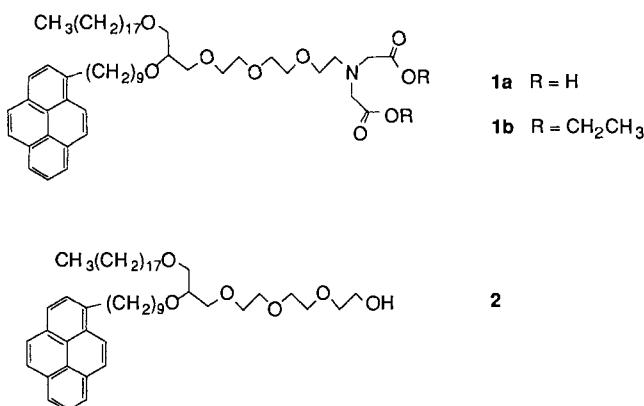


**Metall-induzierte Dispersion von Lipid-
Aggregaten; ein einfacher, selektiver und empfind-
licher Fluoreszenzsensor für Metall-Ionen****

Darryl Y. Sasaki, Deborah R. Shnek, Daniel W. Pack und Frances H. Arnold*

Die durch spezifische Ligandenbindung induzierte Reorganisation von Lipiden ist ein wesentlicher Bestandteil biologischer Prozesse wie der Signalübertragung^[1], der Membranfusion^[2], der Zellkopplung^[3] und der Endozytose^[4]. Oft ist der Ligand ein Protein, das die Lipid-Reorganisation durch mehrfache Lipid-Ligand-Wechselwirkungen verursacht^[5]. Die Lipid-Reorganisation kann jedoch auch durch kleine Ionen bewirkt werden^[6]. So kann Calcium die Phasentrennung von Phosphatidylserin-Lipiden in Vesikeln aus Phosphatidylcholin-Lipiden verursachen^[7] oder die Cardiolipin-Packung von einer Doppelschicht zu einer invertierten hexagonalen Struktur verändern^[8]. Bei Untersuchungen zur Substratbindung an Metall-komplexierende Lipide und deren nachfolgende Reorganisation in Membransystemen^[9] entdeckten wir, daß Metall-Ionen die Verteilung des Metall-chelatisierenden Lipids stark beeinflussen können. Das mit einem Pyrenrest markierte und mit Iminodiessigsäure (IDA) funktionalisierte Lipid **1a** bildet bei Zugabe zu Vesikeln aus



Distearoylphosphatidylcholin (DSPC) Aggregate. Dies belegt der Nachweis von Pyren-Excimeren durch Gleichgewichts-Fluoreszenzmessungen. Die Zugabe zweiwertiger Metall-Ionen führt nahezu sofort zu einer drastischen Umkehrung des Verhältnisses der Emissionsintensitäten von Excimer und Monomer, was vermutlich mit der Dispersion des Pyrenlipids in der Gelphase des Matrixlipids DSPC erklärbar ist. Dieser äußerst empfindliche und selektive Prozeß ermöglicht einen besonders einfachen Zugang zum Nachweis und zur Quantifizierung von Cu^{2+} .

[*] Prof. F. H. Arnold, D. R. Shnek, D. W. Pack
Division of Chemistry and Chemical Engineering 210-41
California Institute of Technology
Pasadena, CA 91125 (USA)
Telefax: Int. + 818/568-8743
D. Y. Sasaki
Sandia National Laboratory
Albuquerque, NM 87185-0368 (USA)

[**] Diese Arbeit wurde vom Office of Naval Research (N00014-92-J-1178) und von der National Science Foundation (BCS-9108502) gefördert. F. H. A. dankt für einen NSF-PYI-Award und für ein David-and-Lucile-Packard-Stipendium. D. R. S. wird mit einem Promotionsstipendium vom National Institute of General Medical Sciences, Pharmacology Sciences Program, gefördert. D. W. P. ist Landau Fellow.

Stabile gemischte Doppelschicht-Vesikel entstehen, wenn die Lipide **1** oder **2** zusammen mit einem Phosphatidylcholin-Lipid in wässriger Lösung mit Ultraschall behandelt werden. Das Gleichgewichts-Fluoreszenzspektrum von 5 Mol-% **1a** in DSPC-Vesikeln (Abb. 1, Kurve a) enthält eine Bande der Monomer-Emission (Maximum bei 377 nm) und eine breite, unstrukturierte Bande mit Emissionsmaximum bei 470 nm, die

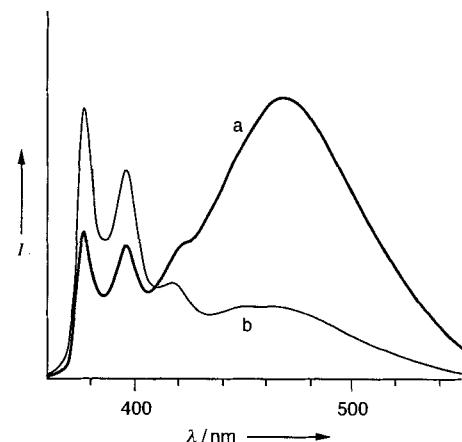


Abb. 1. Fluoreszenz-Emissionsspektren von a) 5% **1a**/95% DSPC und b) 5% **1a**/95% SOPC in einem MOPS-Puffer bei 25 °C. MOPS = 4-Morpholinopropansulfonsäure.

dem Pyren-Excimer zugeordnet wird. Das große Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von Excimer und Monomer (E/M) spiegelt eine hohe lokale Pyrenkonzentration in der Doppelschicht wider^[10]. Der E/M-Wert von Vesikeln, die 5% **1a** und 95% DSPC enthalten, beträgt 1.8 (Kurve a) und sinkt auf ca. 0.2 oder weniger in Vesikeln, die aus 5% **1a** in DSPC:Cholesterin 1:1 (Daten sind nicht aufgeführt) oder SOPC (2-Oleoyl-1-stearoyl-sn-glycero-3-phosphocholin, Kurve b) bestehen. Bei 25 °C liegen die SOPC- und die DSPC/Cholesterin-Matrixdoppelschichten in der fluiden Phase vor, während sich DSPC in der Gelpause befindet. Die auffallend verschiedenen E/M-Werte lassen vermuten, daß entweder **1a** in der DSPC-Gelmatrix Aggregate bildet oder eine Phasentrennung erfolgt, während **1a** in den beiden fluiden Doppelschichten dispergiert vorliegt.

Den deutlichen Einfluß von zweiwertigen Metall-Ionen auf den E/M-Wert von **1a** in DSPC-Vesikeln zeigt Abbildung 2. Mit steigender Metall-Ionen-Konzentration (Mn^{2+}) nimmt die Emissionsintensität des Excimers ab, während die des Mono-

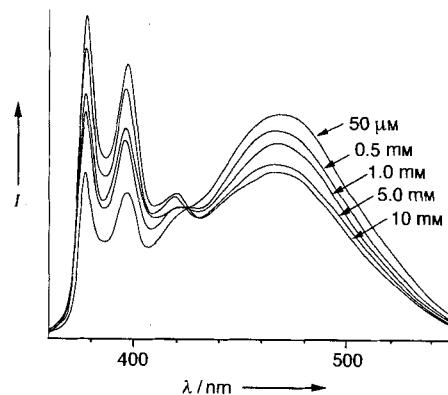


Abb. 2. Fluoreszenz-Emissionsspektren von 5% **1a**/95% DSPC in einem MOPS-Puffer bei 25 °C bei steigender MnCl_2 -Konzentration.

mers ansteigt. Andere Metall-Ionen üben einen ähnlichen Einfluß aus, jedoch bei unterschiedlichen Konzentrationen, wie in Abbildung 3 gezeigt ist. Die Abfolge der E/M-Kurven in Abbildung 3 entspricht im allgemeinen der Reihenfolge der Bindungskonstanten der entsprechenden Metall-Ionen an IDA, mit der Ausnahme, daß Co^{2+} einen stärkeren Einfluß hat als Ni^{2+} ^[11]. Ein Vergleich mit der Metall-Ionen-Komplexierung durch freie *N*-(2-Methoxyethyl)iminodiessigsäure in Lösung spricht dafür, daß, wenn die beobachteten E/M-Wert-Änderungen auf einer Komplexierung des Metall-Ions durch den IDA-Rest beruhen, die Metall-Bindungsaffinität der IDA-Kopfgruppe in Vesikeln um den Faktor 100–1000 geringer ist^[12].

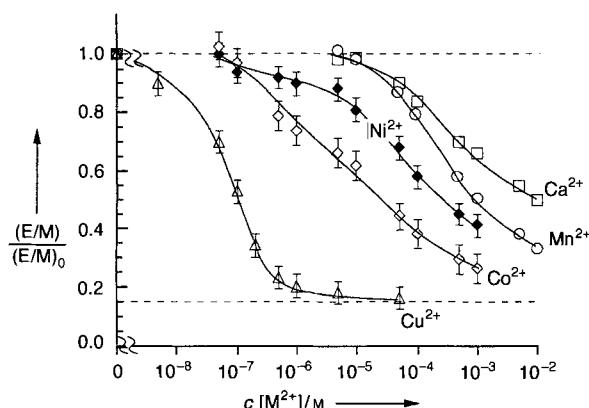


Abb. 3. E/M-Werte (bezogen auf den E/M-Wert ohne Metallzusatz) für Vesikel aus 5% **1a** und 95% DSPC, 0.11 mM Gesamtlipid, in Gegenwart verschiedener Metall-Ionen bei 25 °C. Die Metall-Ionen wurden als Chloride in 0.1 M NaCl zugegeben. Die durchgezogenen Linien wurden zur besseren Anschaulichkeit eingetragen.

Die Empfindlichkeit für geringere Metall-Ionen-Konzentrationen kann durch Verwendung verdünnterer Vesikel (geringere Lipidkonzentrationen) erreicht werden. Dies zeigt Abbildung 4, für die drei Lösungen von Vesikeln aus 5% **1a** und 95% DSPC unterschiedlicher Lipidkonzentration mit Cu^{2+} titriert wurden. Mit der geringsten verwendeten Konzentration von 650 nm Gesamtphospholipid (35 nm **1a**) kann Cu^{2+} bei einer Konzentration von 5 nm (weniger als 1 ppb) in 0.1 M NaCl nachgewiesen werden. Möglicherweise kann die Empfindlichkeit weiter erhöht werden, wenn noch geringere Lipidkonzentrationen und ein Pyren-markiertes Lipid mit einer chelatisierenden Kopfgruppe, deren Affinität zum nachzuweisenden Metall-Ion höher ist als die

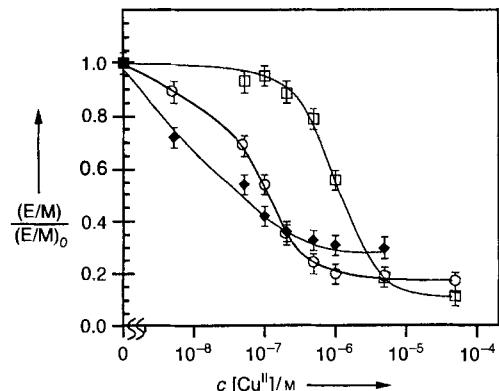


Abb. 4. E/M-Werte (bezogen auf den E/M-Wert ohne Metallzusatz) für Vesikel aus 5% **1a** und 95% DSPC in Gegenwart von Cu^{2+} bei 25 °C: Gesamtphospholipid 65 µM (□), 6.5 µM (○) und 650 nm (●). Das Metall-Ion wurde als Chlorid in 0.1 M NaCl zugegeben. Die durchgezogenen Linien wurden zur besseren Anschaulichkeit eingetragen.

von IDA (z.B. Nitrilotriacetat), verwendet werden. Die in den Abbildungen 2–4 gezeigten Änderungen der E/M-Werte treten innerhalb von Sekunden nach der Metallzugabe auf und sind durch Zugabe von Ethyldiamintetraacetat (edta) im Überschuß vollständig reversibel.

Wegen der starken Affinität von IDA zu Cu^{2+} ist das hier verwendete Doppelschichtsystem sehr empfindlich und selektiv für Cu^{2+} . So können mikromolare Cu^{2+} -Konzentrationen in einer 0.1 M NaCl-Lösung in Gegenwart millimolarer Ca^{2+} -Konzentrationen nachgewiesen werden. Ferner ist die durch submikromolare Cu^{2+} -Konzentrationen bewirkte Abnahme der Excimer-Emission bei 470 nm gegen Schwarzlicht mit bloßem Auge sichtbar.

Durch Titration der nichtchelatisierenden Pyrenlipide **1b** und **2** in DSPC-Vesikeln mit Metall-Ionen wurde bestätigt, daß die beobachtete Änderung des E/M-Wertes eine Folge der Chelatisierung des Metall-Ions durch die IDA-Kopfgruppe ist und nicht auf Fluoreszenzlösung oder einer metallinduzierten Störung der Membran beruht.

Die Fluoreszenz-E/M-Werte von 5% **1** oder **2** in DSPC-Vesikeln sind in Abbildung 5 in Form eines Balkendiagramms dargestellt. Während Cu^{2+} bei einer Konzentration von 5 µM eine große Änderung des E/M-Wertes von Vesikeln aus **1a** und DSPC bewirkt, ist der Einfluß auf die E/M-Werte von Vesikeln, die mit den nichtchelatisierenden Pyrenlipiden hergestellt wurden, sehr klein. Sogar bei 1000fach höheren Cu^{2+} -Konzentrationen (mM) wurde mit **1b** oder **2** enthaltenden Vesikeln keine signifikante Änderung der Fluoreszenzintensität oder des E/M-Wertes beobachtet. Darüber hinaus ruft die Zugabe von Metall-Ionen zu Vesikeln, die **1a** in einer fluiden Matrix (50% DSPC/50% Cholesterin oder SOPC) enthalten, auch nur sehr kleine Änderungen der Fluoreszenz-E/M-Werte hervor (obwohl für die fluidere SOPC-Matrix Lösung beobachtet wird).

Es scheint, daß die Komplexierung des Metall-Ions durch die IDA-Kopfgruppe die Dispersion von **1a** in der DSPC-Gelmatrix bewirkt, wodurch die Zahl von Pyren-Kollisionen und damit auch der E/M-Wert drastisch zurückgehen. Dieser Prozeß ist in Abbildung 6 dargestellt.

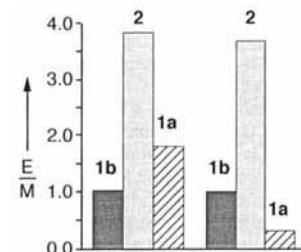


Abb. 5. Das Balkendiagramm zeigt die E/M-Werte von Vesikeln, die 5 Mol-% des Lipids **1b**, **2** oder **1a** enthalten, vor (links) und nach der Zugabe von CuCl_2 (5 µM) (rechts). Alle Messungen wurden in einem MOPS-Puffer bei 25 °C durchgeführt.

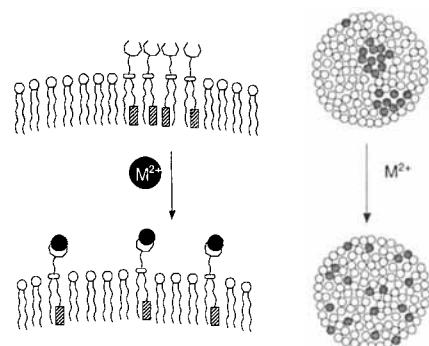


Abb. 6. Schematische Darstellung der durch Metall-Ionen induzierten Dispersion von **1a** in Vesikeln aus 5% **1a** und 95% DSPC, wie sie aus Fluoreszenzmessungen bei 25 °C folgt. **1a** lagert sich wahrscheinlich zu Pyren-reichen Aggregaten zusammen, die dispergiert werden, wenn die Lipid-Kopfgruppen zweiwertige Metall-Ionen chelatisieren.

Die durch spezifische Substratbindung verursachte Reorganisation eines mit einer fluoreszenzaktiven Gruppe markierten Lipids ist eine leistungsfähige Methode zum Nachweis von Substraten in Lösung. Als Meßverfahren hat dieses höchst einfache Zwei-Komponenten-System einige günstige Eigenschaften: Seine Empfindlichkeit für Cu^{2+} (nM) ähnelt der von Ionen-selektiven Elektroden^[13] und anderen auf synthetischen Lipiden basierenden Sensoren^[14]; es ist relativ unempfindlich gegenüber hohen Konzentrationen schwach bindender Metall-Ionen wie Ca^{2+} ; es kann durch Spülen mit einem stark chelatisierenden Agens (edta) regeneriert werden; die Antwortzeit ist kurz (Sekunden). Wegen seiner Einfachheit und seiner besonders schnellen Signalübertragung könnte dieses System ohne weiteres für die kontinuierliche Kupfer-Ionen-Überwachung mit einem Durchfluß-Fluoreszenzspektrometer modifiziert werden. Untersuchungen zum Verständnis des Mechanismus, durch den die Metallbindung die Dispersion der Lipid-Aggregate bewirkt, und über die Anwendungsbreite dieses Sensortyps sind in Arbeit.

Experimentelles

Lipid-Stammlösungen wurden durch Auflösen der Lipide und von Cholesterin (Sigma) in CHCl_3 (HPLC rein) hergestellt. 5 Mol-% der Lipide 1 oder 2 und 95 Mol-% Matrixlipid (DSPC, SOPC oder 1:1 DSPC:Cholesterin) wurden in volumetrischen 12mL-Zentrifugenröhren so vermischt, daß sich 10 μmol Gesamtlipid ergaben. Das Lipidgemisch wurde im Wasserstrahlvakuum eingeengt, und 3 mL MOPS-Puffer (20 mM MOPS, 0.1 M NaCl, pH 7.5) wurden in die Röhrchen zugegeben. Die Röhrchen wurden auf über 55 °C erhitzt und anschließend 15 min in Argon-Atmosphäre und unter Eiskühlung über eine Sondenspitze (Heat Systems Modell 375) mit Ultraschall (25–35% Leistung) behandelt. Die Vesikel wurden 20 min mit 11 000 U min⁻¹ zentrifugiert, um Titanpartikel zu entfernen. An ausgewählten Proben wurde die Phosphatkonzentration bestimmt [15]. Die Vesikelgrößen wurden durch quasi-elasitische Lichtstreuung mit einem Microtrac Ultrafine Particle Analyzer (Leeds & Northrop) bei 25 °C im Phosphatpuffer gemessen. Der mittlere Durchmesser betrug 49 nm (Verteilungsbreite 59 nm) für die nichtmetallierten Vesikel. Die Vesikel wurden für die Metallbindungs-Experimente mit MOPS-Puffer 167fach verdünnt. Die Gleichgewichts-Fluoreszenzmessungen wurden mit einem thermostatisierbaren Shimadzu-RF-450-Spektrofluorimeter bei 25 °C durchgeführt (Anregung bei 346 nm, Anregungs- und Emissionsspaltbreite 5 nm).

Eingegangen am 13. Oktober,
ergänzte Fassung am 6. Dezember 1994 [Z 7397]

Stichworte: Fluoreszenzsensoren · Lipide · Metall-Ionen-Nachweis · Vesikel

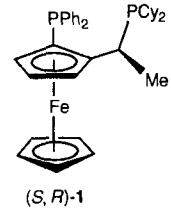
- [1] a) K. Eichmann, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 56; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 54; b) W. J. Fantl, D. E. Johnson, L. T. Williams, *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, *62*, 453.
- [2] a) J. Zimmerberg, S. S. Vogel, L. V. Chernomordik, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1993**, *22*, 433; b) D. Papahadjopoulos, G. Poste, B. E. Schaeffer, W. J. Vail, *Biochim. Biophys. Acta* **1974**, *352*, 10.
- [3] R. B. Kelly, *Curr. Biol.* **1993**, *3*, 474.
- [4] S. C. Silverstein, R. M. Steinman, Z. A. Cohn, *Annu. Rev. Biochem.* **1977**, *46*, 669.
- [5] a) M. Ahlers, W. Müller, A. Reichert, H. Ringsdorf, J. Venzmer, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 1310; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 1269; b) D. M. Haverstick, M. Glaser, *Biophys. J.* **1989**, *55*, 677; c) P. Antes, G. Schwarzmüller, K. Sanhoff, *Chem. Phys. Lipids* **1992**, *62*, 269; d) J. R. Wiener, R. Pal, Y. Barenholz, R. R. Wagner, *Biochemistry* **1985**, *24*, 7651; e) G. B. Birrell, O. H. Griffith, *ibid.* **1976**, *15*, 2925.
- [6] a) H. Hauser, *Chem. Phys. Lipids* **1991**, *57*, 309; b) K. Jacobson, D. Papahadopoulos, *Biochemistry* **1975**, *14*, 152.
- [7] S. Ohnishi, T. Ito, *Biochemistry* **1974**, *13*, 881.
- [8] a) R. P. Rand, S. Sengupta, *Biochim. Biophys. Acta* **1972**, *255*, 484–492; b) B. de Kruijff, A. J. Verkleij, J. Leunissen-Bijvelt, C. J. A. van Echteld, J. Hille, H. Rijnbout, *ibid.* **1982**, *693*, 1.
- [9] D. R. Shnek, D. W. Pack, D. Y. Sasaki, F. H. Arnold, *Langmuir* **1994**, *10*, 2382.
- [10] a) H. J. Gall, W. Hartmann, *Chem. Phys. Lipids* **1980**, *27*, 199; b) H. J. Gall, E. Sackmann, *Biochim. Biophys. Acta* **1974**, *339*, 103.
- [11] Methoxyethyliminodiacetat bindet in Lösung Metall-Ionen in folgender Reihenfolge: $\text{Cu} \gg \text{Ni} > \text{Co} > \text{Mn} > \text{Ca}$; A. E. Martell, P. M. Smith, *Critical Stability Constants, Vol. 6*, Plenum, New York, 1974.

- [12] Beispielsweise beträgt der K_d von Methoxyethyliminodiacetat 3×10^{-6} M für Mn^{2+} , der E/M-Wert der Vesikel dagegen beginnt sich bei 10^{-5} M Mn^{2+} zu ändern und zeigt einen Wendepunkt bei ca. 3×10^{-4} M Mn^{2+} (Abb. 3).
- [13] a) S. S. Kuan, G. G. Guilbaud in *Biosensors: Fundamentals and Applications* (Hrsg.: A. P. F. Turner, I. Karube, G. S. Wilson), Oxford University Press, Oxford, 1987, S. 135; b) S. L. Belli, A. Zirino, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 2583; c) E. K. Quagrainie, V. P. Y. Gadzekpo, *Analyst* **1992**, *117*, 1899; d) R. A. Durst in *Ion Selective Electrodes* (Hrsg.: E. A. Durst), National Bureau of Standards Publication, Washington, DC, 1969, S. 375.
- [14] a) M. Lerchi, E. Bakker, B. Rusterholz, W. Simon, *Anal. Chem.* **1992**, *664*, 1534; b) M. Shimomura, T. Kunitake, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 1757; c) A. Singh, L.-I. Tsao, M. Markowitz, B. P. Gaber, *Langmuir* **1992**, *8*, 1570; d) S. Terrettaz, H. Vogel, M. Grätzel, *J. Electroanal. Chem.* **1992**, *326*, 161; e) S. Steinberg, T. Rubinstein, *Langmuir* **1992**, *8*, 1183.
- [15] W. R. Morrison, *Anal. Biochem.* **1964**, *7*, 218.

Starke Einflüsse der elektronischen Struktur auf die Enantioselektivität in der Rhodium-katalysierten Hydroborierung mit neuen, Pyrazolyl-haltigen Ferrocenylliganden

Anita Schnyder, Lukas Hintermann und Antonio Togni*

Wie wir kürzlich zeigten, ergeben chirale, zweizähnige Ferrocenylphosphane vom Typ 1, die zwei sterisch und elektronisch verschiedene Substituenten enthalten, hohe Enantioselektivitäten in einer Reihe von katalysierten Reaktionen^[1]. Unsere Zwei-Schritt-Synthesemethode ermöglicht eine nahezu uneingeschränkte Variation der Phosphanogruppen in solchen Liganden. Dieses Ligandensystem gibt uns somit die Möglichkeit, von ihm ausgehende sterische und elektronische Einflüsse auf die Stereoselektivität zu studieren. Neulich haben wir unser Konzept auf P,N-Liganden^[2] vom Typ 2 erweitert, die eine Phosphano- und eine Pyrazolylgruppe enthalten, eine bisher noch nicht verwendete Kombination in der asymmetrischen Katalyse^[3]. Wir berichten hier von ihrer Anwendung in der Rhodium-katalysierten Hydroborierung von Styrol mit Catecholboran^[4]. Das bemerkenswerteste Ergebnis ist die Beobachtung großer elektronischer Einflüsse auf die Enantioselektivität dieser Reaktion^[5]. Außerdem stellte sich heraus, daß einige elektronische Eigenheiten des Pyrazolyl- und des Phosphanorests gegenläufige Konsequenzen haben. Zum Beispiel werden hohe Enantioselektivitäten erhalten, wenn der N-Ligand ein guter σ -Donor und der P-Ligand ein guter π -Acceptor ist (siehe unten).



Die neuen Liganden 2 wurden in mäßigen Ausbeuten aus Ferrocenylaminen der Art 3^[6] und dem entsprechenden Pyrazol 4 in Eisessig hergestellt (Schema 1). Die Ergebnisse der katalytischen Hydroborierungen (Schema 2) sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Die Reaktionen wurden in THF bei Raumtemperatur mit 1 Mol-% des Katalysators (in situ hergestellt aus $[\text{Rh}(1,5\text{-cod})_2]\text{BF}_4$ und 1.1 Äquiv. des Liganden) durchgeführt. Das Substrat (Styrol) wurde innerhalb von 3–5 h vollständig umgesetzt. Aufarbeitung und Produktanalysen erfolgten wie

[*] Prof. Dr. A. Togni, Dipl.-Chem. A. Schnyder, L. Hintermann
Laboratorium für Anorganische Chemie der Eidgenössischen Technischen Hochschule
ETH-Zentrum, CH-8092 Zürich (Schweiz)
Telefax: Int. +1/632-1090