

- [1] B. Casu, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1985**, *43*, 51.  
 [2] Heparin: *Chemical and Biological Properties; Clinical Applications* (Hrsg.: D. A. Lane, U. Lindahl), Edward Arnold, London, 1989.  
 [3] J. Choay, J. C. Lormeau, M. Petitou, P. Sinaÿ, J. Fareed, *Ann. NY Acad. Sci.* **1981**, *370*, 644.  
 [4] L. Thunberg, G. Backstrom, U. Lindahl, *Carbohydr. Res.* **1982**, *100*, 393.  
 [5] J. Choay, M. Petitou, J. C. Lormeau, P. Sinaÿ, B. Casu, G. Gatti, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1983**, *116*, 492.  
 [6] G. M. T. Vogel, D. G. Meuleman, F. G. M. Bourgondien, P. M. J. Hobbelink, *Thromb. Res.* **1989**, *54*, 399.  
 [7] M. Petitou, C. A. A. van Boeckel in *Progress in the Chemistry of Natural Products*, Vol. 60 (Hrsg.: W. Hertz, G. W. Kirby, C. Tamm), Springer, Berlin, **1992**, S. 143.  
 [8] C. A. A. van Boeckel, M. Petitou, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1741; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1671.  
 [9] P. D. J. Grootenhuis, C. A. A. van Boeckel, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 2743.  
 [10] C. A. A. van Boeckel, P. D. J. Grootenhuis, A. Visser, *Nat. Struct. Biol.* **1994**, *1*, 423.  
 [11] J. Basten, G. Jaurand, G. Olde-Hanter, P. Duchaussoy, M. Petitou, C. A. A. van Boeckel, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, *2*, 905.  
 [12] H. Lucas, J. E. M. Basten, P. Konradsson, C. A. A. van Boeckel, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 462; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 434.  
 [13] P. Westerduin, C. A. A. van Boeckel, J. E. M. Basten, M. A. Broekhoven, H. Lucas, A. Rood, H. van der Heijden, R. G. M. van Amsterdam, T. G. van Dinther, D. G. Meuleman, A. Visser, G. M. T. Vogel, J. B. L. Damm, G. T. Overkift, *Bioorg. Med. Chem.* **1994**, *2*, 1267.  
 [14] D. L. Lane, J. Denton, A. M. Flynn, L. Thunberg, U. Lindahl, *Biochem. J.* **1984**, *218*, 725.  
 [15] S. T. Olson, I. Björk, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 6353.  
 [16] S. T. Olson, H. R. Halverson, I. Björk, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 6342.  
 [17] P. D. J. Grootenhuis, P. Westerduin, D. Meuleman, M. Petitou, C. A. A. van Boeckel, *Nat. Struct. Biol.* **1995**, *2*, 736.  
 [18] Zur Glycosylierung mit Imitaten siehe: R. R. Schmidt, *Angew. Chem.* **1986**, *98*, 213; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, *25*, 212.  
 [19] P. J. Garegg, H. Hultberg, *Carbohydr. Res.* **1981**, *93*, C10.  
 [20] Nach Standardvorschriften in drei Stufen aus kommerziell erhältlicher Malto-triose hergestellt.  
 [21] Nach der für 1-Azido-11-hydroxy-3,6,9-trioxaundecan beschriebenen Methode hergestellt: C. R. Bertozzi, M. D. Bednarski, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 4326.  
 [22] I: <sup>1</sup>H-NMR (Bruker-BRX-400-Spektrometer, 400 MHz, D<sub>2</sub>O, 300 K, δ(HOD) = 4.76): ABD-Einheit 1 (reduzierendes Ende): δ = 5.19 (d, 1 H, J<sub>1,2</sub> = 4.0 Hz, H-1), 4.20 (m, H-2), 4.69 (m, H-3), 4.01 (m, H-4), 4.08 (m, H-5), 4.4 (m, H-6, H-6'); ABD-Einheit 2: 5.39 (br. s, 1 H, H-1), 3.56 (m, H-2), 3.85 (m, H-3), 4.19 (m, H-4), 4.87 (d, 1 H, J<sub>4,5</sub> = 3 Hz, H-5); ABD-Einheit 3: 5.44 (d, 1 H, d, J<sub>1,2</sub> = 4.0 Hz, H-1), 4.62 (t, 1 H, J<sub>2,3</sub> = 9.0 Hz, H-3), 4.06 (m, H-4), 4.21 (m, H-5); ABD-Einheit 4: 4.71 (d, 1 H, J<sub>1,2</sub> = 6.0 Hz, H-1), 3.29 (dd, 1 H, J<sub>1,2</sub> = 6.0 Hz, J<sub>2,3</sub> = 7.0 Hz, H-2), 3.57 (m, H-4), 3.75 (m, H-5); ABD-Einheit 5 (nichtreduzierendes Ende): 5.49 (d, 1 H, J<sub>1,2</sub> = 3.0 Hz, H-1), 3.35 (dd, 1 H, J<sub>1,2</sub> = 3.0 Hz, J<sub>2,3</sub> = 7.0 Hz, H-2), 3.57 (m, H-3), 3.48 (t, 1 H, J = 7 Hz, H-4), 3.89 (m, H-5); TBD-Einheit 1 (reduzierendes Ende): 4.99 (d, 1 H, J<sub>1,2</sub> = 5.0 Hz, H-1), 4.54 (t, 1 H, J = 5 Hz, H-2), 4.18 (m, H-4), 4.62 (m, H-5); TBD-Einheit 2: 5.57 (d, 1 H, J<sub>1,2</sub> = 4.0 Hz, H-1), 4.69 (m, H-2), 4.95 (dd, 1 H, J = 6, 7 Hz, H-3), 4.18 (m, H-4); TBD-Einheit 3: 5.67 (d, 1 H, J<sub>1,2</sub> = 4.0 Hz, H-1), 4.95 (m, H-3), 4.63 (m, H-4); Spacer: 2.63 (AB, 2 H, J = 40, 16 Hz, SCH<sub>2</sub>C(O)), 2.92 (t, 2 H, J = 6.0 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S).  
 [23] Zur MALDI-massenspektrometrischen Untersuchung von Heparin-analogen Oligosacchariden siehe: P. Juhasz, K. Biemann, *Carbohydr. Res.* **1995**, *270*, 131.  
 [24] MALDI-Massenspektrum des gemischten Konjugats I (Vision-2000-Spektrometer, (Arg-Gly)<sub>10</sub> als basisches Peptid für die Bildung des ionischen Komplexes, 3-Hydroxypicolinsäure als Matrix): ber. für (I + 2(Arg-Gly)<sub>10</sub> + H<sup>+</sup>): 7971, gef. 7972 [(M + 2(Arg-Gly)<sub>10</sub> + H<sup>+</sup>)].  
 [25] Das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum des symmetrischen Konjugats IV ist nahezu identisch zu dem der Vorstufe 7b (und dem des ABD-Kohlenhydrat-Teils von I[22]), mit Ausnahme des Triplets für CH<sub>2</sub>S: δ(7b) = 3.26 (t, CH<sub>2</sub>SAC); δ(IV) = 2.79 (t, CH<sub>2</sub>SSCH<sub>2</sub>) (Bruker-BRX-400-Spektrometer, 400 MHz, D<sub>2</sub>O, 300 K, δ(HOD) = 4.76); MALDI-Massenspektrum des symmetrischen Konjugats IV (Vision-2000-Spektrometer, (Arg-Gly)<sub>10</sub> als basisches Peptid für die Bildung des ionischen Komplexes, 3-Hydroxypicolinsäure als Matrix): MH<sup>+</sup> (IV + 2(Arg-Gly)<sub>10</sub> + H<sup>+</sup>): gef. 8180, ber. 8181.2.

## Stabile, hochgesättigte Glyceride – enzymatische Synthese mit einer Carotinoidsäure\*\*

Vassilia Partali, Lise Kvittingen, Hans-Richard Sliwka\* und Thorleif Anthonsen

Das große Interesse an hochgesättigten langketten Glyceriden in der Medizin und Nahrungsmittelindustrie führte zur Entwicklung mehrerer Anreicherungs- und Synthesemethoden<sup>[1–4]</sup>. Die Glyceridester ungesättigter Fettsäuren wie Icosapentaensäure (C20:5), Docosahexaensäure (C22:6) und der konjugierten Ajenonsäuren (C12:5, C14:5) sind allerdings mindestens ebenso instabil wie ihre Fettsäuren und können deshalb allenfalls bei tiefen Temperaturen unter Schutzgas oder mit Stabilisatoren, z.B. Carotinoiden, gehandhabt werden<sup>[4–6]</sup>.

Die Synthese stabiler, hochgesättigter Glyceride muß daher aufbauen auf stabilen, hochgesättigten Fettsäuren. Die etwa 25 in geringer Konzentration natürlich vorkommenden Carotinoidsäuren erfüllen beide Anforderungen<sup>[7]</sup>. Eine dieser Säuren, 8'-Apo-β-carotinsäure (C30:9), ist ein stabiles, Vitamin-A-aktives Carotinoid, das als Ethylester (C30-Ester) **2** (siehe Schema 1) auch kommerziell erhältlich ist<sup>[8, 9]</sup>.

Glyceride mit Carotinoiden als Fettsäure sind bisher in der Natur nicht gefunden worden, obwohl man die natürlich vorkommende Säure des Esters **2** als eine dehydrogenierte Form der ebenfalls natürlich vorkommenden verzweigten Fettsäuren betrachten kann<sup>[8, 10]</sup>.

Wir erwarten, daß die Carotinoidglyceride **3**, **4**, **6**, **7** die vielfältigen physiologischen Wirkungen der Fettsäuren und der Carotinoide vereinen<sup>[11–13]</sup>. Carotinoidglyceride dürften besser absorbiert werden und daher erhöhte pharmakologische Wirkungen zeigen als freie Carotinoide, die selbst mit Fettsäuren verestert nur unvollkommen von Mensch und Tier aufgenommen werden<sup>[14–16]</sup>. Die Carotinoidfette **6**, **7** sind polyfunktionelle Glyceridderivate, in denen der antioxidative Carotinoidteil als intramolekularer Stabilisator für die ungesättigten Fettsäureacylgruppen im Molekül wirken kann, während gleichzeitig die Fettsäureacylgruppen die Absorption des Carotinoids erleichtern<sup>[17]</sup>. Wir berichten hier über die Synthese der ersten stabilen hochgesättigten, konjugierten Glyceride.

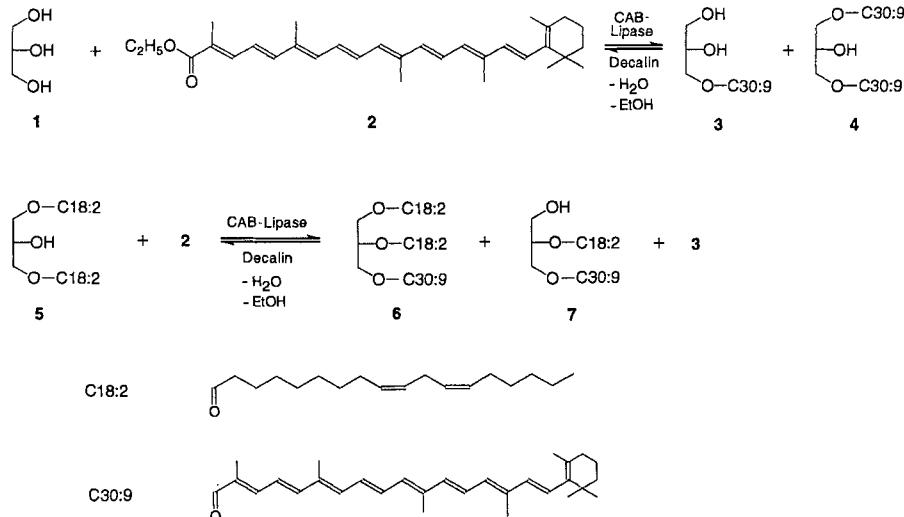
Konventionelle Glyceridsynthesen (Umesterung, direkte Synthese) erschienen als Zugang zu diesen Verbindungen weniger geeignet, da der Carotinoidester **2**, wie allgemein Carotinoide, unter den Reaktionsbedingungen (hohe Temperatur oder Säuren) zerstört wird<sup>[18, 19]</sup>. Die konjugierten Mono-, Di- und Tri-nonaenoylglycerin-Derivate **3**, **4**, **6**, **7** wurden deshalb mit Hilfe enzymatischer Katalyse hergestellt (Schema 1), einer Methode, die bisher in der Carotinoidchemie noch wenig Anwendung gefunden hat<sup>[20–22]</sup>.

Die Verbindungen **3** und **4** wurden durch Veresterung, die Fette **6** und **7** durch Umesterung erhalten. Glycerin **1** und der C30-Ester **2** reagierten in Decalin bei 30–37 °C mit *Candida-Antarctica-B*(CAB)-Lipase bei reduziertem Druck in 43 % Ausbeute zu den Mono- und Diglyceriden **3** und **4** in etwa gleichen

[\*] Dr. H.-R. Sliwka  
 Norges Teknisk Naturvitenskapelige Universitet  
 Institutt for Organisk Kjemi-NTH  
 N-7034 Trondheim (Norwegen)  
 Telefax: Int. + 73 59 54 73  
 E-mail: hrs@nvg.unit.no

Dr. V. Partali, Dr. L. Kvittingen, Dr. T. Anthonsen  
 Norges Teknisk Naturvitenskapelige Universitet  
 Kjemisk Institutt-AVH

[\*\*] Wir bedanken uns für Diskussionen zur Enzymkatalyse, für NMR- und Massenspektren sowie für technische Unterstützung bei P. Halling, H. Anthonsen, B. Olsrød, A. Melbye und S. Liaaen-Jensen.



Schema 1. Enzymatische Synthese von Carotinoylglyceriden.

Anteilen. Die Reaktion des Diglycerids der Linolsäure **5** mit dem C30-Ester **2** ergab in 38% Ausbeute das Triglycerid **6** sowie die Glyceride **3** und **7** im Verhältnis 9:2:1. Die enzymatische Veresterung von Glycerin **1** mit ungesättigten Fettsäuren wird mit zunehmender Nähe der Doppelbindung zur Carbonylgruppe behindert<sup>[4]</sup>. Die Ausbeute an Carotinoylglycerin der Um- und Veresterungsreaktion mit dem carbonylkonjugierten Ester **2** ist dennoch ausreichend.

Die Umsetzung des Diglycerids **5** mit dem Ester **2** kann statistisch, ohne Berücksichtigung der Stellungs- und Stereoisomere, zu neun Glyceridprodukten führen. Theoretisch wird die Bildung der Produkte bestimmt durch eine Gleichgewichtskonstante, die sich aus den Hydrolysegleichgewichtskonstanten der Tri-, Di- und Monoglyceride zusammensetzt. Die tatsächliche Produktbildung wird weiter abhängig sein von der Konzentration der Reaktionspartner, dem Lösungsmittel, von einer Stellungsspezifität der Lipase und von einer eventuellen Wanderung der Acylgruppen. Die bei der Reaktion gebildeten Nebenprodukte H<sub>2</sub>O und EtOH werden durch Arbeiten unter reduziertem Druck kontinuierlich aus dem Gleichgewicht entfernt, was die Ausbeute an höheren Glyceriden fördern sollte. Ungeachtet der Komplexität der Umesterung entstanden als Hauptprodukte vorwiegend Triglycerid **6** neben dem Mono- und Diglycerid **3** bzw. **7**.

Die Carotinoylglycerin-Derivate wurden chromatographisch von den in geringen Mengen vorkommenden Nebenprodukten, von nicht umgesetzten C30-Ester **2** und von farblosen Glyceriden abgetrennt.

Die Struktur der erhaltenen neuen Fette wurde mit UV-VIS-, <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-NMR- und IR-spektroskopisch sowie massenspektrometrisch bestätigt. Obwohl eine Acylwanderung nicht auszuschließen ist, konnte nach Aufarbeitung des Reaktionsgemisches jeweils nur das 1,3-Derivat **4**, das Triglycerid **6** und das 1,2-Derivat **7** NMR-spektroskopisch nachgewiesen werden<sup>[23]</sup>.

Mono- und Diglyceride mittel- und langketiger Fettsäuren bilden in Wasser stabile Emulsionen<sup>[24]</sup>. Die Verbindungen **3**, **4** und **7** eignen sich deshalb möglicherweise zur Herstellung leicht absorbierbarer Carotinoiddispersionen ohne zusätzliche Emulgatoren<sup>[25]</sup>.

### Experimentelles

Veresterung: **1** (83 mg, 0.9 mol), **2** (73 mg, 0.16 mmol) und CAB-Lipase (350 mg) wurden in Decahydronaphthalin (10 mL) bei 35 °C und 10 Torr 4 d gerührt. – Umesterung: **5** (7.4 mg, 0.012 mmol), **2** (12 mg, 0.026 mmol) und CAB-Lipase (60 mg) wurden in Decahydronaphthalin (2 mL) bei 35 °C und 10 Torr 8 d gerührt. Die

gelbroten Carotinoidglyceride beider Reaktionen wurden nach Verdampfen des Lösungsmittels mit Kolonnen- oder präparativer Dünnschichtchromatographie an Silicagel mit Hexan-Aceton-Mischungen getrennt. Farblose Glyceride wurden nicht analysiert. Die Veresterung ergab die Verbindungen **3** und **4** im Verhältnis 1:1 in 43% Ausbeute, die Umesterung lieferte die Produkte **3**, **6** und **7** in 38% Ausbeute im Verhältnis 9:2:1. Die Verbindungen **3**, **4**, **6**, **7** waren VIS-spektroskopisch ( $\lambda_{\text{max}} = 456 \text{ nm}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) identisch mit dem Edukt **2**.

Veresterung: zurückgewonnenes **2**: 22 mg; **3**: erhalten: 15 mg, MS (70 eV):  $m/z$  506 [ $M^+$ ], 414 [ $M^+ - 92$ ]; IR in Substanz als Film auf KBr):  $\tilde{\nu} = 3428 \text{ cm}^{-1}$  (OH), 1700 (konj. C=O); <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS): Glyceryleit: (ABMXY-System),  $\delta = 3.91$ , (q, H-2), 3.56 und 3.65 (beide dd, 2H-3), 4.20 und 4.23 (beide dd, 2H-1); Carotinoyleit:  $\delta = 6.0 - 6.8$  (12H), 1.95 (12H, 4CH<sub>3</sub>), 1.73 (3H, 1CH<sub>3</sub>-C5), 0.95 (6H, 2CH<sub>3</sub>-C1), 1.48 (2H, CH<sub>2</sub>-C2), 1.55 (2H, CH<sub>2</sub>-C3), 2.01 (2H, CH<sub>2</sub>-C4).

**4**: erhalten: 15 mg, MS:  $m/z$  936 [ $M^+$ ], 844 [ $M^+ - 92$ ]; IR: 3460 (OH), 1700 (konj. C=O); <sup>1</sup>H-NMR: Glyceryleit: (AA'BB'X-System),  $\delta = 4.16$  (q, H-2), 4.24 und 4.27 (2H A bzw. 2H A';  $J_{\text{AA}'} = 11.1$ ,  $J_{\text{AX}} = 5.0 \text{ Hz}$ ); Carotinoyleit:  $\delta = 6.0 -$

6.7 (24H, 2 × 12H), 0.96 (12H, 4 × CH<sub>3</sub>-C1), 1.65 (6H, 2 × CH<sub>3</sub>-C5), 1.90, 1.91, 1.92, 1.94 (24H, 2 × 4CH<sub>3</sub>), 1.40 (4H, 2 × CH<sub>2</sub>-C2), 1.55 (4H, 2 × CH<sub>2</sub>-C3), 1.96 (4H, 2 × CH<sub>2</sub>-C4); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Glyceryleit:  $\delta = 65.86$  (C1, C3); Carotinoyleit:  $\delta = 168.6$  (C=O), 39.66 (C2), 33.13 (C4), 28.98 (2CH<sub>3</sub>-C1), 21.77 (CH<sub>3</sub>-C1), 19.27 (C3), 12.8–12.9 (4CH<sub>3</sub>). Umesterung: zurückgewonnenes **2**: 4.6 mg; **6**: erhalten: 3.4 mg, MS:  $m/z$  1030 [ $M^+$ ], 938 [ $M^+ - 92$ ], 599 [ $M^+ - 431$ ]; IR: 1742 (C=O), 1712 (konj. C=O); <sup>1</sup>H-NMR: Glyceryleit: (ABMXY-System),  $\delta = 5.2$  (m, H-2), 4.11 und 4.21 (m, jeweils 1H), 4.27 (m, 2H, 2H-1); Carotinoyleit:  $\delta = 6.0 - 6.8$  (12H), 1.90, 1.95 (12H, 4CH<sub>3</sub>), 0.95 (6H, 2CH<sub>3</sub>-C1), 1.73 (3H, CH<sub>3</sub>-C5), 1.48 (2H, CH<sub>2</sub>-C2), 1.60 (2H, CH<sub>2</sub>-C3); Linoleoyleit:  $\delta = 5.27$  (m, 8H, 2 × 4H, cis-Alken), 0.88 (t, 6H, 2 × CH<sub>3</sub>-C18), 1.25 (m, 32H, 2 × 16CH<sub>2</sub>), 2.28 (m, 4H, 2 × CH<sub>2</sub>CO), 2.70 (m, 4H, 2 × =CCH<sub>2</sub>=), 1.8–2.0 (m, 8H, 4 × =CCH<sub>2</sub>=).

**7**: erhalten: 0.8 mg, MS:  $m/z$  768 [ $M^+$ ], 676 [ $M^+ - 92$ ], 337 [ $M^+ - 431$ ]; IR: 3450 (OH), 1730 (C=O), 1711 (konj. C=O); <sup>1</sup>H-NMR: Glyceryleit: (ABMXY-System),  $\delta = 5.09$  (m, H-2), 3.69 (m, 2H-3), 4.24 (m, 2H-1); Carotinoyleit:  $\delta = 6.0 - 6.7$  (12H), 1.92, 1.98 (12H, 4CH<sub>3</sub>), 1.66 (3H, CH<sub>3</sub>-C5), 0.95 (6H, 2CH<sub>3</sub>-C1), 1.55 (2H, CH<sub>2</sub>-C3), 1.41 (2H, CH<sub>2</sub>-C2); Linoleoyleit:  $\delta = 5.27$  (m, 4H, cis-Alken), 0.82 (t, 3H, CH<sub>3</sub>-C18), 1.25 (m, 16H, 8CH<sub>2</sub>), 2.28 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CO), 2.70 (m, 2H, =CCH<sub>2</sub>=), 1.8–2.0 (m, 4H, 2 × =CCH<sub>2</sub>=).

**3**: erhalten 0.4 mg.

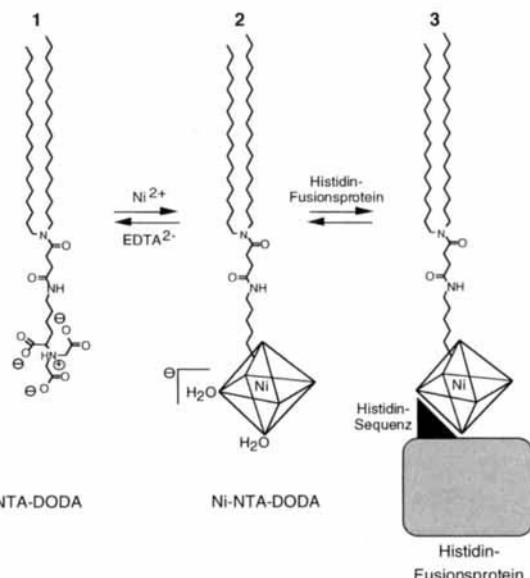
Eingegangen am 29. Mai,  
veränderte Fassung am 28. September 1995 [Z 8036]

### Stichworte:

 Carotinoide · Enzymkatalyse · Lipide

- [1] E. Solar, J. Röttingen, P. Grimstad, A. Askeland, US-A 5336792, 1994 [Chem. Abstr. 1994, 114, 162805r].
- [2] C. F. Moffat, A. S. McGill, R. Hardy, R. S. Anderson, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1993, 70, 133.
- [3] Y. Tanaka, J. Hirano, T. Funada, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1994, 71, 331.
- [4] G. G. Haraldsson, B. Ö. Gudmundsson, Ö. Almarsson, *Tetrahedron* 1995, 51, 941.
- [5] J. Cason, R. Davies, M. H. Sheehan, *J. Org. Chem.* 1971, 36, 2621.
- [6] W. T. Wang, D. B. Min, *ACS Symp. Ser.* 1994, 15.
- [7] H. P. Pfander, M. Gerspacher, M. Rychener, R. Schwabe, *Key to Carotenoids*, Birkhäuser, Basel, 1987.
- [8] J. C. Bauernfeind, *J. Agric. Food Chem.* 1972, 20, 456.
- [9] Produktionsprogramm, BASF AG, Ludwigshafen.
- [10] P. Nuhn, M. Gutheil, B. Dobner, *Fette, Seifen, Anstrichm.* 1985, 135.
- [11] J. L. Harwood, A. Cryer, M. I. Gurr, P. Dodds in *The Lipids Handbook* (Hrsg.: F. D. Gunstone, J. L. Harwood, F. B. Badley), Chapman and Hall, London 1994, S. 665.
- [12] N. I. Krinsky, *Pure Appl. Chem.* 1994, 66, 1003.
- [13] T. D. Shultz, B. P. Chew, W. R. Seaman, L. O. Wedecke, *Cancer Lett. (Shannon Ire.)* 1992, 63, 125.
- [14] J. A. Olsen, *Pure Appl. Chem.* 1994, 66, 1011.
- [15] P. Jayarajan, V. Reddy, M. Mohanram, *Indian J. Med. Res.* 1980, 71, 53.
- [16] J. K. Tyczkowski, J. L. Schaeffer, P. B. Hamilton, *Poultr. Sci.* 1989, 68, 1246.
- [17] O. Hirayama, K. Nakamura, S. Hamada, Y. Kobayashi, *Lipids* 1994, 29, 149.
- [18] K. Schiedt, S. Liaaen-Jensen in *Carotenoids*, Vol. 1A (Hrsg.: G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander), Birkhäuser, Basel, 1995, S. 81.

- [19] F. Gunstone in *The Lipids Handbook* (Hrsg.: F. D. Gunstone, J. L. Harwood, F. B. Badley), Chapman and Hall, London, 1994, S. 594.
- [20] C. Paden, R. Seiden (Procter & Gamble), US-A 5288512, 1994 [Chem. Abstr. 1994, 112, 54088j].
- [21] P. H. Brown, F. D. Carvalho, R. C. Dinwoodie, M. T. Dueber, D. K. Hayashi, R. G. Krishnamurthy, J. J. Myrick, R. S. Silver, C. Thomas (Kraft General Foods), US-A 5288619, 1994 [Chem. Abstr. 1994, 115, 113289n].
- [22] V. Partali, H.-R. Sliwka, T. Anthonsen, S. Liaaen-Jensen, *Biocatalysis* 1992, 6, 145.
- [23] D. R. Kodali, A. Tercyak, D. A. Fahey, D. M. Small, *Chem. Phys. Lipids* 1990, 52, 163.
- [24] M. Berger, M. Schneider, *Fett. Wiss. Technol.* 1993, 95, 169.
- [25] L. Schweikert, C. Sambale (BASF AG), US-A 5350773 1994 [Chem. Abstr. 1994, 119, 138086q].



## Nachweis der spezifischen Proteinadsorption an Chelatorlipidmonoschichten mit FT-IR-Spektroskopie an der Wasser/Luft-Grenzfläche

Lutz Schmitt, Tom M. Bohanon, Steffen Denzinger, Helmut Ringsdorf und Robert Tampé\*

In der Molekularbiologie ist das Konzept der Fusionsproteine zur Identifikation, Reinigung und Charakterisierung von Genprodukten weit verbreitet. Eines der bekanntesten Beispiele sind die Histidin-Fusionsproteine, die mit der Immobilisierten-Metall-Ionen-Affinitätschromatographie<sup>[1, 2]</sup> aufgereinigt werden können. Um dieses Konzept mit den fundamentalen Eigenschaften von Lipiden wie Selbstorganisation und dem Wechselspiel der Phaseneigenschaften zu vereinigen, wurde eine neue Klasse von Chelatorlipiden mit Nitritoliessigsäure (NTA) als Kopfgruppe<sup>[3, 4]</sup> synthetisiert. Dünne Filme dieser Lipide zeigen ein ausgeprägtes Komplexbildungsvermögen gegenüber Nickel-Ionen<sup>[3]</sup>. Der entsprechende Nickelkomplex verfügt mit seinen beiden freien Koordinationsstellen über eine Bindungsstelle für Histidin-Fusionsproteine<sup>[5, 6]</sup>. Wir berichten nun erstmals über eine spezifische Immobilisierung eines Histidin-Fusionsproteins an eine Chelatorlipidmonoschicht, die mit externer Reflexions-Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie (FT-IR) an der Wasser/Luft-Grenzfläche direkt verfolgt wurde. Sowohl die Komplexbildung als auch die spezifische und reversible Proteinadsorption konnten mit dieser Technik nachgewiesen werden.

Mit der externen Reflexions-FT-IR-Spektroskopie an der Wasser/Luft-Grenzfläche können physikalische Eigenschaften einer Lipidmonoschicht<sup>[7]</sup>, z.B. die Konformation der Lipidacylketten<sup>[8, 9]</sup>, untersucht werden. Dabei sind keine extrinsischen Proben wie Fluoreszenzfarbstoffsonden nötig, die die Eigenschaften des beobachteten Systems stören können. Trotzdem ist bis heute weder eine Adsorption noch eine spezifische Proteinbindung an eine Lipidmonoschicht an der Wasser/Luft-Grenzfläche mit dieser Technik direkt verfolgt worden. Für die Messungen kombinierten wir daher einen Filmwaagenaufbau mit einem FT-IR-Spektrometer, das die Daten im externen Reflexionsmodus aufnimmt (Abb. 1 unten). Weiterhin

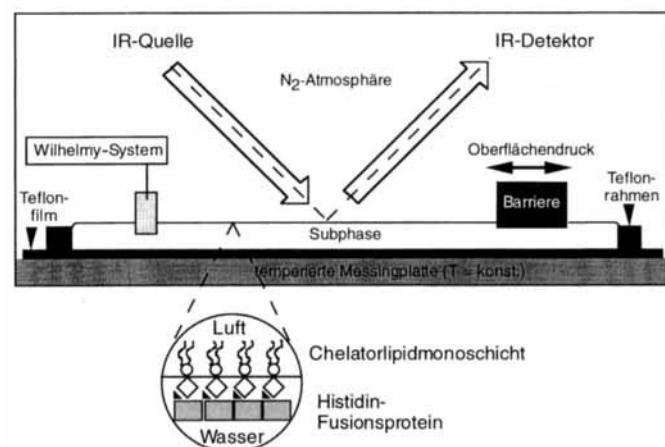


Abb. 1. Oben: In den Experimenten verwendet Komponenten: unbeladenes (NTA-DODA, 1), Nickel-beladenes (Ni-NTA-DODA, 2) und Nickel-beladenes Chelatorlipid mit immobilisiertem Histidin-Fusionsprotein (Protein/Ni-NTA-DODA, 3). Das Chelatorlipid  $N^{\alpha},N^{\alpha}\text{-Bis}(\text{carboxymethyl})\text{-N}^{\alpha}\text{-[(diodecadecylamino)succinyl]-L-lysine}$  (NTA-DODA) wurde gemäß Lit. [3] synthetisiert und in der unbeladenen und beladenen Form verwendet. Für die IR-Experimente wurden 30 nmol Ni-NTA-DODA oder NTA-DODA auf den Subphasenpuffer (10 mM Hepes, pH 8.0, 140 mM NaCl) gespreitet. Als Modellverbindung für ein Histidin-Fusionsprotein wurde ein Hitzeschokofaktor (HSF24) aus Tomate verwendet [15], der von Oliver Boschein und Dr. Klaus-Dieter Scharf (Universität Frankfurt) freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde. HSF24 wurde als Fusionsprotein mit einer C-terminalen Sequenz aus sechs zusätzlichen Histidineinheiten in *E. coli* exprimiert [17] und die Funktionalität mit DNA-Gelretardationsexperimenten nachgewiesen [15, 17]. Unten: Experimenteller Aufbau der externen Reflexions-FT-IR-Spektroskopie an der Wasser/Luft-Grenzfläche. Details sind in Lit. [21] beschrieben. Alle Spektren wurden durch Addition von 5000 Datenpunkten mit einer Auflösung von  $8 \text{ cm}^{-1}$  aufgenommen und mit der von Nicolet zur Verfügung gestellten Software ausgewertet. Bei allen Spektren wurde zusätzlich eine automatische Grundlinien- und Glättungskorrektur durchgeführt.

wurde die spezifische Bindung von Imidazol und von Histidinmarkierten Biomolekülen an die Chelatorlipide mit Filmwaagentechnik, Fluoreszenzspektroskopie und Reflexions-Interferenz-Kontrastmikroskopie (RICM) nachgewiesen<sup>[3–6]</sup>. Die Komplexbildung und spezifische Anlagerung von Histidin-Fusionsproteinen an diese in den IR-Experimenten verwendete neue Klasse von Chelatorlipiden ist in Abbildung 1 oben schematisch dargestellt.

[\*] Dr. R. Tampé  
Max-Planck-Institut für Biochemie  
Am Klopferspitz 18a, D-82152 Martinsried  
Telefax: Int. + 89/8578-2641  
E-mail: tampe@vms.biochem.mpg.de

Dipl.-Chem. L. Schmitt, Dr. R. Tampé  
Lehrstuhl für Biophysik E22 der Technischen Universität München  
Dr. T. M. Bohanon, Dipl.-Chem. S. Denzinger, Prof. Dr. H. Ringsdorf  
Institut für Organische Chemie der Universität Mainz