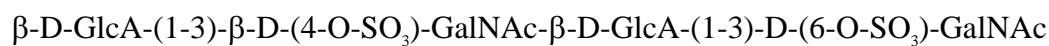
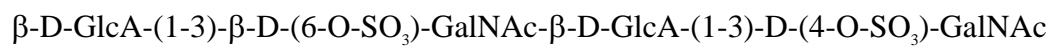
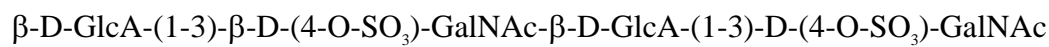
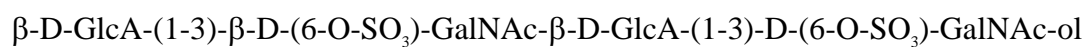
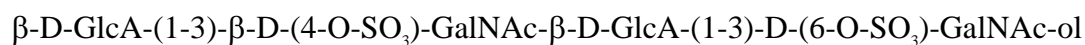
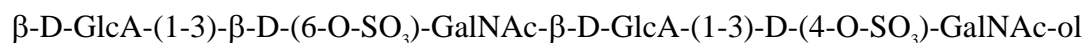
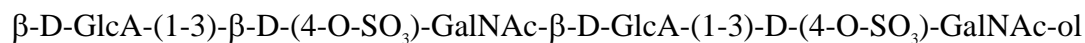


## 6 Zusammenfassung

Gegenstand dieser Arbeit sind die Darstellung, Reinigung und Untersuchung der Struktur sowie die Bindungseigenschaften ausgewählter Glycosaminoglycan-Oligosaccharide. Zunächst wurde Chondroitinsulfat mit Hyaluronidase enzymatisch gespalten. Die erhaltenen Oligomere wurden durch Gelpermeations-Chromatographie größenhomogen fraktioniert. Zur weiteren Trennung der unterschiedlich sulfatierten Tetrasaccharide wurde eine Anionenaustausch-chromatographische Methode entwickelt, mit der drei Positionsisomere der Sulfatgruppe isoliert werden konnten. Diese wurden dann durch Elektrospray-Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie charakterisiert:



Die Reduktion der Oligomerenmischung mit Natriumborhydrid führt zu den entsprechenden Alditolen. Die Trennung dieser Probe war erwartungsgemäß einfacher, da keine Anomerenmischungen vorlagen. Aus dieser Probe konnten alle vier Positionsisomere mit einer Sulfatgruppe pro Galactosamineinheit isoliert werden; sie wurden ebenfalls spektroskopisch charakterisiert:



Mit Hilfe des Programms GEGOP wurden *Metropolis-Monte-Carlo*-Simulationen durchgeführt. Dabei stand vor allem die Frage nach dem Einfluß der Position der Sulfatgruppe und dem der Dielektrizitätskonstante auf die Konformation im Vordergrund. Parallel dazu wurden die NOE-Spektren der 4,4''- sowie der 6,6''-disulfatierten, reduzierten Tetrasaccharide ausgewertet. Aufgrund der Signalüberlagerungen der Tetrasaccharide war die Auswertung nur eingeschränkt möglich. Es konnte aber gezeigt werden, daß die Ergebnisse einer GEGOP-Simulation im Falle der glycosidischen Bindungen UA-GN(4S), UA-GN(6S) und GN(6S)-UA bei einer Dielektrizitätskonstante  $\epsilon = 20$  in guter Übereinstimmung mit den experimentellen Ergebnissen stehen.

Anschließend wurden zwei neuartige NMR-Verfahren zum *Screening* von Substanzbibliotheken auf die Tetrasaccharidmischung angewandt. Diese basieren auf dem *transferred Nuclear Overhauser Effect* (trNOE) und der *saturation transfer difference* NMR-Spektroskopie (STD NMR). Beide Verfahren wurden bislang vor allem für kleinere, gering- oder ungeladene Moleküle eingesetzt. Für diese Versuche wurden die Chondroitinsulfat-Tetrasaccharide als Substrat und Hyaluronidase als Rezeptor verwendet. Der Einsatz der *transferred Nuclear Overhauser Effect* Spektroskopie zum *Screening* von Mischungen zeigte dabei deutliche Limitierungen, da die Chondroitinsulfat-Tetrasaccharide aufgrund ihrer großen Masse nur bei erhöhter Temperatur durchgehend positive NOEs aufweisen. Die *saturation transfer difference* NMR-Spektroskopie gibt deutlich bessere Ergebnisse. Es konnte nachgewiesen werden, daß Chondroitin-4-sulfat-Tetrasaccharide stärker an Hyaluronidase binden, was mit der höheren Hydrolyserate für dieses Isomer übereinstimmt.

Der Versuch, quasi Ligand und Rezeptor zu vertauschen und durch NMR-Spektroskopie eine Bindung von kationischen Tripeptiden an polymeres Heparin nachzuweisen, war nicht erfolgreich. Hauptursache war vermutlich eine zu schwache Bindungskonstante.

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von U. Lindahl (Uppsala) wurde abschließend das System aus Heparinoligomeren und Interleukin-8 untersucht, von dem bekannt ist, daß es eine sehr geringe Bindungsaffinität besitzt. Der Einsatz der *transferred Nuclear Overhauser Effect* Spektroskopie war auch hier auf die Heparin-Tetrasaccharide beschränkt, die bei 310 K positive NOEs aufweisen. Nach Zugabe von Interleukin-8 traten einige negative NOEs auf. Die Signale zeigen eine besonders gute Bindung der Heparin-Tetrasaccharide, deren Uronsäure an 2-Position sulfatiert ist. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den experimentellen biologischen Daten, nach denen diese Sulfatierung für die Bindung notwendig ist.

Beim Einsatz der *saturation transfer difference* NMR-Spektroskopie waren bei den Tetrameren nur geringe Effekte zu beobachten, dagegen konnten für die Hexamere deutliche STD NMR Signale erhalten werden. Wiederum zeigten die Tetrasaccharide mit an 2-sulfatierten Uronsäuren intensive Signale, was mit den experimentellen Daten übereinstimmt.