

## Durch Fluoreszenz-Fingerprinting zu molekularen Erkennungslandschaften\*\*

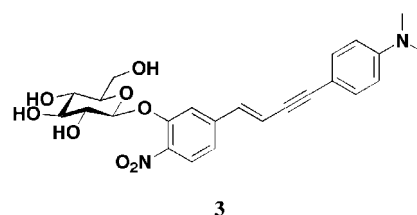
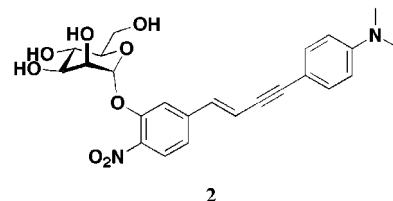
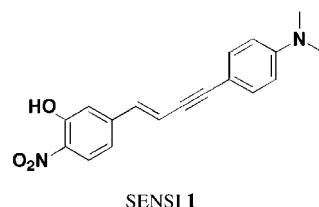
Manfred Auer,\* Christine Graf und James J. La Clair\*

Die Zahl verschiedener Moleküle, die in einem einzigen Experiment untersucht werden können, hat sich im letzten Jahrzehnt drastisch erhöht. Dieser Fortschritt ermöglicht es nun, molekulares Material in einem noch nie dagewesenen Umfang zu testen, was nicht zuletzt maßgeblich dazu beigetragen hat, solch groß angelegte Projekte wie die Sequenzierung des Genoms von mehr als 30 Organismen durchzuführen.<sup>[1]</sup> In der nächsten Entwicklungsstufe müssen diese Fortschritte nun in ein gängiges Format überführt werden, um so ein vorhandenes Medium für Informationen auf molekularer Ebene zu erweitern. Mit bis zu  $10^6$  erfassten molekularen Erkennungsereignissen sind Techniken wie die DNA-Mikroarrays<sup>[2]</sup> bereits im Begriff, dieses Niveau zu erreichen. Dagegen bestehen noch beträchtliche Hürden, mit diesen und ähnlichen mehrdimensionalen Techniken einzelne molekulare Spezies in einer Ansammlung von strukturell und/oder biophysikalisch ähnlichen Molekülen zu identifizieren.

Mehrdimensionales Testen (Screening) von molekularen Wechselwirkungen ist heute dank der Entwicklung folgender Techniken möglich: 1) räumlich adressierbare Mikroarrays,<sup>[2]</sup> 2) empfindlichere Sensoren (z. B. Einzelmolekülspektroskopie),<sup>[3]</sup> 3) molekulares Codieren,<sup>[4]</sup> 4) „molekulare Nasen“<sup>[5]</sup> und/oder 5) Mikroroboter.<sup>[6]</sup> Derzeit basiert ein wesentlicher Teil der Testmethoden auf fluoreszenzspektroskopischer Detektion. Dabei werden in der Regel stationäre (steady-state) fluoreszierende Proben untersucht (d. h. Verbindungen, die wegen ihres starren Gerüsts bei minimaler Abhängigkeit von der Wellenlänge maximal fluoreszieren).

Das Fluorophor **1** hingegen kann wegen der Rotationsmöglichkeiten um sechs seiner Bindungen eine Vielzahl an Konformationen sowohl im Grund- als auch im angeregten Zustand einnehmen.<sup>[7]</sup> Jede dieser Konformationen weist einen anderen Konjugationsgrad auf und erhöht damit die Informationsdichte in den Absorptions- und Emissionsspektren. Die komplexe Photophysik dieses Systems<sup>[8]</sup> bietet also einen wesentlich größeren Informationsgehalt als traditionelle starre Fluorophore wie Fluorescein und Rhodamin.

Die Einschränkung des Konformationsraums um **1** bei Wechselwirkung mit der Oberfläche anderer Moleküle oder



Molekülgruppen kann den Übergang in bestimmte Charge-Transfer-Zustände oder Konformere beeinträchtigen und damit die photophysikalische Antwort verringern.<sup>[8]</sup> Dies kann genutzt werden, um molekulare Erkennungsereignisse zu identifizieren. Wir zeigen hier, wie mit diesem Werkzeug niedrigaffine molekulare Wechselwirkungen erkannt und unterschieden werden können. Als Modellsystem wurde eine typische Klasse von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen herangezogen.

Agglutinine von *Lens culinaris* (LCA),<sup>[9]</sup> *Galanthus nivalis* (GNL)<sup>[10]</sup> und *Pisum sativum* (PSA)<sup>[11]</sup> erkennen  $\alpha$ -Mannoside,<sup>[12]</sup> nicht jedoch  $\beta$ -Glucoside. Die Lectine LCA und PSA sind zu 91 % homolog und haben ähnliche dreidimensionale Strukturen. Beide sind homodimere Proteine, die aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette bestehen. Wie bei anderen Leguminose-Lectinen erstrecken sich zwei große antiparallele  $\beta$ -Faltblätter über das gesamte Dimer, wobei ein Calcium- und ein Manganatom in der Nähe der Kohlenhydrat-Erkennungsstelle lokalisiert sind.<sup>[9, 11]</sup> Die dimeren LCA- und PSA-Komplexe enthalten vier mögliche Bindungsstellen für Kohlenhydrate.

Im Gegensatz zu LCA und PSA gehört das tetramere GNL zur Überfamilie der  $\alpha$ -D-Mannose-spezifischen pflanzlichen Bulbus-Lectine – einer Gruppe von Molekülen, die Retroviren sehr gut inhibieren. Die Kristallstrukturanalyse dieses Lectins im Komplex mit Methyl- $\alpha$ -D-mannose ergab eine neuartige  $\beta$ -Faltblatt-Polypeptidstruktur mit dreizähliger Symmetrie. Drei antiparallele, viersträngige  $\beta$ -Faltblätter, von denen jedes eine konservierte Mannose-Bindungsstelle enthält, sind zu einem zwölfsträngigen  $\beta$ -Zylinder zusammengefasst. Mittels C-terminalem Strangtausch bilden jeweils Paare von Monomeren stabile Dimere. Die daraus resultierenden  $\beta$ -Faltblatt-Hybride sind die eigentlichen Stellen für das hochaffine Binden von Mannose im Bereich der Dimer-

[\*] Univ.-Doz. Dr. M. Auer, C. Graf  
Allergic Diseases Unit  
Fluorescence based HTS-Technology Program  
Novartis Forschungsinstitut GmbH  
Brunner Straße 59, 1235 Wien (Österreich)  
Fax: (+43)1-86634-727  
E-mail: manfred.auer@pharma.novartis.com  
Dr. J. J. La Clair  
Bionic Brothers  
Postfach 511107, 13371 Berlin (Deutschland)  
E-mail: bionicbros@yahoo.com

[\*\*] J.J.L. dankt Wolfgang Rettig (Humboldt-Universität) für seine Großzügigkeit während der Erstellung dieses Manuskripts und der Uebbing Foundation für ihre Unterstützung. M.A. dankt Jan E. de Vries für stete Förderung und Unterstützung.

Verknüpfungsstellen. Die Besetzungsdichte, die an entsprechenden Stellen in anderen  $\beta$ -Faltblattproteinen ermittelt wurde, lässt darauf schließen, dass möglicherweise zwölf Bindungsstellen pro Tetramer existieren.<sup>[10]</sup>

Eine Reihe von Kohlenhydratliganden wurde hergestellt, indem mit Hilfe einer bereits beschriebenen Phasentransfermethode<sup>[7]</sup> das anomere Zentrum des jeweiligen Kohlenhydrats an die phenolische Hydroxygruppe von **1** gebunden wurde.<sup>[12]</sup> Auf diese Art wurden sowohl Kohlenhydratkonjugate des aktiv bindenden  $\alpha$ -Mannosid-<sup>[12]</sup> als auch des nichtbindenden  $\beta$ -Glucosidtyps erhalten (**2** bzw. **3**). In einem Wellenlängenbereich von  $\lambda_a = 350$  bis 450 nm für die Anregung und  $\lambda_e = 480$  bis 600 nm für die Emission konnte selbst mit der maximalen Empfindlichkeit unseres Fluorometers<sup>[13]</sup> nicht zwischen der Fluoreszenz wässriger Lösungen von **1–3** und dem Hintergrund unterschieden werden.

Erst nach Zugabe eines Lectins konnte die Fluoreszenz des Labels **1** detektiert werden. Wie man in Abbildung 1a rechts oben erkennt, fluoreszierten bei einer Anregungswellenlänge

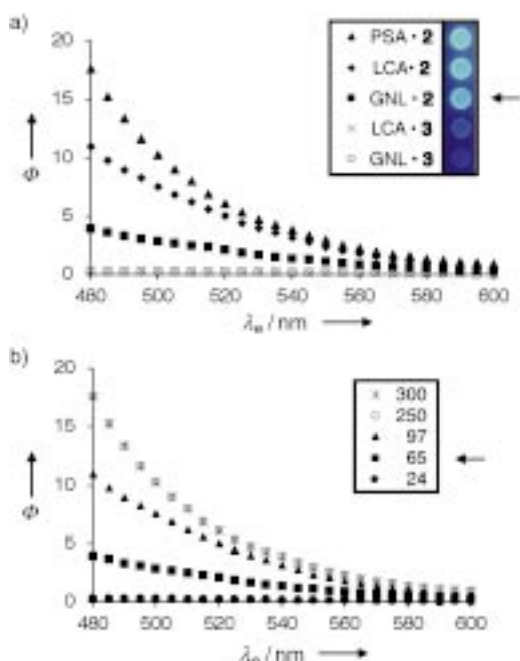


Abbildung 1. Fluoreszenzemissionsspektren der Komplexe aus den Kohlenhydratkonjugaten **2** und **3** und den Lectinen PSA, LCA und GNL. Es ist die Intensität  $\Phi$  in Abhängigkeit von der Emissionswellenlänge  $\lambda_e$  bei einer vorgegebenen Anregungswellenlänge ( $\lambda_a = 370$  nm) aufgetragen. a) Nach Inkubation von  $300 \mu\text{M}$  Lectin mit  $200 \mu\text{M}$  Kohlenhydratkonjugat. Am Einschub oben rechts ist zu erkennen, welche der Reaktionsgefäße Fluoreszenz aussandten. Für die relativen Intensitäten gilt:  $\text{PSA} \cdot \mathbf{2} > \text{LCA} \cdot \mathbf{2} > \text{GNL} \cdot \mathbf{2} \gg \text{LCA} \cdot \mathbf{3} \sim \text{GNL} \cdot \mathbf{3}$ . b) Bei Titration von  $200 \mu\text{M}$  **2** mit PSA in unterschiedlichen Konzentrationen. Die in (a) gegebene spektrale Information konnte bei identischen Spektrometereinstellungen durch schrittweise Änderung der PSA-Konzentration von 24 auf  $300 \mu\text{M}$  reproduziert werden. Man beachte, dass die durch Pfeile gekennzeichneten Spektren (d.h.  $300 \mu\text{M}$  GNL mit  $200 \mu\text{M}$  **2** und  $65 \mu\text{M}$  PSA mit  $200 \mu\text{M}$  **2**) kaum zu unterscheiden sind.

von 370 nm nur die Proben, die Gemische aus den Lectinen und **2** enthielten. Mit einer herkömmlichen zweidimensionalen Analysenmethode würde man nun darauf schließen, dass

die Lectine PSA, LCA und GNL **2** binden, **3** jedoch nicht. Über die Auftragung der Fluoreszenzintensität als Funktion der Emissionswellenlänge, wie bei den fünf Spektren in Abbildung 1a geschehen, könnte dann jede dieser Wechselwirkungen identifiziert werden. Um sicher zu sein, auf diesem Weg gültige Ergebnisse zu erhalten, müsste jedoch zunächst nachgewiesen werden, dass die beobachteten Effekte nicht auch durch eine Veränderung der Komplexstöchiometrie ausgelöst werden können. Wie Abbildung 1b belegt, konnte eine ähnliche Reihe von Spektren durch Mischen von **2** mit PSA in unterschiedlichen Konzentrationen erzeugt werden. Vergleicht man die Spektren in Abbildung 1, erkennt man, dass die durch Pfeile gekennzeichneten kaum zu unterscheiden sind ( $65 \mu\text{M}$  PSA und  $200 \mu\text{M}$  **2** sowie  $200 \mu\text{M}$  **2** und  $300 \mu\text{M}$  GNL; beide mit Quadraten wiedergegeben).

Glücklicherweise erwies sich, dass die Fluoreszenzantwort von **1** sowohl von der Anregungs- als auch von der Emissionswellenlänge abhängig ist. Es wurden deshalb von den vorbereiteten Komplexen Daten in drei Dimensionen aufgenommen. Die resultierenden Topographien (Abbildung 2) illustrieren, wie einfach es damit wird, molekulare Erkennungsereignisse durch eine Fluoreszenz-„landschaft“ zu charakterisieren. Die Zugabe von LCA und PSA zu **2** ergab sehr ähnliche Spektren (Abbildung 2a–c); nur in den Fluoreszenzintensitäten bei  $\lambda_a = 410$  nm und  $\lambda_e = 505$  nm tritt eine geringe Abweichung auf.<sup>[14]</sup> Das strukturell abweichende Lectin GNL lieferte eine deutlich andere Topologie (Abbildung 2d) mit einem zweiten Maximum bei  $\lambda_a = 413$  nm und  $\lambda_e = 490$  nm. Die mit **2** erhaltenen Konturliniendiagramme (Abbildung 2b–d) unterschieden sich wiederum von denen, die man mit dem nichtbindenden Kohlenhydrat **3** erhielt (Abbildung 2e, f). Aus dem Konturlinienverlauf im Bereich  $\lambda_a = 420$ – $440$  nm (Anregung) und  $\lambda_e = 520$ – $570$  nm (Emission) konnten unspezifische Wechselwirkungen von **3** mit (multiplen) Bindungsstellen leicht erkannt werden.

Ein Vergleich von Abbildung 2b oder 2c mit Abbildung 2d veranschaulicht, wie PCA oder LCA mit Hilfe von **2** von GNL unterschieden werden können. Dagegen ermöglichten Auftragungen, die unter denselben Bedingungen mit dem nichtbindenden Liganden **3** erhalten wurden, keine Unterscheidung der beiden Agglutinin-Klassen (Abbildung 2e und f), da die Strukturen dieser Diagramme mit einer Abweichung bis zu 40 % bei jedem Datenpunkt selbst bei mehrfacher Wiederholung der Messungen inkonsistent und nicht reproduzierbar waren. Diese Diskrepanz ist hauptsächlich auf das wegen der niedrigen Fluoreszenzintensität (Abbildung 2h) schlechtere Signal-Rausch-Verhältnis zurückzuführen. Doch auch andere unspezifische Wechselwirkungen (z.B. zwischen **1–3** und Rinderserumalbumin (BSA)) lieferten ähnlich inkonsistente Datensätze.<sup>[15]</sup>

Der wesentliche Nutzen dieser Methode ist also, dass sie hilft, molekulare Erkennungsereignisse von stöchiometrischen Effekten zu unterscheiden. Die Ähnlichkeit der Spektren von **2** in Gegenwart von  $300 \mu\text{M}$  GNL und von  $65 \mu\text{M}$  PSA in Abbildung 1 (Pfeile) geht bei der dreidimensionalen Analyse verloren. Vielmehr bleibt die Struktur des Konturliniendiagramms unabhängig von der PSA-Konzentration erhalten (vgl. Abbildung 2b und g), auch wenn die Intensität abnimmt (Abbildung 2h), und ermöglicht damit selbst bei der

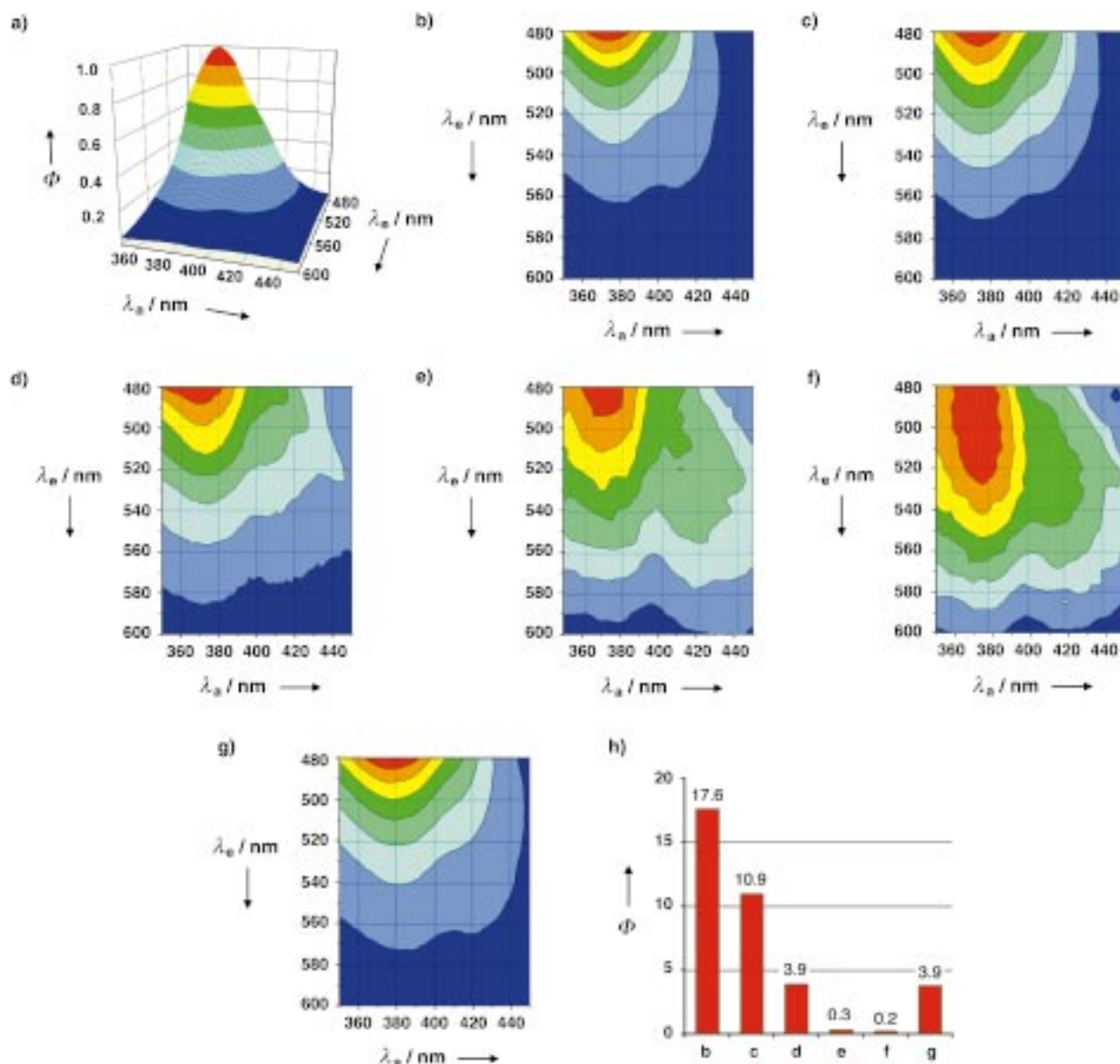


Abbildung 2. Fingerprinting-Analyse von Wechselwirkungen zwischen den Kohlenhydratlignanden **2** und **3** und den Lectinen PSA, LCA und GNL mit Hilfe der auf eins normierten Fluoreszenzintensität  $\Phi$  als Funktion der Anregungswellenlänge  $\lambda_a$  und der Emissionswellenlänge  $\lambda_e$  [a) als dreidimensionale Darstellung, b)–g) als Konturliniendiagramm]. Verwendeter Farbcode für  $\Phi$ : 1.0–0.875 (rot), 0.875–0.750 (orange), 0.750–0.625 (gelb), 0.625–0.500 (grün), 0.500–0.375 (hellgrün), 0.375–0.250 (hellblau), 0.250–0.125 (blau), 0.125–0 (violett). a) und b) 200  $\mu\text{M}$  **2** mit 300  $\mu\text{M}$  PSA, c) 200  $\mu\text{M}$  **2** mit 300  $\mu\text{M}$  LCA, d) 200  $\mu\text{M}$  **2** mit 300  $\mu\text{M}$  GNL, e) 200  $\mu\text{M}$  **3** mit 300  $\mu\text{M}$  LCA, f) 200  $\mu\text{M}$  **3** mit 300  $\mu\text{M}$  GNL, g) 200  $\mu\text{M}$  **2** mit 65  $\mu\text{M}$  PSA. h)  $\Phi$ -Werte aus (a)–(g) für  $\lambda_a = 370$ ,  $\lambda_e = 480$  nm.

niedrigeren PSA-Konzentration noch eine Unterscheidung zwischen PSA und GNL (Abbildung 2g und d).

Die Kombination des nichtstarren Fluoreszenzmarkers **1** mit dreidimensionaler Fluoreszenzspektroskopie ergibt eine effiziente Methode, um anhand molekularer Wechselwirkungen Strukturmerkmale zu erkennen. In unserem Beispiel konnten Protein-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen mit niedriger Affinität ( $K_d \sim 10$ – $50$   $\mu\text{M}$ ) nachgewiesen werden. Aufgrund ihrer technisch einfachen Durchführung bietet die vorgestellte Methode eine adäquate Möglichkeit zur Erhöhung der Verlässlichkeit von Affinitätsmatrices, und sie ist ideal geeignet, um eine Vielzahl von biologischen und chemischen Prozessen zu charakterisieren, insbesondere im

Bereich des Wirkstoff-Screenings, der Bestimmung von chemischer Reinheit und der Identifizierung von Einzelkomponenten in Gemischen.

Derzeit sind niedrigaffine Wechselwirkungen im Bereich  $K_d = 10$ – $100$   $\mu\text{M}$  im pharmazeutischen Wirkstoff-Screening sehr schwierig zu messen. Da Konjugate aus **1** und einer Vielzahl von Ligandenklassen einschließlich der Kohlenhydrate und Lipide nun für das Screening zugänglich werden, ist diese Methode ein vielversprechendes Werkzeug zur Erweiterung der Möglichkeiten sowohl in primären, als auch in sekundären Assays. Es ist nicht die Affinität, sondern der „Fingerabdruck“ einer molekularen Erkennung, der Hit-Substanzen für In-vitro- und In-vivo-Untersuchungen sowie

für das Aufstellen von fundierten Struktur-Aktivitäts-Beziehungen selektiert – wichtigen Informationen für die Bioinformatik, das Molecular Modeling und/oder das rationale Wirkstoffdesign.

## Experimentelles

Die Kohlenhydrat-Lectin-Mischungen wurden durch Zugabe einer 20.6 mM DMSO-Vorratslösung von **2** oder **3** zu 200  $\mu$ L des Lectins (Sigma) in 18 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM  $\text{MnCl}_2$ , 1 mM NaCl, pH 7.2 hergestellt; die endgültigen Kohlenhydrat- und Lectinkonzentrationen waren 200 bzw. 300  $\mu$ M. Diese Lösungen wurden durch einen 0.2- $\mu$ m-Spritzenfilter (Millipore) filtriert und in eine 160- $\mu$ L-Quarzglasküvette transferiert.

Die Fluoreszenzmessungen wurden bei 25 °C im Photonen-zählmodus<sup>[13]</sup> unter dem magischen Winkel und bei Emissions- und Anregungswellenlängenbandbreiten von 8 nm durchgeführt. Als Standard diente 5-Carboxytetramethylrhodamin. Für die 3D-Messungen wurde der Anregungsmo- nochromator in 2-nm-Inkrementen von  $\lambda_a = 350$  nm bis 450 nm durch- gefahren; die Aufnahmen im Emissionskanal erfolgten in 5-nm-Schritten von  $\lambda_e = 480$  nm bis 600 nm. Die Topologien wurden anschließend mittels zweier Durchgänge eines Trinomalgorithmus geglättet, prozessiert und graphisch dargestellt.<sup>[16]</sup>

Eingegangen am 30. März 2000,  
veränderte Fassung am 9. März 2001 [Z14925]

- [1] Siehe [www.tirg.org](http://www.tirg.org).
- [2] a) D. J. Lockhardt, E. A. Winzler, *Nature* **2000**, *405*, 827–836; b) G. Ramsay, *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16*, 40–44.
- [3] a) W. E. Moerner, M. Orrit, *Science* **1999**, *283*, 1670–1676; b) S. Weiss, *Science* **1999**, *283*, 1676–1683; c) P. Schwille, J. Bieschke, F. Oehlenschlaeger, *Biophys. Chem.* **1997**, *66*, 211–228; d) M. Brinkmeier, K. Dorre, K. Riebesel, R. Rigler, *Biophys. Chem.* **1997**, *66*, 229–239.
- [4] a) K. S. Lam, *Anti-Cancer Drug Des.* **1997**, *12*, 145–167; b) D. Madden, K. Viktor, M. Lebl, *Perspect. Drug Discovery Des.* **1995**, *2*, 269–285.
- [5] D. R. Walt, *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 267–278.
- [6] a) B. R. Nelson, J.-M. Breguet, *Proc. Int. Soc. Opt. Eng.* **2000**, *4194*, 1–197; b) B. R. Nelson, J.-M. Breguet, *Proc. Int. Soc. Opt. Eng.* **1999**, *3834*, 1–230; c) A. Sulzmann, B. J. Nelson, *Proc. Int. Soc. Opt. Eng.* **1998**, *3159*, 1–234.
- [7] a) Der Name SENSI für Fluorophore des Typs **1** wurde erstmals verwendet in J. J. La Clair (Scripps Research Institute), US-A 6140041; b) J. J. La Clair, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 339–343; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 325–329; c) J. J. La Clair, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7676–7684.
- [8] Die photophysikalischen Eigenschaften von **1** werden noch zusätzlich verkompliziert, weil die Dreifachbindung zu weiteren Charge-Transfer-Zuständen Anlass gibt. Für Einzelheiten siehe: W. Rettig, *Angew. Chem.* **1986**, *98*, 969–986; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, *25*, 971–988; Y. Hirata, T. Okada, T. Nomoto, *Chem. Phys. Lett.* **1997**, *278*, 133–138.
- [9] LCA ist ein Tetramer aus zwei Untereinheiten (19874 kD) mit je 181 Aminosäuren und zwei mit je 52 Aminosäuren (5724 kD). Für die Kristallstrukturanalyse und Sequenzinformationen siehe: A. Foriers, E. Lebrun, R. Van Rapenbusch, R. de Neve, A. D. Strosberg, *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 5550–5560. Die Struktur kann außerdem aus der Proteindatenbank (PDB) unter 1lem, 1len, 1les und 1lal heruntergeladen werden.
- [10] GNL ist ein Tetramer aus vier identischen Untereinheiten mit einer Länge von je 109 Aminosäuren (12037 kD). Für die Kristallstrukturanalyse und Sequenzinformationen siehe: G. Hester, H. Kaku, I. J. Goldstein, C. S. Wright, *Nat. Struct. Biol.* **1995**, *2*, 472–479; G. Hester, C. S. Wright, *J. Mol. Biol.* **1996**, *262*, 516–531; G. Hester, C. S. Wright, *Structure* **1996**, *4*, 1339–1352. Die Struktur kann außerdem aus der PDB unter 1jpc, 1msa und 1niv heruntergeladen werden.
- [11] Die Struktur von PSA ähnelt der Struktur von LCA. Es ist ebenfalls ein Tetramer aus zwei Untereinheiten (19969 kD) mit je 181 Aminosäuren und zwei mit je 52 Aminosäuren (5574 kD). Für die Kristallstrukturanalyse und Sequenzinformationen siehe: E. J. Meehan, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 13278–13282; G. Gebauer, E. Schilt, H. Rudiger, *Eur. J. Biochem.* **1981**, *113*, 319–325. Die Struktur kann außerdem aus der PDB unter 1bqp, 1rin und 2ltu heruntergeladen werden.
- [12] Jedes der eingesetzten Lectine erkennt  $\alpha$ -Mannopyranoside mit Affinitäten zwischen 5 und 100  $\mu$ M. Dies gilt auch für Kohlenhydrate, die über ihr anomeres Zentrum an Kolorimetrie- oder Fluoreszenzfarbstoffe gebunden sind. Das Einbringen dieser Labels führt typischerweise zu einer Abnahme der Affinität des Kohlenhydratligen um etwa eine Zehnerpotenz. Das bedeutet, dass das verwendete stöchiometrische Verhältnis von Lectin und **2** gewährleistet, dass zumindest 80 % des Kohlenhydratligen an das Lectin gebunden vorliegen.
- [13] Die Fluoreszenzmessungen wurden an einem SLM-8100C-Fluorometer, ausgestattet mit einem JD-590-Photomultiplier und einer 450-W-Xenon-Bogenlampe (SLM Instruments) durchgeführt.
- [14] Dieser Unterschied rührt von strukturellen Eigenschaften und nicht von der Assoziations- oder Aggregationskinetik der Komplexe her. Dies wurde dadurch verifiziert, dass auch bei Wiederholung der Messungen mit um 15 % reduzierten Lectinkonzentrationen Topologien erhalten wurden, die zu jenen in Abbildung 2 gezeigten identisch waren.
- [15] BSA erkennt keines der Kohlenhydrate und dient daher als Maß für unspezifische Wechselwirkungen. Entsprechend sind ein weiterer Beleg dafür, dass die Fluoreszenzantwort von **3** auf unspezifische Wechselwirkungen zurückzuführen ist, die bemerkenswert ähnlichen Konturliniendiagramme, die bei der Zugabe von **3** zu LCA und BSA resultieren. Dies stützt die Annahme, dass die Erhöhung der Fluoreszenzintensität bei **2** teilweise durch die Anlagerung der Kohlenhydratdomäne an oder nahe der spezifischen Bindungsstelle des Lectins hervorgerufen wird.
- [16] Das Glätten der Daten wurde mit dem Trinomalgorithmus des Software-Pakets v1995 durchgeführt, das im Spektrometer SLM-8100C, Serie 2 verwendet wird. Die Rohdaten wurden dann in Excel 97 (Microsoft) bearbeitet und ihre graphische Darstellung mit Origin 5 (Microcal) erzeugt.