

- [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. Hobbelen, *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. Overklift, *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. Halvarson, 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 Imidaten 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 erhältlichlicher Maltotriose 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**: ¹H-NMR (Bruker-BRX-400-Spektrometer, 400 MHz, D₂O, 300 K, δ(HOD) = 4.76): ABD-Einheit 1 (reduzierendes Ende): δ = 5.19 (d, 1 H, J_{1,2} = 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_{4,5} = 3 Hz, H-5); ABD-Einheit 3: 5.44 (d, 1 H, d, J_{1,2} = 4.0 Hz, H-1), 4.62 (t, 1 H, J_{2,3} = 9.0 Hz, H-3), 4.06 (m, H-4), 4.21 (m, H-5); ABD-Einheit 4: 4.71 (d, 1 H, J_{1,2} = 6.0 Hz, H-1), 3.29 (dd, 1 H, J_{1,2} = 6.0 Hz, J_{2,3} = 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_{1,2} = 3.0 Hz, H-1), 3.35 (dd, 1 H, J_{1,2} = 3.0 Hz, J_{2,3} = 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_{1,2} = 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_{1,2} = 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_{1,2} = 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, SCH₂C(O)), 2.92 (t, 2 H, J = 6.0 Hz, CH₂CH₂S).
- [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)₁₀ als basisches Peptid für die Bildung des ionischen Komplexes, 3-Hydroxypicolinsäure als Matrix): ber. für (**I** + 2(Arg-Gly)₁₀ + H⁺): 7971, gef. 7972 [(M + 2(Arg-Gly)₁₀ + H⁺)].
- [25] Das ¹H-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 CH₂S: δ(**7b**) = 3.26 (t, CH₂SAC); δ(**IV**) = 2.79 (t, CH₂SSCH₂) (Bruker-BRX-400-Spektrometer, 400 MHz, D₂O, 300 K, δ(HOD) = 4.76); MALDI-Massenspektrum des symmetrischen Konjugats **IV** (Vision-2000-Spektrometer, (Arg-Gly)₁₀ als basisches Peptid für die Bildung des ionischen Komplexes, 3-Hydroxypicolinsäure als Matrix): MH⁺ (**IV** + 2(Arg-Gly)₁₀ + H⁺): gef. 8180, ber. 8181.2.

Stabile, hochungesättigte Glyceride – enzymatische Synthese mit einer Carotinoidsäure**

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

Das große Interesse an hochungesättigten langkettigen Glyceriden in der Medizin und Nahrungsmittelindustrie führte zur Entwicklung mehrerer Anreicherungs- und Synthesemethoden^[1–4]. 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^[4–6].

Die Synthese stabiler, hochungesättigter Glyceride muß daher aufbauen auf stabilen, hochungesättigten Fettsäuren. Die etwa 25 in geringer Konzentration natürlich vorkommenden Carotinoidsäuren erfüllen beide Anforderungen^[7]. 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^[8,9].

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^[8,10].

Wir erwarten, daß die Carotinoidglyceride **3**, **4**, **6**, **7** die vielfältigen physiologischen Wirkungen der Fettsäuren und der Carotinoide vereinen^[11–13]. 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^[14–16]. 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^[17]. Wir berichten hier über die Synthese der ersten stabilen hochungesättigten, 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^[18,19]. Die konjugierten Mono-, Di- und Trinonenoylglycerin-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^[20–22].

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 Antartica*-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.

- [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 5288 512, **1994** [*Chem. Abstr.* **1994**, 112, 54088j].
 [21] P. H. Brown, F. D. Carvallo, 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 5288 619, **1994** [*Chem. Abstr.* **1994**, 115, 113 289 n].
 [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 5350 773 **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^[1, 2] 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 Nitrilotriessigsäure (NTA) als Kopfgruppe^[3, 4] synthetisiert. Dünne Filme dieser Lipide zeigen ein ausgeprägtes Komplexbildungsvermögen gegenüber Nickel-Ionen^[3]. Der entsprechende Nickelkomplex verfügt mit seinen beiden freien Koordinationsstellen über eine Bindungsstelle für Histidin-Fusionsproteine^[5, 6]. Wir berichten nun erstmals über eine spezifische Immobilisierung eines Histidin-Fusionsproteins an eine Chelatorlipidmonoschicht, die mit externer Reflektions-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 Reflektions-FT-IR-Spektroskopie an der Wasser/Luft-Grenzfläche können physikalische Eigenschaften einer Lipidmonoschicht^[7], z.B. die Konformation der Lipidacylketten^[8, 9], 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 Filmwaagen-aufbau mit einem FT-IR-Spektrometer, das die Daten im externen Reflektionsmodus aufnimmt (Abb. 1 unten). Weiterhin

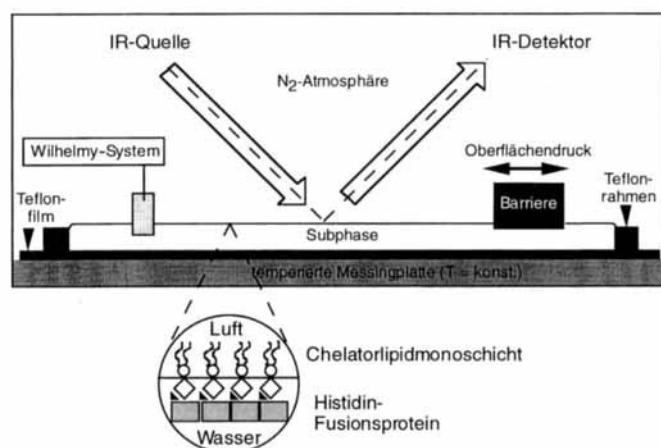
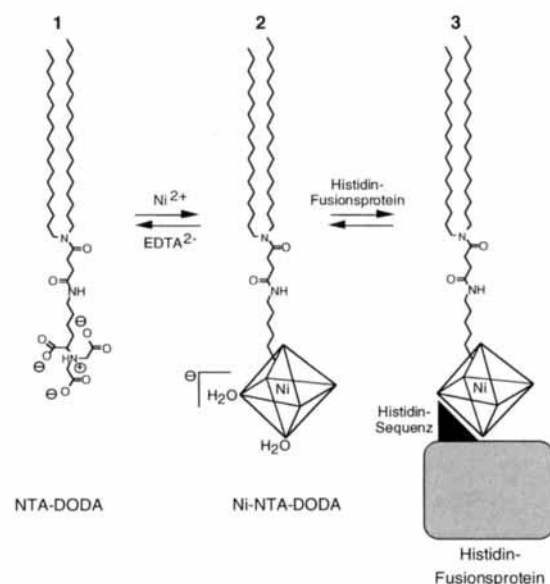


Abb. 1. Oben: In den Experimenten verwendete Komponenten: unbeladenes (NTA-DODA; 1), Nickel-beladenes (Ni-NTA-DODA, 2) und Nickel-beladenes Chelatorlipid mit immobilisiertem Histidin-Fusionsprotein (Protein/Ni-NTA-DODA; 3). Das Chelatorlipid *N*⁸,*N*⁹-Bis(carboxymethyl)-*N*⁵-(diocetadecylamino)succinyl]-L-lysine (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 Hitzeschockfaktor (HSF24) aus Tomate verwendet [15], der von Oliver Boscheinen 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 Reflektions-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 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 Histidin-markierten Biomolekülen an die Chelatorlipide mit Filmwaagentchnik, Fluoreszenzspektroskopie und Reflektions-Interferenz-Kontrastmikroskopie (RICM) nachgewiesen^[3–6]. 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 18 a, 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