

**Protein-NMR-Spektroskopie** Hot PaperZitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 13302–13309

Internationale Ausgabe: doi.org/10.1002/anie.202102690

Deutsche Ausgabe: doi.org/10.1002/ange.202102690

Automatisierte Glykan-Assemblierung ¹⁹F-markierter Glykansonden ermöglicht Hochdurchsatz-NMR-Untersuchungen von Protein-Glykan-Interaktionen

Giulio Fittolani⁺, Elena Shanina⁺, Mónica Guberman, Peter H. Seeberger, Christoph Rademacher* und Martina Delbianco*

Abstract: Protein-Glykan-Interaktionen vermitteln wichtige biologische Prozesse wie die Pathogen-Wirt-Invasion und zelluläre Kommunikation. Wir hier stellen einen schnellen Ansatz vor, der die automatisierte Glykan-Assemblierung (AGA) von ¹⁹F-markierten Sonden und Hochdurchsatz-NMR-Methoden integriert und die Untersuchung von Protein-Glykan-Interaktionen ermöglicht. Synthetische Lewis-Typ-2-Antigene wurden gegen sieben glykanbindende Proteine (GBPs) durchmustert, darunter DC-SIGN und BambL, die an HIV-1- bzw. Lungeninfektionen bei immungeschwächten Patienten beteiligt sind, wobei die Präferenz für fucosylierte Glykane (Le^x, H Typ 2, Le^b) bestätigt wurde. Bisher unbekannte schwache Wechselwirkungen zwischen Glykanen und Lektinen wurden nachgewiesen und thermodynamische Daten gewonnen. Enzymatische Reaktionen wurden in Echtzeit überwacht und lieferten kinetische Parameter. Diese Ergebnisse zeigen den Nutzen von AGA in Kombination mit ¹⁹F-NMR-Spektroskopie für die Entdeckung und Charakterisierung von Glykan-Protein-Wechselwirkungen, wodurch sich neue Perspektiven für ¹⁹F-markierte komplexe Glykane eröffnen.

Einleitung

Glykane sind eine äußerst vielfältige Klasse von Biomolekülen, die an verschiedenen Prozessen wie z. B. der zellulären Kommunikation und Erkennung beteiligt sind und die wichtige strukturelle und modulierende Funktionen erfüllen.^[1] Pathogene dringen in den Wirt ein, indem sie die auf Endothelzellen vorhandenen Wirtsglykane nachahmen oder

ausnutzen. Dieser Prozess wird oft durch Lektine vermittelt, eine Klasse Glykan-bindender Proteine (GBP), die sowohl von Pathogenen als auch von Wirten exprimiert werden. Typischerweise haben Säugetier-Glykane eine geringe Affinität für Rezeptoren von Säugetieren, während sie eine höhere Affinität für bakterielle Lektine aufweisen.^[2] Die Messung von Glykan-Lektin-Interaktionen ist ein entscheidender Schritt zum Verständnis der biologischen Funktionen von Glykanen. Jedoch stellt die extreme Komplexität und Diversität von Glykanen eine Herausforderung für die Charakterisierung dieser allgemein schwachen und promiskuitiven Interaktionen dar.

Synthetische Glykane dienen als wertvolle Sonden zur Untersuchung von Glykan-Protein-Interaktionen. Langwierige Syntheseprotokolle behinderten jedoch ihre systematische und breite Verwendung in der Glykobiologie. Die automatisierte Glykan-Assemblierung (AGA) ermöglicht einen schnellen Zugang zu komplexen und gut definierten Glykanen.^[3,4] Mittels AGA werden Glykane typischerweise in einem Übernachtlauf synthetisiert, was die Herstellung breit gefächerter Glykan-Bibliotheken für systematische Screenings ermöglicht.^[5]

Eine weitere Herausforderung bei der Untersuchung von Glykan-Protein-Wechselwirkungen ist der Bedarf an hochempfindlichen Methoden, die in der Lage sind, Bindungsergebnisse mit oft inhärent niedrigen Affinitäten nachzuweisen. Mehrere analytische Techniken wurden entwickelt, um diese Wechselwirkungen auf molekularer Ebene und im Hochdurchsatz quantitativ zu beschreiben.^[6–8] Die meisten dieser

[*] G. Fittolani,^[†] E. Shanina,^[†] Dr. M. Guberman, Prof. P. H. Seeberger, Prof. C. Rademacher, Dr. M. Delbianco
Department of Biomolecular Systems
Max Planck Institute of Colloids and Interfaces
Am Mühlenberg 1, 14476 Potsdam (Deutschland)
E-Mail: christoph.rademacher@univie.ac.at
martina.delbianco@mpikg.mpg.de

G. Fittolani,^[†] E. Shanina,^[†] Prof. P. H. Seeberger,
Prof. C. Rademacher
Department of Chemistry and Biochemistry
Freie Universität Berlin
Arnimallee 22, 14195 Berlin (Deutschland)
Prof. C. Rademacher
Derzeitige Adresse: Department of Pharmaceutical Chemistry
University of Vienna
Althanstraße 14, 1080 Wien (Österreich),
und
Derzeitige Adresse: Department of Microbiology, Immunobiology

and Genetics
Max F. Perutz Labs
Campus Vienna Biocenter 5, 1030 Wien (Österreich)
Dr. M. Guberman
Derzeitige Adresse: Medicinal Chemistry
Leibniz-Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie
Robert-Rössle Straße 10, 13125 Berlin (Deutschland)

[†] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

Hintergrundinformationen und Identifikationsnummern (ORCID) der Autoren sind unter:

<https://doi.org/10.1002/ange.202102690> zu finden.

© 2021 Die Autoren. Angewandte Chemie veröffentlicht von Wiley-VCH GmbH. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution License, die jede Nutzung des Beitrages in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert wird.

Strategien beruhen auf immobilisierten Glykanen (z. B. die Microarray-Technologie)^[6–10] oder erfordern große Mengen an Proben und lange Analysezeiten (isothermale Titrationskalorimetrie, ITC,^[11] Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie, SPR,^[12] oder Röntgenkristallographie^[13]). Im Gegensatz dazu ermöglicht die NMR-Spektroskopie die schnelle und zuverlässige Detektion von Protein-Glykan-Interaktionen in Lösung und liefert Informationen über den Bindungsmodus in einem homogenen Assay-Format ohne Immobilisierungsprotokolle.^[14,15]

NMR-aktive Marker werden häufig zur Vereinfachung der NMR-Analyse genutzt.^[15–17] Unter diesen sticht der ¹⁹F-Kern aufgrund seiner einzigartigen Eigenschaften hervor, wie z. B.: 1) hohe Empfindlichkeit gegenüber der lokalen chemischen Umgebung, 2) kurze Aufnahmezeiten, 3) einfache Spektren, 4) breiter chemischer Verschiebungsbereich und 5) Abwesenheit in biologischen Systemen (kein Hintergrundsignal).^[18,19] Obwohl die ¹⁹F-NMR-Spektroskopie die Beschreibung von Peptid-(Fehl-)Faltung, Echtzeit-in-vivo-Ereignissen^[18–22] und Protein-Ligand-Interaktionen sowie Hochdurchsatz-Ligandenscreenings ermöglicht hat,^[23,24] steht die Verwendung fluorierter Glykane zur Untersuchung von Proteinbindungen^[25] und enzymatischen Reaktionen^[26–28] erst am Anfang. Die arbeitsintensive mehrstufige Synthese von ¹⁹F-markierten Glykanen stellt den größten Engpass dar und hat diese Studien auf kleine Sammlungen kurzer und relativ einfacher Glykane beschränkt.^[14,29–32] Dennoch haben ¹⁹F-markierte Glykane das Potenzial, Protein-Glykan-Interaktionen detailliert zu beschreiben.^[33,34]

Hier stellen wir einen NMR-basierten Hochdurchsatz-Ansatz für das Screening und die Charakterisierung von Protein-Glykan-Interaktionen mithilfe von ¹⁹F-markierten Glykanen vor. AGA ermöglichte einen schnellen Zugriff auf eine Sammlung ¹⁹F-markierter komplexer Lewis-Typ-2-Glykane. Lewis-Typ-2-Antigene sind an mehreren physiologischen und pathologischen Prozessen, einschließlich Krebs, beteiligt, wo sie als Zelladhäsions- oder Erkennungsvermittler fungieren.^[35,36] Subtile Unterschiede im Fucosylierungsmuster wirken sich stark auf ihre Interaktion mit Proteinen aus, wodurch sie letztlich dem Immunsystem des Wirts entweichen können.^[37–40] Die ¹⁹F-markierten Glykansonen (im Folgenden F-Glykane) wurden gegen Säugetier- und bakterielle Lektine sowie Enzyme durchgemustert. Unter den Säugetierlektinen wählten wir Langerin^[41] und Dendritic Cell-Specific ICAM-3-Grabbing Non-integrin (DC-SIGN)^[42] aus, von denen bekannt ist, dass sie N-Glykane mit hohem Mannosegehalt binden. DC-SIGN erkennt auch selektiv spezifische fucosylierte Glykane,^[43] die eine entscheidende Rolle in der Biologie viraler Pathogene (z. B. HIV) spielen. Zusätzlich untersuchten wir lösliche Lektine, die von einigen opportunistischen Pathogenen produziert werden, die für Lungeninfektionen verantwortlich sind, wie *Pseudomonas*-(LecA und LecB)^[44] und *Burkholderia*-Spezies (BambL).^[45] Schließlich wählten wir zwei verschiedene Sialyltransferasen und untersuchten ihre Wechselwirkungen mit Lewis-Antigenen, da die terminale Sialylierung in Lewis-Antigenen wichtig ist und häufig vorkommt.^[46,47] In Kombination mit ¹⁹F-NMR-Spektroskopie erwiesen sich die markierten Glykansonen als wertvoll, um Bindungsereignisse in Echtzeit zu messen,

neue schwache Protein-Glykan-Wechselwirkungen zu identifizieren und Affinitäten (K_d) sowie Kinetiken enzymatischer Reaktionen zu bestimmen.

Ergebnisse und Diskussion

Automatisierte Synthese von F-Glykanen

Kürzlich wurde ein elegantes Verfahren zur Generierung einer Sammlung von Lewis-Typ-2-Antigenen mittels AGA publiziert.^[48] Wir sahen einen ähnlichen Ansatz zur Herstellung einer Reihe ¹⁹F-markierter Analoga vor, um die Proteinbindung in einem einfachen ¹⁹F-NMR-Assay zu durchmustern. Da davon ausgegangen wird, dass die Position des ¹⁹F-Reporters entscheidend ist, um wertvolle Informationen zu erhalten, wurden F-Glykane (**F-Lac**, **F-nLac₄**, **F-Lex**, **F-H Typ 2** und **F-Le^y**) mit dem ¹⁹F-Reporter in der inneren Lactose-Kern-Untereinheit entworfen (Abbildung 1 A). Diese Position ist distal von der Bindungsstelle (d. h. vom nicht-reduzierenden Ende), um den Einfluss des Fluoratoms während des Bindungsereignisses zu minimieren.^[49,50] Wir stellen die Hypothese auf, dass die Markierung der inneren Kern-Glucose-Einheit die Sensitivität für das Bindungsereignis aufgrund von Gesamtänderungen der Korrelationszeit des Glykans im gebundenen Zustand aufrechterhalten sollte, wodurch Änderungen im ¹⁹F-NMR-Signal gemeldet werden.^[20]

¹⁹F-markierte Analoga von Lewis-Typ-2-Antigenen wurden auf einem festen Träger (funktionalisiertes Merrifield-Harz, **L1**) unter Verwendung der Bausteine (building blocks, BBs) **1–5** synthetisiert (Abbildung 1 A). Die BBs sind mit einer Thioether- oder einer Dibutylphosphat-reaktiven Abgangsgruppe ausgestattet. Die orthogonale Abspaltung der temporären Schutzgruppen 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) und Lävulinoyl (Lev) ermöglicht eine regioselektive Kettenverlängerung. Benzyl(Bn)-, Benzoyl(Bz)- und *N*-Trichloroacetyl(TCA)-Gruppen schützen die restlichen Funktionalitäten. Die β -Stereo-selektivität bei der Glykosylierung mit den BBs **1–4** wird durch die anchimäre Unterstützung der Schutzgruppen an C-2 gewährleistet, während die α -Stereo-selektivität mit BB **5** in früheren Studien verifiziert wurde.^[48] BB **1** ist an der C-3-Position mit dem ¹⁹F-Reporter markiert.^[51] Jedes Oligosaccharid wurde in einem Übernachtslauf unter den zuvor berichteten Bedingungen für unmarkierte Analoga synthetisiert (siehe SI).^[48] Zu den Reaktionen nach der AGA gehörten die Festphasen-Methanolyse,^[51] Photospaltung^[52] vom festen Träger und Hydrogenolyse (siehe SI). Ein einziger abschließender Reinigungsschritt lieferte die anvisierten F-Glykane in Gesamtausbeuten zwischen 5 % und 16 % über 7 bis 15 Syntheseschritte.

¹⁹F-NMR-Screening der F-Glykan-Bibliothek

Ein ¹⁹F- und CPMG-NMR-Screening wurde durchgeführt, um die Wechselwirkungen von fünf F-Glykanen (**F-Lac**, **F-nLac₄**, **F-Le^x**, **F-H Typ 2** und **F-Le^y**) mit Säugetier-(Langerin, DC-SIGN) und bakteriellen (LecA, LecB,

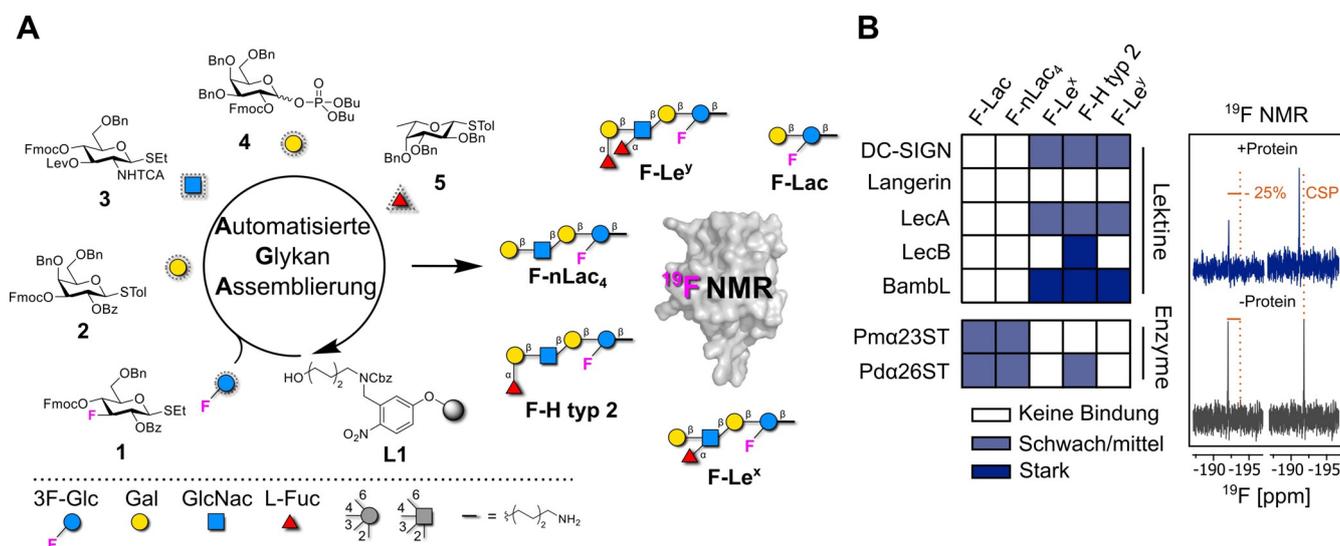


Abbildung 1. Integrierter Ansatz für die Herstellung ^{19}F -markierter Lewis-Typ-2-Glykanen durch AGA und Screening gegen Lektine und Enzyme. A) Die Bausteine BBs 1–5, einschließlich BB 1 mit dem ^{19}F -Reporter, wurden für die AGA einer Sammlung ^{19}F -markierter Lewis-Typ-2-Antigen-Analoga verwendet, die nach der Symbol-Nomenklatur für Glykane (SNFG) dargestellt sind.^[16] B) Die F-Glykane wurden gegen verschiedene Proteine, Säugetier- und bakterielle Lektine sowie Enzyme durchgemustert. Die Bindungsstärke wurde in Abhängigkeit von den beobachteten Veränderungen in der NMR-Spektroskopie nach Zugabe des Proteins definiert (rechts). Starke Bindung (blau) ist definiert als eine Abnahme der Peakintensität von mehr als –25% oder eine chemische Verschiebungsstörung (CSP) von mehr als 0,01 ppm in der ^{19}F -NMR-Spektroskopie. Schwache/mittlere Bindung (hellblau) ist definiert als eine Abnahme der Peakintensität von mehr als –25% in der CPMG-gefilterten ^{19}F -NMR-Spektroskopie. Keine Bindung (weiß) ist definiert als eine Abnahme der Peakintensität von weniger als –25% in der CPMG-gefilterten ^{19}F -NMR-Spektroskopie.

BambL) Lektinen sowie Enzymen ($\alpha(2,3)$ -Sialyltransferase aus *Pasteurella multocida* (Pma23ST)^[53] und $\alpha(2,6)$ -Sialyltransferase aus *Photobacterium damsela* (Pda26ST)^[54]) zu messen (Abbildung 1B). Nach der Proteinbindung wird die molekulare Tumbling-Rate des Glykans stark beeinflusst, was zu einer Abnahme der ^{19}F -Signalintensität führt.^[20] Die Überwachung der ^{19}F -chemischen Verschiebungsstörung (chemical shift perturbation, CSP) oder der Änderung der Peakintensität nach Zugabe des Proteins ermöglichte uns eine qualitative Bewertung der Stärke der Interaktion. Eine Abnahme der Peakintensität oder eine CSP in der ^{19}F -NMR-Spektroskopie weist auf eine starke Bindung hin. Die Anwendung eines CPMG-basierten Spin-Echo-Filters erlaubt die Erkennung schwacher Bindungen. Demzufolge bevorzugten bakterielle (LecA, LecB und BambL) und Säugetier-(DC-SIGN extrazelluläre Domäne (ECD)) Lektine fucosylierte Glykane (Abbildungen S2A, S2B, S2C und S2E). In Gegenwart der Langerin-ECD wurde keine Bindung an F-Glykane beobachtet (Abbildung S2D), was mit früheren Berichten übereinstimmt.^[55] Im Gegensatz dazu zeigten die Enzyme deutlich schwächere Interaktionen und eine leichte Präferenz für kürzere, nicht verzweigte Glykane (Abbildung S3).

Die Reporterposition auf F-Glykanen beeinflusst die Bindung an Säugetier- und Bakterienlektine nicht

DC-SIGN erkennt zelluläre Liganden und Pathogene, die Lewis-Antigene exprimieren. Insbesondere Le^x und Le^y , die

auf *Schistosoma mansoni*^[56] und *Helicobacter pylori*^[43] bzw. Endothelzellen^[57] vorkommen, sind bekannte Bindungspartner für DC-SIGN.^[58] Die starke Präferenz von DC-SIGN für fucosylierte Liganden wurde auch mit der Kristallstruktur der an Le^x gebundenen Kohlenhydrat-Bindungsstelle von DC-SIGN aufgeklärt.^[59] Das qualitative CPMG-NMR-Screening von Säugetierlektinen bestätigte die Interaktion von DC-SIGN mit den fucosylierten Glykanen **F- Le^x** , **F-H Typ 2** und **F- Le^y** (Abbildung 2A), was durch Änderungen der NMR-Peakintensität des Reportermoleküls erkennbar ist. Dieser Effekt wird bei einem Protein-zu-Ligand-Verhältnis von 2:1 maximiert (Abbildung S4A).

Zunächst untersuchten wir die Rolle des ^{19}F -Reporters bei der F-Glykan-Bindung an DC-SIGN. Wir führten proteinbeobachtete ^{15}N -HSQC-NMR-Spektroskopie durch und nahmen HSQC-NMR-Spektren der Kohlenhydrat-Bindungsdomäne von DC-SIGN (carbohydrate recognition domain, CRD) in Gegenwart von **F- Le^x** und Le^x auf. Beide Liganden erzeugten ähnliche Veränderungen des Rückgrats der CRD von DC-SIGN (Abbildungen 2B und S4B). Als nächstes untersuchten wir den Effekt der Position des Reporters auf die Fähigkeit, Bindungsereignisse aufzudecken. Wir konjugierten eine CF_3 -Gruppe an das entfernte Ende des Aminopentyl-Linkers am **H-Typ 2** (**CF_3 -H-Typ 2**), weit entfernt von der Kohlenhydrat-Bindungsstelle, und testeten den neuen Liganden in ^{19}F - und CPMG-NMR-Spektroskopie. Seine Bindung wurde sowohl mit Säugetier-(DC-SIGN, Abbildung 2A) als auch mit bakteriellem Lektin (BambL, Abbildung S5) beobachtet. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Positionierung des ^{19}F -Reporters an der Glc-Einheit

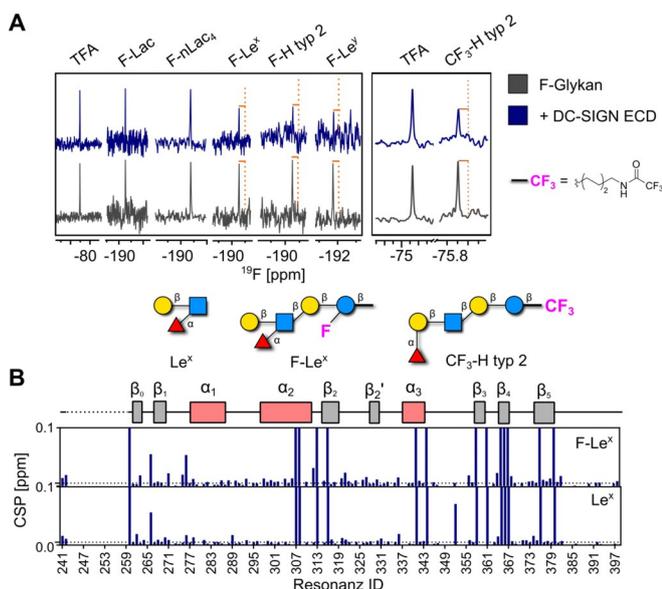


Abbildung 2. Bindung von Säugetierlektin (DC-SIGN) an F-Glykane und Untersuchung der Reporterposition. A) CPMG-NMR-Screening von F-Glykanen allein (grau) und in Gegenwart der ECD von DC-SIGN (blau). DC-SIGN-ECD bindet an **F-Le^x**, **F-H Typ 2** und **F-Le^y**, was durch eine Abnahme der Peakintensität in Anwesenheit von Protein gezeigt wird (orange Linien, links). CPMG-NMR-Spektren von **CF₃-H Typ 2** allein (grau) und in Anwesenheit der DC-SIGN-ECD (blau; rechts). B) Cartoon der zugewiesenen Domänen der DC-SIGN-CRD (nicht zugewiesene Resonanzen in gestrichelter Linie) und CSP-Plot der zugewiesenen Resonanzen in Gegenwart von **F-Le^x** und **Le^x**, der zeigt, dass **F-Le^x** die Resonanzen ähnlich wie unmarkiertes **Le^x** stört.

keinen Einfluss auf die Bindung von F-Glykanen mit Proteinen hat. Darüber hinaus kann der ¹⁹F-Reporter entfernt von der Glykanbindungsstelle positioniert werden, um jegliche Interferenz mit dem Bindungsereignis zu vermeiden, wobei eine ausgezeichnete Empfindlichkeit erhalten bleibt. Die Funktionalisierung des Amino-Linkers mit einer CF₃-Gruppe verhindert jedoch jede eine weitere Konjugation des Glykans (z. B. an Proteine, Oberflächen, Liposomen).

Wir führten detailliertere Untersuchungen der Wechselwirkungen der CRD von DC-SIGN mit **F-Le^y** und **F-H Typ 2** mittels ¹⁵N-HSQC-NMR-Spektroskopie durch (Abbildungen 3A und S6A). Obwohl **Le^y** für seine Wechselwirkung mit DC-SIGN bekannt ist, gibt es bisher keine Strukturdaten.^[57] Beide Liganden führten zu CSPs von Resten innerhalb der Kohlenhydrat-Bindungsstelle sowie in entfernten Stellen der CRD von DC-SIGN.

Die Bindung an **F-Le^y** bewirkte größere Veränderungen in der CRD von DC-SIGN als **F-H Typ 2** oder die Monosaccharid-Positivkontrolle *D*-Mannose (Abbildungen 3B und S6B). Dieses Ergebnis zeigt, dass der Aviditätseffekt eine entscheidende Rolle bei den Interaktionen zwischen DC-SIGN und Lewis-Typ-2-Antigenen spielt, wie dies auch für Strukturen mit hohem Mannosegehalt gezeigt wurde.^[60] Die in entfernten Regionen des Proteins beobachteten CSPs deuten auf eine allosterische Bindung hin, ein bekannter Mechanismus für C-Typ-Lektine wie DC-SIGN.^[61–63] Insgesamt sind wir der Meinung, dass diese Sonden wertvolle Werkzeuge für die Beschreibung der Interaktionsmechanis-

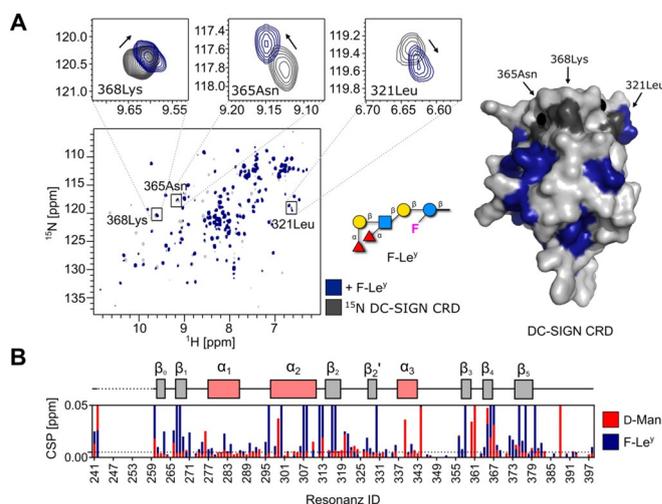


Abbildung 3. Bindung von Säugetierlektin (DC-SIGN) an **F-Le^y**.

A) HSQC-NMR-Spektroskopie (links) zeigt die Wechselwirkung von **F-Le^y** mit ¹⁵N-markiertem DC-SIGN-CRD, und die gestörten Reste wurden der Struktur der DC-SIGN-CRD (blau) zugeordnet. Oberflächendiagramm der Kristallstruktur der DC-SIGN-CRD (PDB: 1sl4; rechts). **F-Le^y** bindet an die Kohlenhydrat-Bindungsstelle der DC-SIGN-CRD, basierend auf Veränderungen der Resonanzen (z. B. 321Leu, 365Asn und 368Lys, grau). B) Cartoon der zugeordneten Domänen der DC-SIGN-CRD (nicht zugeordnete Resonanzen in gestrichelter Linie) und CSP-Plot, der zeigt, dass **F-Le^y** die Resonanzen ähnlich wie *D*-Mannose (rot, Positivkontrolle) stört. Die Größenordnung der von **F-Le^y** erzeugten CSPs ist höher im Vergleich zu *D*-Mannose. CSPs, die den Schwellenwert überschreiten (gestrichelte Linie bei 0,005 ppm) und Intensitäten, die um mehr als 50% abnehmen, wurden für die Kartierung der Bindungsstelle von **F-Le^y** auf einer Struktur der DC-SIGN-CRD verwendet.

men zwischen DC-SIGN und fucosylierten Blutantigenen sind.

Bindungsaffinität von F-Glykanen an bakterielle Lektine

Bakterielle Lektine zeigen eine bemerkenswert hohe Affinität für fucosylierte Blutgruppenantigene.^[35,64] Die Interaktion von BambL aus *Burkholderia ambifaria* mit **H-Typ 2** wurde ausführlich untersucht, und zwei Bindungsstellen wurden in einer Kristallstruktur des Komplexes identifiziert (Abbildung 4A).^[35] Wir setzten uns zum Ziel, diese Interaktion für F-Glykane in ¹⁹F- und proteinbeobachteter NMR-Spektroskopie zu verifizieren.

Zunächst führten wir ¹⁹F-NMR-Screenings und Titrationsexperimente mit fucosylierten F-Glykanen durch. Mit ¹⁹F-NMR-Experimenten konnten wir die Interaktion bestätigen und erhielten Affinitätskonstanten für **F-H Typ 2** ($K_d = 9 \pm 2 \mu\text{M}$, Abbildungen 4B und 3C) und **F-Le^y** ($K_d = 14 \pm 2 \mu\text{M}$, Abbildung S7A). Da BambL zwei Glykanbindungsstellen besitzt, wendeten wir Modelle mit einer und zwei Bindungsstellen an, um die Affinitäten für beide Stellen abzuleiten. Beide Modelle ergaben übereinstimmende K_d -Werte, die mit publizierten, mittels ITC erzeugten Werten übereinstimmen.^[35] Obwohl wir keinen Unterschied in den Affinitäten zwischen den beiden Bindungsstellen in der ¹⁹F-NMR-Spek-

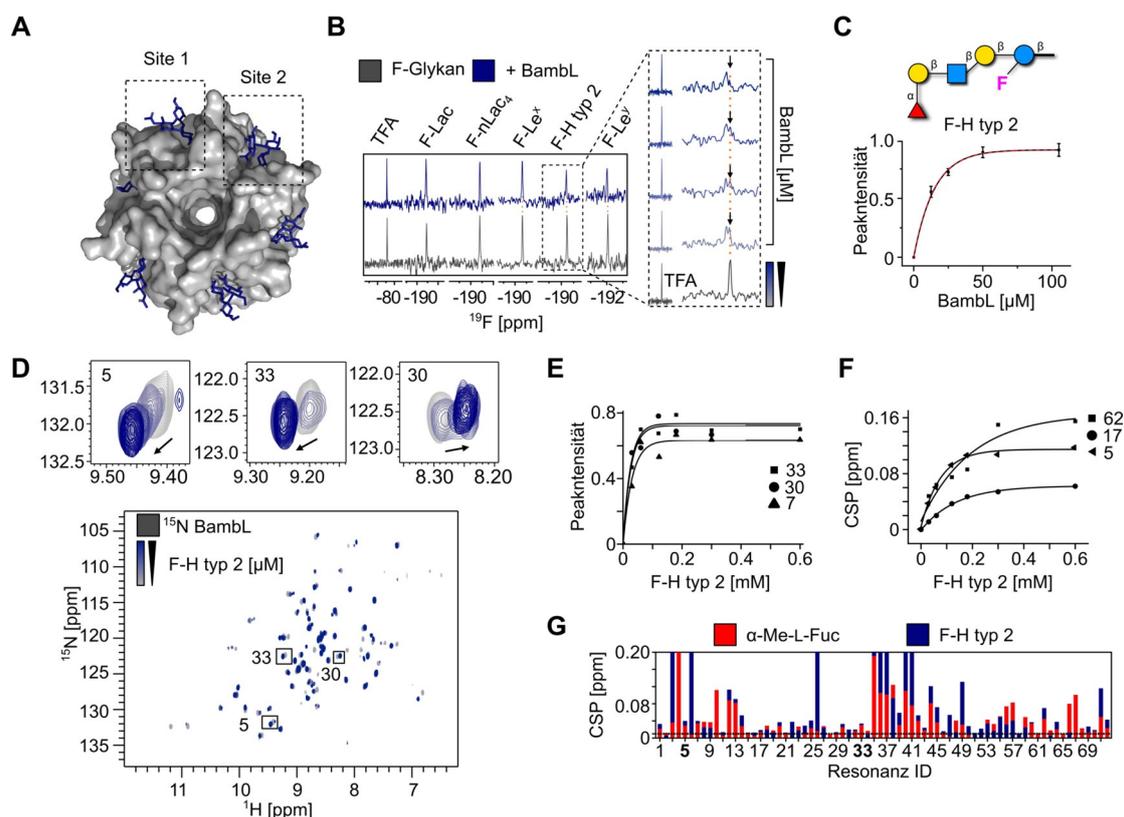


Abbildung 4. Bindung von F-Glykanen an bakterielles Lektin (BamBL). A) Oberflächendiagramm der Kristallstruktur von BamBL im Komplex mit **F-H Typ 2** (PDB: 3zzv). Die Stellen 1 und 2 entsprechen den Kohlenhydrat-Bindungsstellen innerhalb eines Monomers bzw. zwischen zwei Monomeren. B) ^{19}F -NMR-Screening von F-Glykanen allein (grau) und in Gegenwart von BamBL (blau). BamBL bindet **F-Le^x**, **F-Le^y** und **F-H Typ 2** stark, wie mit CSP in Anwesenheit von Protein gezeigt (orange Linie). Die ^{19}F -NMR-Titrationsspektren zeigen, dass **F-H Typ 2** bei Erhöhung der BamBL-Konzentration einen langsamen Austausch auf der Zeitskala der chemischen Verschiebung erfährt. C) Der K_d -Wert von **F-H Typ 2** wurde berechnet und an Ein- und Zwei-Bindungsstellen-Modelle angepasst, was zu einem K_d -Wert von $9 \pm 2 \mu\text{M}$ führt. D) TROSY-NMR-Spektroskopie verifizierte die Bindung von **F-H Typ 2** an ^{15}N -markiertes BamBL. Da BamBL zwei Bindungsstellen hat, wurden bei der Titration von **F-H Typ 2** Peaks beobachtet, die einen langsamen (30, 7 und 33), intermediären und schnellen Austausch (5, 17 und 62) auf der Zeitskala der chemischen Verschiebung zeigen. Das Ein-Seiten-Modell für langsame (E) und schnelle Austauschpeaks (F) wurde angewendet, um die K_d -Werte von $12 \pm 8 \mu\text{M}$ bzw. $94 \pm 33 \mu\text{M}$ abzuleiten. G) CSP-Plot, der die in Gegenwart von α -Me-L-Fucose und **F-H Typ 2** gestörten Resonanzen zeigt.

roskopie beobachteten, zeigten wir, dass die ^{19}F -NMR-Spektroskopie zuverlässig zur Bestimmung von Affinitäten eingesetzt werden kann, wobei im Vergleich mit ITC eine deutlich geringere Ligandenmenge erforderlich ist.

Wir verifizierten die Wechselwirkung von **F-H Typ 2** (Abbildung 4D) und **F-Le^y** (Abbildung S7B) mit ^{15}N -markiertem BamBL in proteinbeobachteter ^{15}N -TROSY-NMR-Spektroskopie. Die Veränderung des Proteinrückgrats ähnelte der mit α -Me-L-Fucose erzeugten. Dies deutet darauf hin, dass der α -L-Fucosezweig hauptsächlich für die Bindung verantwortlich war (Abbildungen S7C und 4D). Um Affinitäten abzuleiten, titrierten wir beide Liganden und verfolgten die Änderungen der Peakintensitäten und CSPs für die Peaks im langsamen (**F-H Typ 2**: $K_d = 12 \pm 8 \mu\text{M}$, Abbildung 4F und **F-Le^y**: $K_d = 17 \pm 3 \mu\text{M}$, Abbildung S7D) bzw. schnellen (**F-H Typ 2**: $K_d = 94 \pm 33 \mu\text{M}$, Abbildung 4G und **F-Le^y**: $K_d = 245 \pm 29 \mu\text{M}$, Abbildung S7E) Austauschregime. Allerdings ist die proteinbeobachtete NMR-Spektroskopie für die Bestimmung des K_d -Werts für Liganden mit hohen Affinitäten nicht gut geeignet, was die die genaue Ableitung von K_d erschwerte.^[65]

Dies unterstreicht den Vorteil der ^{19}F -NMR für ligandenbeobachtete Ansätze.

Zusätzlich zu den bekannten starken Wechselwirkungen von LecB und BamBL mit fucosylierten Glykanen^[66] zeigte das CPMG-NMR-Screening schwache Wechselwirkungen zwischen LecA und fucosylierten F-Glykanen. Um diese Beobachtung zu bestätigen, führten wir ^{19}F -R₂-gefilterte, Protein-beobachtete ^{19}F - (PrOF) und ^{15}N -TROSY-NMR-Experimente durch. **F-H Typ 2** zeigte eine schnellere Relaxation in Gegenwart von Protein, was auf eine schwache Wechselwirkung mit LecA hinweist (Abbildung S8B).

Proteinbeobachtete NMR-Experimente mit 5-Fluortryptophan (5FW, Abbildung S8C) und ^{15}N -markiertem LecA (Abbildungen S8D und S8E) bestätigten, dass diese Wechselwirkung in der kanonischen Kohlenhydrat-Bindungsstelle von LecA stattfindet, zu erkennen durch die chemische Verschiebung von W42 und CSPs, die den durch D-Galactose hervorgerufenen ähneln. Nach unserem Kenntnisstand ist dies der erste Bericht über eine solche schwache Bindung, die mit einer biophysikalischen Methode nachgewiesen wur-

de.^[67,68] Diese Ergebnisse zeigen, dass F-Glykane als Sonden für die Affinitätsbestimmung und Entdeckung neuer Interaktionen unter Verwendung geringer Mengen von Protein und Ligand geeignet sind.

Enzymbindung und Echtzeitkinetik mit F-Glykanen

Mit dem ^{19}F -NMR-Assay konnten wir die Bindung von F-Glykanen (**F-Lac** und **F-nLac₄**) an Enzyme verfolgen. Zwei Sialyltransferasen (Pm α 23ST^[53] und Pda26ST^[54]) wurden in Abwesenheit des Donors (d.h. CMP-Neu5Ac) untersucht und zeigten eine schwache Bindung an das Glykansubstrat (Abbildungen 1 B und S3). Dies ist besonders relevant, da die Akzeptor-Bindungsstellen von Transferasen in der Regel eine sehr geringe Affinität haben und Bindungsereignisse dadurch schwer zu detektieren sind. Kürzere, nicht verzweigte Glykane (**F-Lac** und **F-nLac₄**) zeigten eine stärkere Bindung als längere, verzweigte. **F-Le^x** zeigte keine Bindung mit Pm α 23ST oder Pda26ST, was mit seiner bekannten schlechten Reaktivität als Akzeptor übereinstimmt (Abbildung S3).^[69] Im Gegensatz dazu zeigte Pda26ST eine schwache Bindung mit **F-H Typ 2**, was mit der zuvor berichteten enzymatischen Aktivität übereinstimmt (Abbildung S3).^[54] Dieser einfache Assay könnte als Screening-Plattform zur Identifizierung von Akzeptor-Substraten für bekannte Enzyme und zur Entdeckung neuer Glykosyltransferasen in Betracht gezogen werden.^[70,71] Die hohe Empfindlichkeit des ^{19}F -Reporters gegenüber subtilen Veränderungen in seiner chemischen Umgebung bietet ein wertvolles Werkzeug für die Echtzeitüberwachung enzymatischer Reaktionen. Die Möglichkeit, den ^{19}F -Reporter auf einer Kohlenhydrateinheit in der Nähe der Funktionalisierungsstelle zu platzieren, ist entscheidend, um eine CSP zu erkennen. Wir wählten zwei

Enzyme (β -Galactosidase^[72] und Pm α 23ST^[53]) und überwachten ihre Aktivität an einem Modells substrat, **F-Lac**.

Die von der β -Galactosidase vermittelte Spaltung der glykosidischen Bindung wurde mittels ^{19}F -NMR-Spektroskopie verfolgt. Die Spaltung der endständigen β -Galactose induzierte eine CSP, und die ^{19}F -NMR-Verfolgung in Echtzeit ermöglichte die Ableitung des K_M der enzymatischen Reaktion (Abbildung 5 A). Als nächstes wurde die durch Pm α 23ST^[53] geförderte Bildung glykosidischer Bindungen in Echtzeit verfolgt. *N*-Acetyl-Neuraminsäure (Neu5Ac) wird von einem aktivierten Cytidinmonophosphat-Donor (CMP-Neu5Ac) auf das C-3-OH der terminalen Galactoseeinheit von **F-Lac** übertragen, wobei **F-sLac** entsteht. Die elektronenziehende Eigenschaft von Neu5Ac induzierte eine chemische Verschiebungsstörung von 0,2 ppm auf dem ^{19}F -markierten Akzeptor, wodurch der enzymatische Sialylierungsprozess in Echtzeit verfolgt werden konnte (Abbildung 5 B). War der ^{19}F -Reporter entfernt von der reaktiven Stelle des Akzeptors positioniert (>3 Zuckereinheiten entfernt, **F-nLac₄**), wurde trotz erfolgreicher enzymatischer Umwandlung keine CSP festgestellt (Abbildung S10). Im Gegensatz zu dem, was für die Proteinbindung beobachtet wurde, ist also die Position des ^{19}F -Reporters entscheidend für die Überwachung enzymatischer Reaktionen.

Fazit

AGA ermöglichte die schnelle Synthese ^{19}F -markierter Lewis-Typ-2-Antigene für das Hochdurchsatz-Screening von Proteinbindungen. Analysiert wurden Säugetier- und bakterielle Lektine sowie Enzyme. Das ^{19}F -NMR-Screening von F-Glykanen ermöglichte eine schnelle qualitative Auswertung sowie eine zuverlässige Quantifizierung der Lektinbindung

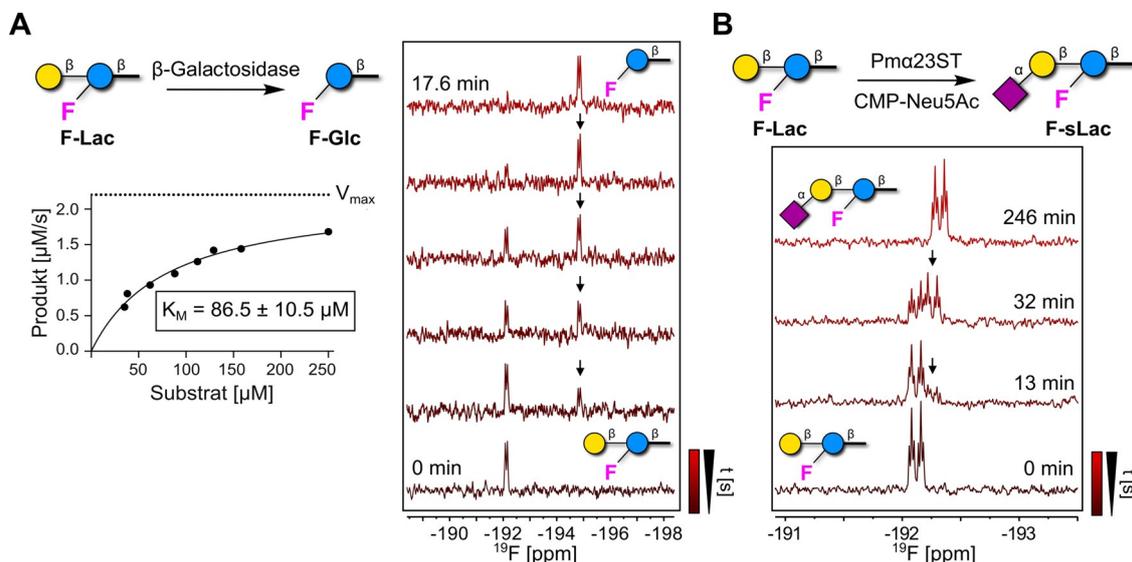


Abbildung 5. Echtzeit-Enzymkinetik mittels ^{19}F -NMR unter Verwendung von F-Glykanen. A) ^{19}F -NMR-Spektroskopie von **F-Lac** bei Inkubation mit β -Galactosidase. ^{19}F -NMR-Echtzeitverfolgung der Produktbildung (schwarze Pfeile) nach Inkubation von **F-Lac** mit β -Galactosidase (rechts). Die kinetischen Daten wurden abgeleitet, indem die Produktbildungsrate als Funktion der Substratkonzentration aufgetragen wurde. Der beste Fit der experimentellen Daten liefert den K_M -Wert von $86,5 \pm 10,5 \mu\text{M}$ gemäß der Henry-Michaelis-Menten-Gleichung (links). B) ^{19}F -NMR-Spektroskopie von **F-Lac**, inkubiert mit Pm α 23ST in Gegenwart von CMP-Neu5Ac. Die Bildung von **F-sLac** (schwarze Pfeile) kann mittels ^{19}F -NMR-Spektroskopie in Echtzeit verfolgt werden. Die Produktbildung wurde durch HPLC bestätigt (Abbildung S9).

(K_d). Der Assay erfordert keine markierten Proteine oder komplexe 2D-NMR-Experimente. Alle NMR-Experimente können in extrem kleinem Maßstab durchgeführt werden (wenige nmol Glykan und Protein pro Experiment). Enzymatische Reaktionen, einschließlich der Sialylierung, wurden in Echtzeit verfolgt, was zeigt, dass ^{19}F -markierte Glykane ein großes Potenzial als molekulare Sonden zur Aufdeckung enzymatischer Prozesse und für das Hochdurchsatz-Screening besitzen.^[27] Protokolle für die selektive ^{19}F -Markierung von Monosacchariden sind verfügbar;^[73–75] die Implementierung dieser neuartigen Bausteine in der AGA wird die Herstellung neuer Klassen von Glykansonden vorantreiben. Angesichts der großen Streuung von ^{19}F -NMR-Signalen können Bibliotheken von F-Glykanen mit unterschiedlichen chemischen Verschiebungen entworfen werden, um den Durchsatz dieses Ansatzes weiter zu erhöhen.^[76] Die Fähigkeit von ^{19}F -Glykansonden, Bindungen oder enzymatische Umwandlungen in Lösung und in Echtzeit aufzudecken, könnte den Weg für NMR-Anwendungen innerhalb von lebenden Zellen (in-cell NMR) ebnet, die oft das Problem hoher Hintergrundsignale zeigen.^[14,77,78] Insgesamt sind diese Sonden wertvolle Werkzeuge, um ein besseres molekulares Verständnis der Wechselwirkungen von komplexen Glykanen mit Proteinrezeptoren zu erhalten.

Danksagung

Wir danken der Max-Planck-Gesellschaft für großzügige finanzielle Unterstützung und Olaf Niemeyer für technische Unterstützung bei der NMR-Spektroskopie. M.D. und G.F. danken dem MPG-FhG Kooperationsprojekt Glyco3Dysplay, und C.R. und E.S. danken dem ANR/DFG französisch-deutschen Projekt „Glycomime“ (RA1944/7-1). Open Access Veröffentlichung ermöglicht und organisiert durch Projekt DEAL.

Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte vorliegen.

Stichwörter: ^{19}F -NMR-Spektroskopie · automatisierte Glykan-Assemblierung · Glykane · Lektine · Protein-Glykan-Interaktionen

- [1] A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, P. Stanley, G. W. Hart, M. Aebi, A. G. Darvill, T. Kinoshita, N. H. Packer, J. H. Prestegard, R. L. Schnaar, P. H. Seeberger, *Essentials of Glycobiology*, 3rd Ed., CSH Press, New York, **2017**.
- [2] P. Gagneux, A. Varki, *Glycobiology* **1999**, *9*, 747–755.
- [3] M. Panza, S. G. Pistorio, K. J. Stine, A. V. Demchenko, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 8105–8150.
- [4] M. Guberman, P. H. Seeberger, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 5581–5592.
- [5] M. Delbianco, A. Kononov, A. Poveda, Y. Yu, T. Diercks, J. Jiménez-Barbero, P. H. Seeberger, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 5421–5426.
- [6] C. D. Rillahan, J. C. Paulson, *Annu. Rev. Biochem.* **2011**, *80*, 797–823.
- [7] J. Stevens, O. Blixt, J. C. Paulson, I. A. Wilson, *Nat. Rev. Microbiol.* **2006**, *4*, 857–864.
- [8] M. Mende, V. Bordoni, A. Tsouka, F. F. Loeffler, M. Delbianco, P. H. Seeberger, *Faraday Discuss.* **2019**, *219*, 9–32.
- [9] D. J. Valles, Y. Naeem, A. Y. Rozenfeld, R. W. Aldasooky, A. M. Wong, C. Carbonell, D. R. Mootoo, A. B. Braunschweig, *Faraday Discuss.* **2019**, *219*, 77–89.
- [10] C.-H. Liang, S.-K. Wang, C.-W. Lin, C.-C. Wang, C.-H. Wong, C.-Y. Wu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1608–1612; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 1646–1650.
- [11] T. K. Dam, C. F. Brewer, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 387–430.
- [12] E. A. Smith, W. D. Thomas, L. L. Kiessling, R. M. Corn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6140–6148.
- [13] E. J. Toone, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1994**, *4*, 719–728.
- [14] P. Valverde, J. I. Quintana, J. I. Santos, A. Ardá, J. Jiménez-Barbero, *ACS Omega* **2019**, *4*, 13618–13630.
- [15] A. Gimeno, P. Valverde, A. Ardá, J. Jiménez-Barbero, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2020**, *62*, 22–30.
- [16] A. Varki, R. D. Cummings, M. Aebi, N. H. Packer, P. H. Seeberger, J. D. Esko, P. Stanley, G. Hart, A. Darvill, T. Kinoshita, et al., *Glycobiology* **2015**, *25*, 1323–1324.
- [17] M. D. Battistel, H. F. Azurmendi, B. Yu, D. I. Freedberg, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2014**, *79*, 48–68.
- [18] S. L. Cobb, C. D. Murphy, *J. Fluorine Chem.* **2009**, *130*, 132–143.
- [19] H. Chen, S. Viel, F. Ziarelli, L. Peng, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 7971.
- [20] C. Dalvit, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2007**, *51*, 243–271.
- [21] S. Tsukiji, M. Miyagawa, Y. Takaoka, T. Tamura, I. Hamachi, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 341–343.
- [22] E. N. G. Marsh, Y. Suzuki, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 1242–1250.
- [23] M. Garavís, B. López-Méndez, A. Somoza, J. Oyarzabal, C. Dalvit, A. Villasante, R. Campos-Olivas, C. González, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 1559–1566.
- [24] N. S. Troelsen, E. Shanina, D. Gonzalez-Romero, D. Danková, I. S. A. Jensen, K. J. Šniady, F. Nami, H. Zhang, C. Rademacher, A. Cuenda, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 2204–2210; *Angew. Chem.* **2020**, *132*, 2224–2230.
- [25] B. Linclau, A. Ardá, N.-C. Reichardt, M. Sollogoub, L. Unione, S. P. Vincent, J. Jiménez-Barbero, *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49*, 3863–3888.
- [26] T. J. Kieser, N. Santschi, L. Nowack, A. Axer, G. Kehr, S. Albrecht, R. Gilmour, *ACS Chem. Neurosci.* **2020**, *11*, 2129–2136.
- [27] T. Keenan, F. Parmeggiani, J. Malassis, C. Q. Fontenelle, J.-B. Vendeville, W. Offen, P. Both, K. Huang, A. Marchesi, A. Heyam, et al., *Cell Chem. Biol.* **2020**, *27*, 1199.
- [28] C. E. Council, K. J. Kilpin, J. S. Gusthart, S. A. Allman, B. Linclau, S. S. Lee, *Org. Biomol. Chem.* **2020**, *18*, 3423–3451.
- [29] A. Ardá, J. Jiménez-Barbero, *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 4761–4769.
- [30] S. A. Allman, H. H. Jensen, B. Vijaykrishnan, J. A. Garnett, E. Leon, Y. Liu, D. C. Anthony, N. R. Sibson, T. Feizi, S. Matthews, et al., *ChemBioChem* **2009**, *10*, 2522–2529.
- [31] S.-J. Richards, M. I. Gibson, M. A. Fascione, B. Linclau, M. C. Galan, A. N. Baker, H. Ledru, C. S. Webster, C. E. Council, M. Walker, et al., *Chem. Sci.* **2021**, *12*, 905–910.
- [32] P. Valverde, S. Delgado, J. D. Martínez, J.-B. Vendeville, J. Malassis, B. Linclau, N.-C. Reichardt, F. J. Cañada, J. Jiménez-Barbero, A. Ardá, *ACS Chem. Biol.* **2019**, *14*, 1660–1671.
- [33] E. Matei, S. André, A. Glinschert, A. S. Infantino, S. Oscarson, H.-J. Gabius, A. M. Gronenborn, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 5364–5374.
- [34] L. P. Calle, B. Echeverría, A. Franconetti, S. Serna, M. C. Fernández-Alonso, T. Diercks, F. J. Cañada, A. Ardá, N.-C.

- Reichardt, J. Jiménez-Barbero, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 11408–11416.
- [35] A. Audfray, A. Varrot, A. Imberty, *C. R. Chim.* **2013**, *16*, 482–490.
- [36] J. E. Heggelund, A. Varrot, A. Imberty, U. Krengel, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2017**, *44*, 190–200.
- [37] A. Gimeno, S. Delgado, P. Valverde, S. Bertuzzi, M. A. Berbís, J. Echavarren, A. Lacetera, S. Martín-Santamaría, A. Suroliá, F. J. Cañada, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 7268–7272; *Angew. Chem.* **2019**, *131*, 7346–7350.
- [38] A. D. Srivastava, L. Unione, M. A. Wolfert, P. Valverde, A. Arda, J. Jiménez-Barbero, G.-J. Boons, *Chem. Eur. J.* **2020**, *26*, 15605–15612.
- [39] C. Dalvit, C. Invernizzi, A. Vulpetti, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 11058–11068.
- [40] A. Gimeno, N.-C. Reichardt, F. J. Cañada, L. Perkams, C. Unverzagt, J. Jiménez-Barbero, A. Ardá, *ACS Chem. Biol.* **2017**, *12*, 1104–1112.
- [41] L. de Witte, A. Nabatov, M. Pion, D. Fluitsma, M. A. W. P. de Jong, T. de Gruijl, V. Pigué, Y. van Kooyk, T. B. H. Geijtenbeek, *Nat. Med.* **2007**, *13*, 367–371.
- [42] J. Geurtsen, N. N. Driessen, B. J. Appelmelk, in *Microb. Glycobiol.*, Elsevier, Amsterdam, **2010**, S. 673–695.
- [43] E. van Liempt, C. M. C. Bank, P. Mehta, J. J. García-Vallejo, Z. S. Kawar, R. Geyer, R. A. Alvarez, R. D. Cummings, Y. van Kooyk, I. van Die, *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 6123–6131.
- [44] A. Imberty, M. Wimmerová, E. P. Mitchell, N. Gilboa-Garber, *Microbes Infect.* **2004**, *6*, 221–228.
- [45] A. Audfray, J. Claudinon, S. Abounit, N. Ruvoën-Clouet, G. Larson, D. F. Smith, M. Wimmerová, J. Le Pendu, W. Römer, A. Varrot, et al., *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 4335–4347.
- [46] K. T. Nam, S. A. Shelby, P. H. Choi, A. B. Marciel, R. Chen, L. Tan, T. K. Chu, R. A. Mesch, B.-C. Lee, M. D. Connolly, et al., *Nat. Mater.* **2010**, *9*, 454–460.
- [47] A. Varki, *Nature* **2007**, *446*, 1023–1029.
- [48] M. Guberman, M. Bräutigam, P. H. Seeberger, *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 5634–5640.
- [49] Q. Li, W. Jiang, J. Guo, M. Jaiswal, Z. Guo, *J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 13232–13241.
- [50] J. Guo, W. Jiang, Q. Li, M. Jaiswal, Z. Guo, *Carbohydr. Res.* **2020**, *492*, 107999.
- [51] Y. Yu, T. Tyrikos-Ergas, Y. Zhu, G. Fittolani, V. Bordoni, A. Singhal, R. J. Fair, A. Grafmüller, P. H. Seeberger, M. Delbianco, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 13127–13132; *Angew. Chem.* **2019**, *131*, 13261–13266.
- [52] M. Hurevich, J. Kandasamy, B. M. Ponnappa, M. Collot, D. Kopetzki, D. T. McQuade, P. H. Seeberger, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 1794–1797.
- [53] H. Yu, H. Chokhawala, R. Karpel, H. Yu, B. Wu, J. Zhang, Y. Zhang, Q. Jia, X. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17618–17619.
- [54] Y. Kajihara, T. Yamamoto, H. Nagae, M. Nakashizuka, T. Sakakibara, I. Terada, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8632–8635.
- [55] H. Feinberg, M. E. Taylor, N. Razi, R. McBride, Y. A. Knirel, S. A. Graham, K. Drickamer, W. I. Weis, *J. Mol. Biol.* **2011**, *405*, 1027–1039.
- [56] I. van Die, S. van Vliet, A. Kwame Nyame, R. D. Cummings, C. M. C. Bank, B. Appelmelk, T. B. H. Geijtenbeek, Y. van Kooyk, *Glycobiology* **2003**, *13*, 471–478.
- [57] J. J. García-Vallejo, E. van Liempt, P. da Costa Martins, C. Beckers, B. van het Hof, S. I. Gringhuis, J.-J. Zwaginga, W. van Dijk, T. B. H. Geijtenbeek, Y. van Kooyk, *Mol. Immunol.* **2008**, *45*, 2359–2369.
- [58] B. J. Appelmelk, I. van Die, S. J. van Vliet, C. M. J. E. Vandenberghe-Grauls, T. B. H. Geijtenbeek, Y. van Kooyk, *J. Immunol.* **2003**, *170*, 1635–1639.
- [59] Y. Guo, H. Feinberg, E. Conroy, D. A. Mitchell, R. Alvarez, O. Blixt, M. E. Taylor, W. I. Weis, K. Drickamer, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 591–598.
- [60] H. Feinberg, R. Castelli, K. Drickamer, P. H. Seeberger, W. I. Weis, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 4202–4209.
- [61] J. Hanske, S. Aleksić, M. Ballaschk, M. Jurk, E. Shanina, M. Beerbaum, P. Schmieder, B. G. Keller, C. Rademacher, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 12176–12186.
- [62] J. Aretz, H. Baukman, E. Shanina, J. Hanske, R. Wawrzinek, V. A. Zapol'skii, P. H. Seeberger, D. E. Kaufmann, C. Rademacher, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 7292–7296; *Angew. Chem.* **2017**, *129*, 7398–7402.
- [63] B. G. Keller, C. Rademacher, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2020**, *62*, 31–38.
- [64] G. Beshr, R. Sommer, D. Hauck, D. C. B. Siebert, A. Hofmann, A. Imberty, A. Titz, *MedChemComm* **2016**, *7*, 519–530.
- [65] M. P. Williamson, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2013**, *73*, 1–16.
- [66] S. Perret, C. Sabin, C. Dumon, M. Pokorná, C. Gautier, O. Galanina, S. Ilia, N. Bovin, M. Nicaise, M. Desmadril, et al., *Biochem. J.* **2005**, *389*, 325–332.
- [67] N. Gilboa-Garber, D. Sudakevitz, M. Sheffi, R. Sela, C. Levene, *Glycoconjugate J.* **1994**, *11*, 414–417.
- [68] I. Joachim, S. Rikker, D. Hauck, D. Ponader, S. Boden, R. Sommer, L. Hartmann, A. Titz, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 7933–7948.
- [69] G. Sugiarto, K. Lau, J. Qu, Y. Li, S. Lim, S. Mu, J. B. Ames, A. J. Fisher, X. Chen, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 1232–1240.
- [70] L. Ban, N. Pettit, L. Li, A. D. Stuparu, L. Cai, W. Chen, W. Guan, W. Han, P. G. Wang, M. Mrksich, *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 769–773.
- [71] W. Shao, R. Sharma, M. H. Clausen, H. V. Scheller, *Plant Methods* **2020**, *16*, 99.
- [72] G. R. Craven, E. Steers, C. B. Anfinsen, *J. Biol. Chem.* **1965**, *240*, 2468–2477.
- [73] A. Baumann, S. Marchner, M. Daum, A. Hoffmann-Röder, *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, 3803–3815.
- [74] K. Dax, M. Albert, J. Ortner, B. J. Paul, *Carbohydr. Res.* **2000**, *327*, 47–86.
- [75] C. Bucher, R. Gilmour, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 8724–8728; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 8906–8910.
- [76] J. D. Martínez, A. I. Manzano, E. Calviño, A. De Diego, B. Rodríguez de Francisco, C. Romanò, S. Oscarson, O. Millet, H.-J. Gabius, J. Jiménez-Barbero, et al., *J. Org. Chem.* **2020**, *85*, 16072–16081.
- [77] Z. Serber, V. Dötsch, *Biochemistry* **2001**, *40*, 14317–14323.
- [78] M. J. Smith, C. B. Marshall, F.-X. Theillet, A. Binolfi, P. Selenko, M. Ikura, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2015**, *32*, 39–47.

Manuskript erhalten: 22. Februar 2021
Veränderte Fassung erhalten: 19. März 2021
Akzeptierte Fassung online: 30. März 2021
Endgültige Fassung online: 7. Mai 2021