

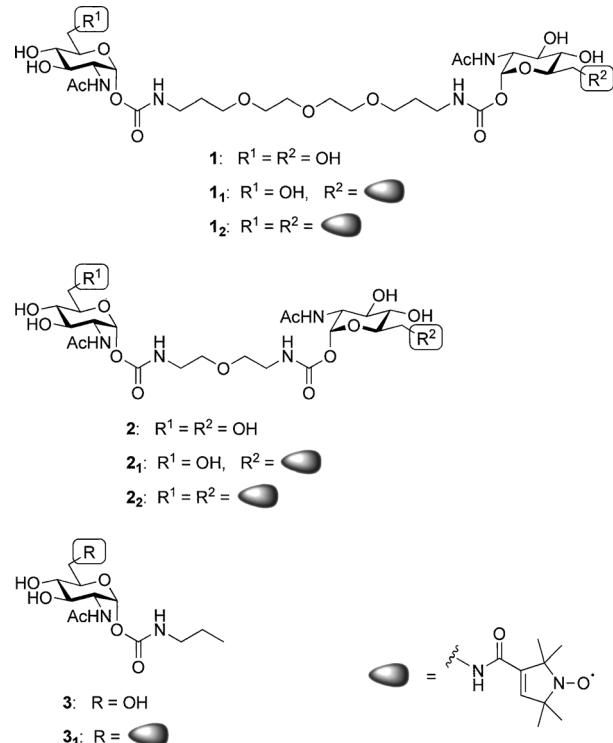
Mechanistische Untersuchung multivalenter Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen durch EPR-Spektroskopie**

Patrick Braun, Bettina Nägele, Valentin Wittmann* und Malte Drescher

Professor Richard R. Schmidt gewidmet

Wechselwirkungen zwischen multivalenten Kohlenhydratderivaten und Kohlenhydrat bindenden Proteinen (Lectinen) werden häufig in biologischen Systemen beobachtet. Ihre Inhibition mithilfe maßgeschneiderter multivalenter Liganden ist eine hochwirksame Methode zur Behandlung vieler menschlicher Krankheiten.^[1] Multivalenz kann zu deutlich höheren Bindungssaffinitäten und -spezifitäten als monovalente Wechselwirkungen führen. Verschiedene Mechanismen wurden zur Erklärung der erhöhten Bindungssaffinitäten vorgeschlagen.^[1f,2] Einer davon ist das überbrückende Binden benachbarter Bindungsstellen durch den multivalenteren Liganden (Chelateffekt),^[3] dem der größte Beitrag zu erhöhter Bindungssaffinität zugeschrieben wird. Kürzlich gelang es uns, die Chelatbindung von multivalenten *N*-Acetylglucosamin-(GlcNAc-)Derivaten an Weizenkeimagglutinin (WGA) röntgenkristallographisch zu charakterisieren.^[4] Da die Kristallstruktur von Biomolekülen bekanntermaßen nicht zwangsläufig deren Struktur in Lösung entspricht^[5] und auch Bindungsmechanismen in dichten Kristallpackungen von denen in Lösung differieren können, ist die Untersuchung multivalenter Wechselwirkungen in Lösung von großer Bedeutung. Hier zeigen wir, wie zu diesem Zweck Elektronenspinresonanz(EPR)-Spektroskopie an spinmarkierten Liganden eingesetzt werden kann, und führen den strukturbasierten Nachweis, dass ein multivalentes GlcNAc-Derivat in Lösung chelatisierend an WGA bindet.

WGA ist ein pflanzliches Lectin, das ein stabiles 36-kDa-Homodimer mit einer zweizähligen Symmetriearchse bildet und spezifisch terminale *N*-Acetylneuraminsäure und GlcNAc bindet.^[6] WGA enthält acht Bindungsstellen, die mit A1, B1C2, C1B2, D1A2, A2, B2C1, C2B1 und D2A1 bezeichnet werden.^[7] Wir konnten bereits durch Kristallstrukturanalyse zeigen, dass vier Moleküle des divalenten Liganden **1** (Schema 1) gleichzeitig an alle acht GlcNAc-Bin-



Schema 1. Mono- und divalente WGA-Liganden.

dungsstellen des WGA-Dimers binden, sodass jeder Ligand benachbarte Bindungsstellen überbrückend besetzt, also B1C2-C2B1, B2C1-C1B2, A1-D2A1 und A2-D1A2.^[4] Diese Struktur erklärt die hohe Bindungssaffinität von **1** für WGA ($IC_{50} = 57 \mu\text{M}$),^[4] die durch einen enzymgekoppelten Lectin-bindungstest (ELLA)^[8] bestimmt wurde. Der divalente Ligand **2** mit einem kürzeren Linker weist einen IC_{50} -Wert von $734 \mu\text{M}$, das monovalente GlcNAc-Derivat **3** einen von 8 mM auf.^[4]

Analoge von **1**, **2** und **3**, die entweder eine (**1₁**, **2₁**, **3₁**) oder zwei (**1₂**, **2₂**) Nitroxid-Spinsonden enthalten, wurden sowohl mit Continuous-Wave(cw)-EPR-Spektroskopie als auch mit einer gepulsten Zweifrequenz-EPR-Methode untersucht. So gelang nun der Nachweis der chelatisierenden Bindung von **1** auch in gefrorener, glasartiger Lösung. Weiterhin zeigen wir, dass Ligand **2**, mit dem kürzeren Linker zwischen den GlcNAc-Resten, anders als **1** nicht in der Lage ist, benachbarte Bindungsstellen überbrückend zu besetzen, sondern monovalent bindet.

Doppel-Elektron-Elektron-Resonanz (DEER oder PELDOR)^[9] ermöglicht das Ausmessen von Abstandsver-

[*] Dipl.-Chem. P. Braun, M. Sc. B. Nägele, Prof. Dr. V. Wittmann, Dr. M. Drescher
Universität Konstanz, Fachbereich Chemie und
Graduiertenschule Chemische Biologie (KoRS-CB)
78457 Konstanz (Deutschland)
Fax: (+49) 7531-88-4573
E-Mail: mail@valentin-wittmann.de

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DR 743/2-1), der Universität Konstanz und der Graduiertenschule Chemische Biologie gefördert. Wir danken Martin Spitzbarth, Timten Brink und Dr. Thomas Exner für ihre Beiträge zur Datenauswertung.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201101074> zu finden.

teilungen zwischen Spinsonden mit Abständen von bis zu 10 nm und ist damit hervorragend geeignet, multivalente Ligand-Protein-Interaktionen zu untersuchen. Nach unserer Kenntnis wird diese Methode hier erstmals in diesem Zusammenhang eingesetzt. Abstände unter 1.5 nm sind mit DEER nicht zugänglich^[10] und wurden deshalb mit Tieftemperatur-cw-EPR-Spektroskopie nachgewiesen. Die rotatorische Beweglichkeit wurde mit cw-EPR-Spektroskopie bei Raumtemperatur an einfach markierten Liganden bestimmt. Gemäß der Struktur des Komplexes von **1** und WGA im Kristall (PDB-Code: 2X52)^[4] sind die Hydroxygruppen in 6-Position der GlcNAc-Reste nicht an der Proteinbindung beteiligt und eignen sich sterisch für das Anbringen der Spinsonde. Dementsprechend wurde diese Hydroxygruppe eines oder beider GlcNAc-Reste von **1–3** durch eine Aminogruppe ersetzt und eine Nitroxid-Spinsonde über eine Amidbindung angebracht (Schema 1; Einzelheiten der Synthese in den Hintergrundinformationen).

Die Ligandenkonzentration für die EPR-Experimente betrug 33 μM . Für die DEER-Experimente wurden Proben mit und ohne Zusatz von WGA in wässriger Lösung mit 30% (v/v) Glycerin äquilibriert. Die Messungen erfolgten bei einer Temperatur von 40 K nach Schockfrieren der Proben, um die sich im Gleichgewicht befindlichen Konformationen zu fixieren (für Einzelheiten sowie DEER-Daten nach Basislinien-Korrektur siehe Hintergrundinformationen). Abstandsverteilungen wurden ohne Vorgabe eines Modells mit DEERAnalysis 2009^[11] erhalten.

DEER-Experimente an einer Lösung des divalenten, doppelt spinmarkierten Liganden **1₂** ohne Zugabe von WGA ergaben eine breite Abstandsverteilung zwischen den Spinsonden einschließlich signifikanter Beiträge unter 2 nm (Abbildung 1, unten) und sogar unter 1.5 nm, wie cw-EPR-Experimente zeigten (Hintergrundinformationen, Abbildung S1). Dies spiegelt die Flexibilität des Linkers zwischen den beiden spinmarkierten GlcNAc-Resten wider, die viele Konformationen mit unterschiedlichsten Spinsonden-Abständen ermöglicht (Abbildung 2 a). Die rotatorische Diffusion der Spinsonde an **1₁** ist bei Raumtemperatur so schnell

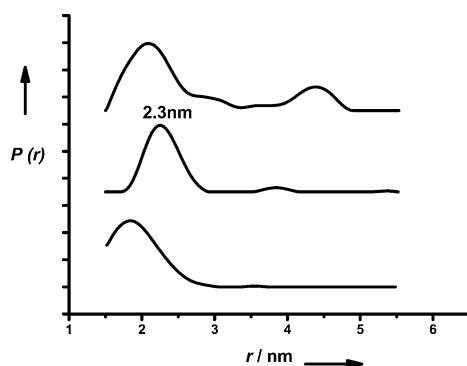


Abbildung 1. Mit DEER erhaltene Abstandsverteilungen für **1₂** ohne (unten) und mit WGA-Zusatz (molares Verhältnis WGA-Dimer/Ligand **1₂** 8:1 (Mitte) und 1:4 (oben)). Der Abstand bei 2.3 nm (Mitte) wird überbrückendem Binden an benachbarte primäre Bindungsstellen zugeordnet; weitere Abstände (oben) entsprechen Abständen zwischen Spinsonden an verschiedenen Liganden, die an dasselbe WGA-Dimer gebunden sind.

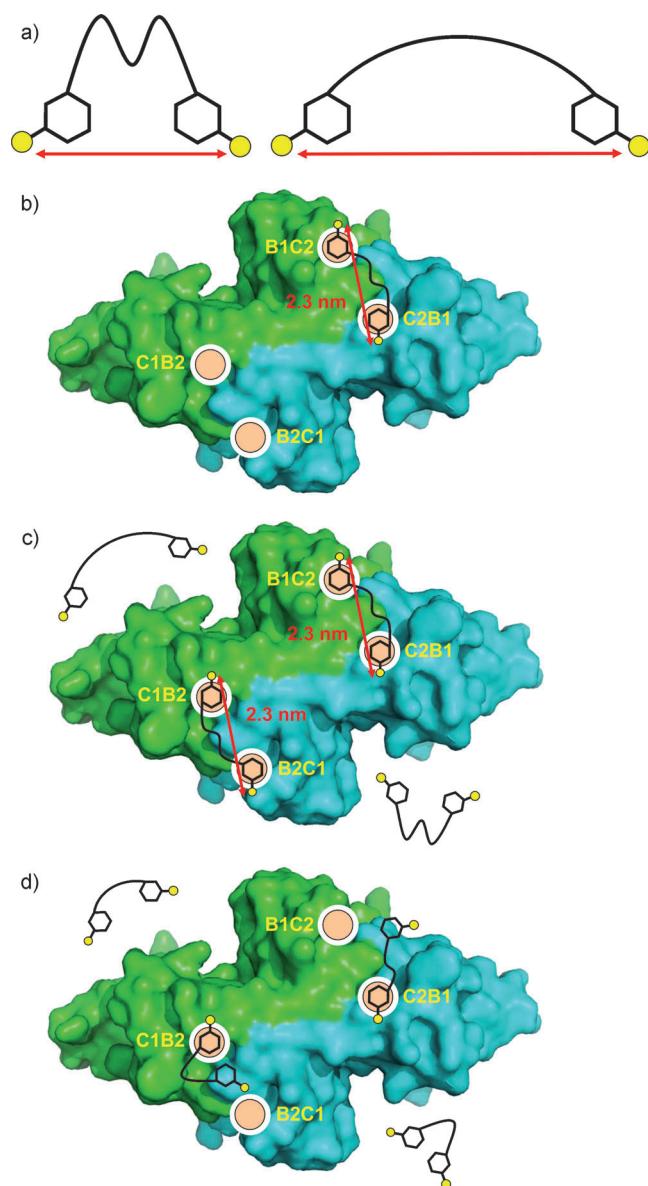


Abbildung 2. a) Divalenter Ligand **1₂** in Lösung; die Flexibilität des Linkers ermöglicht viele Konformationen mit unterschiedlichsten Abständen zwischen den Spinsonden. b) Vorgeschlagener Bindungsmodus für **1₂** in Gegenwart eines Überschusses an WGA-Dimer und c) eines Überschusses an Ligand **1₂**, d) Vorgeschlagener Bindungsmodus des divalenten Liganden **2₂** in Gegenwart eines Überschusses an WGA-Dimer. Die beiden Untereinheiten des WGA-Dimers sind blau und grün eingefärbt, die Nitroxidspinsonden sind als gelbe Kreise dargestellt.

($\tau_C = 120 \text{ ps}$; Abbildung S2, unten in den Hintergrundinformationen), wie man es für ein Molekül dieser Größe erwarten würde.

Unter der Annahme, dass der IC_{50} -Wert für den Liganden in etwa der Dissoziationskonstanten K_d entspricht, erwartet man bei Zugabe eines achtfachen molaren Überschusses an WGA-Dimer nahezu quantitatives Binden von **1** an das Protein. Entsprechend konnte unter solchen Bedingungen eine drastisch reduzierte rotatorische Mobilität des einfach markierten Liganden **1₁** festgestellt ($\tau_C = 1.8 \text{ ns}$; Hinter-

grundinformationen, Abbildung S2, Mitte) und somit quantitativen Binden bestätigt werden. Auch die Verteilung der Abstände zwischen den beiden Spinsonden von **1₂** ändert sich unter diesen Bedingungen deutlich. So wird die Breite der Abstandsverteilung geringer, ihr Maximum verschiebt sich zu 2.3 nm, und es kommen keine Abstände unterhalb 1.5 nm vor (Abbildung 1, Mitte; Hintergrundinformationen, Abbildung S1, Mitte). Diese Daten sprechen für einen gestreckten divalenten Liganden, der gleichzeitig mit beiden Zuckereinheiten an das Protein bindet (Abbildung 2b). Bei einem molaren Protein/Ligand-Verhältnis von 8:1 ist statistisch nicht mehr als ein divalenter Ligand an ein WGA-Dimer gebunden. Eine Auswertung der Abstandsverteilung unter Berücksichtigung der Kristallstruktur (PDB-Code: 2X52) sowie der Abmessungen und der Orientierungsmöglichkeiten der Spinsonden (Hintergrundinformationen, Abbildungen S4 und S5) zeigt, dass der Ligand benachbarte primäre Bindungsstellen besetzt (B1C2/C2B1 oder B2C1/C1B2).

Bei Verringerung der Proteinkonzentration auf ein molares WGA-Dimer/Ligand-Verhältnis von 1:4 erwartet man, dass nur ein Teil (< 40%) der divalenten Ligandenmoleküle an WGA bindet. Mobilitätsmessungen (Hintergrundinformationen, Abbildung S2, oben) deuten auf teilweises Binden hin. Dies spiegelt sich auch in der Abstandsverteilung zwischen den in **1₂** enthaltenen Spinsonden (Abbildung 1, oben) wider. Der Peak bei kleinen Abständen weist eine breitere Schulter auf der Seite der kleinen Abstände auf, und sein Maximum ist zu etwas geringeren Abständen verschoben. Dies lässt auf eine Überlagerung der Abstandsverteilungen für gebundene und ungebundene Liganden schließen. Entsprechende Simulationen sprechen dafür, dass etwa 40 % der Liganden gebunden sind. Außerdem zeigen die Tieftemperatur-cw-EPR-Experimente (Abbildung S1, oben in den Hintergrundinformationen) einen geringeren, aber dennoch signifikanten Anteil von Abständen < 1.5 nm als im Spektrum ohne WGA (Hintergrundinformationen, Abbildung S1, unten), die ungebundenem Liganden zugeordnet werden können. Während der Anteil an gebundenem Liganden mit sinkender Proteinkonzentration sinkt, nimmt die Zahl der gebundenen Liganden pro Protein jedoch zu und erreicht Werte größer als eins (Abbildung 2c). Dementsprechend weist die Abstandsverteilung zusätzliche Werte auf (Abbildung 1, oben), die Abständen zwischen Spinsonden an verschiedenen Molekülen von **1₂**, die an dasselbe WGA-Dimer gebunden sind, entsprechen. Die Analyse solcher multiplen Spin-Wechselwirkungen ist schwierig;^[12] dennoch sind ein deutlicher Peak bei $r=4.3$ nm und eine breitere Verteilung für $r<4$ nm in der Abstandsverteilung zu identifizieren. Diese Abstände entsprechen Interligandabständen zwischen den primären Bindungsstellen, wie sie der Kristallstruktur entnommen werden können (vgl. Hintergrundinformationen, Abbildung S4; Abstände zwischen den Sauerstoffatomen in der 6-Position der GlcNAc-Reste: 4.2, 2.6 und 3.5 nm). Die Interligandabstände zwischen den sekundären Bindungsstellen D2A1 und D1A2 (bis zu 5.3 nm) werden nicht beobachtet.

Für die divalenten Liganden **2₁** und **2₂** mit dem kurzen Linker stellt sich ohne WGA eine vergleichbare Situation wie für **1₁** bzw. **1₂** dar. Die rotatorische Diffusion von **2₁** ist schnell ($\tau_c=120$ ps; Abbildung S6, unten in den Hintergrundinfor-

mationen), Abstände unterhalb von 1.5 nm kommen vor (Hintergrundinformationen, Abbildung S7, oben), und die Abstandsverteilung von **2₂** aus dem DEER-Experiment weist einen einzelnen, breiten Peak mit einem Maximum bei 1.8 nm auf (Abbildung 3, unten). Dieses Maximum liegt beim gleichen Abstand wie bei dem für **1₂** gefundenen. Dies lässt sich

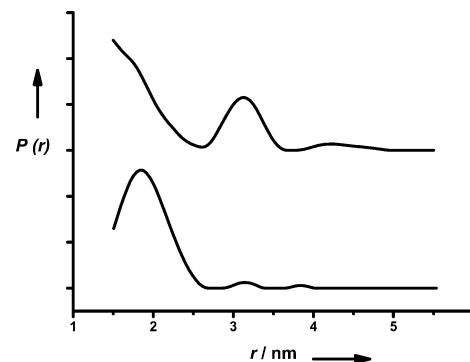


Abbildung 3. Abstandsverteilungen für **2₂** ohne (unten) und mit WGA (molares Verhältnis WGA-Dimer/Ligand **2₂** 8:1, oben). Kleine Peaks bei $r=3.1$ und 3.9 nm (unten) sind nicht signifikant (siehe die Hintergrundinformationen).

mit dem *gauche*-Effekt der Sauerstoffatome im Bereich des Linkers von **1₂** erklären, der zu einer gefalteten Konformation führt, die für Oligo(ethylenglycol)-Ketten bekannt ist.^[13] Nach Hinzugabe von WGA unterscheiden sich die Befunde für den kürzen Liganden **2₂** jedoch deutlich von denen für **1₂**. Selbst bei achtfachem Überschuss an WGA-Dimer bleibt die Hauptkomponente des cw-Spektrums von **2₁** bei Raumtemperatur überwiegend im Regime der schnellen Bewegung, wie vor der Zugabe von WGA. Nur ein kleiner Teil zeigt eine verringerte Mobilität (Hintergrundinformationen, Abbildung S6, oben). Somit kann auf eine niedrige, dem IC₅₀-Wert von **2** entsprechende Bindungsaffinität geschlossen werden. In der Abstandsverteilung für **2₂** unter diesen Bedingungen (Abbildung 3, oben) sind die gleichen kleinen Abstände wie in Abwesenheit von WGA enthalten (einschließlich solcher unter 1.5 nm; vgl. Hintergrundinformationen, Abbildung S7). Abstände bei $r=2.3$ nm, die der gestreckten, überbrückend bindenden Ligandenkonformation entsprächen, treten nicht signifikant auf. Es sind aber Abstände um 3 nm enthalten, die Interligandabständen zwischen spinmarkierten Liganden an C1B2 und C2B1 entsprechen. Insofern kann gefolgert werden, dass es einen kleinen Anteil monovalent gebundener divalenten Liganden gibt, der bevorzugt an C1B2 und C2B1 bindet (Abbildung 2d). Das Fehlen des charakteristischen Peaks bei $r=2.3$ nm, wie er für **1₂** beobachtet wurde, lässt darauf schließen, dass unter diesen Bedingungen benachbarte Bindungsstellen, also z. B. C1B2 und B2C1, nicht gleichzeitig besetzt werden. Da die Kristallstruktur keine Hinweise auf sterische Einschränkungen bietet, die ein solches gleichzeitiges Besetzen benachbarter Bindungsstellen ausschließen würden, ist die plausibelste Erklärung für diese Beobachtung, dass die Bindungsaffinitäten von C1B2 und C2B1 höher als die der anderen beiden primären Bindungsstellen sind.

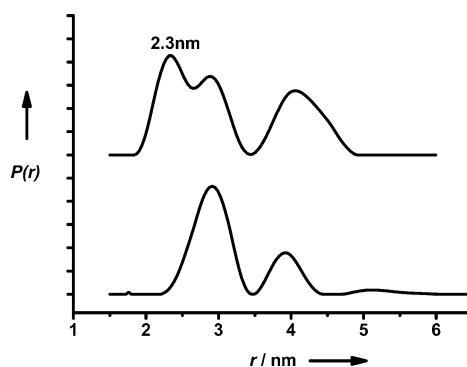


Abbildung 4: Abstandsverteilung für $\mathbf{3}_1$ mit WGA (molares Verhältnis WGA-Dimer/Ligand $\mathbf{3}_1$ 1:1 (unten) und 1:7 (oben)).

In einer Lösung von monovalentem Liganden $\mathbf{3}_1$ und WGA (je 33 μM) kann mit EPR-Spektroskopie nur schwaches Binden festgestellt werden. Der Hauptbeitrag zur dipolaren Entwicklung im DEER-Experiment stammt von einer dreidimensionalen homogenen Verteilung der Spinsonden. Trotzdem lässt sich ein kleiner Anteil interagierender spinmarkierter Liganden $\mathbf{3}_1$, die an dasselbe WGA-Dimer gebunden sind, nachweisen. Wie im Fall von $\mathbf{2}_2$ fehlt der Peak bei 2.3 nm in der Abstandsverteilung, der typisch für gleichzeitiges Besetzen benachbarter Bindungsstellen wäre (Abbildung 4, unten). Nur größere Abstände, die den Abständen zwischen den Bindungsstellen C1B2 und C2B1 (ca. 3 nm; vgl. Abbildung 3, oben) und zwischen B1C2 und B2C1 (ca. 4 nm) zugeordnet werden können, treten auf. Erst bei Verringerung der WGA-Konzentration auf ein molares Protein/Ligand-Verhältnis von 1:7 (entsprechend einer Erhöhung der Zahl der pro Protein gebundenen Liganden) tritt der für das gleichzeitige Besetzen benachbarter Bindungsstellen typische Peak auf (Abbildung 4, oben). Die mit abnehmendem Protein/Ligand-Verhältnis ansteigende relative Intensität des Peaks, der der Besetzung der Bindungsstellen B1C2 und B2C1 (ca. 4 nm) zugeordnet werden konnte, deutet abermals auf eine niedrigere Bindungsaaffinität dieser Bindungsstellen als jene von C1B2 und C2B1 hin.

Zusammenfassend zeichnen die vorgestellten Ergebnisse ein detailliertes Bild des molekularen Mechanismus der Bindung mono- und divalenten Liganden an WGA. Unter Anwendung moderner EPR-spektroskopischer Methoden gelang es erstmals, einen strukturbasierten Nachweis multivalenter Protein-Ligand-Wechselwirkung in Lösung zu erbringen. Eine Chelatbindung des divalenten Liganden $\mathbf{2}_2$ mit einem Linker, der es ermöglicht, benachbarte Bindungsstellen zu überbrücken, ließ sich direkt beobachten. Diese Art der Bindung konnte von monovalentem Binden mehrerer Moleküle durch den divalenten Liganden $\mathbf{2}_2$ mit einem für das Überbrücken zu kurzen Linker unterschieden werden. Zusätzlich gelang es, durch die Auswertung intermolekularer Abstandsverteilungen zwischen verschiedenen Ligandenmolekülen $\mathbf{2}_2$ oder $\mathbf{3}_1$, die an dasselbe multivalente Proteinmolekül gebunden waren, die bevorzugten Bindungsstellen zu identifizieren. Die hier vorgestellte Methode ist keineswegs

auf WGA beschränkt – sie hat das Potenzial für die Untersuchung vielfältiger multivalenter Protein-Ligand-Wechselwirkungen.

Eingegangen am 12. Februar 2011
Online veröffentlicht am 7. Juli 2011

Stichwörter: EPR-Spektroskopie · Kohlenhydrate · Liganden · Multivalenz · Proteine

- [1] a) Y. C. Lee, R. T. Lee, *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 321–327; b) M. Mammam, S.-K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2908–2953; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754–2794; c) J. J. Lundquist, E. J. Toone, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 555–578; d) B. E. Collins, J. C. Paulson, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 617–625; e) V. Wittmann, S. Seeberger, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 918–921; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 900–903; f) L. L. Kiessling, J. E. Gestwicki, L. E. Strong, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 2408–2429; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2348–2368; g) A. Imbert, A. Varrot, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2008**, *18*, 567–576.
- [2] a) T. K. Dam, C. F. Brewer, *Biochemistry* **2008**, *47*, 8470–8476; b) R. J. Pieters, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 2013–2025.
- [3] a) P. I. Kitov, J. M. Sadowska, G. Mulvery, G. D. Armstrong, H. Ling, N. S. Pannu, R. J. Read, D. R. Bundle, *Nature* **2000**, *403*, 669–672; b) E. A. Merritt, Z. Zhang, J. C. Pickens, M. Ahn, W. G. J. Hol, E. Fan, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8818–8824; c) Z. Zhang, E. A. Merritt, M. Ahn, C. Roach, Z. Hou, C. L. M. J. Verlinde, W. G. J. Hol, E. Fan, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12991–12998.
- [4] D. Schwefel, C. Maierhofer, J. G. Beck, S. Seeberger, K. Dieberichs, H. M. Möller, W. Welte, V. Wittmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8704–8719.
- [5] a) H. Kessler, G. Zimmermann, H. Foerster, J. Engel, G. Oepen, W. S. Sheldrick, *Angew. Chem.* **1981**, *93*, 1085–1086; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1981**, *20*, 1053–1055; b) M. J. N. Junk, H. W. Spiess, D. Hinderberger, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 8937–8941; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 8755–8759; c) J. F. Espinosa, J. L. Asensio, J. L. Garcia, J. Laynez, M. Bruix, C. Wright, H.-C. Siebert, H.-J. Gabius, F. J. Canada, J. Jimenez-Barbero, *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 3965–3978.
- [6] a) C. S. Wright, *J. Mol. Biol.* **1980**, *141*, 267–291; b) C. S. Wright, *J. Mol. Biol.* **1989**, *209*, 475–487; c) K. Harata, H. Nagahora, Y. Jigami, *Acta Crystallogr. Sect. D* **1995**, *51*, 1013–1019.
- [7] C. S. Wright, G. E. Kellogg, *Protein Sci.* **1996**, *5*, 1466–1476.
- [8] C. Maierhofer, K. Rohmer, V. Wittmann, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 7661–7676.
- [9] a) A. Milov, K. Salikhov, M. Shirov, *Fiz. Tverd. Tela* **1981**, *23*, 975–982; b) A. D. Milov, A. B. Ponomarev, Y. D. Tsvetkov, *Chem. Phys. Lett.* **1984**, *110*, 67–72; c) M. Pannier, S. Veit, A. Godt, G. Jeschke, H. W. Spiess, *J. Magn. Reson.* **2000**, *142*, 331–340; d) A. K. Upadhyay, P. P. Borbat, J. Wang, J. H. Freed, D. E. Edmondson, *Biochemistry* **2008**, *47*, 1554–1566; e) J. Bhatnagar, P. P. Borbat, A. M. Pollard, A. M. Bilwes, J. H. Freed, B. R. Crane, *Biochemistry* **2010**, *49*, 3824–3841; f) P. P. Borbat, J. H. Freed, *Methods Enzymol.* **2007**, *423*, 52–116.
- [10] A. Milov, B. Naumov, Y. Tsvetkov, *Appl. Magn. Reson.* **2004**, *26*, 587–599.
- [11] G. Jeschke, A. Koch, U. Jonas, A. Godt, *J. Magn. Reson.* **2002**, *155*, 72–82.
- [12] G. Jeschke, M. Sajid, M. Schulte, A. Godt, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 6580–6591.
- [13] *Poly(Ethylene Glycol) Chemistry. Biotechnical and Biomedical Applications* (Hrsg.: J. M. Harris), Plenum, New York, **1992**.