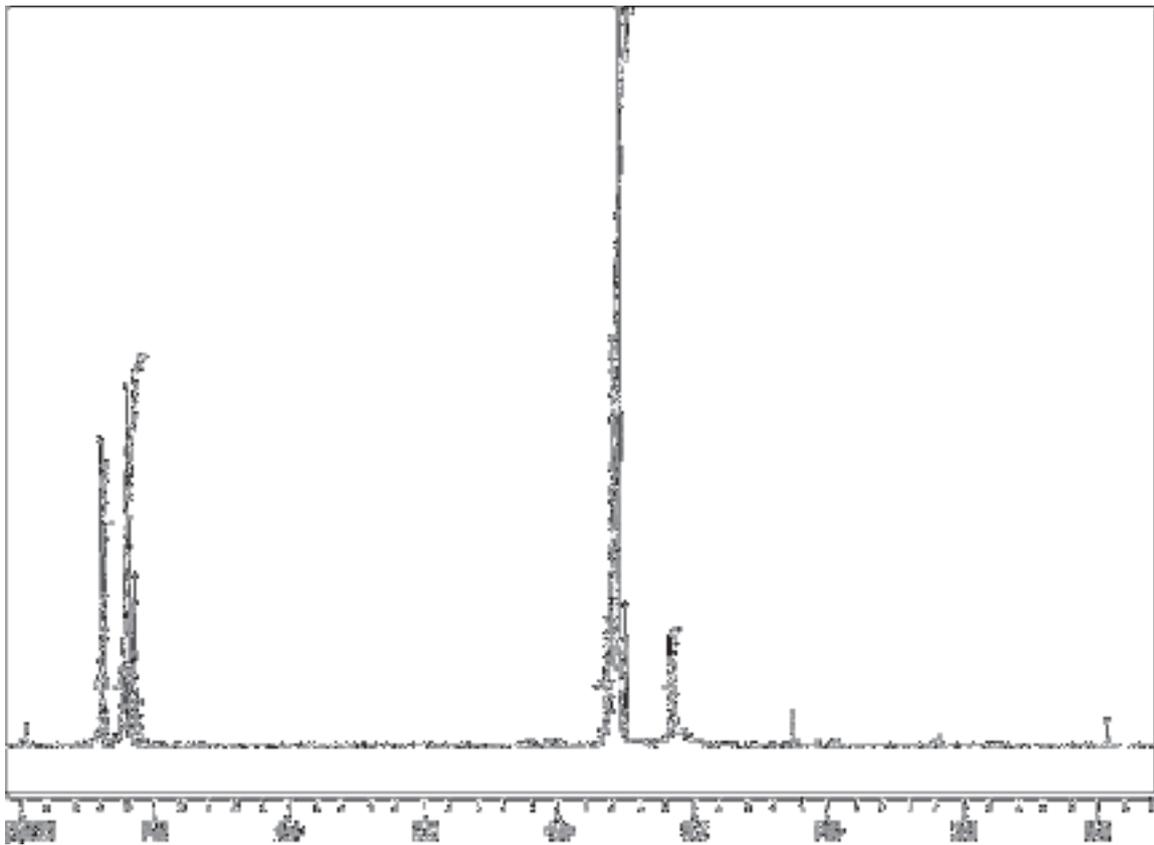
From stock solutions, three dilution series were prepared in DMF: A contained the carbohydrate compound (carboxylate-derivatised) in a 3-fold excess of the desired concentration, B contained PyBOP (in a 3.3-fold excess), and C contained Hünig's Base (in 9-fold excess), respectively. Immediately before usage solutions A–C were mixed for each desired concentration (1:1:1 v/v). Glass slides bearing amino-derivatised glass surfaces (commercially available from *Genetix*) were rinsed with acetone and patted dry with tissues. Press-to-Seal silicon isolators (*Schleicher & Schuell*, no. 10485006) were affixed to the cleaned glass slide and pressure was applied to ensure the removal of air between glass slide and isolator. The prepared solutions were spotted onto the slide (4  $\mu$ L per well), which was then sealed with a microscope slide and placed in a sealed environment at room temperature. After 12-16 h, the microscope slide was removed and the spotting solutions were removed from the wells by suction. Subsequently the wells were rinsed with SDS solution (0.2% in water, 2-5  $\mu$ L). The silicon isolator was removed, and the

whole slide was subjected to ultrasonic agitation in SDS solution (0.2% in water) for 10 min, rinsed with distilled water, and dried with tissues.

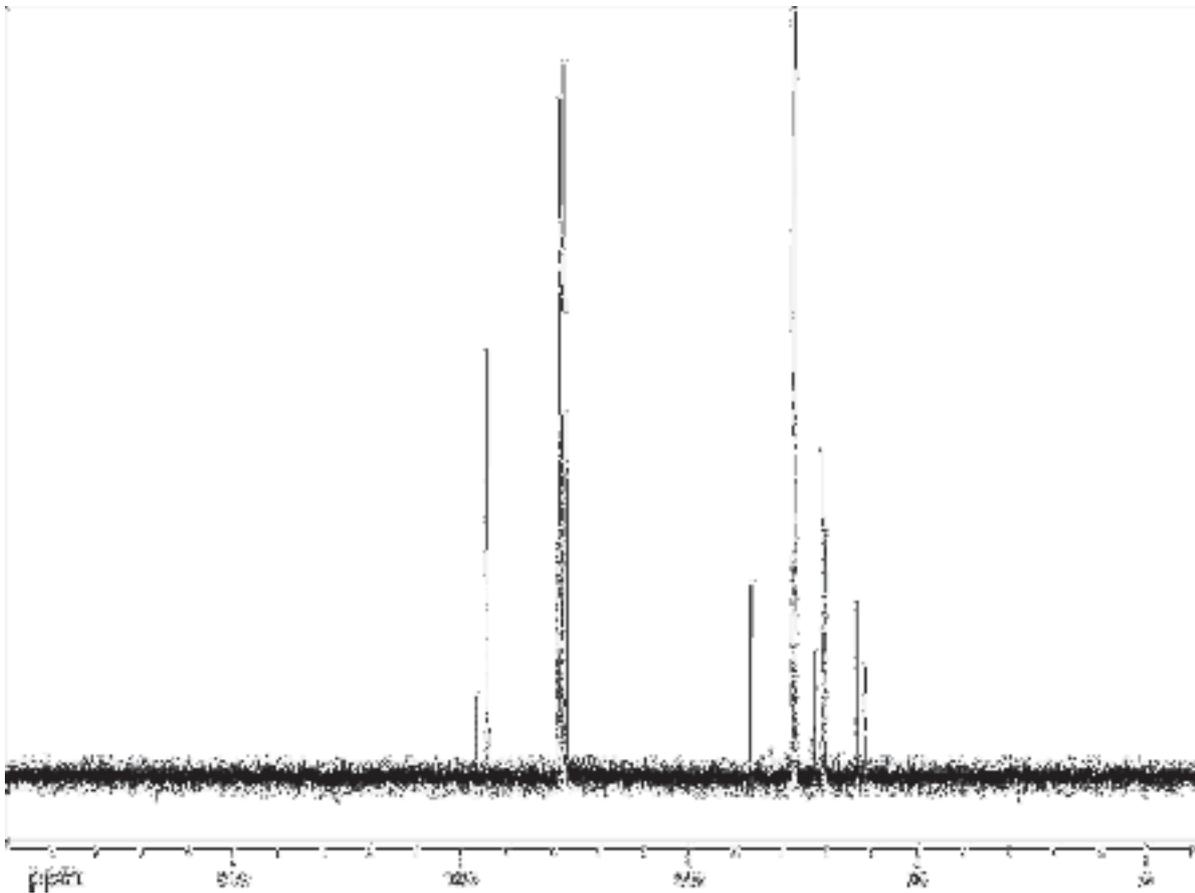
### **Protocol for hybridisation experiments with fluorescence-labelled lectins (SP 2)**

For hybridisation experiments, rhodamine-labelled lectins were purchased from Vector Laboratories. The hybridisation solutions were prepared by diluting the stock solutions to a concentration of  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  with PBS buffer (pH 7.5;  $1 \text{ mol L}^{-1} \text{ CaCl}_2$ ,  $1 \text{ mol L}^{-1} \text{ MnCl}_2$ , 0.1% Tween 20). Prepared glass slides were fully submerged in the lectin solution and gently shaken for 1 h. After hybridisation, the slide was washed in PBS buffer containing no lectin with gentle shaking for 10–30 min, rinsed with distilled water, and patted dry with tissues.

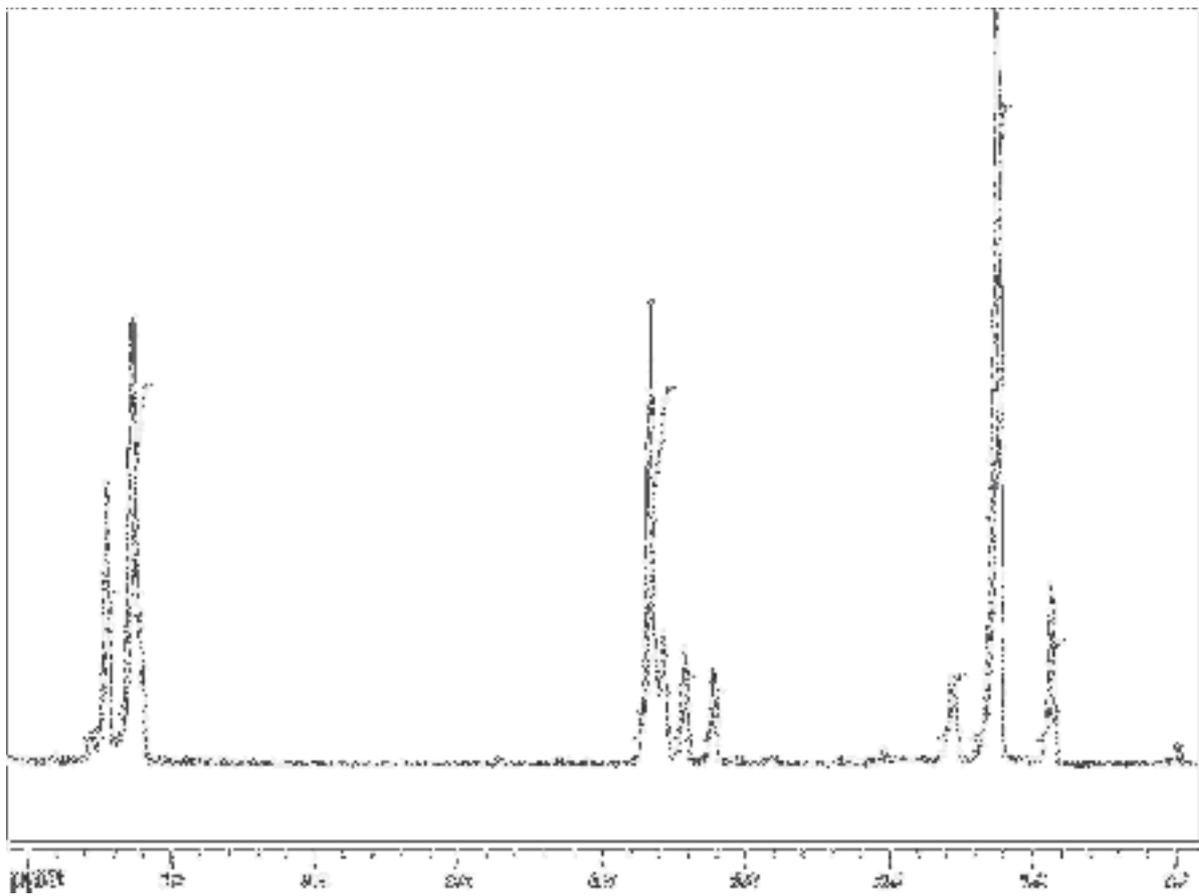
## **7      Abbildung der Spektren**



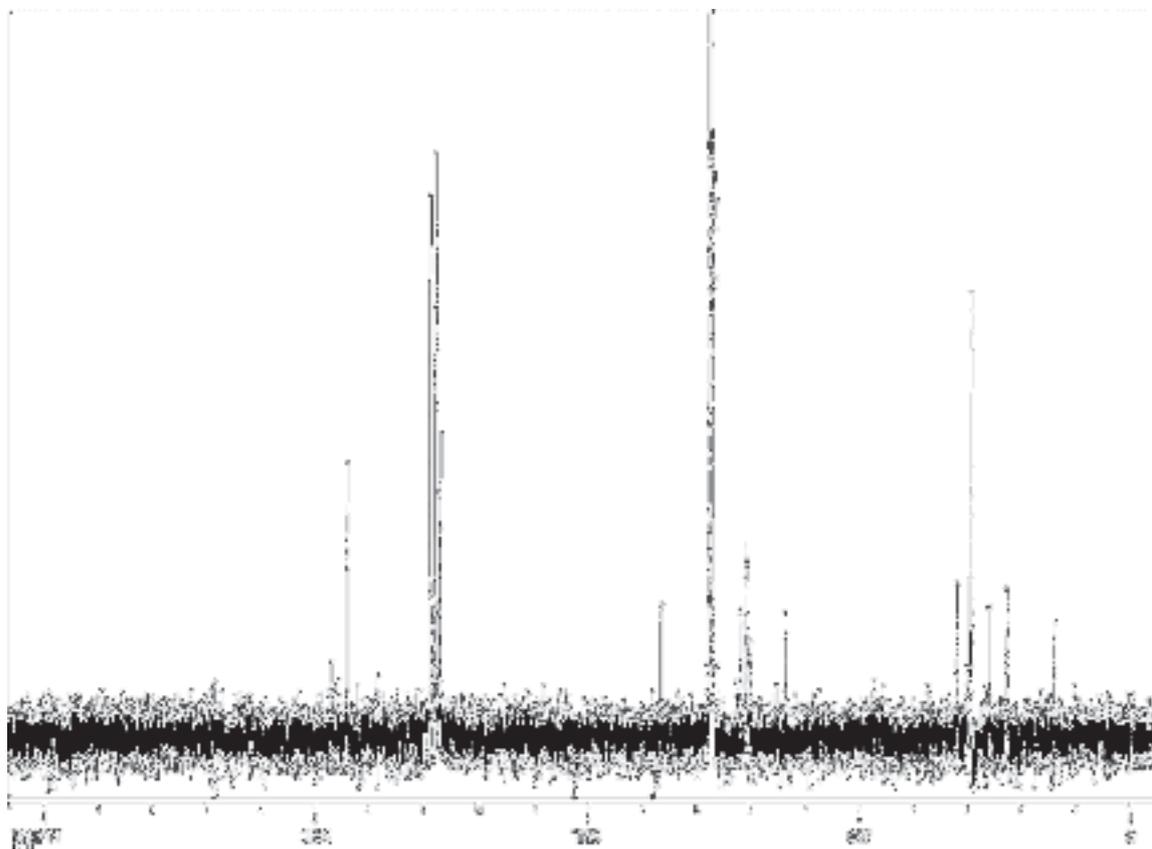
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **4** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



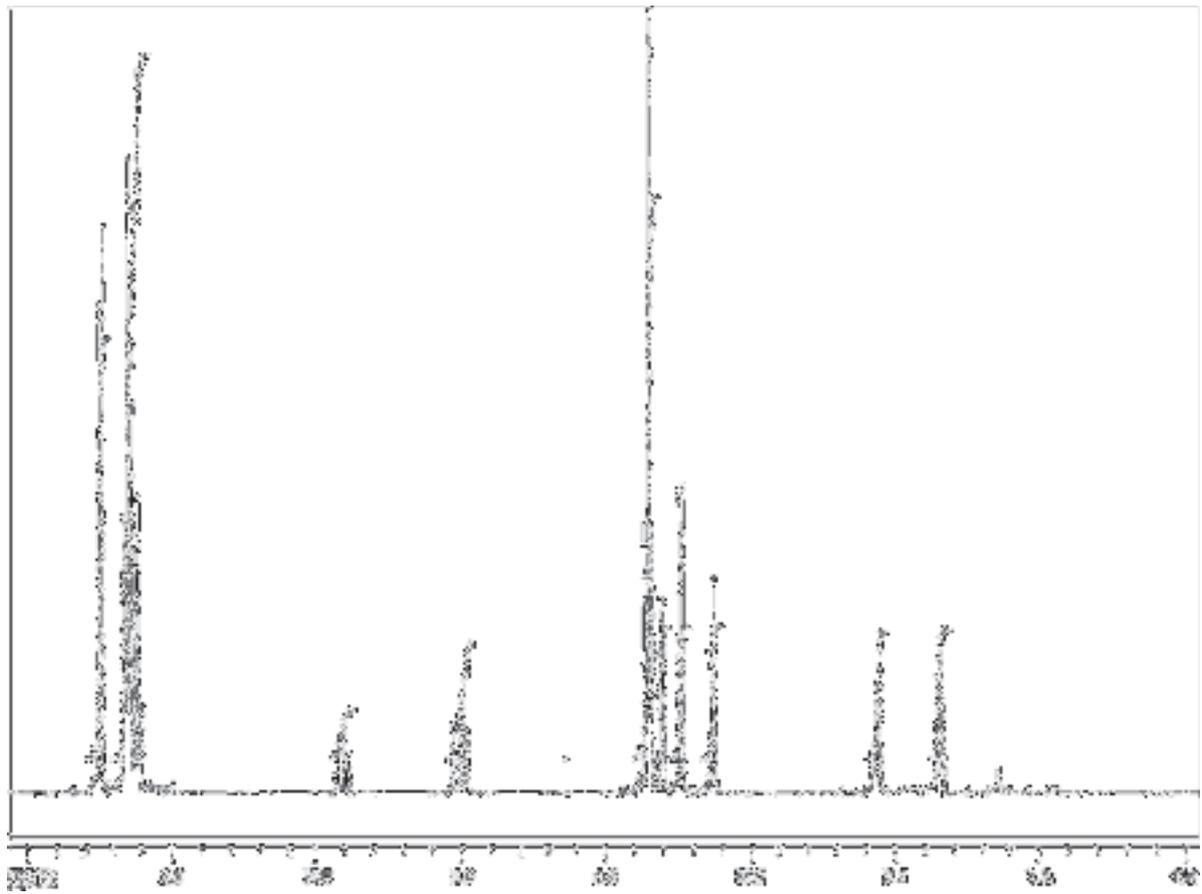
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **4** ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)



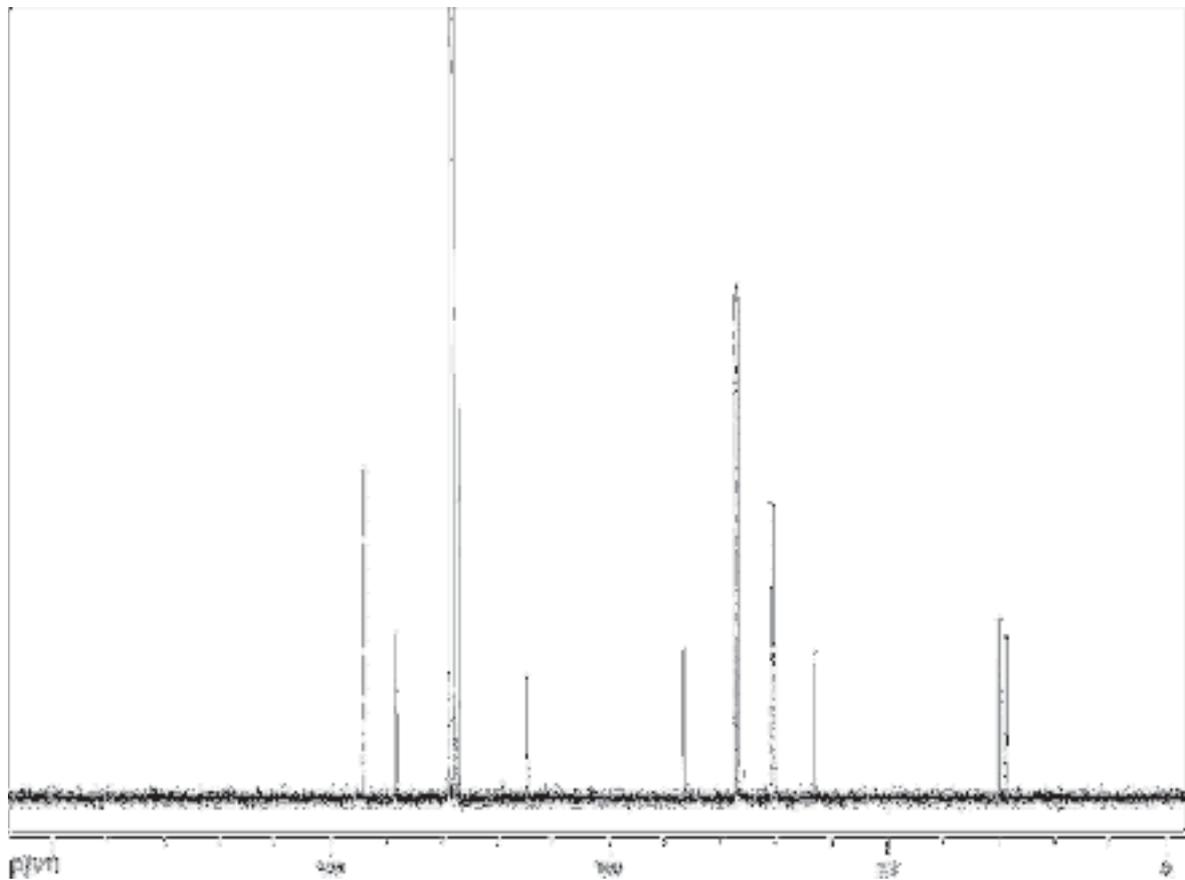
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **12** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



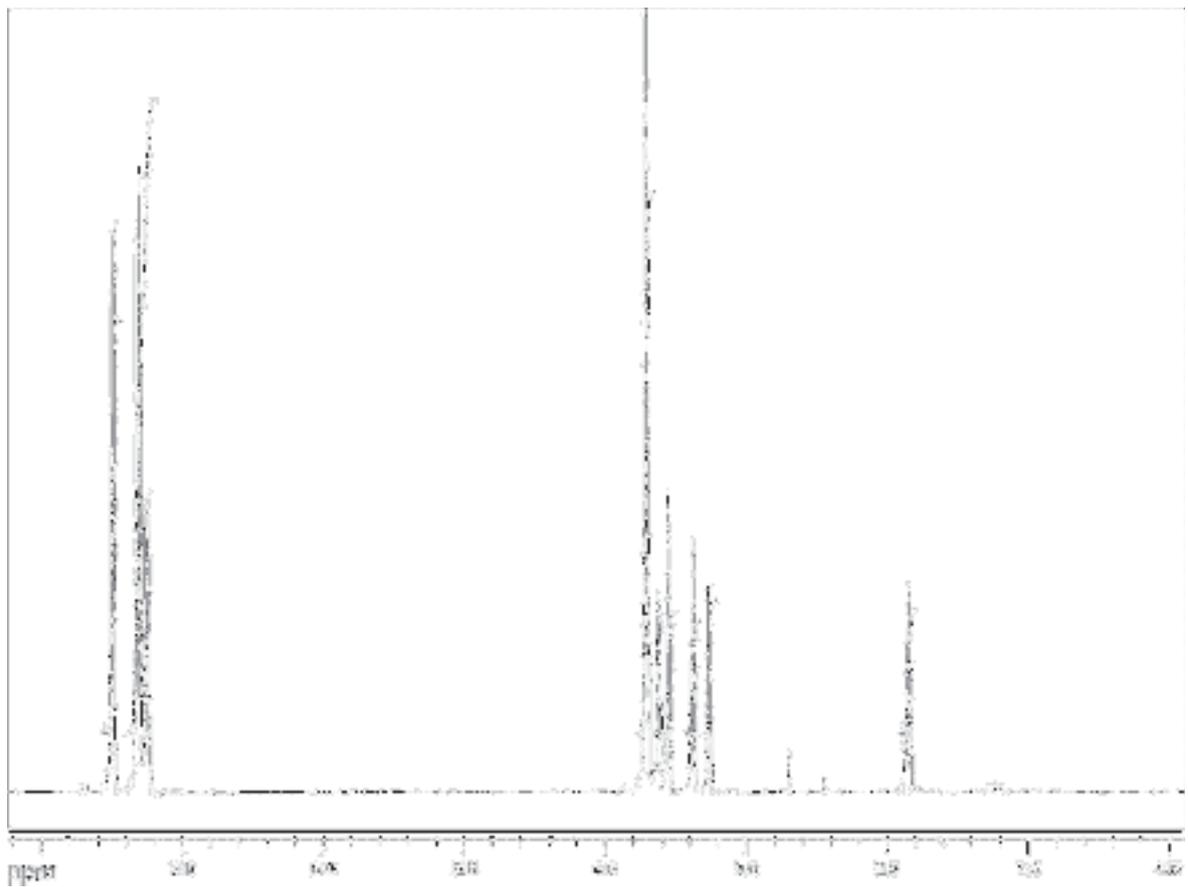
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **12** ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)



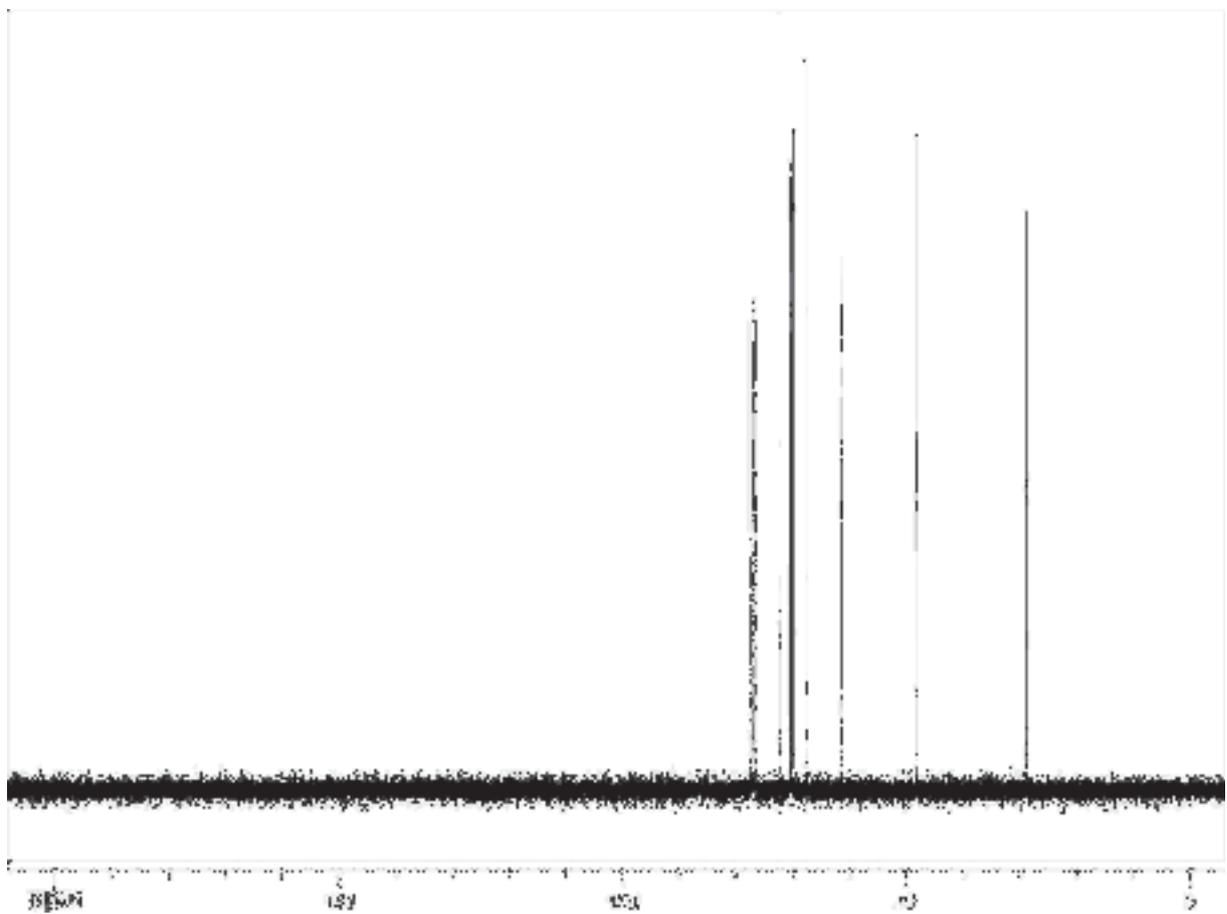
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **14** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



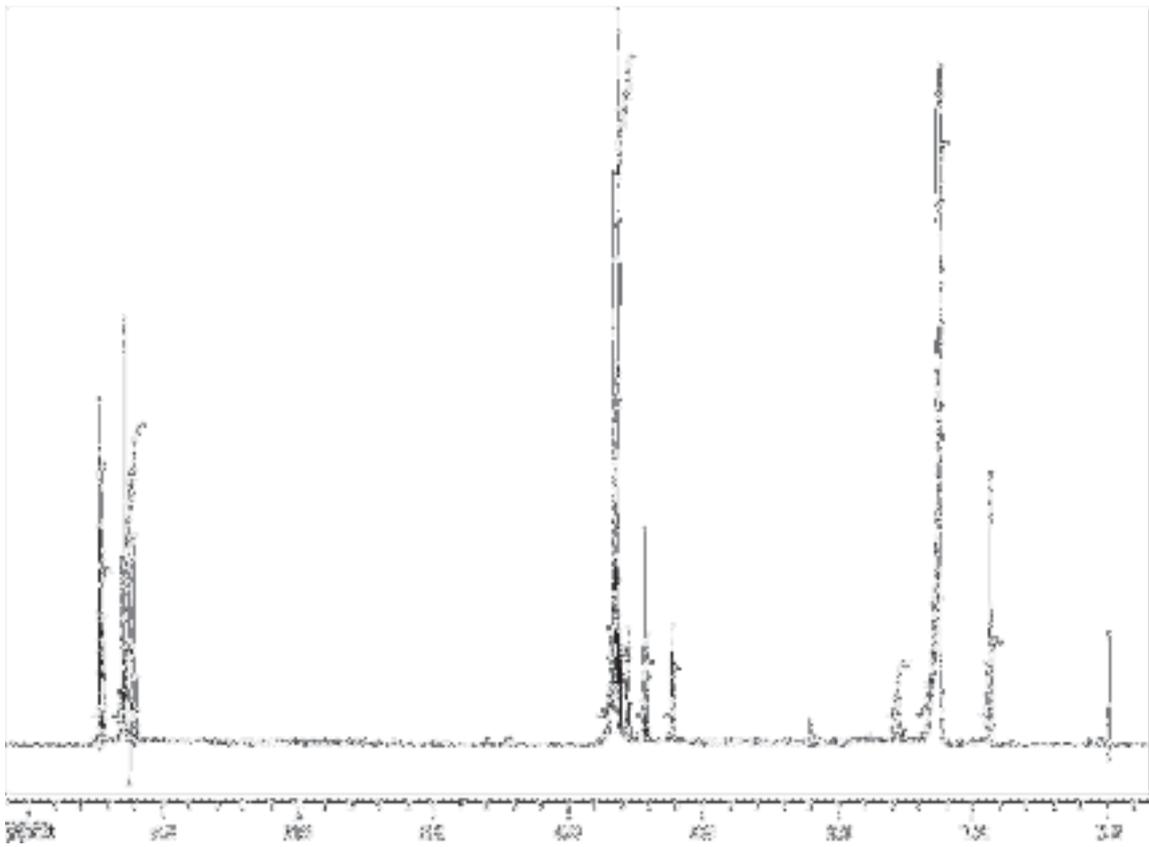
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **14** ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)



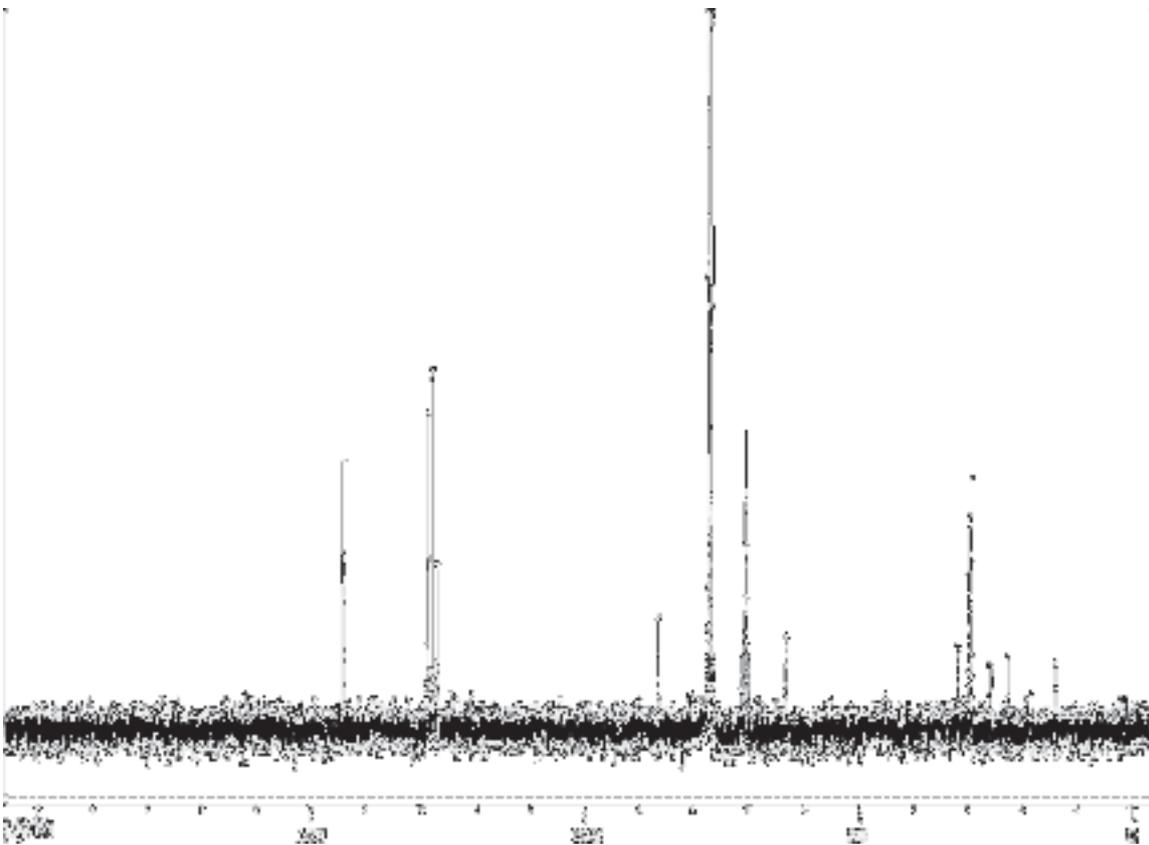
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **15** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



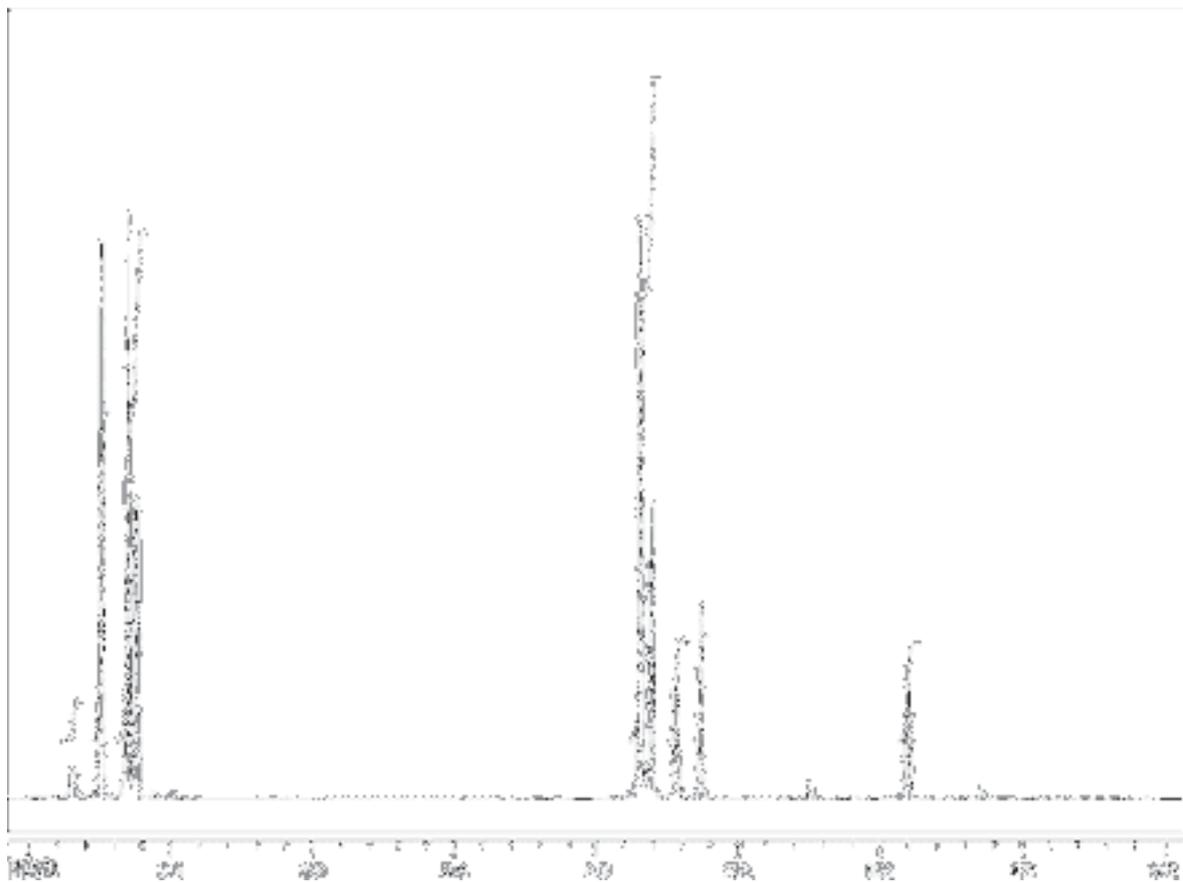
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **15** ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)



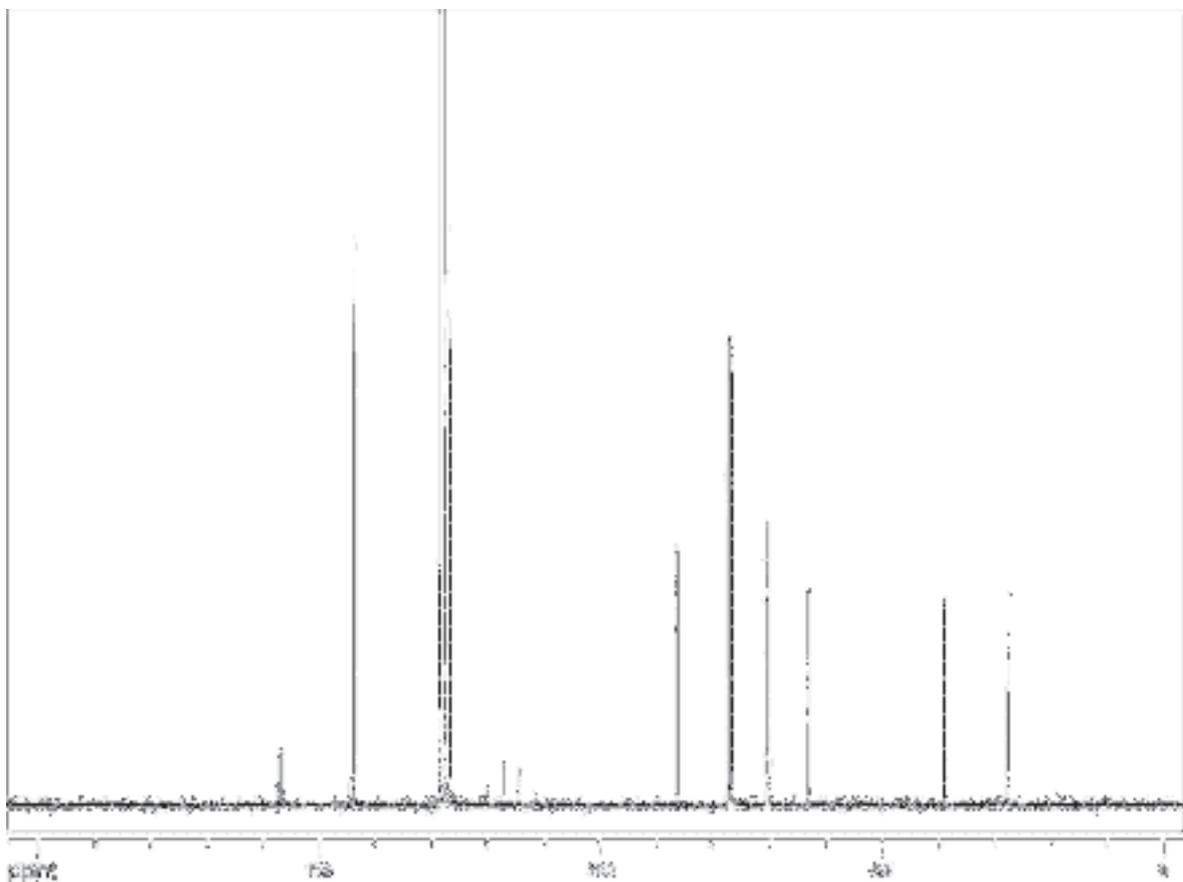
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **16** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



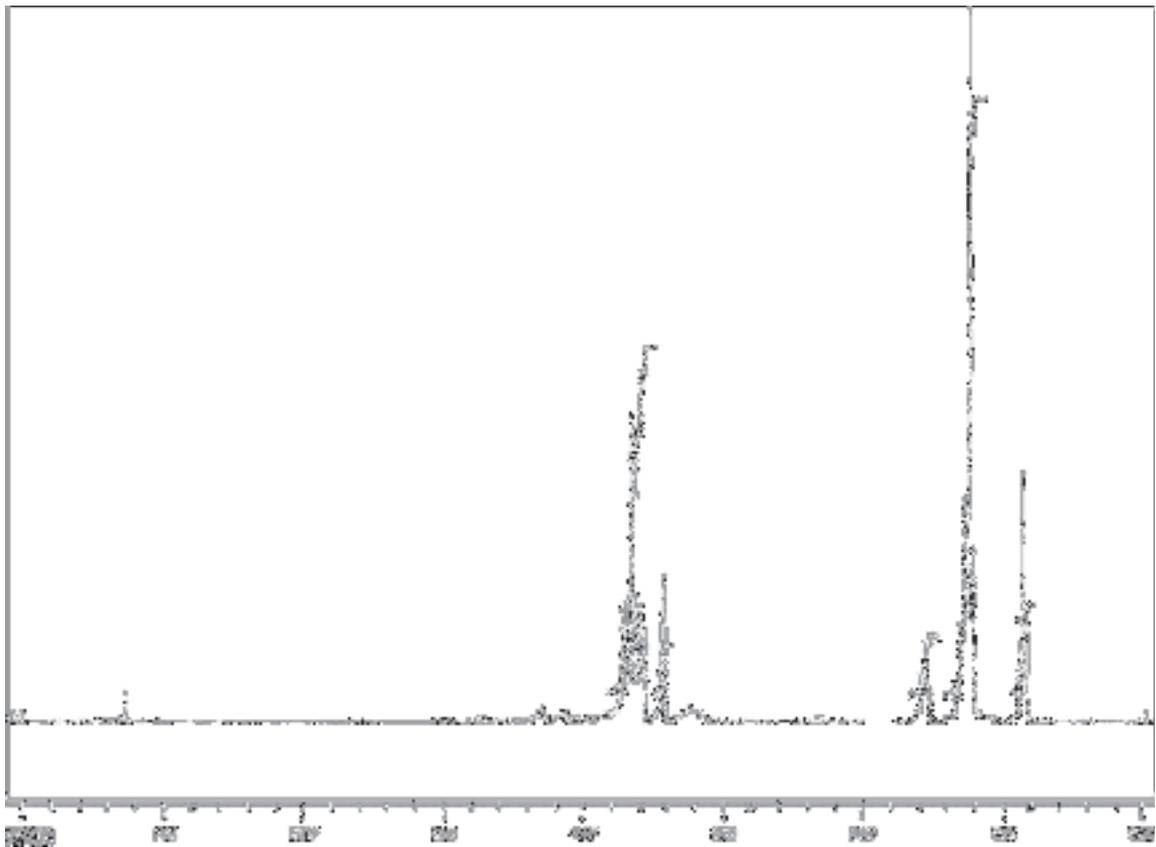
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **16** ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)



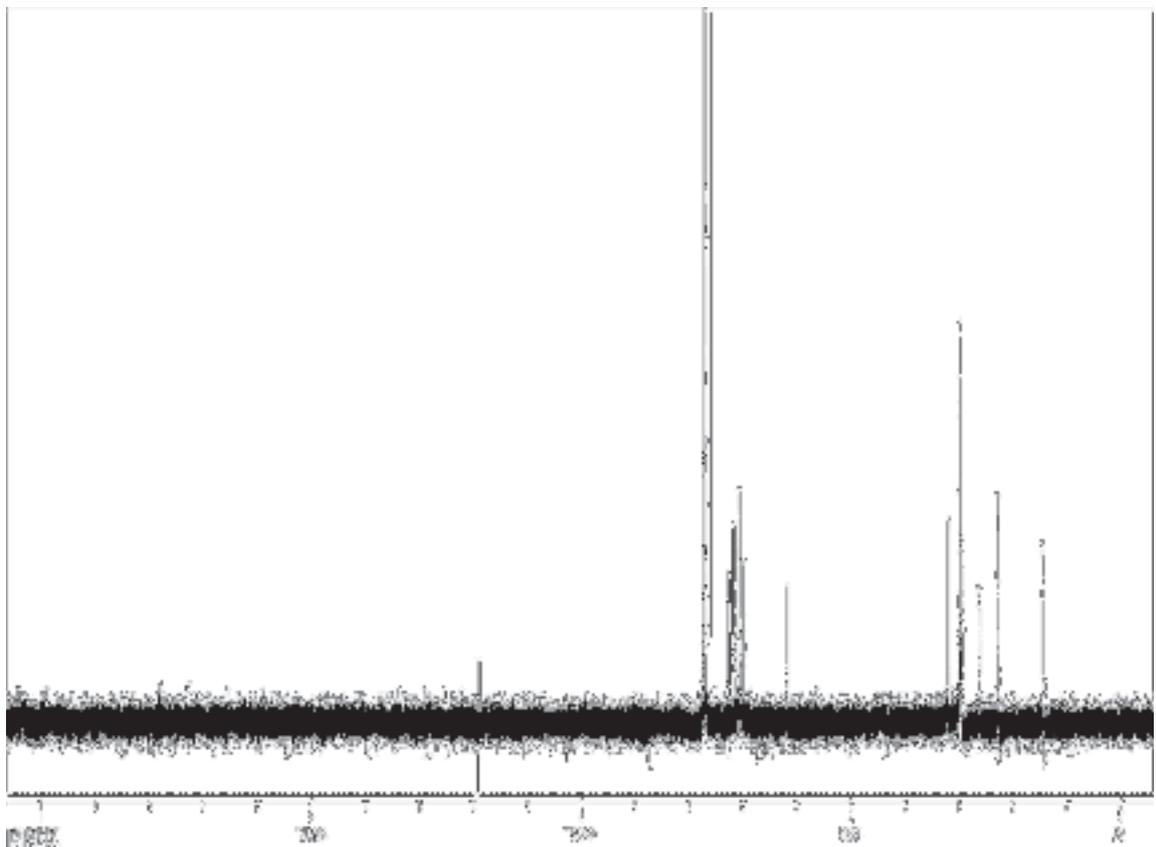
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **18** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



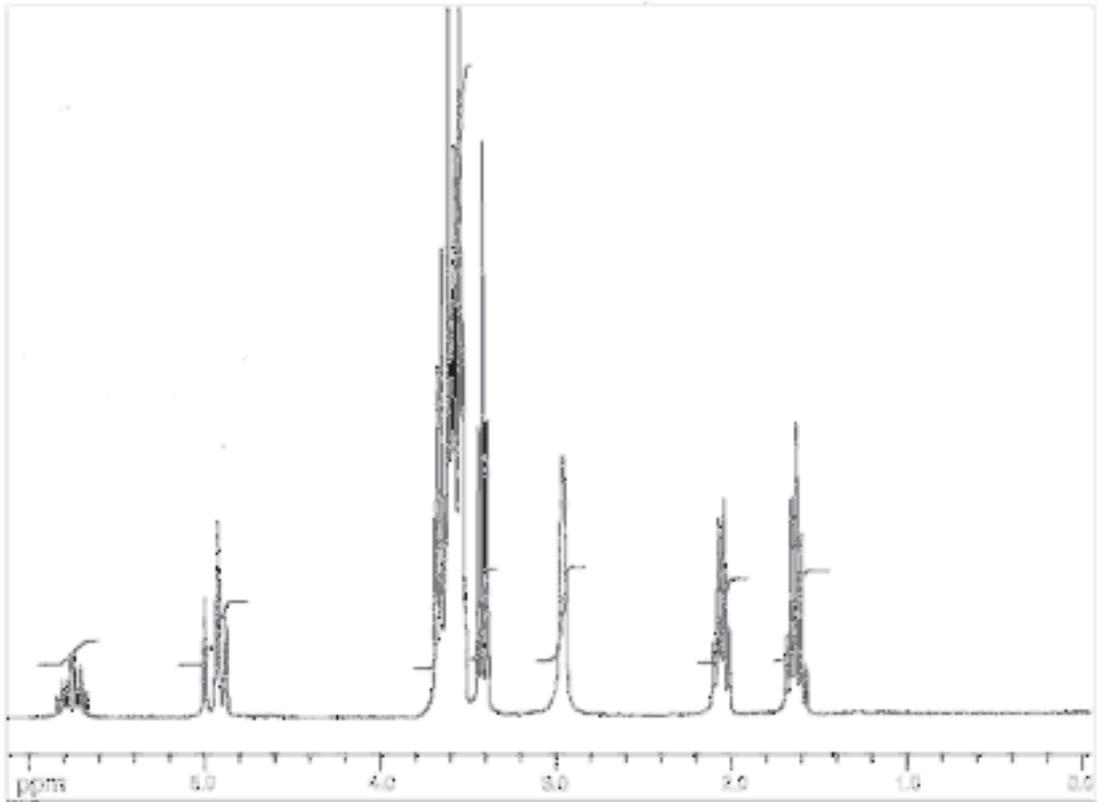
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **18** ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)



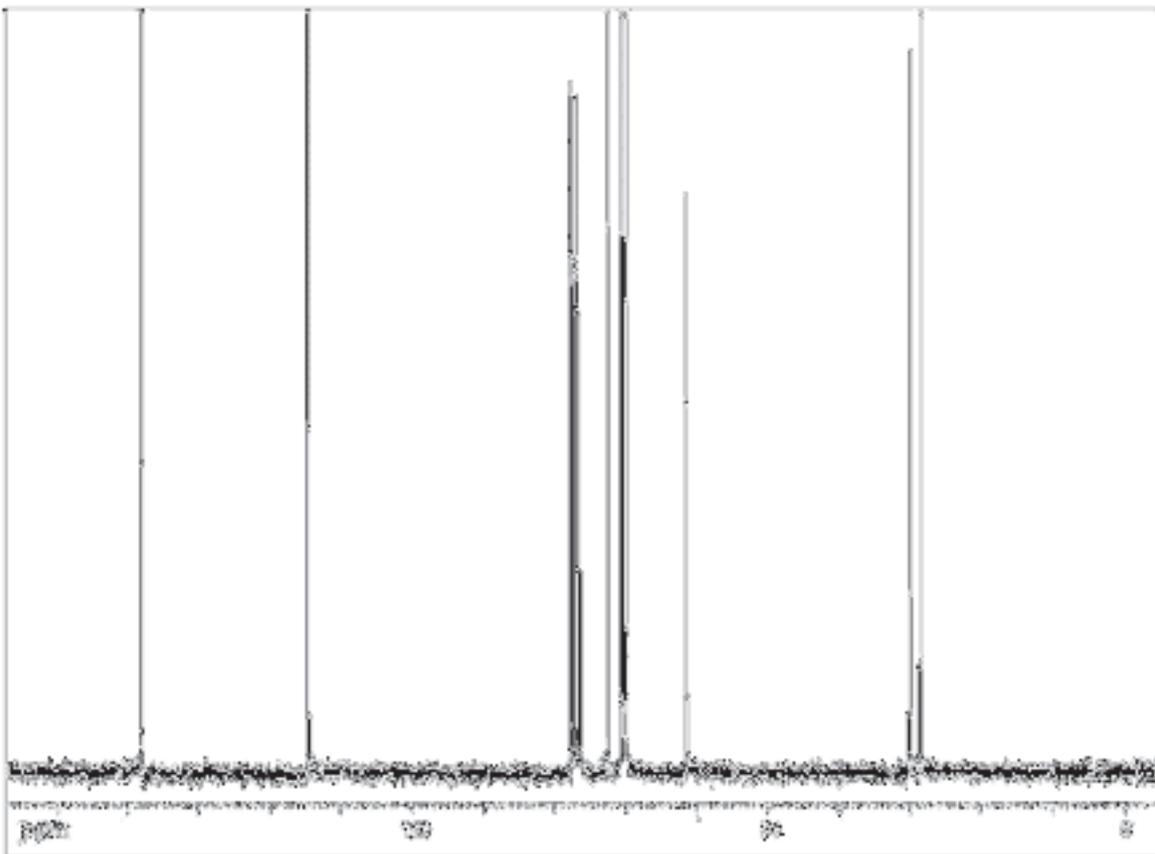
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **19** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



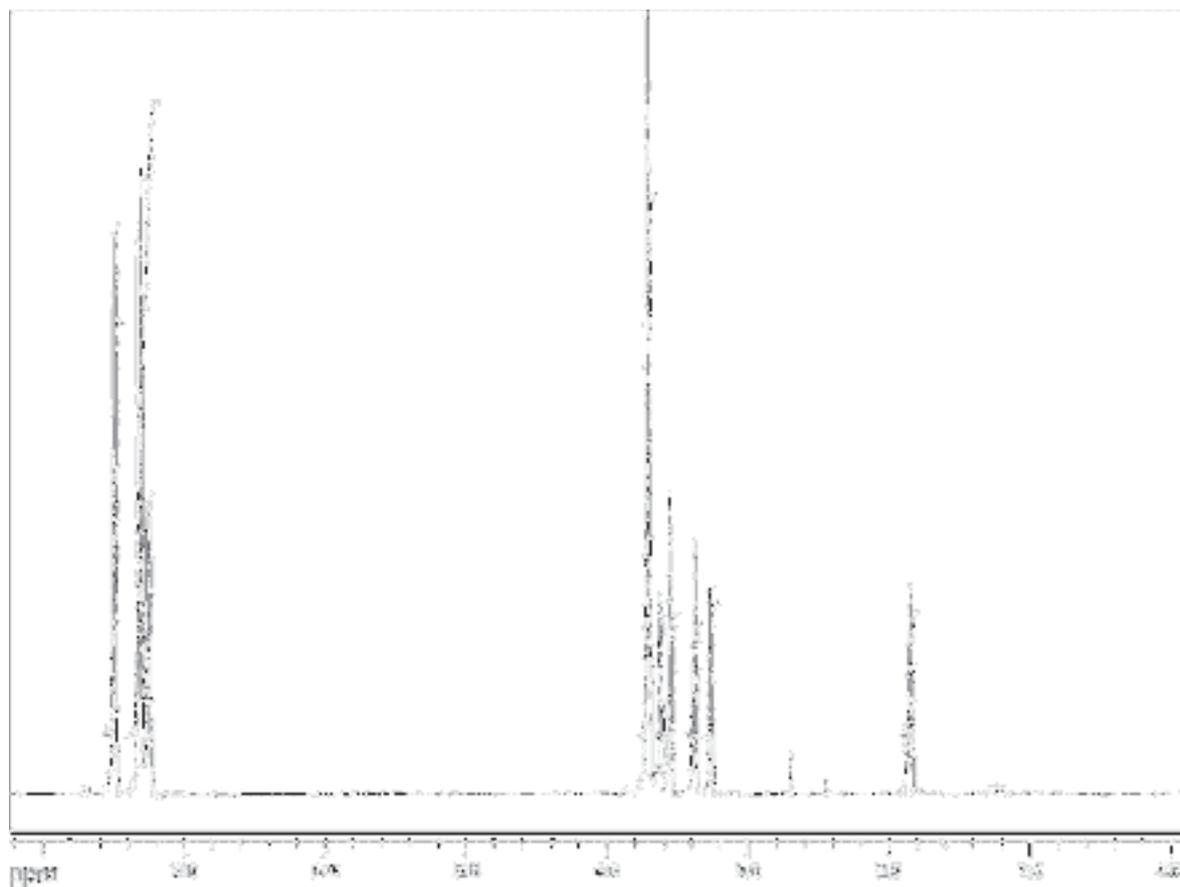
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **19** ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)



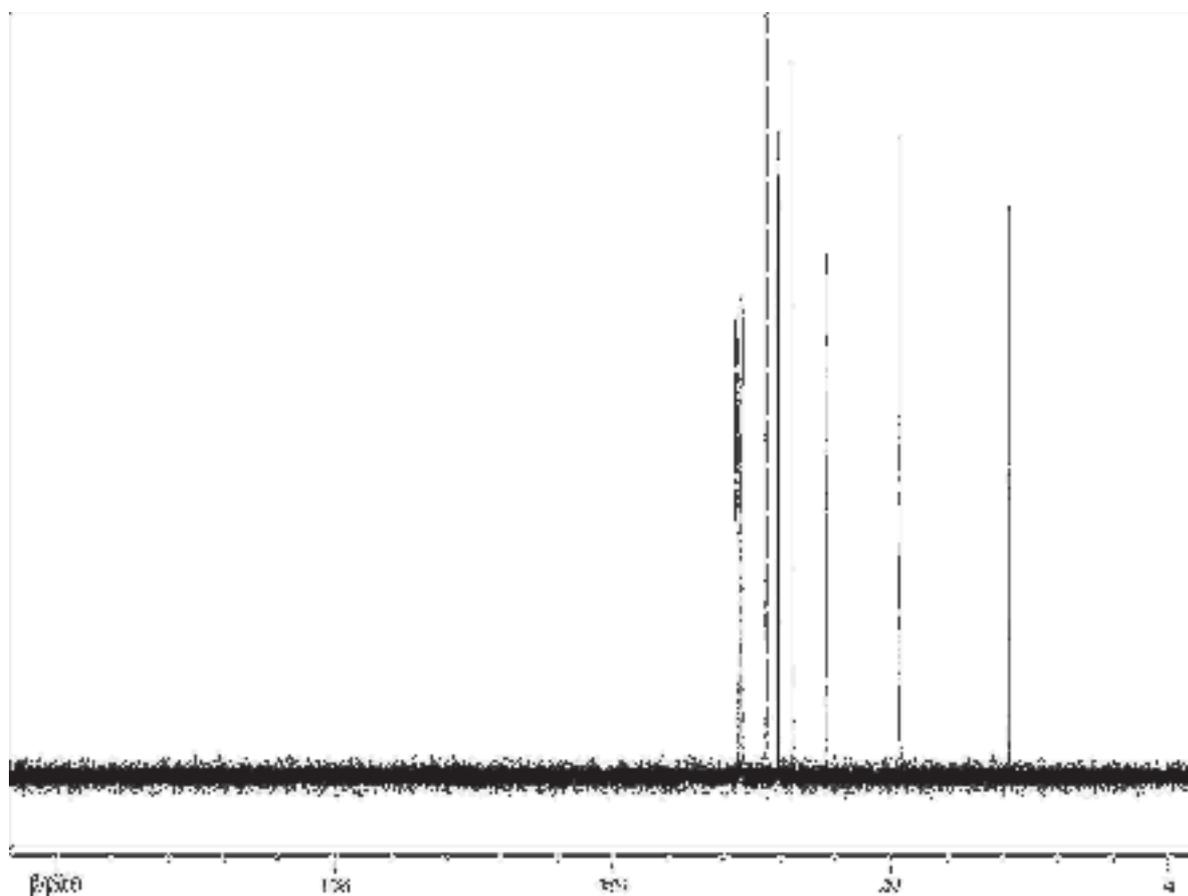
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **20** ( $\text{CDCl}_3$ , 250 MHz)



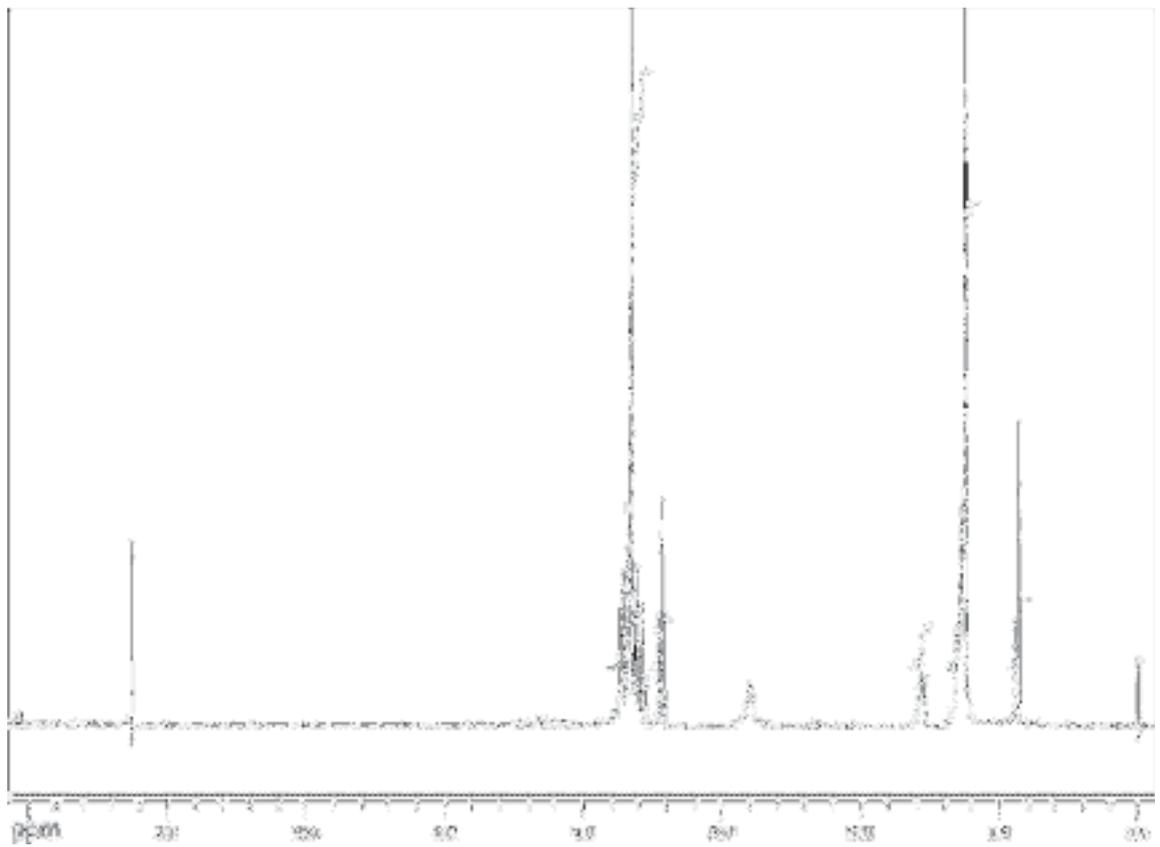
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **20** ( $\text{CDCl}_3$ , 63 MHz)



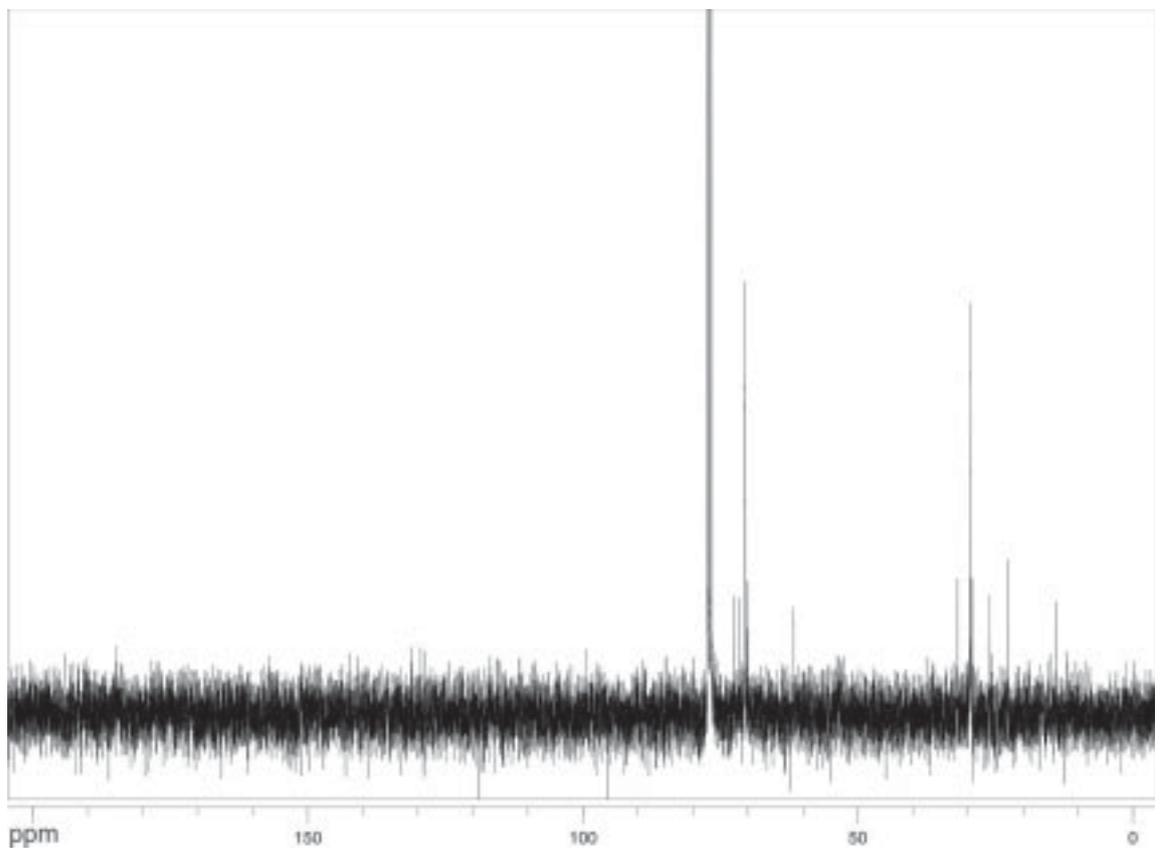
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **21** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



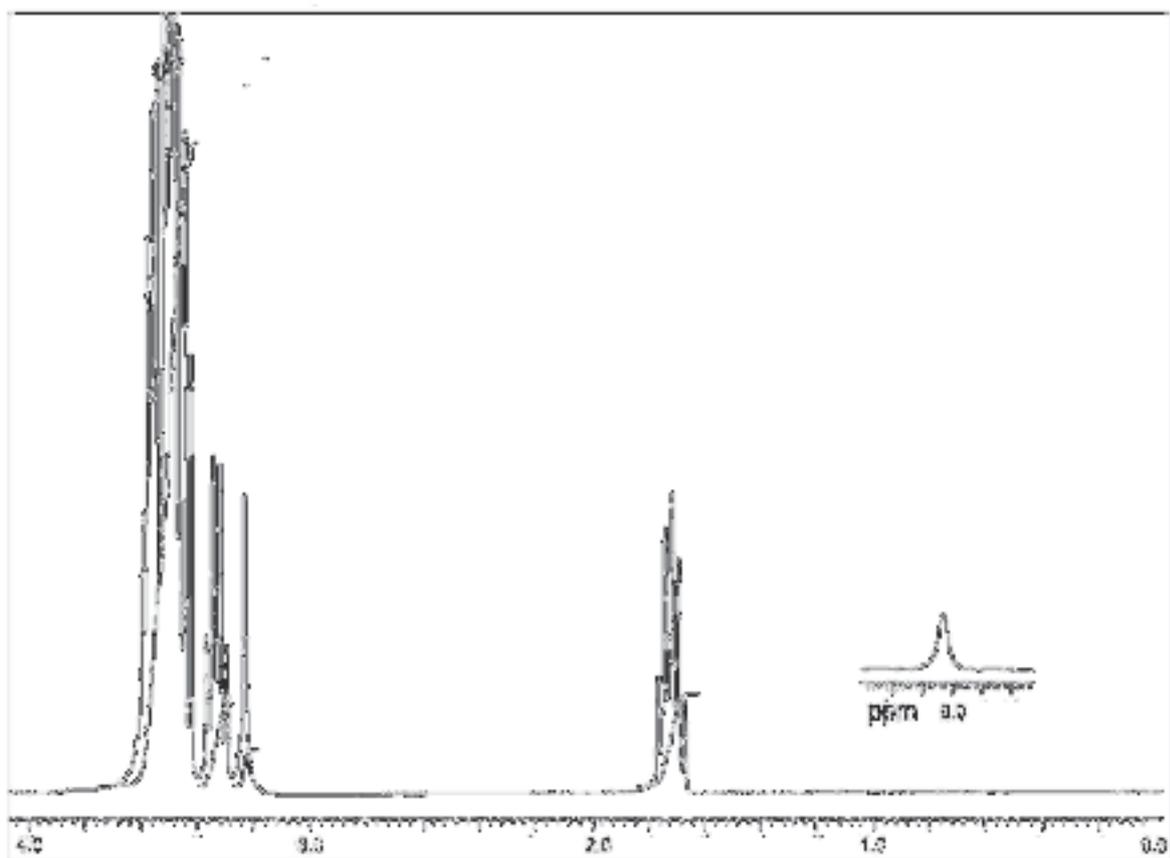
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **21** ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)



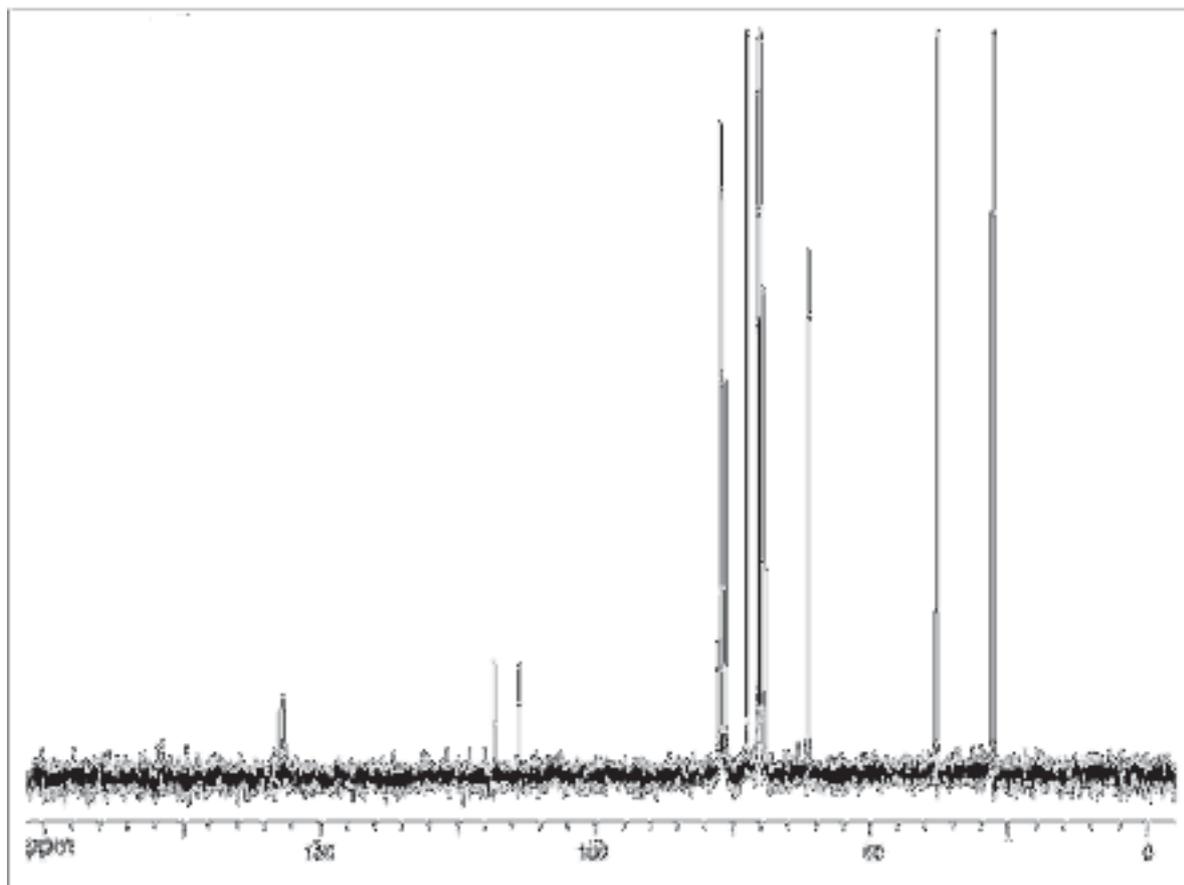
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **22** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



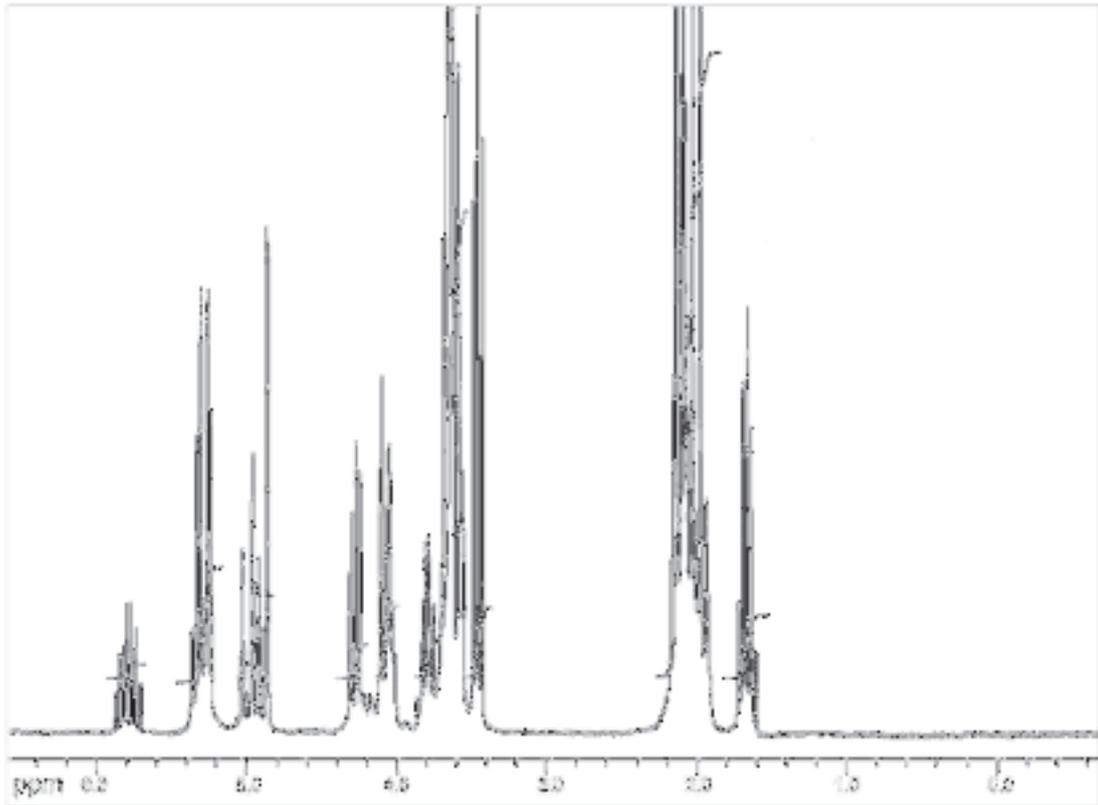
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **22** ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)



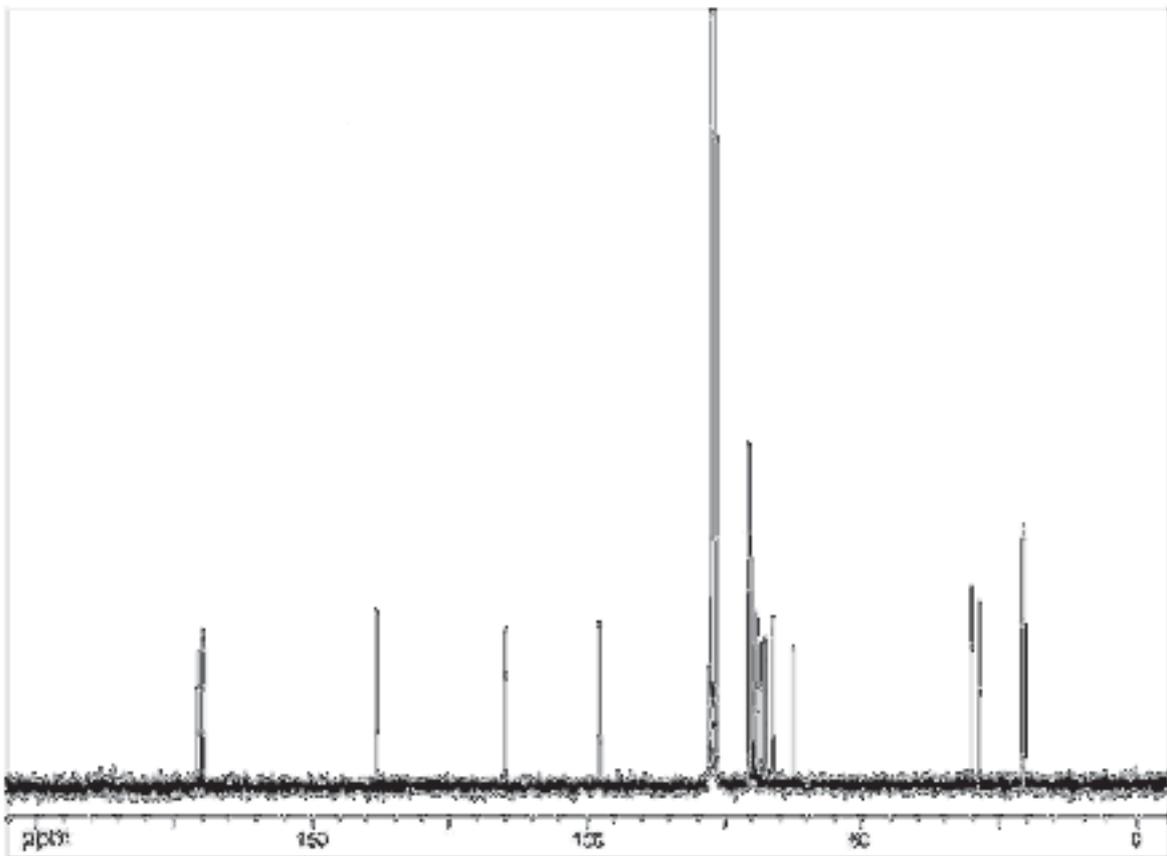
$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Verbindung **24** ( $\text{CDCl}_3$ , 250 MHz)



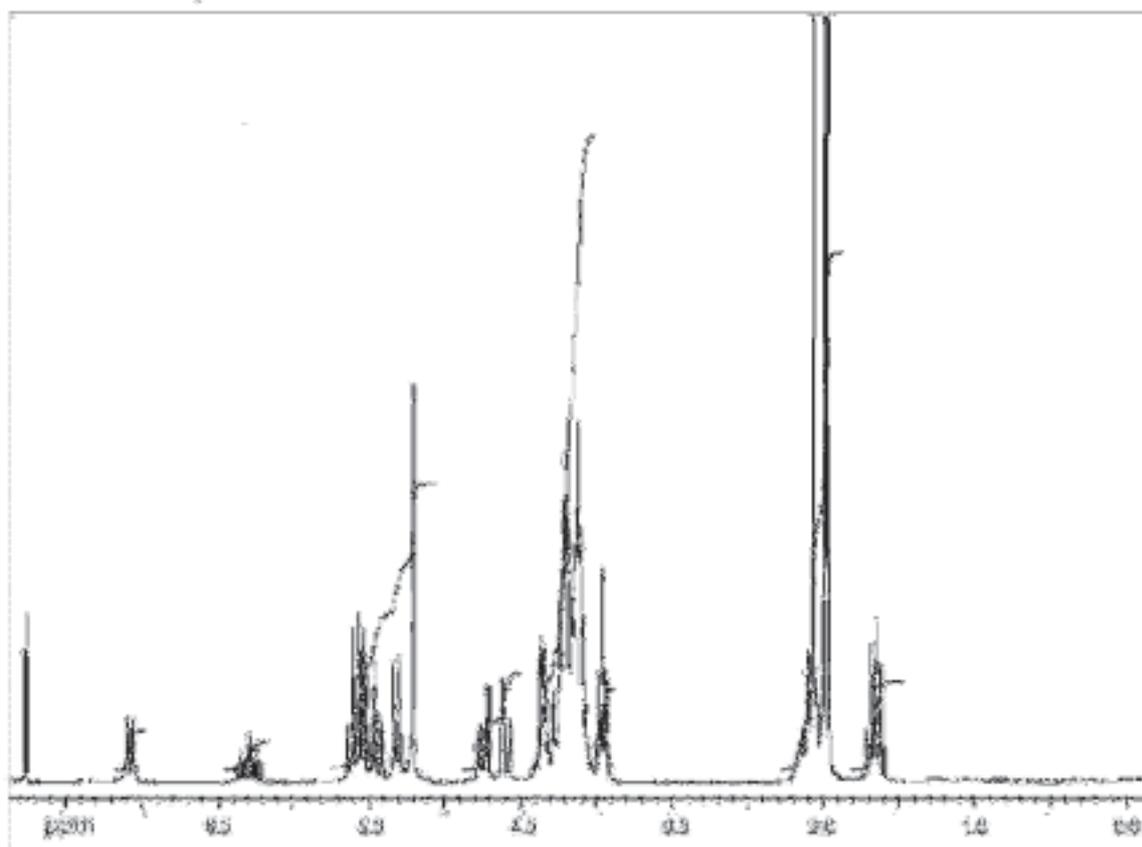
$^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von Verbindung **24** ( $\text{CDCl}_3$ , 63 MHz)



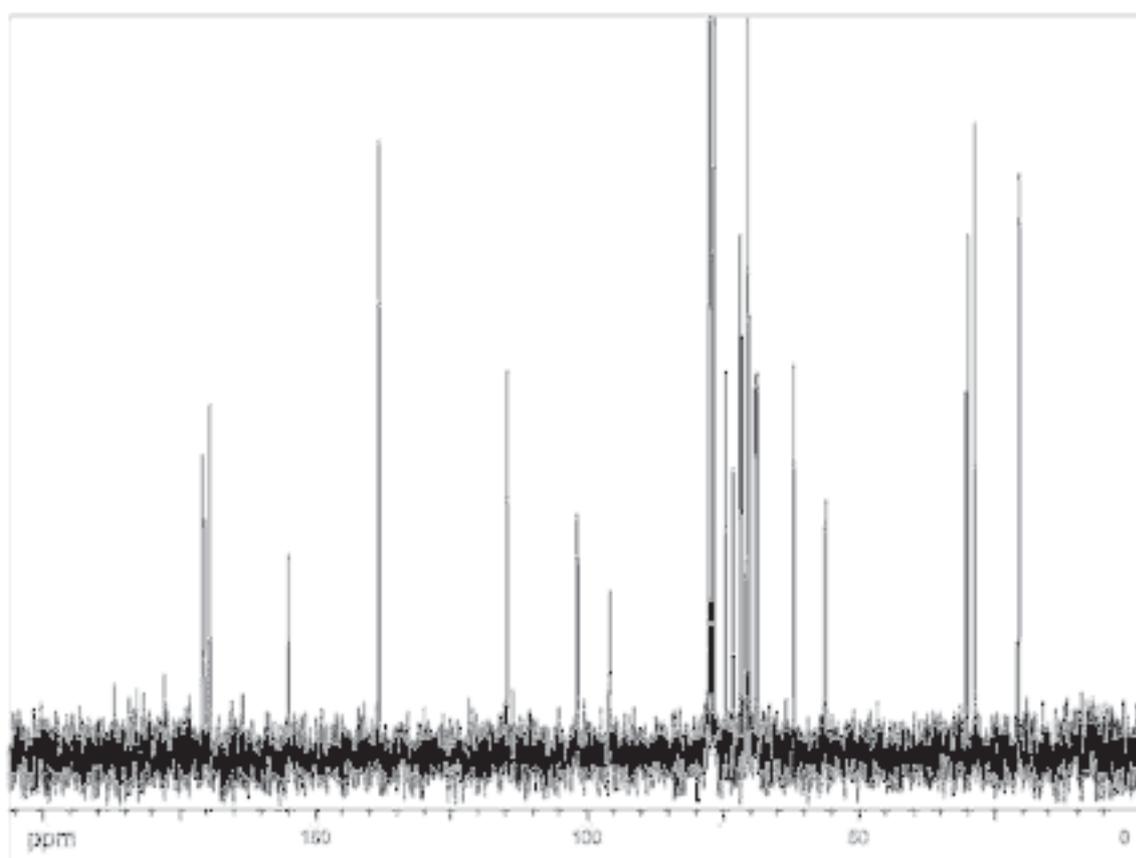
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **55** ( $\text{CDCl}_3$ , 250 MHz)



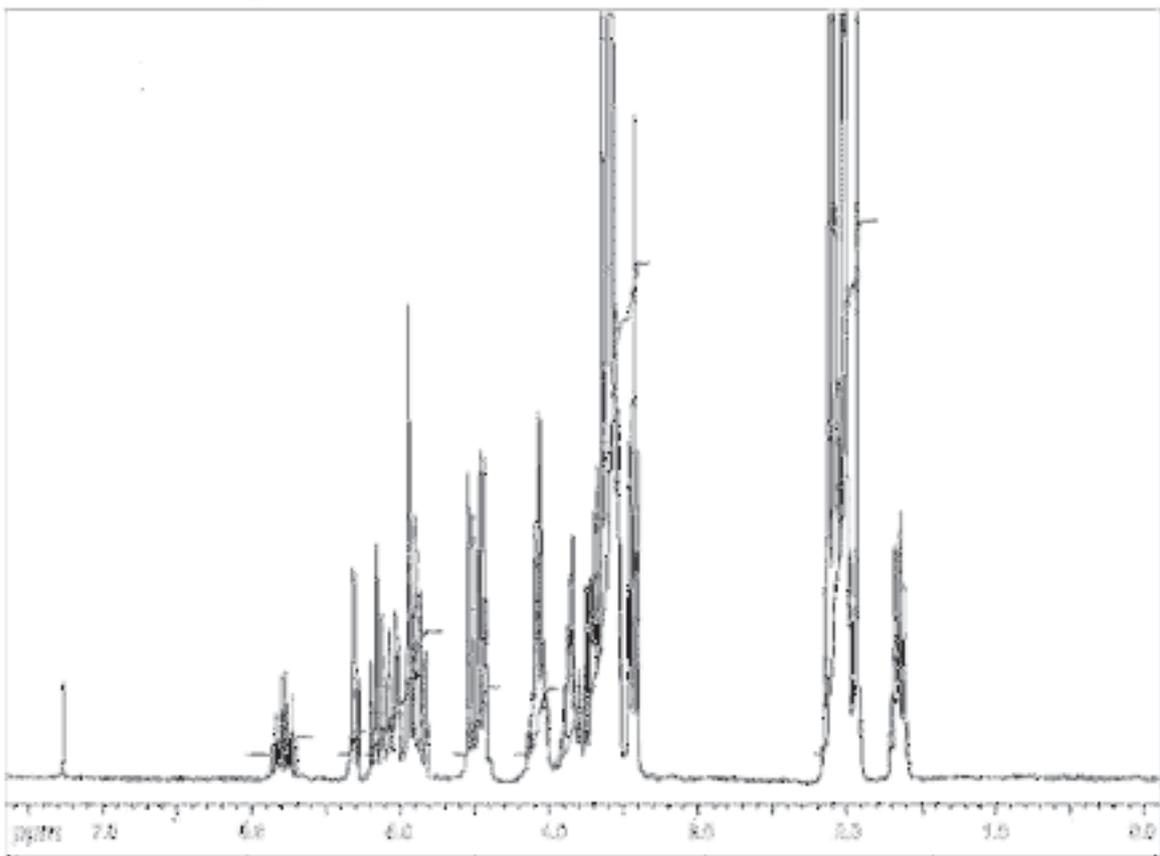
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **55** ( $\text{CDCl}_3$ , 63 MHz)



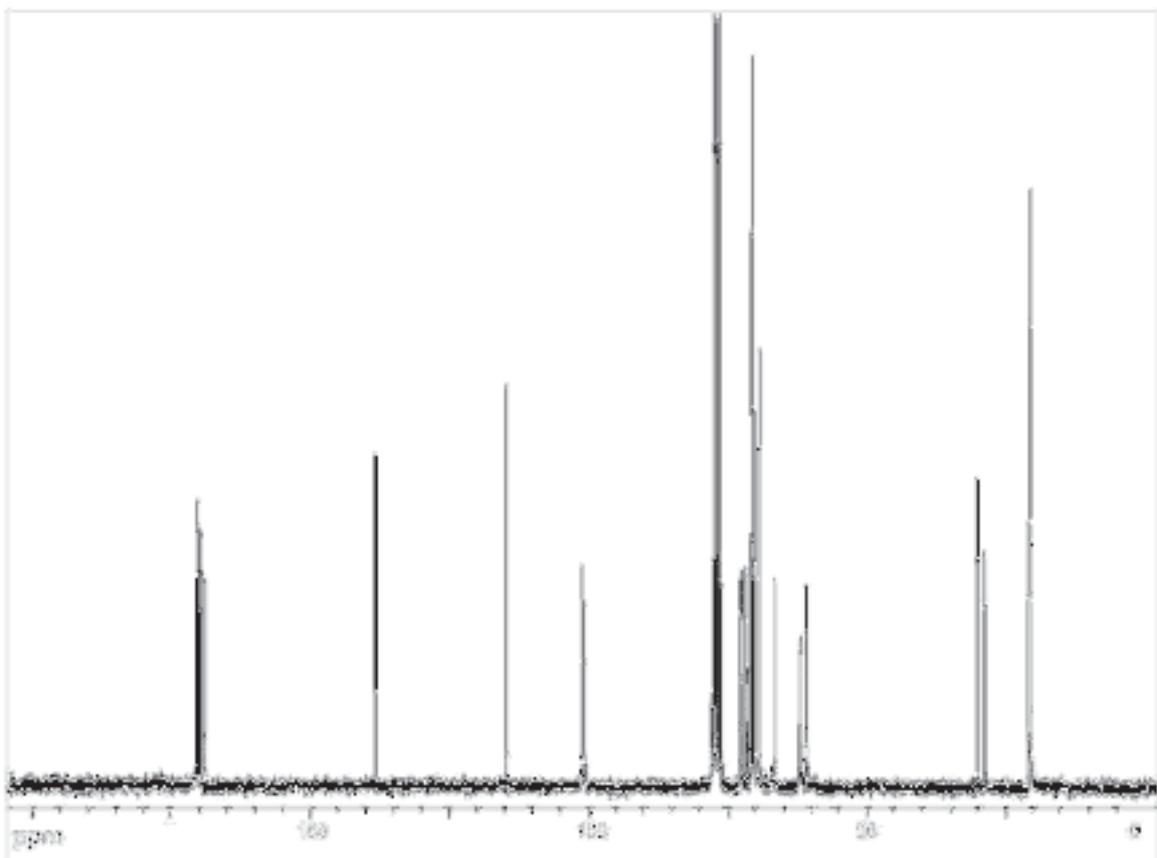
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **56** ( $\text{CDCl}_3$ , 250 MHz)



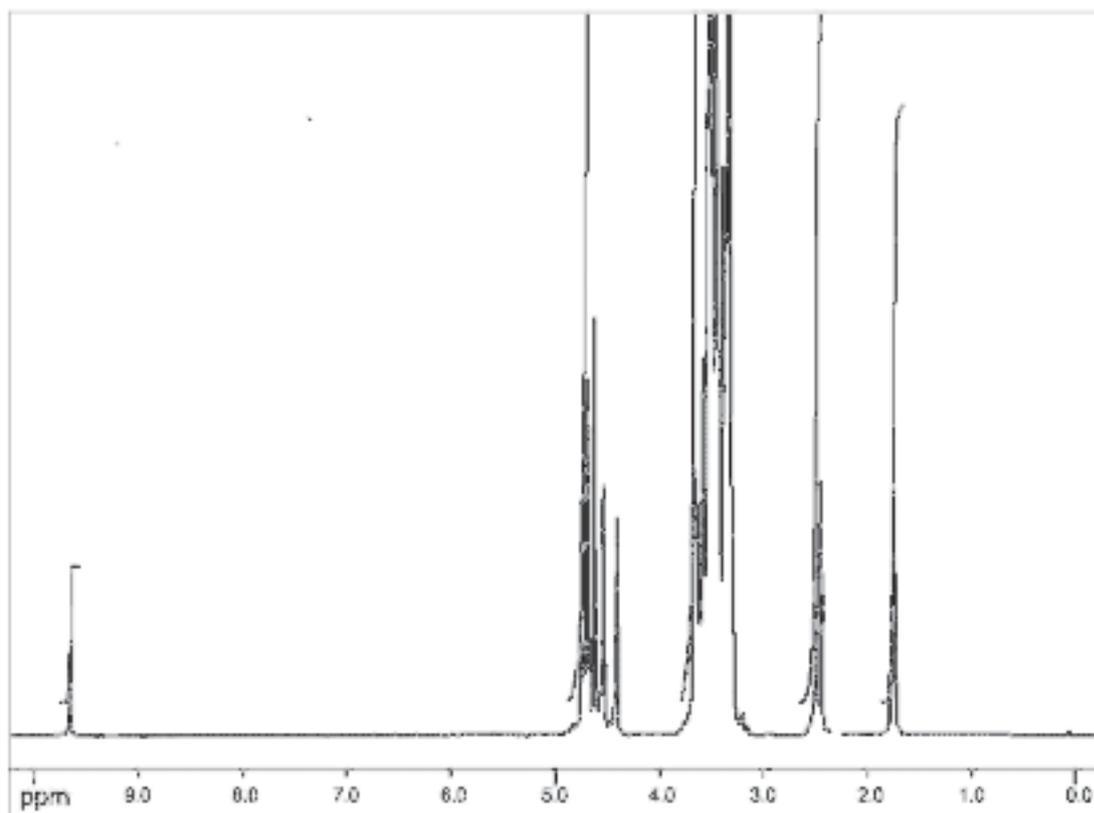
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **56** ( $\text{CDCl}_3$ , 63 MHz)



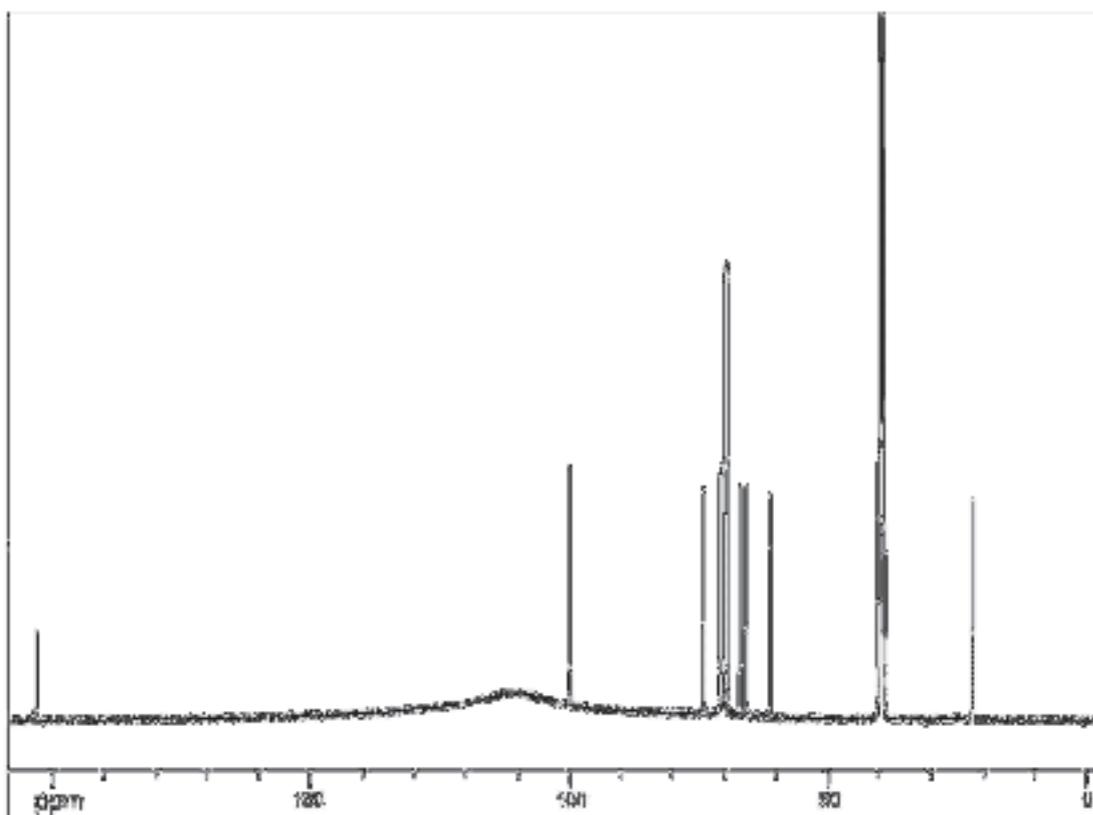
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **57** ( $\text{CDCl}_3$ , 250 MHz)



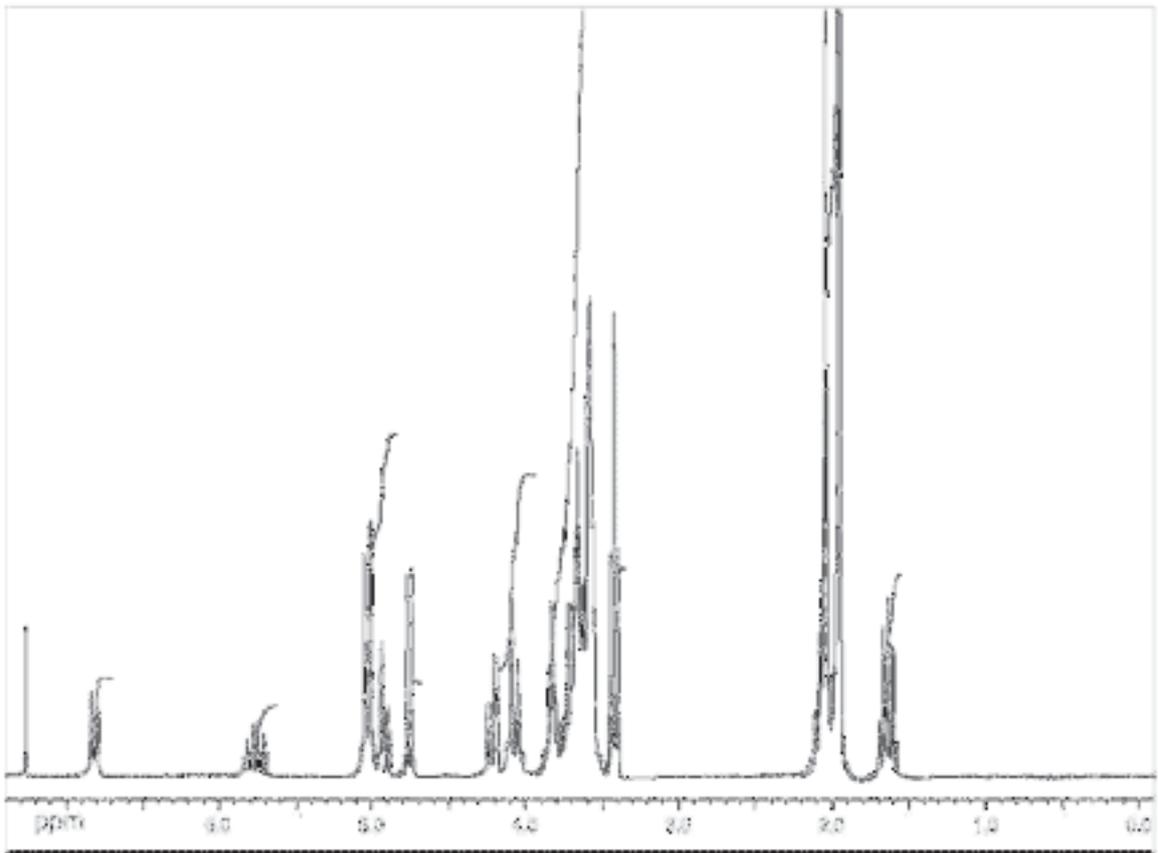
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **57** ( $\text{CDCl}_3$ , 63 MHz)



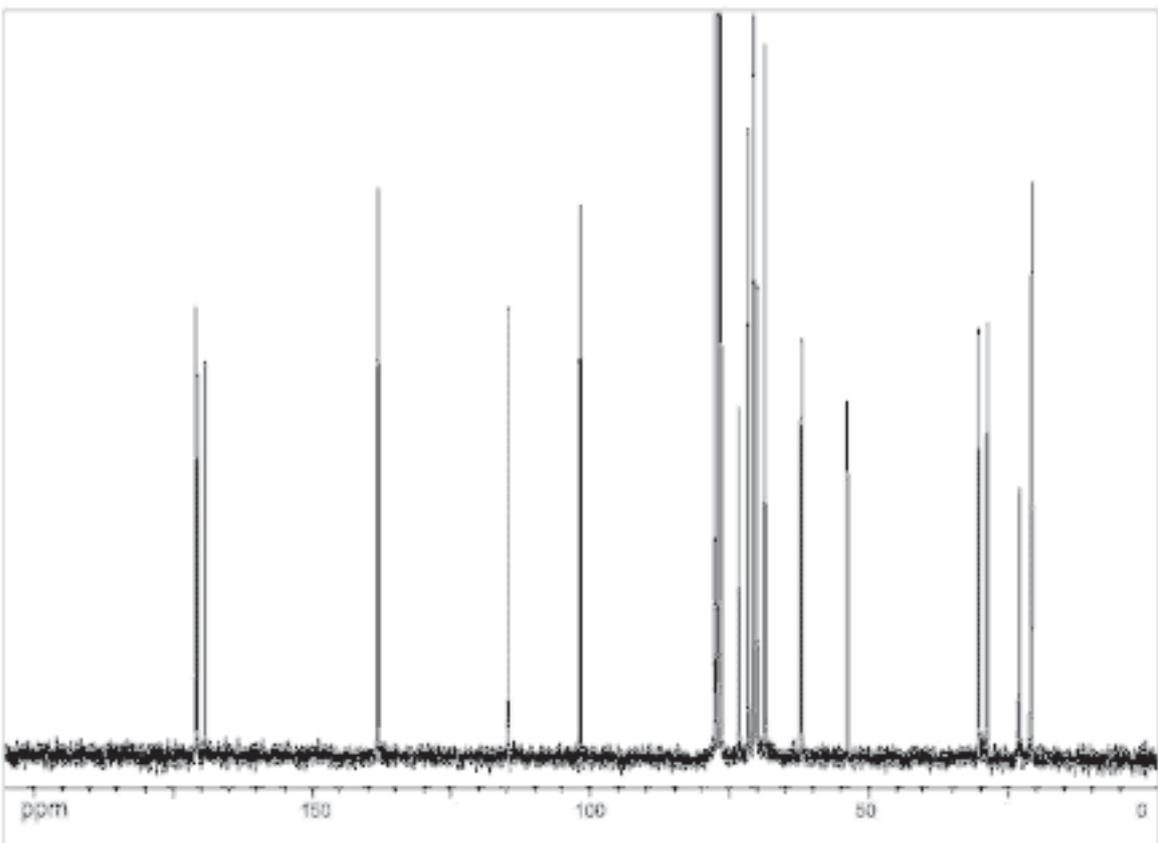
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **58** ( $\text{d}_6$ -DMSO, 600 MHz)



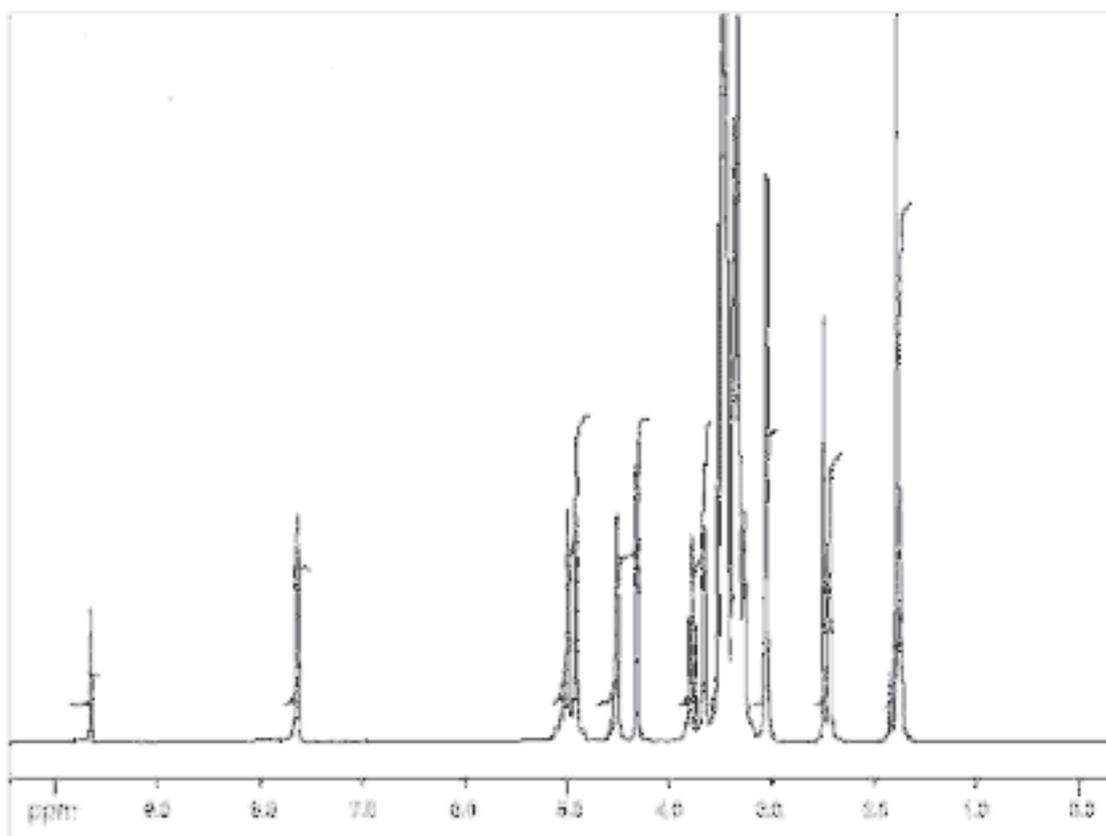
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **58** ( $\text{d}_6$ -DMSO, 151 MHz)



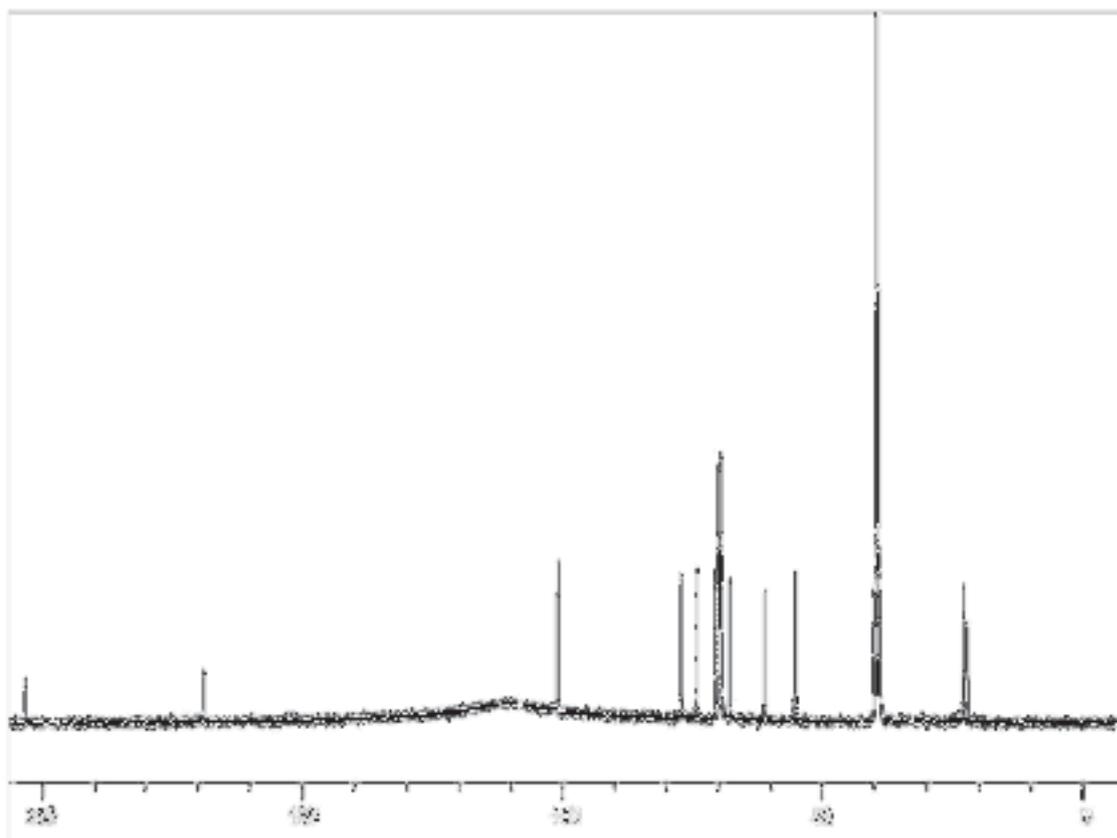
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **59** ( $\text{CDCl}_3$ , 250 MHz)



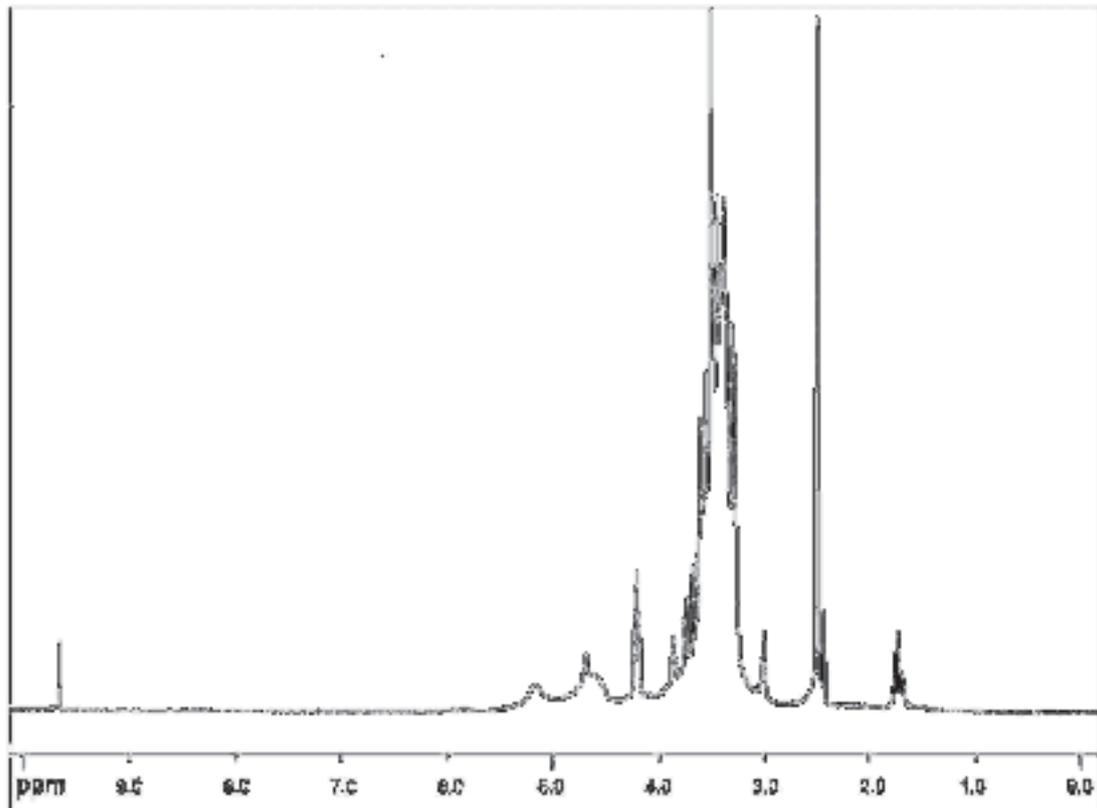
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **59** ( $\text{CDCl}_3$ , 63 MHz)



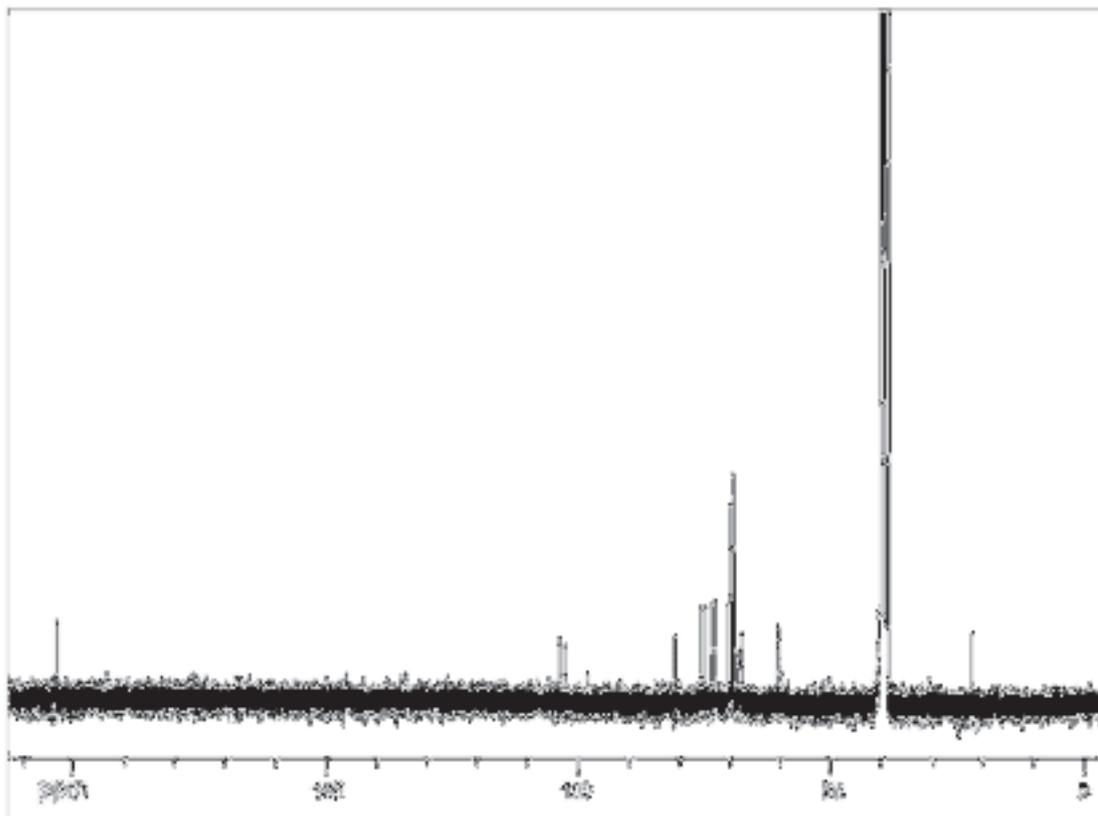
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **60** ( $d_6$ -DMSO, 600 MHz)



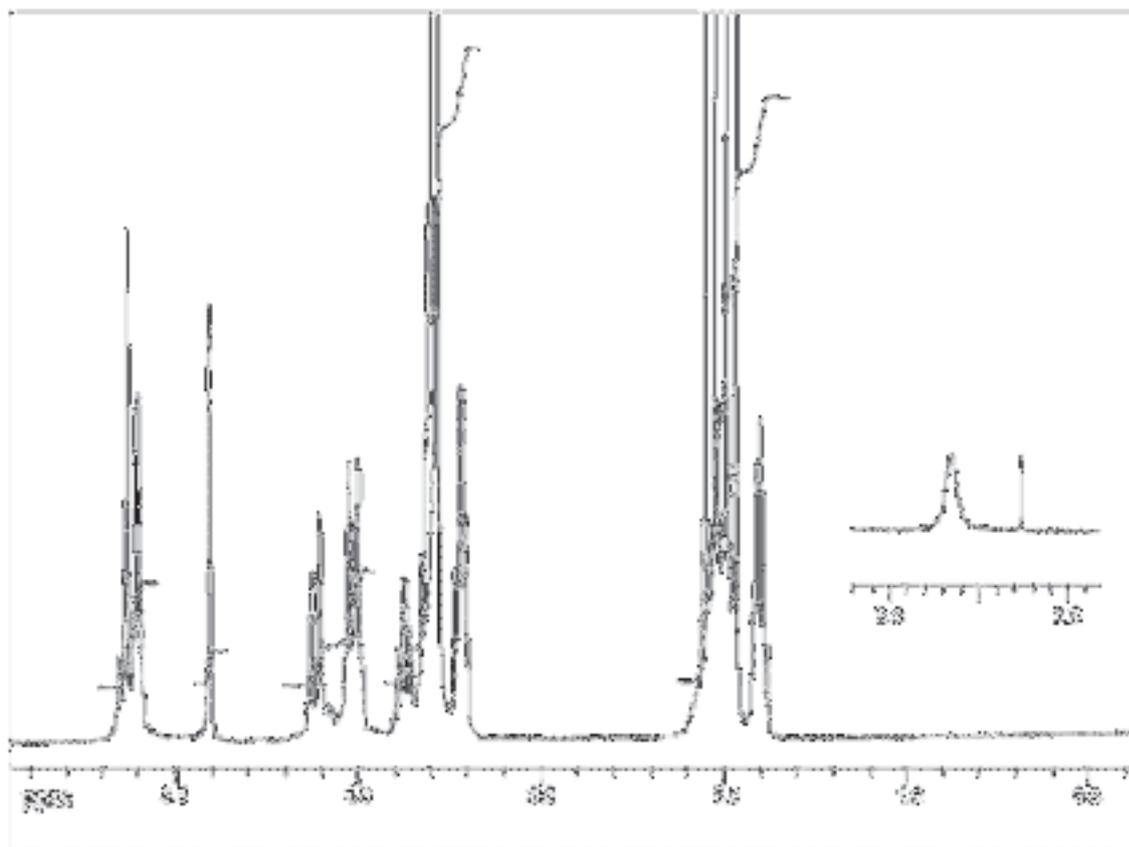
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **60** ( $d_6$ -DMSO, 151 MHz)



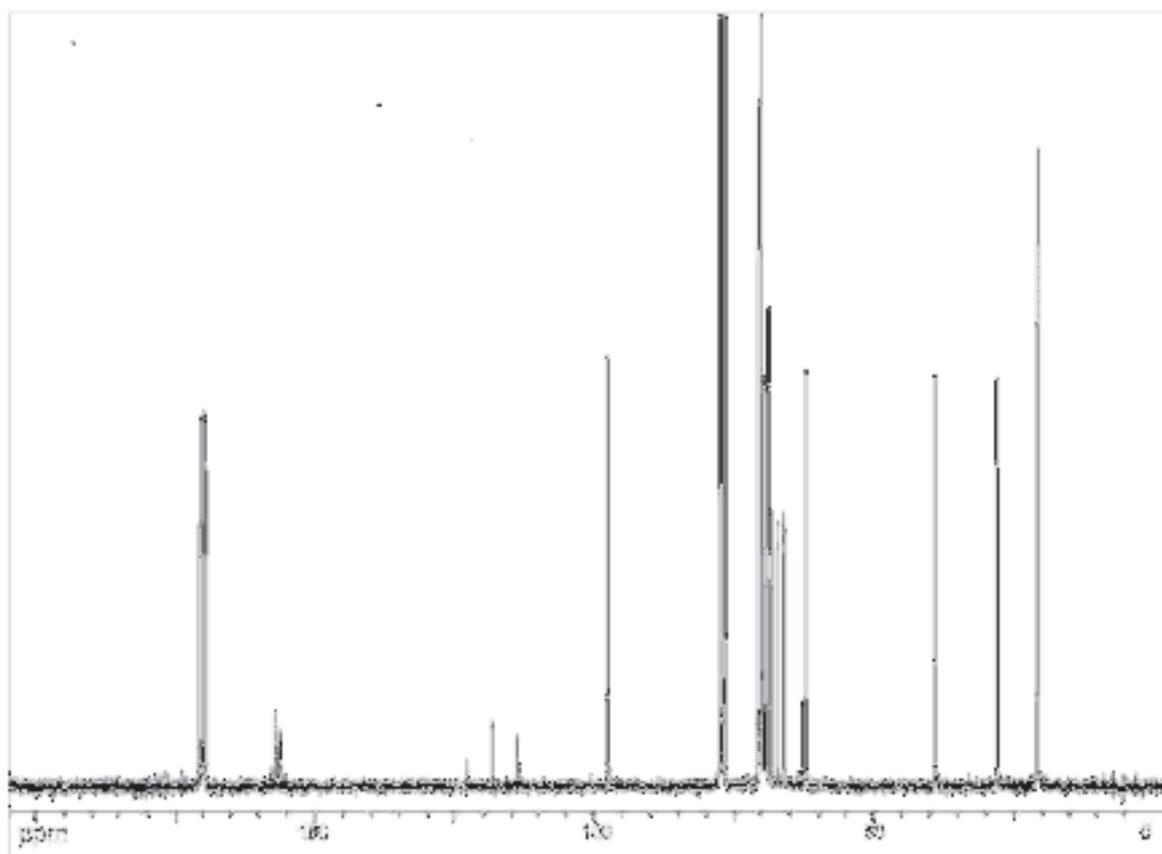
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **61** ( $\text{d}_6$ -DMSO, 600 MHz)



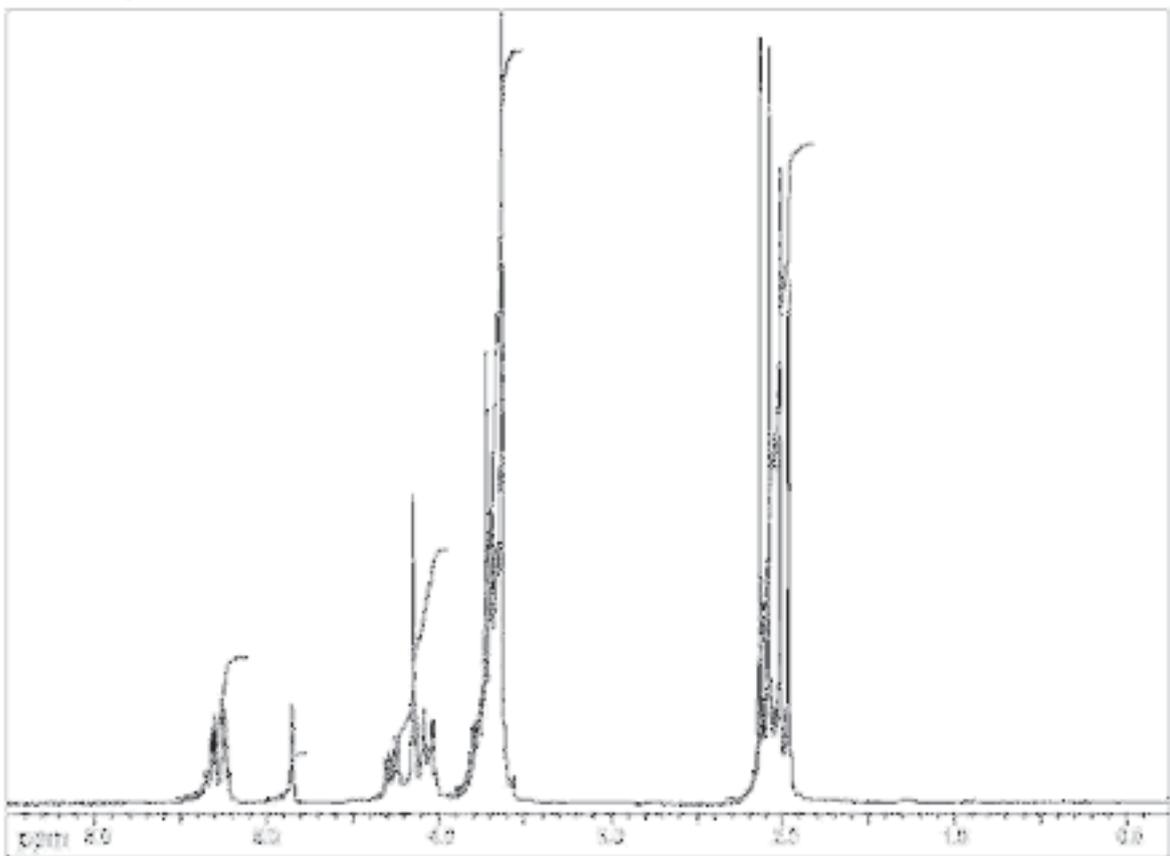
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **61** ( $\text{d}_6$ -DMSO, 151 MHz)



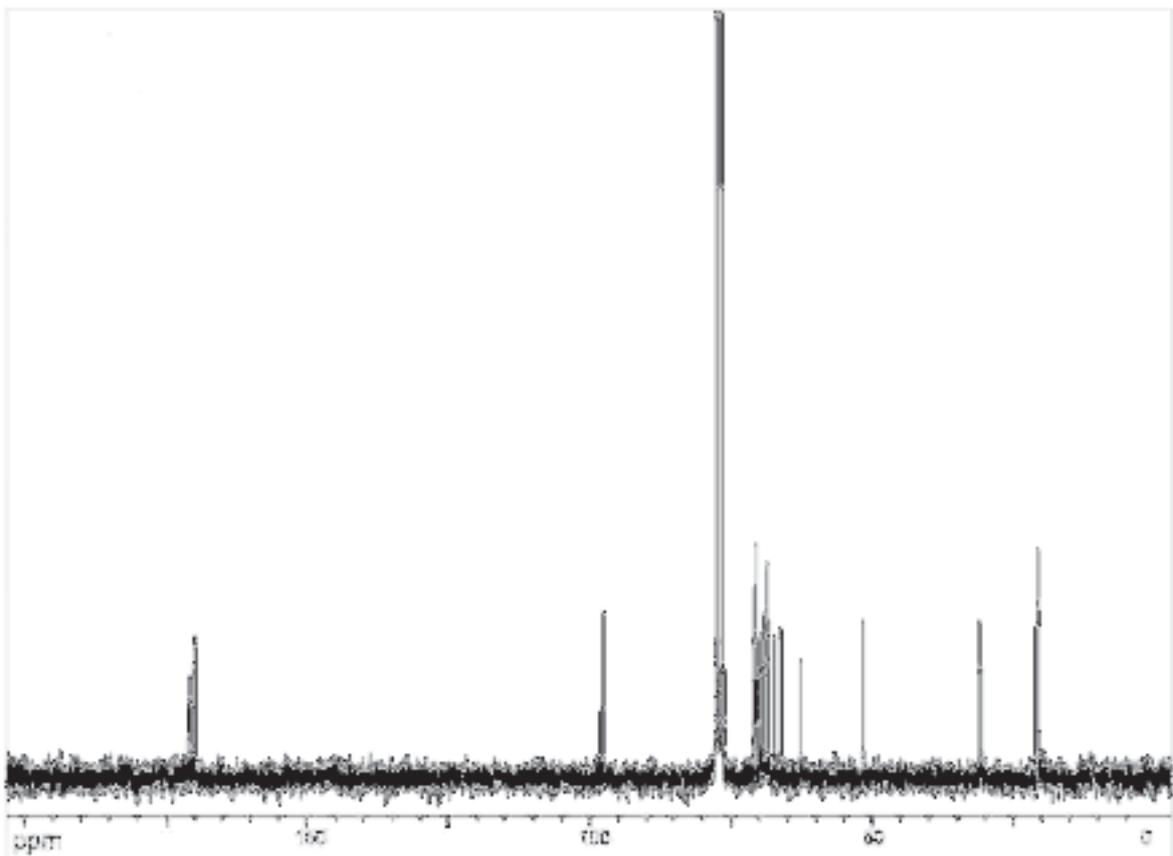
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **62** ( $\text{CDCl}_3$ , 250 MHz)



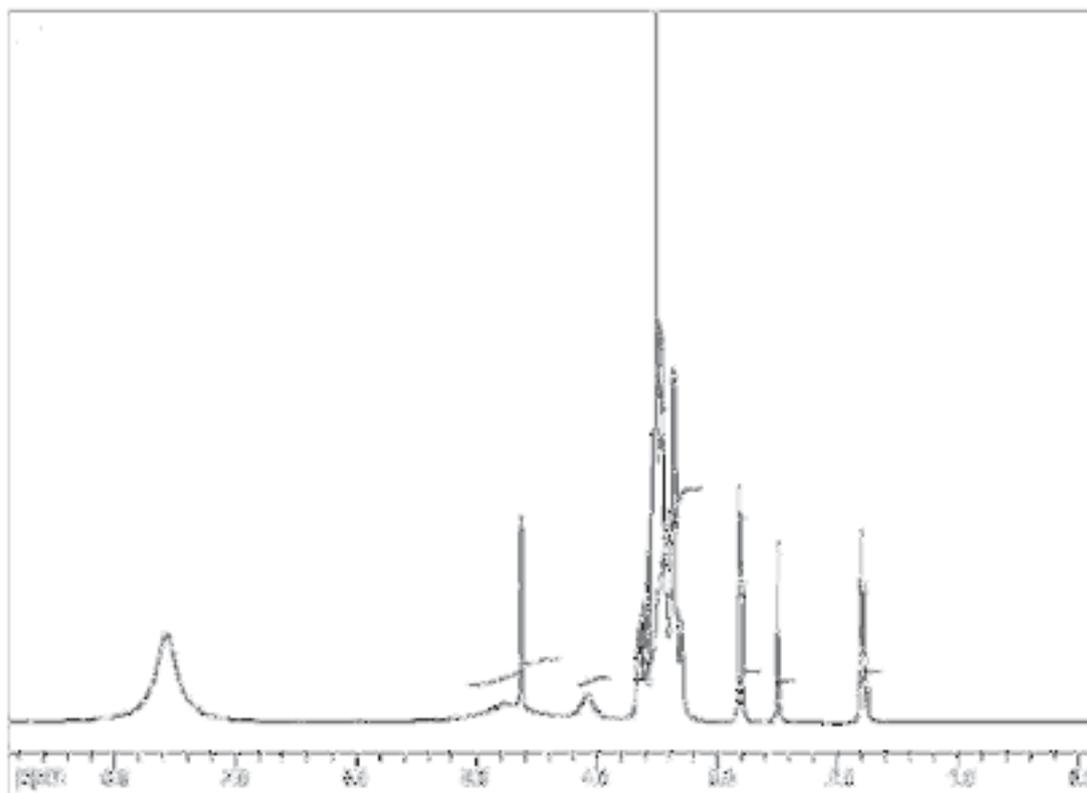
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **62** ( $\text{CDCl}_3$ , 63 MHz)



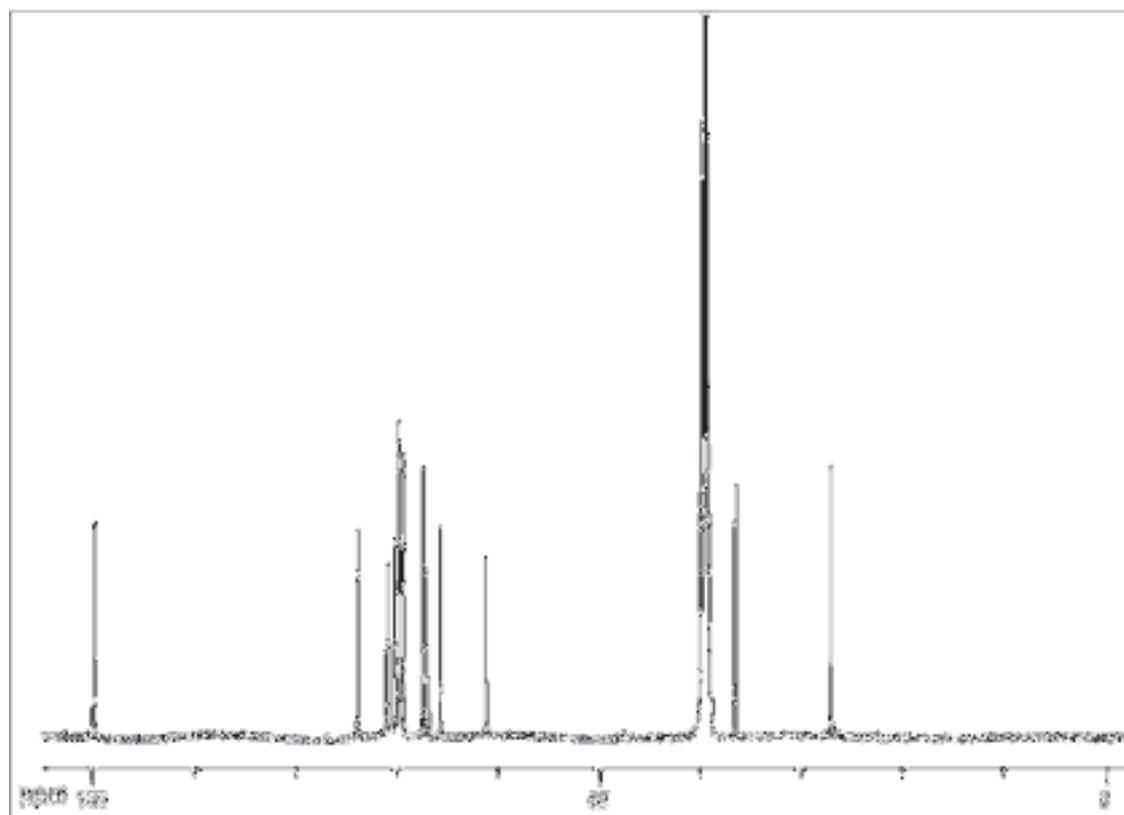
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **63** ( $\text{CDCl}_3$ , 250 MHz)



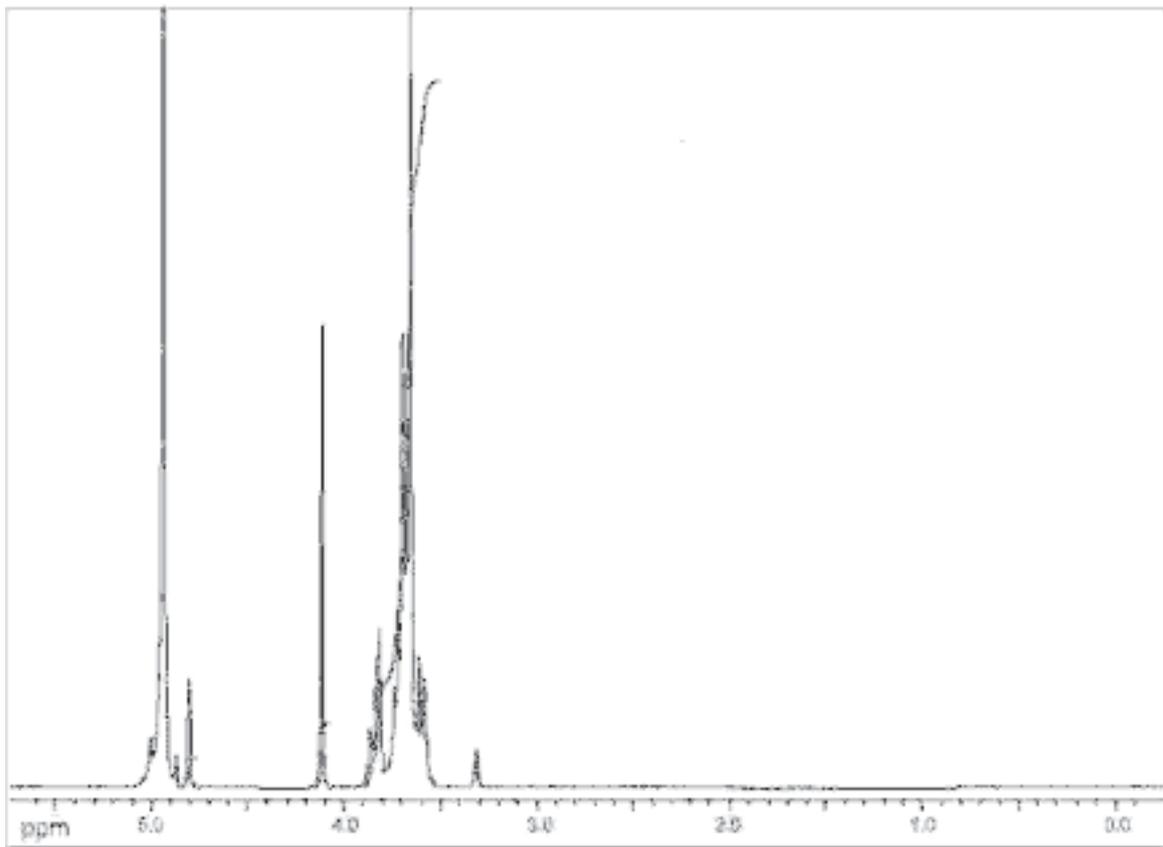
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **63** ( $\text{CDCl}_3$ , 63 MHz)



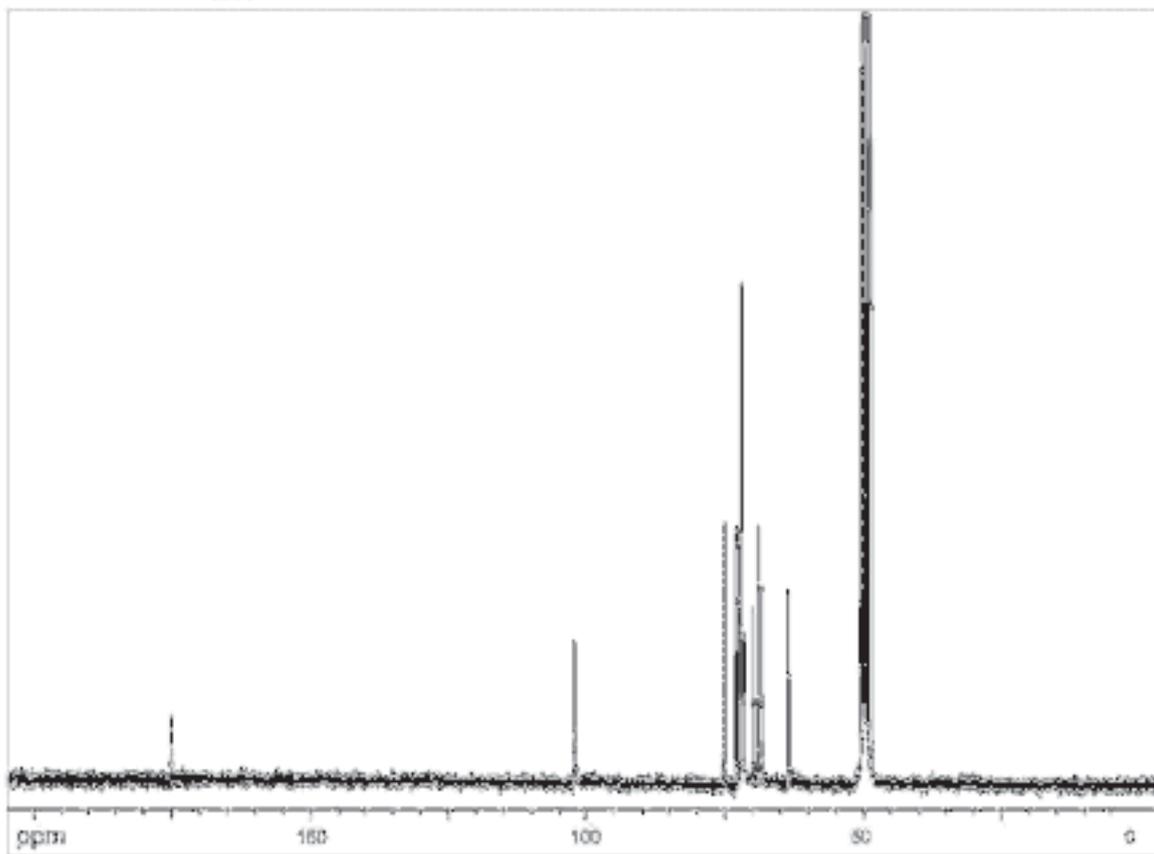
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **64** ( $\text{d}_6$ -DMSO, 600 MHz)



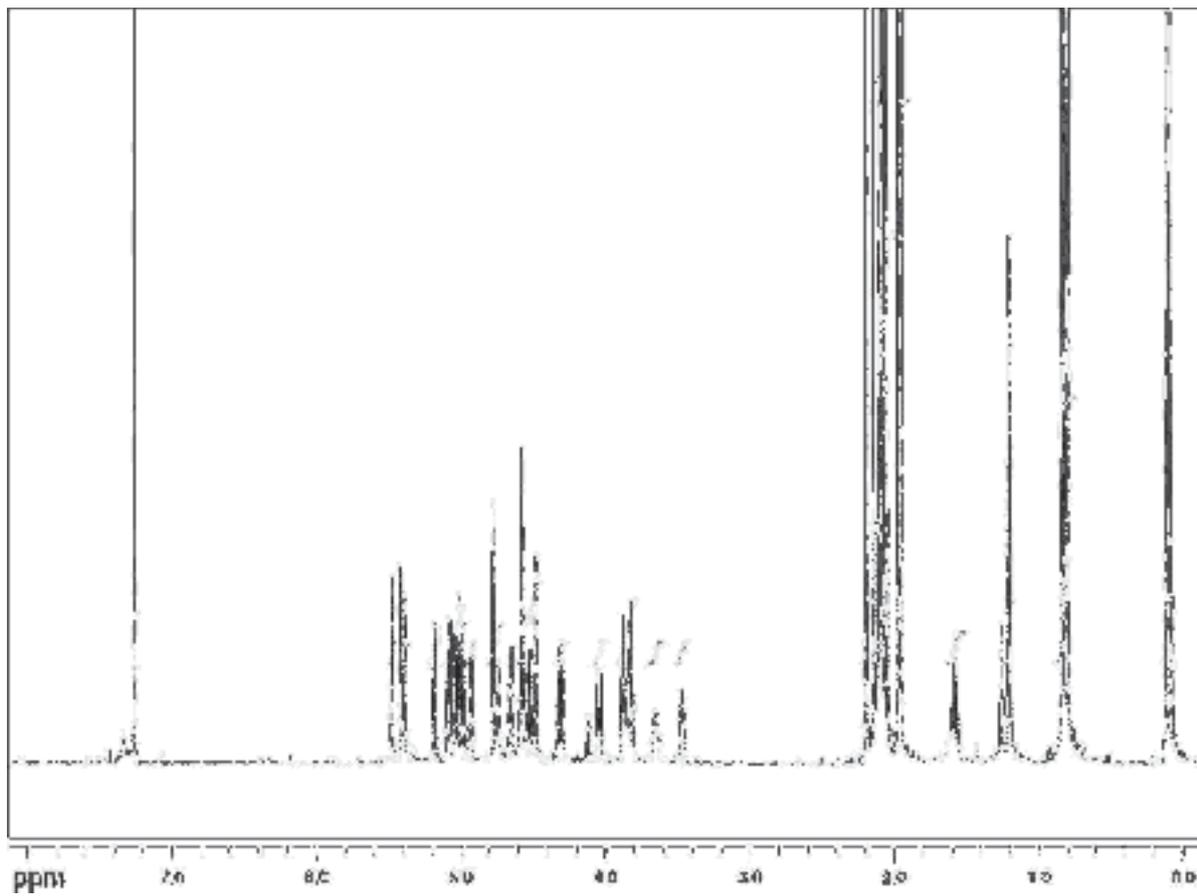
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **64** ( $\text{d}_6$ -DMSO, 151 MHz)



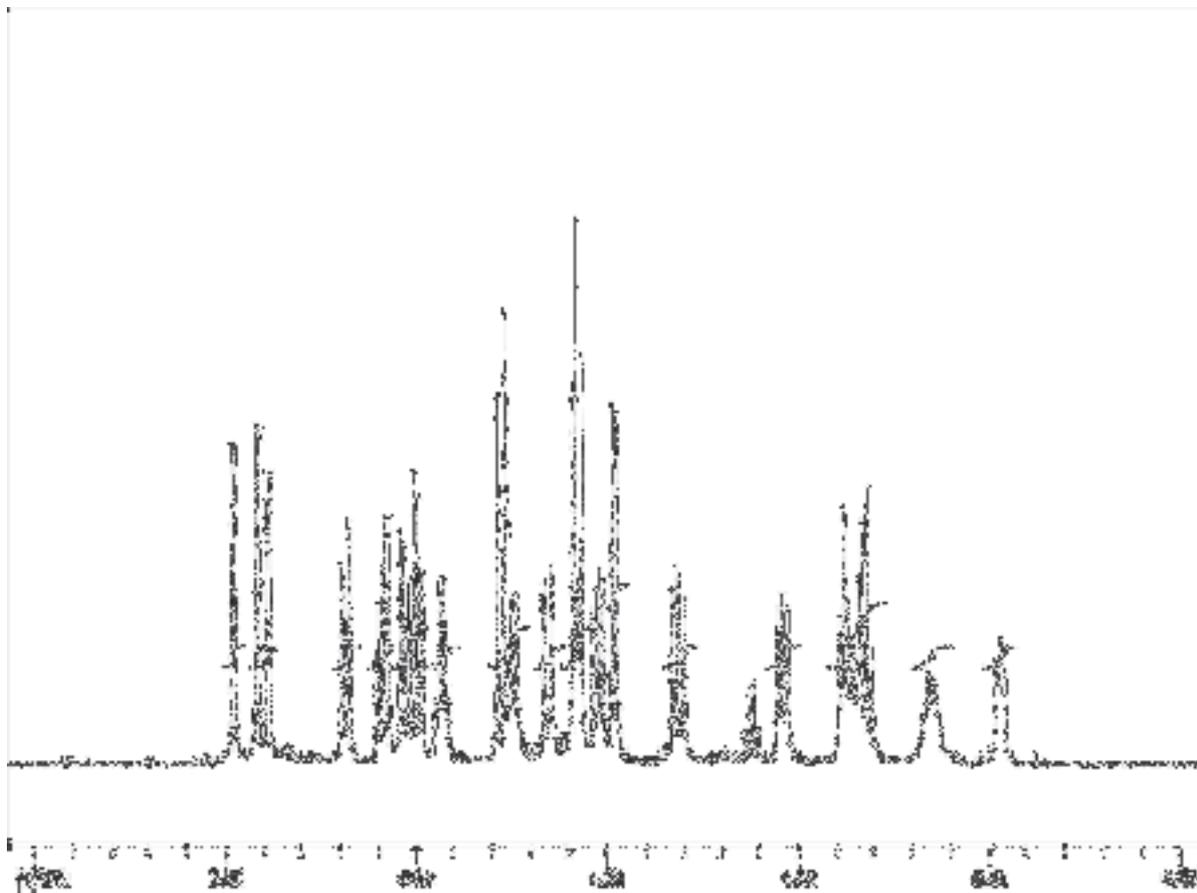
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **65** ( $\text{d}_4$ -MeOD, 600 MHz)



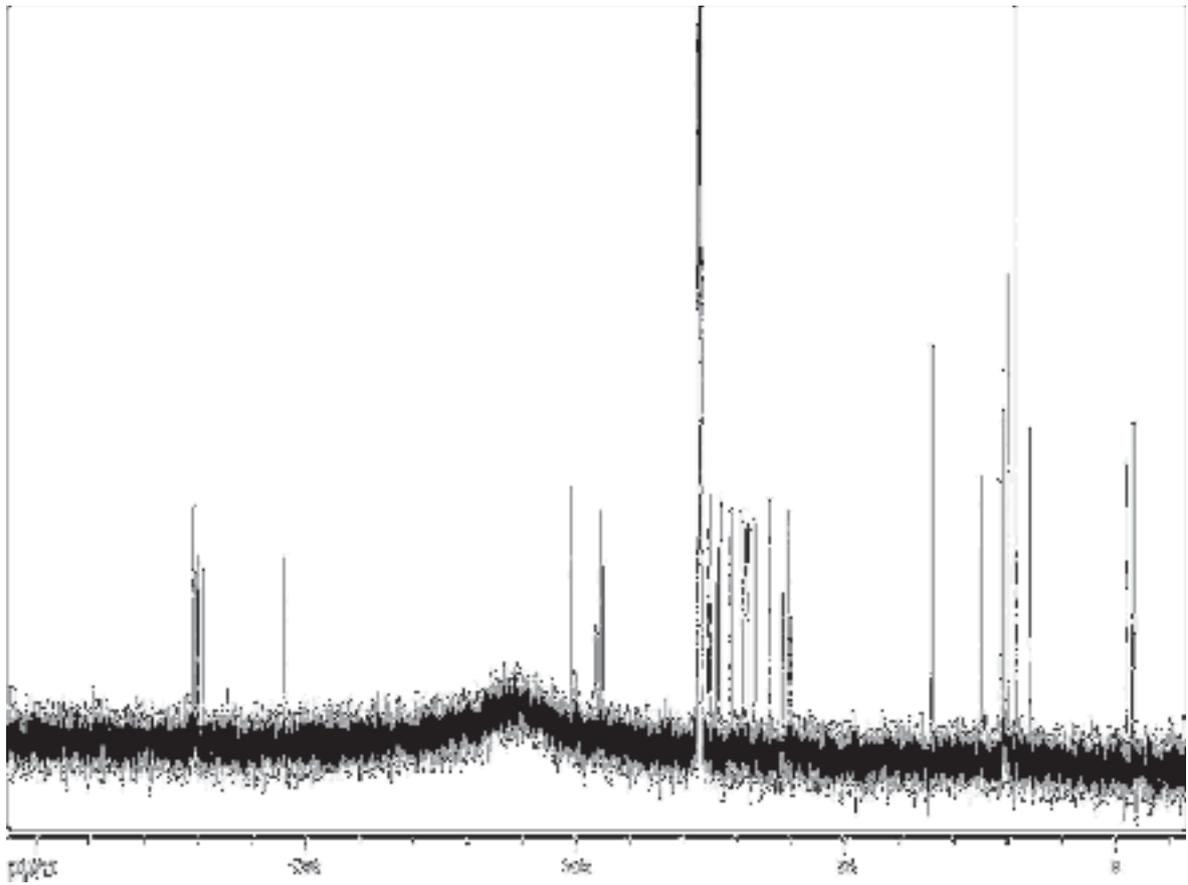
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **65** ( $\text{d}_4$ -MeOD, 151 MHz)



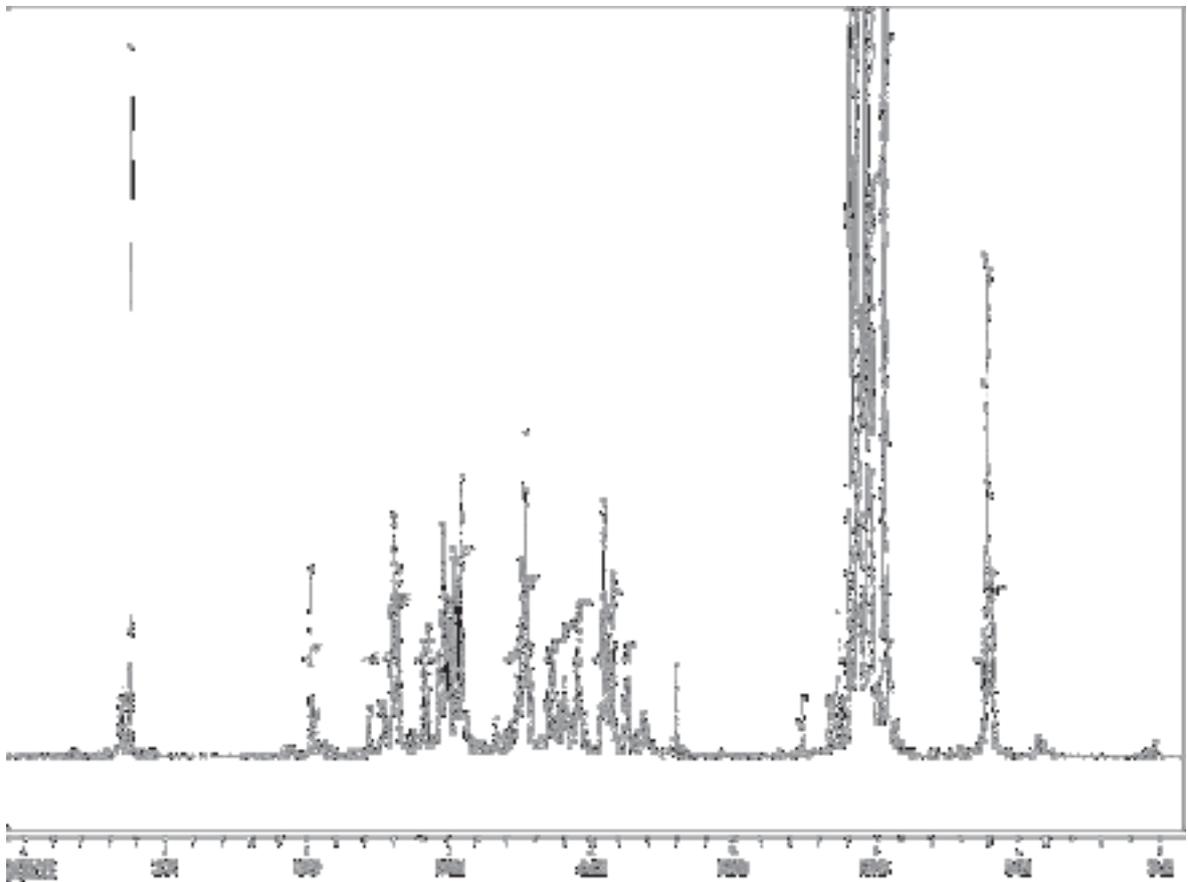
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **72** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)



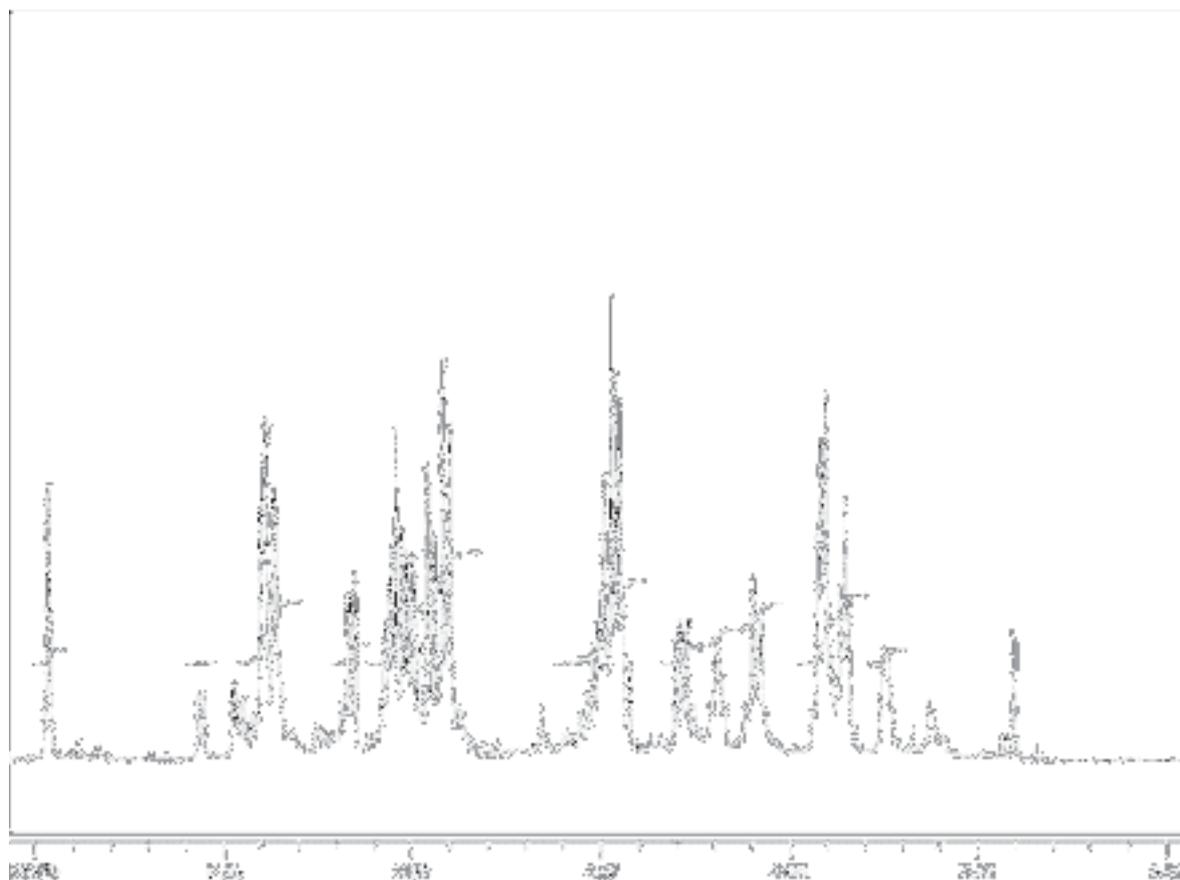
Ausschnitt aus dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **72** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)



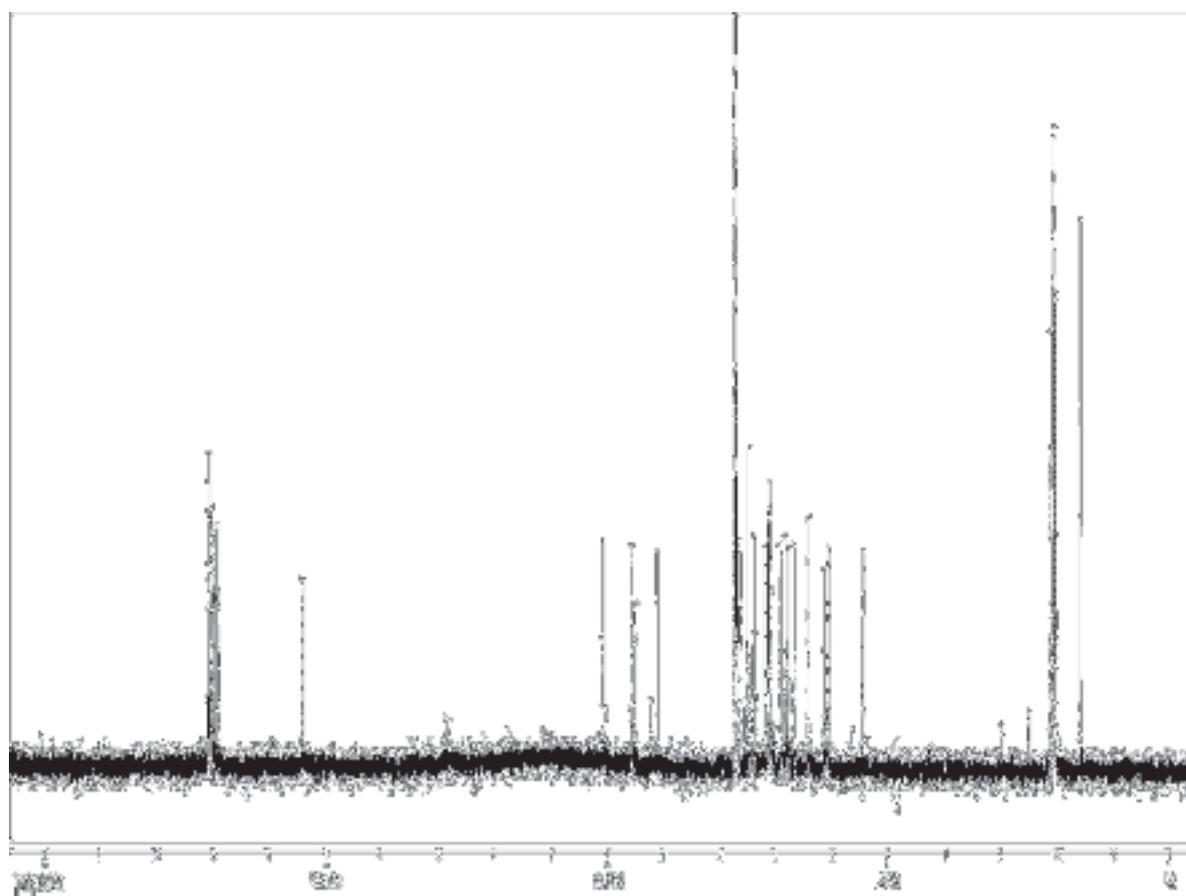
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **72** ( $\text{CDCl}_3$ , 151 MHz)



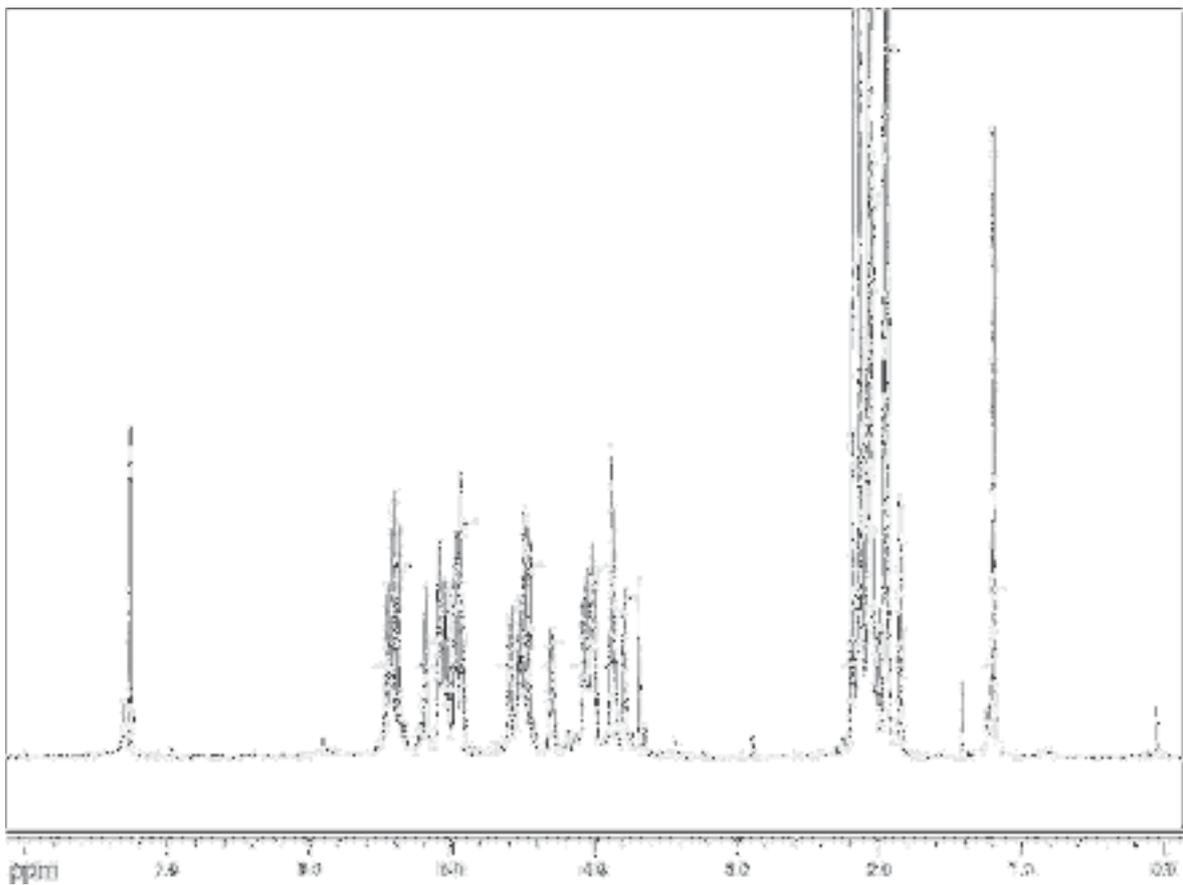
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **73** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)



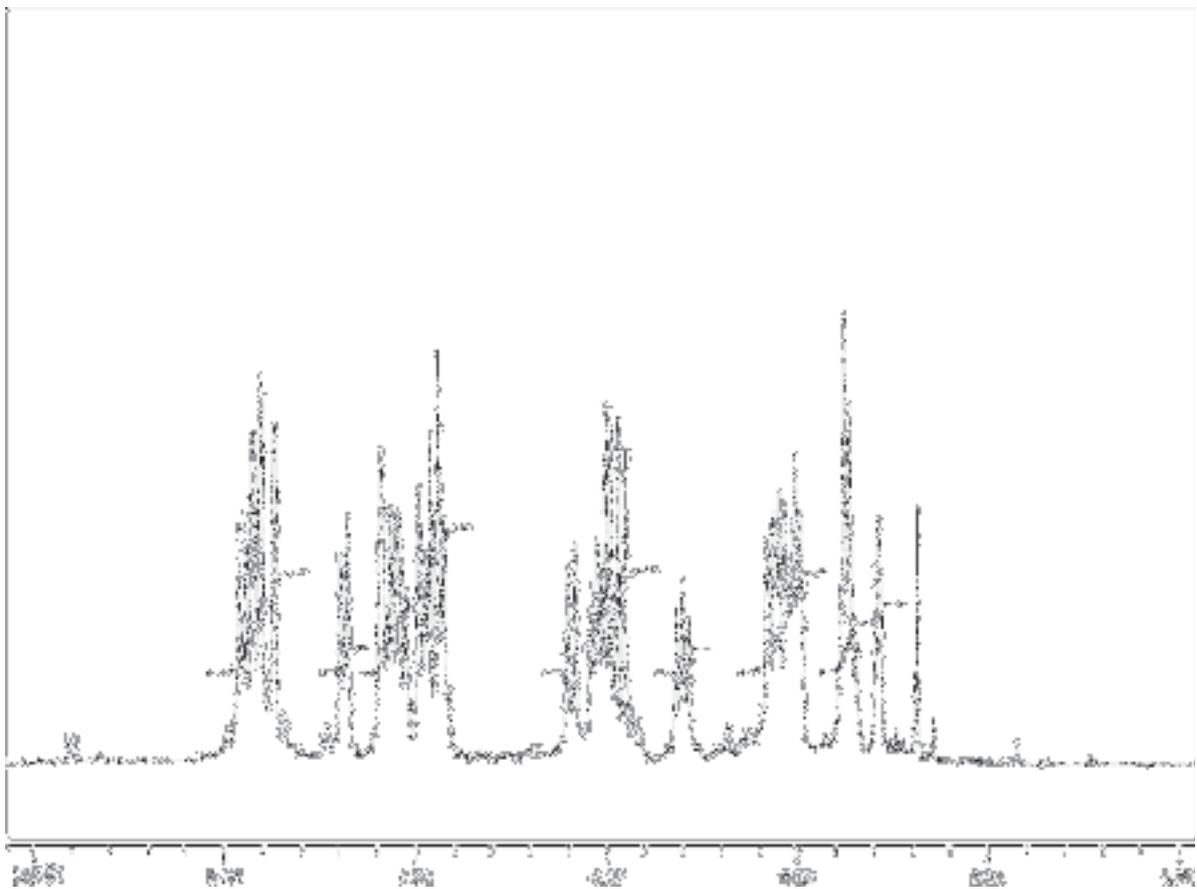
Ausschnitt aus dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **73** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)



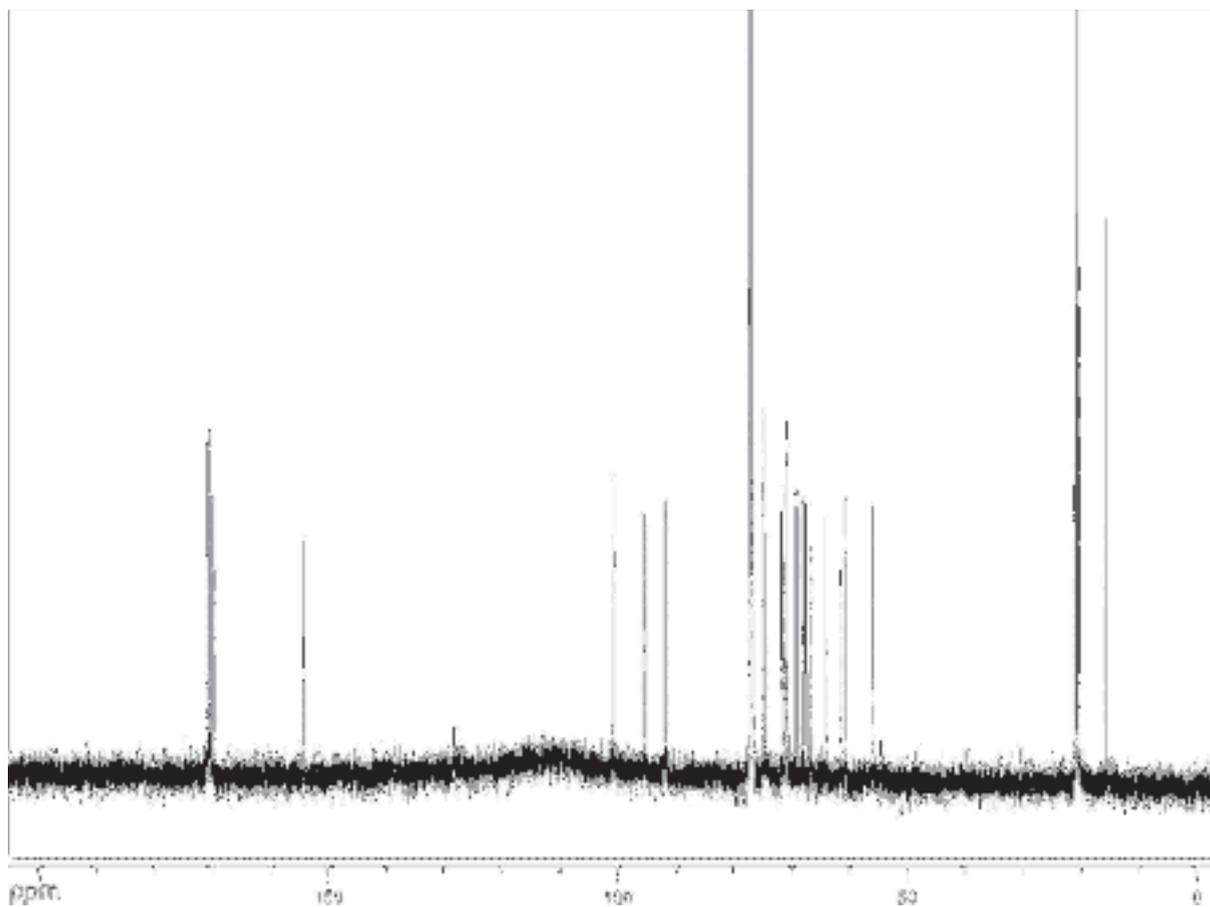
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **73** ( $\text{CDCl}_3$ , 151 MHz)



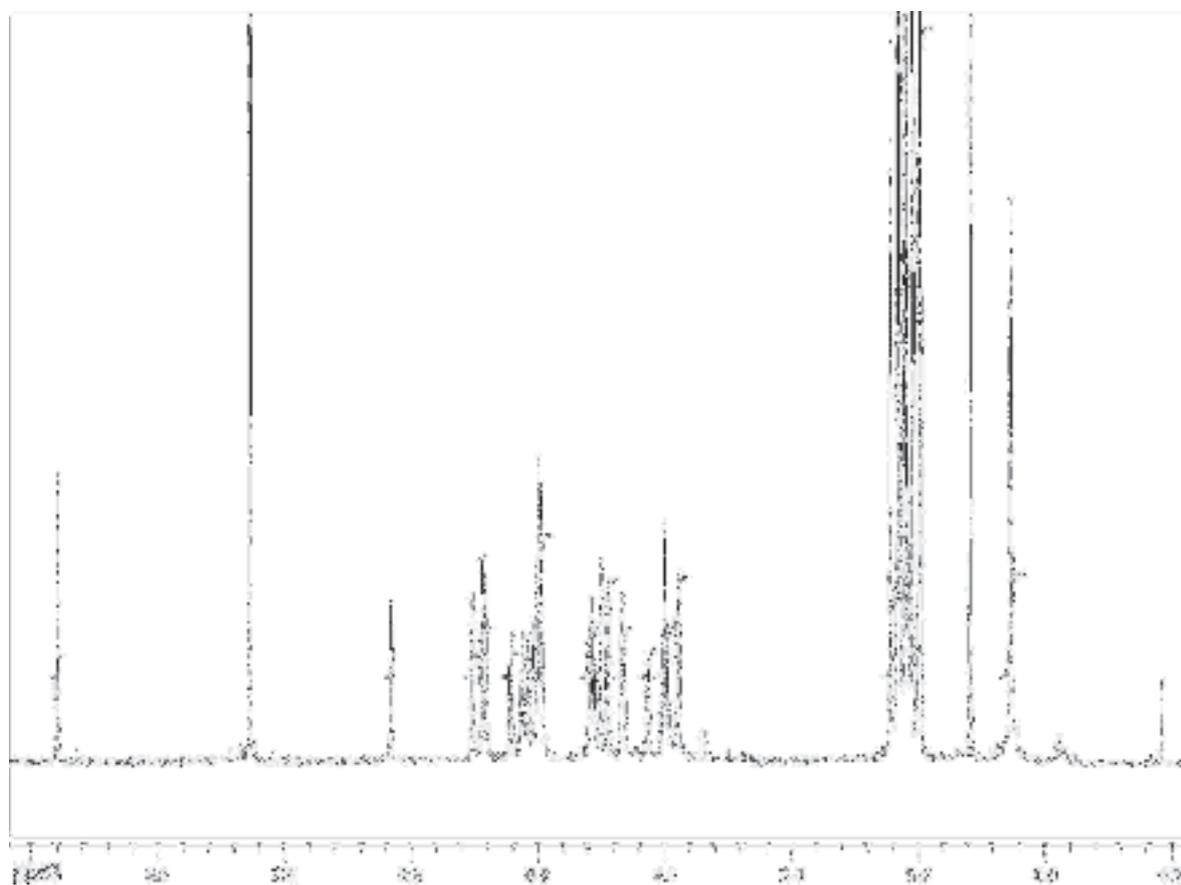
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **74** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)



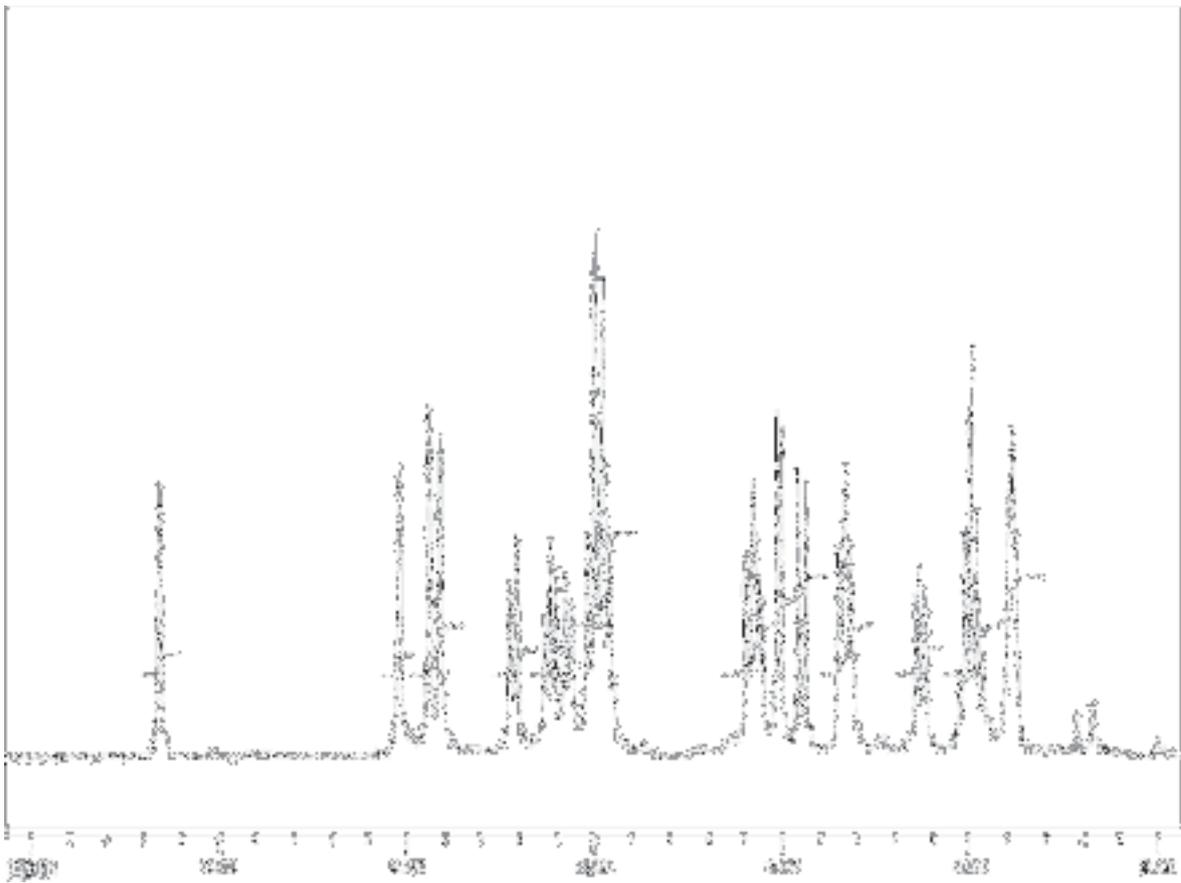
Ausschnitt aus dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **74** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)



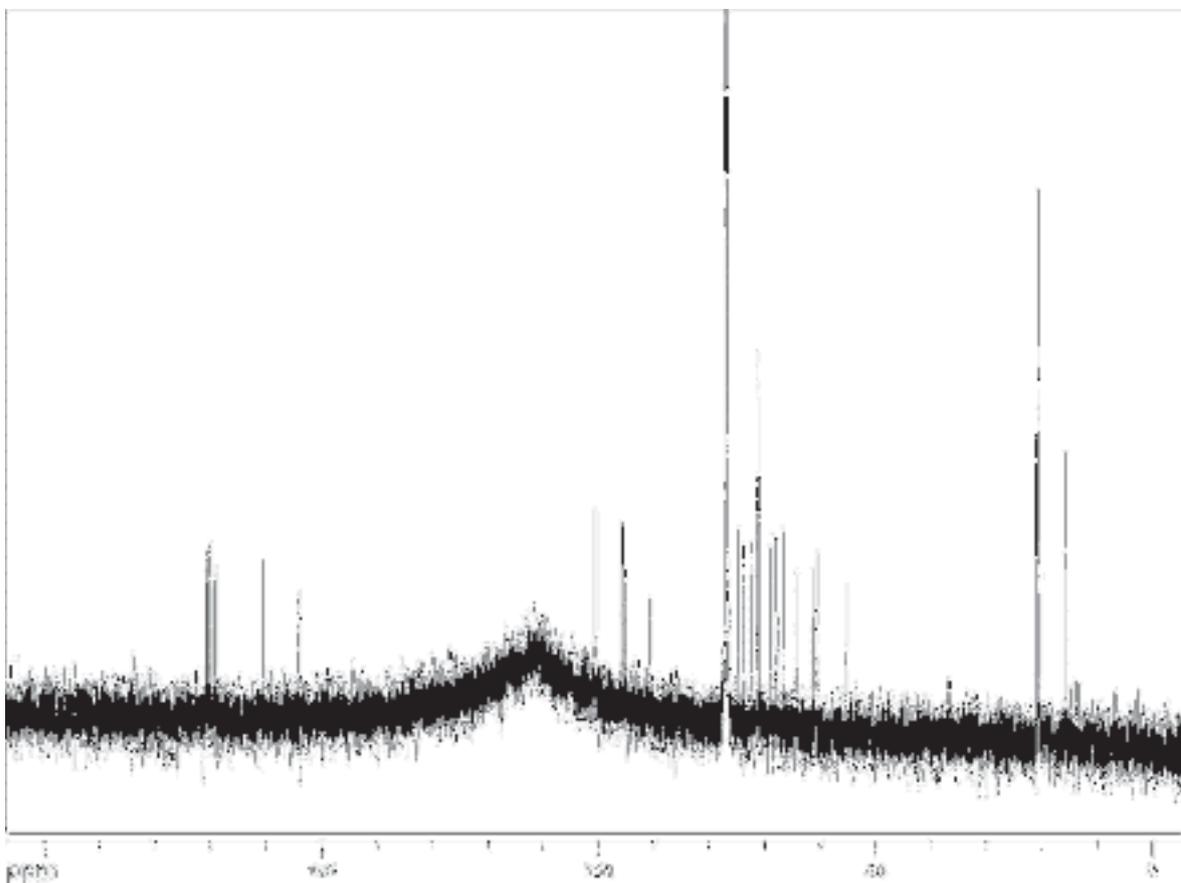
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **74** ( $\text{CDCl}_3$ , 151 MHz)



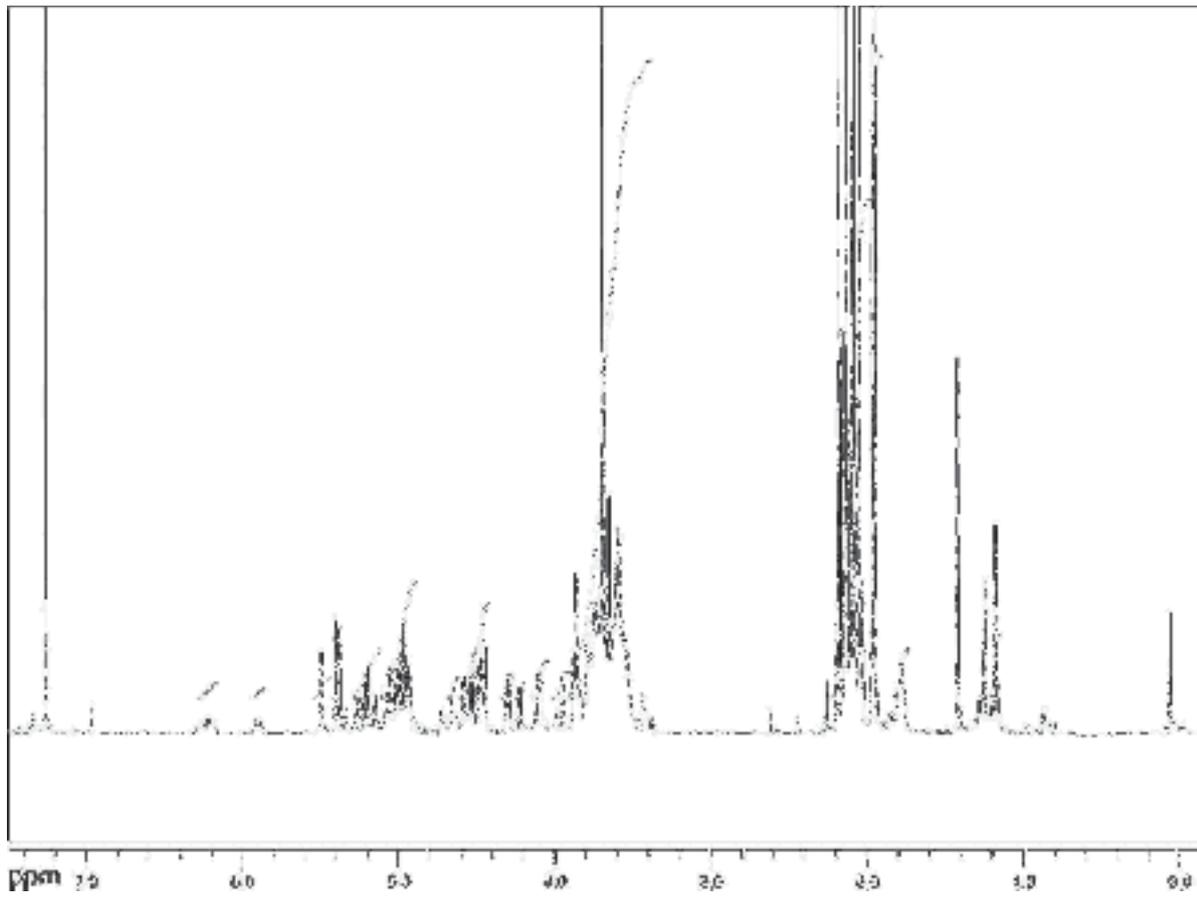
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **75** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)



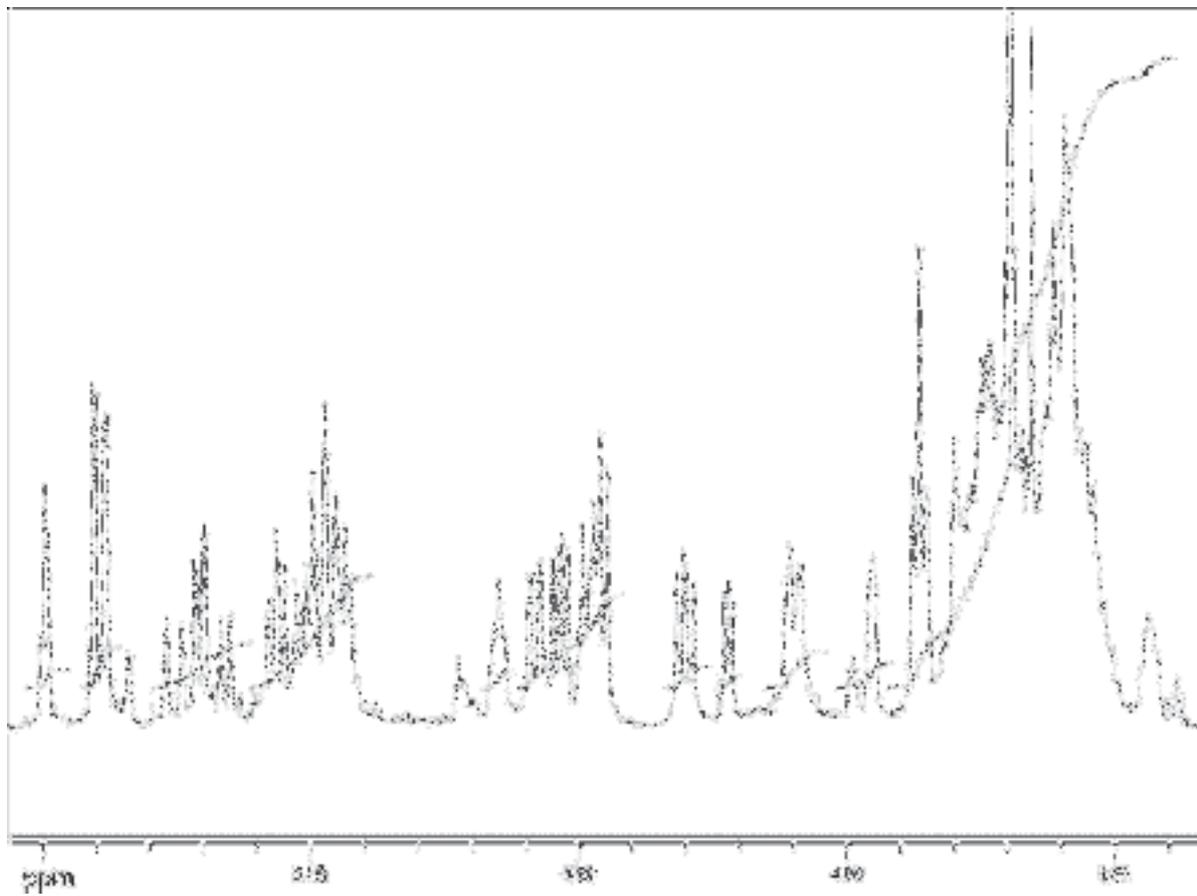
Ausschnitt aus dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **75** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)



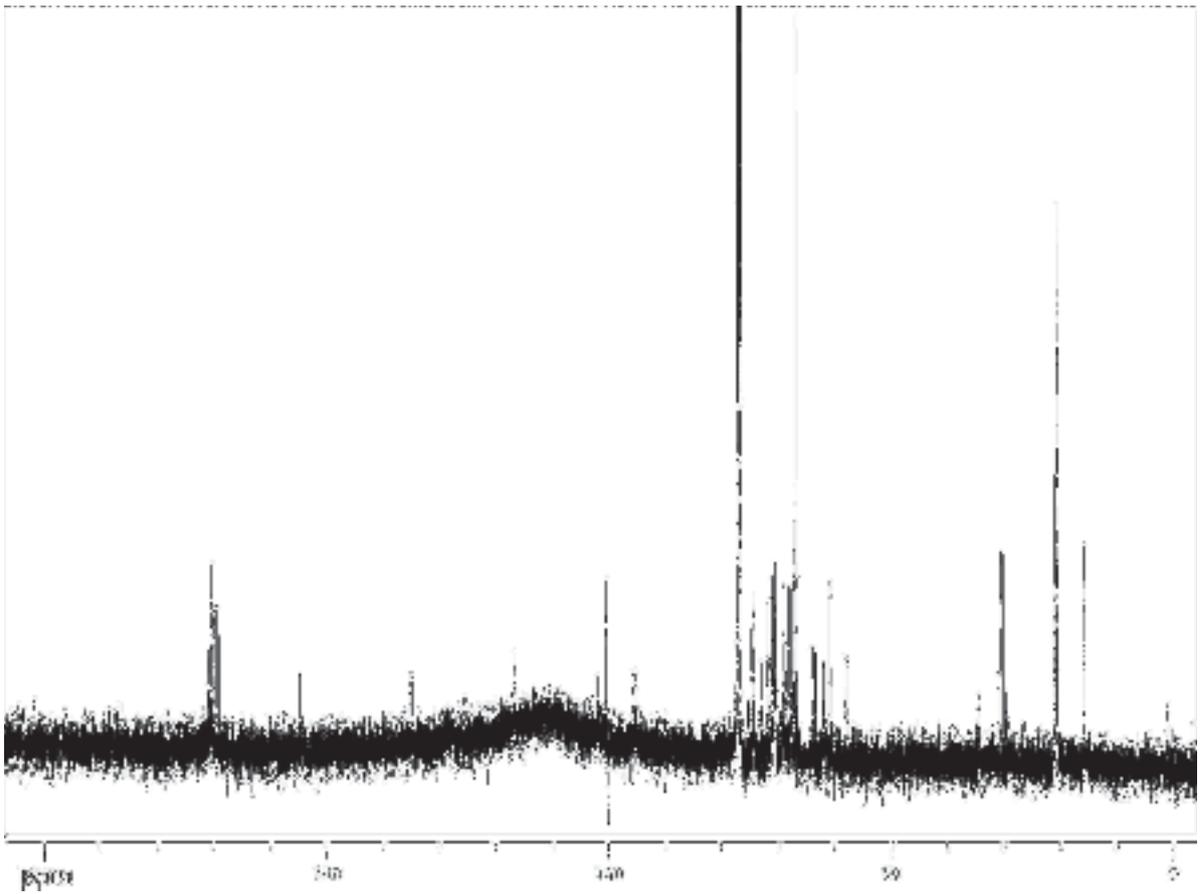
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **75** ( $\text{CDCl}_3$ , 151 MHz)



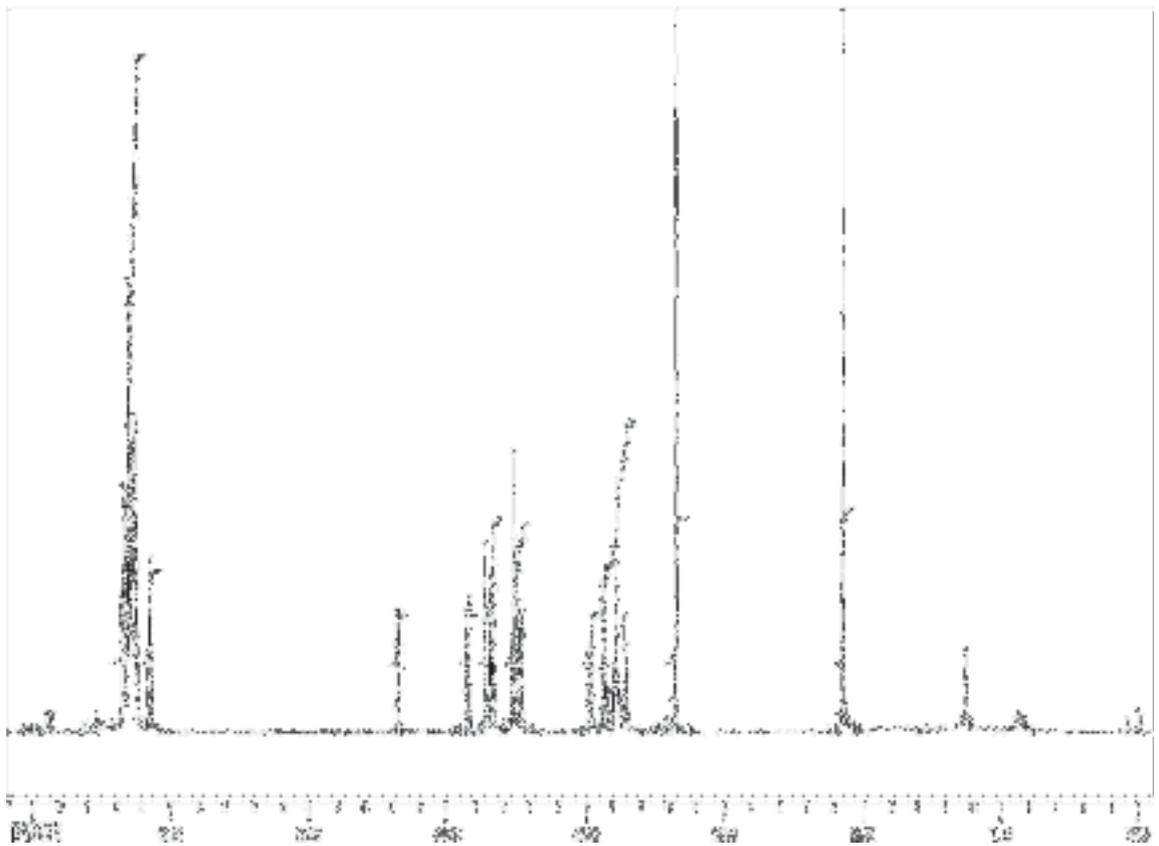
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **76** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)



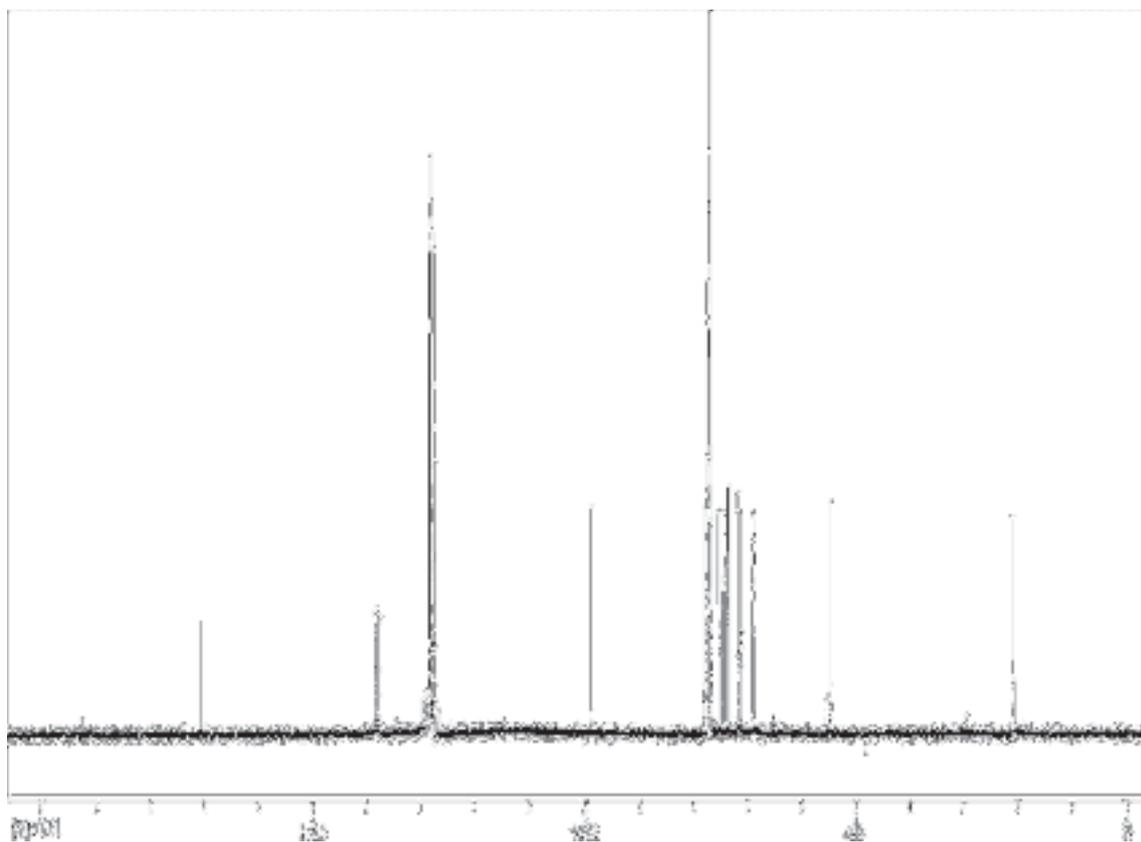
Ausschnitt aus dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **76** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)



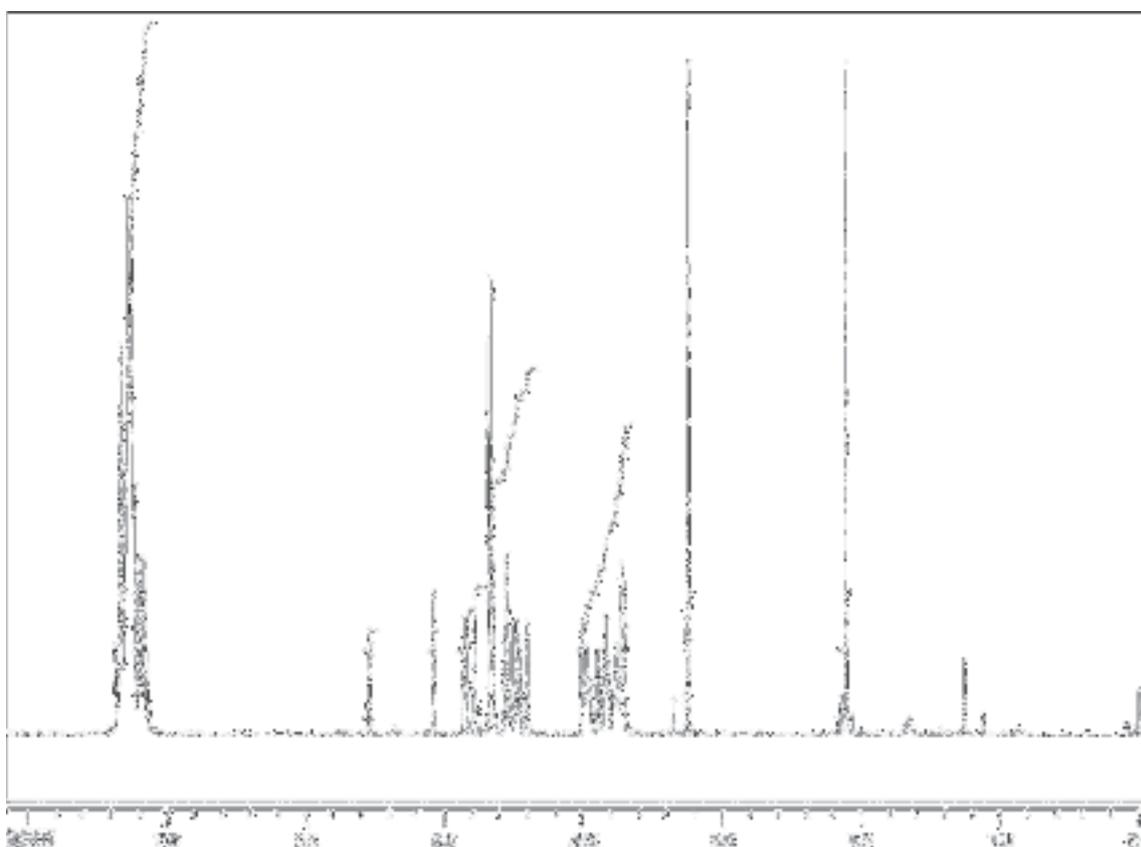
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **76** ( $\text{CDCl}_3$ , 151 MHz)



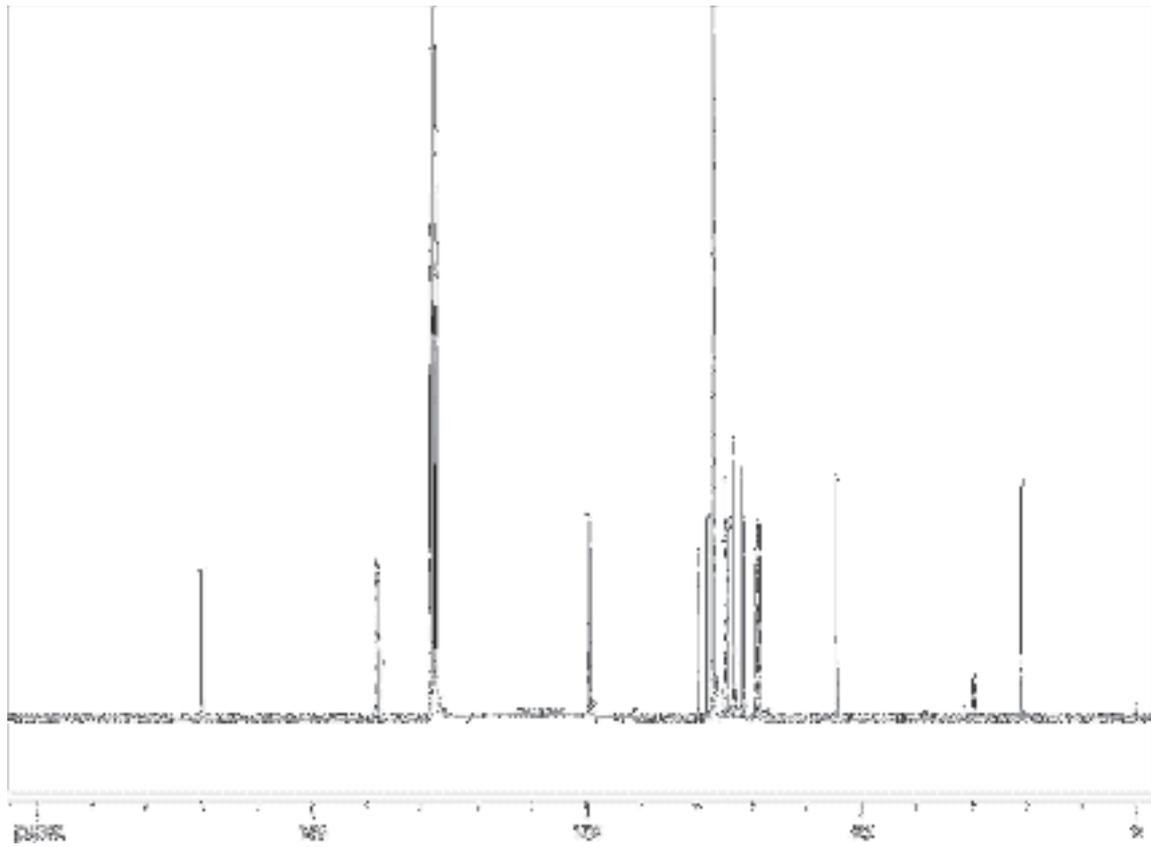
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **77-1** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)



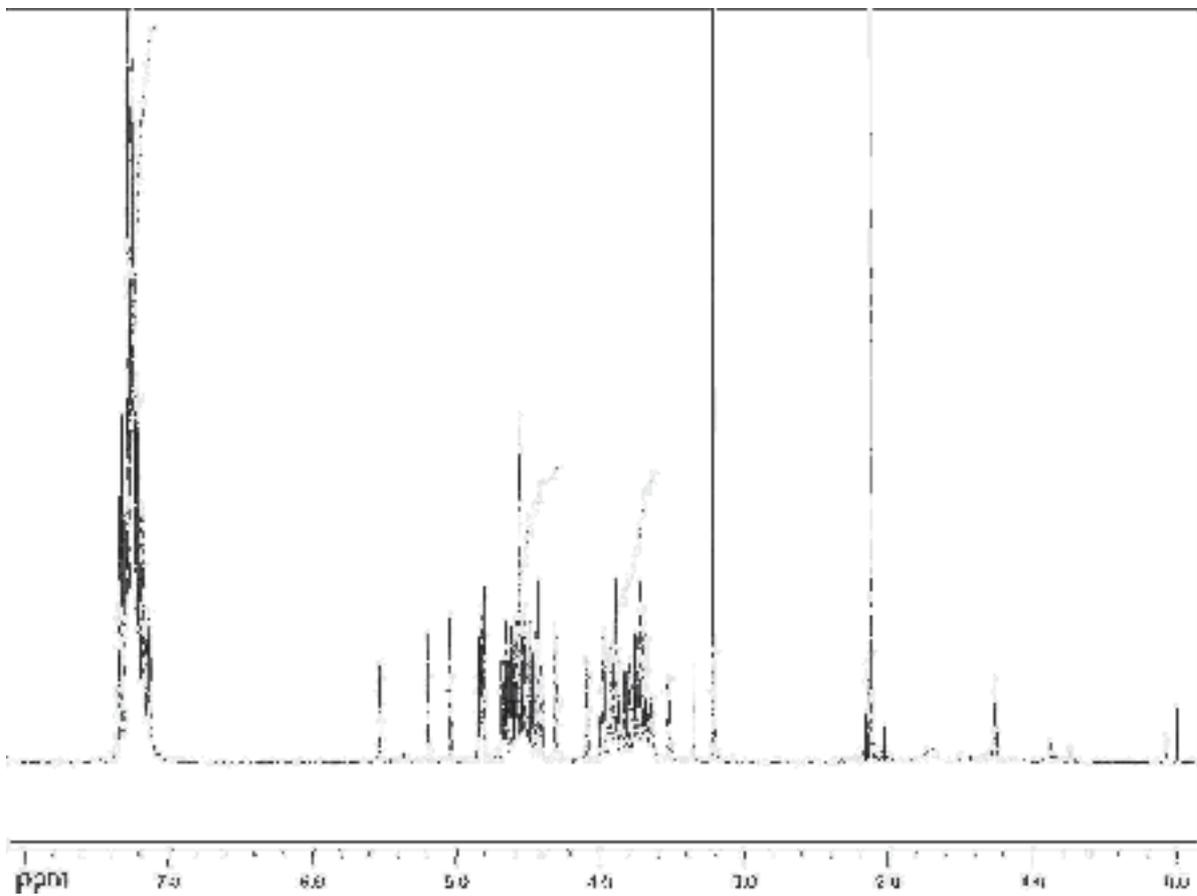
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **77-1** ( $\text{CDCl}_3$ , 151 MHz)



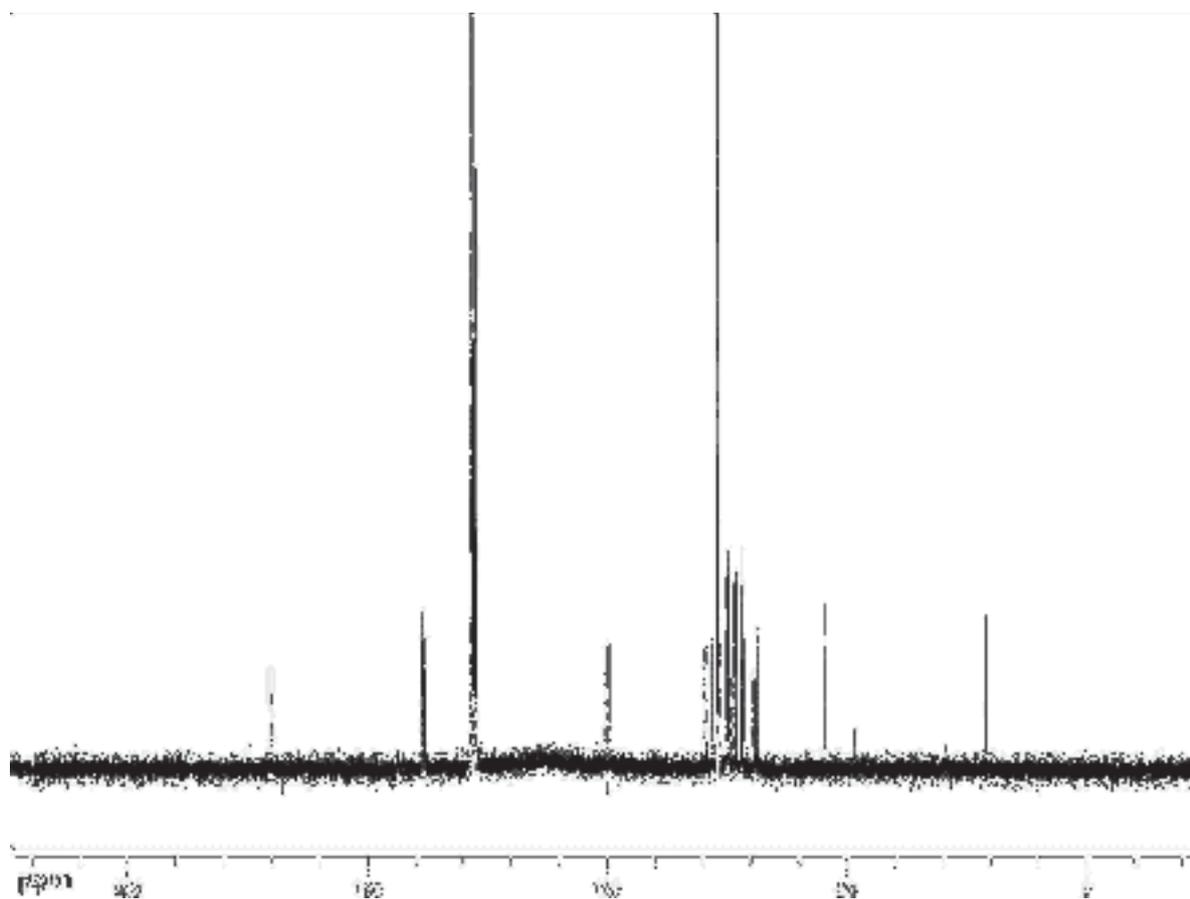
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **77-2** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)



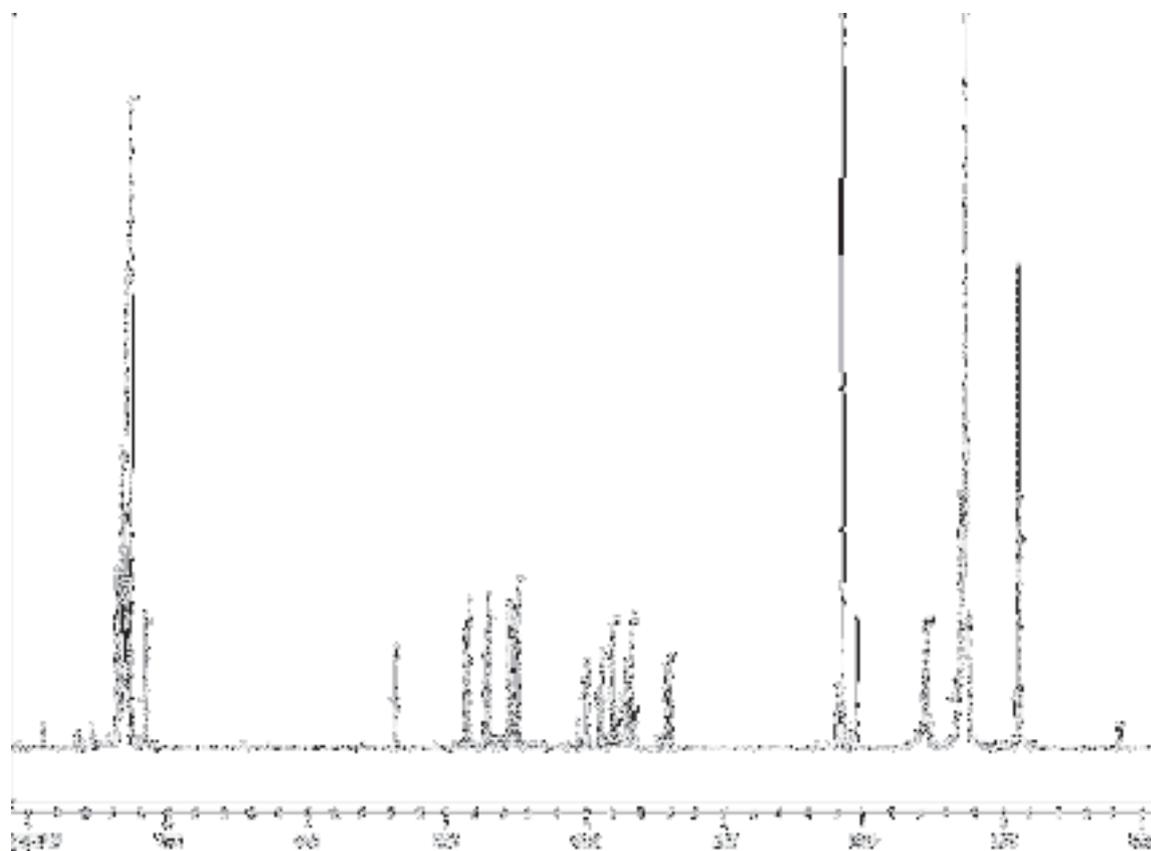
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **77-2** ( $\text{CDCl}_3$ , 151 MHz)



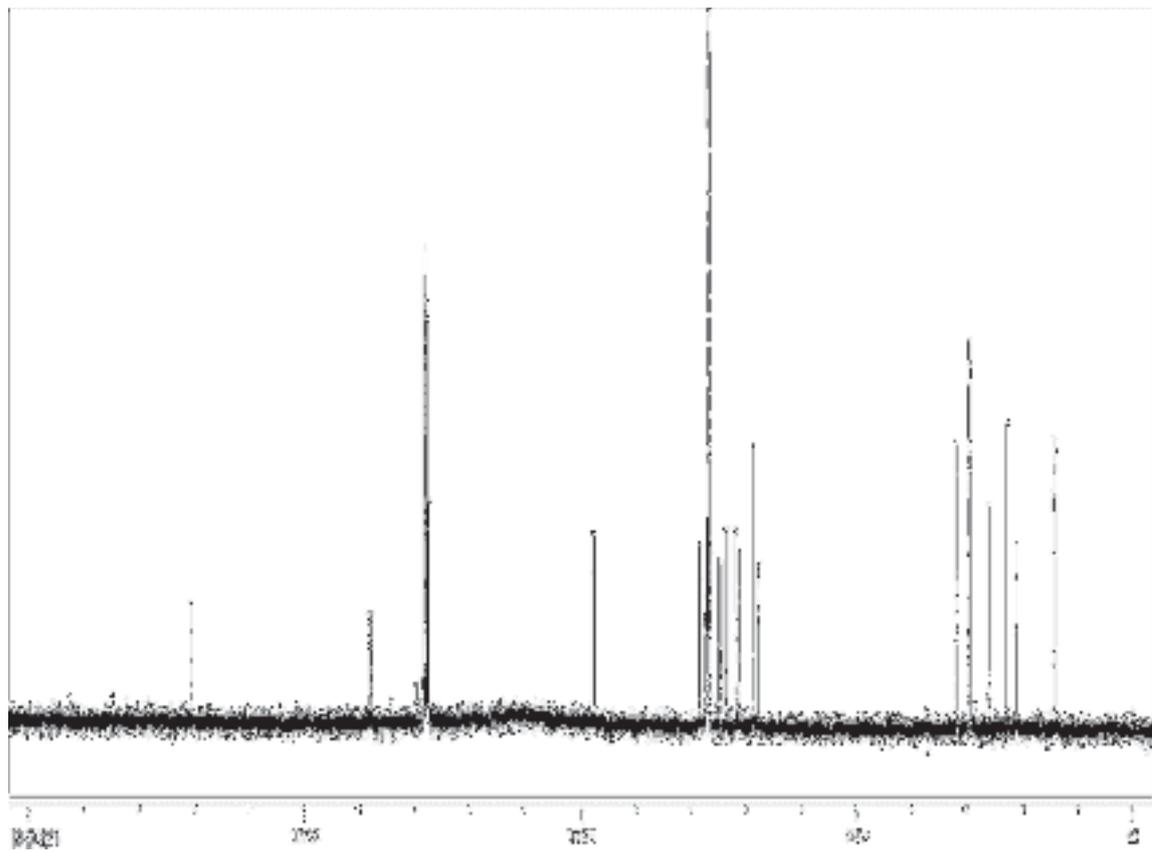
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **77-3** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)



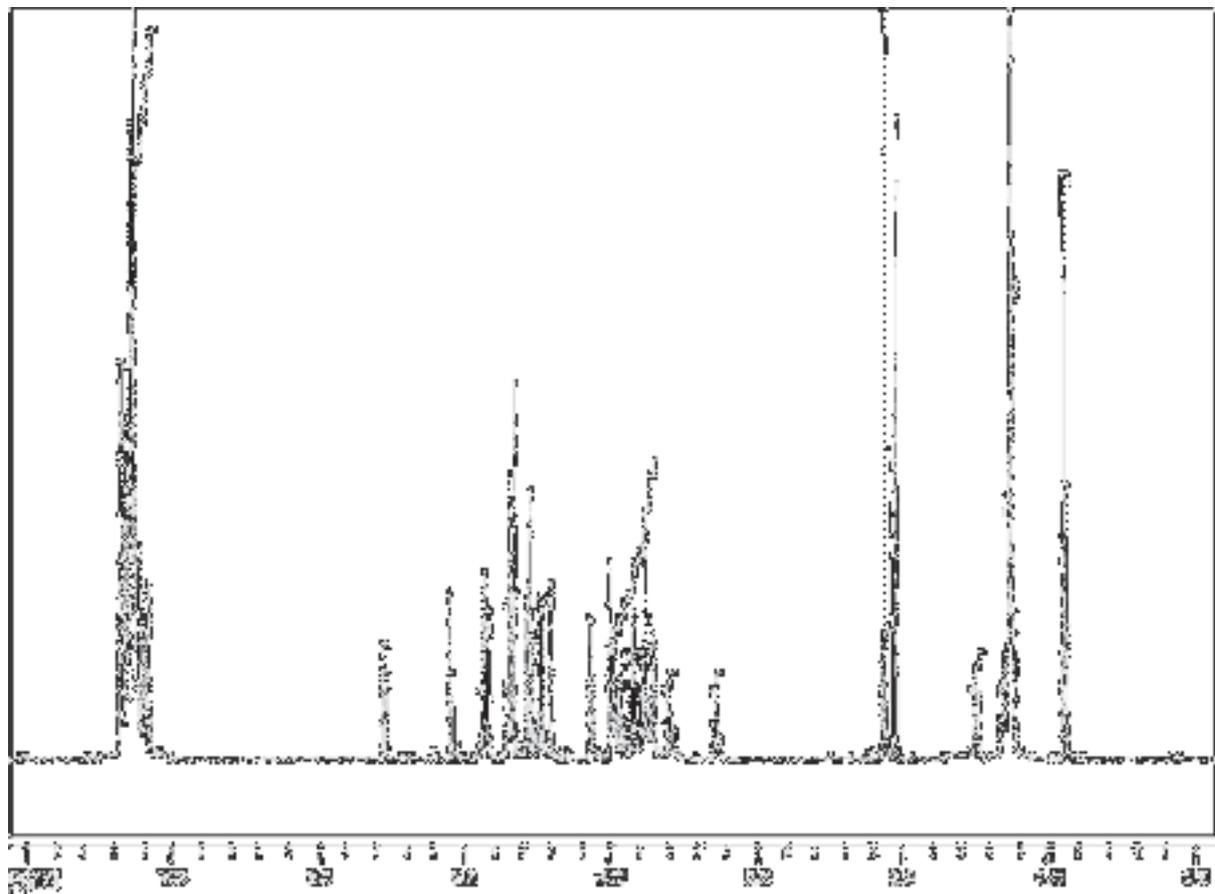
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **77-3** ( $\text{CDCl}_3$ , 151 MHz)



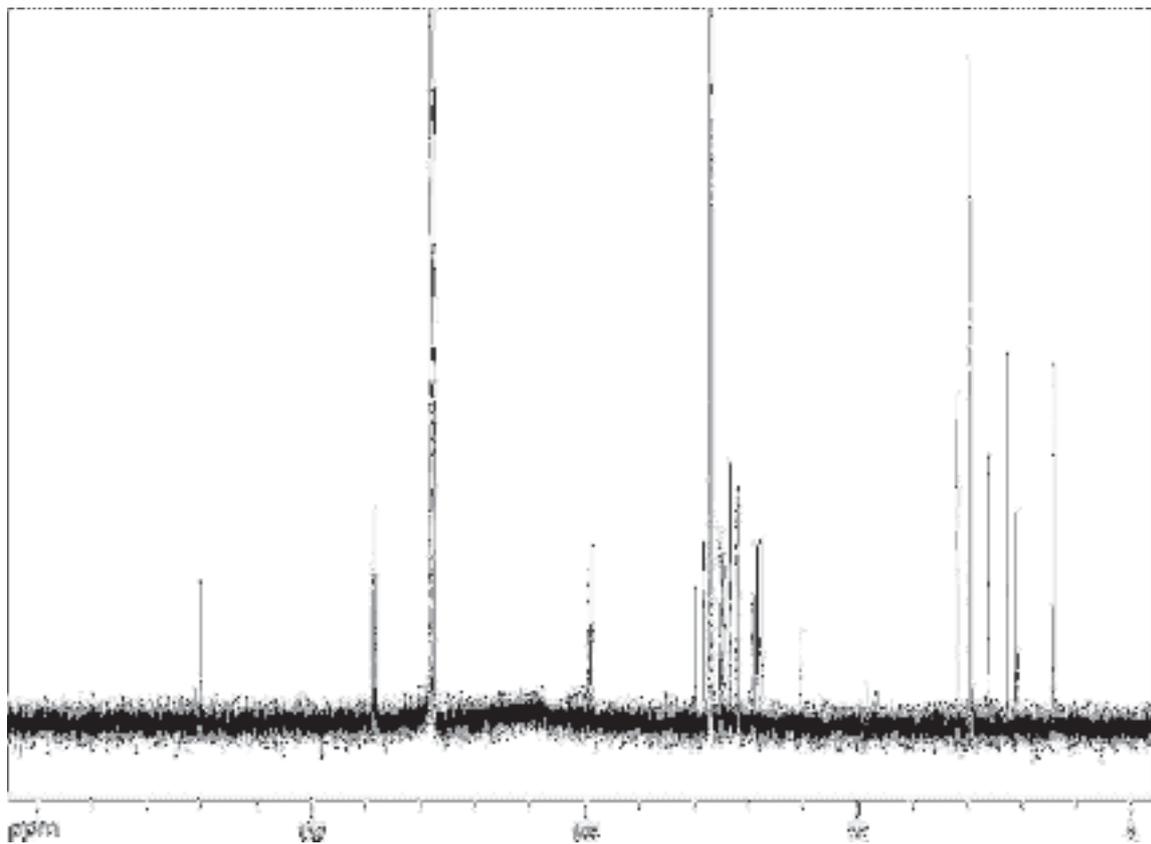
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **78-1** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)



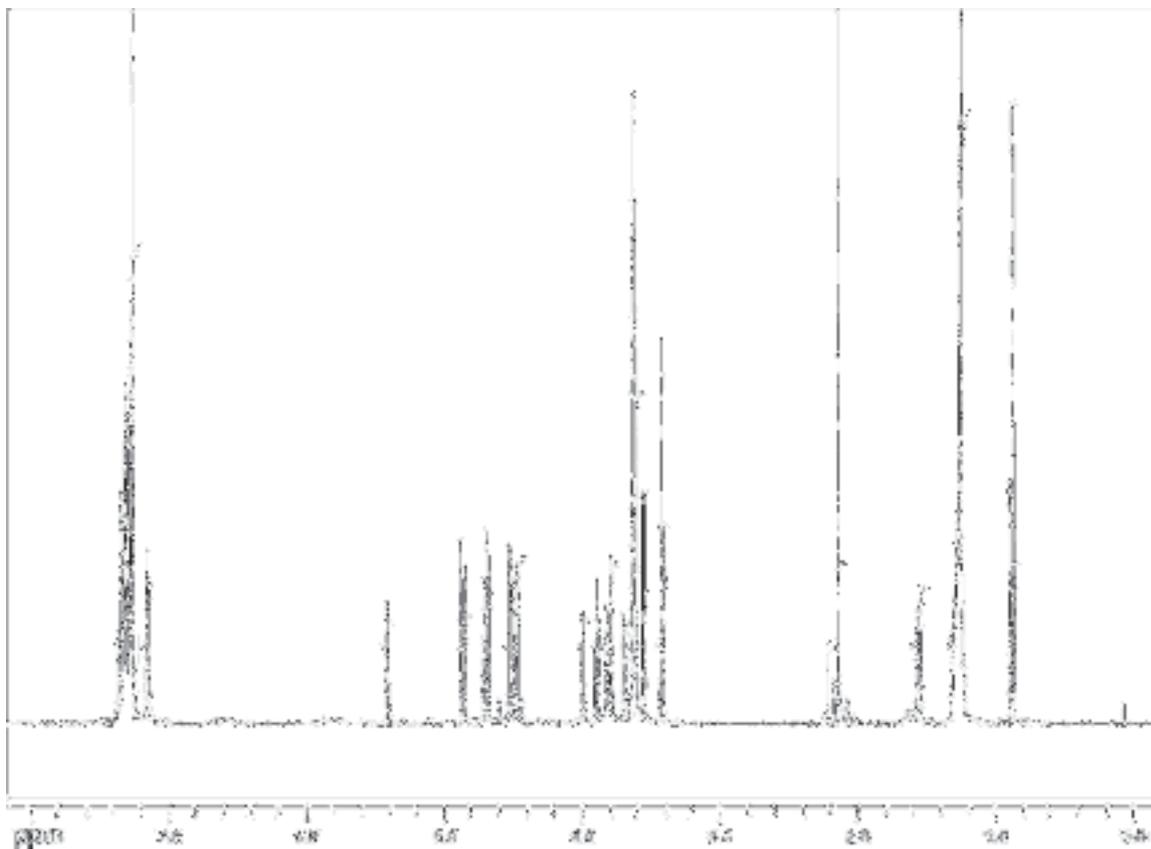
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **78-1** ( $\text{CDCl}_3$ , 151 MHz)



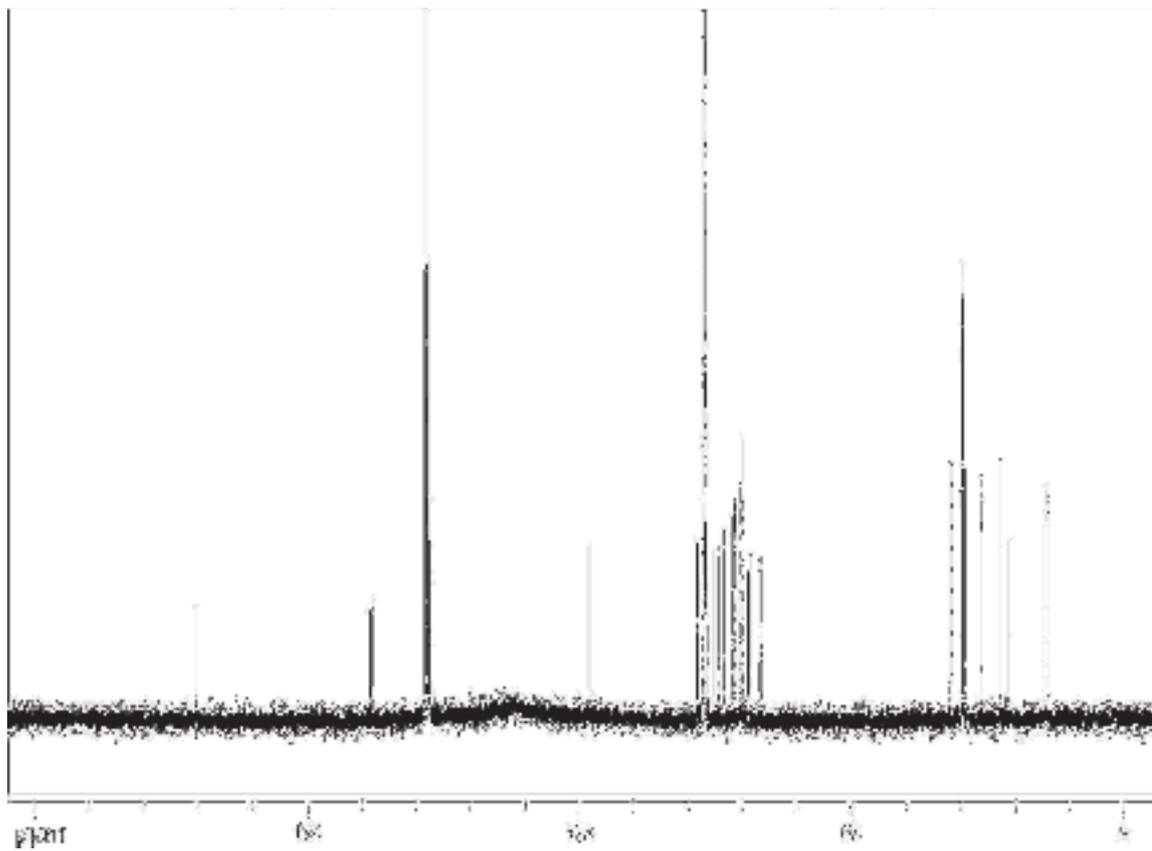
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **78-2** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)



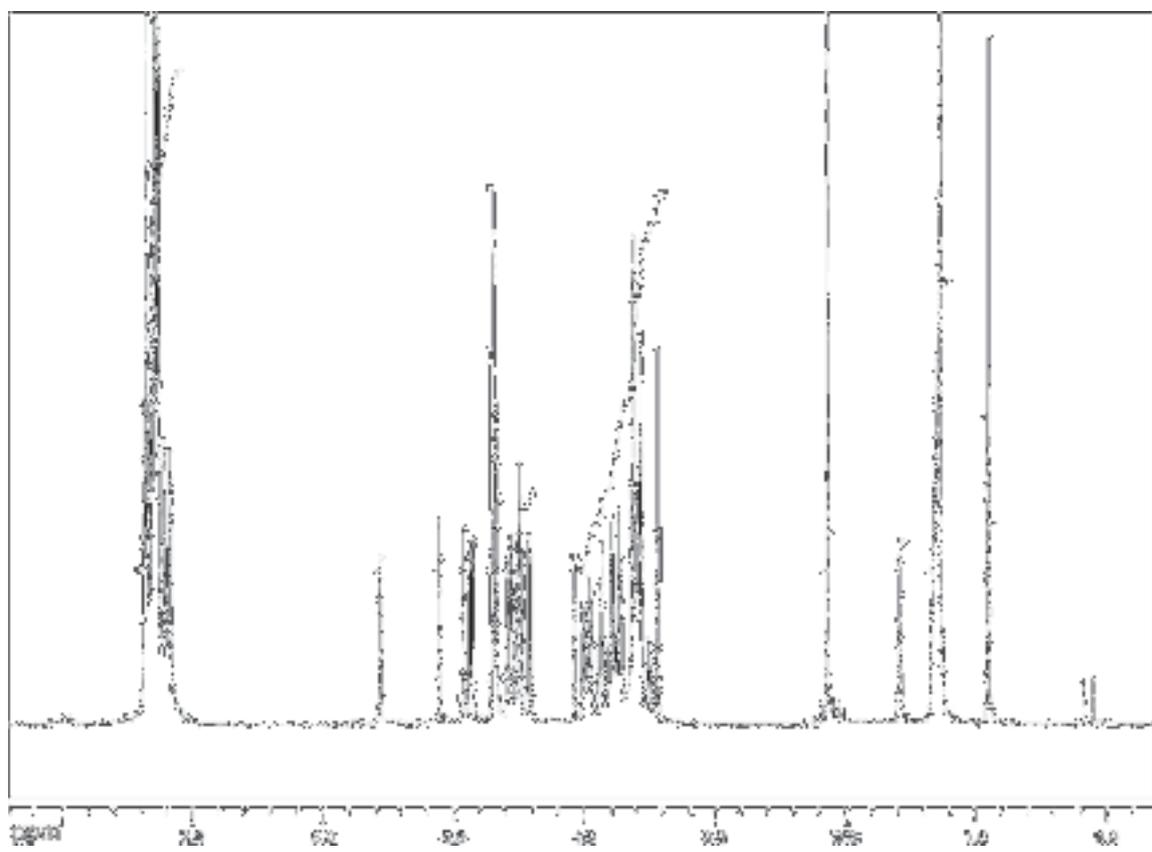
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **78-2** ( $\text{CDCl}_3$ , 151 MHz)



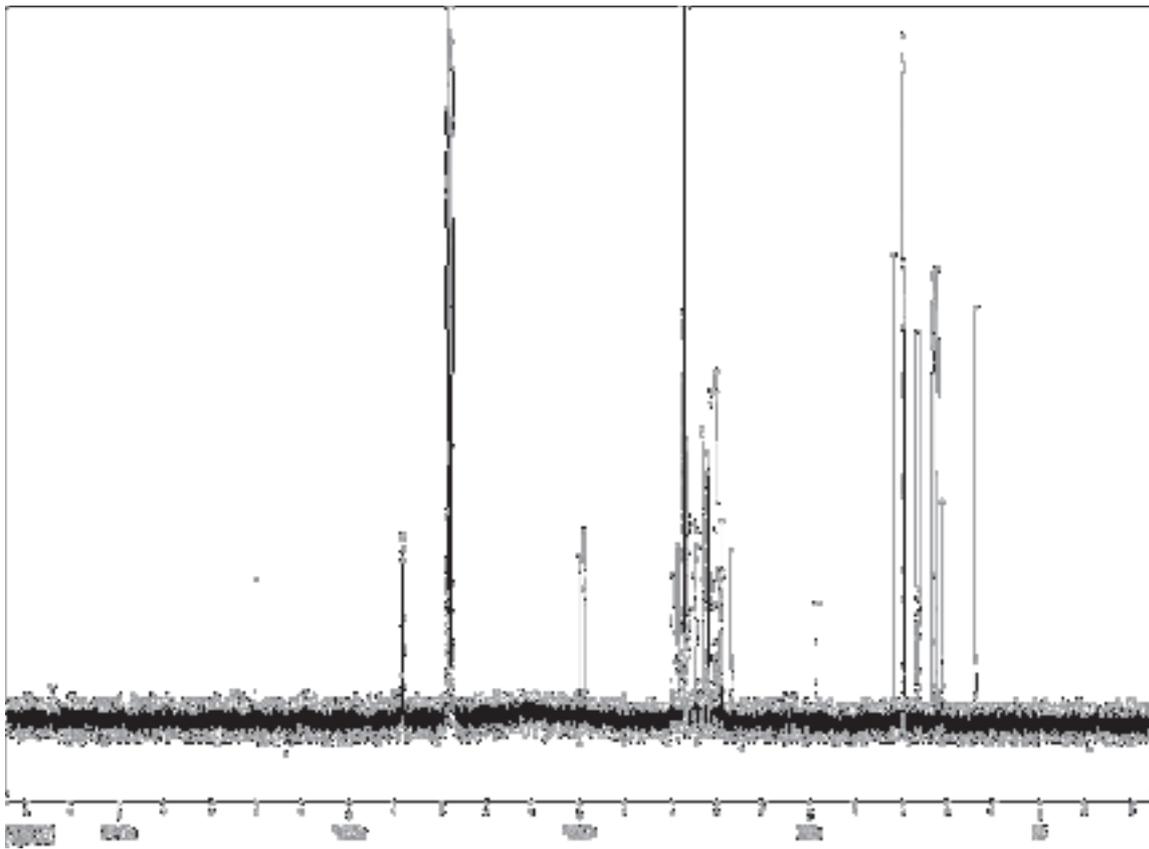
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **79-1** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)



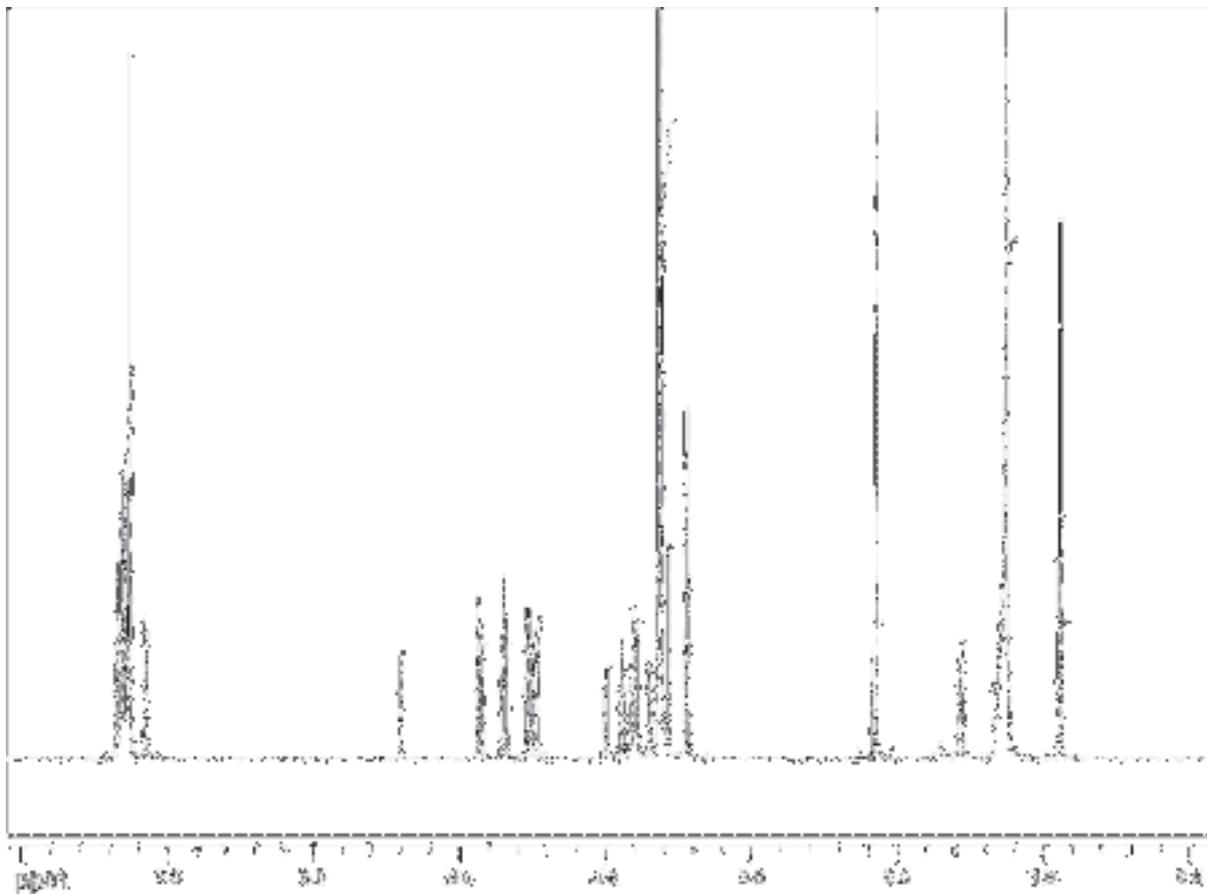
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **79-1** ( $\text{CDCl}_3$ , 151 MHz)



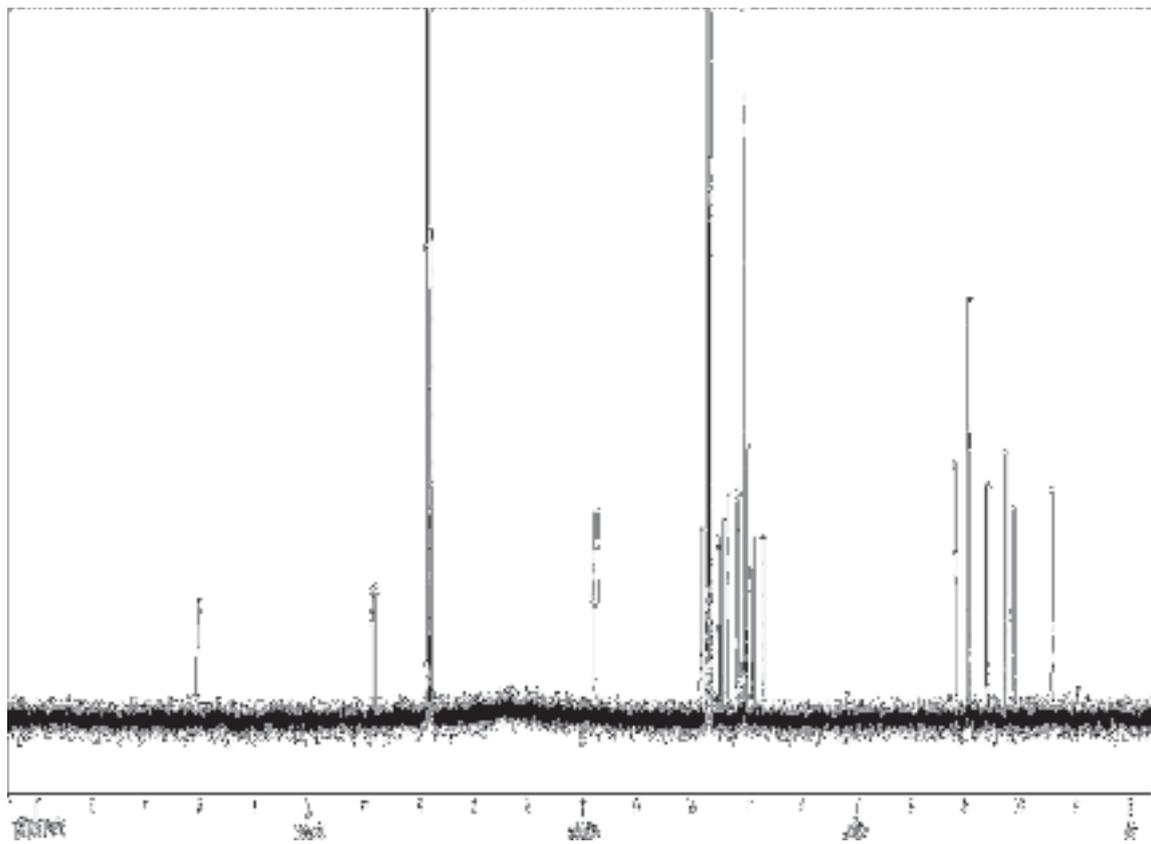
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **79-2** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)



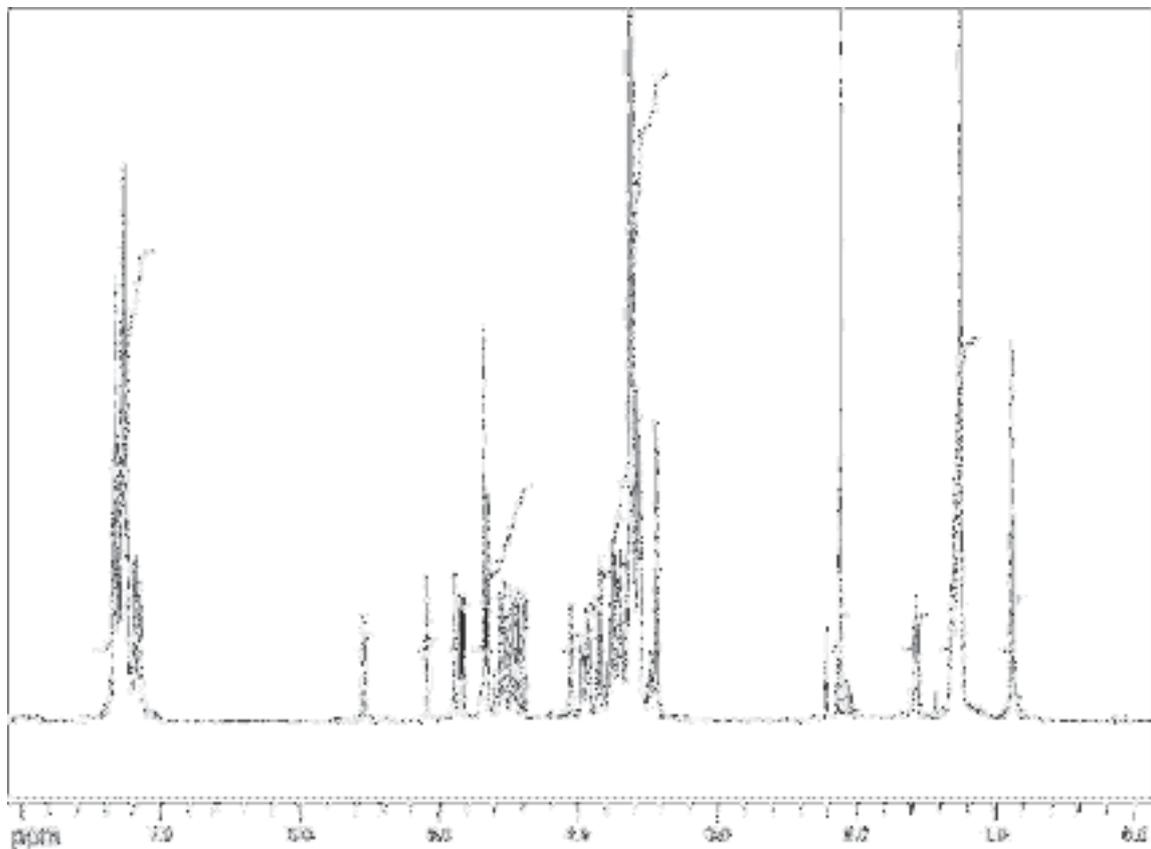
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **79-2** ( $\text{CDCl}_3$ , 151 MHz)



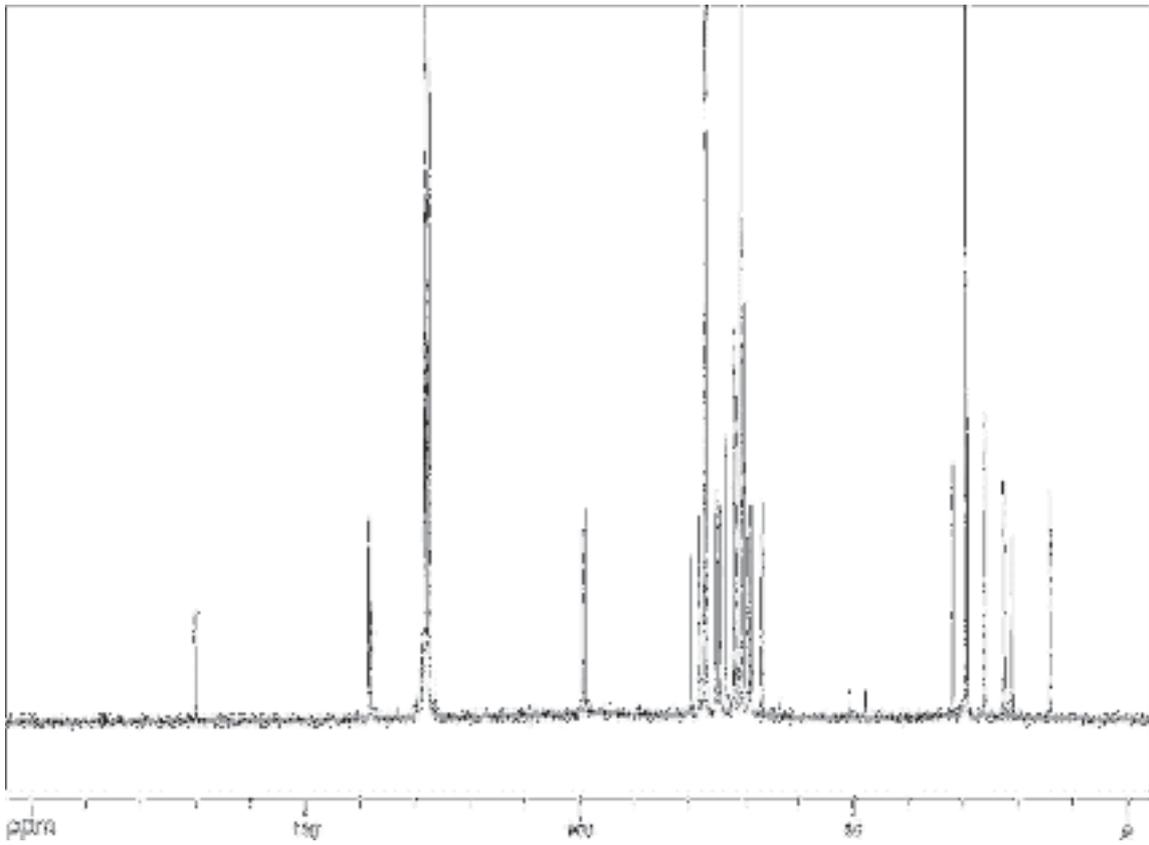
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **80-1** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)



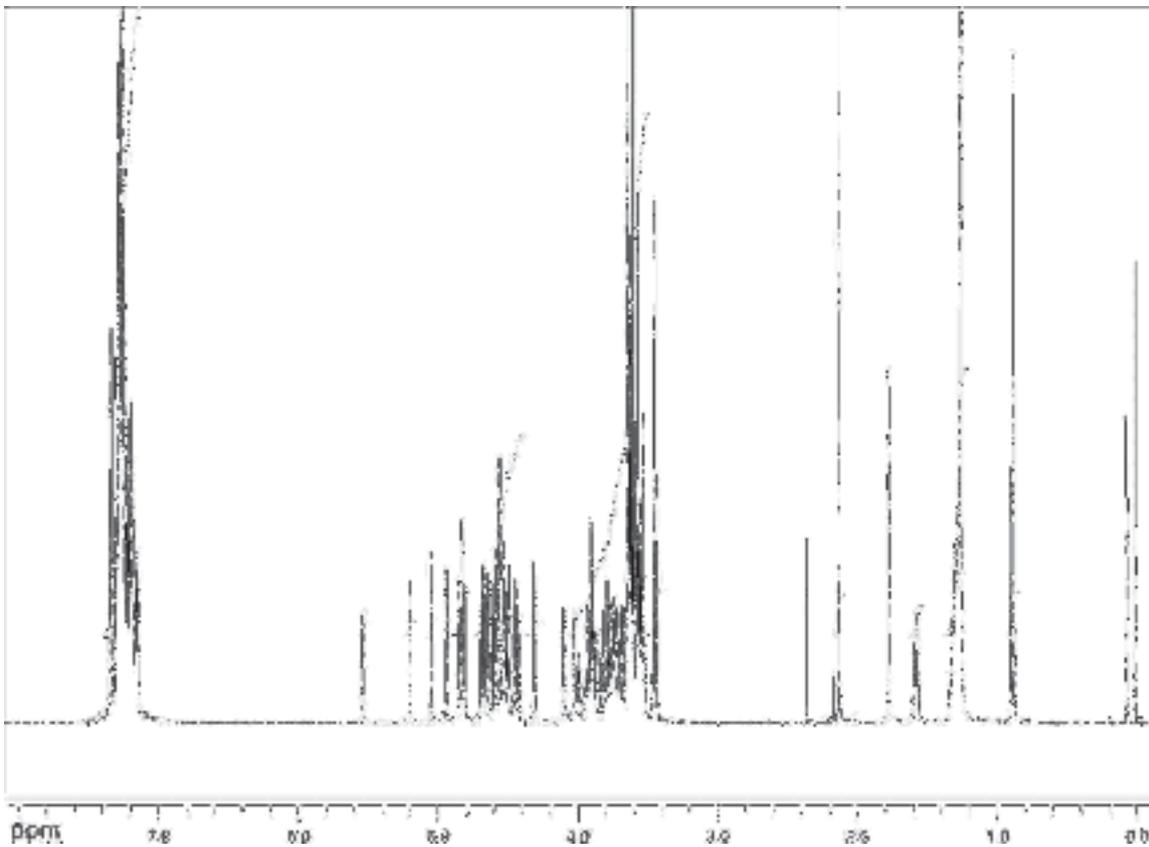
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **80-1** ( $\text{CDCl}_3$ , 151 MHz)



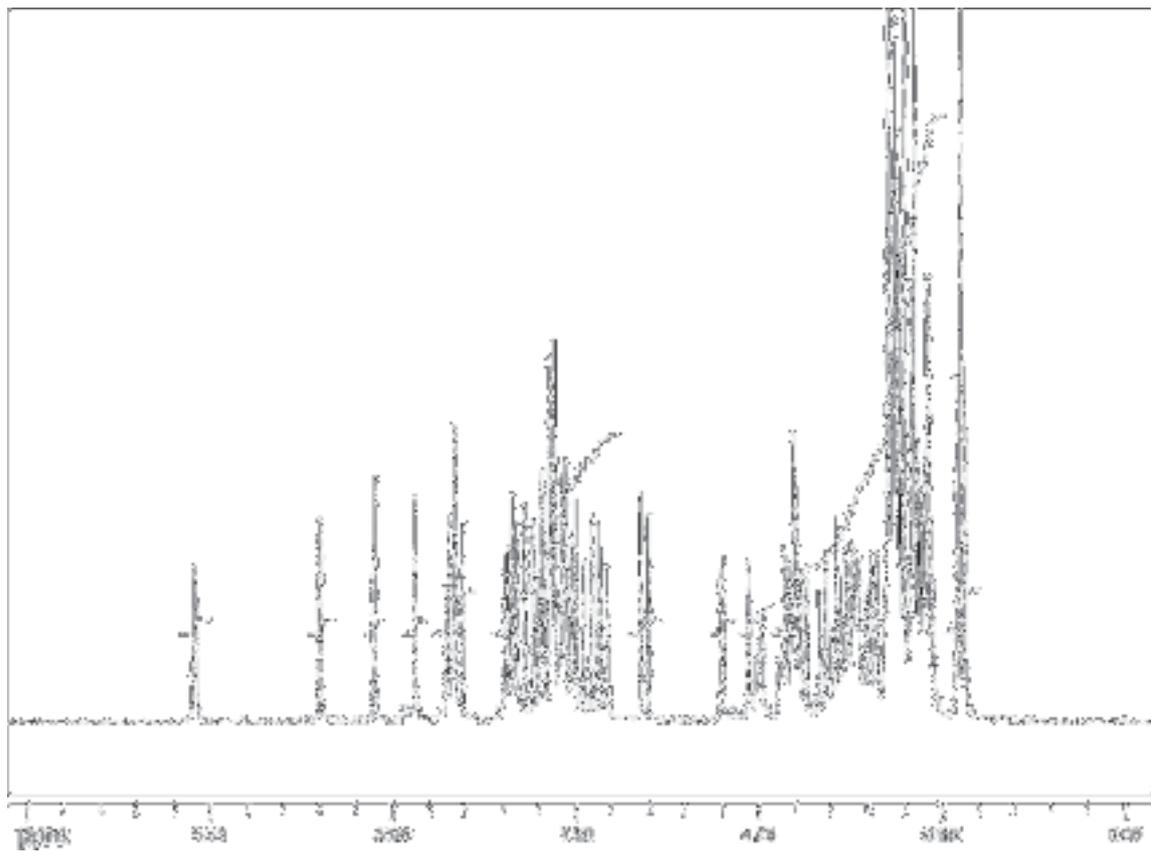
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **80-2** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)



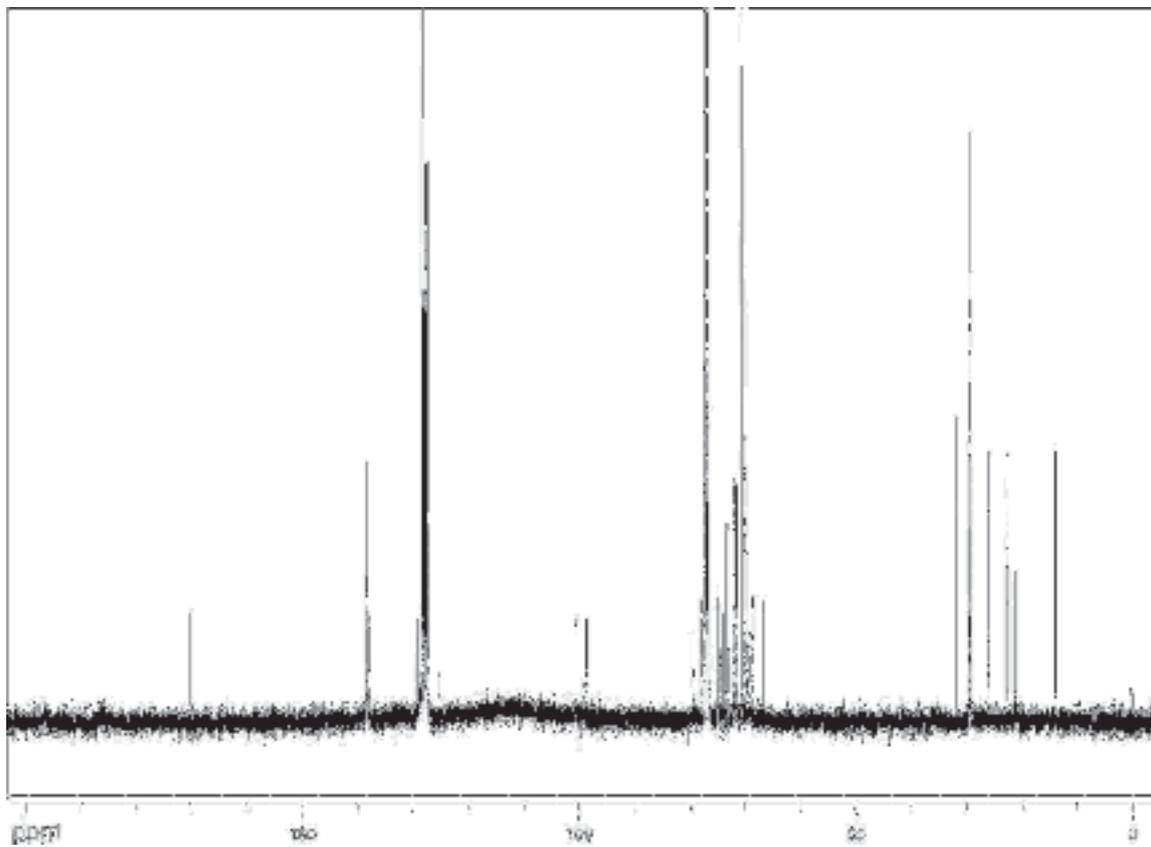
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **80-2** ( $\text{CDCl}_3$ , 151 MHz)



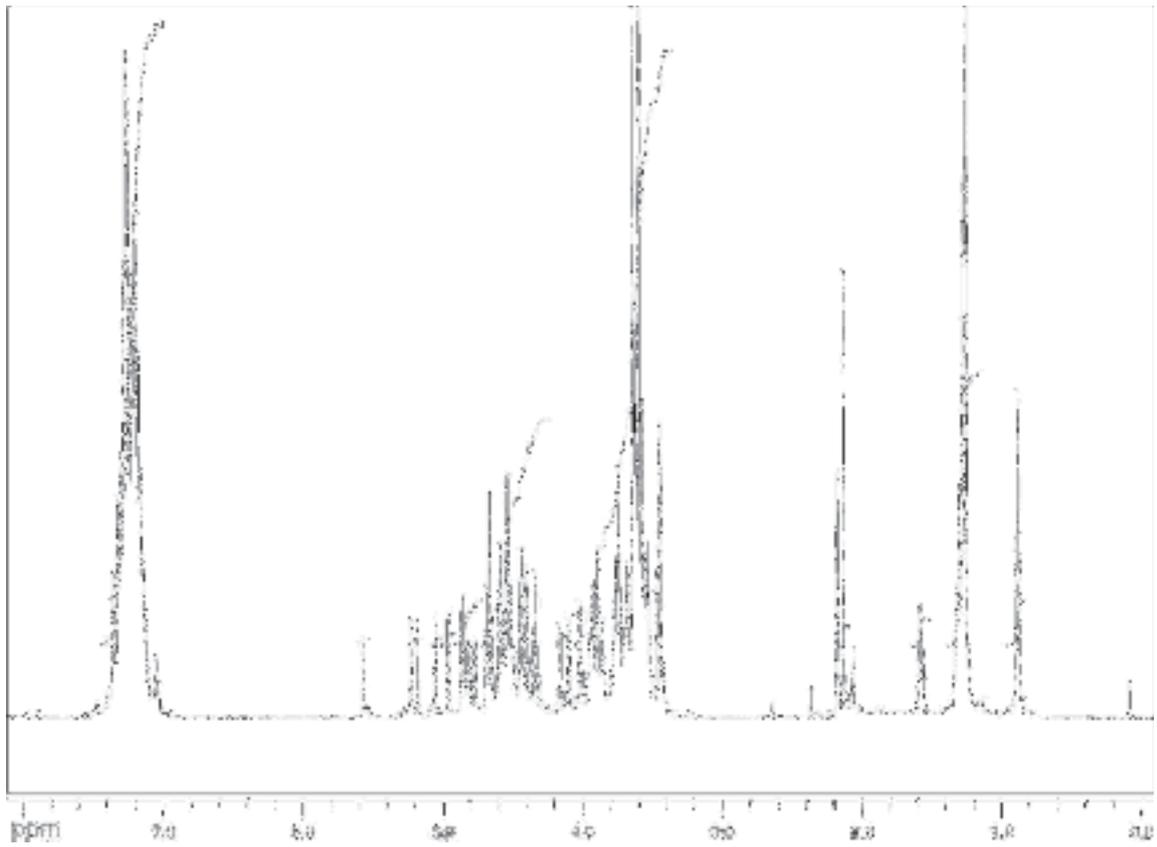
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **80-3** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)



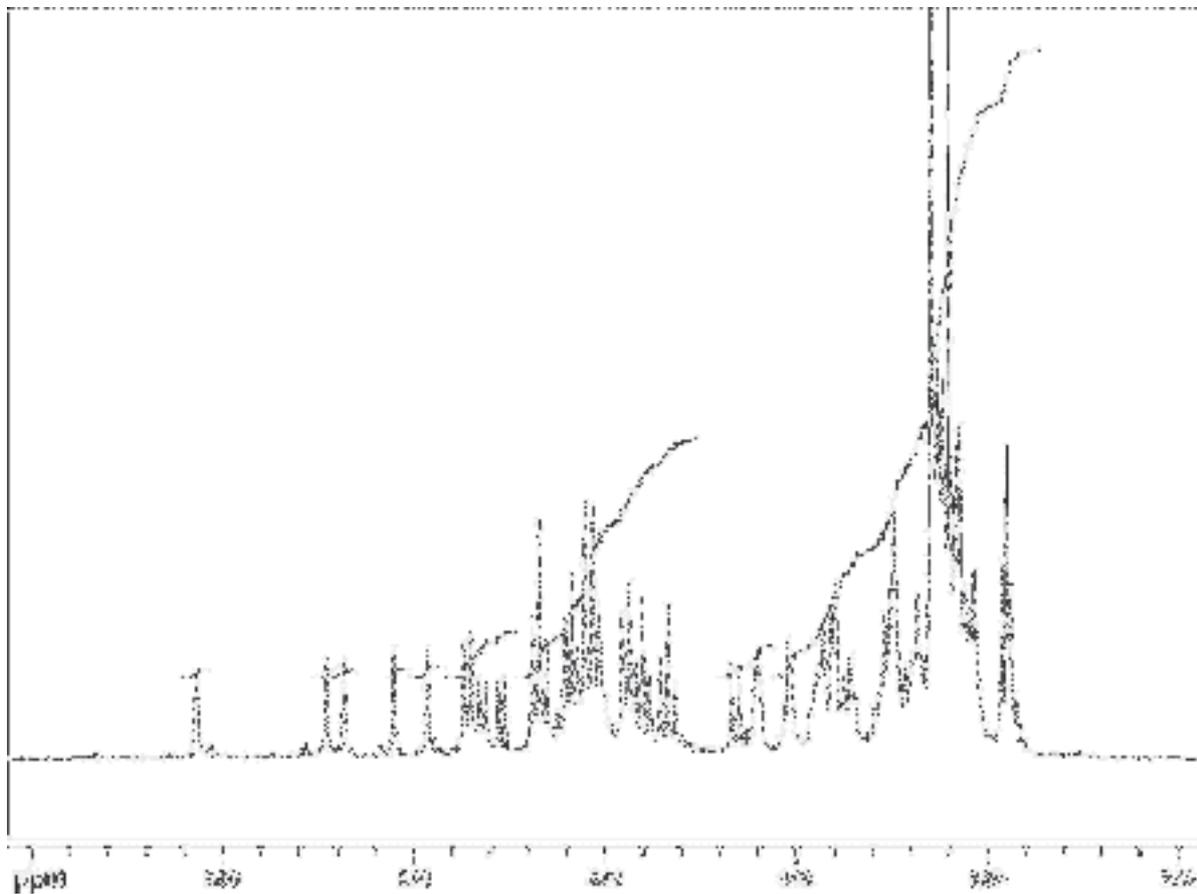
Ausschnitt aus dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **80-3** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)



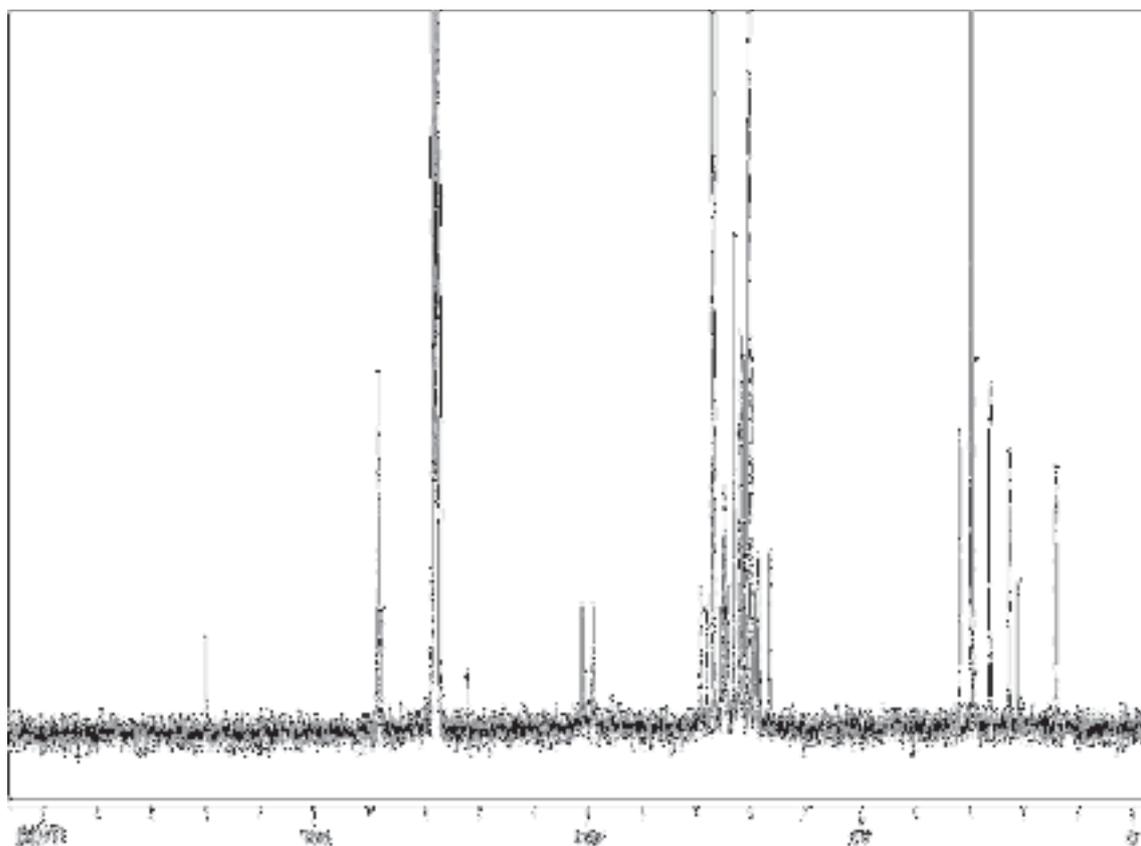
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **80-3** ( $\text{CDCl}_3$ , 151 MHz)



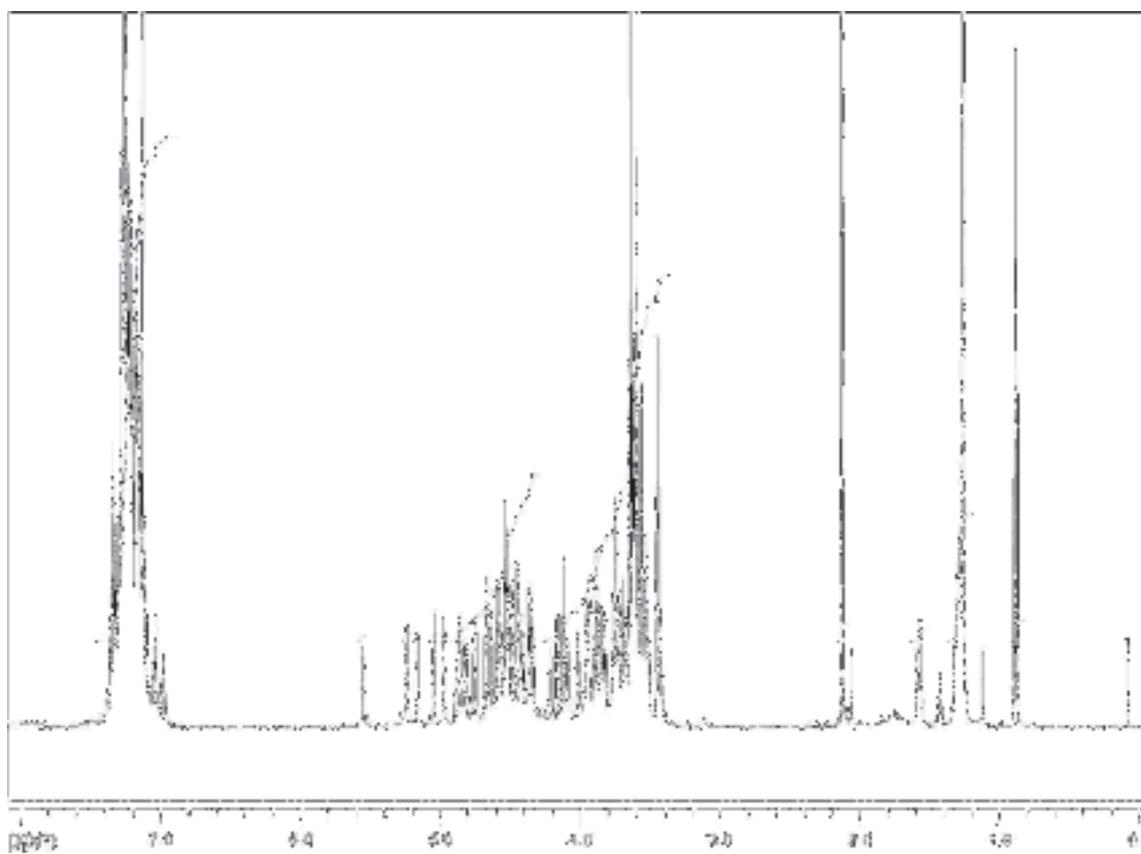
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **80-4** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)



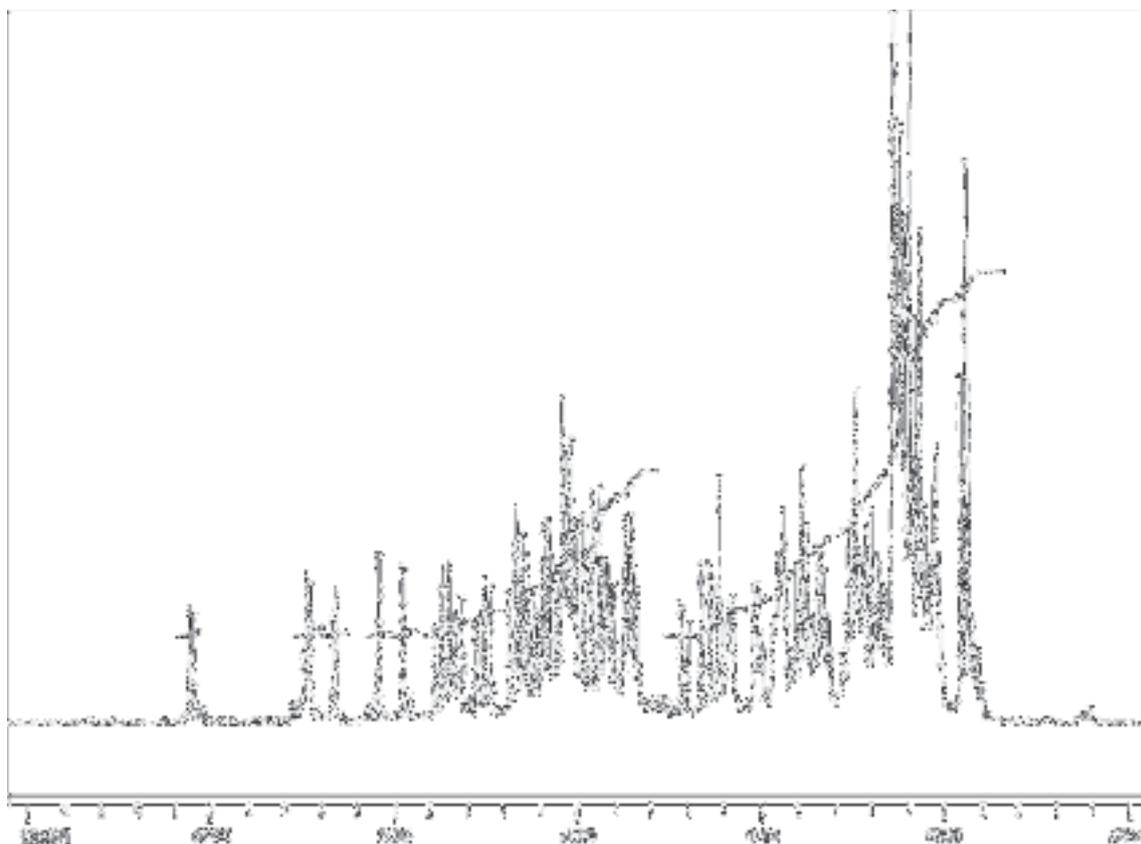
Ausschnitt aus dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **80-4** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)



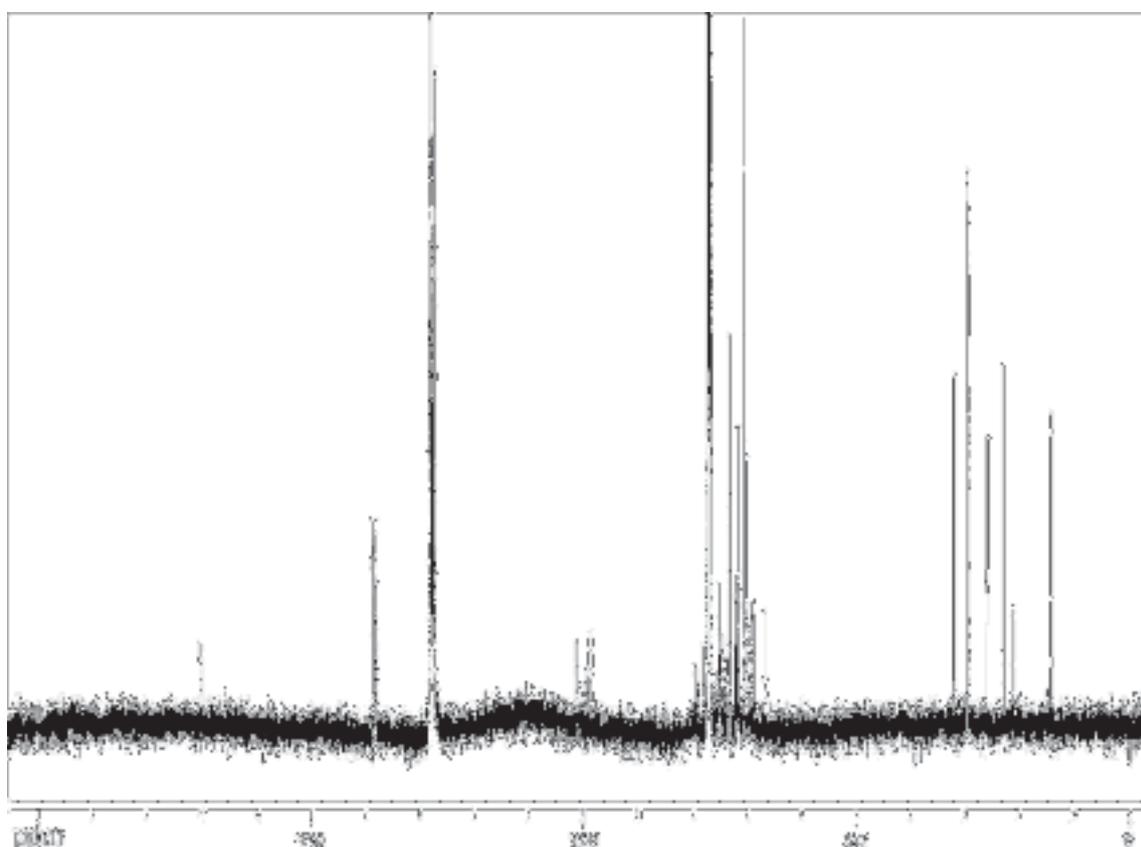
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **80-4** ( $\text{CDCl}_3$ , 151 MHz)



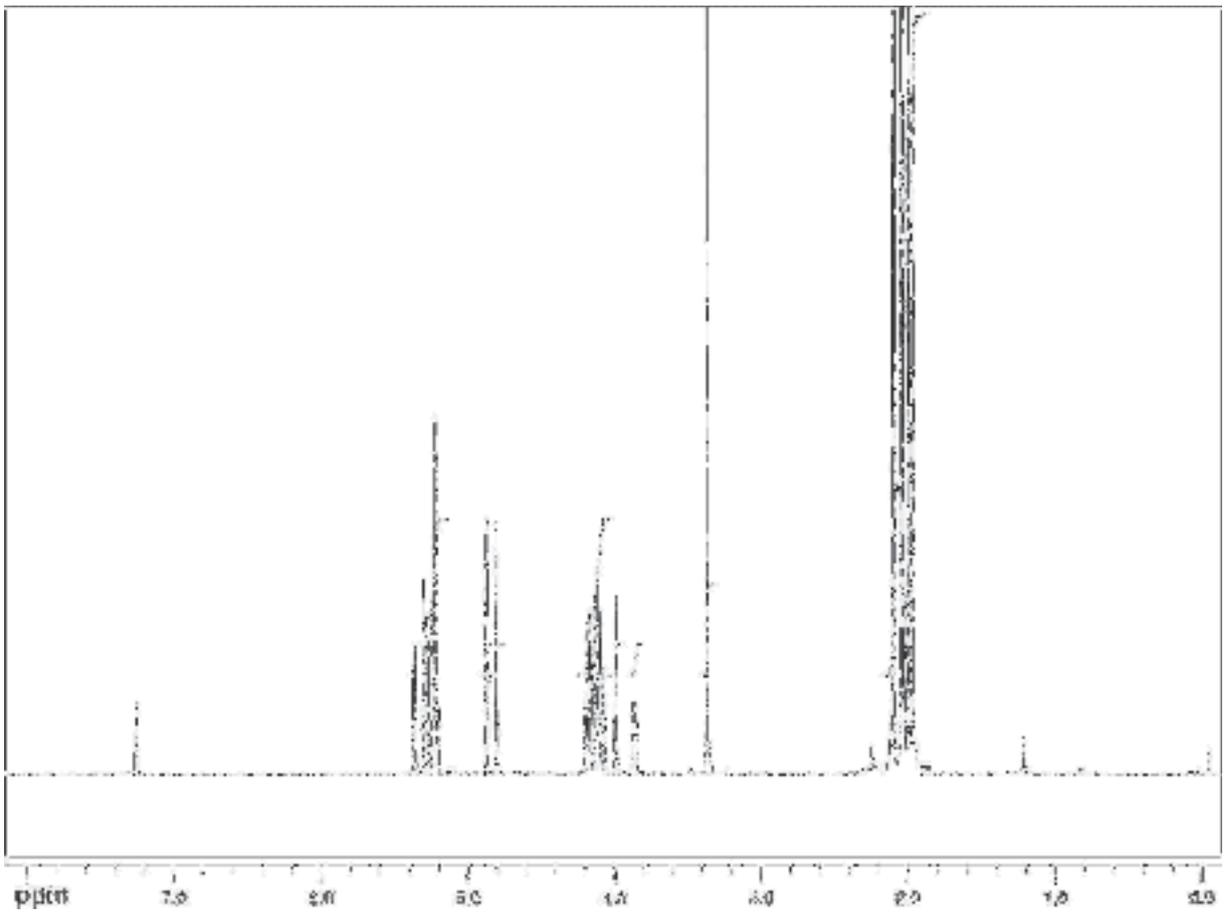
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **80-5** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)



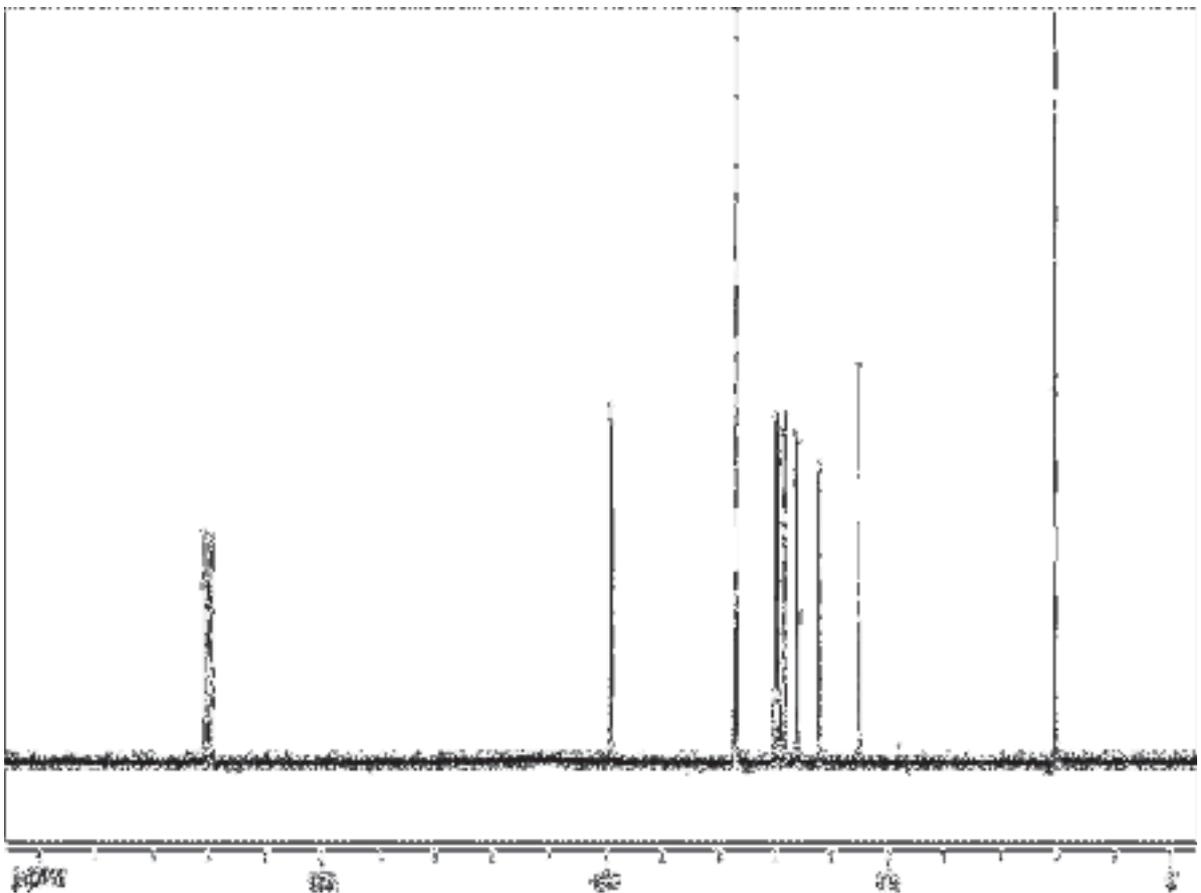
Ausschnitt aus dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **80-5** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)



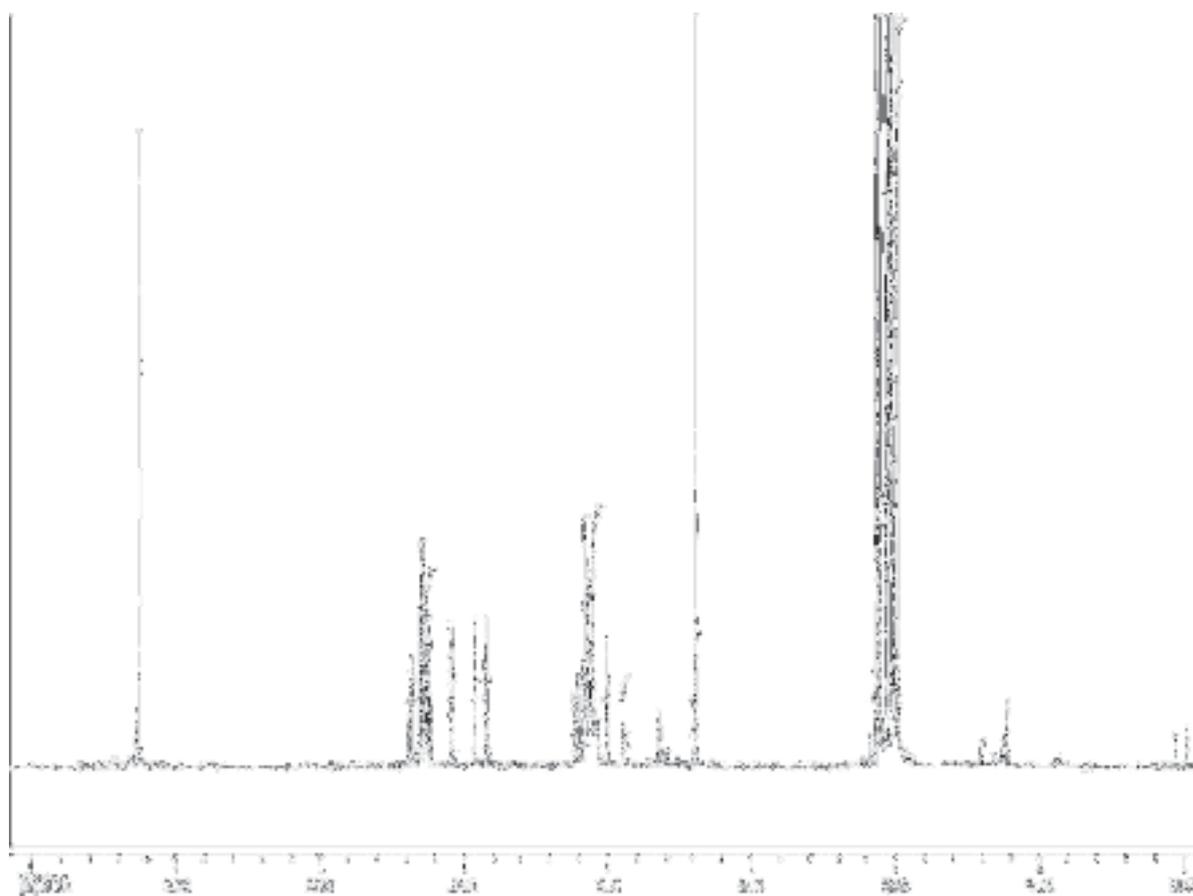
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **80-5** ( $\text{CDCl}_3$ , 151 MHz)



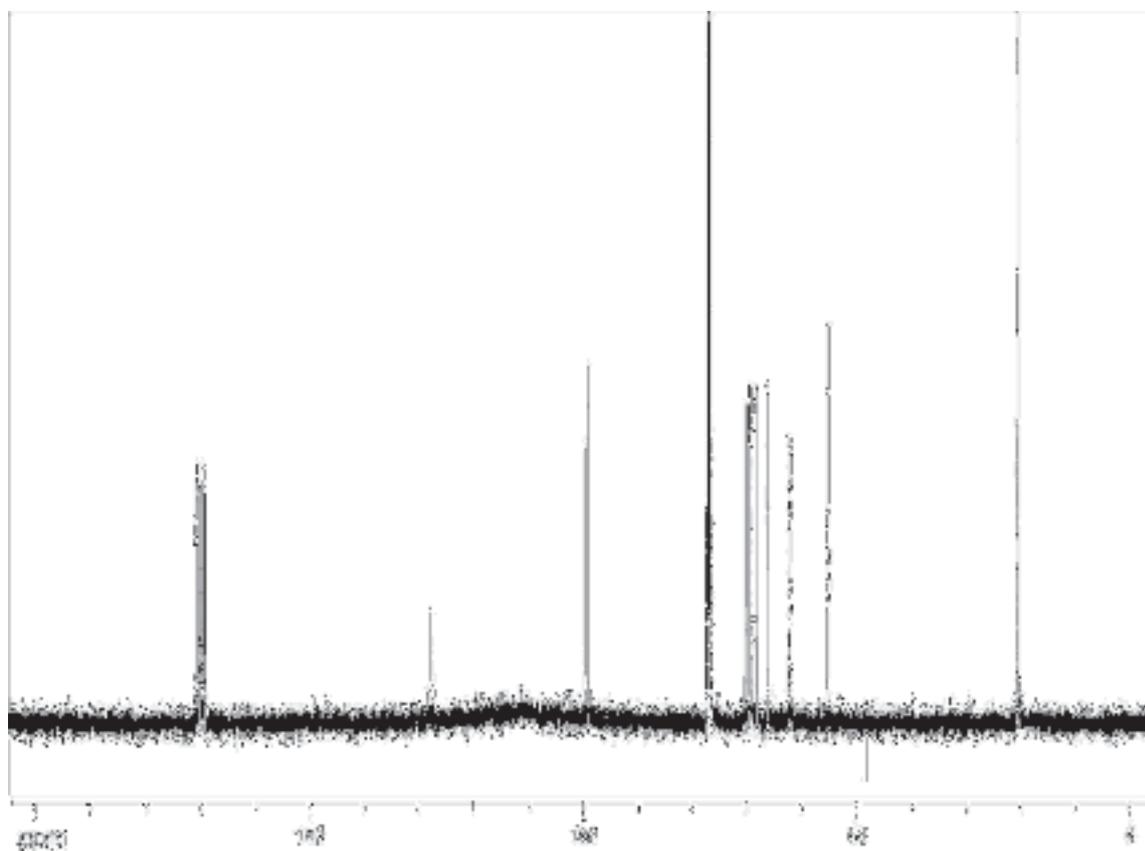
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **85-2** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)



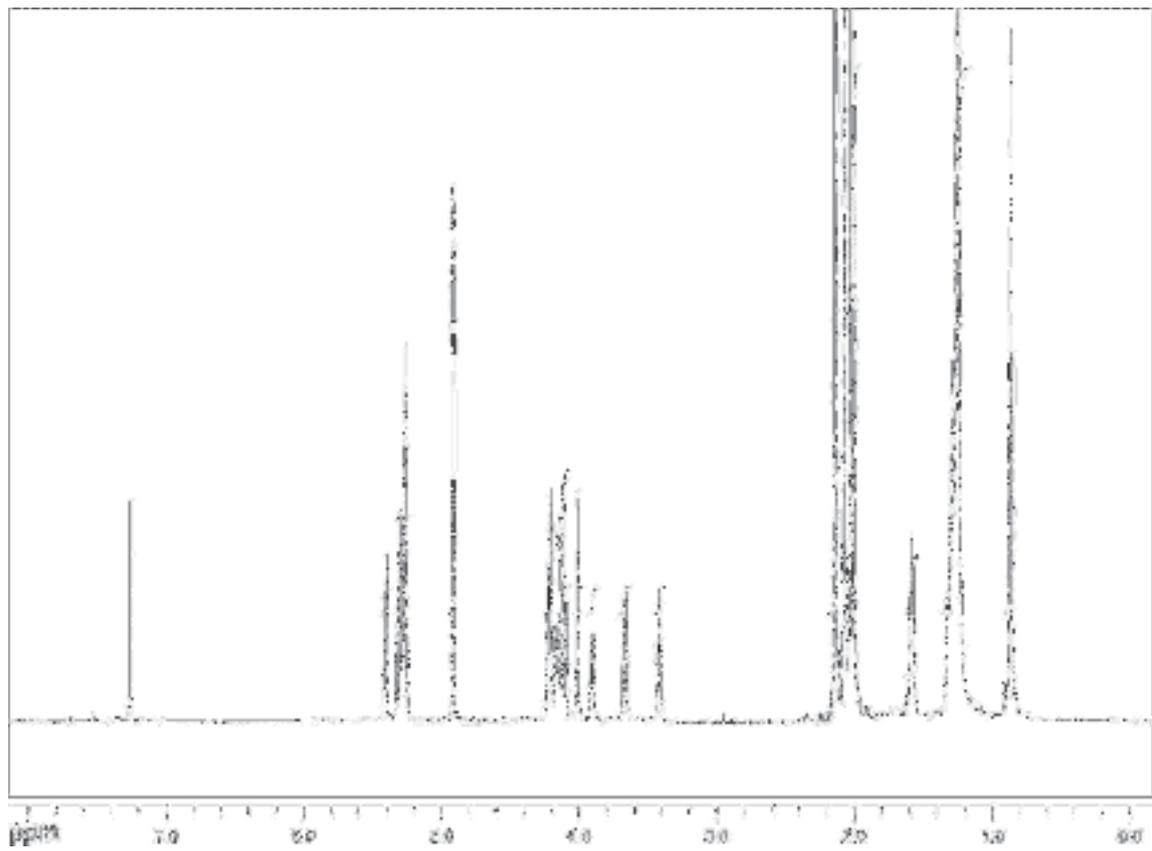
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **85-2** ( $\text{CDCl}_3$ , 151 MHz)



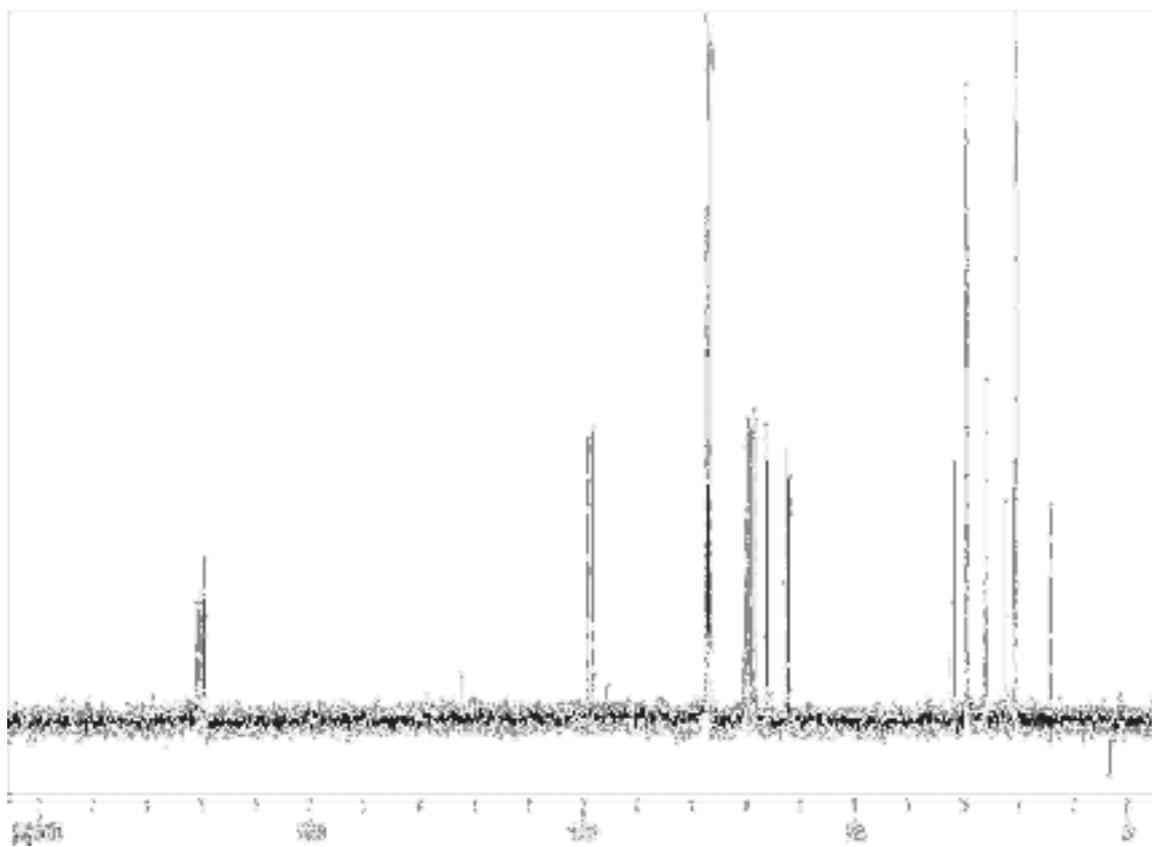
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **85-3** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)



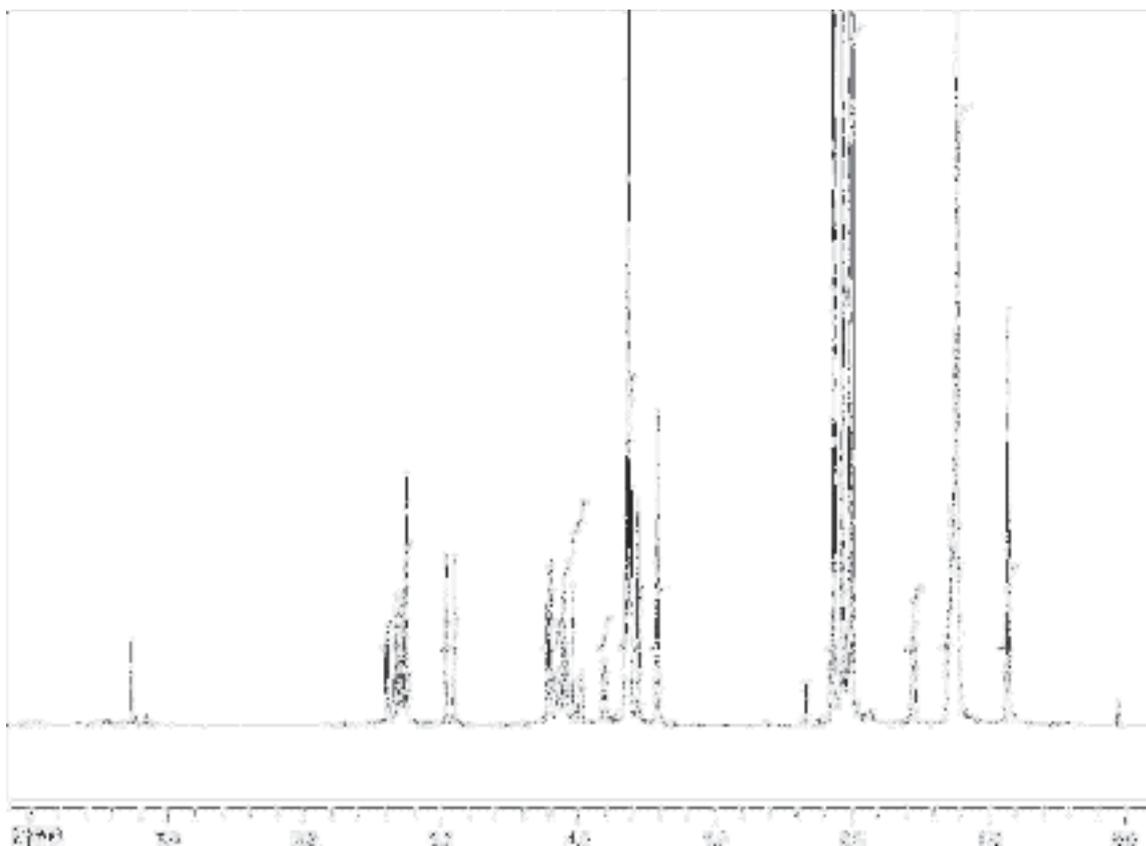
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **85-3** ( $\text{CDCl}_3$ , 151 MHz)



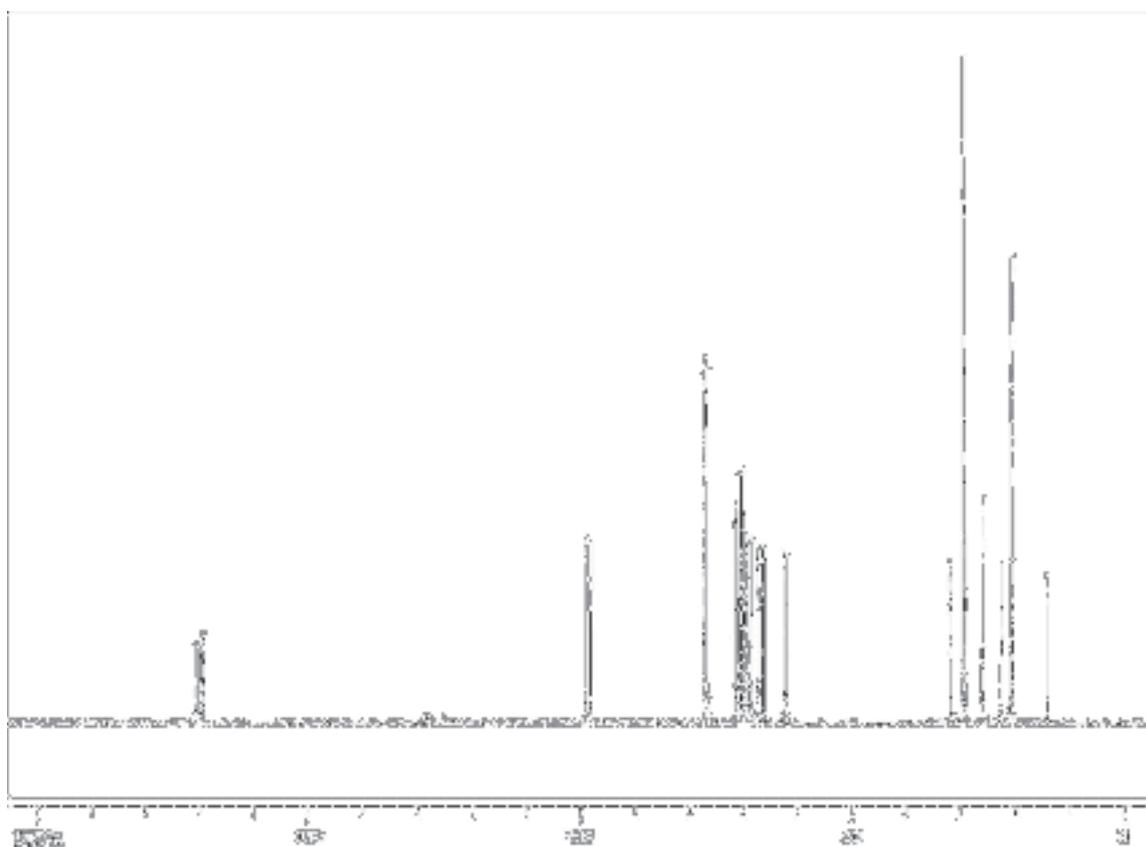
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **86-2** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)



$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **86-2** ( $\text{CDCl}_3$ , 151 MHz)

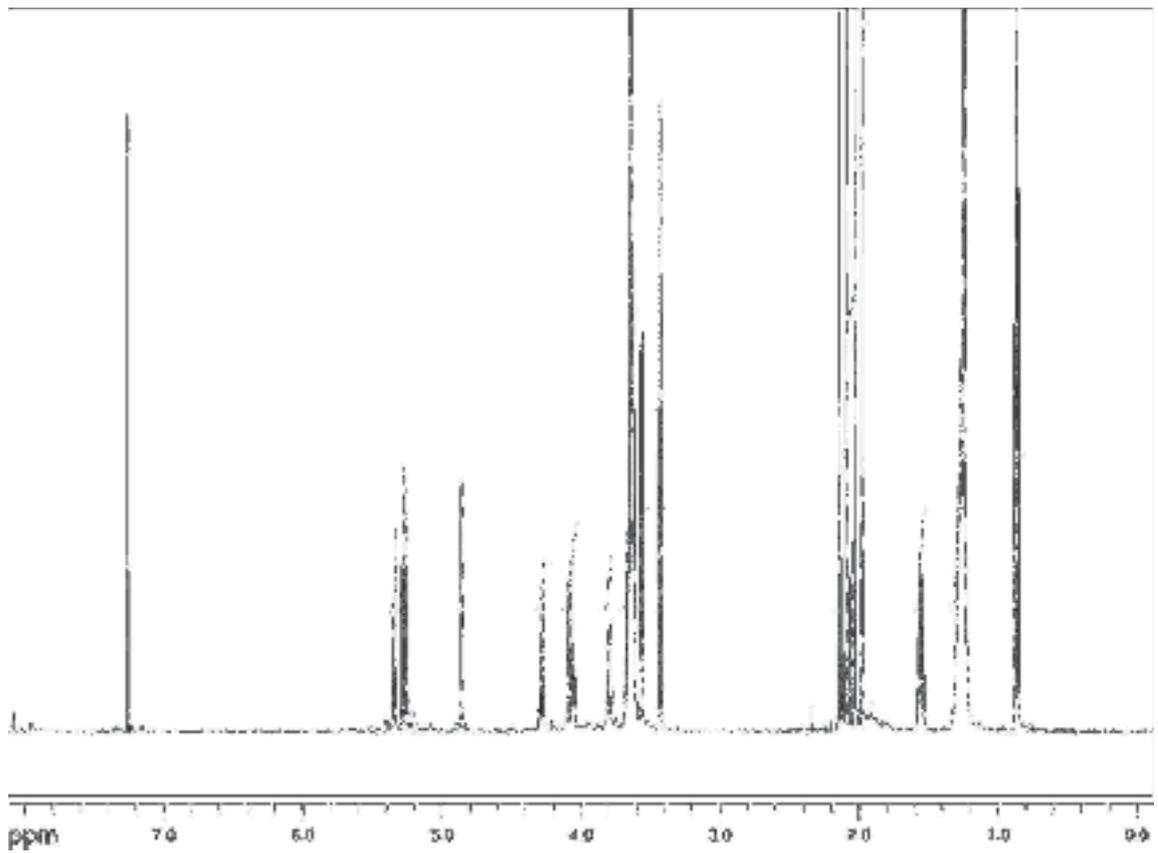


$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **87-2** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)

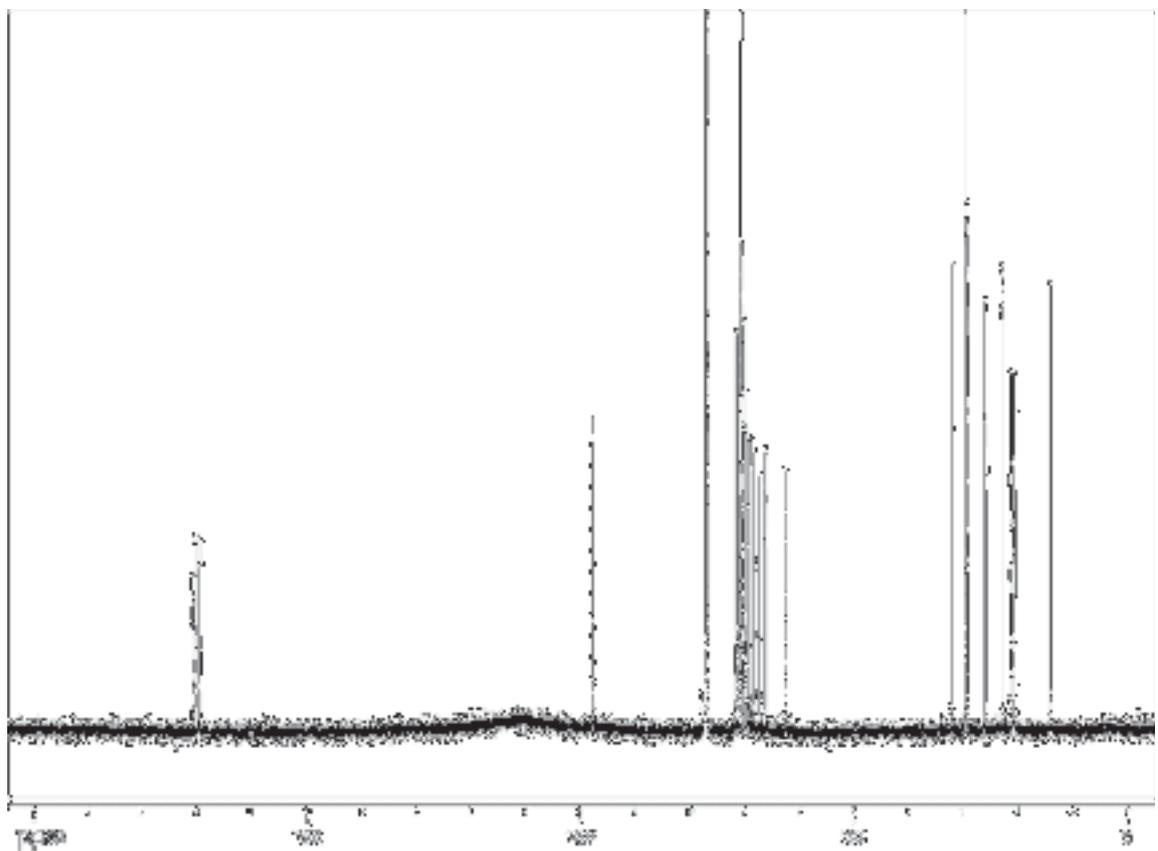


$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **87-2** ( $\text{CDCl}_3$ , 151 MHz)

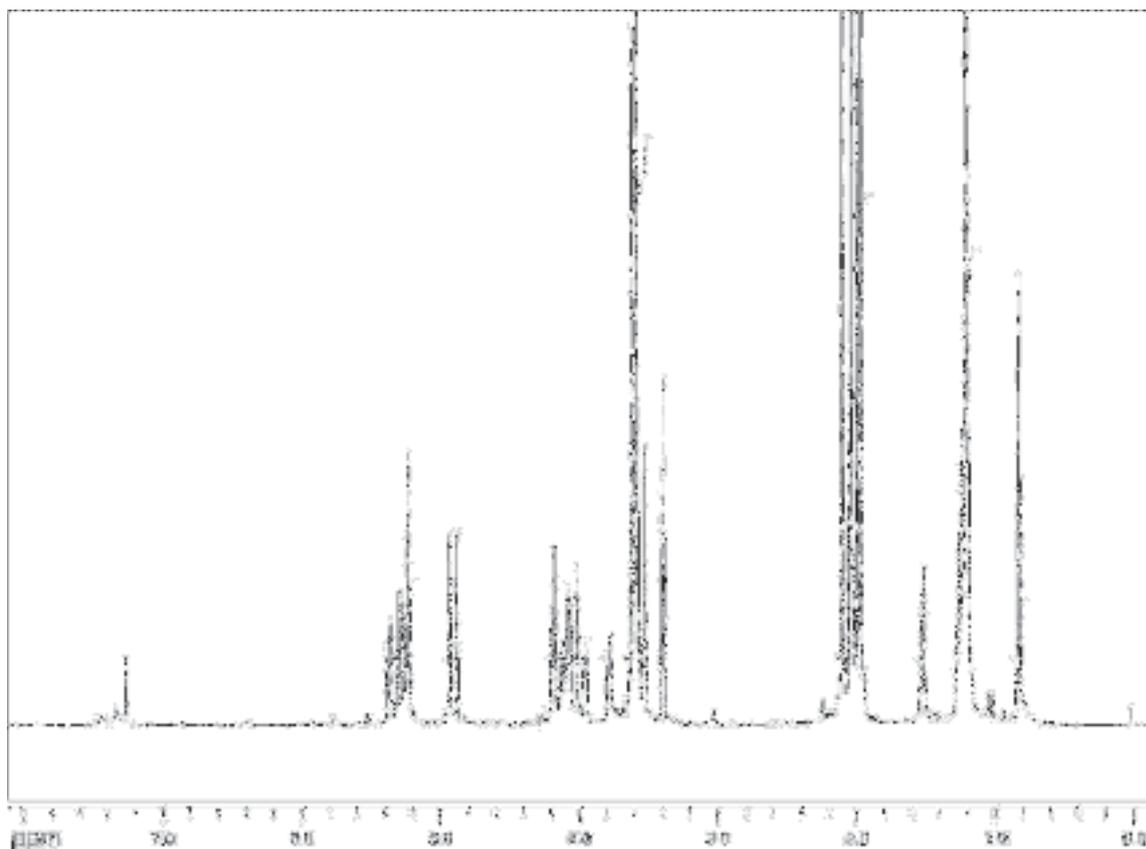
## 7 Abbildung der Spektren



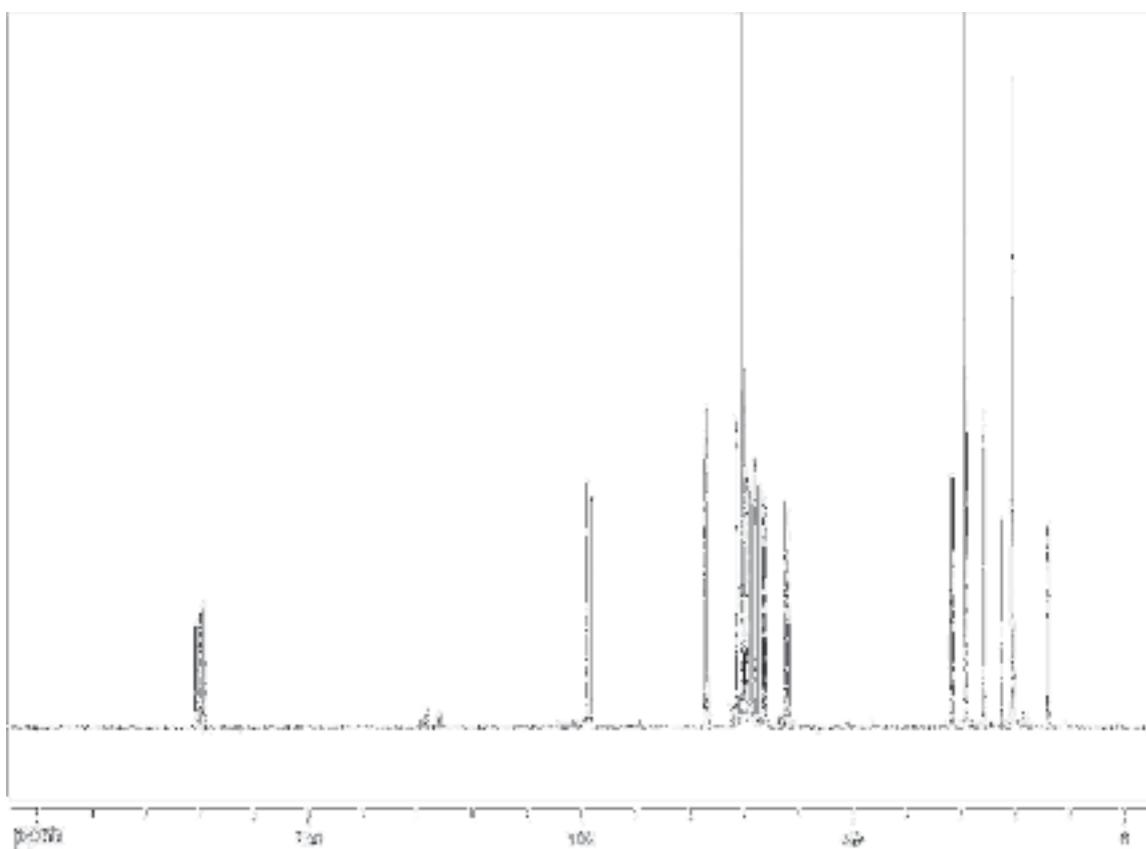
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **88-1** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)



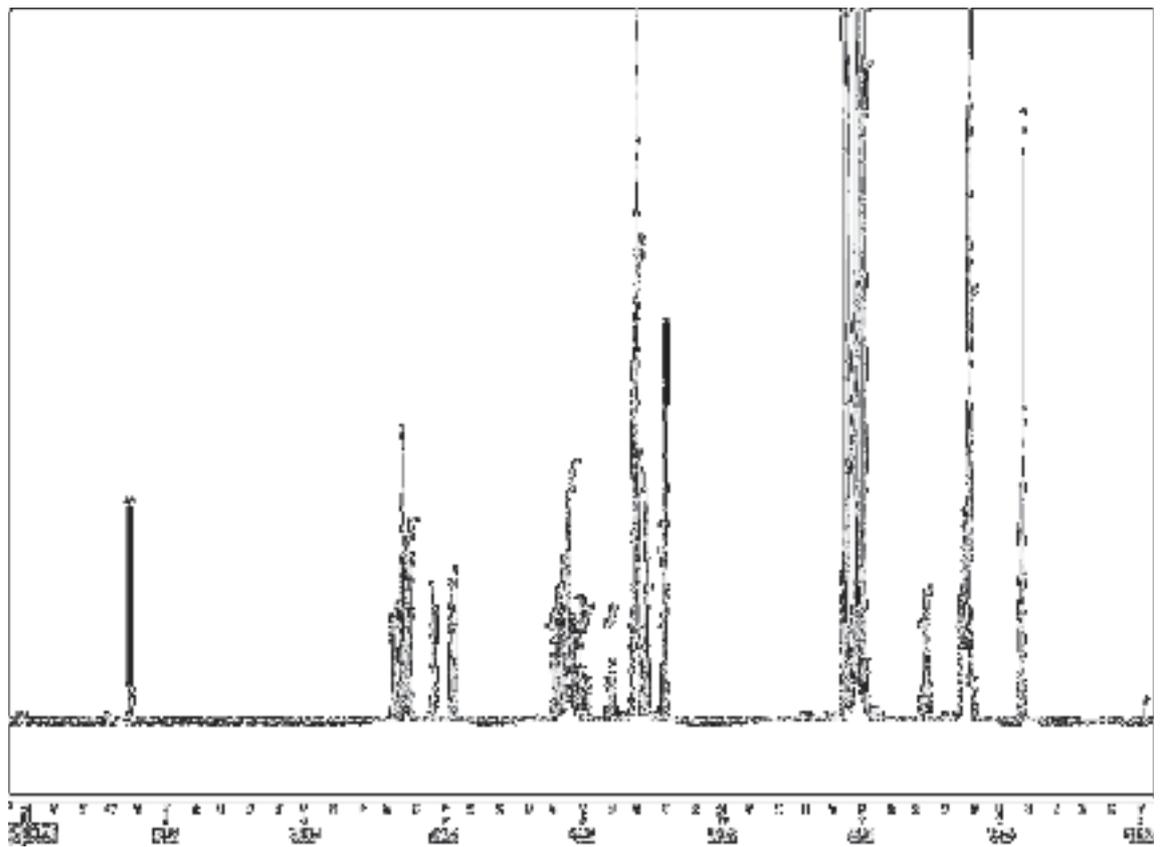
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **88-1** ( $\text{CDCl}_3$ , 151 MHz)



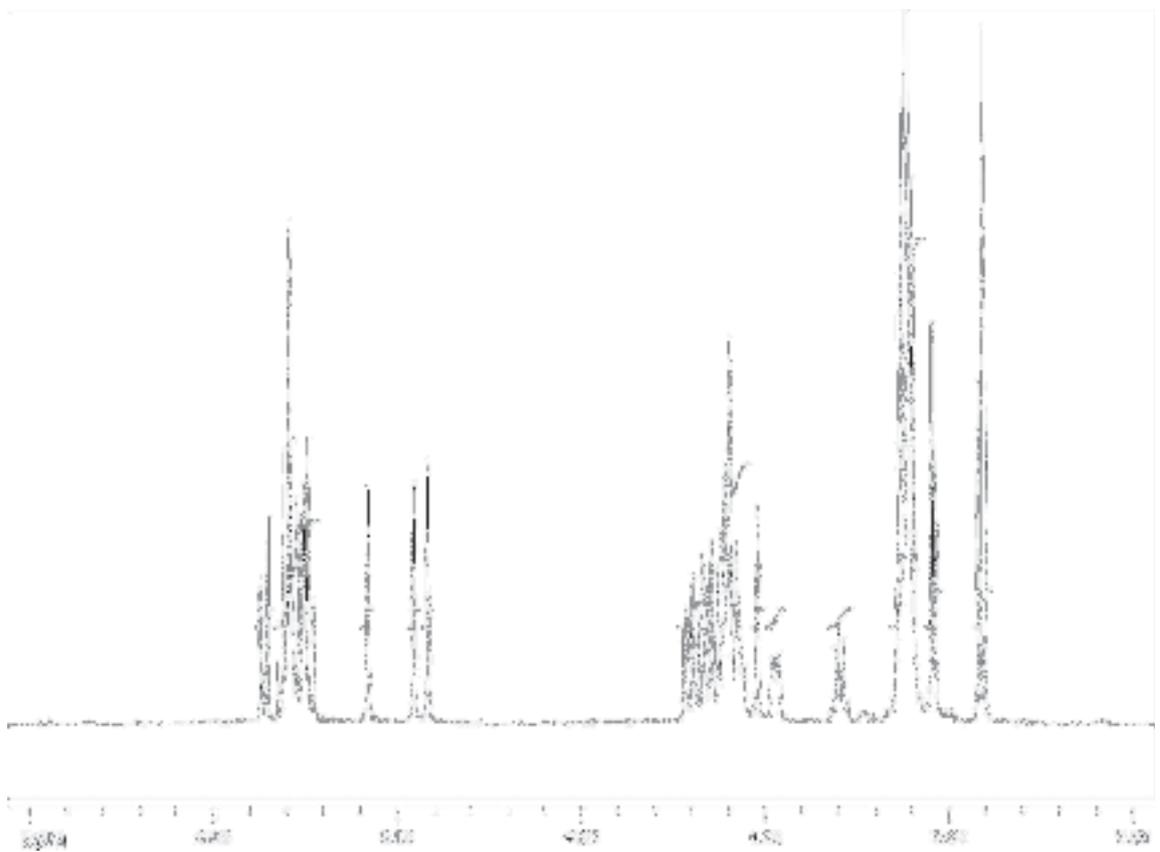
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **88-2** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)



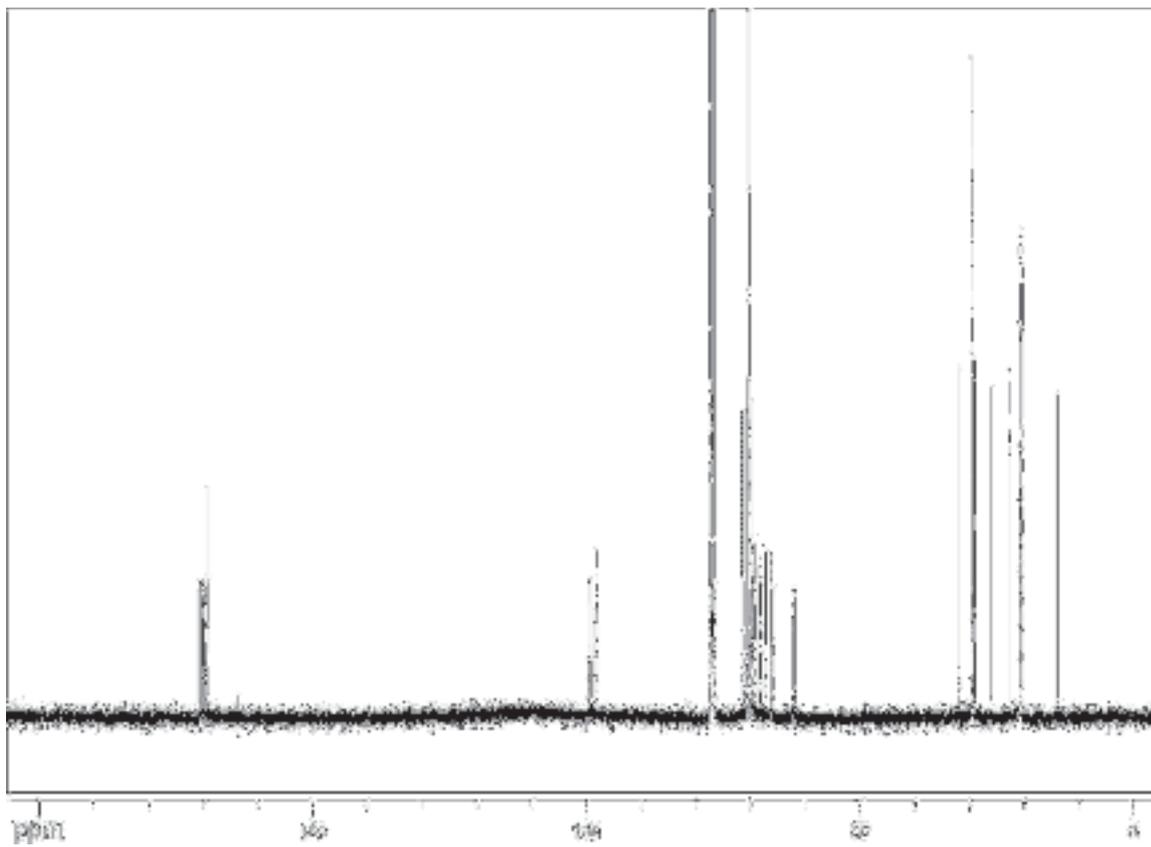
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **88-2** ( $\text{CDCl}_3$ , 151 MHz)



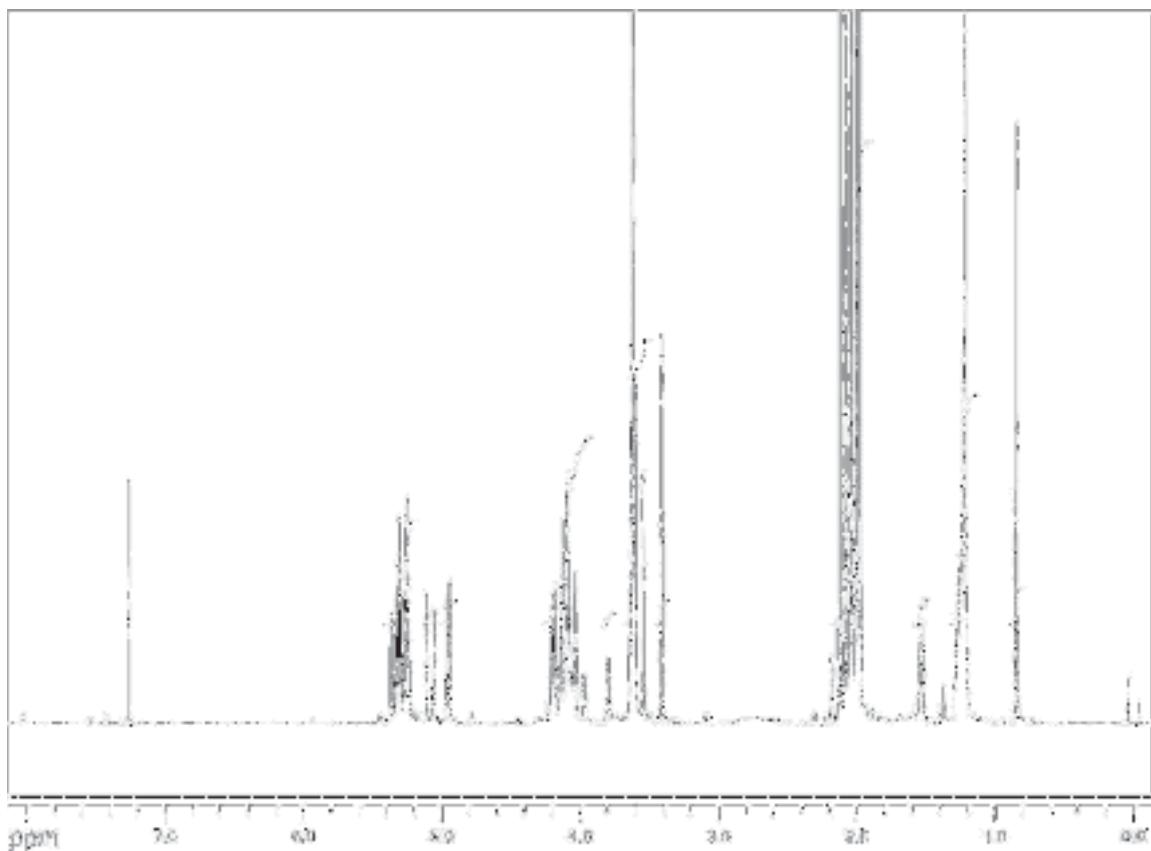
$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Verbindung **88-3** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)



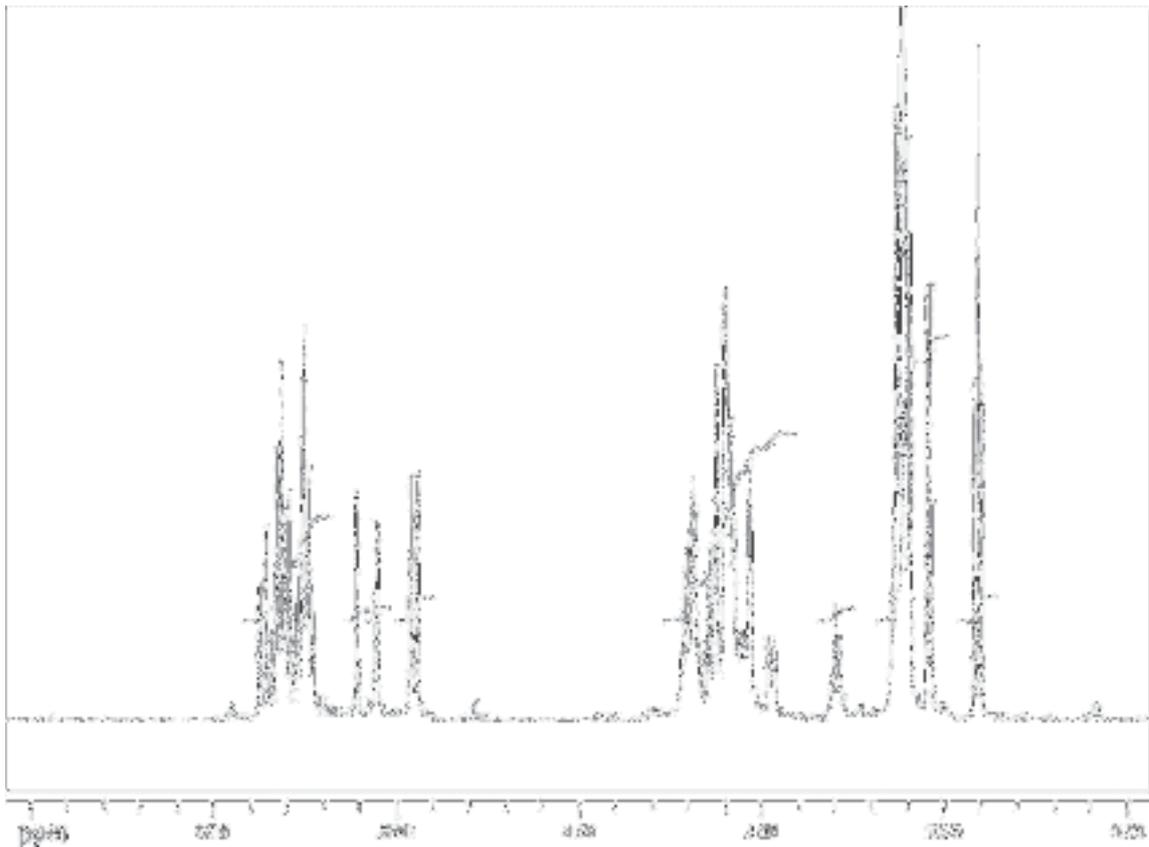
Ausschnitt aus dem  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Verbindung **88-3** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)



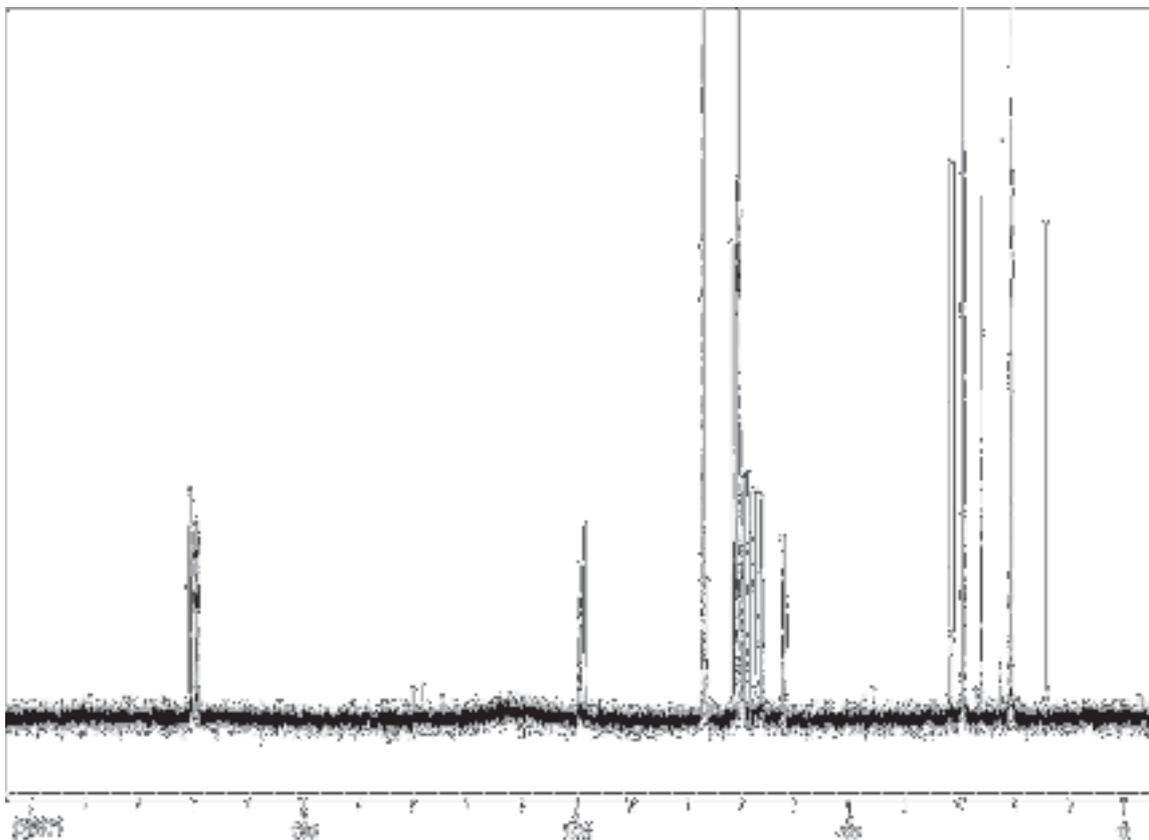
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **88-3** ( $\text{CDCl}_3$ , 151 MHz)



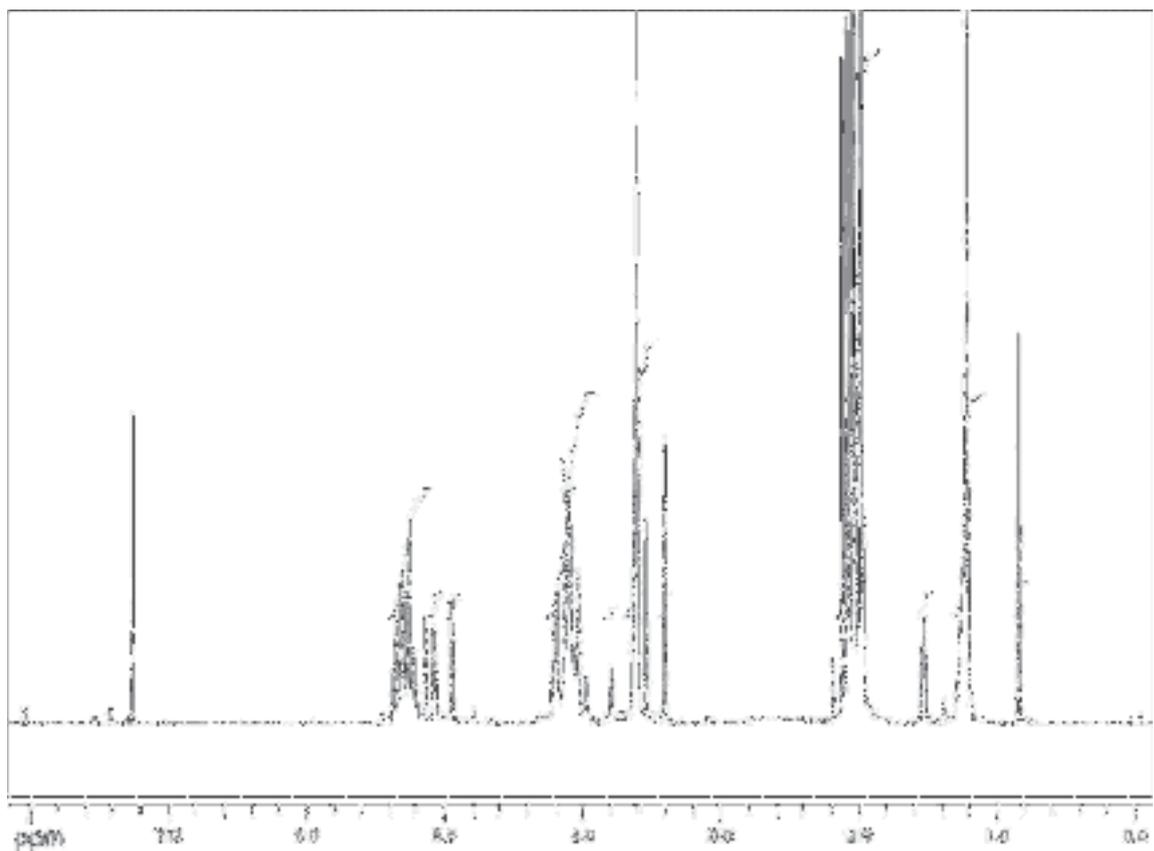
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **88-4** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)



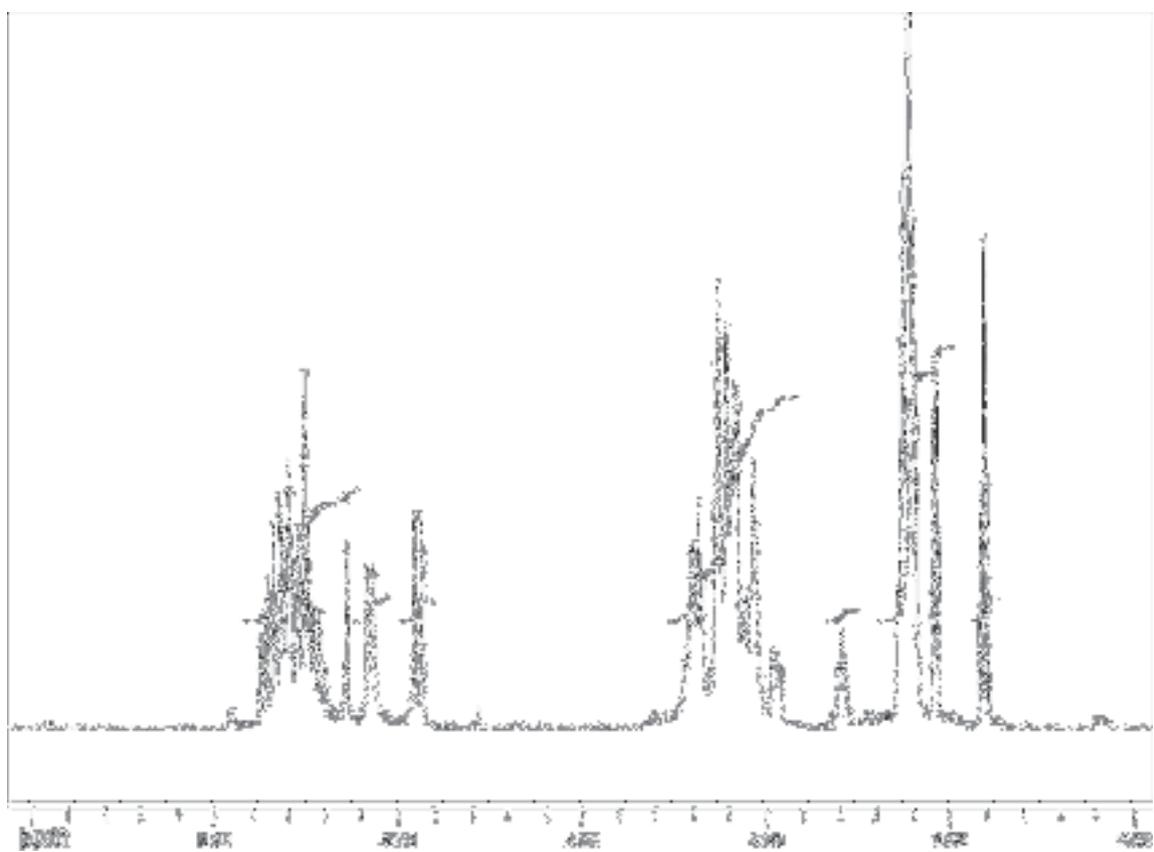
Ausschnitt aus dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **88-4** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)



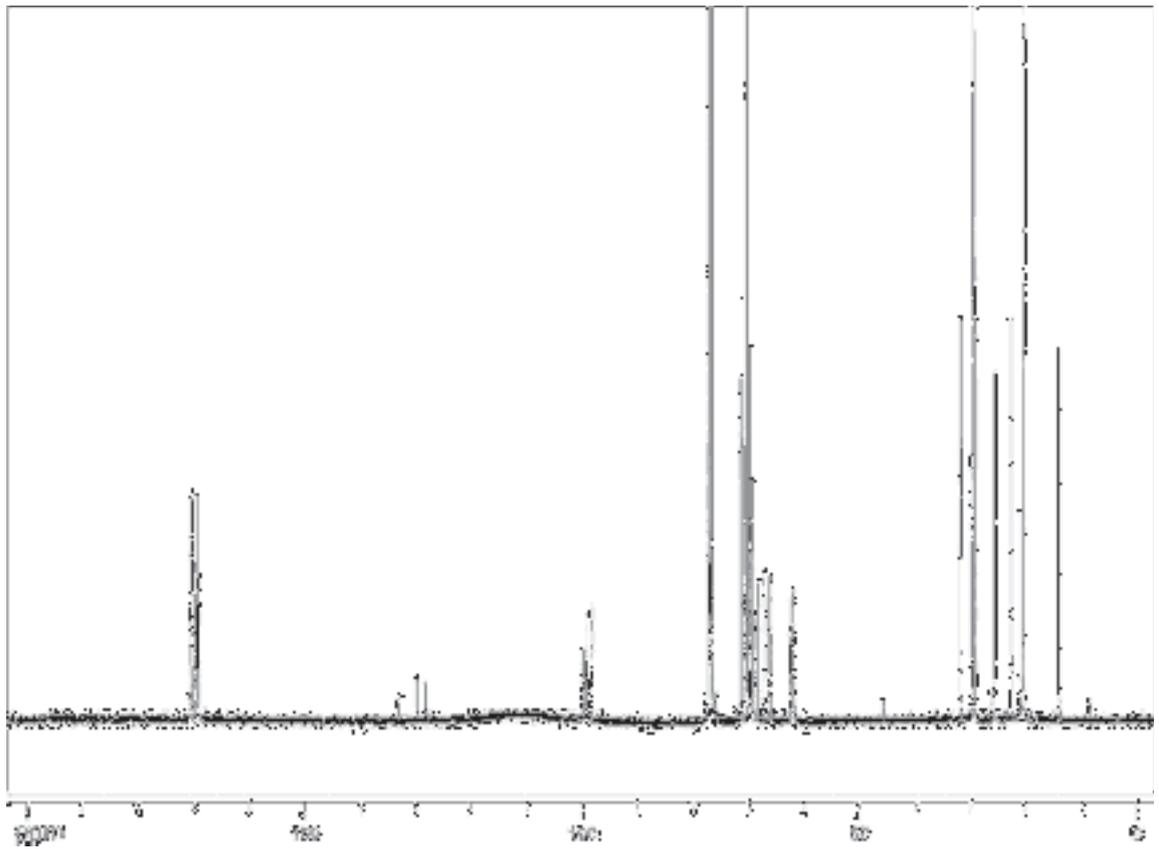
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **88-4** ( $\text{CDCl}_3$ , 151 MHz)



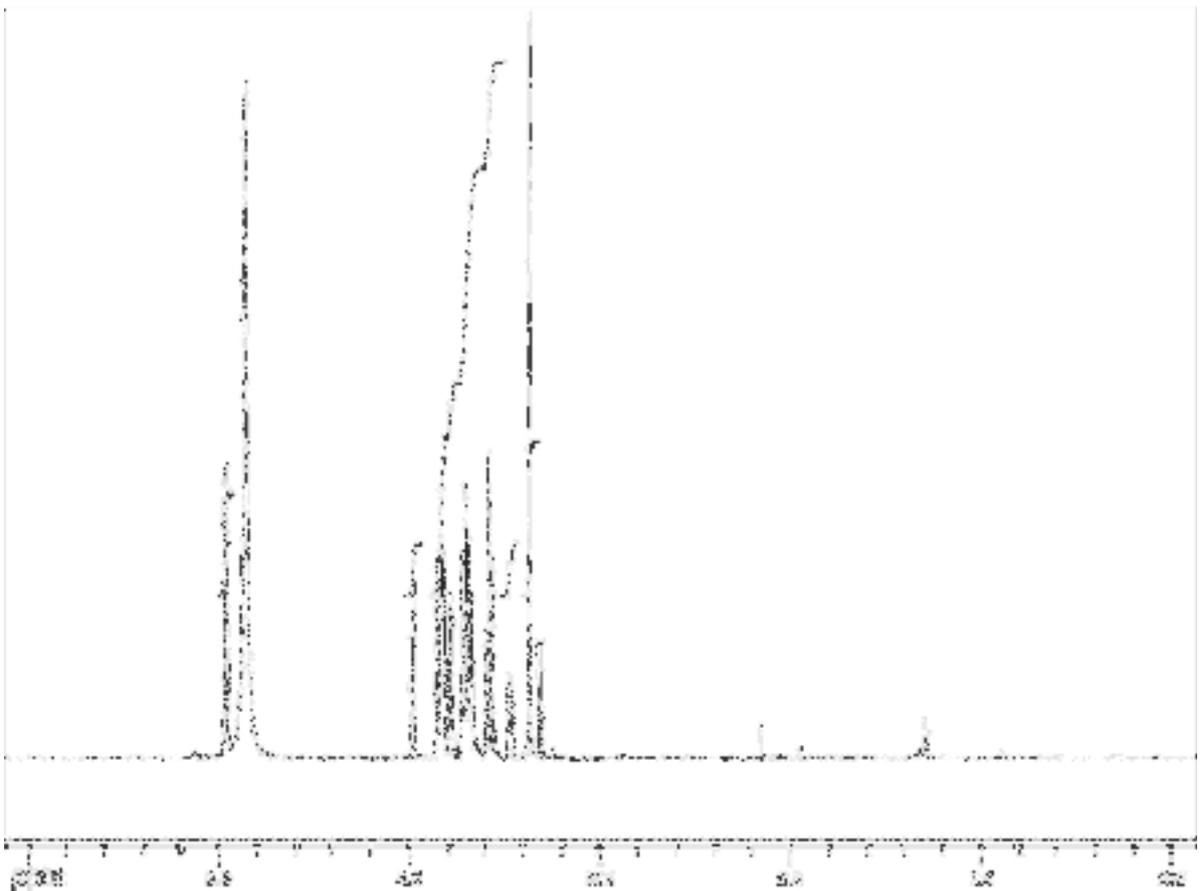
$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Verbindung **88-5** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)



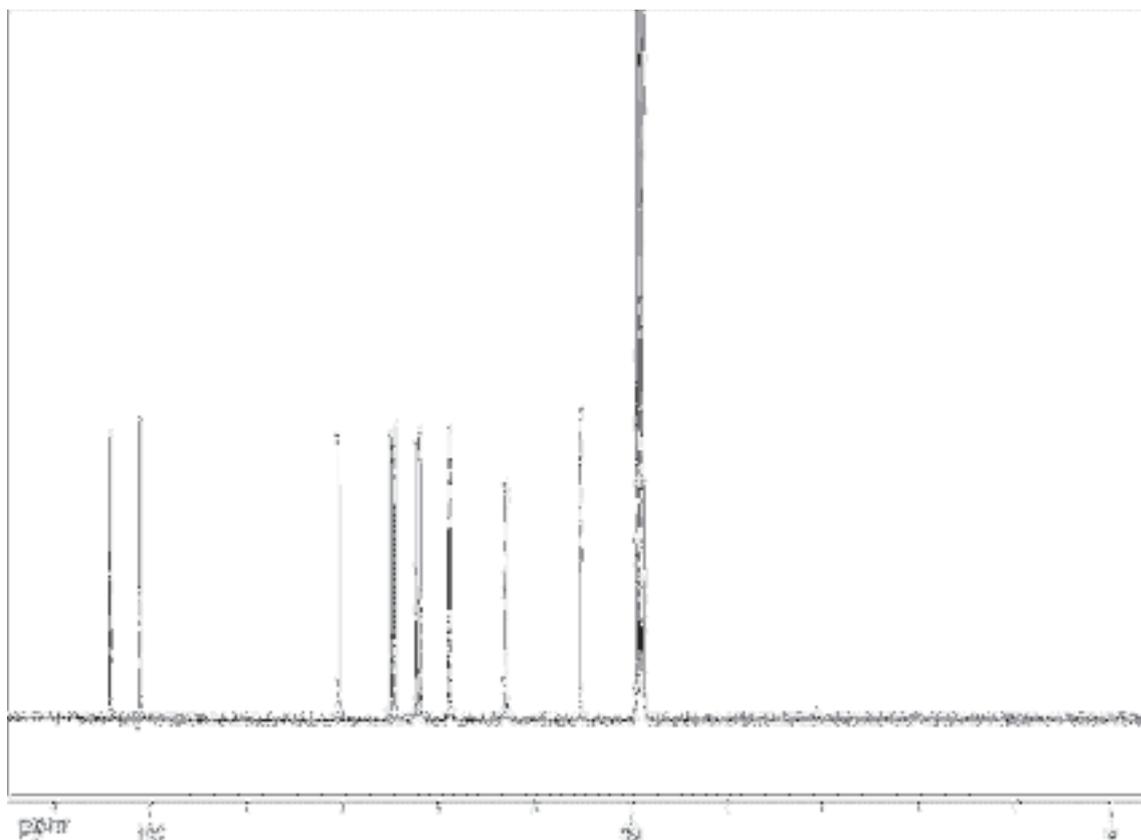
Ausschnitt aus dem  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Verbindung **88-5** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)



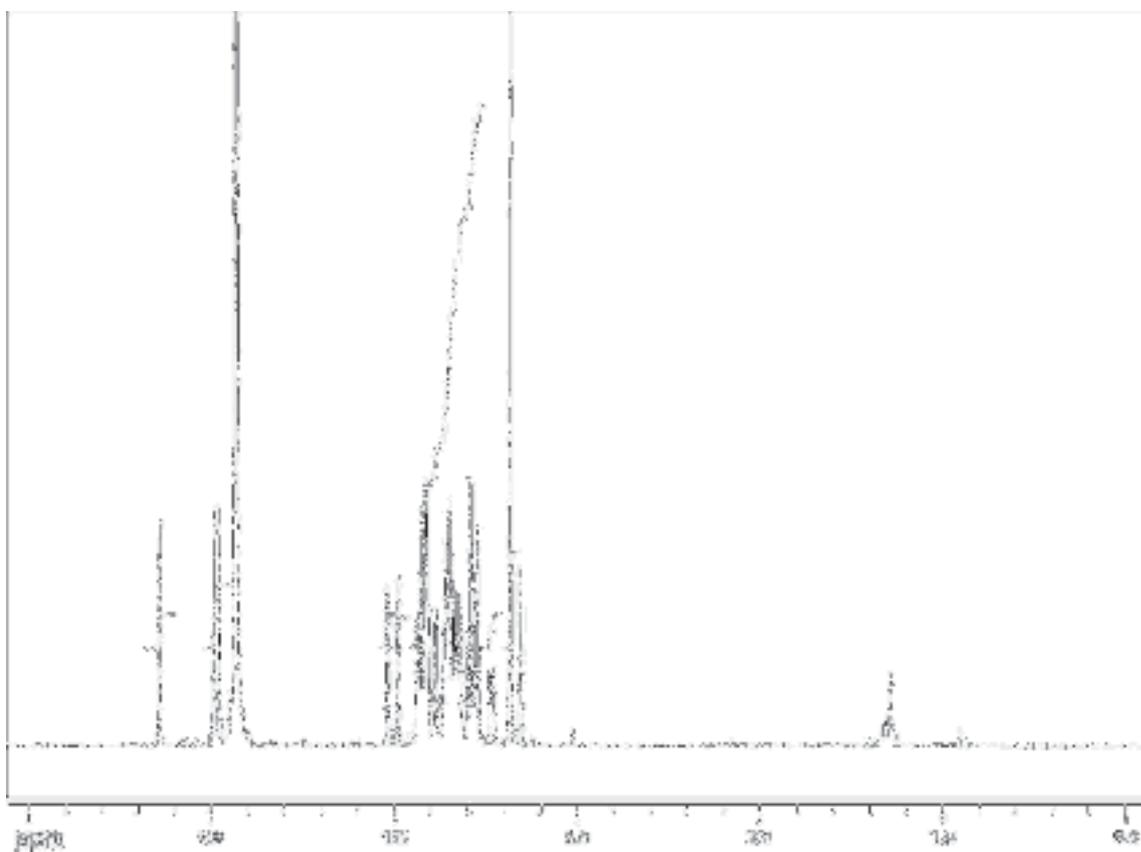
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **88-5** ( $\text{CDCl}_3$ , 151 MHz)



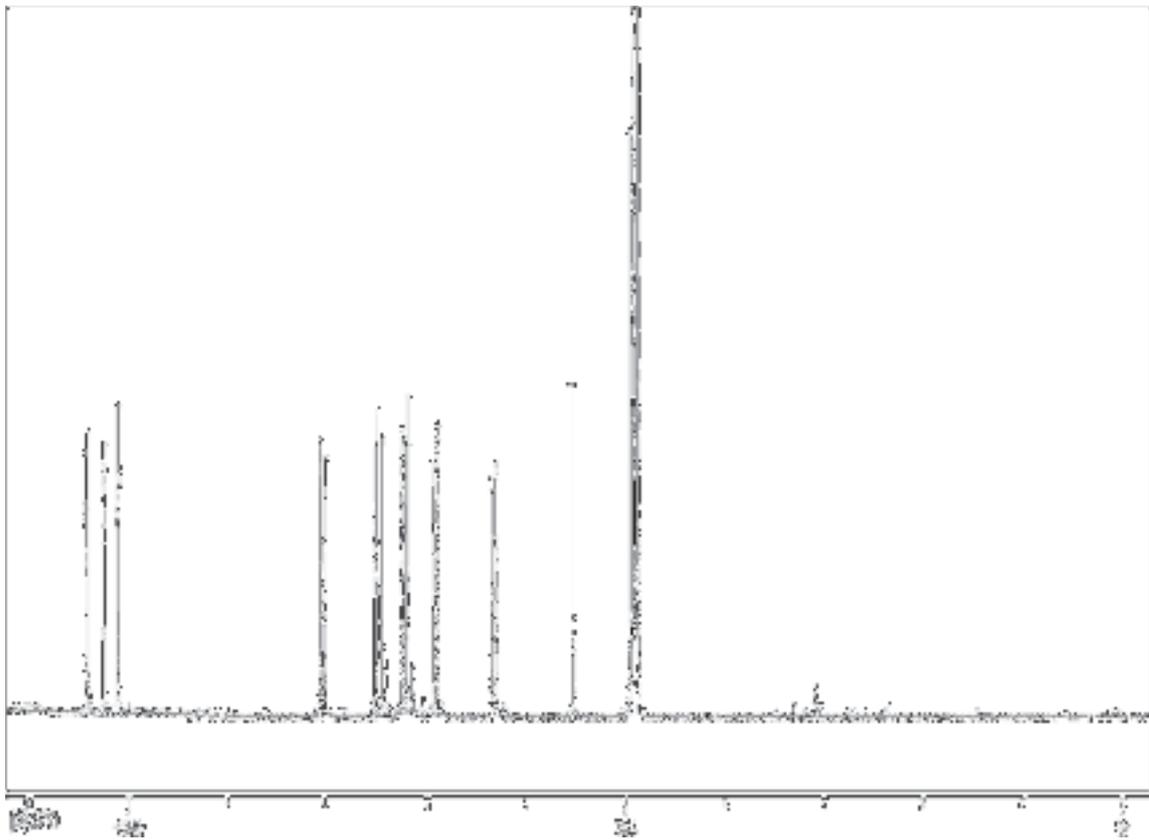
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **89-2** ( $\text{d}_4\text{-MeOD}$ , 600 MHz)



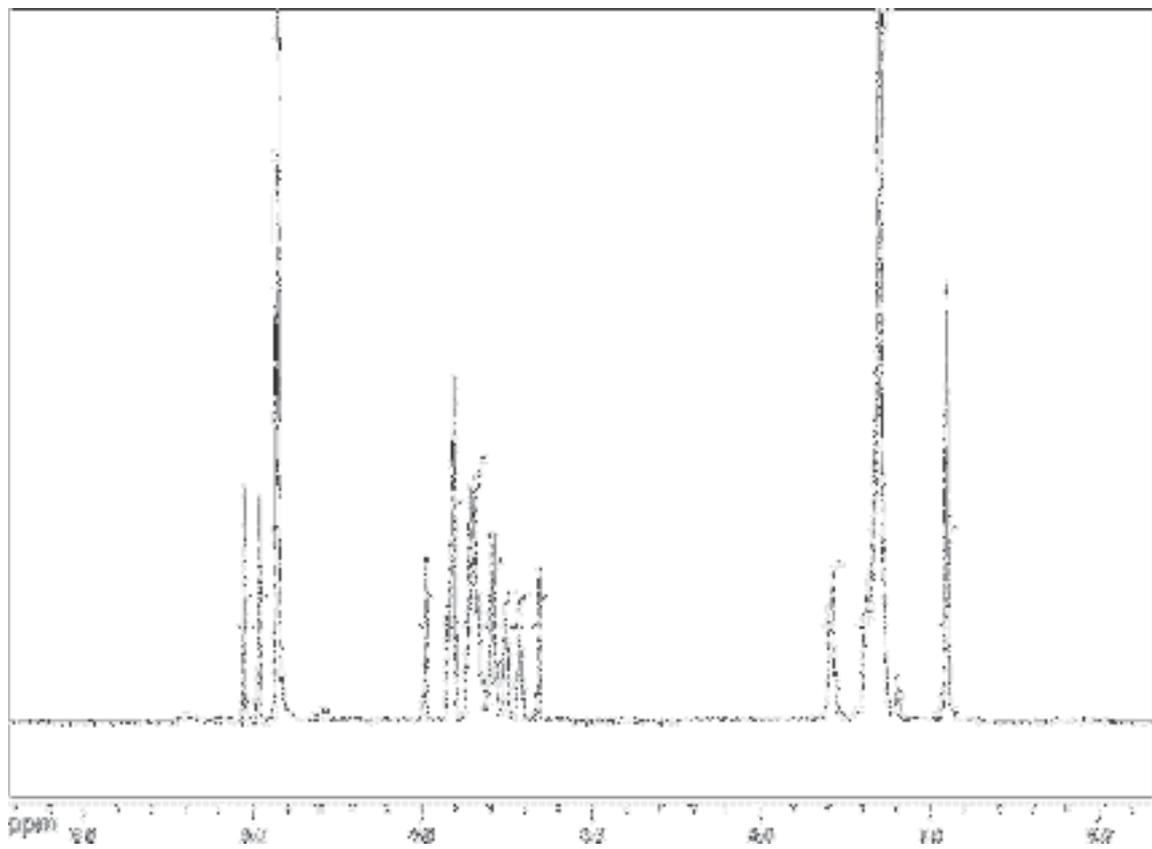
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **89-2** ( $\text{d}_4$ -MeOD, 151 MHz)



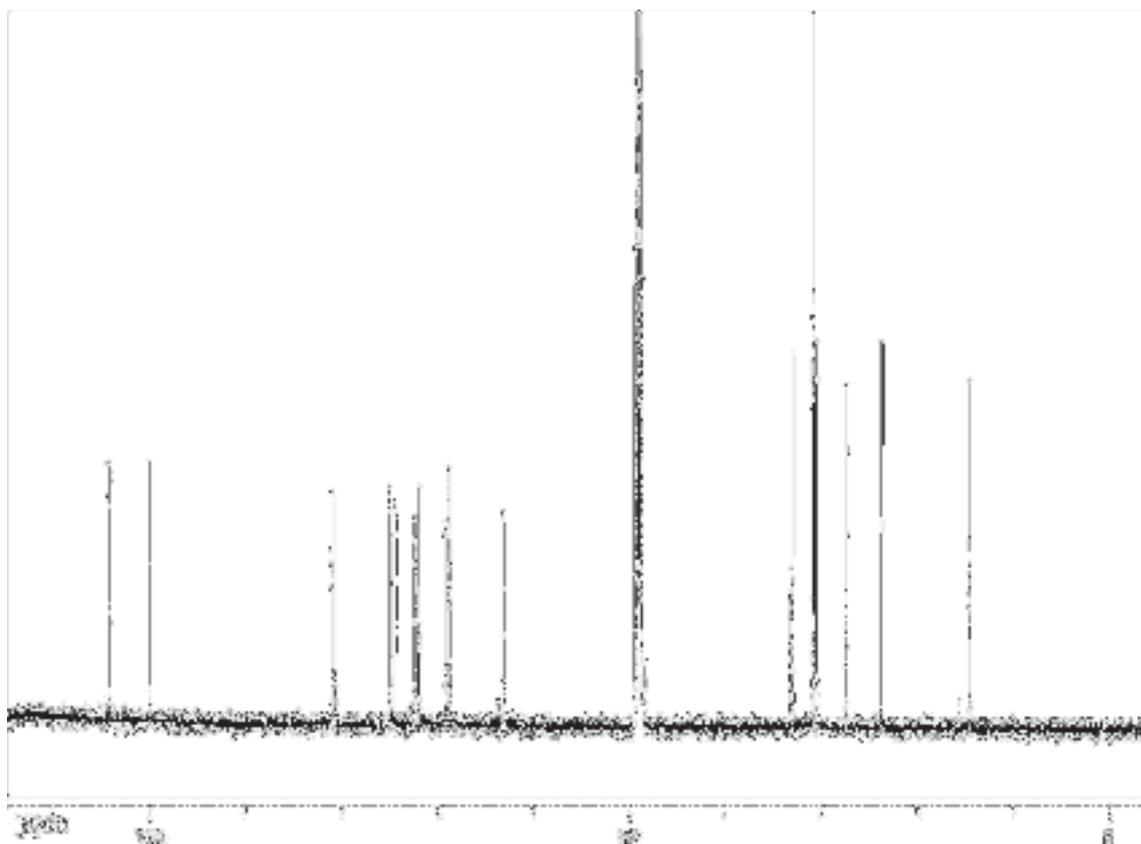
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **89-3** ( $\text{d}_4$ -MeOD, 600 MHz)



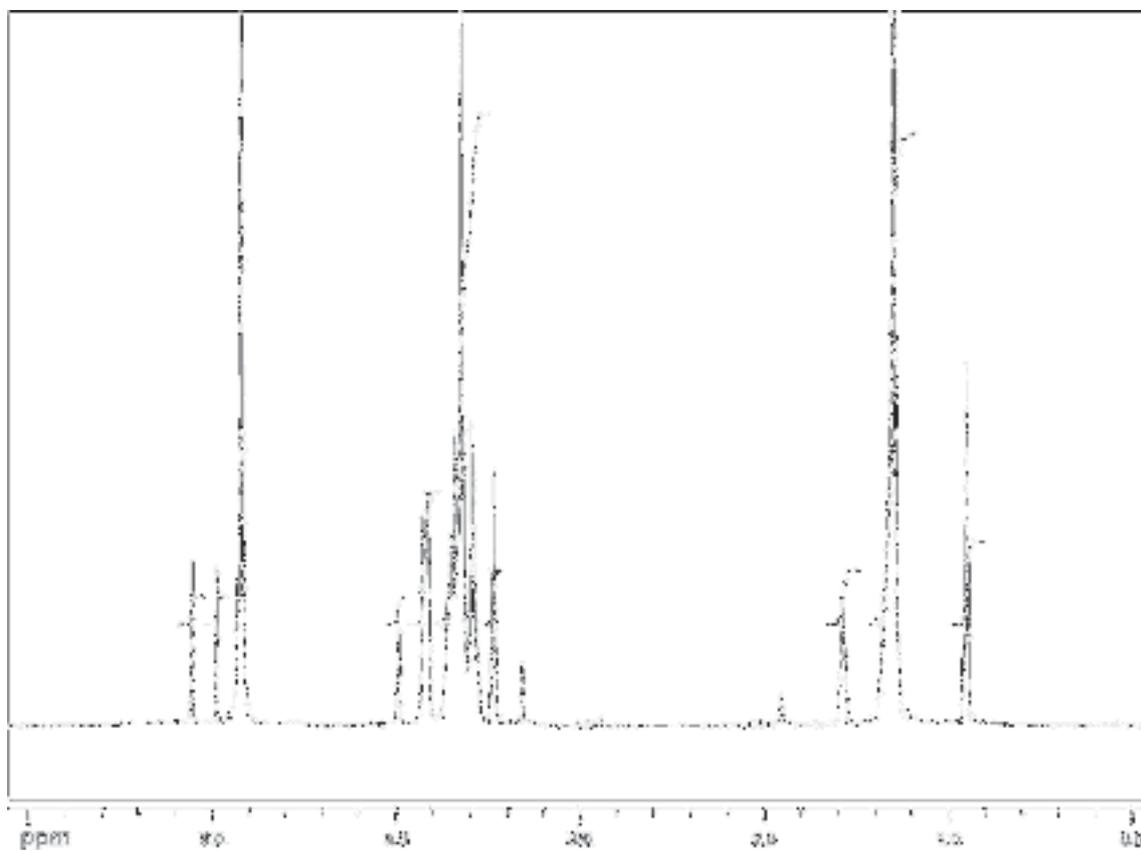
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **89-3** ( $\text{d}_4$ -MeOD, 151 MHz)



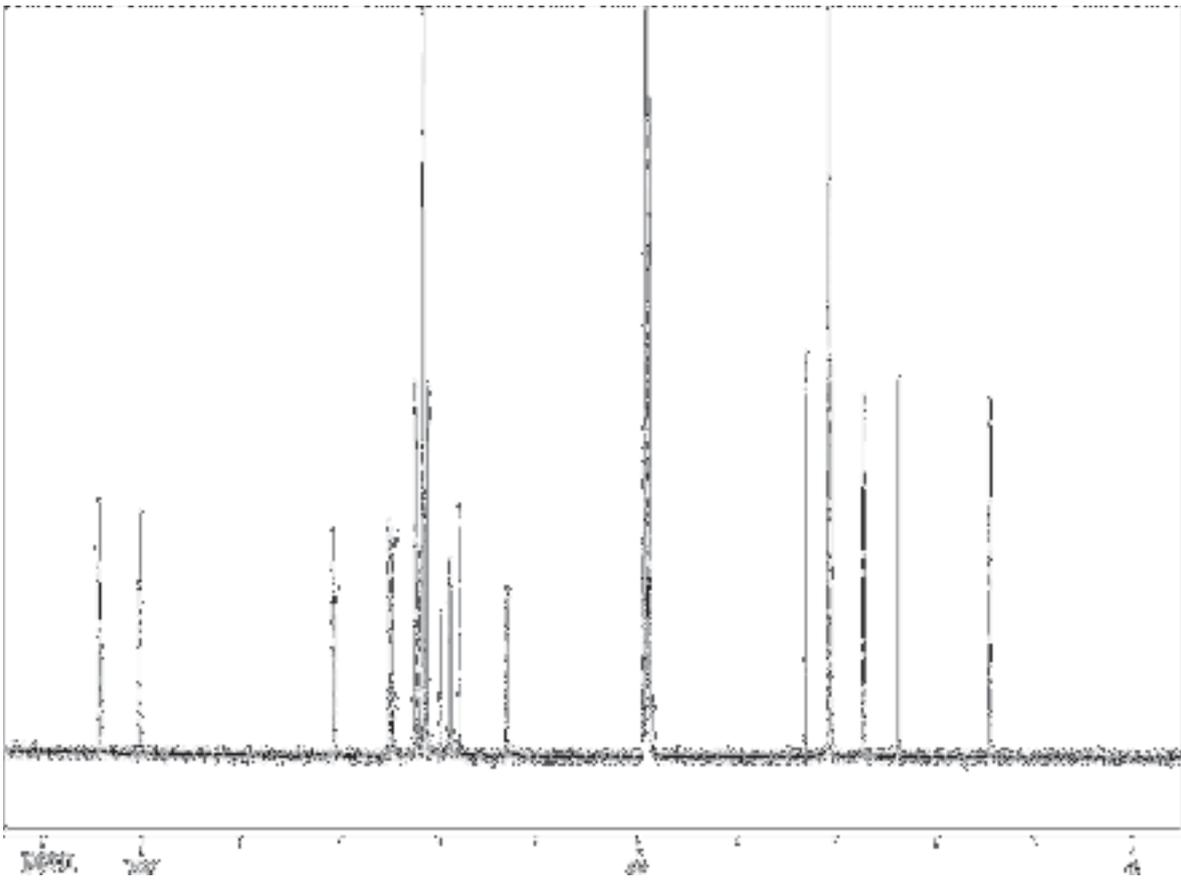
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **90-2** ( $\text{d}_4$ -MeOD, 600 MHz)



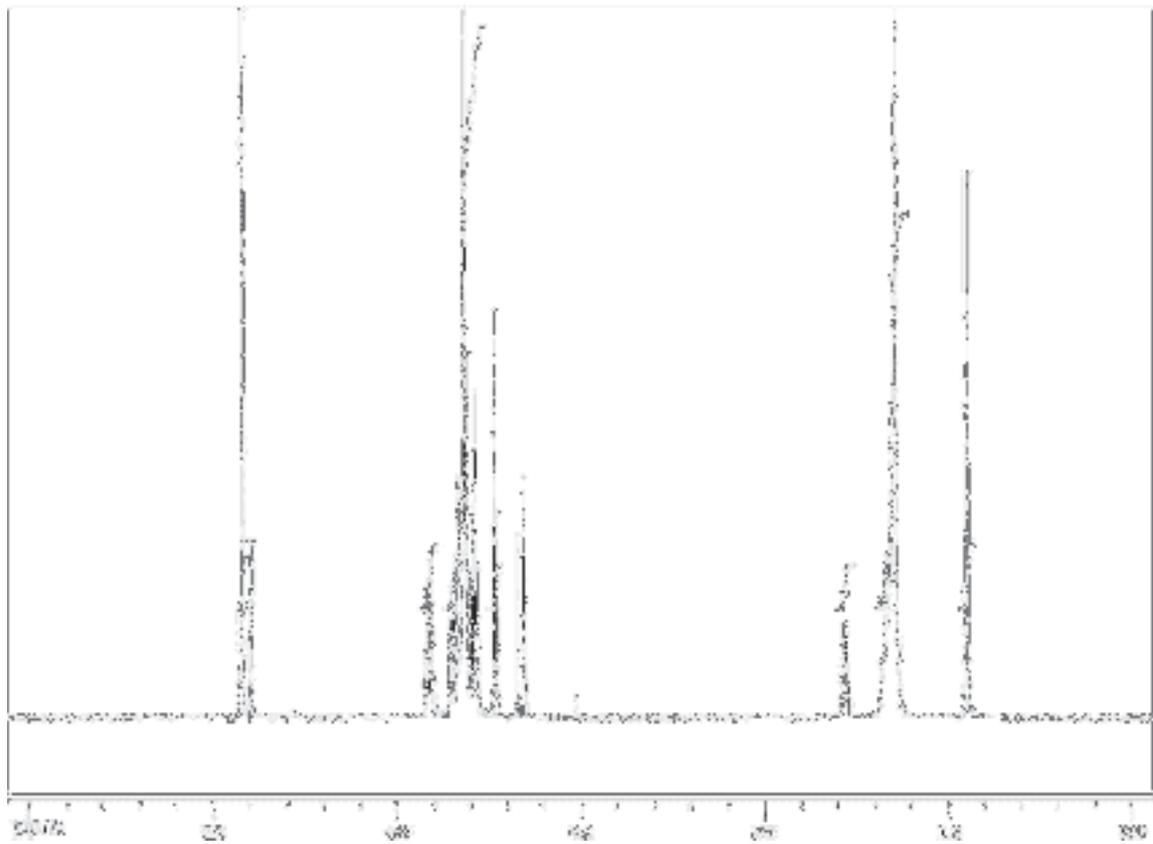
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **90-2** ( $\text{d}_4$ -MeOD, 151 MHz)



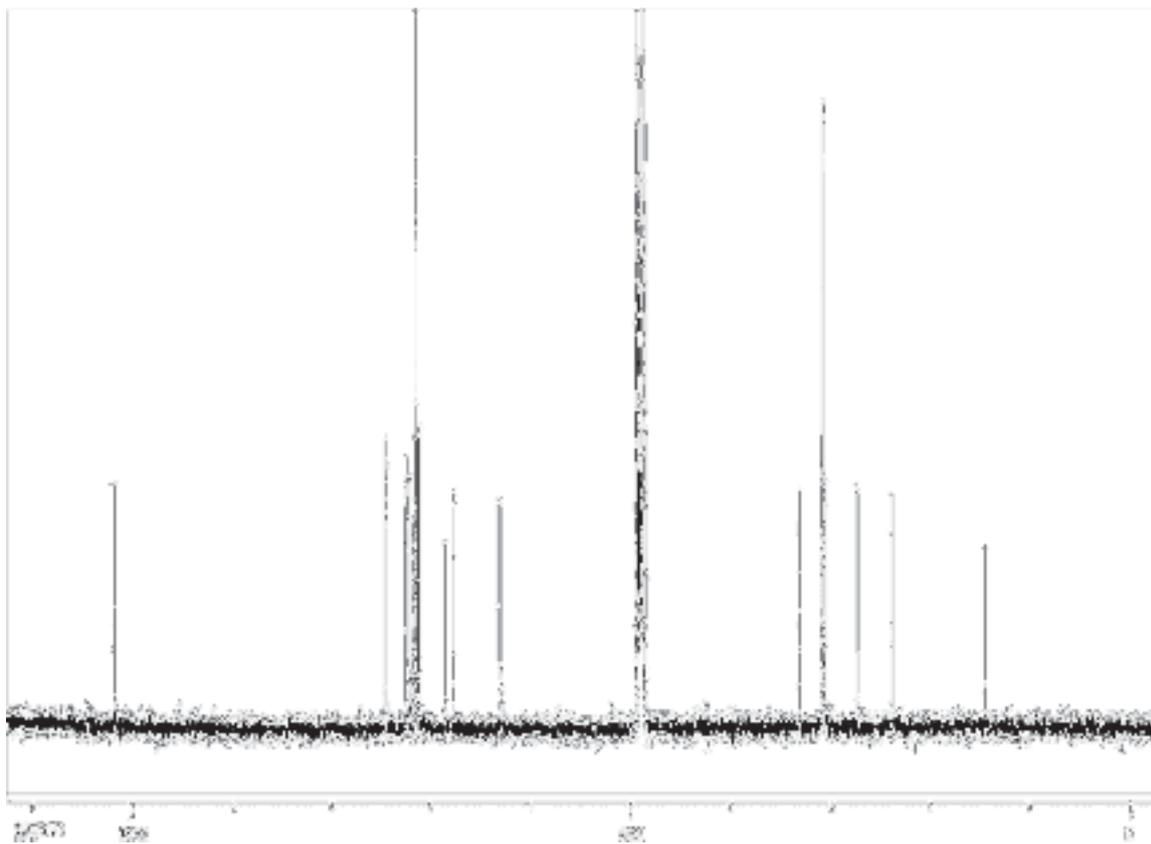
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **91-2** ( $\text{d}_4$ -MeOD, 600 MHz)



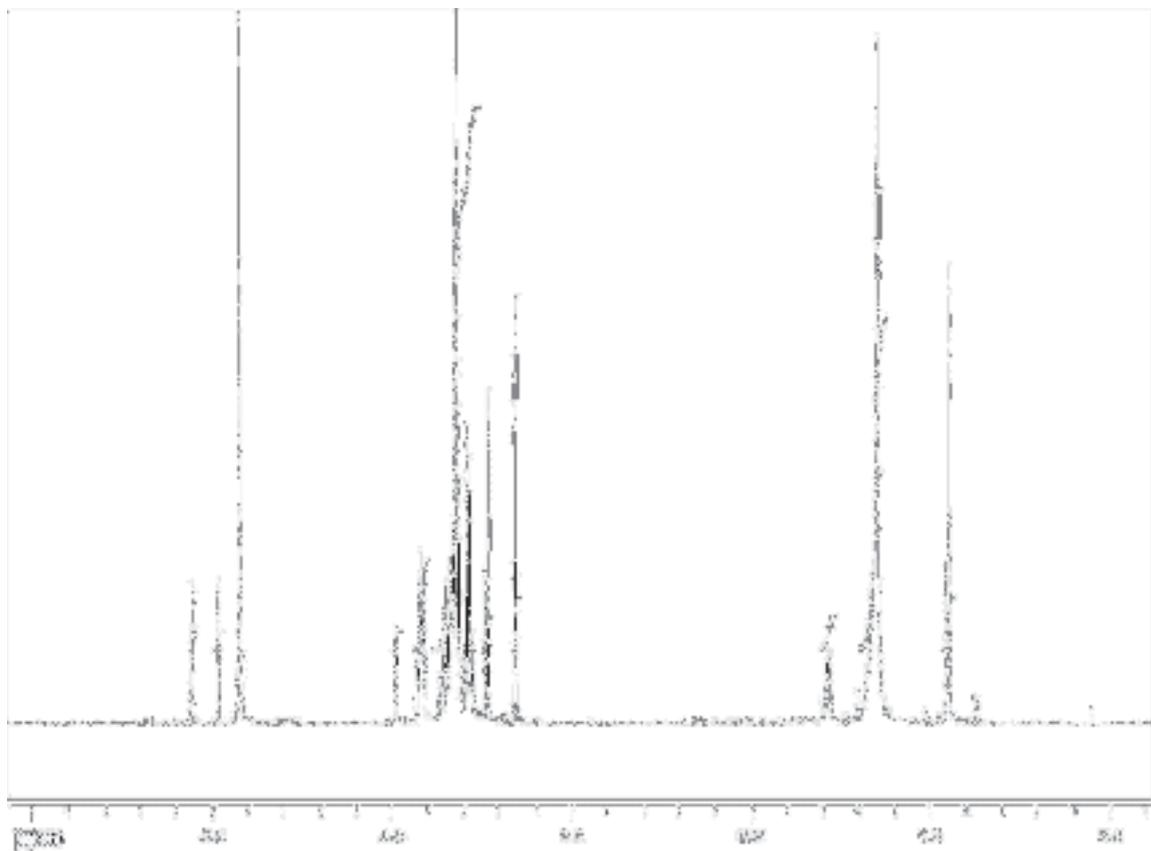
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **91-2** ( $\text{d}_4$ -MeOD, 151 MHz)



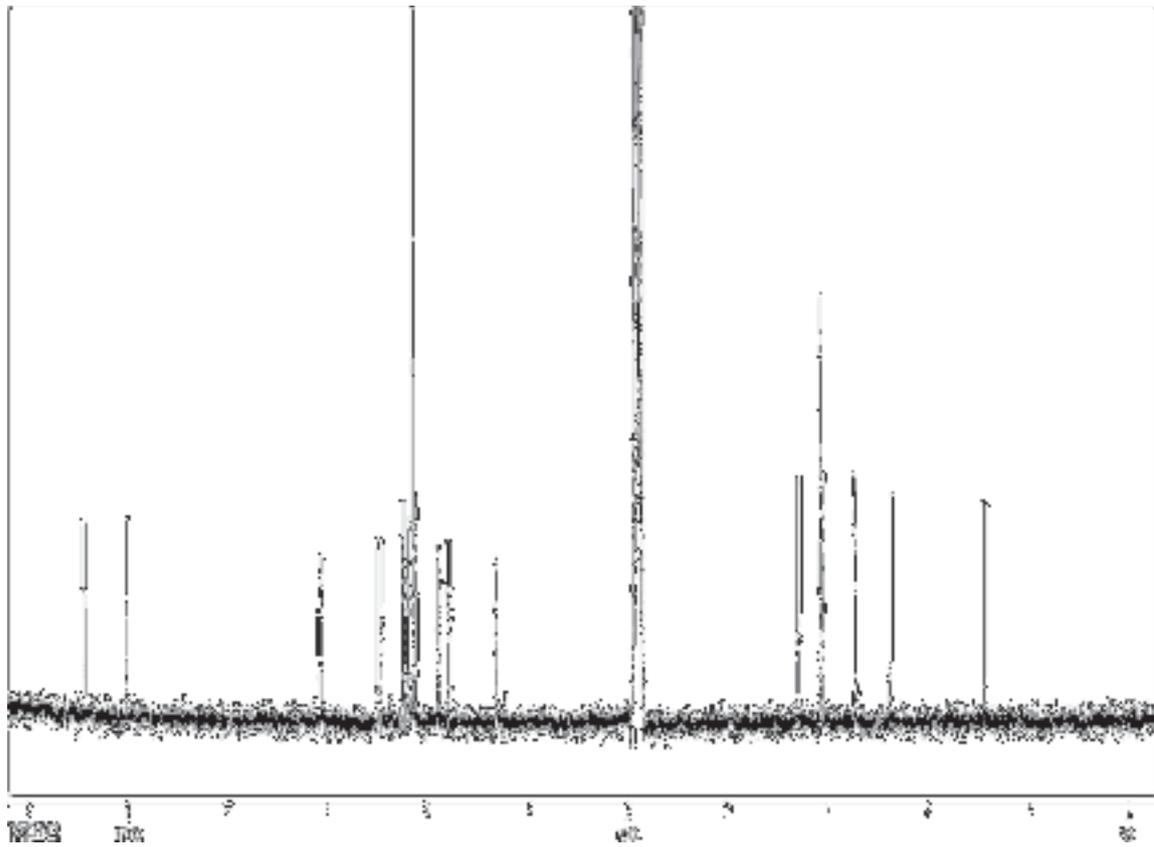
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **92-1** ( $\text{d}_4$ -MeOD, 600 MHz)



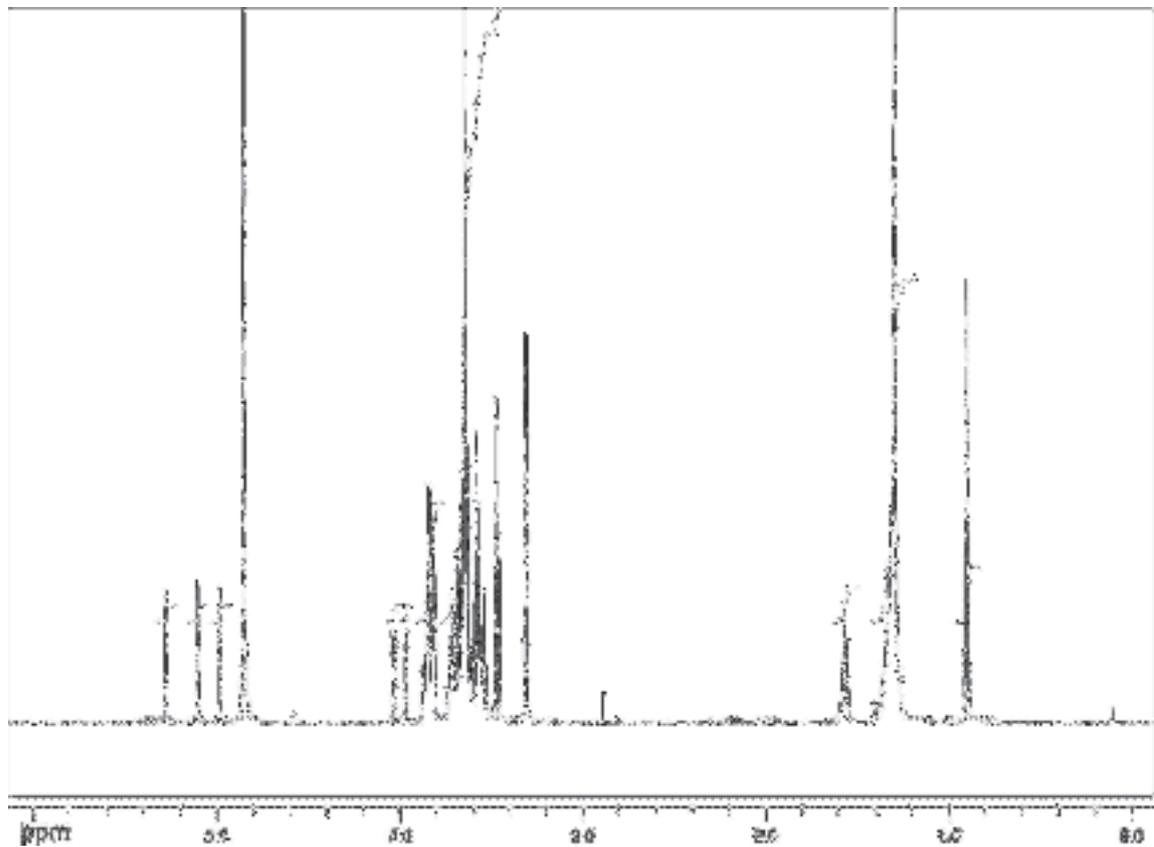
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **92-1** ( $\text{d}_4$ -MeOD, 151 MHz)



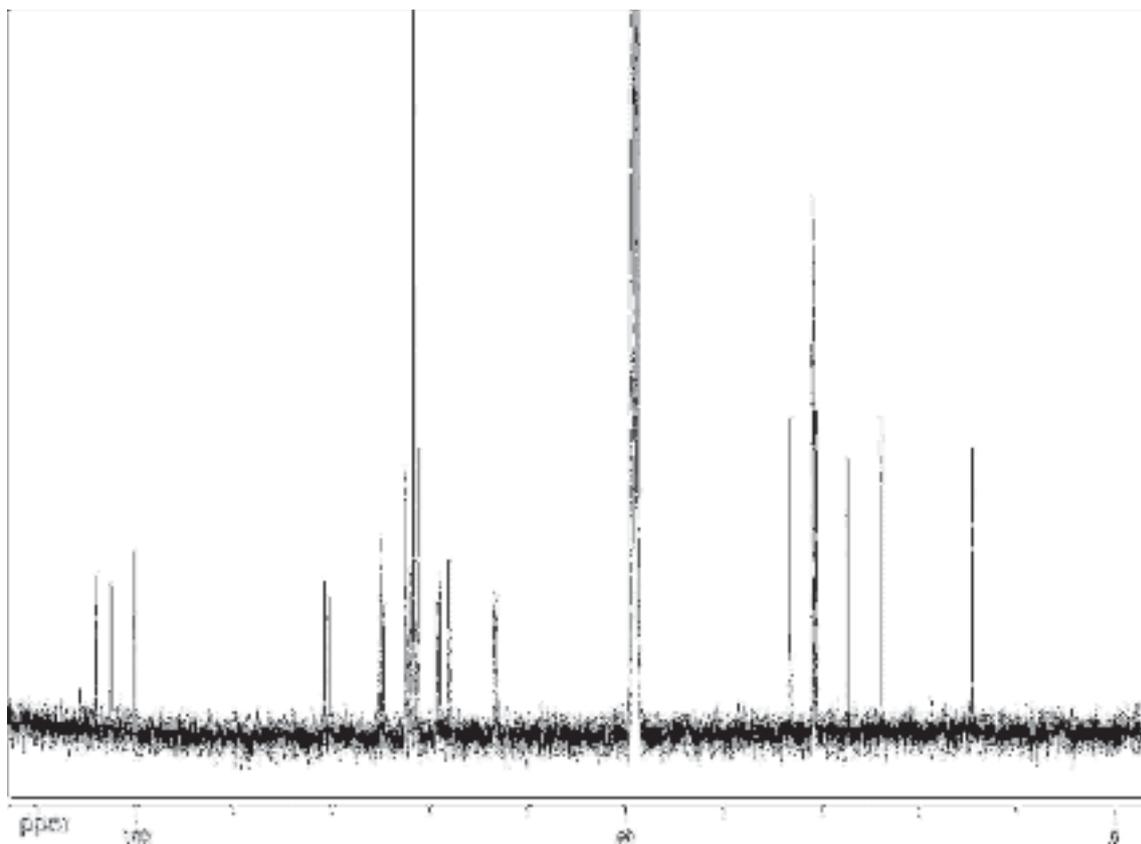
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **92-2** ( $\text{d}_4$ -MeOD, 600 MHz)



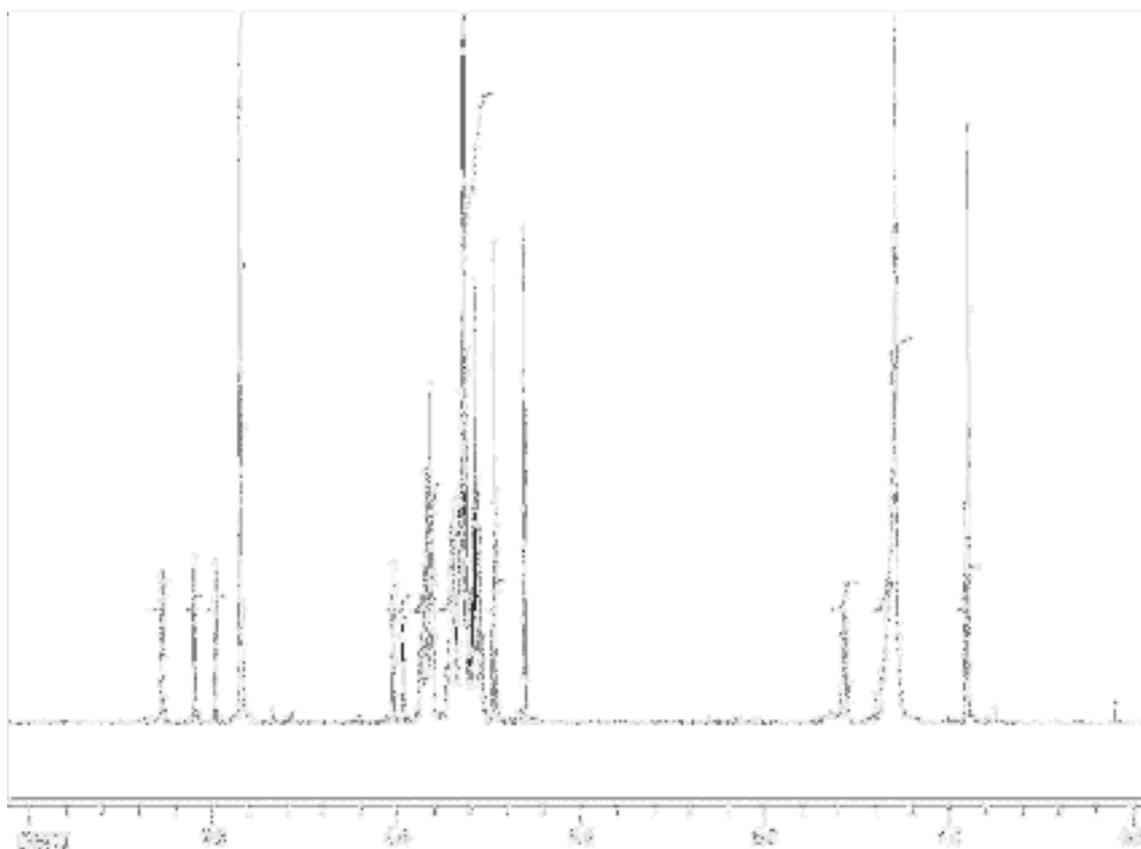
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **92-2** ( $\text{d}_4$ -MeOD, 151 MHz)



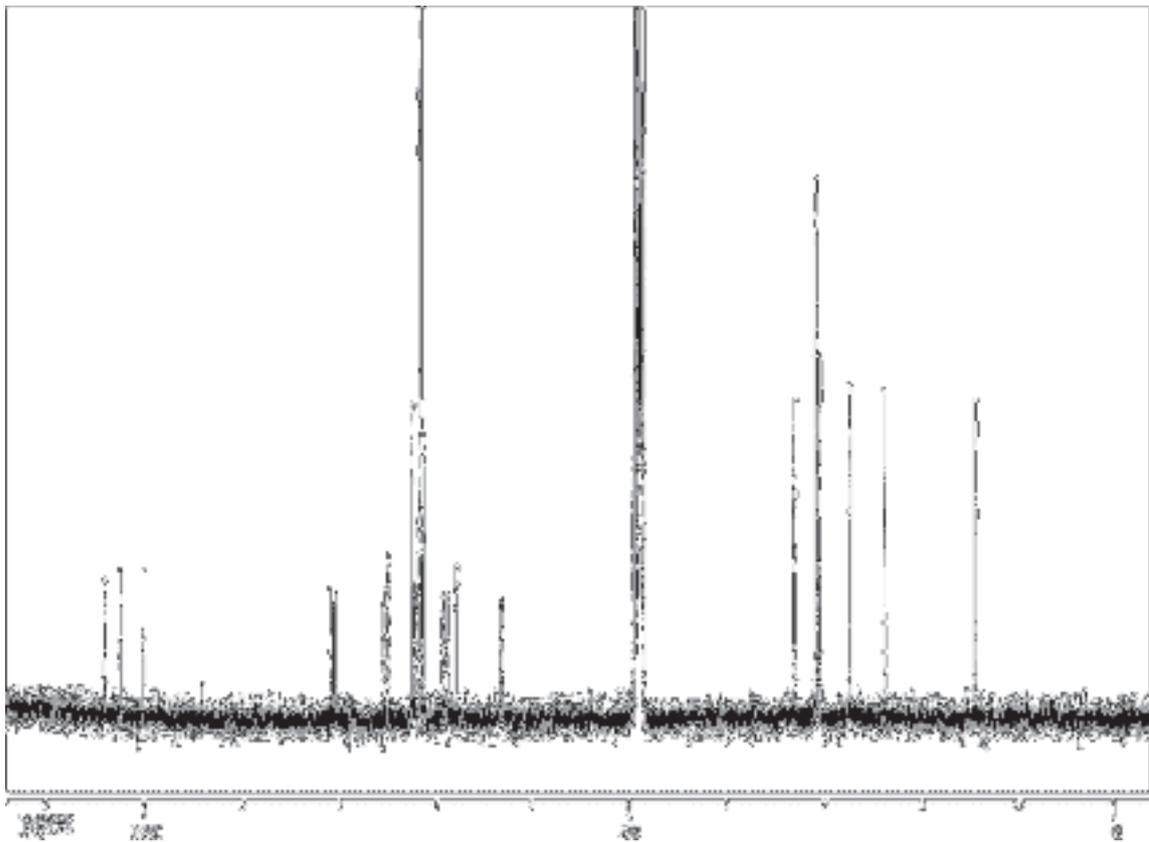
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **92-3** ( $\text{d}_4$ -MeOD, 600 MHz)



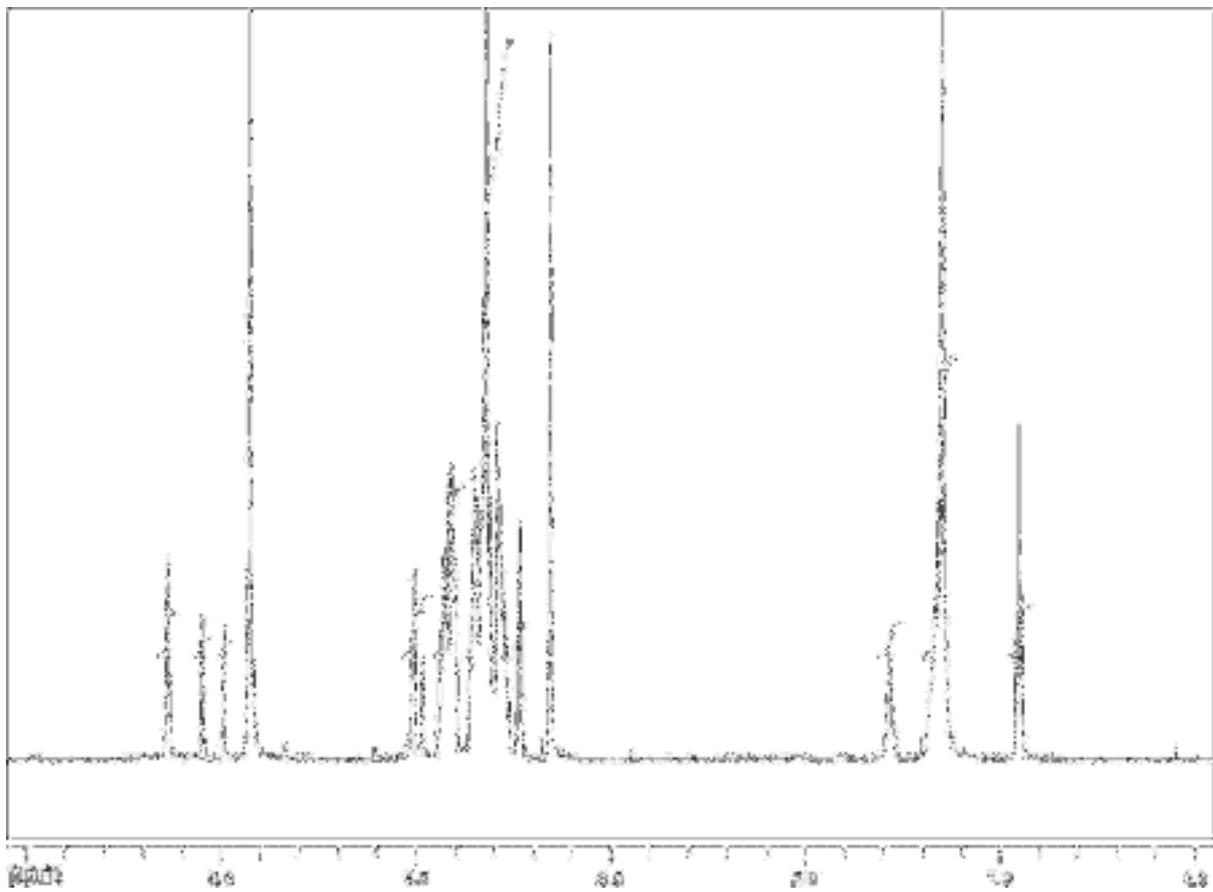
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **92-3** ( $\text{d}_4$ -MeOD, 151 MHz)



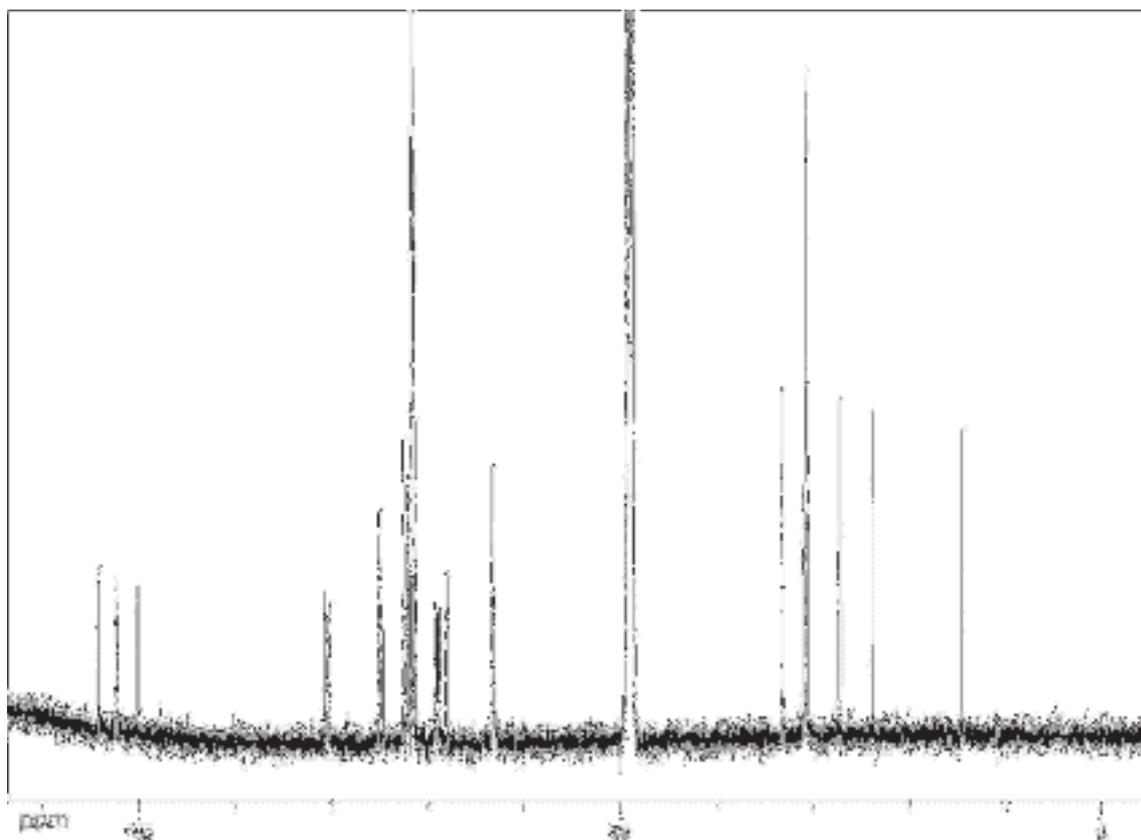
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **92-4** ( $\text{d}_4$ -MeOD, 600 MHz)



$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **92-4** ( $\text{d}_4$ -MeOD, 151 MHz)



$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **92-5** ( $\text{d}_4$ -MeOD, 600 MHz)



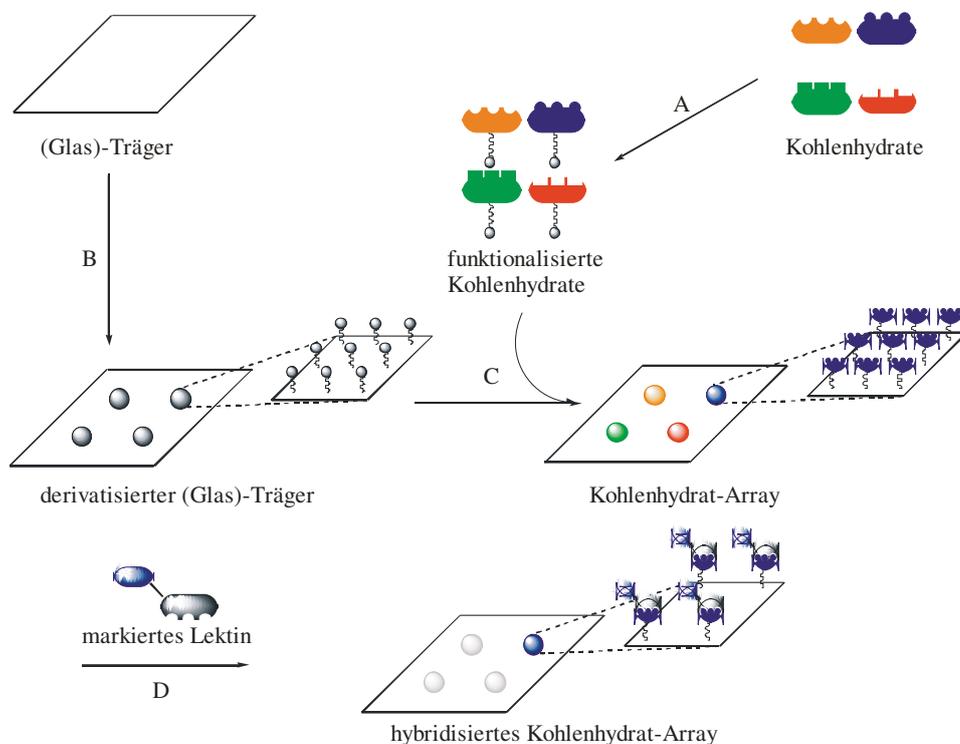
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **92-5** ( $\text{d}_4$ -MeOD, 151 MHz)

## 8 Zusammenfassung

Kohlenhydratstrukturen spielen eine wichtige Rolle in vielen biochemischen Prozessen und üben im zellulären Geschehen strukturelle und modulierende Funktionen aus. Die Mehrzahl aller natürlich vorkommenden Proteine und Lipide sind posttranslational modifiziert, viele davon insbesondere auch glycosyliert. Eingebettet in Plasmamembranen von Zellen sind sie an zahlreichen zellulären Adhäsions- und Erkennungsprozessen beteiligt. Die strukturelle Vielfalt und Komplexität der Glycanstrukturen, die sich aus der Mannigfaltigkeit der Kohlenhydratbausteine und ihren Verknüpfungsmöglichkeiten ergibt, begründen ihren hohen biologischen Informationsgehalt. Die Übertragung dieser Information erfolgt im Sinne der molekularen Erkennung durch nicht-kovalente Wechselwirkungen mit anderen Biomolekülen (Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung). In Zusammenhang mit zellulären Erkennungsprozessen sind dabei insbesondere spezifische Kohlenhydrat-Protein- und Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen von Interesse. Sie zeichnen sich durch das Phänomen der Polyvalenz (Multivalenz) aus wodurch relativ starke und selektive nicht-kovalente Bindungen resultieren. Weiterhin sind sie in vielen Fällen von der Anwesenheit zweiwertiger Kationen wie z. B.  $Mg^{2+}$  oder  $Ca^{2+}$  abhängig. Kohlenhydratbindende Proteine, die Lektine, sind aus vielen Organismen isoliert worden und können nach ihrer Bindungsspezifität eingeteilt werden. Am besten untersucht sind strukturell einfache Pflanzenlektine wie z. B. Concanavalin A, das D-Mannose- und D-Glucose-Strukturen spezifisch erkennt. Die Bindungskonstanten von Kohlenhydrat-Lektin-Komplexen liegen im millimolaren Bereich. Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen sind dagegen schwächer, ihre Existenz neben stärkeren Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen konnte jedoch in einigen Fällen zweifelsfrei nachgewiesen werden. Am besten untersucht ist die homophile Lewis X-Lewis X-Wechselwirkung, die u. a. zwischen Säugetierzellen im frühen embryonalen Entwicklungsstadium auftritt.

Die strukturelle Vielfalt von Kohlenhydratstrukturen und die Schwäche der nicht-kovalenten Kohlenhydrat-Wechselwirkungen erschweren ihre Untersuchung. Als Analysemethoden finden Verwendung das Hämagglutinations-Assay, die Affinitätschromatographie und -elektrophorese, die isothermische Titrationskalorimetrie (ITC), die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR), der enzymgekoppelte Lektintest (ELLA) und zahlreiche NMR-Methoden. Die genannten Verfahren sind teilweise mit hohem experimentellem Aufwand verbunden und eignen sich

zudem in der Regel nur zur Untersuchung einzelner Wechselwirkungen pro Versuch; manche sind dafür in der Lage, quantitative Ergebnisse zu liefern. Andererseits rücken nach der Entschlüsselung des menschlichen Genoms neben den Fragestellungen der Genomik die Untersuchungen von Protein-Wechselwirkungen (Proteomik) und Kohlenhydrat-Wechselwirkungen (Glycomik) in den Brennpunkt des wissenschaftlichen Interesses. Für ein schnelles Screening nicht-kovalenter Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen haben sich in jüngster Zeit Array-Verfahren etabliert. Bei diesen wird ein Bindungspartner (Sonde) auf einem festen Träger in räumlich getrennter definierter Anordnung immobilisiert. Der korrespondierende Bindungspartner (Probe) wird in Lösung und in markierter Form auf den so präparierten Array aufgebracht und bindet in der Folge dort spezifisch an seinen Wechselwirkungspartner (Hybridisierung). Nach der Entfernung von nicht-gebundenen Molekülen durch Waschprozesse können verbliebene spezifisch gebundene Proben aufgrund ihrer Markierung ortsaufgelöst detektiert werden. Da die räumliche Anordnung der Sonden bekannt ist, können auf diese Weise Bindungspartner (Rezeptor-Ligand-Paare) einander zugeordnet werden. Array-Verfahren wurden zuerst zur Untersuchung von DNA-DNA-Wechselwirkungen Anfang der 90er Jahre des letzten Jahrhunderts entwickelt und später auf RNA-, Peptid-, Protein- und schließlich Kohlenhydrat-Wechselwirkungen (letztere ab dem Jahr 2002) ausgedehnt. Abbildung 83 zeigt das Array-Konzept am Beispiel von Kohlenhydrat-Arrays zur Untersuchung von Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkungen.



**Abbildung 83:** Herstellung eines Kohlenhydrat-Arrays und Hybridisierungsexperiment mit markiertem Lektin. A: Funktionalisierung von Kohlenhydraten, B: Derivatisierung des (Glas)-Trägers, C: Immobilisierung von Kohlenhydraten zur Herstellung des Kohlenhydrat-Arrays, D: Hybridisierung des Arrays mit markiertem Lektin.

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit bestand in der Darstellung von Kohlenhydrat-Arrays und deren Einsatz zur Untersuchung von Kohlenhydrat-Protein- und Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen. Dabei sollte die Verknüpfung zwischen Kohlenhydrat und Arrayoberfläche spezifisch und kovalent erfolgen, entweder durch Bindungsbildung mittels reduktiver Aminierung oder durch Ausbildung einer Carbonsäureamidbindung. Als Trägermaterial sollten kommerziell erhältliche aldehyd- oder aminfunktionalisierte Glaträger verwendet werden. Zur Untersuchung von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen sollten kommerziell erhältliche fluoreszenzmarkierte Lektine eingesetzt werden, die Untersuchung von Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen sollte am Beispiel der homophilen Lewis X-Lewis X-Wechselwirkung erfolgen.

Weiterhin sollten zur Untersuchung von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen durch die NMR-Spektroskopie in Lösung Mannoseglycolipide synthetisiert werden, die sich in Phospholipid-Micellen integrieren lassen.

## 8.1 Chemische Synthesen

Ausgehend von Triethylenglykol **1** und Hexaethylenglykol **3** wurden die monofunktionalisierten Linkerbausteine **19-24** synthetisiert (vgl. Abbildung 84). Um Reinigungsprobleme im Umgang mit Ethylenglykolderivaten (Tailing-Effekt bei säulenchromatographischer Trennung) zu verringern, wurde jeweils ein dreistufiger Syntheseweg aus Monotrytylierung, Alkylierung und Detrytylierung gewählt.

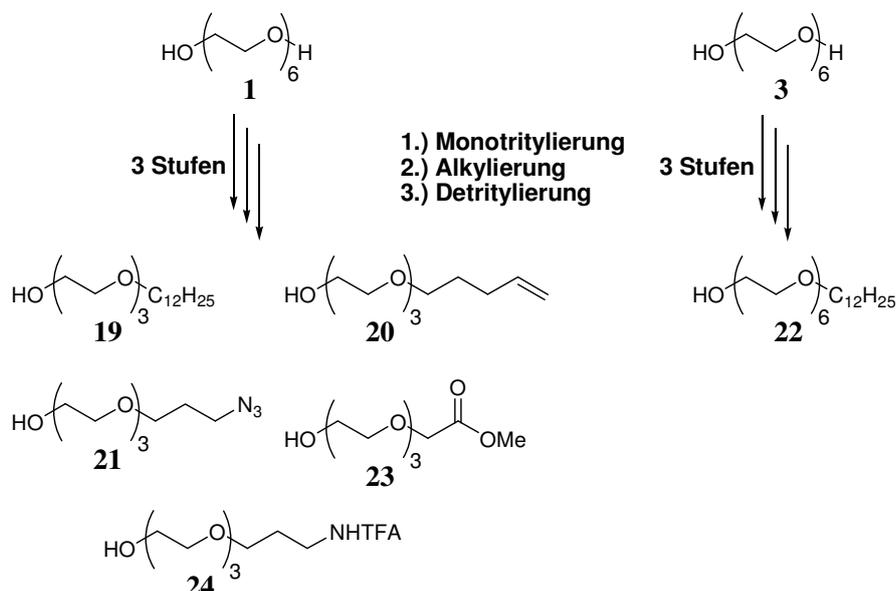
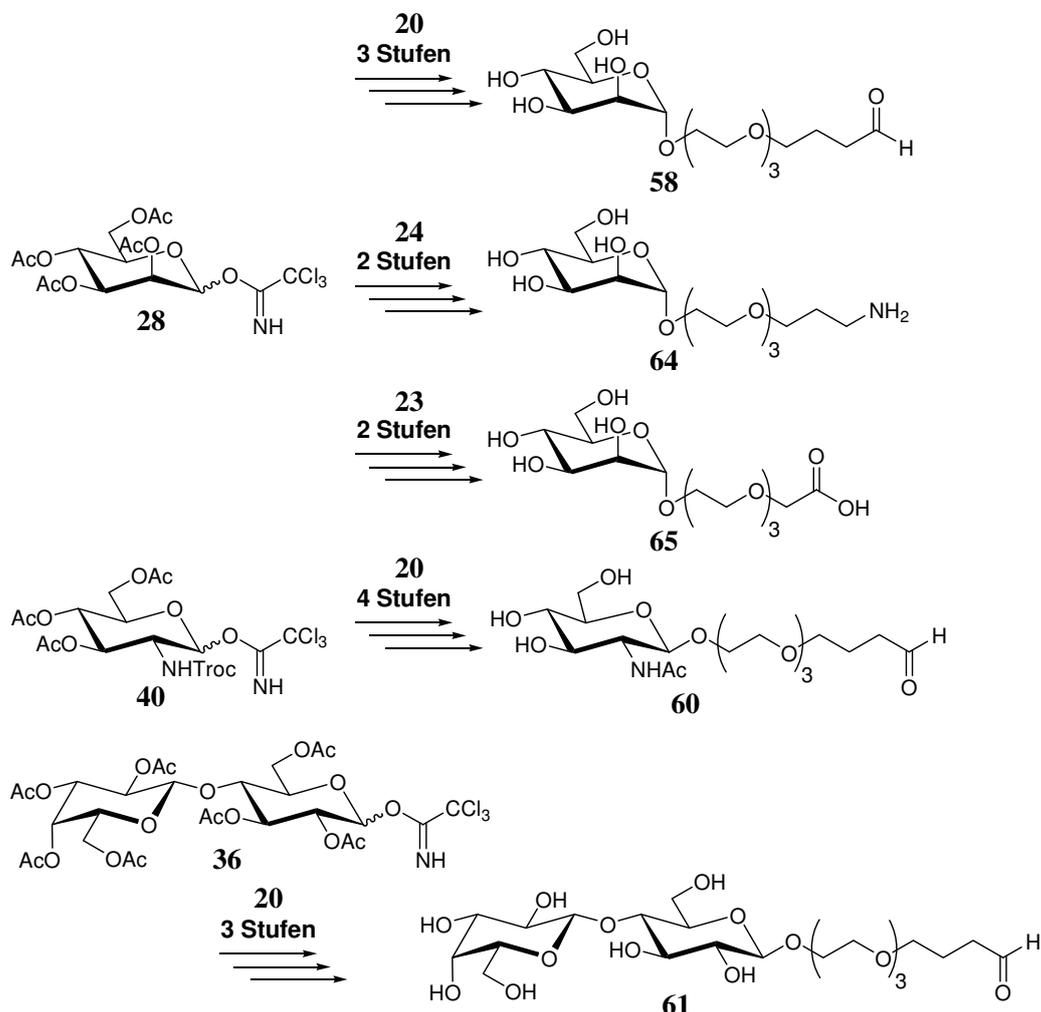


Abbildung 84: Synthese monofunktionalisierter Ethylenglykolderivate.

Die funktionalisierten Kohlenhydrate **58**, **60**, **61**, **64** und **65** wurden durch Glycosylierung aus den literaturbekannten Trichloracetimidatdonoren **28**, **36** und **40** sowie den entsprechenden Ethylenglykolakzeptoren (**21**, **23** und **24**) und anschließenden Entschützungs- bzw. Ozonolysereaktionen synthetisiert (vgl. Abbildung 85).



**Abbildung 85:** Synthese funktionalisierter Kohlenhydrate zur Darstellung von Kohlenhydrat-Arrays.

Damit standen aldehyd- (**58**, **60**, **61**), amin- (**64**) und carboxyl-(**65**) derivatisierte Kohlenhydrate zur Darstellung von Kohlenhydrat-Arrays mittels reduktiver Aminierung bzw. Ausbildung von Carbonsäureamidbindungen zur Verfügung.

Zur Untersuchung der homophilen Lewis X-Lewis X-Wechselwirkung auf Arrayoberflächen sollte entsprechend ein funktionalisiertes Lewis X-Derivat synthetisiert werden. Ausgehend von den Trichloracetimidatdonoren **32** und **48** sowie dem Glucosaminbaustein **39** wurde zunächst die geschützte literaturbekannte Lewis X-Verbindung **71** dargestellt (vgl. Abbildung 86).

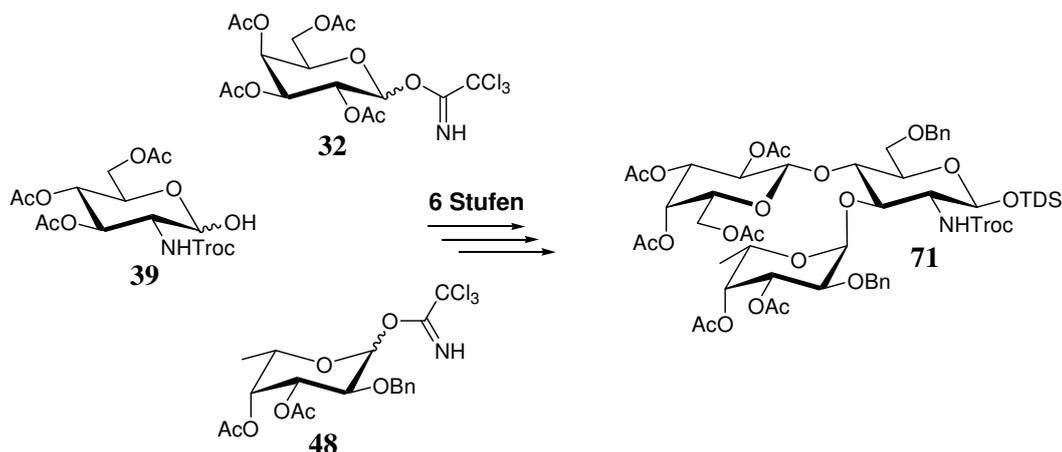


Abbildung 86: Synthese des geschützten Lewis X-Derivats **71**.

Im weiteren Verlauf der Synthese wurde nach Debenzylierung und Acetylierung neben der erwünschten Verbindung **72** bei Anwendung verschiedener Methoden immer auch das Nebenprodukt **73** erhalten (vgl. Abbildung 87). Aus beiden Verbindungen konnte durch anomere Entschützung Verbindung **74** dargestellt werden, aus der schließlich der Lewis X-Donor **75** synthetisiert wurde.

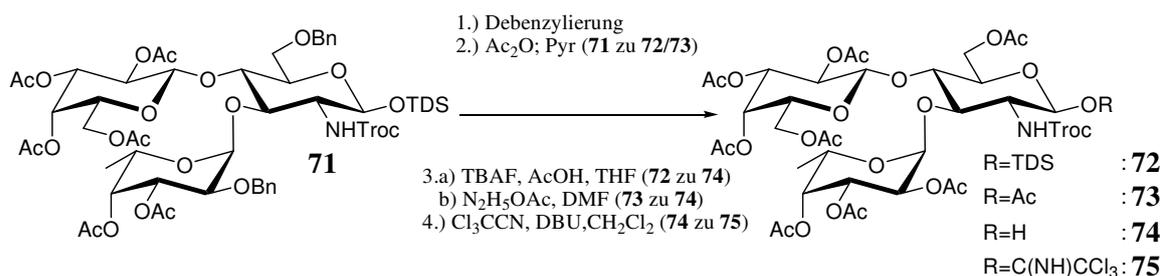


Abbildung 87: Umschüttung des Lewis X-Derivats **71** und Synthese des Lewis X-Donors **75**.

Aus dem Lewis X-Donor **75** und verschiedenen bifunktionellen Glykolakzeptoren sollten dimere Lewis X-Derivate dargestellt werden, die sich entweder mittels Ausbildung von Carbonsäureamidbindungen auf aminderivatisierten Glaträgern immobilisieren lassen (Sonde) oder mit Fluoreszenzfarbstoffen markieren lassen sollten (Probe). Diese Synthesen scheiterten, da die Trennung des dimeren Glycosylierungsproduktes vom Monoglycosylierungsnebenprodukt aufgrund des stark ausgeprägten Tailingeffektes bei der säulenchromatographischen Aufreinigung der Substanzen nicht gelang (vgl. Abbildung 88).

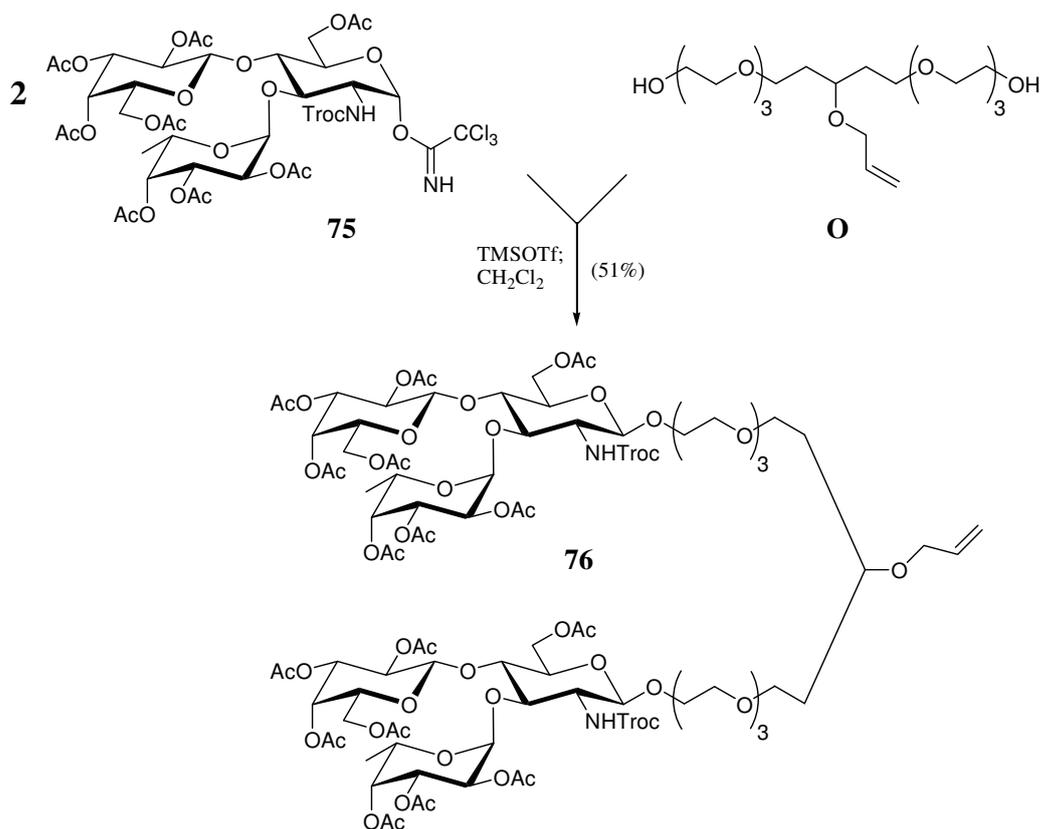


Abbildung 88: Synthese des dimeren Lewis X-Derivats **76**.

Zur Darstellung der Mannose-Glycolipide wurde ausgehend von dem literaturbekannten Mannosendonator **54** und den Akzeptoren Methanol, Dodecanol, **19** und **22** ein zyklisches Syntheschema angewandt, bei dem sich Glycosylierungs- und Desacetylierungsreaktionen abwechselten (vgl. Abbildungen 89 und 90). Aus dem Synthesezyklus wurden jeweils kleinere Mengen entnommen und nach Debenzylierung und Acetylierung konnten die entsprechenden peracetylierten Verbindungen erhalten werden. Die Aufreinigung dieser Verbindungen erforderte in den meisten Fällen die MPLC wiederum aufgrund des Tailingeffektes bei der Säulenchromatographie verursacht durch die Glykoleinheiten.

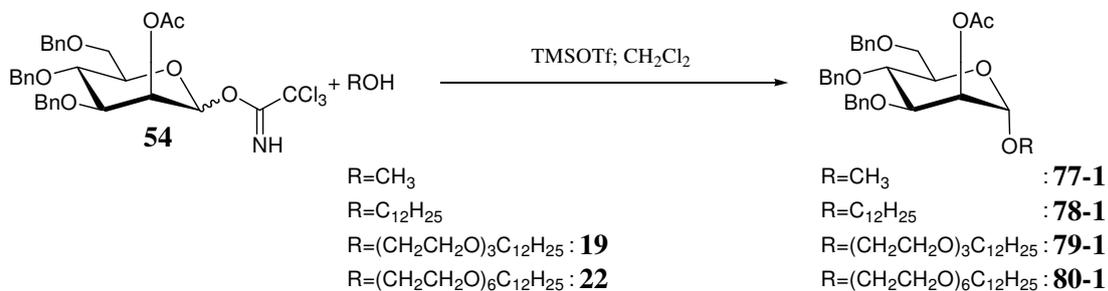


Abbildung 89: Erste Glycosylierungsreaktionen zur Darstellung der Mannose-Glycolipide.

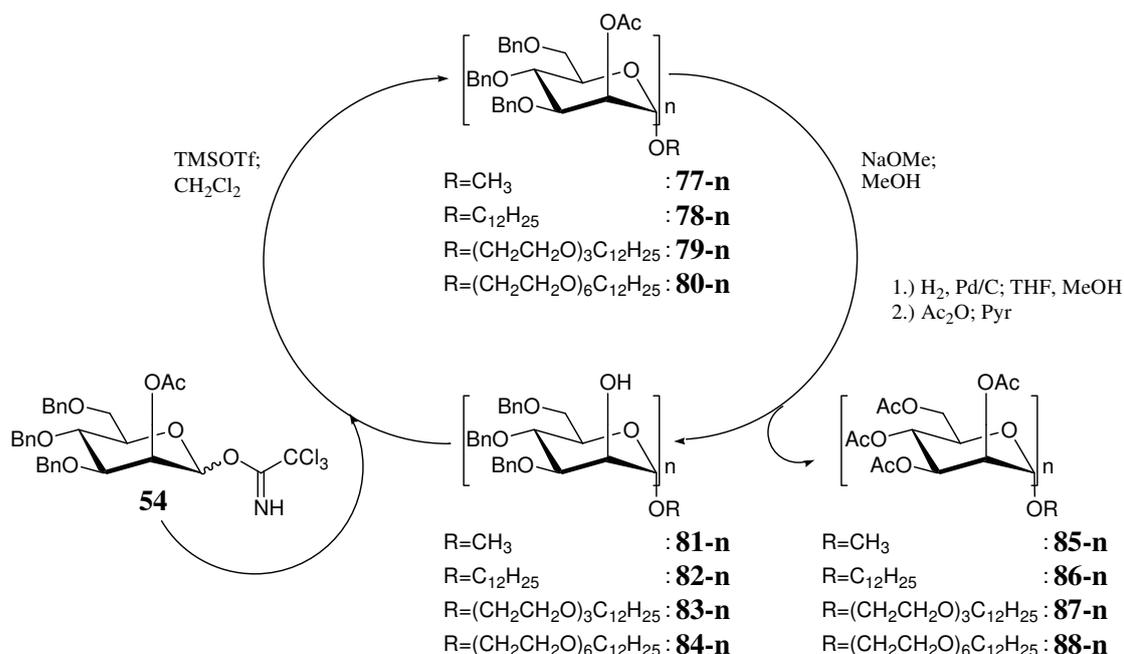


Abbildung 90: Zyklisches Syntheschema zur Darstellung der Mannose-Glycolipide.

Schließlich wurden die gewünschten Mannose-Glycolipide durch Desacetylierung unter Standardbedingungen ohne weitere Aufreinigung erhalten (vgl. Abbildung 91).

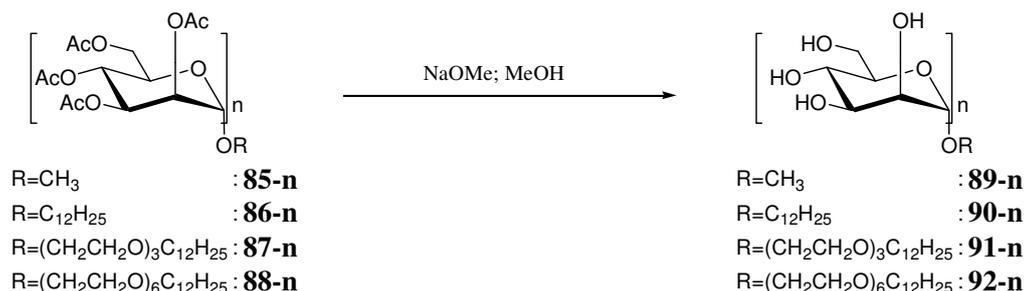
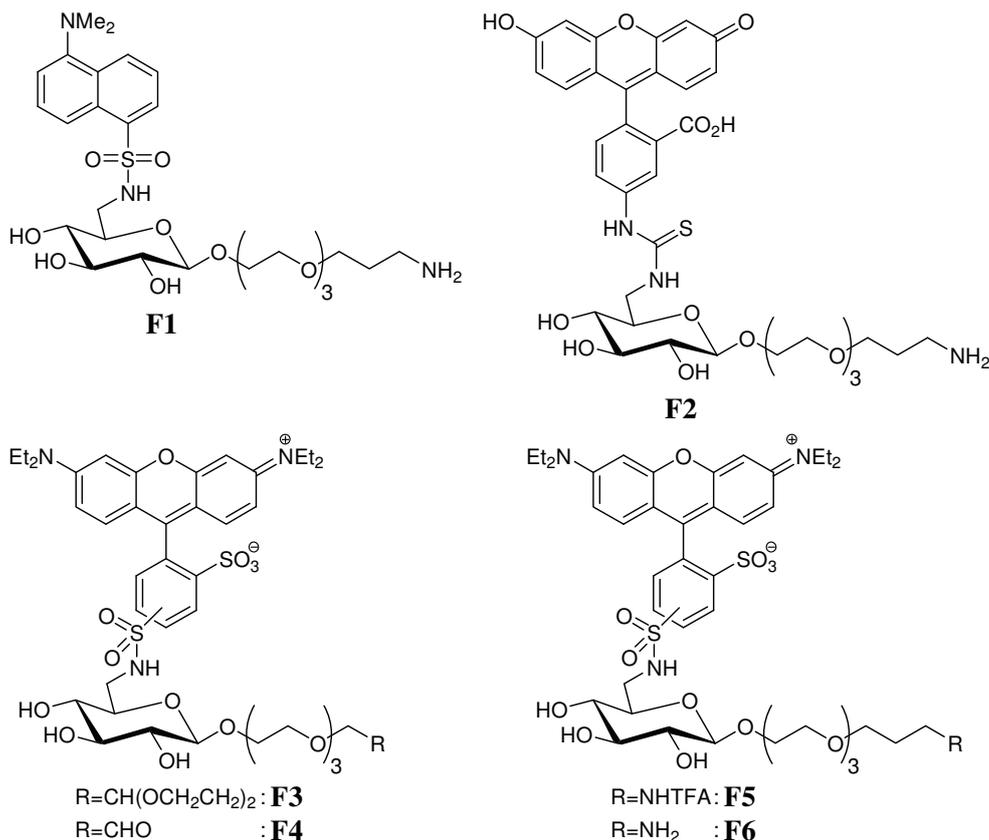


Abbildung 91: Entschützung der Mannose-Glycolipide.

Die dargestellten Mannose-Glycolipide ließen sich, wie erwartet, in Phospholipid-Micellen integrieren, wodurch die Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkung zu dem mannosebindenden Lektin Cyanovirin N durch die NMR-Spektroskopie beobachtet und näher charakterisiert werden konnte. Diese Untersuchungen wurden in der Arbeitsgruppe von *O. Zerbe* an der Universität Zürich durchgeführt.

## 8.2 Array Untersuchungen

Zu Beginn der Array-Experimente wurde die reduktive Aminierung als Immobilisierungsmethode für amino- bzw. aldehydfunktionalisierte Kohlenhydratderivate auf Glaträgern untersucht (vgl. Abbildung 83, Schritt C). Dazu wurden die fluoreszenzmarkierten Verbindungen **F1** – **F6** eingesetzt, die von *M. B. Biskup* zur Verfügung gestellt wurden (vgl. Abbildung 92).



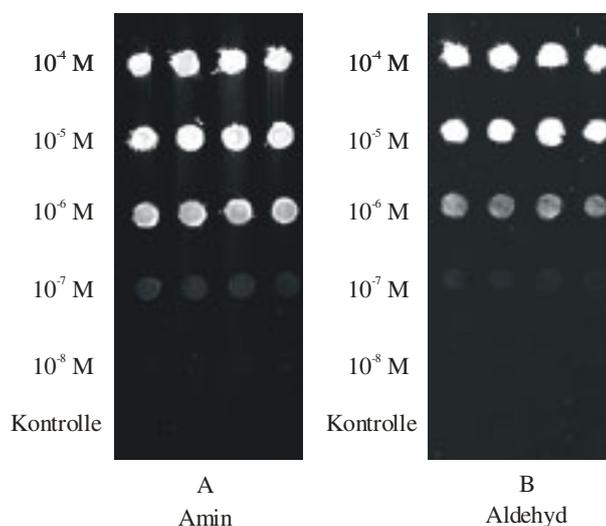
**Abbildung 92:** Fluoreszenzmarkierte Kohlenhydrate zur Untersuchung der Immobilisierung auf Glaträgern.

Diese Verbindungen wurden, zusammen mit dem Reduktionsmittel Natriumcyanoborhydrid im Überschuss, jeweils auf zuvor gereinigte aldehyd- bzw. aminderivatisierte Glaträger in der Regel im Konzentrationsbereich von  $10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> bis  $10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup> aufgetragen und damit spezifisch und kovalent immobilisiert. Die Reaktion wurde in einer Feuchtekammer durchgeführt, die Reaktionszeit lag jeweils zwischen 12 und 16 Stunden. Nach Entfernung überschüssiger Reaktionslösung wurde die resultierende Fluoreszenzintensität gemessen.

Erste Messungen wurden mit einem ELISA-Plattenreader durchgeführt; dabei konnten keine reproduzierbaren Messergebnisse erhalten werden, weder bei der Messung von Flüssigkeitstropfen auf dem Objektträger noch bei der Messung einer trockenen Chipoberfläche.

Als nächstes wurde ein Fluoreszenzmikroskop als Messgerät benutzt. Damit ließ sich die kovalente Immobilisierung der aminoterminalen Kohlenhydrate **F2** und **F6** durch reduktive Aminierung auf aldehydderivatisierten Glaträgern nachweisen. Die Fluoresceinverbindung **F2** musste dabei durch Versiegelung unter einem Deckglas mit einem dünnen Flüssigkeitsfilm überzogen werden, während die Lissaminverbindung **F6** direkt auf trockenen Objektträgern vermessen werden konnte. In beiden Fällen konnten steigende Fluoreszenzintensitäten mit zunehmender Konzentration an aufgetragenem Kohlenhydrat beobachtet werden; außerdem zeigte sich in gewissem Ausmaß auch eine unspezifische nicht-kovalente Adsorption der markierten Verbindungen auf der Arrayoberfläche.

Diese Beobachtungen konnten durch Verwendung eines DNA-Array-Scanners als Messgerät zur Bestimmung der räumlichen Verteilung der Fluoreszenzintensität auf dem Kohlenhydrat-Array bestätigt werden. Zudem konnte mit der Immobilisierung der aldehydfunktionalisierten Verbindung **F4** auf aminderivatisierten Objektträgern auch der umgekehrte Fall nachgewiesen werden. Bei passender Kombination der funktionellen Gruppen (Aldehydverbindung auf Aminchip bzw. Aminverbindung auf Aldehydchip) konnten steigende Fluoreszenzintensitäten im Konzentrationsbereich von  $10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  bis  $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  beobachtet werden, die sich auf spezifische kovalente Bindungen zurückführen lassen (vgl. Abbildung 93).



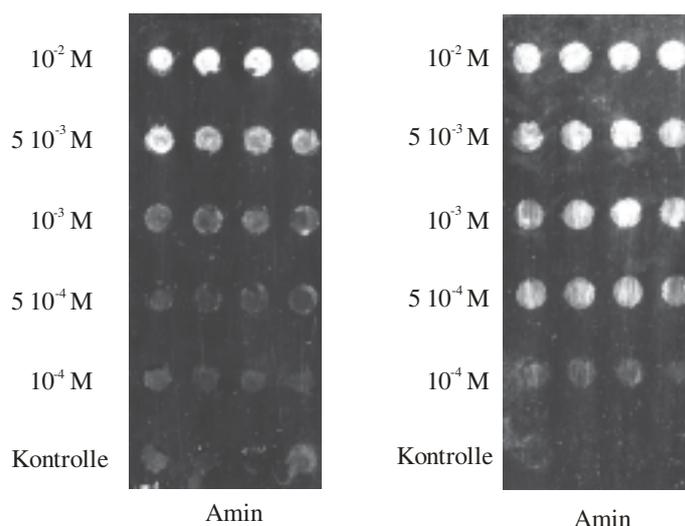
**Abbildung 93:** Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenzintensität der durch reduktive Aminierung immobilisierten Verbindung **F4** und **F6** auf Amin- bzw. Aldehydoberfläche (Aufnahmen mit Array-Scanner).

Bei nicht-passender Kombination funktioneller Gruppen oder bei der Auftragung der geschützten Vorläuferverbindungen **F3** oder **F5** wurden dagegen geringere Signalintensitäten erhalten, die auf unspezifische nicht-kovalente Bindung dieser Verbindungen auf der Chipoberfläche zurückzuführen waren. Gleichfalls geringere Signale wurden bei Verzicht auf das Reduktionsmittel während der Immobilisierungsreaktion erhalten (lediglich reversible Ausbildung einer kovalenten Iminbindung möglich). Unspezifisch gebundenes Kohlenhydrat

konnte durch Waschprozesse nicht mehr von der Arrayoberfläche entfernt werden. Durch Verwendung von Silikonmasken konnte die Reproduzierbarkeit der Messwerte verbessert werden; dennoch lagen Schwankungen in den gemessenen Intensitäten gleichartig präparierter Kohlenhydratspots bei bis zu 30%.

Die Kinetik der Immobilisierungsreaktion wurde durch Variation der Reaktionszeit bei der Immobilisierung des fluoreszenzmarkierten Kohlenhydrats **F6** untersucht – dabei erwies sich eine Reaktionszeit von 12 Stunden bei Raumtemperatur für die kovalente Verknüpfung durch reduktive Aminierung als ausreichend. Die beobachtete Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenzintensitäten ist, zumindest für den Konzentrationsbereich oberhalb von  $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , ein kinetischer Effekt, da eine ausreichende Anzahl an Kohlenhydraten in Lösung zur Absättigung aller funktioneller Gruppen auf der Chipoberfläche prinzipiell zur Verfügung stand. Wegen des gleichzeitigen Auftretens unspezifischer nicht-kovalenter Bindungsanteile und aufgrund der schlechten Reproduzierbarkeit absoluter Messwerte (Schwankungen in der Intensität von bis zu 30%) waren quantitative Aussagen über die Kinetik der Reaktion nicht möglich; eine Abschätzung unter vereinfachenden Annahmen ergab jedoch den erwarteten Verlauf für eine Reaktion pseudo-erster Ordnung.

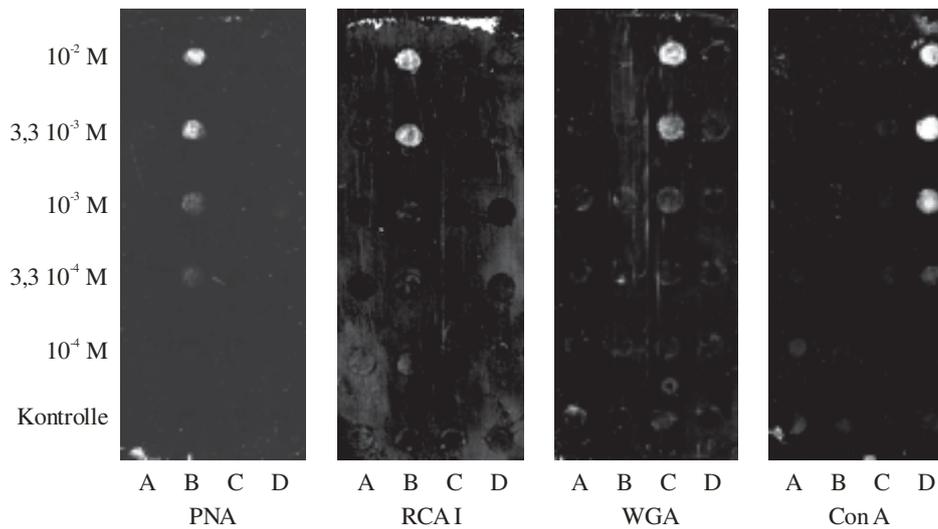
Die Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkung auf Kohlenhydrat-Arrays konnte durch Immobilisierung der Mannoseverbindungen **58**, **64** und **65** durch reduktive Aminierung bzw. Ausbildung von Carbonsäureamidbindungen und anschließender Hybridisierung mit fluoreszenzmarkiertem Lektin Concanavalin A ( $c = 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) nachgewiesen werden. Dabei konnten konzentrationsabhängige Fluoreszenzintensitäten im Bereich von  $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  bis  $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  an aufgetragenem Kohlenhydrat beobachtet werden (vgl. Abbildung 94).



**Abbildung 94:** Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenzintensität der immobilisierten Mannoseverbindungen **58** (links, gebunden durch reduktive Aminierung) und **64** (rechts, gebunden durch Carbonsäureamidbindung) auf Aminoberflächen nach Hybridisierung mit fluoreszenzmarkiertem Lektin Con A ( $c = 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Verwendung von Silikonmasken mit  $5 \mu\text{l}$  Volumen pro Spot.

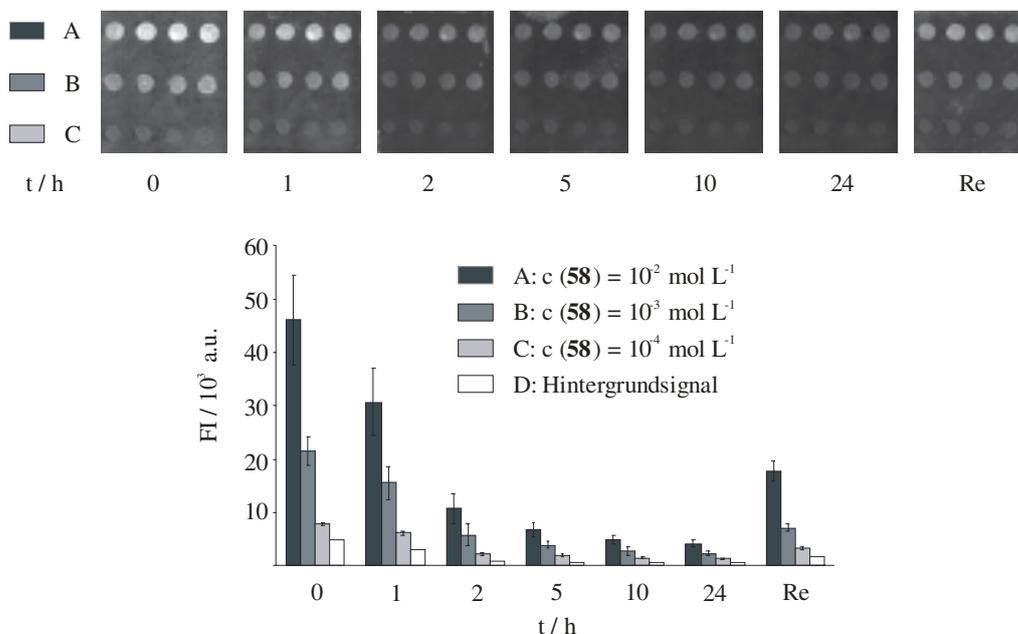
Bei Kombination der aldehydfunktionalisierten Verbindung **58** und aminderivatisierten Objektträgern konnten im Vergleich bessere Ergebnisse (höhere Intensitäten und geringeres Fluoreszenzhintergrundsignal) erzielt werden als bei Auftragung von Verbindung **64** auf Aldehydoberflächen. Schwächere Signalintensitäten wurden bei Kombination nicht-passender funktioneller Gruppen oder bei Verzicht auf das Kupplungsreagenzes (Natriumcyanoborhydrid bzw. PyBOP) festgestellt; diese waren auf unspezifische nicht-kovalente Bindungen der Kohlenhydrate auf der Chipoberfläche oder auf die zwar kovalente aber reversible Ausbildung von Iminbindungen zurückzuführen. Die Immobilisierung von Verbindung **65** durch Ausbildung von Carbonsäureamidbindungen gelang zwar mit Hilfe des Kupplungsreagenzes PyBOP in absolutem DMF als Lösungsmittel nicht jedoch mit EDC in wässriger Lösung. Auch bei den Versuchen zur Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkung konnte durch Verwendung von Silikonmasken die Reproduzierbarkeit der Messwerte verbessert werden. Unspezifische Haftung des Lektins auf der Arrayoberfläche trat bei der verwendeten Konzentration zur Hybridisierung von  $c = 1 \mu\text{g mL}^{-1}$  nur in geringem Maße auf (auf Hydroxy- und Aldehydoberflächen stärker als auf Aminoberflächen), so dass der Einsatz verschiedener Blockierungsreagenzien keine Verbesserung der Ergebnisse brachte; insbesondere konnte das Detektionslimit nicht unter eine Konzentration von  $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  an aufgetragenem Kohlenhydrat abgesenkt werden. Dies gelang gleichfalls nicht durch eine Erhöhung der Lektinkonzentration bei der Hybridisierung.

Die Selektivität der Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkung konnte durch Kreuzexperimente mit den aldehydfunktionalisierten Kohlenhydraten **58**, **60** und **61** sowie den fluoreszenzmarkierten Lektinen Con A, WGA, PNA und RCA I nachgewiesen werden. Die verschiedenen Kohlenhydrate wurden nach der Immobilisierung durch reduktive Aminierung auf aminderivatisierten Objektträgern bei Hybridisierungsexperimenten ausschließlich von ihren bekannten komplementären Lektinpartnern erkannt (vgl. Abbildung 95).



**Abbildung 95:** Selektivität der Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkung nach Immobilisierung von Polyethylenglykol 1000 Dialdehyd (Spur A), Lactoseverbindung **61** (Spur B), *N*-Acetylglucosaminverbindung **60** (Spur C) und Mannoseverbindung **58** (Spur D) und Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Lektinen PNA (außen links), RCA I (Mitte links), WGA (Mitte rechts) und Con A (außen rechts), (jeweils  $c = 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Mit Hilfe von Wasch- und Elutionsexperimenten wurde die Reversibilität der Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkung auf Kohlenhydrat-Arrays untersucht. Nach Immobilisierung von Verbindung **58** im Konzentrationsbereich von  $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  bis  $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  und Hybridisierung mit fluoreszenzmarkiertem Lektin Concanavalin A nahm die gemessene Fluoreszenzintensität bei allen aufgetragenen Konzentrationen im Verlauf fortdauernder Wasch- oder Elutionsprozesse wieder ab (vgl. Abbildung 96).



**Abbildung 96:** Reversibilität der Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkung durch Elution des hybridisierten Arrays mit Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid in PBS-Puffer ( $200 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Fluoreszenzintensität nach der Hybridisierung mit fluoreszenzmarkiertem Lektin Con A ( $c = 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $t = 0 \text{ h}$ ), Abnahme bei fortdauerndem Elutionsprozess (1-24 h) und Rehybridisierung (Re); (oben: Aufnahmen mit Array-Scanner, unten: Messwerte).

Die Abnahme verlief dabei relativ langsam und nicht vollständig, was auf unspezifisch gebundene Lektinanteile zurückzuführen war, die sich nicht wieder entfernen ließen. Im direkten Vergleich war sie bei der Elution mit Kompetitoren wie Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid oder Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid signifikant stärker als bei Waschvorgängen in reinem PBS-Puffer. Polyvalente Kompetitoren wie Stärke oder Glycogen führten zu keiner erhöhten Abnahmegeschwindigkeit der Fluoreszenzintensitäten im Vergleich zu reinem PBS-Puffer, bei Verwendung denaturierender Reagenzien wie SDS, Harnstoff oder Guanidiniumhydrochlorid lag diese im Bereich der Elution mit Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid. Durch siedendes Wasser oder proteolytischen Abbau konnte gebundenes Lektin gleichfalls wieder von der Chipoberfläche entfernt werden. Aufgrund zurückbleibender Reste an unspezifisch gebundenem Lektin oder von Lektinfragmenten sowie durch Veränderungen der physikochemischen Eigenschaften der Glasoberflächen durch die Wasch- bzw. Elutionsprozesse konnte bei Rehybridisierungsexperimenten die ursprünglich erhaltene Fluoreszenzintensität nicht mehr erreicht werden.

Durch kovalente Immobilisation der divalenten Mannoseverbindungen **H**, **I** und **J** und der monovalenten Verbindung **65** und anschließende vergleichende Hybridisierungsexperimente mit dem fluoreszenzmarkierten Lektin Concanavalin A wurde die vermutete Polyvalenz der Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkung auf Kohlenhydrat-Arrays nicht bestätigt.



## 9 Literatur- und Quellenverzeichnis

- [1] D. Voet, J. G. Voet, *Biochemie*, VCH, Weinheim, **1992**.
- [2] S.-I. Hakomori, *Spektrum Wissensch.* **1986**, Juli, 90-101.
- [3] S. J. Singer, G. L. Nicolson, *Science* **1972**, 720-731.
- [4] H.-J. Gabius, *Naturwissenschaften* **2000**, 87, 108-121.
- [5] H.-J. Gabius, H.-C. Siebert, S. Andre, J. Jimenez-Barbero, H. Rüdiger, *ChemBioChem* **2004**, 5, 740-764.
- [6] R. R. Schmidt, *Angew. Chem.* **1986**, 98, 213-236; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, 25, 212-235.
- [7] A. Ehnsen, Dissertation, Universität Konstanz **1986**.
- [8] R. A. Dwek, *Chem. Rev.* **1996**, 683-720.
- [9] Y. C. Lee, R. T. Lee, *Acc. Chem. Res.* **1995**, 28, 321-327.
- [10] H. Lis, N. Sharon, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 637-674.
- [11] BioCarbChemicals, Katalog **1990**.
- [12] N. Sharon, H. Lis, *Spektrum Wissensch.* **1993**, März, 66-74.
- [13] M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 2908-2953; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2755-2794.
- [14] J. D. Badjic, A. Nelson, S. J. Cantrill, W. B. Turnbull, J. F. Stoddart, *Acc. Chem. Res.* **2005**, 38, 723-732.
- [15] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J. D. Watson, *Molecular Biology of the Cell*, Garland, New York, **2002**.
- [16] N. F. Burkhalter, S. M. Dimick, E. J. Toone in *Carbohydrates in Chemistry and Biology*, Vol. 2 (Hrsg.: B. Ernst, G. W. Hart, P. Sinay), Wiley-VCH, Weinheim, **2000**, 863-914.
- [17] I. Eggens, B. Fenderson, T. Toyokuni, B. Dean, M. Stround, S.-I. Hakomori, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 9476-9484.
- [18] N. V. Bovin in *Glycosciences* (Hrsg.: H.-J. Gabius, S. Gabius), Chapman and Hall, London, **1997**.
- [19] D. Spillmann, M. M. Burger in *Carbohydrates in Chemistry and Biology*, Vol. 3 (Hrsg.: B. Ernst, G. W. Hart, P. Sinay), Wiley-VCH, Weinheim, **2000**, 1061-1069.
- [20] J. Rojo, J. C. Morales, S. Penades in *Topics in Current Chemistry*, Vol. 218, Springer, Berlin Heidelberg, **2002**, 45-92.
- [21] A. Imberty, S. Perez, *Chem. Rev.* **2000**, 100, 4567-4588.
- [22] S.-I. Hakomori, K. Handa in *Carbohydrates in Chemistry and Biology*, Vol. 4 (Hrsg.: B. Ernst, G. W. Hart, P. Sinay), Wiley-VCH, Weinheim, **2000**, 771-782.
- [23] J. Vogel, G. Bendas, U. Bakowsky, G. Hummel, R. R. Schmidt, U. Kettmann, U. Rothe, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, 1372, 205-215.
- [24] S.-I. Hakomori, Y. Zhang, *Chem. Biol.* **1997**, 4, 97-104.
- [25] R. U. Lemieux, *Acc. Chem. Res.* **1996**, 29, 373-380.
- [26] D. H. Williams, M. S. Westwell, *Chem. Soc. Rev.* **1998**, 27, 57-63.
- [27] W. C. Boyd, E. Slapeigh, *Science* **1954**, 119, 419.
- [28] I. J. Goldstein, R. C. Hughes, M. Monsigny, T. Osawa, N. Sharon, *Nature* **1980**, 285, 66.
- [29] M. E. Etzler, Y. C. Lee, R. T. Lee, P. G. Marron-Terada, N. M. Dahms, P. R. Crocker, S. Kelm, R. Wallis, R. P. McEver, D. N. W. Cooper, S. H. Barondes in *Carbohydrates in Chemistry and Biology*, Vol. 4 (Hrsg.: B. Ernst, G. W. Hart, P. Sinay), Wiley-VCH, Weinheim, **2000**, 533-647.

- [30] W. I. Weis, K. Drickamer, *Ann. Rev. Biochem.* **1996**, *65*, 441-473.
- [31] R. Loris, T. Hamelryck, J. Bouckaert, L. Wyns, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1383*, 9-36.
- [32] H. Lis, N. Sharon, *Annu. Rev. Biochem.* **1986**, *55*, 35-67.
- [33] K. Drickamer, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 9557-9560.
- [34] N. Sharon, H. Lis, *FASEB J.* **1990**, *4*, 3198-3208.
- [35] J. M. Rini, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1995**, *24*, 551-577.
- [36] N. Sharon, *Trends Biochem. Sci.* **1993**, *18*, 221-226.
- [37] C. Emmerich, J. R. Helliwell, M. Redshaw, J. H. Naismith, S. J. Harrop, J. Raftery, J. A. K. (Gilboa), J. Yariv, Z. Dauter, K. S. Wilson, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **1994**, 749-756.
- [38] J. B. Sumner, *J. Biol. Chem.* **1919**, *37*, 137-142.
- [39] J. B. Sumner, S. F. Howell, *J. Bacteriol.* **1936**, *32*, 227-237.
- [40] J. H. Naismith, C. Emmerich, J. Habash, S. J. Harrop, J. R. Helliwell, W. N. Hunter, J. Raftery, A. J. Kalb, J. Yariv, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **1994**, 847-58.
- [41] J. Bouckaert, R. Loris, F. Poortmans, L. Wyns, *Proteins* **1995**, *23*, 510-524.
- [42] P. Adhikari, K. Bachhawat-Sikder, C. J. Thomas, R. Ravishankar, A. A. Jeyaprakash, V. Sharma, M. Vijayan, A. Surolia, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 40734-40739.
- [43] R. Banerjee, K. Das, R. Raviashankar, K. Suguna, A. Surolia, M. Vijayan, *J. Mol. Biol.* **1996**, *259*, 281-296.
- [44] T. W. Hamelryck, M.-H. Dao-Thi, F. Poortmans, M. J. Chrispeels, L. Wyns, R. Loris, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 20479-20485.
- [45] E. C. Sweeney, A. G. Tonevitsky, D. E. Temiakov, A. G. Agapov, S. Saward, R. A. Palmer, *Proteins* **1997**, *28*, 586-589.
- [46] N. V. Konareva, A. G. Gabdulkhakov, S. Eschenburg, S. Stoeva, A. N. Popov, R. Krauspenhaar, M. E. Andriyanova, Y. Savochkina, I. I. Agapov, A. G. Tonevitsky, A. N. Kornev, V. V. Kornilov, V. N. Zaitsev, W. Voelter, C. Betzel, S. V. Nikonov, B. K. Vainshtein, A. M. Mikhailov, *Kristallografiya* **2001**, *46*, 866-874.
- [47] M. Muraki, M. Ishimura, K. Harata, *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1569*, 10-20.
- [48] J. Emsley, H. E. White, B. P. O'Hara, G. Oliva, N. Srinivasan, I. J. Tickle, T. Blundell, M. B. Pepys, S. P. Wood, *Nature* **1994**, *367*, 338-345.
- [49] C. S. Wright, G. E. Kellogg, *Protein Sci.* **1996**, *5*, 1466-1476.
- [50] M. Boyd, K. Gustafson, J. McMahon, R. Shoemaker, B. O'Keefe, T. Mori, R. Gulakowski, L. Wu, M. Rivera, C. Laurencott, M. Currens, J. Cardellina, R. Buckheit, P. Nara, L. Pannell, R. Sowder, L. Henderson, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41*, 1521-1530.
- [51] B. O'Keefe, S. Shenoy, D. Xie, W. Zhang, J. Muschik, M. Currens, I. Chaiken, M. Boyd, *Mol. Pharmacol.* **2000**, *58*, 982-992.
- [52] F. Yang, C. A. Bewley, J. M. Louis, K. R. Gustafson, M. R. Boyd, A. M. Gronenborn, G. M. Clore, A. Wlodawer, *J. Mol. Biol.* **1999**, *288*, 403-412.
- [53] I. Botos, B. R. O'Keefe, S. R. Shenoy, L. K. Cartner, D. M. Ratner, P. H. Seeberger, M. R. Boyd, A. Wlodawer, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 34336-34342.
- [54] C. A. Bewley, K. R. Gustafson, M. R. Boyd, D. G. Covell, A. Bax, G. M. Clore, A. M. Gronenborn, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 571-578.
- [55] C. A. Bewley, *Structure* **2001**, *9*, 931-940.
- [56] C. Sandstrom, O. Berteau, E. Gemma, S. Oscarson, L. Kenne, A. M. Gronenborn, *Biochemistry* **2004**, *43*, 13926-13931.
- [57] C. A. Bewley, S. Otero-Quintero, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3892-3902.
- [58] C. A. Bewley, S. Kiyonaka, I. Hamachi, *J. Mol. Biol.* **2002**, *322*, 881-889.
- [59] A. J. Bolmstedt, B. R. O'Keefe, S. R. Shenoy, J. B. McMahon, M. R. Boyd, *Mol. Pharmacol.* **2001**, *59*, 949-954.
- [60] D. Spillmann, M. M. Burger, *J. Cell Biochem.* **1996**, *61*, 562-568.
- [61] G. N. Misevic, M. M. Burger, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 4922-4929.

- [62] N. Kojima, S.-I. Hakomori, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 20159-20162.
- [63] B. Fenderson, U. Zehavi, S.-I. Hakomori, *J. Exp. Med.* **1984**, 160, 1591-1596.
- [64] N. Kojima, S.-I. Hakomori, *J. Biol. Chem.* **1991**, 17552-17558.
- [65] D. Spillmann, *Glycoconjugate J.* **1994**, 11, 169-171.
- [66] S.-I. Hakomori, *Pure Appl. Chem.* **1991**, 63, 473-482.
- [67] Y. D. Vankar, R. R. Schmidt, *Chem. Soc. Rev.* **2000**, 29, 201-216.
- [68] A. Wassermann, T. Takaki, *Berlin. Klin. Wschr.* **1968**, 35, 5-8.
- [69] D. Solter, B. B. Knowles, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, 75, 5565-5569.
- [70] M. Boubelik, D. Floryk, J. Bohata, L. Draberova, J. Macak, F. Smid, P. Draber, *Glycobiology* **1998**, 8, 139-146.
- [71] E. Gold, *Vox Sang.* **1968**, 15, 222-231.
- [72] H. Lis, N. Sharon, *J. Chromatogr.* **1981**, 215, 361-372.
- [73] B. M. Dunn, I. M. Chaiken, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1974**, 71, 2382-2385.
- [74] L. W. Nichol, A. G. Ogston, D. J. Winzor, W. H. Sawyer, *Biochem. J.* **1974**, 143, 435-443.
- [75] V. Horejsi, M. Ticha, *J. Chromatogr.* **1986**, 376, 49-67.
- [76] V. Horejsi, M. Ticha, J. Kocourek, *Biochim. Biophys. Acta* **1977**, 499, 290-300.
- [77] J. K. Grime, *Analytical Solution Chemistry*, Wiley, New York, **1985**.
- [78] T. Wiseman, S. Williston, J. F. Brandts, L. N. Lin, *Anal. Biochem.* **1989**, 179, 131-137.
- [79] G. A. Holdgate, *BioTechniques* **2001**, 31, 164-166.
- [80] F. Schindler, *LaborPraxis* **2000**, 24, 38-42.
- [81] W. Jäger in *Carbohydrates in Chemistry and Biology*, Vol. 2 (Hrsg.: B. Ernst, G. W. Hart, P. Sinay), Wiley-VCH, Weinheim, **2000**, 1045-1057.
- [82] M. Fivash, E. M. Towler, R. J. Fisher, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1998**, 9, 97-101.
- [83] D. Hall, *Anal. Biochem.* **2001**, 288, 109-125.
- [84] A. Poveda, J. Jimenez-Barbero, *Chem. Soc. Rev.* **1999**, 27, 133-143.
- [85] P. Balaram, A. A. Bothner-By, J. Dadok, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 4015-4017.
- [86] P. Balaram, A. A. Bothner-By, E. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 4017-4018.
- [87] T. Peters in *Carbohydrates in Chemistry and Biology*, Vol. 2 (Hrsg.: B. Ernst, G. W. Hart, P. Sinay), Wiley-VCH, Weinheim, **2000**, 1003-1023.
- [88] S. Gabius, K. P. Hellmann, T. Hellmann, U. Brinck, H. J. Gabius, *Anal. Biochem.* **1989**, 182, 447-451.
- [89] H. J. Gabius, R. Engelhardt, K. P. Hellmann, T. Hellmann, A. Ochsenfahrt, *Anal. Biochem.* **1987**, 165, 349-355.
- [90] M. C. Shao, C. C. Chin, *Methods Enzymol.* **1994**, 247, 253-262.
- [91] R. Roy, D. Page, S. F. Perez, V. V. Bencomo, *Glycoconjugate J.* **1998**, 15, 251-263.
- [92] H. Streicher, W. Schmid, I. Wenzl, C. Fiedler, H. Kahlig, F. M. Unger, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, 10, 1369-1371.
- [93] M. Duk, E. Lisowska, J. H. Wu, A. M. Wu, *Anal. Biochem.* **1994**, 221, 266-272.
- [94] E. Vorberg, D. R. Bundle, *J. Immunol. Meth.* **1990**, 132, 81-89.
- [95] J. M. de la Fuente, A. G. Barrientos, T. C. Rojas, J. Rojo, J. Canada, A. Fernandez, S. Penades, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 2318-2321; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2258-2261.
- [96] C. Tromas, J. Rojo, J. M. de la Fuente, A. G. Barrientos, R. Garcia, S. Penades, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 2318-2321; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 3052-3055.
- [97] M. R. Wormald, C. J. Edge, R. A. Dwek, *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **1991**, 180, 1214-1221.
- [98] C. Gege, Dissertation, Universität Konstanz **2001**.
- [99] C. Gege, G. Bendas, J. Vogel, U. Rothe, R. R. Schmidt, *Chem. Eur. J.* **2000**, 6, 111-122.
- [100] A. Geyer, C. Gege, R. R. Schmidt, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 1569-1571; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1466-1468.

- [101] A. Geyer, C. Gege, R. R. Schmidt, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 3381-3385; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3245-3249.
- [102] S. Choudhuri, *J. Biochem. Mol. Tox.* **2004**, *18*, 171-179.
- [103] D. N. Howbrook, A. M. van der Valk, M. C. O'Shaughnessy, D. K. Sarker, S. C. Baker, A. W. Lloyd, *Drug Discovery Today* **2003**, *8*, 642-651.
- [104] Q. Xu, K. S. Lam, *J. Biomed. Biotechnol.* **2003**, 257-266.
- [105] K.-Y. Tomizaki, K. Usui, H. Mihara, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1-18.
- [106] L. Bonetta, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 571-578.
- [107] U. Reineke, R. Volkmer-Engert, J. Schneider-Mergener, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, *12*, 59-64.
- [108] R. Frank, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 9217-9232.
- [109] S. P. A. Fodor, J. L. Read, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Lu, D. Solas, *Science* **1991**, *251*, 767-773.
- [110] A. C. Pease, D. Solas, E. J. Sullivan, M. T. Cronin, C. P. Holmes, S. P. A. Fodor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 5022-5026.
- [111] M. C. Pirrung, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1326-1341; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1276-1289.
- [112] H. Ge, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, e3.
- [113] B. D. Martin, B. P. Gaber, C. H. Patterson, D. C. Turner, *Langmuir* **1998**, *14*, 3971-3975.
- [114] L. A. Ruiz-Taylor, T. L. Martin, F. G. Zaugg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 852-857.
- [115] G. MacBeath, S. L. Schreiber, *Science* **2000**, *289*, 1760-1763.
- [116] R. Benters, C. M. Niemeyer, D. Wöhrle, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 686-694.
- [117] H. Zhu, J. F. Klemic, S. Chang, *Nat. Gen.* **2000**, *26*, 283-289.
- [118] S. C. Lin, F. G. Tseng, H. M. Huang, C. Y. Huang, C. C. Chieng, *Fresenius J. Anal. Chem.* **2001**, *371*, 202-208.
- [119] D. J. Revell, J. R. Knight, D. J. Blyth, A. H. Haines, D. A. Russell, *Langmuir* **1998**, *14*, 4517-4524.
- [120] G. Ramsay, *Nat. Biotech.* **1998**, *16*, 40-44.
- [121] D. J. Lockhart, E. A. Winzler, *Nature* **2000**, *405*, 827-836.
- [122] S. Lorkowski, G. Lorkowski, P. Cullen, *Chem. unserer Zeit* **2000**, *34*, 356-372.
- [123] T. Kodadek, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 105-115.
- [124] H. Zhu, M. Snyder, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 40-45.
- [125] Y.-S. Lee, M. Mrksich, *Trends Biotechnol.* **2002**, *20*, S14-S18.
- [126] D. Wang, S. Liu, B. J. Trummer, C. Deng, A. Wang, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 275-281.
- [127] S. Park, I. Shin, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3312-3314; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3180-3182.
- [128] B. T. Houseman, M. Mrksich, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 443-454.
- [129] W. G. T. Willats, S. E. Rasmussen, T. Kristensen, J. D. Mikkelsen, J. P. Knox, *Proteomics* **2002**, *2*, 1666-1671.
- [130] L. Nimrichter, A. Gargir, M. Gortler, R. T. Altstock, A. Shtevi, O. Weisshaus, E. Fire, N. Dotan, R. L. Schnaar, *Glycobiology* **2004**, *14*, 197-203.
- [131] M. Schwarz, L. Spector, A. Gargir, A. Shtevi, M. Gortler, R. T. Altstock, A. A. Dukler, N. Dotan, *Glycobiology* **2003**, *13*, 749-754.
- [132] L. L. Kiessling, C. W. Cairo, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 234-235.
- [133] K. R. Love, P. H. Seeberger, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3733-3736; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3583-3586.
- [134] C. O. Mellet, J. M. G. Fernandez, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 819-822.
- [135] T. Feizi, F. Fazio, W. Chai, C.-H. Wong, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, *13*, 637-645.
- [136] S. L. Flitsch, R. V. Ulijn, *Nature* **2003**, *421*, 219-220.
- [137] J. Hirabayashi, *Trends Biotechnol.* **2003**, *21*, 141-143.
- [138] D. Wang, *Proteomics* **2003**, *3*, 2167-2175.

- [139] M. D. Disney, P. H. Seeberger, *Drug Discovery Today* **2004**, *3*, 151-158.
- [140] T. Feizi, W. Chai, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 582-588.
- [141] I. Khan, D. V. Desai, A. Kumar, *J. Biosci. Bioengin.* **2004**, *98*, 331-337.
- [142] D. M. Ratner, E. W. Adams, M. D. Disney, P. H. Seeberger, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 1375-1383.
- [143] I. Shin, J. W. Cho, D. W. Boo, *Comb. Chem. High Throughput Screening* **2004**, *7*, 565-574.
- [144] I. Shin, S. Park, M.-R. Lee, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 2894-2901.
- [145] W. G. T. Willats, *Protein Microarrays* **2005**, 57-69.
- [146] V. I. Dyukova, N. V. Shilova, O. E. Galanina, A. Y. Rubina, N. V. Bovin, *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1760*, 603-609.
- [147] K. Larsen, M. B. Thygesen, F. Guillaumie, W. G. T. Willats, K. J. Jensen, *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 1209-1234.
- [148] N. L. Pohl, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 125-126.
- [149] A. Kuno, N. Uchiyama, S. Koseki-Kuno, Y. Ebe, S. Takashima, M. Yamada, J. Hirabayashi, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 851-856.
- [150] M.-R. Lee, S. Park, I. Shin, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5132-5135.
- [151] S. Angeloni, J. L. Ridet, N. Kusy, H. Gao, F. Crevoisier, S. Guinchard, S. Kochhar, H. Sigrist, N. Sprenger, *Glycobiology* **2005**, *15*, 31-41.
- [152] K. T. Pilobello, L. Krishnamoorthy, D. Slawek, L. K. Mahal, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 985-989.
- [153] T. Zheng, D. Peelen, L. M. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9982-9983.
- [154] K.-L. Hsu, K. T. Pilobello, L. K. Mahal, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 153-157.
- [155] Y. Koshi, E. Nakata, H. Yamane, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10413-10422.
- [156] R. Wang, S. Liu, D. Shah, D. Wang, *Methods in Molecular Biology (Totowa, NJ, United States)* **2005**, *310*, 241-252.
- [157] Y. Fang, A. G. Frutos, J. Lahiri, *Langmuir* **2003**, *19*, 1500-1505.
- [158] G. T. Carroll, D. Wang, N. J. Turro, J. T. Koberstein, *Langmuir* **2006**, *22*, 2899-2905.
- [159] J. L. de Paz, D. Spillmann, P. H. Seeberger, *Chem. Commun.* **2006**, 3116-3118.
- [160] N. Kanoh, S. Kumashiro, S. Simizu, Y. Kondoh, S. Hatakeyama, H. Tashiro, H. Osada, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 5742-5745; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5584-5587.
- [161] Z.-L. Zhi, A. K. Powell, J. E. Turnbull, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 4786-4793.
- [162] J. Su, M. Mrksich, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 4909-4912; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4715-4718.
- [163] M. C. Bryan, F. Fazio, H.-K. Lee, C.-Y. Huang, A. Chang, M. D. Best, D. A. Calarese, O. Blixt, J. C. Paulson, D. Burton, I. A. Wilson, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8640-8641.
- [164] F. Fazio, M. C. Bryan, H.-K. Lee, A. Chang, C.-H. Wong, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 2689-2692.
- [165] L. C. P. M. De Smet, G. A. Stork, G. H. F. Hurenkamp, Q.-Y. Sun, H. Topal, P. J. E. Vronen, A. B. Sieval, A. Wright, G. M. Visser, H. Zuilhof, E. J. R. Sudhoelter, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13916-13917.
- [166] E. A. Smith, W. D. Thomas, L. L. Kiessling, R. M. Corn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6140-6148.
- [167] H. Uzawa, H. Ito, M. Izumi, H. Tokuhisa, K. Taguchi, N. Minoura, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 5895-5905.
- [168] T. Sato, S. Fujita, M. C. Z. Kasuya, K. Hatanaka, T. Yamagata, *Chem. Lett.* **2004**, *33*, 580-581.
- [169] B. T. Houseman, E. S. Gawalt, M. Mrksich, *Langmuir* **2003**, *19*, 1522-1531.
- [170] C. Galustian, C. G. Park, W. Chai, M. Kiso, S. A. Bruening, Y.-S. Kang, R. M. Steinman, T. Feizi, *Int. Immunol.* **2004**, *16*, 853-866.
- [171] K. Usui, T. Ojima, K.-y. Tomizaki, H. Mihara, *NanoBiotechnol.* **2005**, *1*, 191-199.

- [172] T. H. Patwa, J. Zhao, M. A. Anderson, D. M. Simeone, D. M. Lubman, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 6411-6421.
- [173] N. V. Shilova, O. E. Galanina, T. V. Pochechueva, A. A. Chinarev, V. A. Kadykov, A. B. Tuzikov, N. V. Bovin, *Glycoconjugate J.* **2005**, *22*, 43-51.
- [174] F. Fazio, M. C. Bryan, O. Blixt, J. C. Paulson, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14397-14402.
- [175] C.-H. Wong, M. C. Bryan, *Methods Enzymol.* **2003**, *362*, 218-225.
- [176] M. C. Bryan, L. V. Lee, C.-H. Wong, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 3185-3188.
- [177] G.-L. Huang, H.-L. Huang, H.-C. Zhang, P.-G. Wang, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2006**, *133*, 211-215.
- [178] G.-L. Huang, H.-C. Zhang, P.-G. Wang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 2031-2033.
- [179] S. Fukui, T. Feizi, C. Galustian, A. M. Lawson, W. Chai, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 1011-1017.
- [180] P. J. Coombs, M. E. Taylor, K. Drickamer, *Glycobiology* **2006**, *16*, 1C-7C.
- [181] C. H. Gruen, S. J. Van Vliet, W. E. C. M. Schiphorst, C. M. C. Bank, S. Meyer, I. Van Die, Y. Van Kooyk, *Anal. Biochem.* **2006**, *354*, 54-63.
- [182] O. E. Galanina, M. Mecklenburg, N. E. Nifantiev, G. V. Pazynina, N. V. Bovin, *Lab on a Chip* **2003**, *3*, 260-265.
- [183] K.-S. Ko, F. A. Jaipuri, N. L. Pohl, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13162-13163.
- [184] S. K. Mamidyala, K.-S. Ko, F. A. Jaipuri, G. Park, N. L. Pohl, *J. Fluorine Chem.* **2006**, *127*, 571-579.
- [185] J. C. Manimala, Z. Li, A. Jain, S. VedBrat, J. C. Gildersleeve, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 2229-2241.
- [186] J. C. Manimala, T. A. Roach, Z. Li, J. C. Gildersleeve, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 3689-3692; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, *45*, 3607-3610.
- [187] J. M. Langenhan, J. S. Thorson, *Curr. Org. Synth.* **2005**, *2*, 59-81.
- [188] L. C. P. M. De Smet, A. V. Pukin, G. A. Stork, C. H. Ric de Vos, G. M. Visser, H. Zuilhof, E. J. R. Sudhoelter, *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 2599-2695.
- [189] N. Shirahata, A. Hozumi, Y. Miura, K. Kobayashi, Y. Sakka, T. Yonezawa, *Thin Solid Films* **2006**, *499*, 213-218.
- [190] S. Park, M.-R. Lee, S.-J. Pyo, I. Shin, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4812-4819.
- [191] E. W. Adams, J. Ueberfeld, D. M. Ratner, B. R. O'Keefe, D. R. Walt, P. H. Seeberger, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 5475-5478; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5317-5320.
- [192] E. W. Adams, D. M. Ratner, H. R. Bokesch, J. B. McMahan, B. R. O'Keefe, P. H. Seeberger, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 875-881.
- [193] D. M. Ratner, E. W. Adams, J. Su, B. R. O'Keefe, M. Mrksich, P. H. Seeberger, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 379-382.
- [194] Y.-U. Kwon, R. L. Soucy, D. A. Snyder, P. H. Seeberger, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 2493-2504.
- [195] M. A. Brun, M. D. Disney, P. H. Seeberger, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 421-424.
- [196] M. Koehn, R. Wacker, C. Peters, H. Schroeder, L. Soulere, R. Breinbauer, C. M. Niemeyer, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 6009-6014; *Angew. Chem Int. Ed.* **2003**, *42*, 5830-5834.
- [197] M. D. Disney, P. H. Seeberger, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 3308-14.
- [198] E. A. Yates, M. O. Jones, C. E. Clarke, A. K. Powell, S. R. Johnson, A. Porch, P. P. Edwards, J. E. Turnbull, *J. Mater. Chem.* **2003**, *13*, 2061-2063.
- [199] S. E. Tully, M. Rawat, L. C. Hsieh-Wilson, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7740-7741.
- [200] M.-R. Lee, I. Shin, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4269-4272.
- [201] X. Zhou, J. Zhou, *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *21*, 1451-1458.
- [202] O. Blixt, S. Head, T. Mondala, C. Scanlan, M. E. Huflejt, R. Alvarez, M. C. Bryan, F. Fazio, D. Calarese, J. Stevens, N. Razi, D. J. Stevens, J. J. Skehel, I. van Die, D. R.

- Burton, I. A. Wilson, R. Cummings, N. Bovin, C.-H. Wong, J. C. Paulson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 17033-17038.
- [203] M. D. Disney, P. H. Seeberger, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1701-1707.
- [204] C.-Y. Huang, D. A. Thayer, A. Y. Chang, M. D. Best, J. Hoffmann, S. Head, C.-H. Wong, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 15-20.
- [205] B. Xia, Z. S. Kowar, T. Ju, R. A. Alvarez, G. P. Sachdev, R. D. Cummings, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 845-850.
- [206] M. Mizuno, M. Noguchi, M. Imai, T. Motoyoshi, T. Inazu, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 485-490.
- [207] F. K. Wallner, H. A. Norberg, A. I. Johansson, M. Mogemark, M. Elofsson, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 309-315.
- [208] N. Zammateo, L. Jeanmart, S. Hamels, S. Courtois, P. Louette, L. Hevesi, J. Remacle, *Anal. Biochem.* **2000**, *280*, 143-150.
- [209] S. R. Rasmussen, M. R. Larsen, S. Rasmussen, *Anal. Biochem.* **1991**, *198*, 138-142.
- [210] S. S. Ghosh, G. F. Musso, *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 5353-5372.
- [211] B. Joos, H. Kuster, R. Cone, *Anal. Biochem.* **1997**, *247*, 96-101.
- [212] M. Schena, D. Shalon, R. Heller, A. Chai, P. Brown, R. Davis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 10614-10619.
- [213] M. B. Biskup, J. U. Müller, R. Weingart, R. R. Schmidt, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1007-1015.
- [214] M. B. Biskup, Dissertation, Universität Konstanz **2006**.
- [215] R. Weingart, Arbeitsbericht, Universität Konstanz **2002**.
- [216] X.-H. Jiang, Arbeitsbericht, Universität Konstanz **2006**.
- [217] J. Mares, J. U. Müller, A. Skirgailiene, A. Neumoin, C. A. Bewley, R. R. Schmidt, O. Zerbe, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1764-1773.
- [218] J. U. Müller, Diplomarbeit, Universität Konstanz **2002**.
- [219] V. E. M. Kaats-Richters, J. W. Zwikker, E. M. D. Keegstra, L. W. Jenneskens, *Synth. Commun.* **1994**, *24*, 2399-2409.
- [220] L. A. Brooks, H. R. Snyder, *Org. Synth.* **1940-1949**, *Coll. Vol. 3*, 698-700.
- [221] K. Antczak, J. F. Kingston, S. J. Alward, A. G. Fallis, *Can. J. Chem.* **1984**, *62*, 829-837.
- [222] J. K. Pak, M. Hesse, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 8200-8204.
- [223] J. A. Marshall, A. W. Garofalo, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 3675-3680.
- [224] E. Fischer, R. Oetker, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1914**, *46*, 4029-4040.
- [225] J. Kerekgyarto, J. P. Kamerling, J. B. Bouwstra, J. F. G. Vliegthart, A. Liptak, *Carbohydr. Res.* **1989**, *186*, 51-62.
- [226] M. Upreti, D. Ruhela, R. A. Vishwakarma, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 6577-6584.
- [227] M. L. Wolfrom, A. Thompson, *Methods Carbohydr. Chem.* **1963**, *2*, 211-215.
- [228] F. A. W. Koeman, J. W. G. Meissner, H. R. P. van Ritter, J. P. Kamerling, J. F. G. Vliegthart, *J. Carbohydr. Chem.* **1994**, *13*, 1-25.
- [229] P. Critchley, M. N. Willand, K. Rullay Atvinder, H. Crout David, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 928-938.
- [230] G. Excoffier, D. Gagnaire, J.-P. Utille, *Carbohydr. Res.* **1975**, *39*, 368-373.
- [231] W. Dullenkopf, Diplomarbeit, Universität Konstanz **1996**.
- [232] W. Dullenkopf, J. C. Castro-Palomino, L. Manzoni, R. R. Schmidt, *Carbohydr. Res.* **1996**, *296*, 135-147.
- [233] J. Zhang, P. Kovac, *J. Carbohydr. Chem.* **1999**, *18*, 461-469.
- [234] R. Windmüller, Diplomarbeit, Universität Konstanz **1990**.
- [235] F. Guibe, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 13509-13556.
- [236] E. J. Corey, W. J. Suggs, *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 3223-3224.
- [237] T. Ogawa, S. Nakabayasi, *Carbohydr. Res.* **1981**, *93*, C1-C5.
- [238] A. Fürst, P. A. Plattner, *Helv. Chim. Acta* **1949**, *32*, 275-283.
- [239] K. P. R. Kartha, H. J. Jennings, *J. Carbohydr. Chem.* **1990**, *9*, 777-781.

- [240] N. E. Franks, R. Montgomery, *Carbohydr. Res.* **1968**, *6*, 286-298.
- [241] M. M. Ponpipom, *Carbohydr. Res.* **1977**, *59*, 311-317.
- [242] T. G. Mayer, R. Weingart, F. Munstermann, T. Kawada, T. Kurzchalia, R. R. Schmidt, *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 2563-2571.
- [243] T. G. Mayer, Dissertation, Universität Konstanz **1996**.
- [244] F. Yamazaki, S. Sato, T. Nukada, Y. Ito, T. Ogawa, *Carbohydr. Res.* **1990**, *201*, 31-50.
- [245] S. Sato, Y. Ito, T. Nukada, T. Ogawa, *Carb. Res.* **1987**, *167*, 197-210.
- [246] S. Figueroa-Perez, V. Verez-Bencomo, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 9143-9146.
- [247] Y.-M. Zhang, J. Esnault, J.-M. Mallet, P. Sinay, *J. Carbohydr. Chem.* **1999**, *18*, 419-427.
- [248] L. Manzoni, L. Lay, R. R. Schmidt, *J. Carbohydr. Chem.* **1998**, *17*, 739-758.
- [249] A. Toepfer, Dissertation, Universität Konstanz **1992**.
- [250] R. Windmüller, Dissertation, Universität Konstanz **1997**.
- [251] R. Bommer, Dissertation, Universität Konstanz **1990**.
- [252] G. Hummel, Dissertation, Universität Konstanz **1995**.
- [253] G. Hummel, R. R. Schmidt, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 1173-1176.
- [254] C. Gege, Diplomarbeit, Universität Konstanz **1997**.
- [255] Y. Cong, Dissertation, Universität Konstanz **2005**.
- [256] M. P. DeNinno, J. B. Etienne, K. C. Duplantier, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 669-672.
- [257] B. P. Czech, R. A. Bartsch, *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 4076-4078.
- [258] G. R. Cook, L. G. Beholz, J. R. Stille, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 3575-3584.
- [259] Y. Oikawa, T. Tanaka, K. Horita, O. Yonemitsu, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 5397-5400.
- [260] T. Bieg, W. Szeja, *Synthesis* **1985**, *1*, 76-77.
- [261] A. M. Felix, E. P. Heimer, T. J. Lambros, C. Tzougraki, J. Meienhofer, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 4194-4196.
- [262] A. B. Smith, G. R. Ott, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 13095-13096.
- [263] T. G. Mayer, B. Kratzer, R. R. Schmidt, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 2289-2293; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 2177-2181.
- [264] J. Rademann, R. R. Schmidt, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 3650-3653.
- [265] R. O. Hutchins, M. K. Hutchins in *Comprehensive Organic Synthesis*, Vol. 8 (Hrsg.: B. M. Trost, I. Fleming), Pergamon Press, New York, **1991**.
- [266] A. F. Abdel-Magid, K. G. Carson, B. D. Harris, C. A. Maryanoff, R. D. Shah, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *61*, 3849-3862.
- [267] W. S. Emerson, *Org. React.* **1948**, *4*, 174-255.
- [268] K. A. Schellenberg, *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 3259-3261.
- [269] W. S. Emerson, C. A. Uranek, *J. Am. Chem. Soc.* **1941**, *63*, 749-751.
- [270] H. E. Johnson, D. G. Crosby, *J. Org. Chem.* **1962**, *27*, 2205-2207.
- [271] R. F. Borch, M. D. Bernstein, H. D. Dust, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2897-2904.
- [272] R. F. Borch, H. D. Dust, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 3996-3997.
- [273] S. Kim, C. H. Oh, J. S. Ko, K. H. Ahn, Y. J. Kim, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 1927-1932.
- [274] R. O. Hutchins, M. Markowitz, *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 3571-3574.
- [275] H. R. Morales, M. Perez-Juarez, L. Cuellar, L. Mendoza, H. Fernandez, R. Contreras, *Synth. Commun.* **1984**, *14*, 1213-1219.
- [276] R. O. Hutchins, K. Learn, B. Nazer, D. Pytlewski, A. Pelter, *Org. Prep. Proced. Int.* **1984**, *16*, 335-372.
- [277] U.-H. Dolling, A. W. Douglas, E. J. J. Grabowski, E. F. Schönewaldt, P. Sohar, M. Sletzing, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 1634-1640.
- [278] M. Bodanszky, A. Bodanszky, *The Practice of Peptide Synthesis*, 2. Auflage, Berlin, **1994**.
- [279] H.-D. Jakubke, *Peptide-Chemie und Biologie*, Springer, Heidelberg, **1996**.
- [280] D. N. Wilson, K. H. Nierhaus, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 3586-3610; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3464-3486.
- [281] J. C. Sheehan, S. L. Ledis, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 875-879.

- [282] A. R. Katritzky, X. Lan, J. Z. Yang, O. V. Denisko, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 409-548.
- [283] F. Albericio, *Curr. Op. Chem. Biol.* **2004**, 8, 211-221.
- [284] J. Coste, D. Le-Nguyen, B. Castro, *Tetrahedron Lett.* **1990**, 205-208.
- [285] K. Drexler, Diplomarbeit, Universität Konstanz **2004**.
- [286] H. Zollinger, *Color Chemistry*, 3.Auflage, VHCA, Zürich, **2003**.
- [287] W. Salzburger, Fachbereich Biologie, Universität Konstanz, *persönliche Mitteilung*.
- [288] D. Wöll, S. Walbert, K.-P. Stengele, T. J. Albert, T. Richmond, J. Norton, M. Singer, R. D. Green, W. Pfeleiderer, U. E. Steiner, *Helv. Chim. Acta* **2004**, 87, 28-45.
- [289] D. Wöll, Dissertation, Universität Konstanz **2006**.
- [290] E. Southern, K. Mir, M. Shchepinov, *Nature Genet.* **1999**, 21, 5-9.
- [291] R. R. Schmidt, Antrag für das Teilprojekt "Synthese und kovalente Anbindung von Oligosacchariden an Glasoberflächen - Erzeugung von Oligosaccharid-Chips" der DFG-Forschergruppe "Oligosaccharid- und DNA-Chips" (FOR 434), Universität Konstanz, **2001**.
- [292] G. Bodenhausen, D. J. Ruben, *Chem. Phys. Lett.* **1980**, 69, 185-189.
- [293] A. Loiseau Francois, K. Hii King, M. Hill Alison, *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 639-47.
- [294] C. Meyer, I. Marek, G. Courtemanche, J.-F. Normant, *Tetrahedron* **1994**, 50, 11665-92.
- [295] W. H. Pearson, S. C. Bergmeier, J. A. Chytra, *Synthesis* **1990**, 156-9.
- [296] B. A. Gingras, C. H. Bayley, *Can. J. Chem.* **1957**, 35, 599-604.
- [297] A. N. Wrigley, A. J. Stirton, E. Howard, Jr., *J. Org. Chem.* **1960**, 25, 439-444.
- [298] P. Sallay, J. Morgos, L. Farkas, I. Rusznak, B. Bartha, *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* **1979**, 102, 85-90.
- [299] J. C. Loren, P. Gantzel, A. Linden, J. S. Siegel, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 3105-3116.
- [300] Y. Nakatsuji, N. Kawamura, M. Okahara, K. Matsushima, *Synthesis* **1981**, 42-4.
- [301] D. Wahler, O. Boujard, F. Lefevre, J.-L. Reymond, *Tetrahedron* **2004**, 60, 703-710.
- [302] H. Franzyk, M. Meldal, H. Paulsen, K. Bock, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1995**, 2883-2898.
- [303] R. Kumar, P. Tiwari, P. R. Maulik, A. K. Misra, *Carbohydr. Res.* **2005**, 340, 2335-2339.
- [304] T. B. Cai, D. Lu, X. Tang, Y. Zhang, M. Landerholm, P. G. Wang, *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 3518-3524.
- [305] R. R. Schmidt, M. Stumpp, *Liebigs Ann. Chem.* **1983**, 1249-1256.
- [306] H. Kondo, S. Aoki, Y. Ichikawa, R. L. Halcomb, H. Ritzen, C.-H. Wong, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 864-77.
- [307] R. R. Schmidt, J. Michel, M. Roos, *Liebigs Ann. Chem.* **1984**, 1343-1357.
- [308] P. Boullanger, M. Jouineau, B. Bouammali, D. Lafont, G. Descotes, *Carbohydr. Res.* **1990**, 202, 151-164.
- [309] H. Paulsen, B. Helpap, *Carbohydr. Res.* **1991**, 216, 289-313.
- [310] J. Beignet, J. Tiernan, C. H. Woo, B. M. Kariuki, L. R. Cox, *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 6341-6356.
- [311] T. G. Mayer, R. R. Schmidt, *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 1153-1165.
- [312] T. Ogawa, K. Katano, K. Sasajima, M. Matsui, *Tetrahedron* **1981**, 37, 2779-2786.
- [313] T. Peters, *Liebigs Ann. Chem.* **1991**, 135-141.
- [314] S. Ogawa, T. Furuya, H. Tsunoda, O. Hindsgaul, K. Stangier, M. M. Palcic, *Carbohydr. Res.* **1995**, 271, 197-205.
- [315] Z. Szirmai, L. Balatoni, A. Liptak, *Carbohydr. Res.* **1994**, 254, 301-309.





