



Multivalenz als chemisches Organisations- und Wirkprinzip

Carlo Fasting, Christoph A. Schalley, Marcus Weber, Oliver Seitz, Stefan Hecht, Beate Koksich, Jens Dernedde, Christina Graf, Ernst-Walter Knapp und Rainer Haag*

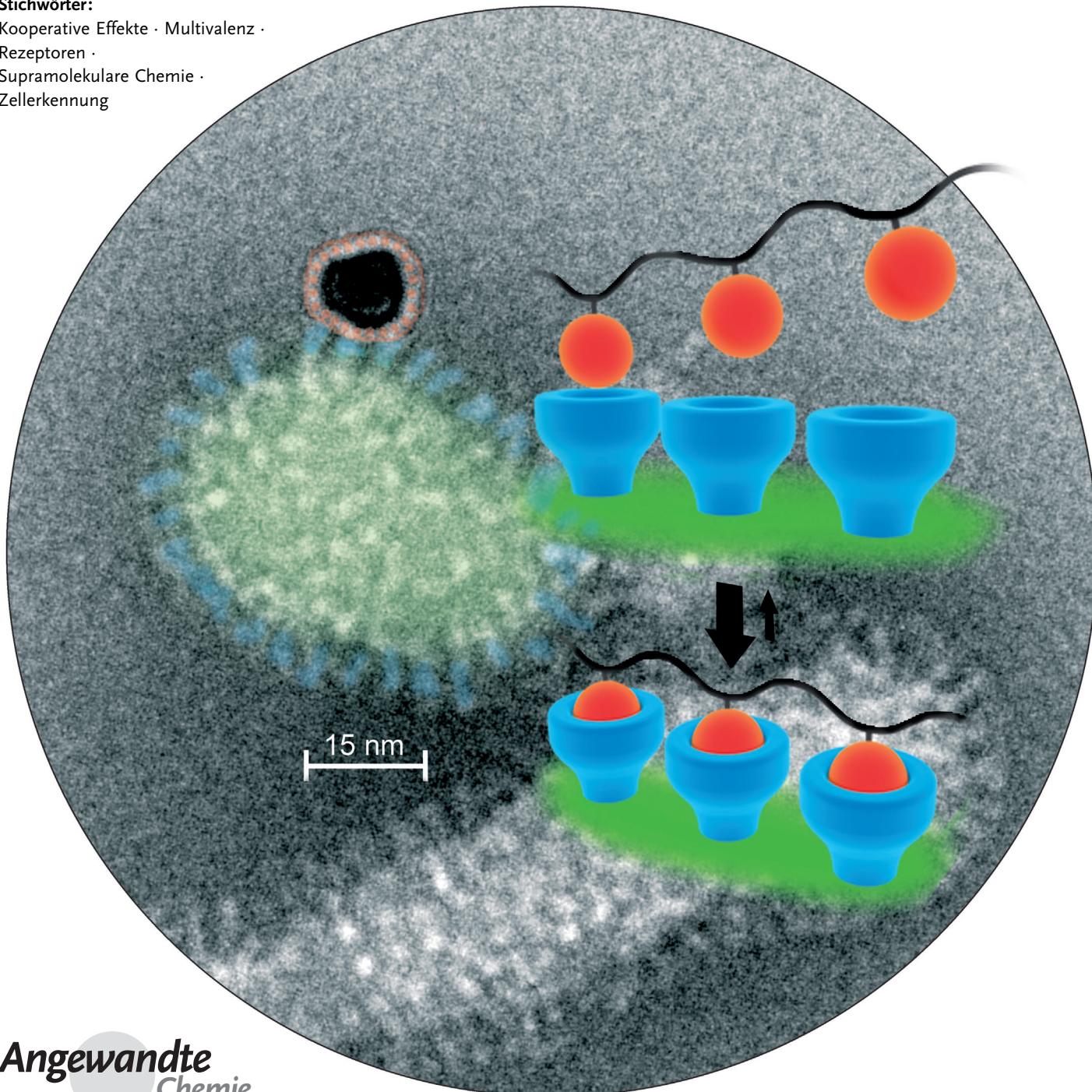
Stichwörter:

Kooperative Effekte · Multivalenz ·

Rezeptoren ·

Supramolekulare Chemie ·

Zellerkennung



Multivalente Wechselwirkungen können universell zur gezielten Bindungsverstärkung zwischen verschiedenen Grenzflächen oder Molekülen genutzt werden. Die Bindungspartner bilden dabei kooperativ multiple Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen, die auf einzelnen schwachen, nichtkovalenten Bindungen basieren und daher prinzipiell reversibel sind. Daher spielen multi- und polyvalente Wechselwirkungen in biologischen Systemen eine entscheidende Rolle für Erkennungs-, Adhäsions- und Signalprozesse. Die wissenschaftliche und praktische Etablierung dieses Prinzips wird anhand der Entwicklung von natürlichen Systemen über einfache artifizielle und theoretische Modelle hin zu anwendungsorientierten funktionalen Systemen demonstriert. Anhand eines systematischen Überblicks über Gerüstarchitekturen werden die zugrunde liegenden Wirk- und Steuerungsmöglichkeiten aufgezeigt und Designvorschläge für möglichst effektive multivalente Bindungspartner bis hin zu polyvalenten Therapeutika aufgezeigt.

1. Einleitung

Multivalenz ist ein Schlüsselprinzip in der Natur, um starke, zugleich aber auch reversible Wechselwirkungen zu erreichen. Ein eingängiges Beispiel aus dem täglichen Leben sind die Klette und der davon abgeleitete Klettverschluss (Abbildung 1). Durch Verschlaufung von multiplen Haken

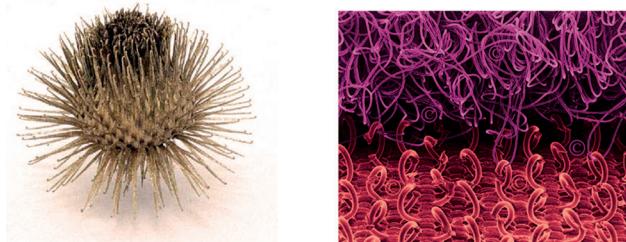


Abbildung 1. Prinzipien wie das Anhaften der Klette (links) oder des davon inspirierten Klettverschlusses (rechts) lassen sich auch auf die molekulare Ebene übertragen.

auf der einen und Ösen auf der anderen Seite kommt es hier durch die große Zahl schwacher Wechselwirkungen zu einer starken Verbindung beider Oberflächen, was z. B. ein Abscheren verhindert. Je größer die Klettfläche, desto stabiler die Wechselwirkung. Entscheidend ist hierbei aber auch die Reversibilität der Wechselwirkung, die durch sequenzielles Trennen der einzelnen Haken und Ösen erreicht werden kann. Diese wichtige Eigenschaft unterscheidet multivalente grundlegend von kovalenten Wechselwirkungen, die technisch einer permanenten Verklebung oder Verschraubung entsprächen.

Dieses makroskopische Beispiel ist in der Natur auch auf molekularer Ebene zu beobachten, wo man die Haken mit sehr spezifisch bindenden molekularen Einheiten (Liganden) und die Ösen mit entsprechenden Bindungstaschen in einem

Molekülkomplex (Rezeptor) vergleichen kann. Im biologischen Kontext sind die multivalenten Wechselwirkungen von Zellen untereinander oder mit anderen Organismen – besonders mit Bakterien und Viren – von großer medizinischer Bedeutung. Hierbei kommt es ebenfalls zu einer großflächigen Wechselwirkung einer großen Zahl einzelner, zueinander komplementärer Bindungspartner.

Im Unterschied zu den schwachen monovalenten Wechselwirkungen bieten multivalente Wechselwirkungen auf molekularer Ebene den großen Vorteil der mehrfachen und dadurch verstärkten Wechselwirkung. Ein wichtiges Beispiel ist die multivalente Wechselwirkung von Viren mit Wirtzellen, die zunächst zu einer stabilen Anhaftung führt (Abbildung 2a). Anschließend kann sich die zelluläre Membran einstülpen, und das Virus wird durch Endozytose aufgenommen. Nach Insertion des viralen Genoms in die zelluläre DNA folgt letztlich die Produktion neuer Viruspartikel. In der Medizin werden im klassischen Therapieansatz derzeit nur monovalente Wirkstoffe eingesetzt, die im Unterschied zu multivalent an Wirtzellen anbindenden Erregern (z. B. Viren) nur eine geringe Affinität zum Erreger aufweisen und daher nur bei sehr hohen Konzentrationen kompetitiv sein

[*] Dr. C. Fasting, Prof. C. A. Schalley, Prof. B. Koksch, Prof. C. Graf, Prof. E.-W. Knapp, Prof. R. Haag
Institut für Chemie und Biochemie,
Freie Universität Berlin
Takustraße 3, 14195 Berlin (Deutschland)
E-Mail: haag@chemie.fu-berlin.de

Dr. M. Weber
Konrad-Zuse-Zentrum für Informationstechnik Berlin (Deutschland)
Prof. O. Seitz, Prof. S. Hecht
Institut für Chemie der
Humboldt-Universität zu Berlin (Deutschland)
Dr. J. Dernedde
Zentralinstitut für Laboratoriumsmedizin,
Klinische Chemie und Pathobiochemie,
Charité-Universitätsmedizin Berlin (Deutschland)

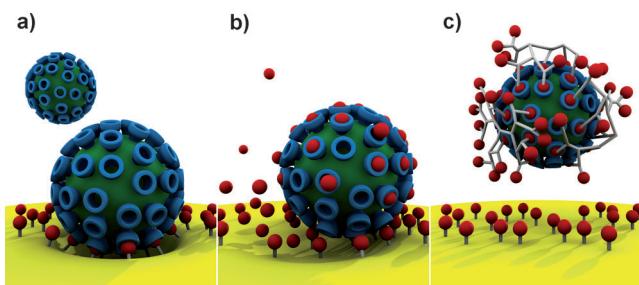


Abbildung 2. a) Multivalente Bindung eines Virus an eine Zelloberfläche im Vergleich zu einer b) nichtkompetitiven Bindung monovalenter Liganden (klassischer Wirkstoffansatz). c) Multi- und polyvalente Liganden können durch Bindung und Abschirmung der Virusoberfläche eine erheblich stärkere Wirkung als monovalente Liganden entfalten.

können (Abbildung 2b). Dementsprechend bergen die Synthese und die Untersuchung von multivalenten Gerüstarchitekturen ein enormes Potenzial für ein effektives und vor allem kompetitives Vorgehen gegen Viren und Bakterien (Abbildung 2c).

Die Einstülpung der Zellmembran nach erfolgreicher Virusadhäsion weist zusätzlich zur Bindungsverstärkung noch auf einen zweiten wichtigen Aspekt multivalenter Wechselwirkungen hin: Diese bieten auch auf größeren Längenskalen die Möglichkeit zur Formkontrolle. Die Anordnung der Bindungsstellen auf einem multivalenten Liganden kann dazu genutzt werden, die Geometrie der Rezeptoren auf der Membran der Wirtzelle zu beeinflussen und so besser definierte großräumige molekulare Architekturen (z.B. Clustering, Einstülpung) zu erzeugen.

Multivalenz im Sinne dieses Aufsatzes wird durch mehrfach aneinander gekoppelte, supramolekulare Bindungsmodule in biologischen wie auch synthetischen Systemen definiert. Die Untersuchung multivalenter Wechselwirkungen mit synthetischen Systemen hat dabei allerdings noch nicht die Vielfalt und Bedeutung wie in biologischen Systemen.

Obwohl in der supramolekularen Chemie bislang nur recht wenige Wirt-Gast-Systeme explizit und systematisch auf ihre Verwendung in einem multivalenten Verbund untersucht worden sind, konnten hier trotzdem bedeutende Erkenntnisse erzielt werden: Zum einen ist die Zahl der Bindungsstellen in synthetischen Systemen kontrollierbar und damit bekannt. Daher kann man beispielsweise in der thermochemischen Analyse quantitativ arbeiten. Zum anderen können synthetische Strukturen oft mit vertretbarem Aufwand systematisch variiert werden. Damit können Serien von Wirt-Gast-Komplexen im Detail untersucht werden, sodass nicht nur monovalente und multivalente, sondern auch intermediaire Wechselwirkungsszenarien einer genaueren Untersuchung zugänglich werden. Außerdem können die Spacer, die die Bindungsstellen miteinander verbinden, variiert werden. Spacer sind nicht einfach nur „unschuldige Zuschauer“, sie können auch die Bindung der Liganden durch eigene Wechselwirkungen mit dem Rezeptor verstärken oder schwächen.

Die gezielte Nutzung der Multivalenz ist daher nicht nur für die Medizin^[1,2] (z.B. für die Herstellung von Anti-Infektiva) und die Biochemie^[3] von großer Bedeutung, sondern auch für die strukturell definierte Konstruktion neuer Funktionsmoleküle in der supramolekularen Chemie^[4,5] und den Materialwissenschaften.^[6] Multivalente molekulare Systeme können dazu dienen, durch eine gesteuerte Selbstorganisation zunehmend komplexere Strukturen aufzubauen oder eine gezielte chemische Nanostrukturierung von Oberflächen zu erreichen.^[7]

Früher schon zusammengefasste Daten zur multivalenten Bindung^[1,3-5,8-10] sollen hier nicht wiederholt werden. Vielmehr will dieser Aufsatz darüber hinaus ein grundlegendes Verständnis für Multivalenz als chemisches Organisations- und Wirkprinzip entwickeln und aufzeigen, was die entscheidenden Faktoren sind, die multivalente Wechselwirkungen so effizient machen. Ausgewählte Beispiele für multi- und polyvalente Wechselwirkungen und ihre potenziellen Anwendungen sollen einen Einblick in den aktuellen Stand der Forschung geben und die theoretischen Grundlagen der Multivalenz veranschaulichen. Dabei liegt der Schwerpunkt dieses Aufsatzes auf dem Vergleich synthetischer multi- und polyvalenter Gerüstarchitekturen, die für die Präsentation der Liganden verantwortlich sind, mit den natürlich genutzten Systemen.



Von links nach rechts: J. Dernedde, S. Hecht, C. Graf, M. Weber, R. Haag, C. Fasting, O. Seitz, C. A. Schalley (nicht auf dem Bild: B. Koksch und E.-W. Knapp). Das Autorenteam ist Teil des seit 2008 von der DFG geförderten SFB 765 „Multivalenz als chemisches Organisations- und Wirkprinzip: Neue Architekturen, Funktionen und Anwendungen“, der von derzeit rund 80 Wissenschaftlern in 21 wissenschaftlichen Teilprojekten an verschiedenen Forschungseinrichtungen am Standort Berlin realisiert wird (Sprecher: Rainer Haag, FU Berlin) und ein integriertes Graduiertenkolleg mit rund 35 Graduierten umfasst. Weitere Informationen: www.sfb765.de

2. Multivalente Wechselwirkungen

2.1. Begriffe und Definitionen

Als multivalent betrachten wir Wechselwirkungen zwischen einem m -valenten Rezeptor und einem n -valenten Liganden ($m, n > 1$; auch $m \neq n$). Die Wechselwirkungen mehrerer monovalenter Liganden ($m = 1$) mit einem multivalenten Rezeptor sind nicht multivalent. Allerdings gibt es hier durch die Zahl m an äquivalenten Bindungstaschen des multivalenten Rezeptors auch für monovalente Liganden bereits eine begünstigte Bindung, da z.B. ein m -valenter Rezeptor m -mal häufiger einen ersten monomeren Liganden bindet als ein entsprechender monovalenter Rezeptor. Dieser

Symmetrieffekt^[11-13] wird durch die äquivalenten Bindungstaschen des *m*-valenten Rezeptors hervorgerufen und tritt entsprechend auch bei multivalenten Liganden auf. Haben Rezeptor und Ligand mehrere identische Bindungsstellen, sind sie homomultivalent, haben sie mehrere Bindungsstellen, die sich jedoch unterscheiden, bezeichnen wir sie als heteromultivalent.

In der Literatur findet sich häufig der Begriff Polyvalenz, vor allem, wenn es um die Bindung von Liganden an Rezeptoren auf Grenzflächen wie Zellmembranen geht, die eine hohe Zahl ($n \geq 10$) von zweidimensional verteilten Bindungsstellen anbieten.^[2] Wir grenzen in diesem Aufsatz Multivalenz und Polyvalenz konzeptionell nicht voneinander ab, da durch eine hohe Zahl von Bindungsstellen an einer Grenzfläche lediglich weitere Symmetriefaktoren^[11] zur präzisen Beschreibung eingeführt werden müssen. Dieses Problem tritt aber nicht nur an Grenzflächen auf, sondern ergibt sich genauso beispielsweise für einen dekavalenten Rezeptor in Lösung, der mit einem bivalenten Liganden wechselwirkt. Daher sollte eine Beschreibung möglichst für beide Phänomene einheitlich erfolgen. Dennoch ist für die Untersuchung von isolierten multiplen Wechselwirkungen, anders als für die meist sehr dynamischen und kaum eindeutig zugänglichen Wechselwirkungen zwischen flächigen Systemen, die sprachliche Unterscheidung von Multi- und Polyvalenz sinnvoll.

Der Begriff Avidität stammt aus der Biochemie und wurde ursprünglich zur Beschreibung des Bindungsverhaltens von unterschiedlich valenten Immunglobulinen (Antikörpern; IgD-, IgE- und IgG-Monomere: bivalent, IgA-Homodimer: tetravalent, IgM-Homopentamer: dekivalent) eingeführt. Daher ist der Aviditätsbegriff bei Antikörpern mit der hier diskutierten Multivalenz vergleichbar, soll aber nicht weiter vertieft werden (siehe Lit. [1]). Der ebenfalls lange bekannte Chelateffekt, von Schwarzenbach^[14] bereits 1952 eingeführt, ist ebenfalls konzeptionell mit Multivalenz eng verwandt, und beide Begriffe werden mitunter als Synonyme verwendet.^[4,15] Der Chelatbegriff findet traditionell in der anorganischen Koordinationschemie, der Multivalenzbegriff in der organischen und makromolekularen Chemie Anwendung.

Beide Konzepte beschreiben ähnliche Phänomene, nämlich die kooperative Wechselwirkung von mehreren miteinander verbundenen Bindungsgruppen während eines Bindungsvorganges. Im Unterschied zur Chelatisierung eines Zentralatoms oder -moleküls handelt es sich bei Multivalenz im Sinne dieses Aufsatzes jedoch um die Bindung von mehreren, aneinander gekuppelten Bindungsmodulen in biologischen und synthetischen Systemen. Entscheidend ist hier also die Art und Weise, wie mehrere Bindungsmodule (natürliche oder synthetische Liganden und Rezeptoren) durch geeignete Strukturen und Architekturen zueinander geführt werden, und weniger der Modus der isolierten supramolekularen Wechselwirkung eines Bindungsmoduls. Die oben erwähnte Polyvalenz als großflächige, zweidimensionale Wechselwirkung geht über einen einfachen Chelateffekt noch weiter hinaus. Bedenkt man, dass die Natur Polyvalenzeffekte auch auf Längenskalen bis weit in den Mikrometerbereich hinein nutzt, kommt man zu dem Schluss, dass der Chelateffekt, wie er in einfachen, einkernigen Metallion-Ligand-Komplexen

mit ihrer definierten Ligandensphäre auftritt, einen Sonderfall multivalenter Wechselwirkungen beschreibt. Es konnte gezeigt werden,^[16,17] dass selbst ein „einfacher“ Chelateffekt wie die Bindung von Ethyldiamintetraacetat an Calcium-Ionen nur schwer in quantitativen thermodynamischen Beschreibungen erfasst werden kann. Umso mehr wird dies auf komplexe multi- oder polyvalente biologische Systeme zu treffen.

Zur Charakterisierung des Effekts der multivalenten Bindung wurde von Whitesides et al.^[1] der Verstärkungsfaktor β vorgeschlagen, der sich aus dem Verhältnis der Bindungskonstanten für multivalente Bindung [K_{multi}] eines multivalenten Liganden an einen multivalenten Rezeptor und der Bindungskonstanten für monovalente Bindung [K_{mono}] eines monovalenten Liganden an den multivalenten Rezeptor ergibt [Gl. (1)]. Dieser Verstärkungsfaktor hat den Vorteil, dass er auch ohne Kenntnis der Multiplizität der effektiven Bindungen verwendet werden kann. Ein Nachteil ist, dass er gleichzeitig auch den Einfluss der Kooperativität und des Symmetrieffektes enthält.

$$\beta = \frac{K_{\text{multi}}}{K_{\text{mono}}} \quad (1)$$

Trotz vielfacher Klarstellung in der Literatur^[4-6] bleibt es ein weit verbreitetes Missverständnis, dass multivalente Wechselwirkungen grundsätzlich mit positiver Kooperativität verbunden sein sollen.^[18] Eine Bindungsverstärkung durch Multivalenz kann jedoch auch dann nützlich sein, wenn die Bindung nicht additiv oder positiv kooperativ erfolgt. So kann man sich vorstellen, dass multivalente Wirkstoffe am Zielrezeptor dank ihrer stärkeren Bindung und höheren Spezifität ohne Wirkverlust in weit geringerer Dosis verabreicht werden können als entsprechende monovalente Analoga.

In allen multivalenten Systemen spielen die verbindenden Strukturen zwischen den einzelnen Liganden, als Teil eines starren Gerüstes oder auch nur als bewegliche Kette, eine entscheidende Rolle. In diesem Aufsatz schlagen wir vor, generell den Begriff Spacer zu verwenden, ungeachtet der chemischen Natur und Struktur dieses Bindegliedes. Wir werden weiter unten sehen, dass seine Flexibilität einen signifikanten Einfluss auf die thermodynamische Beschreibung hat, da hier für sehr flexible und sehr starre Liganden deutlich verschiedene Symmetriefaktoren berücksichtigt werden müssen.

2.2. Theoretische Grundlagen/kinetische und thermodynamische Aspekte

Die Thermodynamik der monovalenten Bindung eines Liganden an einen Rezeptor ist im Wesentlichen durch die freie Bindungsenthalpie (ΔG_{mono}) bestimmt. Während es bei monovalenten Systemen nur zwei Zustände gibt (gebunden und ungebunden), zwischen denen die entsprechende Freie-Enthalpie-Differenz gebildet wird, ist diese Dualität bei multivalenten Systemen nicht mehr gegeben. Es gibt bei einem *n*-valenten Rezeptor *n*+1 verschiedene Bindungszustände: *j* Rezeptorplätze sind besetzt. Um die freie Bin-

dungsenthalpie ($\Delta G_{\text{LR}}^{(n)}$) für allgemeine multivalente Systeme zu errechnen, muss man daher zunächst eine Zuordnung treffen, welche Bindungszustände ($0 < j < n$) als gebunden und welche als ungebunden gelten sollen. Da die Zahl der Möglichkeiten, j Rezeptorplätze bei einem n -valenten Rezeptor zu besetzen, aus Symmetriegründen $\frac{n!}{(n-j)!j!}$ beträgt und es daher viele teilbesetzte Zustände gibt, ist diese Zuordnung entscheidend für den zu erwartenden kooperativen Effekt der multivalenten Bindung.^[12] Betrachten wir zwei Extremfälle: Im ersten Fall wird ein messbarer Bindungseffekt erst erreicht, wenn alle Rezeptorplätze durch Liganden besetzt sind. Aufgrund der Symmetrie ist dieser Zustand gegenüber denen der teilbesetzten Rezeptoren sehr selten zu beobachten, falls die Liganden unabhängig voneinander agieren. Eine Vororganisation der Liganden durch multivalente Präsentation ist erstrebenswert. Im zweiten Fall tritt ein Effekt bereits ein, wenn nur mindestens ein Rezeptorplatz durch einen Liganden besetzt wird. Die „erste Bindung“ wird bei einer multivalenten Präsentation der Liganden jedoch entropisch erschwert. Die Gesamtentropie eines Systems aus n Rezeptoren und n freien monovalenten Liganden nimmt nur geringfügig ab, sobald ein einzelner Ligand an einen Rezeptorplatz bindet und dabei seine Solvations-, Rotations- und Translationsentropie ($\Delta S_{\text{mono}} = \Delta S_{\text{trans}} + \Delta S_{\text{rot}} + \Delta S_{\text{sol}}$) ändert, da die freigeblichenen Liganden diesen Entropieanteil weiterhin aufweisen. Anders sieht dies bei multivalenten Liganden aus: Multivalente Liganden entstehen durch die Verknüpfung mehrerer monovalenter Liganden über eine Spacerarchitektur oder an Grenzflächen. Bei der Bindung dieser Gerüste über einzelne Liganden an einen einzelnen Rezeptorplatz verliert das System bereits als Ganzes Translations- und Rotationsentropie. Zusätzlich wird die Konformationsentropie der Spacerarchitektur verringert (ΔS_{conf}). Daher wird im Allgemeinen die „erste Bindung“ eines multivalenten Liganden an einen einzelnen Rezeptorplatz entropisch erschwert (siehe auch Lit. [19]).^[19] Dieses zeigen Mammen et al.^[1] anhand von folgendem Modell: Sie nehmen an, dass die Entropieänderung der n -fachen Bindung sich (bis auf die Konformationsentropie) im Wesentlichen aus den gleichen Beiträgen zusammensetzt wie bei der monovalenten Bindung eines einzelnen Liganden ($\Delta S_{\text{multi}} = \Delta S_{\text{trans}} + \Delta S_{\text{rot}} + \Delta S_{\text{sol}} + \Delta S_{\text{conf}}$). Nimmt man ferner an, dass die Enthalpie der monovalenten Bindung (ΔH_{mono}) sich bei multivalenter Bindung unabhängig vom Spacer verstärkt ($\Delta H_{\text{multi}} = \Delta H_{\text{mono}}$), dann gilt für die Differenz der freien Bindungsenthalpien $\Delta \Delta G = \Delta G_{\text{LR}}^{(n)} - n \Delta G_{\text{mono}} = T(n-1) \Delta S_{\text{mono}} - T \Delta S_{\text{conf}}$. Diese Formel lässt zwei Schlüsse zu: 1) Bei flexiblen Spacern ist mit einem großen Verlust an Konformationsentropie zu rechnen. Der kooperative Effekt wird also erwartungsgemäß nicht so stark sein wie bei einem starren Spacer. 2) Aus entropischen Gründen sind geringe Bindungsvalenzen weniger wahrscheinlich, hohe Valenzen werden gefördert. Ein Extremfall ist gegeben, wenn die Architektur des multivalenten Liganden z.B. nur die Bindungszustände $j=0$ und $j=n$ ermöglicht. Dieser Idealfall ist am ehesten für Chelatverbindungen realisiert, die als starre, maßgeschneiderte Mehrfachliganden an Übergangsmetalle binden.^[20,21]

Im obigen Modell von Mammen et al. wird angenommen, dass der Spacer keinen enthalpischen Beitrag zur Bindung

liefert. Tatsächlich kann jedoch die Annahme, dass gilt $\Delta H_{\text{multi}} = \Delta H_{\text{mono}}$, sehr unrealistisch sein. Erstens könnte der Spacer selbst wegen seiner chemischen Natur mit dem Rezeptor positiv oder negativ wechselwirken und damit die multivalente Bindungsenthalpie verändern; zweitens könnte eine enthalpische Abschwächung der multivalenten Bindung durch eine nicht exakte geometrische Vororganisation der Liganden entstehen; und drittens könnte der Spacer direkt Einfluss auf die (z.B. elektrostatischen) Eigenschaften des Liganden nehmen und zu einer Veränderung der Bindungsstärke führen. Diese Effekte lassen sich mit theoretischen Methoden (z.B. Moleküldynamik) sehr gut untersuchen (siehe unten) und sind eine große Hilfe, da der systematische Austausch von Spacergruppen in der Regel präparativ aufwändig ist. Eine Mischung aus entropischen und enthalpischen Effekten ergibt sich, wenn die Vororganisation des Spacers nicht perfekt ist, jedoch wegen der Flexibilität des Spacers optimale geometrische Ausrichtungen der Liganden möglich sind (Abbildung 3).

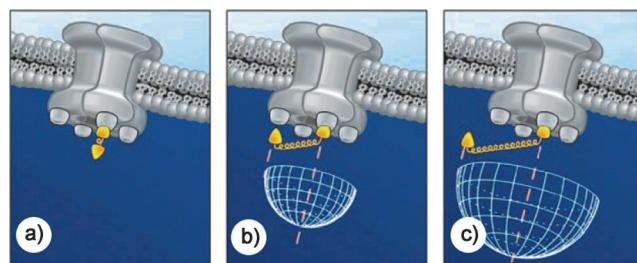


Abbildung 3. Bindung eines bivalenten Liganden an den tetravalenten cGMP-Rezeptor: a) Mit zu kurzer Spacerlänge kann nur eine Bindungsstelle im Rezeptor besetzt werden. b) Mit passender Spacerlänge und optimalem Aktionsradius für die zweite Bindung wird die größte Bindungsstärke erzielt. c) Ein zu langer Spacer erhöht die Zahl unproduktiver Freiheitsgrade und senkt die Bindungsstärke wieder ab. Abbildung aus Lit. [24] mit Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd.

Bei dieser einfachen Modellierung wird angenommen, dass Entropie- und Enthalpiebeiträge, die das Lösungsmittel bei einer multivalenten Bindung betreffen, im Wesentlichen aus dem monovalenten Fall abgeleitet werden können. Man vernachlässigt dabei unter Umständen, dass das Vorhandensein eines Spacers eine Vielzahl schwacher Wechselwirkungen in das System einbringt, die wiederum wegen hoher Wärmekapazitätunterschiede bei der Bindung eine Entropie-Enthalpie-Kompensation bewirken kann.^[22] In molekularen Simulationen sollten daher Lösungsmittelleffekte durch explizite Modellierung mit berücksichtigt werden (siehe Abschnitt 2.4). In Bezug auf positive oder negative Änderungen der Wärmekapazitäten vernachlässigt man ferner, dass die zusätzliche Spacerstruktur Auswirkungen auf die Entropie- und Enthalpieeigenschaften der wechselwirkenden Proteinbausteine haben kann.^[23]

Aus thermodynamischer Sicht ist die multivalente Präsentation der Liganden also nicht immer von Vorteil. Für eine weitergehende Betrachtung der multivalenten Bindung zwischen Liganden- und Rezeptorsystemen ist außer der geometrischen Anordnung ebenso wichtig, welche und wie viele

Systemzustände durch die Flexibilität von Ligand und Rezeptor überhaupt möglich sind. Dabei muss definiert sein, welcher Zustand als „gebunden“ oder als „ungebunden“ zu werten ist.

Diese Definition könnte nicht nur auf Basis der Zahl der besetzten Rezeptorplätze, sondern auch auf Basis einer räumlichen Nähe des multivalenteren Liganden zum Rezeptor geschehen.^[22] Dabei spielt es keine Rolle, wie viele Bindungen zwischen den beiden Partnern vorhanden sind. Räumliche Nähe ist fundamental für ein möglicherweise aktives Eingreifen von Liganden in Bindungsprozesse. Wenn ein einzelner Ligand eines multivalenteren Systems gebunden ist, sind weitere benachbarte Liganden bereits in der Nähe des Rezeptors und erhöhen so die Wahrscheinlichkeit, ebenfalls zu binden. In einem Experiment von Kramer und Karpen^[24] wurde gezeigt, dass dieser Effekt messbar ist. Konzeptionell bereits 1925 von Kuhn geprägt^[25,26] und später auf Multivalenz angewendet,^[27] gibt es Modelle, die eine erhöhte effektive lokale Konzentration von weiteren Liganden konstatieren, falls der erste Ligand an den Rezeptor gebunden hat. Eine genauere Behandlung zeigt allerdings, dass die Position des zweiten Liganden (in einem bivalenten System) relativ zum ersten einer dreidimensionalen Gauß-Verteilung gehorcht^[19] und damit nicht homogen verteilt ist. Als Folge wird die erhöhte lokale Konzentration häufig deutlich überschätzt.

Dennoch hat sich die Ansicht etabliert, den ersten Bindungsvorgang zwischen multivalenteren Liganden und Rezeptoren und die folgenden Bindungsvorgänge kinetisch unterschiedlich zu werten, da der erste Bindungsvorgang die räumliche Nähe schafft, die zu einer erhöhten lokalen Konzentration führt. Während der erste Bindungsvorgang kinetisch gesehen ein intermolekularer Prozess ist und daher durch Rezeptor- sowie Ligandenkonzentration bestimmt wird, sind der zweite und alle folgenden Bindungsvorgänge als intramolekulare Prozesse zu sehen. Sie werden nur noch durch eine einzelne Konzentrationsgröße determiniert. Die Gesamtgleichgewichtskonstante einer bivalenten Bindung enthält daher einen Faktor, der die Einheit einer Konzentration hat und sich „effektive Molarität“ (*EM*) nennt. Diese ist für bivalente Systeme messbar (siehe Abschnitt 2.3). Die „erste Bindung“ eines multivalenteren Systems hat wegen der oben beschriebenen thermodynamischen Aspekte meistens eine geringere Bindungsgeschwindigkeit als im monovalenteren System; dagegen sind die weiteren Bindungen durch die Vororganisation der Liganden beschleunigt. Die Bindungs-kinetik eines multivalenteren Systems ist daher eine Ensemblegröße und lässt sich als gewichteter Mittelwert über sehr viele verschiedene elementare Bindungsvorgänge verstehen. Die räumliche Nähe eines Liganden zu seinem Rezeptor entscheidet dabei maßgeblich über die Wahrscheinlichkeit des entsprechenden Bindungsvorgangs.

In Arbeiten von Mack et al. über bivalentes Bindungsverhalten wird diese Nähe eines löslichen, bivalenten Rezeptors zur Ligandenoberfläche durch die Definition von „ungebundenen“ und „vororientierten“ Zuständen vorgenommen.^[28] Nur in vororientierten Zuständen können Rezeptor-Liganden-Bindungen zustande kommen, wobei keine Aussage zur Herkunft des bivalenten Rezeptors getroffen werden kann. Dieser kann sich sowohl aus der Lösung der

Oberfläche angenähert haben oder gerade teilweise oder vollständig von der Ligandenoberfläche dissoziiert sein. Im zweiten Fall besteht wegen der räumlichen Nähe eine hohe Wahrscheinlichkeit zur erneuten Anbindung (Rückbindung). Eine effektive Rückbindung kann durchaus auch als „Gleiten“ eines multivalenteren Liganden über eine (multivalente) Oberfläche, anstelle einer vollständigen Dissoziation, in einem Flusssystem mittels Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) gemessen werden, wie von Ernst et al. an His-Tags unterschiedlicher Länge gezeigt wurde.^[29]

Jüngste mathematische Arbeiten zeigen (am Beispiel der Proteinfaltung) allerdings die Grenzen des Vorgehens, räumliche und kinetische Aspekte in einem kinetischen Modell zu vermischen. Es ist theoretisch nicht möglich, zur Berechnung einer Gesamtkinetik die vielen elementaren Zwischenschritte eines Systems beliebig festzulegen, da diese möglicherweise keine eigenen kinetischen Entitäten darstellen (besonders die räumlich definierten Zustände) und daher entsprechende Geschwindigkeitskonstanten auch nicht messbar wären.^[30] Die Reduktion auf einzelne Elementarprozesse ergibt daher eine unvollständige und unkorrekte Beschreibung der Realität. Aus mathematischer Sicht verletzt eine beliebig gewählte Zerlegung des kinetischen Gesamtprozesses, besonders in wenige exemplarisch ausgewählte Elementarprozesse, die so genannte Markov-Eigenschaft,^[31-33] die prinzipiell besagt, dass ein solches System kein Gedächtnis besitzt. Zur korrekten Formulierung der Kinetik sind die elementaren Bindungsvorgänge systemabhängig zu wählen, was dazu führen kann, dass bestimmte Bindungszustände nicht mehr als eindeutig „gebunden“ oder „ungebunden“ klassifiziert werden können.^[34,35] Daher sind in einer mathematisch-kinetischen Betrachtung multivalenter Wechselwirkungen auch weitere Faktoren wie Liganden- und Rezeptorstruktur, Diffusion oder auch laminarer Stofftransport (an Grenzflächen) zu berücksichtigen.

2.3. Multivalenz und Kooperativität: Bestimmung effektiver Molaritäten

In biologischen Systemen ist die Zahl der Bindungsstellen häufig nicht bekannt, sodass keine Aussagen über die Kooperativität der multivalenteren Bindung getroffen werden können. Bei vielen synthetischen Beispielen ist dies jedoch kein Problem, da die Zahl *n* der Bindungsstellen nicht nur ermittelt, sondern oft bei der Synthese sogar gezielt eingestellt werden kann. Dann können die Einzelbeiträge zur multivalenteren Bindung bestimmt und Aussagen über die Chelatkooperativität erhalten werden.^[36,37] Hierbei spielt die Bestimmung der effektiven Molarität *EM* eine entscheidende Rolle. Abbildung 4 zeigt dies für einen bivalenten Fall. *EM* ist dabei die kritische Konzentration, unterhalb derer der Ringschluss zum bivalenten Komplex gegenüber der Oligomerisierung bevorzugt ist.

Greift man das letzte Gleichgewicht zwischen der offenen und geschlossenen Form des bivalenten Komplexes heraus, so ergibt sich mit $K_{\text{mono}}EM$ ein Maß für die Chelatkooperativität: Ist $K_{\text{mono}}EM \gg 1$, erfolgt die Bindung positiv kooperativ; ist $K_{\text{mono}}EM \ll 1$, handelt es sich um negative Kooperativität;

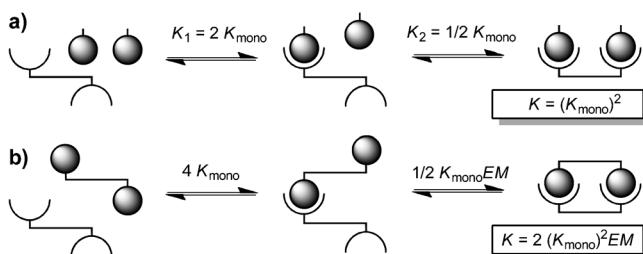


Abbildung 4. Bindungskonstanten der einzelnen Gleichgewichte (K_1 und K_2) und die Gesamtbindungskonstanten ($K = K_1 K_2$) für die zweifache Bindung a) monovalenter und b) bivalenter Gäste an bivalente Wirte.

der bivalente Komplex liegt dann größtenteils in der offenen Form vor.^[36]

Die effektive Molarität kann wie in Abbildung 5 an einem bivalenten Pseudorotaxan^[38] gezeigt – und von Hunter et al.^[39–41] für eine Reihe schöner Beispiele durchgeführt –

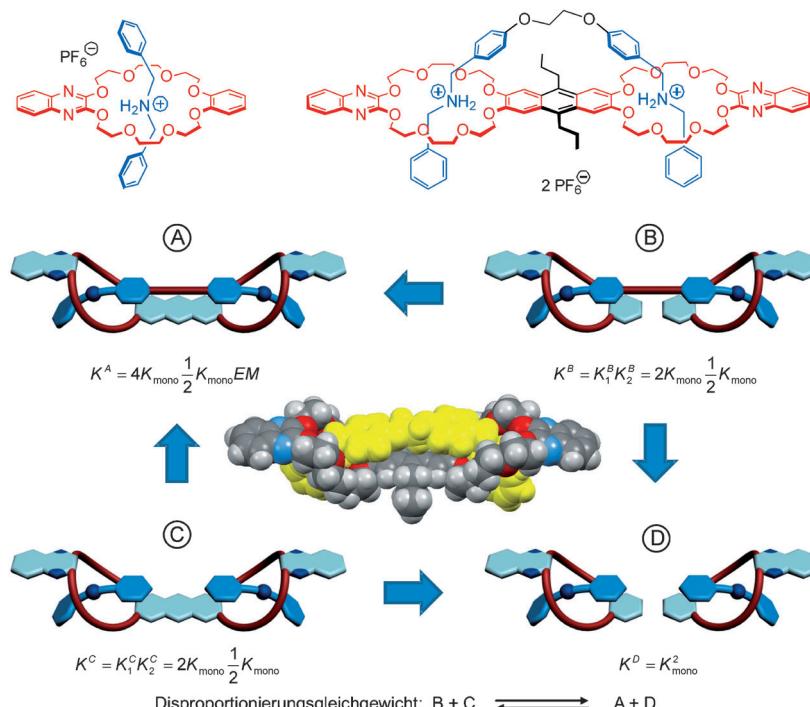


Abbildung 5. Bestimmung der effektiven Molarität für die bivalente Pseudorotaxanbildung durch einen „double mutant cycle“. Mitte: Molekülstruktur des Pseudorotaxans im Kristall (dunkelgrau C, hellgrau H, rot O, blau N, gelb bivalenter Ligand).

durch Doppelmutantenanalyse („double mutant cycles“) bestimmt werden. Dazu betrachtet man das Disproportionierungs-Gleichgewicht, dessen Gleichgewichtskonstante und damit EM leicht aus den unabhängig messbaren Konstanten K^A – K^D erhalten werden können [Gl. (2)]. Je größer EM , desto stärker liegt das Gleichgewicht auf der Seite des bivalenten Komplexes und desto stärker positiv kooperativ ist die Bindung.

$$K = \frac{K^A K^D}{K^B K^C} = \frac{2K_{\text{mono}}^2 EM K_{\text{mono}}^2}{K_{\text{mono}}^2 K_{\text{mono}}^2} = 2EM \quad (2)$$

Eine interessante Beobachtung ist, dass das Pseudorotaxan mit dem $O(CH_2)_2O$ -Spacer in der Achsenmitte eine deutlich positive Chelatkooperativität aufweist ($EM = 132 \text{ mM}$; $K_{\text{mono}} EM \approx 40$), während der Einschub nur einer einzigen weiteren Methylenegruppe zu einer nahezu unkooperativen Bindung führt ($EM = 5.8 \text{ mM}$; $K_{\text{mono}} EM \approx 2.5$). Dieser Effekt kann auf eine attraktive Stapelwechselwirkung zwischen dem Anthracenspacer im Kronenetherdimer und den beiden inneren Phenylgruppen der Achse erklärt werden. Die Molekülstruktur im Kristall (Abbildung 5, Mitte) zeigt, dass der $O(CH_2)_2O$ -Spacer hierfür optimal geeignet ist, während längere Spacer zwangsläufig diese Geometrie stören müssen.

Die bivalenten Pseudorotaxane enthalten in den Achsen recht flexible Spacers und sind durch nur geringe Chelatkooperativität ausgezeichnet. Die EM -Werte für die Bindung des Hexapyridingasts im hexavalenten Porphyrinrad in Abbildung 6 liegen hingegen um mehrere Größenordnungen höher ($EM = 280$ – 1700 M).^[42,43] Solche für eine supramolekulare Wechselwirkung äußerst hohen effektiven Molaritäten und stark ausgeprägten positiven Chelatkooperativitäten lassen sich auf die nahezu perfekte Vororganisation und die hohe Rigidität von Wirt und Gast zurückführen.

Mithilfe der „double mutant cycles“ lassen sich die verschiedenen individuellen Wechselwirkungen an den Wechselwirkungsflächen zwischen Wirt und Gast sehr schön in einzelne Beiträge zerlegen. Hunter et al. haben dies beispielsweise für ein Zinkporphyrin durchgeführt, an das Gäste nicht nur über die Koordination eines Pyridin-Stickstoffatoms an das zentrale Zink(II)-Ion binden – in diesen Wirt-Gast-Komplexen verbinden zusätzlich Wasserstoffbrücken in der Komplexperipherie Wirt und Gast miteinander, deren einzelne Beiträge genau ermittelt werden konnten.^[44] Mit diesen Systemen wurden kürzlich auch die Auswirkungen der Umgebung quantifiziert.^[45] Die effektiven Molaritäten für die Bildung der Wasserstoffbrücken stellten sich dabei als deutlich lösungsmittelabhängig heraus.

2.4. Modellierungen/Berechnungen multivalenter Wechselwirkungen

Bei der Untersuchung multivalenter Wechselwirkungen spielt die Konformationsentropie der Bindungseinheit zwischen den einzelnen Rezeptoren oder Liganden eine große Rolle. Vereinfachte theoretische Modelle sehen das Spacer-Molekül als abstrakte Kette von Gliedern, die sich nur in bestimmter Weise zueinander anordnen lassen.^[46–50] Diese

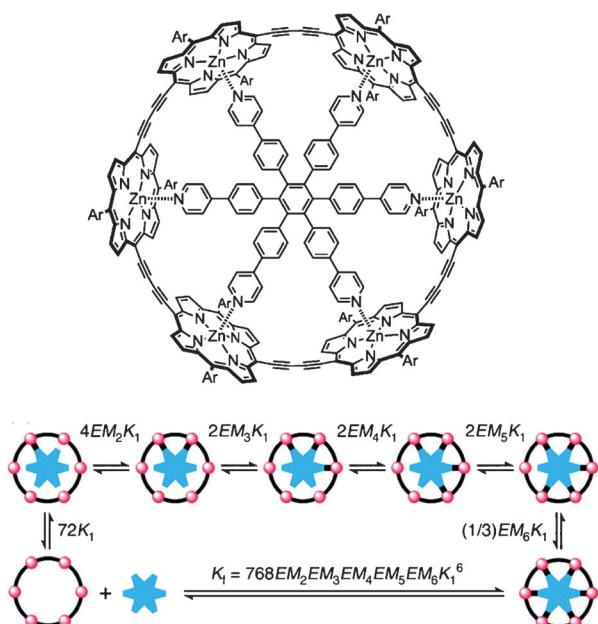


Abbildung 6. Starke Chelatkooperativität findet man bei diesem perfekt vororganisierten hexavalenten Komplex von Andersons Porphyrinrad. Abbildungen aus Lit. [42] mit Genehmigung der American Chemical Society.

vereinfachten Modelle reichen oft nicht aus, um die Konformationsentropie des Spacers hinreichend genau abschätzen zu können, denn sie vernachlässigen die physikalischen Wechselwirkungen der Atome des Spacers untereinander oder mit dem Lösungsmittel. Das Verhalten eines Spacers kann auch von der Art der Liganden abhängen, die an dem Spacer gebunden sind. Um diese Wechselwirkungen zu berücksichtigen, muss man ein physikalisches Modell des Systems aus Lösungsmittel, Spacer und Ligand erstellen. Ein atomgenaues, physikalisch-klassisches Modell des Systems liefert z.B. das Molecular Modeling.^[51] So wird das Verhalten des Spacer-Ligand-Lösungsmittel-Systems am Rechner simuliert, und die entropischen Eigenschaften des Spacers werden mithilfe der statistischen Thermodynamik ausgewertet.

Es gibt sehr unterschiedliche Ansätze, die Konformationsentropie aus statistischen Daten abzuleiten. Einer davon ist es, Entropie als Temperaturabhängigkeit der freien Energie zu sehen.^[52,53] In diesem Fall müssen Simulationsdaten bei verschiedenen (theoretischen) Temperaturen erzeugt werden, was mit einem großen Rechenaufwand verbunden ist. Alternativ kann der Zusammenhang zwischen der Varianz der Stichproben und der Entropie (bei angenommener Normalverteilung der Freiheitsgrade) genutzt werden. Die Annahme einer Normalverteilung für die untersuchten Freiheitsgrade kann aber ungenau sein und muss eventuell korrigiert werden. Ein weiterer Ansatz besteht darin, direkt aus den Simulationsdaten eine Entropieschätzung vorzunehmen.^[54] Bei diesem Ansatz ist es möglich, das Lösungsmittel atomgenau (explizit) zu berücksichtigen, anders als bei (impliziten) Modellen, bei denen nur ortsunabhängige physikalische Eigenschaften des Lösungsmittels eingebracht werden können.

Mit dem expliziten Ansatz konnte gezeigt werden, dass der Einfluss des Liganden auf die entropischen Eigenschaften des Ligand-Spacer-Lösungsmittel-Systems nicht vernachlässigt werden kann, so wie es bei vereinfachten Modellen der Fall ist.^[55] Werden beispielsweise zwei Liganden mit hydrophoben Eigenschaften (wie der Östrogenrezeptor-Agonist Diethylstilbestrol, DES) mit einem flexiblen Spacer (z.B. auf Polyethylenglycol(PEG)-Basis) verbunden, verringern hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Liganden die Konformationsentropie des Spacers im Lösungsmittel Wasser (gegenüber dem reinen PEG-Spacer). Dies schränkt die Freiheiten der Liganden so sehr ein, dass der im vorangehenden Abschnitt beschriebene, negative kooperative Effekt überwiegt und ein bivalentes System hinsichtlich der freien Energie keinen Vorteil gegenüber zwei monovalent bindenden Liganden aufweist. Solche vorgesetzten Ligand-Ligand-Wechselwirkungen können nur durch starre Spacer unterdrückt werden (Abbildung 7; siehe auch Abschnitt 3.2.2).

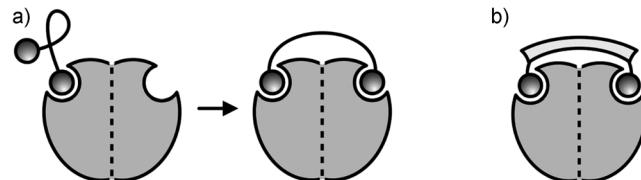


Abbildung 7. Möglichkeiten der bivalenten Bindung unter wesentlicher Beteiligung des Spacers: a) Ein flexibler Spacer verhindert durch entropisch begünstigte Faltung und Aggregation eine lineare Konformation. Diese wird erst durch Bindung des zweiten Liganden erduldet. b) Ein rigider Spacer mit kurzen flexiblen Endgruppen verhindert sofort entropische Verluste durch reduzierte Freiheitsgrade und Vororientierung der Liganden.

Außer der Bestimmung der Konformationsentropie des Spacers ist auch die atomgenaue Simulation von multivalenten Bindungsprozessen eine Herausforderung an computerbasierte Verfahren. Derzeit beschäftigen sich Theoretiker vor allem mit dem Unterschied in der freien Energie zwischen dem monovalent gebundenen und dem nichtgebundenen Liganden (Bindungsaffinität), allerdings versagen viele der dabei verwendeten Methoden im Falle eines multivalenten Bindungsprozesses.^[56] Um den Unterschied in der freien Energie für den monovalenten Fall festzustellen, werden durch Molecular Modeling zwei Szenarien simuliert und miteinander verglichen: Einmal wird ein Ligandmolekül im Lösungsmittel simuliert und einmal der Ligand in seiner „Bindungsposition“ innerhalb der Bindungstasche des Zielproteins. Bei dieser Art der Modellierung stellt man sich den Bindungsprozess als einen einstufigen Vorgang zwischen „gebunden“ und „nichtgebunden“ vor. Der Unterschied $\Delta\Delta G$ in der freien Energie der beiden Endpunkte bestimmt damit auch das Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeiten r_{12}, r_{21} der beiden „Reaktionsrichtungen“ im reversiblen Fall: $\Delta\Delta G = -k_B T \ln \left(\frac{r_{12}}{r_{21}} \right)$. Bei einem multivalenten Bindungsprozess gilt diese Gleichung nicht, es gibt immer verschiedene Zustände („kein Ligand bindet“, „einer bindet“, „zwei binden“...), die Einfluss auf das Gleichgewicht nehmen. Das

Simulieren einzelner Szenarien führt daher nicht zu Erkenntnissen über die Geschwindigkeiten der Prozesse.^[55] Vielmehr sind es die Freie-Energie-Barrieren, die über die Geschwindigkeiten der Prozesse Auskunft geben. Konformationsdynamik ist ein Verfahren, dass sich auf die Untersuchung der Energiebarrieren molekularer Prozesse konzentriert.^[57,58] Es wurde auf diese Weise bereits gezeigt, dass selbst ein monovalenter Bindungsprozess mehrstufig ablaufen kann.^[59] Multivalente Bindungsprozesse wurden jedoch bislang kaum mithilfe theoretischer Methoden untersucht.^[221]

2.5. Quantifizierung multivalenter Wechselwirkungen

Zur Quantifizierung multivalenter Bindungen wurden bereits zahlreiche Techniken eingesetzt. Assoziations- und Dissoziationskonstanten werden unter anderem durch Fluoreszenzspektroskopie,^[60] Interne-Totalreflexions-Fluoreszenzspektroskopie und -mikroskopie (TIRFS, TIRFM)^[61,62] oder Nutzung von Quarzkristall-Mikrowaagen (QCM)^[63] bestimmt. Thermodynamische und kinetische Parameter zur Quantifizierung multivalenter Bindungen sind durch Oberflächenplasmonenresonanz(SPR)-Spektroskopie,^[64] isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)^[65] und für Bindungskonstanten $< 10^5$ durch NMR-spektroskopische Messungen zugänglich. Die Rasterkraftmikroskopie (AFM) und verwandte Methoden ermöglichen eine direkte Messung der Bindungsstärke.^[66] Mit Methoden der Mikroskopie und mit dynamischer Lichtstreuung kann kolloidale Stabilität von nanopartikulären Systemen in Abhängigkeit von deren multivalenter Stabilisierung bestimmt werden, ebenso ist eine Messung von durch multivalente Wechselwirkungen induzierter Aggregation möglich.^[60,67] Verschiedene biologische Assays werden verwendet, um multivalente Wechselwirkungen in biologischen Systemen zu evaluieren; hier wird als häufigste Methode SPR als markerfreie Detektionsmethode verwendet. SPR ermöglicht die Bestimmung von Bindungskonstanten, wenn ein 1:1-Bindungsmodus von Rezeptor (Analyt) und Ligand vorliegt.

Häufig lassen sich experimentelle Daten, besonders bei hochvalenten Ligandkonjugaten komplexer Architektur, keinem Bindungsmodell zuordnen und sind somit nicht vollständig auswertbar, dies kann aber auch bereits bei manchen niedervalenten Ligandsystemen der Fall sein.^[68] Einen Ausweg zur Beschreibung multivalenter Wechselwirkungen bietet hier die Bestimmung von IC_{50} -Werten (IC_{50} = mittlere inhibitorische Konzentration) mit SPR. Hat man einen robusten SPR-Assay für die Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung, lässt sich durch konzentrationsabhängige Präinkubation des Rezeptors (Analyten) mit potenziellen multivalenten Inhibitoren die Konzentration des Inhibitors bestimmen, die zur Reduktion des Bindungssignals auf 50 % des Ausgangswertes führt (IC_{50} -Wert). Daraus ergibt sich: je kleiner der IC_{50} -Wert, desto potenter der Inhibitor. Durch Normierung auf eine Funktionalität oder einen Liganden lässt sich der Verstärkungsfaktor β ermitteln, der die durchschnittliche Affinität eines Liganden des multivalenten Binders beschreibt.

Vorteil dieses kompetitiven Bindungsassays ist, dass in kurzer Zeit eine Vielzahl von Proben mit hoher Reproduzi-

erbarkeit analysiert und verglichen werden kann und wegen der hohen Empfindlichkeit nur wenig Probenmaterial benötigt wird, was für viele biologische Fragestellungen von wesentlicher Bedeutung ist. Ein weiterer Vorteil dieses Messverfahrens ist Nähe zur In-vivo-Situation für Wechselwirkungen, die unter Flussbedingungen stattfinden, beispielsweise die bakterielle und leukozytäre Adhäsion im Blutgefäß (siehe Abschnitt 4.2).

Tabelle 1 gibt einen Überblick über einige der wichtigsten Methoden zur Quantifizierung multivalenter Wechselwirkungen. Es werden außer den Messmethoden jeweils die experimentelle Messgröße und das daraus ableitbare Maß für die Multivalenz genannt. Dazu werden Beispiele angegeben, die zeigen, wie die jeweilige Methode praktisch genutzt werden kann.

3. Multivalente Gerüstarchitekturen

Um Multivalenz als Organisations- und Wirkprinzip zu nutzen, ist ein intelligentes Design des multivalenten Ligandenkonstrukts erforderlich, das außer der intrinsischen Affinität der einzelnen Liganden auch deren Abstand und relative räumliche Orientierung (Vororganisation) berücksichtigt. Diese Aspekte werden maßgeblich durch die Wahl der Gerüstarchitektur und des Spacers bestimmt. Hierbei kann zwischen zwei Extremfällen unterschieden werden: Im ersten Fall kann eine flexible Verknüpfung der einzelnen Ligandeneinheiten erfolgen, was dem resultierenden System einen großen Konformationsraum erschließt, womit nur ein Bruchteil in der gewünschten, im Sinne einer multivalenten Wechselwirkung „produktiven“ Struktur vorliegt oder – statistisch-thermodynamisch argumentiert – die multivalente Wechselwirkung zu einem Verlust an Konformationsentropie im Rückgrat führt (siehe Abschnitt 2.2). Im zweiten Fall verhindert eine starre Fixierung der Ligandeneinheiten diesen entropischen Verlust, allerdings setzt dies eine optimale Positionierung der Liganden voraus, da ansonsten durch suboptimale Passung Bindungsenthalpie in großem Maße verloren wird. Da eine solche Präzision nur in wenigen Fällen erreicht werden kann, scheint also – wie so häufig – ein Mittelweg am vielversprechendsten, bei dem gerade genug Flexibilität zur Anpassung vorhanden ist, aber auch nicht mehr.

Eine zusätzliche und häufig entscheidende Komponente ist die sich im Laufe des Bindungsvorgangs ändernde Solvation im Bereich des Rückgrates. Die Solvationsbeiträge der Ligandenbindung sollten für monovalente und multivalente Wechselwirkungen annähernd identisch sein. So kann der Spacer durch seine sich ändernde Konformation stärker oder weniger stark solvatisiert werden, oder es können sich unspezifische Wechselwirkungen, z. B. hydrophobe Kontakte, mit der Rezeptoroberfläche ergeben. Diese komplexen Zusammenhänge erschweren eine experimentelle Untersuchung der Phänomene erheblich, und demzufolge tauchen in der Literatur größtenteils Einzelbeobachtungen, d. h. Berichte über erfolgreiche multivalente Ligandenkonstrukte, auf, jedoch mangelt es nach wie vor an systematischen und vergleichenden Untersuchungen zum Einfluss der Gerüstarchitektur auf die Stärke multivalenter Wechselwirkungen. Im

Tabelle 1: Messmethoden zur Quantifizierung multivalenter Bindungen

Methode	Messgröße	Maß für Multivalenz	Beispiel
UV/Vis/NIR-Absorptionsspektroskopie	Übergangstemperatur (aus Änderung der Absorption) als Funktion der Wirkkonzentration	Bindungsenthalpie	Hybridisierung von Oligothymintemplaten (Wirt) mit oligomeren Adenin- und Naphthalin-Diaminotriazin-Gästen ^[69]
	apparente Auslenkungstemperatur (aus Änderung der Absorption) als Funktion der Gastkonzentration	Gast-Gast-Wechselwirkungsenergie	
	Absorptionsänderung als Funktion der Ligandenkonzentration	Assoziationskonstante	
Fluoreszenzspektroskopie	relative Änderung der Fluoreszenzintensität als Funktion der Konzentration des Liganden	Assoziationskonstante	multivalente Wechselwirkung Kohlenhydrat-modifizierter Quantenpunkte mit Lectinen und Spermien ^[60]
	Grad der Komplexierung der Wirtmoleküle α (aus Fluoreszenzintensität bestimmt) als Funktion der Konzentration der Gastmoleküle	Assoziationskonstante	Wirt-Gast-Wechselwirkung zwischen der Peripherie Adamantylharnstoff-funktionalisierter Dendrimere und Ureido-Essigsäure-Derivate ^[70]
	Fluoreszenzintensität der bindenden Liganden als Funktion der Zeit	Assoziationskonstante Dissoziationskonstante	zweidimensionale Protein-Protein-Wechselwirkung auf Modellmembranen ^[61]
Interne-Totalreflexions-Fluoreszenz-(TIRF)-Mikroskopie/Spektroskopie		Dissoziationskonstante	Bindung multivalenter Proteinliganden an Lipiddoppelschichten ^[62]
			Bindung von Choleratoxinen an Phospholipidmembranen ^[83]
	Änderung im Refraktionsindex bei Ligand/Rezeptor Wechselwirkung (massenabhängig)	Assoziationskonstante, IC_{50} , Kinetik	Affinitäts-Screening von Antikörpern ^[71] multivalente Wechselwirkungen von Polyglycerolsulfaten und Selectinen ^[72]
Circulardichroismus(CD)-Spektroskopie	CD-Intensität als Funktion der Wirt/Gast-Konzentration	Gast-Gast-Wechselwirkungsenergie	Hybridisierung von Oligothymin-Templaten mit oligomeren Adenin- und Naphthalin-Diaminotriazin-Gästen ^[69]
NMR-Spektroskopie	Diffusionskoeffizient aus DOSY-Messungen ^[73]	Größeninformationen zum Nachweis multivalent induzierter Komplexbildung	Hexamere Resorcinaren- und Pyrogallarenkapseln ^[75]
	NMR-Integrale oder Signalverschiebungen als Funktion des Ligand-Rezeptor-Verhältnisses oder NMR-Titration ^[74]	freie Bindungsenthalpie bei temperaturabhängiger Messung: Bindungsenthalpie und -entropie Aktivierungsparameter ΔG^\ddagger , ΔH^\ddagger , ΔS^\ddagger (z. B. über Linienformanalyse)	
EPR-Spektroskopie	dipolare Wechselwirkung zwischen Spinsonden	Abstandsverteilung in Lösung Strukturänderung	Abstandsmessung von bivalenten Spinsonden in Lösung ^[76]
isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) ^[65]	Wärme als Funktion des Ligand/Rezeptor- bzw. Wirt/Gast-Verhältnisses	Assoziationskonstante Bindungsenthalpie Bindungsentropie freie Bindungsenthalpie	Maltose und Lactose auf der Oberfläche von β -Cyclodextrinvesikeln ^[77] Einfädelung von Pseudorotaxanen ^[78]

Tabelle 1: (Fortsetzung)

Methode	Messgröße	Maß für Multivalenz	Beispiel
Laser-Reflexionsinterferometrie (LRI, Rif)	Reflektivität oder daraus abgeleitet Bedeckungsgrad mit gebundenem Liganden als Funktion der Zeit	Dissoziations- und Assoziationskonstanten	zweidimensionale Protein-Protein-Wechselwirkung auf Modellmembranen ^[57]
Quarzkristall-Mikrowaage (QCM)	Frequenzänderung als Funktion des Konzentrations des multivalennten Liganden	Assoziationskonstante	multivalente Wechselwirkung von Lectinen mit einem vernetzten, auf eine Oberfläche aufgepropften Glycopolymere ^[63]
Rasterkraftmikroskopie (AFM)	Zugkraft als Funktion des intermolekularen Abstands	Bindungskräfte	molekulare Wechselwirkung zwischen Bakteriophagen und Lipopolysaccharid-Doppelschichten ^[66] intermolekulare Wechselwirkung zwischen C ₆₀ und Porphyrinderivaten ^[79]
Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	Zahl (multivalenter) Nanopartikel pro Aggregat	Grad der durch multivalente Funktionalisierung bedingten Aggregation	multivalente Wechselwirkung Kohlenhydrat-modifizierter Quantenpunkte mit Lectinen und Spermien ^[60]
	Visualisierung einzelner Bindungen in einem multivalennten Komplex	Stabilität gegen Aggregation als Funktion multivalenter Stabilisierung	Bindung von Viruspartikeln an Nanopartikeln ^[80,81]
Fluoreszenzmikroskopie	Fluoreszenzintensität als Funktion der Zeit	Geschwindigkeitskonstante	Bindung von CdS-Quantenpunkten mit variabler Ligan- denmultivalenz an GABA(C)-Rezeptoren auf einer Zellmembran ^[82]
dynamische Lichtstreuung (DLS)	hydrodynamischer Durchmesser (aus zeitlicher Änderung der Streuintensität) als Funktion der Zeit	Aggregationsgeschwindigkeitskonstante (Maß für Stabilität gegen Aggregation infolge multivalenter Stabilisierung)	Aggregation von mit mono- und multivalennten Thiolen stabilisierten Goldnanopartikeln in Lösung ^[67]
hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (HPLC)	unterschiedliche Retention als Funktion der Polarität und Molekülgroße	kompetitive Messungen ermöglichen Ermittlung von Gleichgewichtskonstanten	trivale Wechselwirkung zwischen Vancomycintrimer und D-Ala-D-Ala-Trimer. ^[84]

folgenden Abschnitt wollen wir daher exemplarisch auf verschiedene Gerüsttypen eingehen sowie ihre Vor- und Nachteile diskutieren.

3.1. Statistische Polyvalenz

3.1.1. Synthetische Polymere

Multifunktionale organische Polymere bieten dank ihrer hohen Kettenflexibilität und einstellbaren Löslichkeit eine geeignete Plattform für die Verankerung von Liganden für multivalente Wechselwirkungen (Abbildung 8). Bei der statistischen Multivalenz wurde zunächst auf lineare Strukturen gesetzt, die beispielsweise für die Inaktivierung von Viren (siehe Abschnitt 4.2) durch spezifische Wechselwirkung zwischen Sialinsäure(SA)-funktionalisierten Polyacrylamiden und Hämagglutinin (HA), dem ubiquitären viralen Oberflächenprotein, verwendet wurden.^[85,86] Durch eine flächige

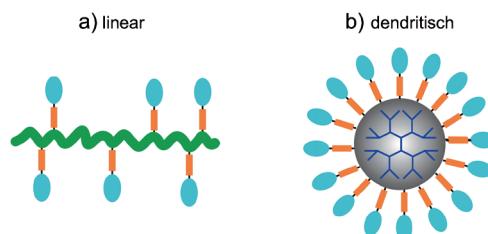


Abbildung 8. Beispiele für synthetische Polymere, die als Gerüstarchitekturen für polyvalente Wechselwirkungen eingesetzt werden (hellblau: Ligand, orange: Spacer).

Wechselwirkung und sterische Abschirmung der Viren durch polymere Systeme gelang es, deren Wechselwirkung mit den Zielzellen kompetitiv zu unterdrücken.

Außer diesen polyvalenten viralen Inhibitoren wurden auch Liganden für zelluläre Targets (z.B. als membran-

ständige Rezeptoren) auf Basis linearer Polymere entwickelt. Aktuelle Beispiele hierfür sind die von Kiessling et al. entwickelten multivalennten ROMP-basierten (ROMP = ring-öffnende Metathesepolymerisation) linearen Polymere^[87] und die von Kopeček et al. verwendeten wasserlöslichen Polyacrylamide (*N*-(2-Hydroxypropyl)methacrylamid, HPMA).^[88] Weitere wichtige Beispiele für statistische multivalente Gerüstarchitekturen sind Glycopolymere.^[89] Sie reichen von semisynthetischen Hybriden mit variabler Zuckerkontrolle bis hin zu natürlichen Strukturen mit polydisperser Kettenlänge, z. B. Chitosane, Dextrans, Heparine und Hyaluronsäuren. Lineare Polymere (random coil) haben keine gerichtete Ligandenpräsentation, da sie im Unterschied zu definierten Oberflächen oder globulären Strukturen viele verschiedene Konformationen einnehmen können. Dendritische Polymere dagegen weisen bereits eine definierte Architektur auf und verfügen über die denkbar höchste Oberflächenfunktionalisierung. Allerdings wurden bislang überwiegend kleine definierte multivalente Dendrone und Dendrimer eingesetzt.^[90,91] Landers et al. konnten zeigen, dass ein SA-konjugiertes Polyamidoamin-Dendrimer (G4-SA) geeignet ist, *in vitro* die Hämagglytination (Erythrocyten-Virus-Wechselwirkung) zu inhibieren, wenn die Sialinsäure über einen kurzen Spacer angebunden wird.^[92] Interessanterweise führte der Einbau eines längeren PEG-Spacers für eine Exposition der SA am Dendrimer zu einer Auslösung der Inhibition. Dieser Befund lässt auf die Bedeutung des Spacers innerhalb des Moleküls schließen und ist mit der zu großen Flexibilität (hohem Entropieverlust) des Systems erklärbar. Das aktive SA-Konjugat ist auch in der Lage, *in vivo* pulmonare Influenza-A-Infektionen zu inhibieren. Allerdings zeigte sich ebenfalls, dass die Blockade der Adhäsion Virus-typ-spezifisch ist, was auf unterschiedliche Zugänglichkeit der individuellen HA-Bindungsstellen zurückzuführen ist. Auch wenn viele Ansätze auf kleinen Dendrimeren basieren, sind diese niedervalenten Strukturen (in der Regel mit $n=4-16$) nicht kompetitiv mit flächigen Wechselwirkungen oder Wechselwirkungsstellen, da diese weit auseinander liegen (siehe Abschnitt 4.3).

Vor Kurzem wurden von Cloninger^[93] und Hammond et al.^[94] globuläre Architekturen mit multivalennten Antennen entworfen. Hierzu wurden verzweigte Endgruppen eingesetzt, um entsprechend „geclusterte“ Liganden zu erzeugen, die bessere Bindungseigenschaften als statistisch beladene Oberflächen aufweisen.

3.1.2. Hybridmaterialien

Organische Materialien können mit anorganischen Materialien in vielfältiger Weise über multivalente Wechselwirkungen zu neuen Strukturen verknüpft werden. Als anorganische Substrate dienen dabei vor allem metallische oder oxidische Oberflächen, die als ausgedehnte Fläche oder Nanopartikel vorliegen; als weitere Materialien werden unter anderem Graphit oder Silicium eingesetzt. Ein Spezialfall sind dreidimensionale Netzwerke (metal-organic frameworks, MOFs), die allerdings mangels inneren Raums und Funktionalisierungsmöglichkeiten für weitere Liganden eher in den Materialwissenschaften Eingang finden.^[95] Organische

Reaktionspartner können kleine organische Moleküle sowie größere Systeme wie Dendrimer, Polymere oder Biomoleküle, z. B. DNA oder Proteine, sein. Es sind verschiedene statistische multivalente Bindungsmodi zwischen organischen und anorganischen Materialien möglich (Abbildung 9).

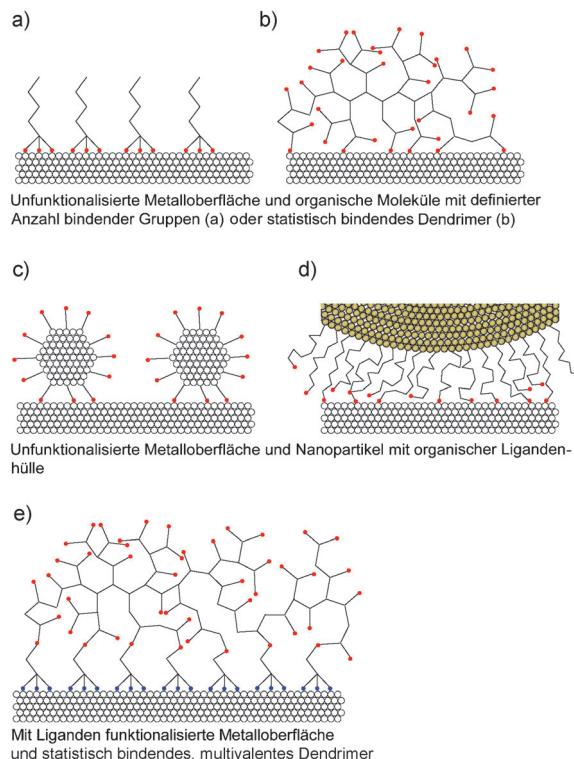


Abbildung 9. Übersicht über die verschiedenen statistischen multivalennten Bindungsmodi zwischen organischen und anorganischen Bindungspartnern zur Bildung von Hybridmaterialien. Details siehe Text.

Bei einer nicht weiter functionalisierten Metall-, Metall-oxid- oder Graphitoberfläche, bei der nur ein kleiner Teil der Atome auf der Oberfläche als Bindungspartner fungiert, erfolgt die Verknüpfung zum organischen Bindungspartner statistisch. Dabei kann der organische Partner selbst mit einer definierten Zahl von funktionellen Gruppen binden, z. B. bei der Bindung eines di- oder trivalenten Thiols auf einer Goldoberfläche (Abbildung 9a)^[67] sowie substituierter Pyridine auf Graphitoberflächen.^[96] Es kann aber auch die Verknüpfung des organischen Partners statistisch erfolgen, wie beispielsweise bei der Bindung eines Dendrimers auf eine Metall- oder Glasoberfläche^[97] (Abbildung 9b). Zhou et al. nutzten auf an eine Glasoberfläche multivalent gebundene Poly(amidoamin)-Dendrimer, die mit terminalen Aminoxy- und Hydrazidgruppen functionalisiert waren, zur kontrollierten Kupplung verschiedener Mono-, Oligo- und Polysaccharide.^[97] Anstelle eines organischen Moleküls können auch anorganische Nanopartikel mit einer organischen Ligandenhülle an die Oberfläche binden, sodass in einem solchen Hybridmaterial nur noch die wechselwirkende Komponente selbst organischer Natur ist. Dabei können abhängig von der Dichte, dem Krümmungsradius und der Steifigkeit der Liganden praktisch alle dem Substrat zugewandten Liganden

des Nanopartikels an die Oberfläche binden (Abbildung 9c), oder es kann nur eine statistische Bindung einiger Liganden erfolgen (Abbildung 9d). Ein Beispiel hierfür ist die Bindung mit Dithiocarbamaten funktionalisierter Siliciumoxidpartikel an Goldoberflächen.^[98] Alternativ kann die Oberfläche des anorganischen Substrats selbst mit organischen Liganden (z.B. Thiolen, DNA, Proteineinheiten) funktionalisiert sein, an die der organische oder nanopartikuläre Bindungspartner bindet (Abbildung 9e). Auch diese Verknüpfung ist in der Regel statistisch, wenn die Dichte der Oberflächen-gebundenen Liganden ausreichend hoch ist. Die Oberflächen-gebundenen Liganden können dabei selbst multi- oder monovalent an die anorganische Oberfläche gebunden werden.

Dorokhin et al. funktionalisierten Glasoberflächen mit einer Schicht aus β -Cyclodextrinen sowie einer daran gebundenen, weiteren Schicht aus Adamantyl-terminierten Poly(propylenimin)-Dendrimeren, um mit β -Cyclodextrinheptamin funktionalisierte CdSe/ZnS-Halbleiternanopartikel zu binden.^[99] Solche durch multivalente Stabilisierung erhaltenen Schichtstrukturen sind für Anwendungen in der Optoelektronik^[100,101] sowie in der Sensorik^[102,103] von Interesse. Johnson und Levicky gelang es, mit Thiolgruppen terminiertes Poly(mercaptopropyl)methylsiloxan (PMPMS) irreversibel auf einem Goldsubstrat zu deponieren,^[104] und zwar durch die multivalente Wechselwirkung der Thiolgruppen in Kombination mit der hohen Hydrophobie des Polymers. Danach war es möglich, Thiol-terminierte DNA-Oligonukleotide kovalent an das Substrat zu binden. Das erhaltene System ist bis Temperaturen nahe 100°C stabil und eröffnet somit neue Anwendungsgebiete in der Diagnostik. Es ist darüber hinaus auch möglich, durch multivalente Verknüpfung von Nanopartikeln auf einer planaren Oberfläche größere dreidimensionale Strukturen aufzubauen (siehe Abschnitt 4.1). Außer der Herstellung von auf Substraten deponierten Systemen ist auch die Synthese in Lösung vorliegender anorganisch-organischer Hybridsysteme möglich. Dabei induzieren multivalente Wechselwirkungen eine kontrollierte Aggregation der Reaktionspartner. Wagner et al. gelang es durch Nutzung multivalenter elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen Goldnanopartikeln und Coiled-Coil-Peptiden, schaltbar und reversibel Kolloidanordnungen herzustellen.^[105]

3.2. Programmierte Multivalenz durch definierte Biopolymere

Im Unterschied zu den oben aufgeführten, synthetischen Polymersystemen, die auf Grundlage rationaler Überlegungen bezüglich der Multiplizität entstanden sind, ist die Natur in der Lage, deutlich komplexere Architekturen durch Verwendung von maßgeschneiderten Biopolymeren (Peptide, Proteine, DNA) zu realisieren.

3.2.1. Peptid-basierte Gerüststrukturen

Eine definierte räumliche Ausrichtung von Kohlenhydrateinheiten in synthetischen Glycopolymeren ist oft schwer zu verwirklichen. Mithilfe sowohl kurzer flexibler als auch konformativ fixierter Modellpeptide konnte die Rolle der Protein-Substrat-Konformation (insbesondere von N-gly-

cosylierten Peptiden) mittels exakt positionierter Liganden für den Glycosylierungsprozess bereits ausführlich studiert werden.^[222] Der Vorteil der Anwendung von Modellpeptiden liegt darin, dass eine Vielzahl von analytischen Verfahren zur Strukturcharakterisierung angewendet werden kann und darüber hinaus der Vergleich zwischen glycosylierter und nichtglycosylierter Form wertvolle Informationen über die konformativen Konsequenzen der Modifizierung liefert.

Im Folgenden wird anhand einiger ausgewählter Beispiele ein Überblick über die verschiedenen Peptidrückgrat-basierten multivalennten Strukturen präsentiert. Ziel ist dabei nicht die allumfassende Auflistung aller bisher synthetisierten Peptid-basierten multivalennten Gerüststrukturen, sondern vielmehr ein Überblick über die geometrischen Möglichkeiten und eine Herausarbeitung der Unterschiede.

Ungeordnete Gerüststrukturen: Unter den Begriff multivalente ungeordnete Peptid-basierte Gerüststrukturen fällt eine Reihe sehr unterschiedlicher Verbindungen. Diese bestehen im Extremfall aus nur einer Aminosäure und sind bivalent oder aus mehreren hundert Aminosäuren mit ebenso vielen Liganden. Lee und Mitarbeiter entwickelten basierend auf den Seitenkettenmodifizierten Aminosäuren Glutamin- und Asparaginsäure mit γ -L-Glutamyl-L-Glutaminsäure (γ -EE) bzw. β -L-Aspartyl-L-Asparaginsäure (β -DD) trivale Inhibitoren für den Asialoglycoproteinrezeptor (ASGPR).^[106,107] Hierbei wurden die GalNAc-Liganden über hydrophobe Aminohexylspacer mit den drei Carboxygruppen der Glutamin- bzw. Asparaginsäuren verknüpft (Abbildung 10a, oben). Tam entwickelte basierend auf der Verzweigung von Lysinresten so genannte MAPs (MAPs = multiple-antigen peptides).^[108,109] Diesem Konzept folgend wurden seitdem diverse multivalente Peptid- und Glycopeptid-Dendrimere synthetisiert und untersucht.^[110,111]

Multivalente homopolymere lineare Peptidketten sind in ihrer Anwendung viel verbreiteter als die oben beschriebenen kleinen Gerüste. Hierbei werden mehrere Liganden über die funktionellen Aminosäureseitenketten statistisch verteilt in

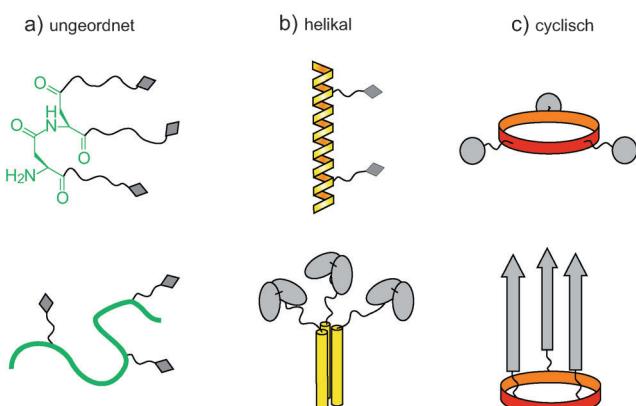


Abbildung 10. Schema diverser multivalenter peptidischer Gerüststrukturen. a) Ungeordnete Strukturen: kleines trivalentes Gerüst β -DD mit Glycosylliganden (oben); lineare Peptidkette mit Seitenketten-verknüpften Liganden (unten). b) Helikale Strukturen: α -Helix mit Glycosylliganden (oben); trivalentes Collagen-basiertes Gerüst mit drei „single chain variable fragments“ (scFv)-Liganden (unten). c) Cyclische Strukturen: radiale Anordnung der Liganden (oben); axiale Anordnung von Liganden, z. B. β -Faltblättern (unten).

die Peptidkette eingeführt. Am bekanntesten ist die Poly-L-glutaminsäure (PGA), an deren Carboxyseitenketten die Liganden über chemische oder chemisch-enzymatische Techniken eingeführt werden können. Durch die Länge des linearen polymeren Grundgerüsts können auch große Rezeptorabstände überbrückt werden; zudem ermöglicht die flexible Struktur eine relativ spannungsfreie Wechselwirkung der Liganden mit Rezeptoren. Weitere Vorteile des PGA-Gerüsts sind eine niedrige Toxizität und Immunogenität sowie die gute Bioabbaubarkeit und Wasserlöslichkeit (10 % (w/v)). Hochpolymere Lysogangliosid/PGA-Konjugate haben sich als pikomolare Inhibitoren des trimeren Hämaggglutinins des Influenzavirus erwiesen.^[112] Dabei sind sowohl das Molekulargewicht der PGA als auch die Ligandenkonzentration Parameter, die die Effizienz der Bindung von Influenzaviren durch PGA-basierte Polymere beeinflussen.^[113] Eine zu hohe Ligandendichte schwächt vermutlich wegen sterischer Gegebenheiten die Bindung.^[114] Die Einführung von Aminohexylspacern zwischen dem PGA-Rückgrat und den Liganden kann die sterischen Einschränkungen wieder aufheben.

PGA-basierte Glycopeptide binden selektiv an zahlreiche pflanzliche Lectine.^[115,116] Das glycosyierte PGA-Rückgrat eignet sich daher als Modellsystem für Glycane vom Mucintyp.^[116] Die Glycopeptide wechselwirken spezifisch mit dem zugehörigen Lectin, und zwar unabhängig davon, um wie viele Zuckerreste das Glycan gegenüber dem natürlichen Glycoprotein gekürzt wurde.

Kleine Aminosäuren mit Seitengruppen, die möglichst wenig Einfluss auf z. B. die Löslichkeit des Gesamtkonstrukts ausüben, wie Glycin oder Alanin, können als Spacer zwischen den funktionalisierten Aminosäuren fungieren. So kann nicht nur der Abstand zwischen den Liganden, sondern auch die Sekundärstruktur des Peptids beeinflusst werden. Diese Systeme sind hervorragend geeignet, den Einfluss von Ligandenabständen auf die Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen zu untersuchen. Unverzagt et al. synthetisierten eine Reihe von bivalenten Modellpeptiden als Inhibitoren für das Influenzavirus.^[118] Dabei wurden die mit der Aminosäure Asparagin verknüpften Sialyl-N-acetyllactosamin-Liganden durch flexible Glycinfragmente unterschiedlicher Kettenlänge miteinander verbunden.

Helikale Gerüststrukturen: Polypeptide, die überwiegend aus Aminosäuren mit starker Neigung zur Helixbildung, wie Alanin oder Prolin, aufgebaut sind, können als helikale multivalente Peptidrückgratstrukturen fungieren. Diese sind wesentlich steifer als ungeordnete Strukturen, d. h., dass die Ligandenabstände entlang der Helixachse besser an die Rezeptorabstände angepasst werden müssen. Gleichzeitig wird aber auch der Entropieverlust bei der Ligand-Rezeptor-Bindung verringert.^[117]

Unverzagt et al. studierten anhand eines bivalenten Systems für Influenzainhibitoren den Zusammenhang zwischen der Länge einer helikalen Prolinkette zwischen den Liganden und der Effizienz der Inhibition.^[118] Diese war im Fall einer ungünstigen Platzierung der Liganden entlang der steifen Prolinhelix schlechter als die des monovalenten Systems. Kiick und Liu nutzten für ihre systematische Studie eine Alanin-reiche Sequenz als α -helikale Gerüststruktur für Cholera-Toxin-Inhibitoren.^[119] Die Glycosylliganden wurden

über Aminohexylspacer mit Glutamatseitenketten des Peptidrückgrats in der Weise verknüpft, dass sie sich in verschiedenen Abständen zueinander befanden. Der α -helikale Inhibitor Cap 35-H-6 inhibierte doppelt so gut wie der ungeordnete multivalente Inhibitor Cap 35-RC-6 (162-fach Cap 35-RC-6; 340-fach Cap 35-H-6 im Vergleich zum monovalenten Liganden), was vermutlich auf den geringeren Verlust der Konformationsentropie zurückzuführen ist.

Kürzlich konnten Falenski et al. zeigen, dass sich das α -helikale Coiled-Coil-Faltungsmotiv als multivalente Gerüststruktur dafür eignet, mehrere Glycosylliganden entlang der Helixachsen zu präsentieren.^[120] Das helikale Coiled-Coil-System bietet wegen der typischen Primärstruktur des Heptad-Wiederholungsmusters einzigartige Möglichkeiten für eine justierbare Präsentation von Kohlenhydratfunktionalitäten. Innerhalb des Coiled-Coil-Faltungsmotivs winden sich zwei bis sieben α -Helices linksgängig umeinander (Abbildung 11). Die thermodynamische Triebkraft für die Aggregation mehrerer Peptidhelices wird zum überwiegenden Teil durch Anordnen hydrophober Aminosäuren in Positionen a und d zu einem hydrophoben Kern erzielt. Die Positionen e und g sind oft mit geladenen Aminosäuren wie Lysin oder Glutamat besetzt und beeinflussen durch elektrostatische Wechselwirkungen die Spezifität der Faltung (parallel gegenüber antiparallel). Die Positionen a, d, e und g lassen sich demnach zu einer interhelikalen Erkennungsdomäne zusammenfassen (siehe Rahmen in Abbildung 11). Die Positionen b, c und f des Heptad-Wiederholungsmusters liegen zum Lösungsmittel exponiert auf der Oberfläche des helikalen Zylinders (Abbildung 11). Sie stehen einzeln und in

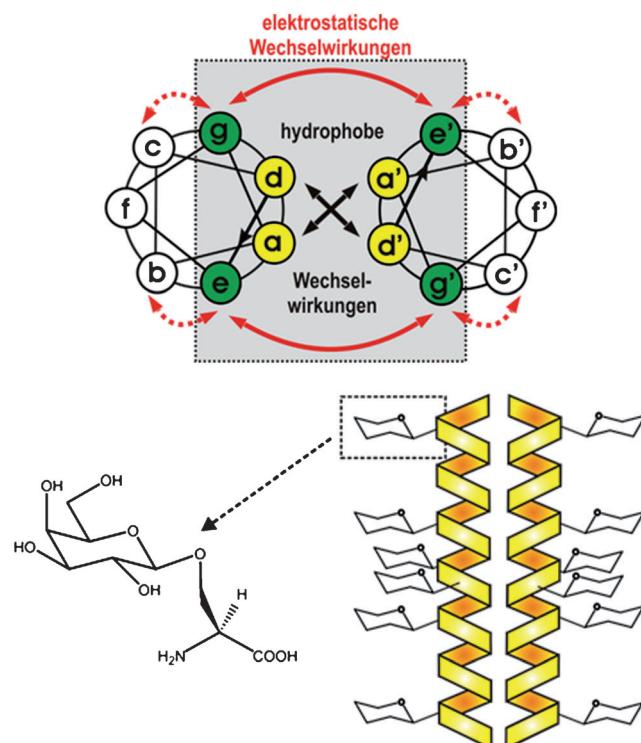


Abbildung 11. Oben: Helical-Wheel-Darstellung eines parallelen Coiled-Coil-Dimers. Unten: Schematische Darstellung eines in den Positionen b, c und f hyperglycosylierten α -helikalen Coiled-Coil-Dimers.

Kombination für den Einbau von Kohlenhydratbausteinen zur Verfügung, was eine Feinabstimmung des Abstands der präsentierten Bausteine ermöglicht. Bei der Einführung der Glycosylliganden war eine sukzessive, aber relativ geringe Destabilisierung der Coiled-Coil-Struktur zu beobachten. Selbst die Einführung von zwölf β -D-Galactoserenen (sechs β -D-Galactosereste pro 26 Aminosäure langes Peptid) über die Serinseitenketten in den lösungsmittelexponierten Positionen eines Coiled-Coil-Dimers resultierte in einer stabilen Coiled-Coil-Struktur ($T_m = 72^\circ\text{C}$ gegenüber 85°C des unglycosylierten Peptids). In weiterführenden Studien wird zurzeit die Bindung der Coiled-Coil-Glycopeptide an natürliche Glycoproteinrezeptoren wie Lectine oder den Asialoglycoproteinrezeptor von HepG2-Zellen getestet.

Die Vorteile der Anwendung Peptidrückgrat-basierter Gerüststrukturen bestehen vor allem darin, dass der präparative Zugang mit der chemischen Festphasenpeptidsynthese und etablierten orthogonalen Schutzgruppenstrategien gewährleistet ist. Größere Peptidrückgratstrukturen sind durch Ligation, Polymerisierung oder Expression zugänglich. Die diversen Seitenkettenfunktionen der Aminosäuren ermöglichen die einfache Einführung unterschiedlicher Liganden. Nach gezieltem Einbau der Liganden erhält man monodisperse Systeme. Bei Templayen auf Basis von helikalen Systemen oder Cyclopeptiden kann der Abstand der Liganden zueinander gesteuert werden. Weiterhin sind Peptidgerüste von der Natur adaptiert und daher biokompatibel, d.h., sie sind gut wasserlöslich und bioabbaubar. Die Beantwortung der Frage, ob die gute Bioabbaubarkeit durch Proteolyse nicht eher nachteilig ist, hängt im Wesentlichen davon ab, in welchem Kontext die multivalenten Peptidsysteme eingesetzt werden sollen und ob es sich um ungeordnete, definiert gefaltete oder höher organisierte Systeme handelt. Die Synthese langer Peptidsequenzen ist teilweise schwierig und zuweilen relativ kostspielig. Dieser Nachteil kann in verschiedenen Fällen umgangen werden, indem man Selbstorganisationsprozesse nutzt. Lediglich bei Überbrückung größerer Rezeptorabstände, was lange und damit flexible Peptidsequenzen erfordert, kann es schwierig werden, den Abstand zwischen den einzelnen Liganden zu steuern und den Verlust der Konformationsentropie bei der Rezeptorbindung zu minimieren. Des Weiteren bieten die Seitenketten der Aminosäuren zusätzliche funktionelle Gruppen, die mit den Rezeptormolekülen in Wechselwirkung treten können. Bei entsprechendem Design ist hierdurch eine Bindungsverstärkung möglich.

In jüngster Zeit ist es auch gelungen, durch ortsspezifische Mutagenese und Gencode-Engineering mehrere bioortho-

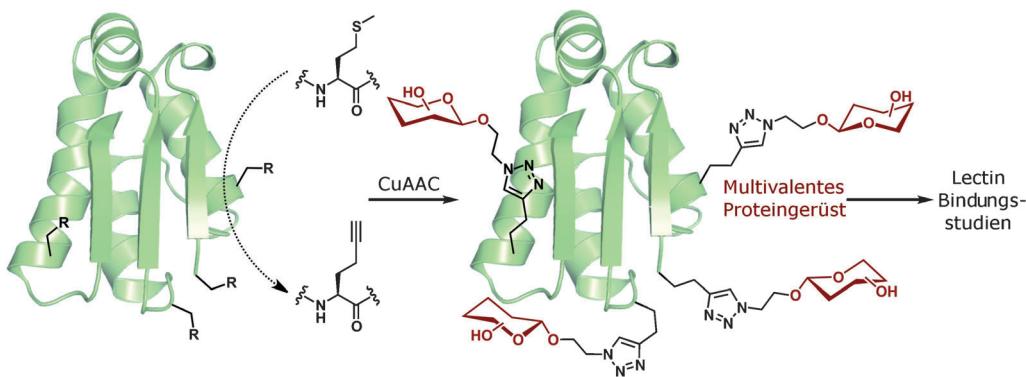


Abbildung 12. Nutzung des Barstar-Proteins als multivalentes Gerüstmolekül.^[121] Die Alkinfunktionen werden durch Ersatz einer kanonischen Aminosäure (Methionin) mit Homopropargylglycin ortsspezifisch eingeführt. CuAAC: Cu-katalysierte Alkin-Azid-Cycloaddition.

gonale Funktionalisierungen zielgerichtet an ganzen Proteinen einzuführen.^[121] Durch etablierte Konjugationsmethoden konnten so maßgeschneiderte, multivalente Biomoleküle für eine effiziente Lectininhibition generiert werden (Abbildung 12).

3.2.2. PNA/DNA

Nucleinsäuremoleküle werden nicht mehr nur als genetisches Speichermaterial betrachtet, sondern zunehmend als ein Strukturtemplat. Hierbei werden die Watson-Crick-Basenpaarungsregeln genutzt, um DNA- und RNA-Moleküle sowie Analoga zu instruieren, in Struktur und Größe definierte Architekturen zu bilden.^[122,123] Meist stehen Duplex- und Triplexstrukturen und in jüngerer Zeit auch Quadruplexstrukturen im Vordergrund, mit deren Hilfe Chromophore,^[124] Metalle^[125,126] und sogar Proteine^[127] in exakt eingestellten Abständen angeordnet werden können. Bislang verfolgte die Mehrzahl der Arbeiten materialwissenschaftliche Fragestellungen.

Vor Kurzem wurde erkannt, dass Nucleinsäure-basierte Architekturen auch den molekularen Lebenswissenschaften faszinierende Möglichkeiten eröffnen.^[128,129] So ist vor allem die multivalente Ligandenpräsentation auf Nucleinsäuregerüsten interessant, weil

- monodisperse Materialien durch chemische oder biologische Synthese in nahezu beliebigen Längenskalen herstellbar sind,
- die Valenz einer Ligandenpräsentation durch sequenzstrukturierte Selbstorganisation gesteuert wird und
- die funktionellen Gruppen auf der Nucleinsäurehelix mit Angström-Genauigkeit positioniert werden können.

Ein weiterer Vorteil ist, dass die Rigidität/Flexibilität von Nucleinsäurearchitekturen wählbar eingestellt werden kann. So weist ein DNA-Doppelstrang eine Persistenzlänge von 500 Å auf, d.h., innerhalb eines solchen Abstands verhält sich ein DNA-Duplex als starrer Stab.^[130,131] Den meisten Stabstrukturen wohnt eine Tendenz zur Aggregation inne. Im Unterschied dazu zeichnen sich DNA-Duplexarchitekturen durch ihre hohe Wasserlöslichkeit aus, eine für biologische Untersuchungen sehr wichtige Eigenschaft. Unter Einbezie-

hung von Einzelstrangbrüchen oder einzelsträngigen Teilbereichen kann die Flexibilität des Nucleinsäuregerüsts stufenweise erhöht werden.

Kobayashi et al. setzten Oligonucleotid-Monosaccharid-Konjugate mit halbseitig komplementären Sequenzen in der Oligomerisierung durch Hybridisierung ein.^[132–135] Die resultierenden DNA-Galactose- oder DNA-Mannose-Cluster zeichnen sich durch eine strenge Periodizität der Saccharid-Präsentation aus. Anhand dieser Strukturen wurde demonstriert, dass die helikale Torsion der Ligandenpräsentation an einem DNA-Duplex die kooperative Erkennung von Lectinen beeinflusst. Für die multivalente Wechselwirkung mit Lectinen wie *Ricinus-communis*-Agglutinin oder Concanavalin A waren drei Monosaccharidliganden nötig.

Winssinger et al. beschrieben eine Methode, bei der die Topologie eines triantennären Oligomannosids, das vom HIV neutralisierenden 2G12-Antikörper erkannt wird, durch benachbarte Präsentation zweier einfacher Mannoside nachgeahmt werden kann.^[136] Hierzu wurden Di- und Trimannose-einheiten an die N- (5') oder C-terminalen Enden (3') von Peptidnucleinsäuren (PNAs) gebunden. PNA ist ein nichtionisches DNA-Analogon, das mit komplementären DNA- oder RNA-Strängen sehr stabile doppelhelikale Strukturen bildet. Einen ähnlichen Ansatz nutzten Winssinger et al. für die bivalente Präsentation von Cyclopeptiden.^[137] Über PNA-PNA-Hybridisierung dimerisierte PNA-Cyclopeptid-Konjugate zeigten eine zehnfach höhere Affinität für den Cytokinzeptor DR5 als monovalente Konjugate.

Scheibe et al. zeigten, dass PNA-Zucker-Konjugate für Abstandsmessungen von Bindungsstellen im *Erythrina-cristagalli*-Lectin (ECL) genutzt werden können.^[68] Nur fünf verschiedene PNA-Konjugate genügten, um durch Permutation von komplementären Sequenzadressen auf dem DNA-Templat eine Vielzahl multivalenter Architekturen zu erschließen. Kürzlich verwendeten Apella et al. diese Methode, um hochaffine Binder für Integrine aufzubauen. Integrine vermitteln die Zell-Zell-Adhäsion. Die Überexpression dieser multivalenten Rezeptoren steht im Zusammenhang mit der Metastasierung von Krebs. Die besten Konstrukte trugen 20 Cyclopeptidliganden und zeigten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine um zwei Größenordnungen bessere Inhibition der Bindung von Melanomzellen an die extrazelluläre Matrix als das monovalente Cyclopeptid.^[138]

Eberhard et al. statteten DNA-Architekturen mit Phosphopeptid-Liganden aus und nutzten die bivalenten Konjugate für das räumliche Screening von Tandem-Phosphopeptidbindungsdomänen der Syk-Kinase.^[139] In dieser Arbeit wurden einzelsträngige Segmente in die Architekturen einbezogen, um Aussagen über die Flexibilität einer Proteindomäne treffen zu können. Ähnlich gingen Abendroth et al. bei Untersuchungen des Östrogenrezeptors vor (siehe Abbildung 14 in Abschnitt 3.2.3).^[140] Die DNA-programmierte räumliche Rasterung lieferte außer dem Abstand der Kon sensusbindungsstellen für Östrogen auch Hinweise auf eine zusätzliche hydrophobe Bindungsstelle auf der Oberfläche der Ligandenbindungsdomäne.

Die Gruppen um Neri und Hamilton beschrieben DNA-kodierte selbstorganisierte Bibliotheken, in denen kleine Moleküle an Oligonucleotide gebunden werden, um diese

nach Hybridisierung an den Enden von Duplexen und Triplexen di- bzw. trivalent zu präsentieren.^[141–143] Die Methode soll die Identifizierung von Wirkstoffen für medizinische Anwendungen erleichtern. Terminal modifizierte Template auf Basis einer DNA-Quadruplexstruktur ermöglichen es, die Affinität der präsentierten Liganden für Zielproteine wie Cytochrom c oder Trypsin zu steuern.^[144–146]

Winssinger et al. machten von einer benachbarten Hybridisierung von PNA-Konjugaten mit DNA-Templaten Gebrauch. In einem Beispiel wurde gezeigt, dass 62 500 Kombinationen kleiner Molekülliganden nach Affinitätsselektion gegen Carboanhydrase die partielle Konvergenz der Carboanhydrasehemmerbibliothek ermöglichen.^[147] Die heterobivalente Präsentation von Peptiden an DNA-Duplexen nutzten Chaput et al., um hochaffine Binder für ein regulatorisches Protein Gal180 der Hefe zu konstruieren.^[148]

3.2.3. Räumliche Rasterung zur Abstandsmessung in Protein-komplexen

DNA-Architekturen bieten den Vorteil, dass die Abstände zwischen den präsentierten Liganden über die Sequenz der beteiligten Stränge in weiten Bereichen programmierbar sind. Im Folgenden werden Beispiele diskutiert, in denen Liganden in Abständen zwischen 3 und 150 Å präsentiert werden, um den Abstand zwischen den Bindungsstellen in Rezeptoren zu messen. Exemplarisch werden hierbei multivalente Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Kohlenhydraten, niedermolekularen Verbindungen und Proteinen behandelt. Die Vorüberlegungen zu flexiblen und starren Spacern finden sich in Abschnitt 2.

Für die räumliche Rasterung des *Erythrina-cristagalli*-Lectins (ECL) synthetisierten Scheibe et al. PNA-LacNAc-Konjugate.^[68] Insgesamt wurden fünf verschiedene PNA-Oligomere hergestellt, die drei unabhängige Anticodonsequenzen aufspannen. Ein DNA-Templat, das drei verschiedene Codonsegmente auf vier Positionen enthält, ermöglicht im Prinzip die Bildung von 324 Supramolekülen (Abbildung 13). Ein tetravalenter PNA-DNA-Komplex wurde von ECL mit einer mehr als 700-fach (180-fach pro Ligand) höheren Affinität gebunden als ein monovalenter PNA-DNA-Komplex. Bei der Untersuchung bivalenter Komplexe wurden die höchsten Affinitäten gemessen, wenn die LacNAc-Liganden in einem Abstand von 104 Å angeordnet waren. Die Einbeziehung einzelsträngiger Segmente zwischen den beiden doppelhelikalen Regionen in III führte zu noch höheren Affinitäten. In ECL finden sich die Bindungsstellen in einem 65-Å-Abstand auf gegenüberliegenden Positionen eines Homodimers. Die Autoren folgerten, dass sich bivalente Liganden der Krümmung der Proteinoberfläche anpassen müssten und dies am besten gelänge, wenn die Liganden von einem flexiblen Templat in einem linearen Abstand von 100 Å angeboten werden.

Viele Proteine, die an der Bildung von Protein-Protein-Wechselwirkungsnetzwerken beteiligt sind, verfügen über mehrere Proteinbindungsdomänen. Ohne Kenntnisse der Proteinstruktur ist es schwierig, die Voraussetzungen für die hochaffine Bindung eines spezifischen Substrats zu bemessen. Eberhard et al. nutzten DNA-Peptid-Konjugate, um die Ab-

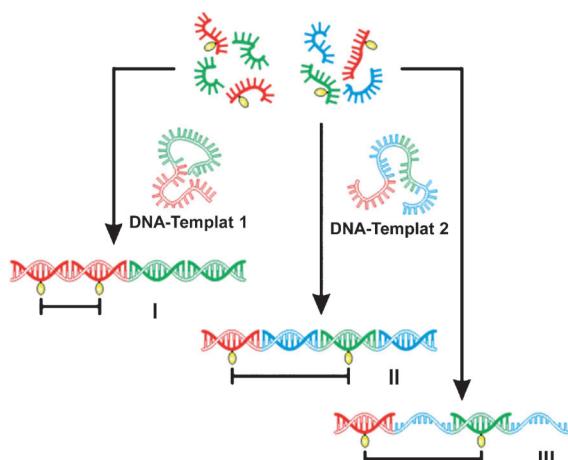


Abbildung 13. Sequenzprogrammierte Bildung von PNA-DNA-Komplexen zur Steuerung der Valenz (nicht gezeigt) und räumlichen Anordnung von Glycoliganden (gelb).

stände zwischen den Tandem-SH2-Domänen der Syk-Kinase abzuschätzen, eines wichtigen Signalenzymes bei der Aktivierung von B-Lymphocyten.^[139] SH2-Domänen binden Phosphotyrosin-haltige Peptidmotive, die über eine Maleinimidyleinheit mit cysteinmodifizierten Oligonukleotiden konjugiert wurden. In dieser Studie wurden mehrere DNA-Architekturen untersucht (Abbildung 14): Bivalente Einzelstränge **1** banden an die Syk-tSH2-Domäne mit sehr hoher Affinität, jedoch spielte der Abstand zwischen Phosphopeptid-Anker-

stellen keine Rolle, was die Autoren der hohen Flexibilität der DNA-Einzelstränge zuschrieben. Nach Hybridisierung mit einem komplementären DNA-Strang bilden sich rigide Duplexe **2**. Niedrige Affinität für Syk-tSH2 zeigten Duplexe, in denen die Phosphopeptide bei einem Abstand von 5 oder 16 Nucleotiden auf entgegengesetzten Seiten der Doppelhelix angeordnet waren. Die höchsten Affinitäten wurden beobachtet, wenn die Phosphopeptide auf der gleichen Helixseite in einem Abstand von 2 (ca. 7 Å) oder 11 Nucleotiden (ca. 37 Å), nicht aber 21 Nucleotiden (ca. 70 Å) positioniert wurden. Die Autoren folgerten, dass die Interdomäne, die die beiden SH2-Domänen in der Syk-Kinase verbindet, nicht in der Lage ist, Distanzen von 70 Å aufzuspannen. Die helikale Torsion erschwert Abstandsmessungen in den Bereichen zwischen 10 und 25 Å sowie allen ganzzahligen Vielfachen davon. Aus diesem Grund fügten die Autoren einzelsträngige Regionen zwischen den Duplexsegmenten der ternären Komplexe **3** ein. Diese Regionen weisen zwar Rotationsfreiheitsgrade auf, sind jedoch FRET-Messungen (FRET = resonanter Fluoreszenzenergietransfer) zufolge dennoch deutlich weniger flexibel als vollständig ungepaarte Einzelstränge. Experimente mit ternären Komplexen **3**, in denen die ungepaarten Bereiche schrittweise verlängert wurden, lassen darauf schließen, dass die Syk-Interdomäne flexibel genug ist, die SH2-Domänen in Abständen zwischen 7 und 50 Å anzurorden.

Ein weiteres aktuelles Beispiel ist die Untersuchung bivalenter Wechselwirkungen im homodimeren Östrogenrezeptor mit einem Rezeptorabstand von 3.9 nm (Abbildung 14). Abgesehen von der Kristallstruktur in Gegenwart verschiedener Liganden sind auch erste bivalente Liganden mit flexiblen Spacern bekannt.^[149] Die Aufgabe bestand nun darin, einen molekularen Maßstab zur Aufklärung unbestimmter Quartärstrukturen in Proteinkomplexen auf Basis starrer DNA-Spacermoleküle zu entwickeln. Tatsächlich ergab der maßgeschneiderte starre DNA-Spacer die höchste Bindungsaaffinität bei einem Vergleich mit zu kurzen und zu langen DNA-Spacern.^[150] Auch flexible synthetische PEG-Spacer zeigten nur eine vergleichsweise schwache bivalente Bindung.^[149]

Wittmann et al. konnten durch Röntgenstrukturanalyse eines Lectin-Ligand-Komplexes (WGA-GlcNAc) zeigen, dass Weizenkeim-Agglutinin (WGA) vier Bindungsdomänen mit insgesamt acht Bindungsstellen aufweist, wovon in der Kristallstruktur jeweils zwei benachbarte Bindungsstellen durch einen überbrückenden, bivalenten Liganden besetzt werden können.^[151] Durch EPR-spektroskopische Verfahren konnte diese Struktur auch in Lösung bestätigt werden. Dazu wurden die *N*-Acetylglucosamin-Liganden über PEG-Spacer unterschiedlicher Länge verbunden und terminal mit Spinsonden markiert. Mit diesen bivalenten Konstrukten konnte so die Abstandsverteilung der bivalenten Liganden bei unterschiedlichen Ligand/Rezeptor-Verhältnissen gemessen werden. Mit dieser Methode konnten der optimale Bindungsabstand zwischen zwei Liganden in Lösung wie auch unterschiedliche Bindungsmodi ermittelt werden.^[76]

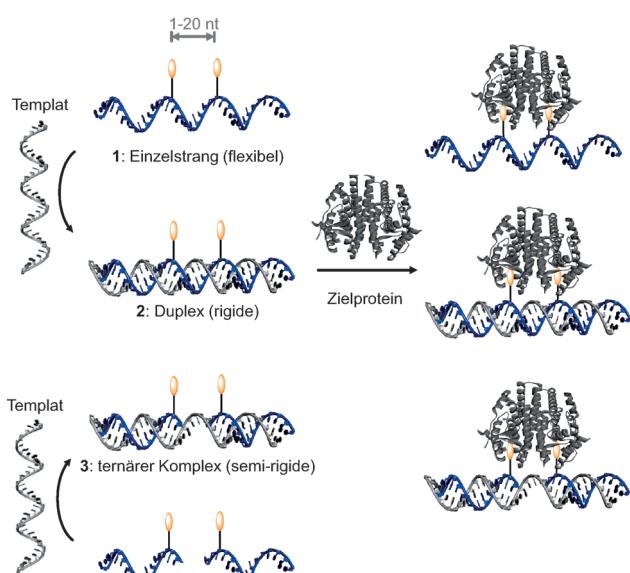


Abbildung 14. Prinzip der räumliche Rasterung von Proteinen mit bivalenten Peptid-DNA-Komplexen als flexiblem Einzelstrang (**1**), rigidem Doppelstrang (**2**) und unter Einbeziehung semi-rigider Einzelstrangsegmente in ternären Komplexen (**3**). Tandem-SH2-Domänen der Syk-Kinase wurden in allen drei Modi mit Phosphotyrosin-haltigen KpYETLG-Motiven systematisch untersucht.^[139] Eine räumliche Rasterung des Östrogenrezeptors mit Östrogenanaloga in ternären Komplexen zeigte den Abstand zwischen den Konsensusbindungstaschen auf und gab sogar Hinweise auf eine zweite hydrophobe Bindungsstelle.^[150] nt = Nucleotid.

4. Funktion von multivalenten und polyvalenten Systemen

Nach den Grundlagen der Multivalenz und verschiedenen Gerüstarchitekturen werden in diesem Abschnitt funktionale multivalente und polyvalente Systemen vorgestellt. Hier überwiegen die biologisch inspirierten Beispiele mit Anwendungen in der Medizin, aber gerade in den letzten Jahren sind interessante supramolekulare Systeme dazugekommen.

4.1. Artifizielle supramolekulare Systeme

Definierte supramolekulare Systeme – aus der anorganischen, organischen oder biologischen Chemie – sind zum Verständnis der an multivalenten Wechselwirkungen beteiligten Kräfte und Prozesse in Lösung besonders wertvoll. Können solche Systeme in gezielt modellierte und präparativ aufgebaute flächige oder sphärische Nanostrukturen mit definierter Oberfläche integriert werden, sind quantitative Untersuchungen zu weit reichenden multivalenten Effekten möglich, wie sie besonders bei flächigen Systemen auftreten (Polyvalenz).

Synthetische multivalente Wirte und Gäste gibt es in der supramolekularen Chemie viele; demgegenüber ist die Zahl der Studien, in denen der Versuch einer genaueren thermodynamischen und kinetischen Beschreibung unternommen wird, jedoch überraschend gering. Darunter finden sich allgemeine Modelle für Selbstorganisationsprozesse^[152, 153] und konkrete Modelle für beispielsweise die Selbstorganisation von meso-Pyridyl-Zn-Porphyrinen in Tetramere.^[154] Melamin-Cyanurat-Rosetten^[155, 156] bei denen eine größere Zahl von Bausteinen über Wasserstoffbrücken zu einem Komplex zusammengebracht wird, wurden hinsichtlich der entropischen Beiträge zur Bindung untersucht.

Außer über die als Beispiele für detaillierte thermochemische Analysen in Abschnitt 2.3 gezeigten Systeme wurde auch über eine Reihe anderer kooperativer, multivalenter Bindungsprozesse berichtet; darunter finden sich abgesehen von frühen Arbeiten von Lehn et al. zu Übergangsmetallhelicaten^[157–160] sowie Andersons und Taylors Porphyrinleitern^[161] auch die molekularen Oligoamidreißverschlüsse von Hunter et al.^[162, 163] (Beispiel siehe Abbildung 15).

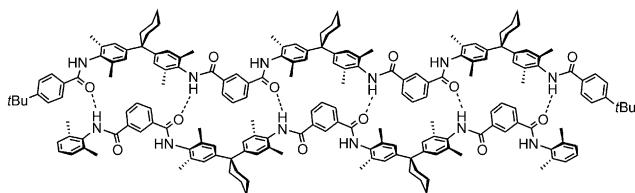


Abbildung 15. Positiv kooperativ bindender Oligoamidreißverschluss.

Variert man die Länge der zueinander komplementären Bausteine systematisch zwischen zwei und sechs Wasserstoffbrücken und trägt man die Bindungsenergien über die Zahl der Wasserstoffbrücken auf, erhält man eine exponentiell ansteigende Kurve. Jede zusätzliche Wasserstoffbrücke

liefert also einen höheren Energiebeitrag als die vorhergehende.

Mit der Rolle des Spacers und seiner Flexibilität beschäftigt sich eine Reihe von Publikationen. Schon Page und Jencks schätzten Anfang der 1970er Jahre die entropischen Kosten einer bei der Bindung festgelegten, aber zuvor frei drehbaren C-C-Bindung auf $-T\Delta S = 3.8 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($\text{CH}_2\text{-CH}_2$) und $-T\Delta S = 7.5 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($\text{CH}_2\text{-C=O}$) bei Raumtemperatur ab.^[164] Searle und Williams berichteten über geringfügig kleinere Werte von $-T\Delta S = 1.6\text{--}3.6 \text{ kJ mol}^{-1}$ bei 300 K für die Festlegung von Rotoren in Kohlenwasserstoffketten bei der Kristallisation eines Alkans.^[165] Schneider et al. fanden schließlich für eine Serie von bivalenten Bisamid/Biscarboxylat-Komplexe mit Spacern unterschiedlicher Länge einen Wert von $-T\Delta S = 1.3 \text{ kJ mol}^{-1}$.^[166, 167] In diesen Studien zeigt sich der Vorteil synthetischer Modellsysteme, die gezielt variiert werden können, um präzise Aussagen über die Thermochemie machen zu können.

Bindungsverstärkung wurde auch in Komplexen modifizierter Peptide mit Cucurbit[8]uril gefunden (Abbildung 16).^[168] Cucurbit[8]uril kann in seinem Hohlraum zwei Gäste gleichzeitig binden, von denen einer vorzugsweise ein

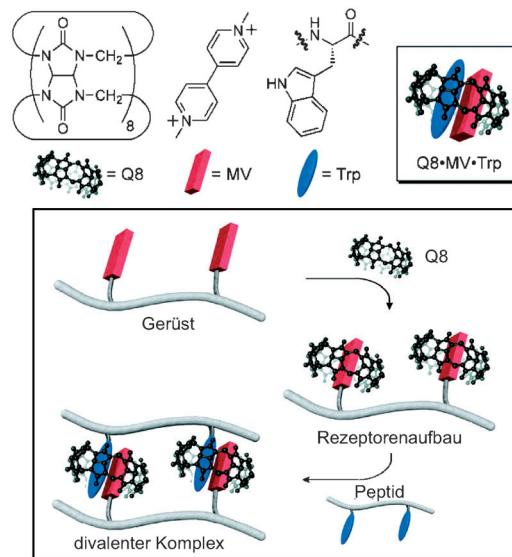


Abbildung 16. Cucurbit[8]uril (Q8) bildet ternäre Komplexe mit Methylviologen (MV) und elektronenreichen Arenen, beispielsweise aus der Seitenkette des Tryptophans (Trp). Programmiert man Peptide mit diesen beiden Gästen, lassen sich leicht multivalente Wirt-Gast-Komplexe erzeugen (unten). Wiedergabe aus Lit. [168] mit Genehmigung der American Chemical Society.

Dikation ist, das in der Länge in etwa dem Abstand der beiden Säume von nach innen weisenden Carbonylgruppen entspricht. Methylviologen ist ein solcher elektronenärmer Gast, der für die zusätzliche Aufnahme eines elektronenreichen Arens als komplementärer Gast im Cucurbiturilhohlraum sorgt. Funktionalisiert man ein Peptid mit Viologenseitenketten und ein zweites Peptid mit Tryptophanen in gleichen Abständen, bilden beide Peptide bei Zugabe von

Cucurbit[8]uril durch die Paarung der komplementären Gäste einen Doppelstrang. Je nach der Zahl der möglichen Wechselwirkungen ergeben sich dabei auch multivalente Komplexe, von denen beispielsweise ein trivalenter eine etwa 210-mal höhere Bindungskonstante aufweist als die entsprechenden monovalenten Aggregate.

Noch stärker lässt sich die Komplexität verringern, wenn man supramolekulare Komplexe in der hochverdünnten Gasphase eines Massenspektrometers untersucht. Hier entfallen Lösungsmittelleffekte komplett, und die intrinsischen Eigenschaften der Komplexe können untersucht werden. Diese thermochemische Analyse in der Gasphase ist sehr aufwändig und wurde bisher noch nicht für multivalente Systeme durchgeführt. Allerdings konnte Armentrout bereits die Bindungsenergien der Kronenether [12]Krone-4 bis [18]Krone-6 und anderer Ether zu Alkalimetallen ermitteln.^[169] Einer der zentralen Befunde dieser Studien war, dass die Bindungsenergie der Kronenether entgegen der aus dem Chelateffekt resultierenden Erwartung geringere Werte als die Summe der Bindungsenergien zu einer vergleichbaren Zahl kurzer linearer Ether mit insgesamt gleicher Zahl an Donoratomen aufwies. Dies bedeutet, dass hier die Bindung der Kronenether systematisch negativ kooperativ erfolgt. Die allgemein gültige Vorstellung, dass Alkalimetallionen an jene Kronenether, in deren Hohlraum sie möglichst genau hineinpassen, am stärksten binden, drückt sich in den Gasphasen-Bindungsenergien nicht annähernd so deutlich aus wie in den in Lösung gemessenen Bindungsenergien (siehe Lit. [170], zit. Lit.). Dieser Unterschied ist auf einen erheblichen Solvatationseffekt zurückzuführen und zeigt eindrucksvoll, dass der Vergleich isolierter Systeme in der Gasphase mit experimentellen Daten aus kondensierter Phase tiefgreifende Einblicke in Solvatationseffekte liefern und damit zu einem genaueren Verständnis der Bindungsprozesse beitragen kann. Dies trifft besonders auf die Untersuchung multivalenter Bindungsprozesse zu, bei denen entropische Effekte besondere Relevanz vermuten lassen, sodass hier zukünftig interessante Forschungsergebnisse zu erwarten sein dürften.

Zum Schluss dieses Abschnitts zu supramolekularen multivalennten Systemen soll noch ein Beispiel diskutiert werden, in dem die multivalente Bindung eine besondere Funktion ermöglicht. Nach der Synthese mehrerer trivalenter, so genannter „Superbündel“^[171,172] bauten Stoddart et al. molekulare Aufzüge (Abbildung 17), indem sie an jeden der drei Ammoniumarme der Gastkomponente eine Viologenstation (4,4'-Bipyridinium) anhängten.^[173,174] Damit wird das nach Anbringen von Stopfern entstandene [3]Rotaxan schaltbar. Sind die sekundären Amine protoniert, komplexieren die Kronenether bevorzugt an diesen Stationen, und die Plattform befindet sich in direkter Nachbarschaft zum Spacer des Gasts. Deprotoniert man, wandert sie zu den Viologenstationen und entfernt sich damit vom Gastspacer.

Eine damit verwandte kinetische Untersuchung belegt, wie wichtig ein Verständnis der Eigenschaften des Spacers für ein tiefer gehendes Verständnis der Multivalenz ist.^[175] Mit Hilfe eines Viologen/Dibenzo-[24]Krone-8-Templats gelingt die dreifache Einfädelung des dreiarmigen Viologengasts in den trivalenten Kronenetherwirt (Abbildung 18). Dabei sind

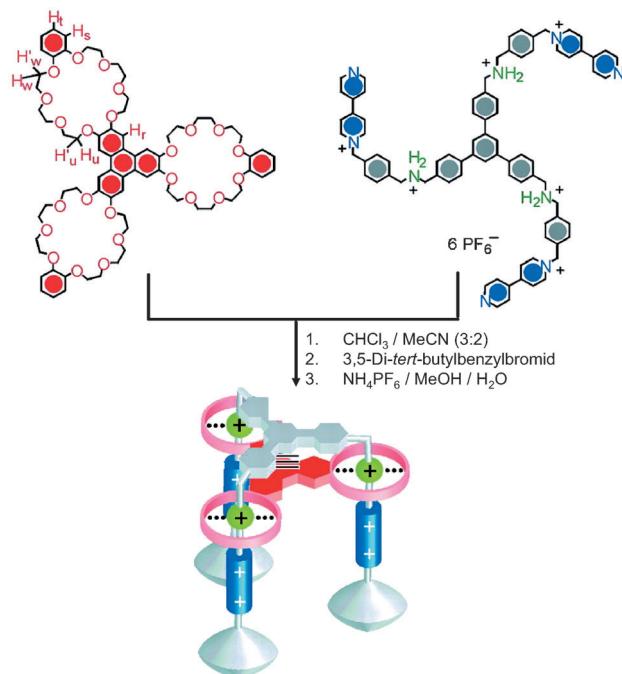


Abbildung 17. Synthese des molekularen Aufzugs durch Stoddart et al. Wiedergabe aus Lit. [173] mit Genehmigung der AAAS.

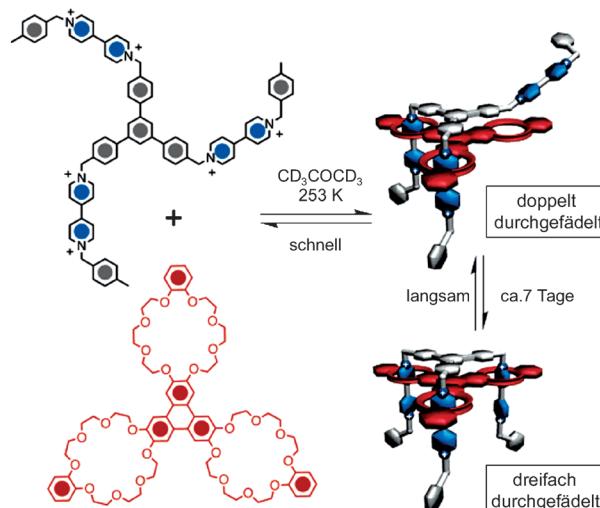


Abbildung 18. Ein dreifach durchgefädelter Pseudorotaxan auf der Basis eines Viologen/Dibenzo-[24]Krone-8-Templats zeigt, dass Multivalenz sich auch in kinetischen Parametern widerspiegeln kann. Während die ersten beiden Einfädelungsschritte sehr schnell erfolgen, benötigt die dritte Achse ca. sieben Tage, um einzufädeln. Wiedergabe aus Lit. [175] mit Genehmigung der American Chemical Society.

die ersten beiden Einfädelungsschritte schnell, der abschließende dritte Schritt jedoch erheblich langsamer – mehrere Tage sind nötig, um die Einfädelung abzuschließen. Der Grund ist recht klar in den chemischen Strukturen der beiden Komponenten erkennbar. Beide haben rigide aromatische Spacergerüste, an denen die Bindungsstellen befestigt sind. Die beiden Gerüste sind zusätzlich auch noch in der Lage, miteinander π - π -Wechselwirkungen einzugehen. Nach der

zweiten Einfädelung ist der Komplex daher so rigide, dass die dritte Einfädelung nur noch über eine hohe Aktivierungsbarriere erfolgen kann. Wie dieses Beispiel zeigt, ist der Einfluss des Spacers mannigfaltig, und ein detailliertes Verständnis von Multivalenz setzt auch eine genaue Untersuchung des Spacereinflusses voraus. Insbesondere aber greift eine rein auf die Thermodynamik der multivalennten Bindung zielende Beschreibung zu kurz, da Multivalenz sich auch sehr klar in der Kinetik der Bindung ausdrücken kann.

Weiterhin lassen sich multivalente supramolekulare Wechselwirkungen zur Nanostrukturierung von Oberflächen und zum Aufbau neuer Materialien nutzen (siehe Abschnitt 3.1.2). Multivalente Wechselwirkungen an Grenzflächen werden in der Biologie vor allem zur initialen und reversiblen Immobilisierung von größeren Objekten wie ganzen Zellen oder von Pathogenen genutzt. Im Unterschied zu den meisten biochemischen Beispielen sind supramolekulare Systeme dank ihrer besser definierten Struktur jedoch geeigneter, um ein grundlegendes und quantitatives Verständnis von multi-/polyvalenten Wechselwirkungen an Grenzflächen zu erzielen.^[153, 176, 177] Zunehmend werden Methoden entwickelt, die durch Nanostrukturierung von Oberflächen oder selbstorganisierte Monoschichten (SAMs) auf potenzielle Anwendungen im relevanten Größenbereich von 1–100 nm abzielen.^[178, 179] Hier sind insbesondere biologisch oder katalytisch aktive, räumlich definierte und somit adressierbare Oberflächen interessant.^[180] Traditionelle lithographische Prozesse mit ihrer technisch bedingten Beschränkung auf eine Längenskala von >100 nm wurden hinsichtlich ihrer bisher erzielbaren Strukturgrößen erweitert (Nanolithographie).^[181]

Aber auch durch Multivalenz-gesteuerten Selbstzusammensetzen von supramolekularen Molekülen oder funktionalisierten Nanopartikeln lassen sich planare oder dreidimensionale funktionale Strukturen (alternativ gezielt auf einem Oberflächensubstrat) realisieren, die sich selbst sortieren und korrigieren, wie von der Gruppe um Reinhoudt und Huskens demonstriert wurde.^[182] Ein interessantes Beispiel hierzu von Crespo-Biel et al. ist ein regelmäßiger Multischichtenaufbau über multivalente Gast-Wirt-Wechselwirkungen durch alternierende Adsorption von Adamantyl präsentierenden Poly(propylenimin)-Dendrimeren und von Cyclodextrin-beschichteten Goldnanopartikeln auf einer initialen Cyclodextrin-SAM auf Goldoberflächen (Abbildung 19).^[183, 184] Mit diesem Ansatz ist grundsätzlich der Aufbau von definiert strukturierten und stabilen Oberflächen oder Materialien möglich.

4.2. Multivalente Wechselwirkungen an biologischen Grenzflächen

Von grundlegender Bedeutung bei der Wechselwirkung biologischer Oberflächen sind multi- und polyvalente Wechselwirkungen zwischen Lectinen und Glycanen. Lectine sind Proteine mit definierter Glycanerkennungsdomäne auf der Oberfläche von Viren und Bakterien sowie pflanzlichen und tierischen Zellen. Affine Inhibitoren der Lectine sind deshalb geeignet, die Funktion von definierten Kohlenhydratstruk-

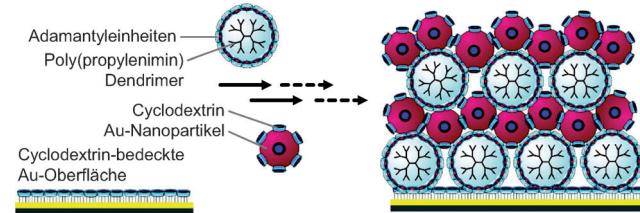


Abbildung 19. Aufbau von dreidimensionalen Strukturen durch schichtweise Absorption (layer-by-layer, LbL) komplementär funktionalisierter, multivalenter Nanopartikel (Dendrime und Au-Nanopartikel) auf SAMs. Wiedergabe aus Lit. [183] mit Genehmigung der American Chemical Society.

turen aufzuklären, wenn sie als kompetitiver Bindungspartner eingesetzt werden, und bieten darüber hinaus die Möglichkeit zur pharmakologischen Intervention. Das Phänomen der multivalennten Glycan-Lectin-Wechselwirkung wird in den Glycowissenschaften seit seiner Beschreibung gemeinhin auch als Glucosidclustereffekt bezeichnet und hebt die besondere biologische Relevanz dieses Systems hervor.^[185] Multivalente Glycankonjugate werden in diesem Zusammenhang auch als Glycancluster bezeichnet (siehe dendritische Glycocluster in Abschnitt 3.3.1 und DNA-Cluster in Abschnitt 3.2.2).

Die Bindung eines individuellen Lectins an ein Glycan (monovalente Bindung) ist relativ schwach, die Dissoziationskonstanten K_D liegen typischerweise im millimolaren Bereich. Stärkere Wechselwirkungen werden durch Clusterbildung beider Bindungspartner realisiert. Hierzu werden entweder mehrere komplementäre, monovalente funktionelle Gruppen auf wechselwirkenden zellulären Oberflächen präsentiert (multivalente Oberflächen), oder die multivalente Bindung zweier Moleküle wird durch die jeweils mehrfache Präsentation einer funktionellen Gruppe innerhalb eines Moleküls realisiert (multivalente Moleküle).^[186, 187] Ein interessantes Beispiel für den zweiten Fall – die Wechselwirkung eines monomolekularen, multivalenten Rezeptors mit multivalenten Liganden – ist das lösliche bakterielle Adhäsins Choleratoxin (CT), das zur Familie der AB₅-Toxine gehört (Abbildung 20). Es besteht aus einer Toxinuntereinheit, die allein für das Krankheitsbild (Diarrhoe) verantwortlich ist, und fünf Lectinuntereinheiten, die die zelluläre Aufnahme in Enterocyten des Darms ermöglichen. Organisiert in einer pentavalenten Struktur bindet das CT an seinen zellulären Liganden – das Gangliosid GM1 – und wird anschließend endocytotisch aufgenommen. Da bis zu fünf Liganden gleichzeitig an das Choleratoxin binden können, ist dies ein geeignetes Modell, das Design multivalenter Inhibitoren zu untersuchen. In diesem Beispiel sind die adressierbaren Bindungsstellen klar durch ihren Abstand zueinander definiert.

Die Saccharidstruktur des Gangliosids GM1 besteht aus einem Pentasaccharid, wobei die terminalen Galactose- und Sialinsäureeinheiten nahezu vollständig zur Bindungsenergie beitragen.^[190] Ein interessantes Beispiel zum Design der CT-Inhibitoren, das der Bedeutung von Spacerlänge und -flexibilität Rechnung trägt, zeigt eindrucksvoll, wie Inhibitionsssteigerungen erreicht werden können.^[191] Multivalenz wird

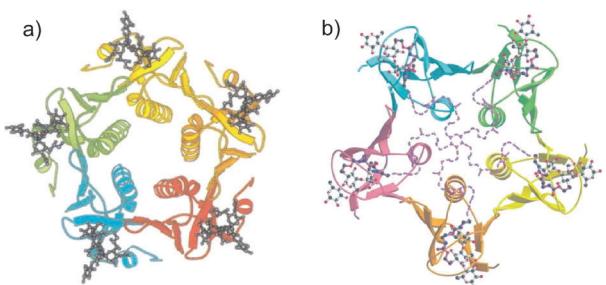


Abbildung 20. a) Kristallstruktur einer pentavalenten Choleratoxin-B-Untereinheit, gebunden an fünf GM1-Pentasaccharide.^[188] b) B₅-Untereinheit eines Shiga-verwandten bakteriellen Toxins, gebunden an einen pentavalenten, sternförmigen, präparativ hergestellten Polysaccharid-inhibitor.^[189] Wiedergabe aus Lit. [189] mit Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd.

hier genutzt, um die Adressierung der einzelnen Lectinbindungsstellen zu ermöglichen. Ein bivalentes GM1-Konjugat erzeugt bereits eine 9500-mal stärkere Inhibitionswirkung (IC_{50}) als monovalentes GM1 (bezogen auf die Zahl der Liganden pro Konjugat immerhin noch 4750-mal stärker). Ein oktavalentes GM1-Konjugat ist sogar 380 000-mal stärker inhibitorisch wirksam, pro Ligand also 47 500-mal aktiver. Außer dem additiven Effekt trägt auch die Aggregation der Choleratoxine durch die multivalente Liganden zur Inhibition bei.^[192]

Wie in diesem Beispiel werden zur Evaluierung von inhibitorisch wirksamen Verbindungen oftmals kompetitive Bindungsassays durchgeführt, die letztlich einen IC_{50} -Wert generieren, also die Konzentration eines Wirkstoffes, der zur halbmaximalen Inhibition eines Proteins/Enzyms führt. Dies zeigt ein generelles Problem vieler biochemischer Messungen auf: Diese Messungen werden an einem definierten Protein-Liganden-Paar durchgeführt, und man erhält somit keine Daten zu Affinitäten oder Bindungskonstanten, sondern zu einer entsprechend definierten Wirkung (in diesem Falle einer Inhibition). Man darf daher IC_{50} -Werte nur innerhalb eines Messsystems untereinander vergleichen und nicht mit Bindungskonstanten (des Inhibitors zum Protein) in Beziehung setzen. Die multivalente Ligandpräsentation führt daher zwar zu niedrigeren IC_{50} -Werten, ein kooperativer Effekt ist aber in der Regel nicht definierbar.

Eine starke Inhibition der CT-GM1-Wechselwirkung gelingt auch, wenn der Inhibitor, anstelle der komplexen Pentasaccharideinheit, schlicht aus Galactoseliganden besteht. Die terminale Galactose des Pentasaccharids ist tief in der Bindungstasche des CT gebunden und kann daher als ein einfacher Minimalligand wirken. Für das Design eines wirksamen Galactose-basierten Inhibitors ist es daher umso wichtiger, dass der Abstand der hydrophilen Bindungstasche zur Proteinoberfläche mit einem hydrophilen PEG-Spacer genau überbrückt wird. So zeigt ein Galactosendendrimer^[193] gegenüber dem GM1-Dendrimer gleichen Aufbaus zwar eine deutlich geringere inhibitorische Potenz, die nicht einmal den Wert des monomeren Gangliosids GM1 erreicht, unterstreicht aber dennoch in seiner Wirkungsweise das generelle Konzept einer Bindungsverstärkung durch multivalente Ligandenpräsentation.

Ein weiteres gut untersuchtes Beispiel starker Lectin-Glycan-Wechselwirkungen zwischen polyvalenten Oberflächen ist das der Selectine und ihrer Glycanliganden. Bei dieser Zell-Zell-Wechselwirkung leiten die auf beiden Oberflächen präsentierten Selectine und Liganden die Adhäsion von Leukozyten aus dem Blut an das Gefäßendothel ein, was zur Auswanderung der Leukozyten in entzündetes Gewebe führt (Abbildung 21). In pathophysiologischen Situationen ist diese Auswanderung dereguliert, und die massive Infiltration von Leukozyten verstärkt die Entzündungsreaktion durch vermehrten Gewebeschaden.

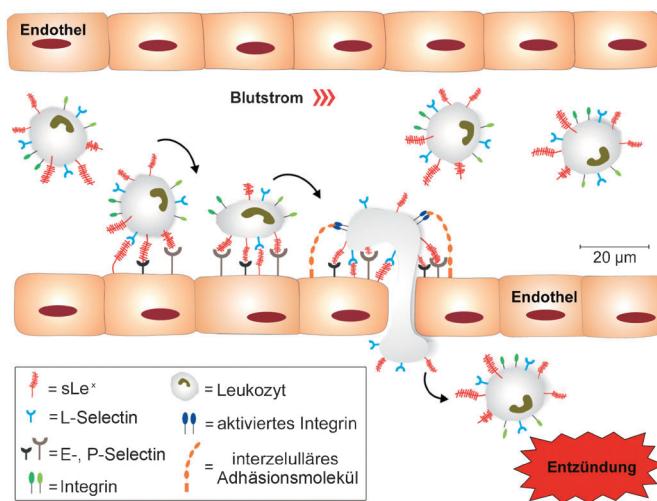


Abbildung 21. Die Selectin-Ligand-Wechselwirkung rekrutiert Leukozyten an das Gefäßendothel und ermöglicht damit ihre Adhäsion. Den Entzündungsmediatoren folgend, wandern die Leukozyten aus den Blutgefäßen aus, hin zum Entzündungsherd.

Die Selectine sind C-Typ-Lectine, die Calcium-abhängig ihre physiologischen Liganden binden. Das leukozytäre L-Selectin und die auf dem Endothel präsentierten E- und P-Selectine erkennen alle den Tetrasaccharidliganden Sialyl-Lewis^x (sLe^x; Abbildung 22), der von membranständigen Proteinen oder Lipiden auf beiden wechselwirkenden zellulären Oberflächen präsentiert wird (Abbildung 21). Zusätzliche Sulfatierung der Liganden ist eine Modifikation, die die Bindung an L- und P-Selectin verstärkt. Die monovalente Selectin-sLe^x-Wechselwirkung ist schwach und weist einen K_D -Wert im mm-Bereich auf. In einem reduktionistischen Ansatz konnte die Leitstruktur sLe^x sukzessive vereinfacht werden, und es wurden über Partialstrukturen sogar sLe^x-Mimetika mit nur noch einer Glycanstruktur (Fucose, Galactose, Sialinsäure und andere) generiert. Auch wenn diese monovalenten Bausteine schlechtere Affinitäten zu den Selectinen zeigten, konnte ihre Aktivität doch durch ihre n -valente Präsentation drastisch gesteigert werden. Bisher wurden hier relativ niedervalente Systeme ($n < 10$) untersucht;^[194–196] von großer Bedeutung sind dementsprechend Untersuchungen an polyvalenten Systemen, die durch einen flächigen Charakter (ähnlich dem Klettverschluss) helfen können, diese Wechselwirkung zu verstärken. Solche polyvalenten Selectininhibitory könnten die Bildung konformer Zell-

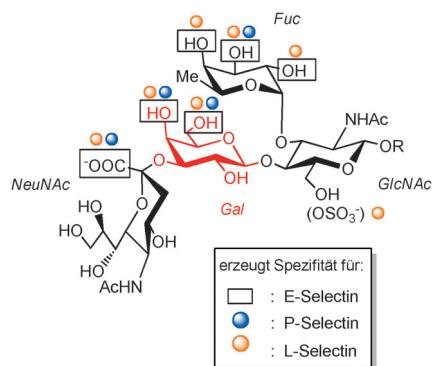


Abbildung 22. Struktur des Sialyl-Lewis^x-Liganden (sLe^x) und seine Selectin-spezifischen Erkennungsfunktionen.

kontakte weit effizienter verhindern und sollten deshalb geeignet sein, die Entzündung zu dämpfen.^[197,198]

Thoma et al. konnten zeigen, dass lineare Polylysin-Polymeren konjugiert mit einem sLe^x-Analogon die E-Selectin-vermittelte Zell-Zell-Wechselwirkung unter physiologischen Flußbedingungen drastisch verringern können.^[199] Während der monovalente Ligand einen IC₅₀-Wert von 30–40 µm aufweist, erreicht ein funktionalisiertes Polymer mit 420 Liganden einen IC₅₀-Wert von 50 nm bezogen auf die Ligandkonzentration am Polymer. Somit steigert sich allein durch die multivalente Präsentation des E-Selectin-Liganden die inhibitorische Wirkung eines einzelnen Liganden um den Faktor 700. Die Autoren konnten weiter zeigen, dass die Größe und der Grad der Funktionalisierung des Polymers entscheidend für die Inhibitionswirkung sind und zu hohe Beladungsdichten zur sterischen Hinderung der Bindung führen.

In Arbeiten zur Selectininhibition mit funktionalisierten dendritischen Glycopolymeren (Abbildung 23) konnten Papp et al. mit einem kompetitiven SPR-basierten Messsystem

nachweisen, dass Galactose als minimaler Selectinligand wirkt, sofern er in ausreichender Konzentration verfügbar ist.^[200] Gegenüber einer tetravalenten Architektur (IC₅₀ = 240 µm) bewirkt ein dendritisches Polyglycerol-Glycan-Konjugat mit 35 Galactoseeinheiten eine rund 100-fache Verstärkung der L-Selectin-Ligand-Inhibition bezogen auf eine einzelne Galactoseeinheit (IC₅₀ = 2.45 µm). Das zusätzliche Einbringen von Sulfatgruppen in das Galactosekonjugat verstärkt die Inhibition weiterhin um den Faktor 70, und es wurde ein IC₅₀-Wert von 35 nm erreicht. Dieser klare Nachweis eines Multivalenzeffekts kann durch starre Gerüstarchitekturen noch deutlich verbessert werden (siehe unten).

In Analogie zu den sulfatierten multivalenten Glycokonjugaten konnte mit dendritischem Polyglycerinsulfat (dPGS) eine hochaktive anti-inflammatorische Verbindung identifiziert werden, die im nanomolaren Bereich an L- und P-Selectine sowie andere Entzündungsmediatoren bindet (siehe Abschnitt 4.3).^[72,201,202]

Auch wenn auf einem sphärischen oder flächigen Polymer die Präsentation der Liganden nicht mehr rational auf die komplementäre Rezeptorpositionierung abgestimmt, sondern eher statistisch verteilt ist (siehe Abschnitt 3.1), resultiert eine signifikante Inhibition verstärkung, die nun mithilfe theoretischer Methoden in Einklang mit der Bindungskinetik (z.B. der Möglichkeit zur vermehrten Rückbindung der Liganden) und Thermodynamik gebracht werden kann.

Außer den flächigen polyvalenten Wechselwirkungen von Nanopartikeln mit planaren Materialien, wie sie in Abschnitt 4.1 beschrieben wurden, sind auch Nanopartikel-Wechselwirkungen mit biologischen Oberflächen von großer Bedeutung, vor allem für die Bildgebung und Diagnostik. Bei Herstellung, Stabilisierung und Anwendungen von anorganischen Nanopartikeln spielen multivalente Nanopartikel in doppelter Hinsicht eine wichtige Rolle: Zum einen können durch die multivalente Bindung von organischen Liganden an Nanopartikeln die Festigkeit der Nanopartikel-Ligand-Bindung und somit die Stabilität erheblich gegenüber den entsprechenden Werten für andere Reagentien gesteigert werden. Gleichzeitig kann die durch mangelnde sterische oder elektrostatische Stabilisierung bedingte Aggregation in Dispersion deutlich verhindert werden. Andererseits sind mit organischen Liganden funktionalisierte Nanopartikel selbst ein multivalentes System, wenn die endständigen Reste der Liganden funktionelle Gruppen tragen. Die Vorteile nanopartikulärer Systeme bestehen darin, dass auf einem solchen Träger viele funktionelle Gruppen auf engem Raum lokalisiert sind und damit multivalente Verstärkungseffekte möglich werden. Zugleich sind aber, im Unterschied zu ausgedehnten, multivalent funktionalisierten Oberflächen auf Substraten, nanopartikuläre Träger in Dispersion mobil. Darüber hinaus können Form, Größe und physikalische Eigenschaften dieser Partikel gezielt eingestellt werden, und durch Wahl eines geeigneten Kerns lässt sich die multivalente Präsentation funktioneller Gruppen mit Eigenschaften wie Fluoreszenz oder Magnetismus koppeln.^[203] Diese einzigartigen Kombinationsmöglichkeiten machen multivalent funktionalisierte Nanopartikel zu vielversprechenden Systemen für zahlreiche Anwendungen in den Lebenswissenschaften. Ein Beispiel hierfür sind die 2001 von Penades und Mitar-

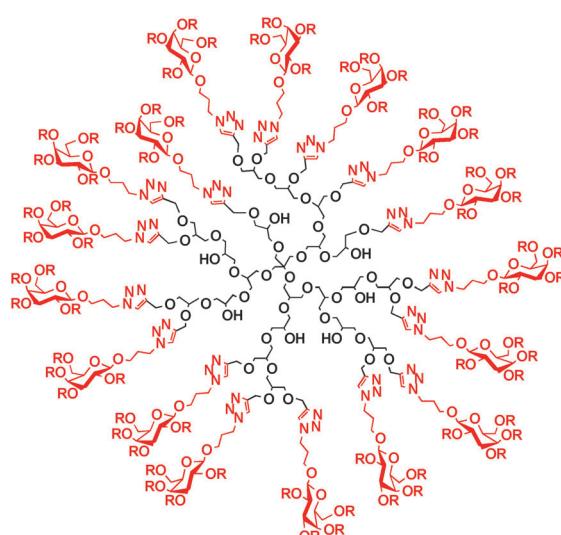


Abbildung 23. Struktur eines dendritischen Galactosekonjugats mit starker L-Selectin-Bindung; IC₅₀ = 2.45 µm (R = H) und 35 nm (R = SO₃Na).

beiteren entwickelten Glyconanopartikel, mit Kohlenhydraten funktionalisierte Gold-, Silber- und Halbleiternanopartikel.^[204,205] Glyconanopartikel sind ein vielfältig einstellbares biomimetisches Modell für die Präsentation von Kohlenhydraten auf Zelloberflächen und wurden zur Untersuchung von Kohlenhydrat-Kohlenhydrat- und Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen genutzt.^[205–207] Darüber hinaus fanden sie bereits Anwendung als Biomarker und Biosensoren, z. B. zur Detektion von Concavalin A und *Escherichia coli*^[208] sowie in der Biomedizin und den Materialwissenschaften.^[205] Dernedde et al. konnten zeigen, dass durch die multivalente Präsentation von Selectinen auf Goldnanopartikeln der IC_{50} -Wert der Selectine gegenüber dem der freien Selectine vom mikromolaren in den picomolaren Bereich optimiert werden kann.^[209] Ebenso lassen sich mit der Immobilisierung von sulfatierten Kohlenhydratmimetika auf Goldnanopartikeln (Abbildung 24) eine weitere Steigerung der Bindungsaffinität und vor allem eine weit höhere Selektivität für P- gegenüber L-Selectinen erreichen.^[210,211]

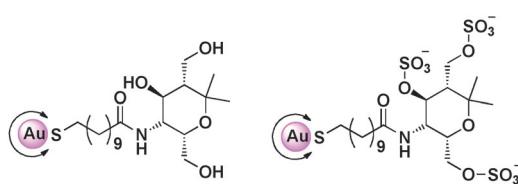


Abbildung 24. Auf Goldnanopartikeln immobilisierte Kohlenhydratmimetika mit Bindungsaffinitäten im nano- (links) bzw. picomolaren (rechts) Bereich sowie gute P- Selectinselektivität.

Während die monovalenten Liganden keine Bindungsaffinitäten zeigen, ergibt sich mit dem multivalenteren, an Goldkolloide gebundenen Liganden ein IC_{50} -Wert von 10 nm für P-Selectin. Das entsprechende sulfatierte System ist nicht nur wesentlich stabiler, sondern es bindet auch sehr viel stärker an P-Selectin ($IC_{50} = 0.04$ nm), etwas schwächer an L-Selectin ($IC_{50} = 0.35$ nm). Zahlreiche Anwendungen in den Lebenswissenschaften erfordern Nanopartikel, die auch unter physiologischen Bedingungen, d. h. mit relativ hohem Salzgehalt und bei Temperaturen um 37 °C, dauerhaft stabil sind. Um diesen Anforderungen zu genügen, müssen die zur kinetischen Stabilisierung der Partikel erforderlichen organischen Liganden fest an die Partikel gebunden sein. Dazu sind monovalente Bindungen oft nicht ausreichend, da zwischen Partikel-gebundenen und freien Liganden ein chemisches Gleichgewicht besteht. Durch die Wahl eines stabileren bindenden multivalenteren Liganden kann dieses Gleichgewicht stark in Richtung der Partikel-gebundenen Moleküle verschoben werden. Somit werden Partikel erhalten, die den erhöhten Anforderungen entsprechen können. Gubala et al. zeigten, dass durch Verwendung multivalenter Dendronliganden anstelle monovalenter Moleküle die kolloidale Stabilität von Nanopartikeln drastisch gesteigert werden kann. Durch eine stabilere, multivalente Bindung der zur Detektion im Immunassay notwendigen Antikörper auf der Nanopartikeloberfläche kann dabei darüber hinaus die Detektionsgrenze des Assays erheblich gesenkt werden.^[212]

Da Nanopartikel hinsichtlich ihrer Größe und Form sowie der chemischen Beschaffenheit ihrer Oberfläche definiert eingestellt und mit vielen experimentellen Methoden einfach experimentell detektiert werden können (siehe Abschnitt 2.5), sind sie ein vielversprechendes Modellsystem für die systematische Untersuchung multivalenter Bindungseffekte. Boal und Rotello zeigten, dass die multivalente Erkennung von Gastmolekülen mit dem radialen Abstand von der Partikeloberfläche abnimmt, und konnten so belegen, dass es durch flexiblere multivalente Bindungsstellen zu einer Abnahme multivalenter Erkennung kommt.^[213] Zhang et al. demonstrierten in systematischen Studien am Beispiel von mit Thiolliganden stabilisierten Goldpartikeln, dass durch multivalente Bindung die kolloidale Stabilität erhöht wird.^[67]

Ein weiteres aktuelles Beispiel sind Sialinsäure-funktionalisierte Goldnanopartikel (Abbildung 25 a), die eine starke Bindung an Influenzaviren zeigten. Bei kleinen (ca. 2 nm Durchmesser) Goldnanopartikeln gelang mithilfe von Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) die Visualisierung des einfachen Anhaftens.^[80] Hierbei konnten die Partikel als kleine schwarze Punkte auf der Virushülle beobachtet werden. Bei der Verwendung großer Goldkolloide konnten

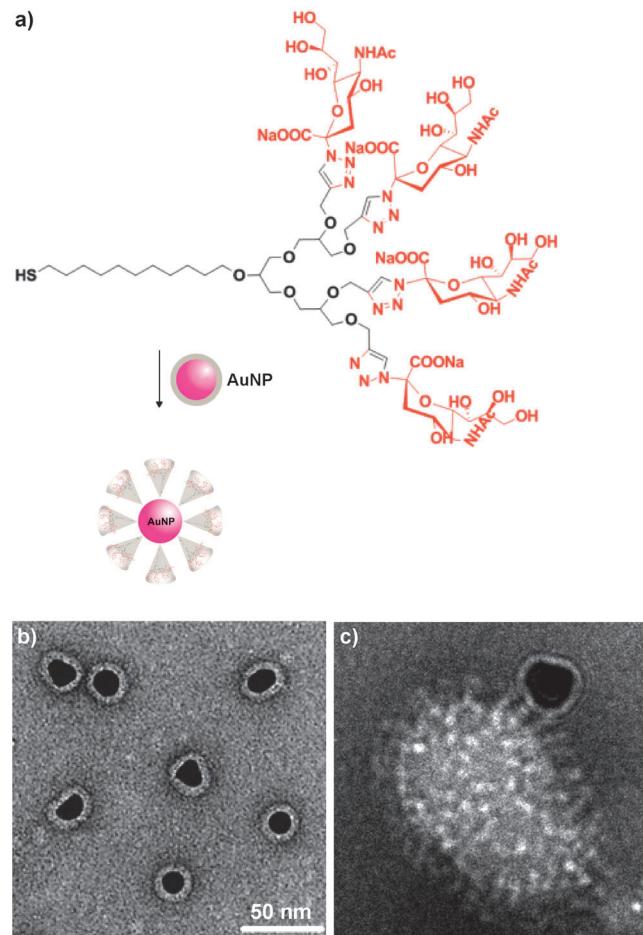


Abbildung 25. a) Synthese der Sialinsäure-funktionalisierten Goldnanopartikel (AuNPs); b) elektronenmikroskopische Visualisierung von 14 nm großen AuNPs; c) Kryo-TEM-Aufnahmen von AuNP-Virion-Komplexen ermöglichen erstmals die Visualisierung einzelner multivalenter Bindungen.

erstmals einzelne multivalente Bindungen visualisiert werden (Abbildung 25c). Überraschenderweise zeigte das zweidimensionale Bild lediglich drei effektive Bindungen (räumlich sind drei bis fünf Bindungen möglich). Dieser Befund macht weiterhin deutlich, dass sphärische multivalente Nanopartikel, die nicht deformierbar sind, für flächige polyvalente Wechselwirkungen ungeeignet sind, da wegen der konvexen Oberfläche nur wenige effektive Bindungspunkte zustande kommen.

Außer der Partikelkrümmung von anorganischen Nanopartikeln limitiert auch die begrenzte Größe der bislang verwendeten Polymerpartikel die multivalente Bindungsverstärkung. Die Hämagglutininrezeptor-Verteilung auf der Virusoberfläche lässt für niedervalente Systeme keine effiziente Wechselwirkung mit mehreren trivalenten Rezeptoren zu (siehe Abschnitt 4.3).

Statistische Polymere (Abschnitt 3.1), wie das lineare Polyacrylamid-Sialinsäure-Konjugat mit hohem Molekulargewicht (10^6 Da), zeigten eine bis zu 10^8 -fache Steigerung der Bindungsaaffinität und Blockade der Zelladhäsion durch flächige Wechselwirkungen. Wegen des hohen Molekulargewichts des Polymers und der damit verbundenen langen Verweildauer im Körper ist die In-vivo-Applikation aber unrealistisch. Nichtsdestoweniger wurde die hohe Effektivität dieser linearen Polymere in vitro nachgewiesen.^[86,214] Zusätzlich zu seiner äußerst affinen Bindung kann es die Viruspartikel sterisch abschirmen, wenn es in Kombination mit anderen monovalenten Liganden verwendet wird.^[215]

Ein neuartiger Ansatz sind dendritisch aufgebaute Nanogele mit gleicher Dimension, wie Influenzaviren, um kompetitive flächige Wechselwirkungen eingehen zu können (Abbildung 26). In grundlegenden Arbeiten konnten neuartige biokompatible und bioabbaubare Nanogele auf Polyglycerinbasis (20–100 nm) entwickelt werden, die durch ein einfaches modulares Funktionalisierungsverfahren auf ihrer Oberfläche mit geeigneten Sialinsäureliganden ausgestattet werden können.^[216,217] Hierbei konnten erstmals starke Wechselwirkungen zwischen den Sialinsäure-funktionalisierten Nanogelen und den Hämagglutininrezeptoren auf Influenzaviren erreicht und die zelluläre Infektion bis zu 80% inhibiert werden.^[218] Interessanterweise waren dabei niedrigfunktionalisierte Nanogele besser als hochfunktionalisierte, was an der möglichen sterischen Überfrachtung der letztgenannten liegen könnte. Diese polyvalenten Nanogele können mittlerweile auch bioabbaubar hergestellt werden^[217] und lassen auf zukünftige, noch wirksamere Therapieansätze hoffen.

4.3. Perspektiven für multivalente Wirkstoffe

Trotz langjähriger, grundlegender Forschungsarbeiten zu multivalenten Wirkstoffen hat sich bislang noch kein großes Pharmaunternehmen ernsthaft mit dem großen Potenzial multivalenter Wechselwirkungen befasst. Der Grund dafür dürfte in der starken Fokussierung auf zunächst niedermolekulare Verbindungen („small molecules“) und mittlerweile „biologicals“ liegen. Das junge Gebiet der polymeren Therapeutika wird daher eher von innovativen kleinen und

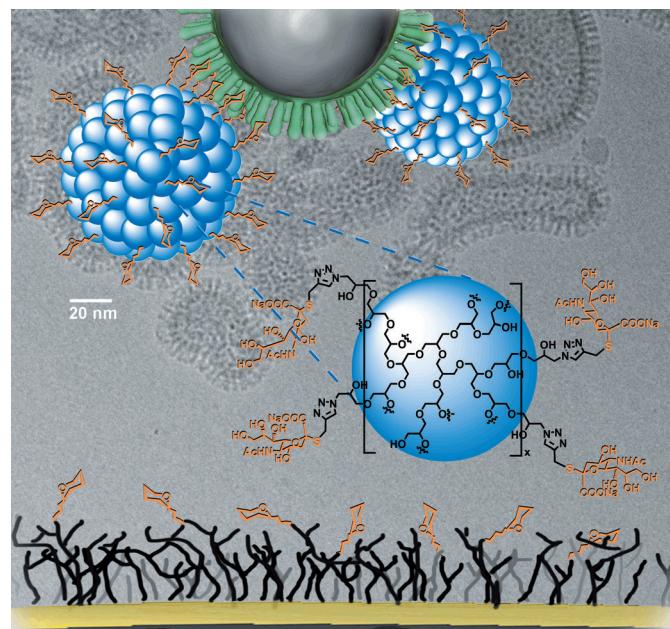


Abbildung 26. Multivalente Wechselwirkung von Sialinsäure-funktionalisierten Polyglycerolnanogelen mit Hämagglutininrezeptoren der Virusoberfläche. Durch die effiziente Konkurrenz zwischen dem Nanogel und den auf der Zelloberfläche präsentierten Glycanstrukturen wie sLe^x werden die virale Bindung und damit die zelluläre Infektion durch Influenzaviren um bis zu 80% reduziert.

mittleren Unternehmen aufgegriffen. Für multivalente Wirkstoffe soll dies an zwei Beispielen erläutert werden.

In Analogie zu sulfatierten multivalenten Glykokonjugaten (siehe Abschnitt 4.2, Abbildung 23) gelang es, eine verzweigte Heparin-analoge Struktur zu synthetisieren.^[201] Dabei konnte mit dem dendritischen Polyglycerinsulfat (dPGS; Abbildung 27) eine hochaktive anti-inflammatorische Verbindung aufgefunden werden, die im nanomolaren Bereich an L- und P-Selectine sowie andere Entzündungsmediatoren bindet und auch in vivo im Mausmodell der Kontaktdermatitis ähnlich effektiv wie das kommerzielle Glucocorticoid Prednisolon wirkt.^[72] Die Vorteile von dPGS sind seine einfache Zugänglichkeit im Großmaßstab und die Möglichkeit der Konjugation von Effektormolekülen, z.B. von Farb- und Wirkstoffen.^[219]

Auch im antiviralen Bereich gibt es seit einigen Jahren eine erste klinische Entwicklung von multivalenten Wirkstoffen, so beispielsweise ein multivalentes Mikrobioid. ViavaGel wurde als topisches Vaginalgel entwickelt, das die Übertragung von HIV verhindern oder reduzieren kann. Das sulfonierte dendritische Gerüst wird gegenwärtig in einer klinischen Phase-II-Studie getestet.^[220] Allerdings ist die bislang limitierte Größe der eingesetzten Dendrimere niedriger Generation (< 10 nm) verglichen mit der Verteilung der Hämagglutininrezeptor-Stellen auf der Virusoberfläche noch eine Haupteinschränkung für effiziente multivalente Wechselwirkungen (Abbildung 28). Hierbei muss natürlich grundsätzlich auch die Ausscheidung solcher polymeren Wirkstoffe über die Niere mit einer Grenze von ca. 40 kDa berücksichtigt werden, was die Größe nichtabbaubarer Systeme deutlich einschränkt.

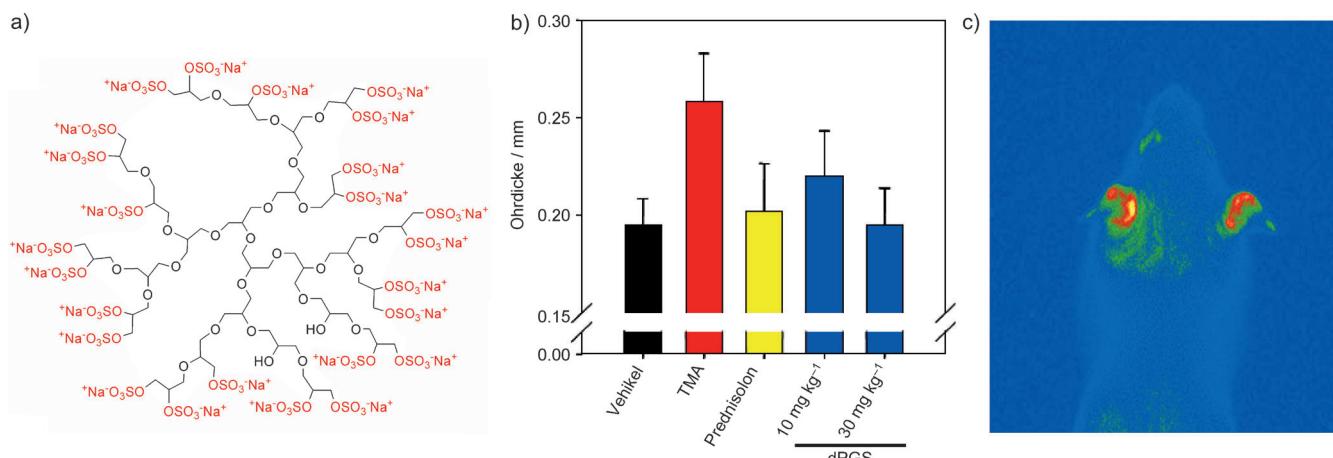


Abbildung 27. a) Struktur von dPGS; b) therapeutische Studie im Mausmodell der Kontaktdermatitis: Ohrschwellung nach Reizung durch Trimelinsäureanhydrid (TMA), dPGS (blaue Balken) im Vergleich zum kommerziellen Prednisolon (Dosis: 30 mg kg^{-1} , gelber Balken); c) entzündungsselektive Fluoreszenzdiagnostik mit dPGS-Farbstoffkonjugat.

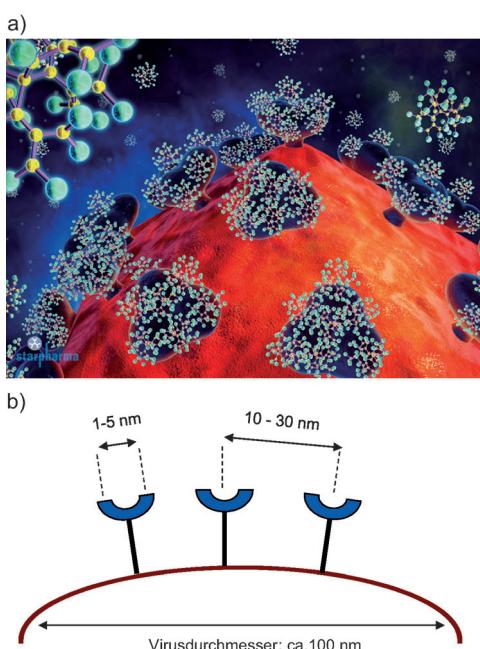


Abbildung 28. a) Größenverhältnis zwischen einem HI-Viruspartikel mit seinen trivalenten Oberflächenrezeptoren und dem dendritischen Wirkstoffkonjugat (VivaGel, mit freundlicher Genehmigung von Starpharma) und b) die schematischen Längenverhältnisse für Hämaggutininrezeptoren auf der Virusoberfläche.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Seit der wegweisenden Übersicht von Whitesides et al.^[1] vor 14 Jahren an dieser Stelle über biologisch relevante multivalente Systeme wurde das Phänomen Multivalenz an vielfältigen neuen Systemen intensiv untersucht. Außer weiteren biologischen Targets erobert die Multivalenz auch zunehmend den Bereich artifizieller Systeme, z.B. die supramolekulare Chemie und die Materialwissenschaften.

Theoretische Arbeiten greifen die experimentellen Befunde auf und ermöglichen ein tieferes Verständnis der

Multivalenz. Allerdings gibt es noch wenige prädiktive Arbeiten, die zuverlässige Vorausplanungen – im chemischen Sinne – erlauben. Für ein besseres Verständnis der Multivalenz sind daher vor allem systematische Studien an Modellen und komplexeren Systemen notwendig. Nur so können die theoretischen Grundlagen weiter ausgebaut werden. Hierbei ist besonders eine gemeinsame Betrachtung von Kinetik und Thermodynamik sowie von statistischen Effekten wichtig.

Multivalente Liganden bieten durch die enorme Bindungsverstärkung mit rigiden, definierten Spacern klare Vorteile gegenüber monovalenten Liganden, und dies wird konzeptionell in Zukunft zunehmend auf pharmazeutisch relevante Targets angewendet werden. Weiterhin ermöglicht die „Programmierbarkeit“ rigider Spacers, also das fixe Einstellen des Abstandes zwischen zwei Liganden, die passgenaue Abschätzung der Abstände zwischen multivalenten Bindungsstellen, z.B. in Proteinkomplexen. Besonders in heteromultivalenten Systemen können orthogonale Bindungsstellen eingebaut werden, sodass durch Selbstsortierung definierte, programmierte Überstrukturen erhalten werden.

Die exakte Positionierung multivalenter Liganden auf definierten biologischen Gerüsten, wie Proteinen und DNA, wird zukünftig eine noch größere Rolle spielen. Auch im Bereich polyvalenter Systeme mit flächigen Wechselwirkungen hat es in den letzten Jahren zahlreiche Durchbrüche gegeben. Beispielsweise ist es durch die Synthese gezielt hergestellter, multifunktionaler Nano- und Mikrogele gelungen, maßgeschneiderte Wechselwirkungen mit viralen Systemen zu erreichen. Besonders vielversprechend sind hierbei Architekturen mit ähnlicher Größe, wie sie auch im biologischen System vorhanden sind. Allerdings ist die Wechselwirkung wegen der nur schmalen Kontaktfläche zwischen kugelförmigen Partikeln (siehe Abbildung 25c) noch limitiert. Zur Optimierung der flächigen Wechselwirkung sind in der Zukunft vor allem multivalente Gerüstarchitekturen mit nicht-sphärischer Geometrie von großer Bedeutung.

Für den In-vivo-Einsatz polyvalenter Systeme an biologischen Grenzflächen (z.B. Viren und Bakterien) sind vor allem bioabbaubare multivalente Nanopartikel von großer

Bedeutung. Die Ausscheidungsorgane (Niere, Milz, Leber) setzen hier jedoch enge Grenzen hinsichtlich der Partikelgröße.

Im Bereich der multivalennten Wirkstoffe zeichnen sich erste Erfolge in klinischen Studien ab; allerdings sind solche neuen Wirkstoffkonzepte nur mit einem Umdenken der Pharmaindustrie möglich. Nach einem starken Fokus auf „small molecules“ und mittlerweile auch „biologicals“ bieten polymere Therapeutika und insbesondere multi- und polyvalente Wirkstoffe ein großes Potenzial für die Zukunft.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 765 sowie allen beteiligten Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern für ihre wissenschaftlichen Beiträge.

Eingegangen am 9. Februar 2012

Online veröffentlicht am 5. September 2012

multivalenter Bindung liegt positive Kooperativität aber erst dann vor, wenn die Bindungsenergie für n -valente Bindung größer ist als das n -Fache der monovalenten Bindung. Multivalente Bindungen zeigen im Gegenteil in der Regel negative Kooperativität (siehe Lit. [34]). Dies wiederum schränkt aber nicht den enormen Vorteil der Bindungsverstärkung zweier multivalenter Objekte an sich ein.

- [19] D. J. Diestler, E. W. Knapp, *Phys. Rev. Lett.* **2008**, *100*, 178101.
- [20] G. Schwarzenbach, *Helv. Chim. Acta* **1952**, *35*, 2344–2363.
- [21] O. Andersen, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2683–2710.
- [22] J. D. Dunitz, *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 709–712.
- [23] W. E. Stites, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1233–1250.
- [24] R. H. Kramer, J. W. Karpen, *Nature* **1998**, *395*, 710–713.
- [25] W. Kuhn, *Kolloid-Z.* **1934**, *68*, 2–15.
- [26] M. A. Winnik, *Chem. Rev.* **1981**, *81*, 491–524.
- [27] J. M. Gargano, T. Ngo, J. Y. Kim, D. W. Acheson, W. J. Lees, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12909–12910.
- [28] E. T. Mack, P. W. Snyder, R. Perez-Castillejos, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 11701–11715.
- [29] S. Knecht, D. Ricklin, A. N. Eberle, B. Ernst, *J. Mol. Recognit.* **2009**, *22*, 270–279.
- [30] F. Noe, C. Schütte, E. Vanden-Eijnden, L. Reich, T. R. Weikl, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 19011–19016.
- [31] J. D. Chodera, W. C. Swope, J. W. Pitera, K. A. Dill, *Multiscale Model. Simul.* **2006**, *5*, 1214–1226.
- [32] W. C. Swope, J. W. Pitera, F. Suits, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 6571–6581.
- [33] E. Vanden-Eijnden, M. Venturoli, *J. Chem. Phys.* **2009**, *130*, 194101.
- [34] M. Weber, S. Kube, *Int. Conf. on Num. Analy. and Appl. Math.*, Vol. 1048 (Hrsg.: T. E. Simos, G. Psihogios, C. Tsitouras), AIP Conference Proceedings, American Institute of Physics, New York, **2008**, S. 593–596.
- [35] M. Weber, Habilitation, Freie Universität Berlin, **2011**.
- [36] C. A. Hunter, H. L. Anderson, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7624–7636; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7488–7499.
- [37] G. Ercolani, L. Schiaffino, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 1800–1807; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1762–1768.
- [38] K. N. W. Jiang, N. L. Löw, E. V. Dzyuba, F. Klautzsch, A. Schäfer, J. Huuskonen, K. Rissanen, C. A. Schalley, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 1860–1868.
- [39] E. Chekmeneva, C. A. Hunter, M. J. Packer, S. M. Turega, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 17718–17725.
- [40] C. A. Hunter, M. C. Misuraca, S. M. Turega, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 582–594.
- [41] M. C. Misuraca, T. Grecu, Z. Freixa, V. Garavini, C. A. Hunter, P. W. van Leeuwen, M. D. Segarra-Maset, S. M. Turega, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 2723–2732.
- [42] H. J. Hogben, J. K. Sprafke, M. Hoffmann, M. Pawlicki, H. L. Anderson, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 20962–20969.
- [43] J. K. Sprafke, B. Odell, T. D. Claridge, H. L. Anderson, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 5687–5690; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 5572–5575.
- [44] C. A. Hunter, M. C. Misuraca, S. M. Turega, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 582–594.
- [45] C. A. Hunter, M. C. Misuraca, S. M. Turega, *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 589–601.
- [46] P. J. Flory, *Proc. R. Soc. London Ser. A* **1956**, *234*, 60–73.
- [47] G. J. Fleer, *Colloid Surf.* **1989**, *35*, 151–167.
- [48] C. D. Eads, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 6653–6661.
- [49] D. G. Covell, R. L. Jernigan, *Biochemistry* **1990**, *29*, 3287–3294.
- [50] D. S. Rykunov, B. A. Reva, A. V. Finkelstein, *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* **1995**, *22*, 100–109.
- [51] T. Schlick, *Molecular Modeling and Simulation: An Interdisciplinary Guide*, Vol. 21, 2. Aufl., Springer, Berlin, **2002**.
- [52] W. Göpel, H.-D. Wiemhöfer, *Statistische Thermodynamik*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2000**.

- [53] M. E. Tuckerman, *Statistical Mechanics: Theory and Molecular Simulation*, Oxford University Press, Oxford, **2010**.
- [54] W. Fischer, M. Calderon, A. Schulz, I. Andreou, M. Weber, R. Haag, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 1744–1752.
- [55] A. Bujotzek, M. Shan, R. Haag, M. Weber, *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2011**, *25*, 253–262.
- [56] C. Chipot, A. Pohorille, *Free Energy Calculations: Theory and Applications in Chemistry and Biology*, Springer, Berlin, **2007**.
- [57] W. H. C. Schütte in *Handbook of Numerical Analysis, Special Volume Computational Chemistry*, Vol. 10 (Hrsg.: P. G. Ciarlet), Elsevier Science & Technology, Amsterdam, **2003**, S. 1032.
- [58] P. S. Deuflhard in *Applied Mathematics Entering the 21st Century, Invited Talks from the ICIAM 2003 Congress*, Vol. 116 (Hrsg.: R. Moore, J. M. Hill), Proceedings in Applied Mathematics, Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia, **2004**, S. 91–120.
- [59] A. W. Bujotzek, M. Weber, *J. Bioinf. Comput. Biol.* **2009**, *7*, 811–831.
- [60] A. Robinson, J. M. Fang, P. T. Chou, K. W. Liao, R. M. Chu, S. J. Lee, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1899–1905.
- [61] M. Gavutis, S. Lata, J. Piehler, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 2091–2103.
- [62] H. Jung, A. D. Robison, P. S. Cremer, *J. Struct. Biol.* **2009**, *168*, 90–94.
- [63] L. Yu, M. Huang, P. G. Wang, X. Zeng, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 8979–8986.
- [64] N. J. de Mol, F. J. Dekker, I. Broutin, M. J. E. Fischer, R. M. J. Liskamp, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 753–763.
- [65] F. P. Schmidtchen in *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry* (Hrsg.: C. A. Schalley), Wiley-VCH, Weinheim, **2007**, S. 55–78.
- [66] H. Handa, S. Gurgczynski, M. P. Jackson, G. Z. Mao, *Langmuir* **2010**, *26*, 12095–12103.
- [67] S. S. Zhang, G. Leem, L. O. Srisombat, T. R. Lee, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 113–120.
- [68] C. Scheibe, A. Bujotzek, J. Dernedde, M. Weber, O. Seitz, *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 770–775.
- [69] P. G. A. Janssen, N. J. M. Brankaert, X. Vila, A. Schenning, *Soft Matter* **2010**, *6*, 1494–1502.
- [70] M. Pittelkow, C. B. Nielsen, A. C. Broeren, J. L. J. van Dongen, M. H. P. van Genderen, E. W. Meijer, J. B. Christensen, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 5126–5135.
- [71] O. Nahshol, V. Bronner, A. Notcovich, L. Rubrecht, D. Laune, T. Bravman, *Anal. Biochem.* **2008**, *383*, 52–60.
- [72] J. Dernedde, A. Rausch, M. Weinhart, S. Enders, R. Tauber, K. Licha, M. Schirner, U. Zugel, A. von Bonin, R. Haag, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 19679–19684.
- [73] Y. Cohen, L. Avram, T. Evan-Salem, L. Frish, *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry* (Hrsg.: C. A. Schalley), Wiley-VCH, Weinheim, **2007**, S. 163–219.
- [74] K. Hirose in *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry* (Hrsg.: C. A. Schalley), Wiley-VCH, Weinheim, **2007**, S. 17–54.
- [75] T. Evan-Salem, I. Baruch, L. Avram, Y. Cohen, L. C. Palmer, J. Rebek, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 12296–12300.
- [76] P. Braun, B. Nägele, V. Wittmann, M. Drescher, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 8579–8582; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8428–8431.
- [77] J. Voskuhl, M. C. A. Stuart, B. J. Ravoo, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 2790–2796.
- [78] W. Jiang, K. Nowosinski, N. L. Löw, E. V. Dzyuba, F. Klautzsch, A. Schäfer, J. Huuskonen, K. Rissanen, C. A. Schalley, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 1860–1868.
- [79] Y. H. Zhang, Y. Yu, Z. H. Jiang, H. P. Xu, Z. Q. Wang, X. Zhang, M. Oda, T. Ishizuka, D. L. Jiang, L. F. Chi, H. Fuchs, *Langmuir* **2009**, *25*, 6627–6632.
- [80] I. Papp, C. Sieben, K. Ludwig, M. Roskamp, C. Böttcher, S. Schlecht, A. Herrmann, R. Haag, *Small* **2010**, *6*, 2900–2906.
- [81] K. Niikura, K. Nagakawa, N. Ohtake, T. Suzuki, Y. Matsuo, H. Sawa, K. Ijiro, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 1848–1852.
- [82] H. A. Gussin, I. D. Tomlinson, N. J. Muni, D. M. Little, H. H. Qian, S. J. Rosenthal, D. R. Pepperberg, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 1455–1464.
- [83] J. J. Shi, T. L. Yang, S. Kataoka, Y. J. Zhang, A. J. Diaz, P. S. Cremer, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5954–5961.
- [84] J. Rao, J. Lahiri, L. Isaacs, R. M. Weis, G. M. Whitesides, *Science* **1998**, *280*, 708–711.
- [85] G. B. Sigal, M. Mammen, G. Dahmann, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3789–3800.
- [86] S. K. Choi, M. Mammen, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 4103–4111.
- [87] Siehe Lit. [3].
- [88] K. Wu, J. Liu, R. N. Johnson, J. Yang, J. Kopeček, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 1493–1497; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1451–1455.
- [89] R. Narain, *Engineered carbohydrate-based materials for biomedical applications: polymers, surfaces, dendrimers, nanoparticles, and hydrogels*, Wiley, Hoboken, **2011**.
- [90] L. Rögl, E. H. M. Lempens, E. W. Meijer, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 106–117; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 102–112.
- [91] *Glycoscience and Microbial Adhesion*, Vol. 288 (Hrsg.: T. K. Lindhorst, S. Oscarson), Springer, Berlin, **2009**.
- [92] J. J. Landers, Z. Y. Cao, I. Lee, L. T. Piehler, P. P. Myc, A. Myc, T. Hamouda, A. T. Galecki, J. R. Baker, *J. Infect. Dis.* **2002**, *186*, 1222–1230.
- [93] M. Cloninger, *Drug Discovery Today* **2004**, *9*, 111–112.
- [94] Z. Poon, S. Chen, A. C. Engler, H. I. Lee, E. Atas, G. von Maltzahn, S. N. Bhatia, P. T. Hammond, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 7424–7428; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 7266–7270.
- [95] D. Zacher, R. Schmid, C. Woll, R. A. Fischer, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 184–208; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 176–199.
- [96] L. Vandromme, H. U. ReiBig, S. Groper, J. P. Rabe, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 2049–2055.
- [97] X. C. Zhou, C. Turchi, D. N. Wang, *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 5031–5040.
- [98] M. H. Park, X. X. Duan, Y. Ofir, B. Creran, D. Patra, X. Y. Ling, J. Huskens, V. M. Rotello, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2010**, *2*, 795–799.
- [99] D. Dorokhin, S. H. Hsu, N. Tomczak, D. N. Reinhoudt, J. Huskens, A. H. Velders, G. J. Vancso, *ACS Nano* **2010**, *4*, 137–142.
- [100] T. A. Klar, T. Franzl, A. L. Rogach, J. Feldmann, *J. Adv. Mater.* **2005**, *17*, 769–773.
- [101] X. Wang, C. J. Summers, Z. L. Wang, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 423–426.
- [102] E. Russ Galian, M. de La Guardia, *TrAC Trends Anal. Chem.* **2009**, *28*, 279–291.
- [103] W. R. Algar, M. Massey, U. J. Krull, *TrAC Trends Anal. Chem.* **2009**, *28*, 292–306.
- [104] P. A. Johnson, R. Levicky, *Langmuir* **2003**, *19*, 10288–10294.
- [105] S. C. Wagner, M. Roskamp, H. Colfen, C. Bottcher, S. Schlecht, B. Koksch, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 46–51.
- [106] R. T. Lee, Y. C. Lee, *Methods Enzymol.* **2003**, *362*, 38–43.
- [107] J. J. Hangeland, J. E. Flesher, S. F. Deamond, Y. C. Lee, O. P. Ts, J. J. Frost, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **1997**, *7*, 141–149.
- [108] J. P. Tam, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 5409–5413.
- [109] G. Thumshirn, U. Hersel, S. L. Goodman, H. Kessler, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 2717–2725.
- [110] P. Niederhafner, J. Šebestík, J. Ježek, *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 2–43.
- [111] P. Niederhafner, J. Šebestík, J. Ježek, *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 44–65.
- [112] H. Kamitakahara, T. Suzuki, N. Nishigori, Y. Suzuki, O. Kanie, C.-H. Wong, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 1607–1611; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1524–1528.

- [113] K. Totani, T. Kubota, T. Kuroda, T. Murata, K. I. Hidari, T. Suzuki, Y. Suzuki, K. Kobayashi, H. Ashida, K. Yamamoto, T. Usui, *Glycobiology* **2003**, *13*, 315–326.
- [114] B. D. Polizzotti, K. L. Kiick, *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 483–490.
- [115] X. Zeng, Y. Nakaaki, T. Murata, T. Usui, *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *383*, 28–37.
- [116] X. Zeng, T. Murata, H. Kawagishi, T. Usui, K. Kobayashi, *Carbohydr. Res.* **1998**, *312*, 209–217.
- [117] a) N. Voyer, J. Lamothe, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 9241–9284; b) N. Voyer, *Top. Curr. Chem.* **1996**, *184*, 1–37.
- [118] C. Unverzagt, S. Kelm, J. C. Paulson, *Carbohydr. Res.* **1994**, *251*, 285–301.
- [119] S. Liu, K. L. Kiick, *Macromolecules* **2008**, *41*, 764–772.
- [120] J. A. Falenski, U. I. M. Gerling, B. Koksch, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 3703–3706.
- [121] L. M. Artner, L. Merkel, N. Bohlke, F. Beceren-Braun, C. Weise, J. Dernedde, N. Budisa, C. P. R. Hackenberger, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 522–524.
- [122] N. C. Seeman, *Nano Lett.* **2010**, *10*, 1971–1978.
- [123] N. C. Seeman, *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 65–87.
- [124] V. L. Malinovskii, D. Wenger, R. Haner, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 410–422.
- [125] G. H. Clever, T. Carell, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 254–257; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 250–253.
- [126] G. H. Clever, C. Kaul, T. Carell, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 6340–6350; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6226–6236.
- [127] C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 1220–1238; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1200–1216.
- [128] L. Rögl, O. Seitz, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 3881–3887.
- [129] F. Diezmann, O. Seitz, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5789–5801.
- [130] H. G. Hansma, K. J. Kim, D. E. Laney, R. A. Garcia, M. Argaman, M. J. Allen, S. M. Parsons, *J. Struct. Biol.* **1997**, *119*, 99–108.
- [131] Y. J. Lu, B. Weers, N. C. Stellwagen, *Biopolymers* **2001**, *61*, 261–275.
- [132] T. Akasaka, K. Matsuura, K. Kobayashi, *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 776–785.
- [133] K. Matsuura, M. Hibino, Y. Yamada, K. Kobayashi, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 357–358.
- [134] K. Matsuura, M. Hibino, T. Ikeda, Y. Yamada, K. Kobayashi, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 352–359.
- [135] Y. Yamada, K. Matsuura, K. Kobayashi, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 1913–1922.
- [136] K. Gorska, K. T. Huang, O. Chaloin, N. Winssinger, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7831–7836; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7695–7700.
- [137] K. Gorska, J. Beyrath, S. Fournel, G. Guichard, N. Winssinger, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 7742–7744.
- [138] E. A. Englund, D. Wang, H. Fujigaki, H. Sakai, C. M. Micklitsch, R. Ghirlando, G. Martin-Manso, M. L. Pendrak, D. D. Roberts, S. R. Durell, D. H. Appella, *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 614.
- [139] H. Eberhard, F. Diezmann, O. Seitz, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 4232–4236; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 4146–4150.
- [140] F. Abendroth, A. Bujotzek, M. Shan, R. Haag, M. Weber, O. Seitz, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 8751–8755; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8592–8596.
- [141] S. Melkko, Y. Zhang, C. E. Dumelin, J. Scheuermann, D. Neri, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 4755–4758; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4671–4674.
- [142] L. Mannocci, S. Melkko, F. Buller, I. Molnar, J. P. G. Bianke, C. E. Dumelin, J. Scheuermann, D. Neri, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 1836–1841.
- [143] K. I. Sprinz, D. M. Tagore, A. D. Hamilton, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3908–3911.
- [144] D. M. Tagore, K. I. Sprinz, S. Fletcher, J. Jayawickramarajah, A. D. Hamilton, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 227–229; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 223–225.
- [145] D. M. Tagore, K. I. Sprinz, A. D. Hamilton, *Supramol. Chem.* **2007**, *19*, 129–136.
- [146] D. C. Harris, X. Z. Chu, J. Jayawickramarajah, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14950–14951.
- [147] J. P. Daguer, M. Ciobanu, S. Alvarez, S. Barluenga, N. Winsinger, *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 625–632.
- [148] B. A. R. Williams, C. W. Diehnelt, P. Belcher, M. Greving, N. W. Woodbury, S. A. Johnston, J. C. Chaput, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17233–17241.
- [149] M. Shan, A. Bujotzek, F. Abendroth, A. Wellner, R. Gust, O. Seitz, M. Weber, R. Haag, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 2587–2598.
- [150] Siehe Lit. [140].
- [151] D. Schwefel, C. Maierhofer, J. G. Beck, S. Seeberger, K. Dieberichs, H. M. Moller, W. Welte, V. Wittmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8704–8719.
- [152] G. Ercolani, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 5052–5057.
- [153] J. Huskens, A. Mulder, T. Auletta, C. A. Nijhuis, M. J. W. Ludden, D. N. Reinhoudt, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6784–6797.
- [154] G. Ercolani, M. Ioele, D. Monti, *New J. Chem.* **2001**, *25*, 783–789.
- [155] M. Mammen, E. I. Shakhnovich, J. M. Deutch, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 3821–3830.
- [156] A. G. Bielejewska, C. E. Marjo, L. J. Prins, P. Timmerman, F. de Jong, D. N. Reinhoudt, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7518–7533.
- [157] A. Pfeil, J. M. Lehn, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1992**, 838–840.
- [158] T. M. Garrett, U. Koert, J. M. Lehn, *J. Phys. Org. Chem.* **1992**, *5*, 529–532.
- [159] N. Fatin-Rouge, S. Blanc, A. Pfeil, A. Rigault, A. M. Albrecht-Gary, J. M. Lehn, *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 1694–1711.
- [160] A. Marquis, J. P. Kintzinger, R. Graff, P. N. W. Baxter, J. M. Lehn, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2884–2888; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2760–2764.
- [161] P. N. Taylor, H. L. Anderson, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11538–11545.
- [162] A. P. Bisson, F. J. Carver, C. A. Hunter, J. P. Waltho, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 10292–10293.
- [163] A. P. Bisson, C. A. Hunter, J. C. Morales, K. Young, *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 845–851.
- [164] M. I. Page, W. P. Jencks, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1971**, *68*, 1678–1683.
- [165] M. S. Searle, D. H. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10690–10697.
- [166] F. Eblinger, H. J. Schneider, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 821–824; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 826–829.
- [167] M. A. Hossain, H. J. Schneider, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 1284–1290.
- [168] J. J. Reczek, A. A. Kennedy, B. T. Halbert, A. R. Urbach, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2408–2415.
- [169] P. B. Armentrout, *Int. J. Mass Spectrom.* **1999**, *193*, 227–240.
- [170] C. A. Schalley, A. Springer, *Mass-Spectrometry and Gas-Phase Chemistry of Non-Covalent Complexes*, Wiley, Hoboken, **2009**, S. 329–356.
- [171] V. Balzani, M. Clemente-Leon, A. Credi, J. N. Lowe, J. D. Badjic, J. F. Stoddart, D. J. Williams, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 5348–5360.
- [172] J. D. Badjic, V. Balzani, A. Credi, J. N. Lowe, S. Silvi, J. F. Stoddart, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 1926–1935.
- [173] J. D. Badjic, V. Balzani, A. Credi, S. Silvi, J. F. Stoddart, *Science* **2004**, *303*, 1845–1849.
- [174] J. D. Badjic, C. M. Ronconi, J. F. Stoddart, V. Balzani, S. Silvi, A. Credi, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1489–1499.

- [175] J. D. Badjić, S. J. Cantrill, J. F. Stoddart, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2288–2289.
- [176] A. Perl, A. Gomez-Casado, D. Thompson, H. H. Dam, P. Jonkheijm, D. N. Reinhoudt, J. Huskens, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 317–322.
- [177] A. Gomez-Casado, H. H. Dam, M. D. Yilmaz, D. Florea, P. Jonkheijm, J. Huskens, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 10849–10857.
- [178] X. Y. Ling, D. N. Reinhoudt, J. Huskens, *Pure Appl. Chem.* **2009**, *81*, 2225–2233.
- [179] S. Kinge, M. Crego-Calama, D. N. Reinhoudt, *ChemPhysChem* **2008**, *9*, 20–42.
- [180] Siehe Lit. [7].
- [181] H. M. Saavedra, T. J. Mullen, P. P. Zhang, D. C. Dewey, S. A. Claridge, P. S. Weiss, *Rep. Prog. Phys.* **2010**, *73*, 036501.
- [182] O. Crespo-Biel, B. J. Ravoo, D. N. Reinhoudt, J. Huskens, *J. Mater. Chem.* **2006**, *16*, 3997–4021.
- [183] O. Crespo-Biel, B. Dordi, D. N. Reinhoudt, J. Huskens, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7594–7600.
- [184] O. Crespo-Biel, C. W. Lim, B. J. Ravoo, D. N. Reinhoudt, J. Huskens, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 17024–17032.
- [185] a) Y. C. Lee, R. T. Lee, *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 321–327; b) J. J. Lundquist, E. J. Toone, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 555–578.
- [186] S. R. S. Ting, G. Chen, M. H. Stenzel, *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 1392–1412.
- [187] a) T. K. Dam, C. F. Brewer, *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Vol. 63 (Hrsg.: D. Horton), Academic Press, New York, **2010**, S. 139–164; b) Y. M. Chabre, R. Roy, *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Vol. 63 (Hrsg.: D. Horton), Academic Press, New York, **2010**, S. 165–393.
- [188] E. A. Merritt, S. Sarfaty, F. van den Akker, C. L'Hoer, J. A. Martial, W. G. Hol, *Protein Sci.* **1994**, *3*, 166–175.
- [189] P. I. Kitov, J. M. Sadowska, G. Mulvey, G. D. Armstrong, H. Ling, N. S. Pannu, R. J. Read, D. R. Bundle, *Nature* **2000**, *403*, 669–672.
- [190] W. B. Turnbull, B. L. Precious, S. W. Homans, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1047–1054.
- [191] A. V. Pukin, H. M. Branderhorst, C. Sisu, C. A. Weijers, M. Gilbert, R. M. Liskamp, G. M. Visser, H. Zuilhof, R. J. Pieters, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1500–1503.
- [192] C. Sisu, A. J. Baron, H. M. Branderhorst, S. D. Connell, C. A. Weijers, R. de Vries, E. D. Hayes, A. V. Pukin, M. Gilbert, R. J. Pieters, H. Zuilhof, G. M. Visser, W. B. Turnbull, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 329–337.
- [193] H. M. Branderhorst, R. M. Liskamp, G. M. Visser, R. J. Pieters, *Chem. Commun.* **2007**, 5043–5045.
- [194] T. Lindhorst in *Topics in Current Chemistry*, Vol. 218 (Hrsg.: S. Penadés), Springer, Berlin, **2002**, S. 201–235.
- [195] K. Elsner, M. M. K. Boysen, T. K. Lindhorst, *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 1715–1725.
- [196] I. Deguise, D. Lagnoux, R. Roy, *New J. Chem.* **2007**, *31*, 1321–1331.
- [197] E. E. Simanek, G. J. McGarvey, J. A. Jablonowski, C. H. Wong, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 833–862.
- [198] Y. M. Chabre, R. Roy, *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, *8*, 1237–1285.
- [199] G. Thoma, R. O. Duthaler, J. L. Magnani, J. T. Patton, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10113–10114.
- [200] I. Papp, J. Dernedde, S. Enders, R. Haag, *Chem. Commun.* **2008**, 5851–5853.
- [201] H. Türk, R. Haag, S. Alban, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 162–167.
- [202] M. Weinhart, D. Groger, S. Enders, S. B. Riese, J. Dernedde, R. K. Kainthan, D. E. Brooks, R. Haag, *Macromol. Biosci.* **2011**, *11*, 1088–1098.
- [203] A. Hofmann, S. Thierbach, A. Semisch, A. Hartwig, M. Taupitz, E. Rühl, C. Graf, *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 7842–7853.
- [204] J. M. de la Fuente, A. G. Barrientos, T. C. Rojas, J. Rojo, J. Canada, A. Fernandez, S. Penades, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2317–2321; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2257–2261.
- [205] J. M. De La Fuente, S. Penades, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2006**, *1760*, 636–651.
- [206] R. Kikkeri, P. Laurino, A. Odedra, P. H. Seeberger, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 2098–2101; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2054–2057.
- [207] R. Kikkeri, B. Lepenies, A. Adibekian, P. Laurino, P. H. Seeberger, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2110–2112.
- [208] C. C. Huang, C. T. Chen, Y. C. Shiang, Z. H. Lin, H. T. Chang, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 875–882.
- [209] J. Dernedde, S. Enders, H. U. Reiβig, M. Roskamp, S. Schlecht, S. Yekta, *Chem. Commun.* **2009**, 932–934.
- [210] M. Roskamp, S. Enders, F. Pfrenge, S. Yekta, V. Dekaris, J. Dernedde, H. U. Reiβig, S. Schlecht, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 7448–7456.
- [211] Siehe Lit. [209].
- [212] V. Gubala, X. Le Guevel, R. Nooney, D. E. Williams, B. MacCraith, *Talanta* **2010**, *81*, 1833–1839.
- [213] A. K. Boal, V. M. Rotello, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 5019–5024.
- [214] M. Mammen, G. Dahmann, G. M. Whitesides, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 4179–4190.
- [215] S. K. Choi, M. Mammen, G. M. Whitesides, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 97–104.
- [216] A. L. Sisson, D. Steinhilber, T. Rossow, P. Welker, K. Licha, R. Haag, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7676–7681; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7540–7545.
- [217] D. Steinhilber, A. L. Sisson, D. Mangoldt, P. Welker, K. Licha, R. Haag, *Adv. Funct. Mater.* **2010**, *20*, 4133–4138.
- [218] I. Papp, C. Sieben, A. L. Sisson, J. Kostka, C. Bottcher, K. Ludwig, A. Herrmann, R. Haag, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 887–895.
- [219] K. Licha, P. Welker, M. Weinhart, N. Wegner, S. Kern, S. Reichter, I. Gemeinhardt, C. Weissbach, B. Ebert, R. Haag, M. Schirner, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 2453–2460.
- [220] a) weitere Informationen unter: <http://www.starpharma.com>; b) T. D. McCarthy, P. Karella, S. A. Henderson, M. Giannis, D. F. O'Keefe, G. Heery, J. R. A. Paull, B. R. Matthews, G. Holan, *Mol. Pharm.* **2005**, *2*, 312–318; c) R. Rupp, S. L. Rosenthal, L. R. Stanberry, *Int. J. Nanomed.* **2007**, *2*, 561–566.
- [221] M. Weber, A. Bujotzek, R. Haag, *J. Chem. Phys.* **2012**, *137*, 054111.
- [222] B. Imperiali, *Acc. Chem. Res.* **1997**, *30*, 452–459.