

Ist kombinatorische Oberflächenchemie möglich?**

Qun Huo, Guodong Sui, Peter Kele und Roger M. Leblanc*

Kombinatorische Methoden in der Chemie und der Biologie haben sich als hervorragende Hilfsmittel bei der Entdeckung neuer Pharmaka und biologisch aktiver Verbindungen erwiesen.^[1] Seit den Anfängen in den frühen neunziger Jahren hat die kombinatorische Chemie die medizinische Wirkstoffforschung revolutioniert. Zurzeit gibt es auch auf anderen Forschungsgebieten signifikante Fortschritte, bei der kombinatorischen Synthese neuer Materialien und Katalysatoren.^[2-4]

Die Möglichkeiten der kombinatorischen Chemie hat man allerdings bisher noch nicht vollständig genutzt. Die Natur bietet kombinatorische Chemie in höchster Vollendung: Vier Desoxyribonucleotide und zwanzig Aminosäuren sind die kleinen molekularen Bausteine, auf deren „Kombination“ das Leben auf dieser Welt beruht. Eine lange Polypeptidkette kann man in der Tat als eine „Kombination“ verschiedener, durch Peptidbindungen verknüpfter Aminosäuren ansehen. Diese Polypeptide falten sich dann infolge nichtkovalenter Bindungen zwischen den Aminosäuren zu dreidimensionalen Proteinstrukturen. Demnach kann das aktive Zentrum eines Proteins als eine Kombination von Aminosäuren im dreidimensionalen Raum aufgefasst werden.

Dieses grundlegende Merkmal von Proteinen bietet einen sehr interessanten Ansatzpunkt für die Entwicklung von Proteinmimetika. Amphiphile Lipidmoleküle wurden in der Oberflächenchemie eingehend untersucht. In der Grenzfläche zwischen den Phasen Luft und Wasser ragt der hydrophile, polare Rest dieser Moleküle in die wässrige Phase, während sich die hydrophobe Alkylkette zur Gasphase hin ausrichtet. Werden die Amphiphile auf der Wasseroberfläche komprimiert, lagern sie sich zu organisierten supramolekularen Gebilden zusammen, die als Langmuir-Monoschichten bekannt sind. Falls die polaren Endgruppen durch verschiedene Peptide ersetzt werden, z.B. durch Peptidbibliotheken, entstehen Lipide mit kovalent gebundenen Peptiden, so genannte Peptidlipide, die durch Selbstorganisation proteinartige supramolekulare Strukturen bilden können (Abbildung 1).

Yu et al. haben über ein selbstaggregierendes Peptidlipid berichtet, das an der Luft-Wasser-Grenzfläche eine Kollagenähnliche Struktur aufweist.^[5] Kunitake hat die Aggregation zweier Peptidlipide an der Luft-Wasser-Grenzfläche unter

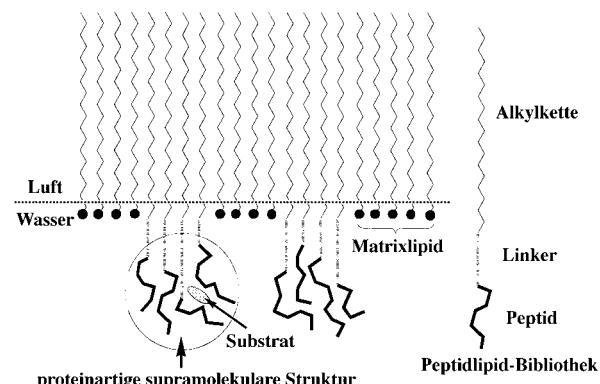
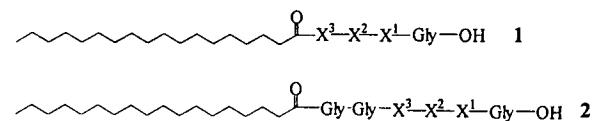


Abbildung 1. Die Bildung proteinartiger supramolekularer Strukturen an der Luft-Wasser-Grenzfläche durch Selbstorganisation der Peptidlipide.

Bildung einer Bindungsstelle für ein spezielles Peptid beschrieben.^[6] Gewöhnliche Lipide können auf der Wasseroberfläche ebenfalls assoziieren und dadurch als Rezeptoren für kleine organische Gastmoleküle fungieren.^[7] Diese früheren Arbeiten stützen die These, dass man mit kombinatorischen Methoden Suprastrukturen von Proteinmimetika herstellen kann.

Wir berichten hier über unsere Untersuchungen von Langmuir-Monoschichten aus Peptidlipid-Bibliotheken. Die Bibliothek **LIB** und die drei Unterbibliotheken **SUB1**, **SUB2** und **SUB3** wurden durch Festphasensynthesen^[8] nach dem „Mischen-und-Aufteilen“-Verfahren hergestellt (Tabelle 1).^[9] Fünf Aminosäuren – Glycin (Gly), Glutaminsäure (Glu),

Tabelle 1. Die Strukturen und die Grundbausteine der Peptidlipid-Bibliotheken.



Bibliothek	X ¹ , X ² , X ³	Komponenten
LIB	Gly, Glu, Ser, His, Tyr	250
SUB1	Gly, Ser, Tyr	54
SUB2	Gly, Glu, Tyr	54
SUB3	Glu, Ser, His	54

Serin (Ser), Histidin (His) und Tyrosin (Tyr) – dienten als Grundbausteine. Nach der Kupplung der letzten für die Peptidkette relevanten Aminosäure wurde eine Hälfte des Harzes (Wang-Harz) abgetrennt, an die anschließend zwei zusätzliche Gly-Einheiten gekuppelt wurden, um die Peptidkette zu verlängern. Die vereinigten Harze wurden mit dem Succinimidylester der Stearinsäure zu **1** und **2** umgesetzt. Dadurch, dass die Peptidkette in **2** um zwei Gly-Reste länger ist als in **1**, können bei der Aggregation dieser Peptidlipide an der Luft-Wasser-Grenzfläche pseudo-dreidimensionale Strukturen entstehen (Abbildung 1). Die Bibliothek **LIB** enthält 250 Komponenten, und jede der drei Unterbibliotheken, die Teile von **LIB** sind, besteht aus 54 Komponenten.

[*] Prof. Dr. R. M. Leblanc, Dr. Q. Huo, G. Sui, P. Kele
Center for Supramolecular Science
Department of Chemistry, University of Miami
1301 Memorial Drive, Cox 315, Coral Gables, FL 33124 (USA)
Fax: (+1) 305-284-4571
E-mail: rml@umiami.ir.miami.edu

[**] Wir danken der Charles E. Culpeper Foundation für die finanzielle Unterstützung.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.wiley-vch.de/home/angewandte/> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

Wir untersuchten nun die Oberflächenchemie dieser Substanzbibliotheken. Entgegen den herkömmlichen Untersuchungen monomolekularer Lipidschichten auf einer Wasseroberfläche wurde in dieser Studie eine „Lipidbibliothek“ anstelle nur eines oder einiger weniger Lipide getestet. Messungen der Abhängigkeit des Oberflächendrucks von der Größe der Oberfläche bei gleicher Temperatur belegen, dass alle Bibliotheken im Test Monoschichten bilden (Abbildung 2). Allerdings trat bei diesen Messungen ein Problem

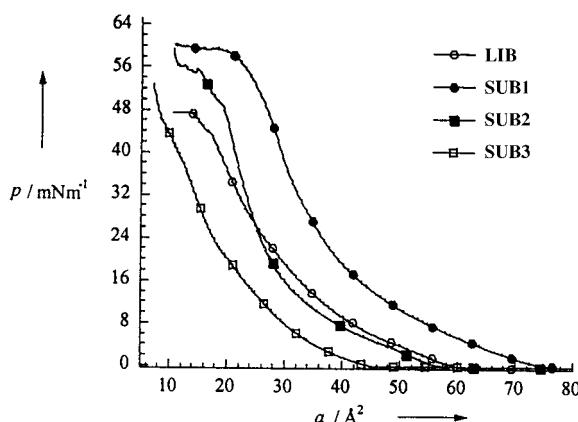


Abbildung 2. Spannungs-Flächen-Diagramm (p - a -Isothermen) für die Peptidlipide der Bibliotheken **LIB**, **SUB1**, **SUB2** und **SUB3** auf Wasser (pH 5.8, 20°C).

auf: Da die Bibliotheken nach dem „Mischen-und-Aufteilen“-Verfahren aufgebaut wurden, sind die Komponenten nicht individuell charakterisiert. Ein genaues Molekulargewicht der Probe konnte nicht berechnet werden. Deshalb wurde für alle Proben ein mittleres Molekulargewicht von 600 g mol^{-1} angenommen, was einem Molekül mit einer C_{18} -Alkylkette und einer aus 3–5 Aminosäuren bestehenden Peptidkette entspricht. Der aus den p - a -Isothermen abgeleitete Flächenbedarf für ein einzelnes Molekül stimmt nicht mit dem tatsächlichen durchschnittlichen Flächenbedarf eines Moleküls der untersuchten Bibliothek überein. Daher können die Flächenbedarfswerte der einzelnen Monoschichten nicht untereinander verglichen werden. Aber dies ist für die Untersuchungen zur molekularen Erkennung und der Bindungseigenschaften der Peptidlipide nicht relevant, weil hier nur die Änderung des Flächenbedarfs eines Moleküls nach der Bindung eines Substrats wichtig ist.

Die aus den Peptidlipid-Bibliotheken hergestellten Monoschichten untersuchten wir hinsichtlich der molekularen Erkennung von Maltose und anderen Zuckermolekülen. In der Bindungsregion des Maltose-bindenden Proteins („maltose binding protein“, MBP) kommen ungewöhnlich viele polare und aromatische Aminosäuren vor.^[10] Zwischen den polaren, geladenen Aminosäureresten und den Hydroxygruppen der Maltose kommt es zu Wasserstoffbrückenbindungen, und die van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen Protein und Maltose sind überwiegend auf die π -Stapel der aromatischen Aminosäuren zurückzuführen. Zwei der zum Aufbau unserer Bibliotheken verwendeten Aminosäuren sind positiv bzw. negativ geladen (His und Glu), eine ist aromatisch (Tyr). Da diese Aminosäuren in den Peptidlipiden an verschiedenen

Stellen eingebaut sind, können in den Monoschichten räumliche Anordnungen auftreten, die denen der Bindungsstelle in MBP ähneln und somit fähig sind, Maltose spezifisch zu binden.

In allen Monoschichten nahm der Flächenbedarf je Molekül zu, wenn eine 10 mm Lösung von D-Maltose in Wasser als Testlösung verwendet wurde. Dieser auf die Anwesenheit von Maltose zurückzuführende Effekt ist allerdings bei jeder Bibliothek unterschiedlich stark ausgeprägt (Abbildung 3). Während im Fall von **LIB** der Flächenbedarf je Molekül in der Maltoselösung gegenüber dem in reinem Wasser nur leicht ansteigt (ca. 4 \AA^2 pro Molekül), ist im Fall der Bibliothek **SUB2**, deren Peptide sich aus Gly, Glu und Tyr zusammensetzen, die größte Steigerung zu beobachten (ca. 12 \AA^2 pro Molekül).

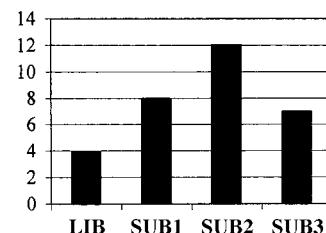


Abbildung 3. Die Zunahme des Flächenbedarfs je Molekül (\AA^2 pro Molekül) in den Monoschichten der Peptidlipid-Bibliotheken in Maltoselösung (10 mm in Wasser, pH 5.8) gegenüber dem in Wasser. Die Werte wurden anhand der durch Extrapolation aus den Isothermen bestimmten Flächenbedarfswerte berechnet.

In jeder Studie, in der Substanzbibliotheken eingesetzt werden, ist die Identifizierung der aktiven Komponenten ein wesentliches Anliegen. Unsere Experimente deuten darauf hin, dass die Substanzen in **SUB2** gegenüber Maltose aktiver sind als die Komponenten der anderen Bibliotheken. Dies lässt sich wie folgt erklären: In den Verbindungen von **SUB1** kommen keine polaren Aminosäuren vor, und beim Aufbau von **SUB3** sind keine aromatischen Aminosäuren verwendet worden. Nur die Peptide in **SUB2** enthalten die Strukturelemente, die im Bereich der Maltose-Bindungsstelle von MBP auftreten,^[10] nämlich polare, geladene (Glu) und aromatische Aminosäuren (Tyr). Diese Aminosäurereste können sich in der Oberflächenschicht so anordnen, dass supramolekulare Bereiche entstehen, die als Bindungsstellen für Maltose fungieren. Somit ahmt die monomolekulare Schicht der Komponenten von **SUB2** die Konformation und Funktion von MBP effizienter nach als die Monoschichten der anderen Unterbibliotheken. Da in **LIB** sowohl aktive als auch inaktive Peptidlipide vorliegen, ist die eigentliche Konzentration aktiver Peptidlipide in der Monoschicht geringer als im Fall von **SUB2**. Deshalb ist auch die Bindungsaffinität zu Maltose geringer.

Die Bindung von Maltose oder höheren Homologen an MBP führt aufgrund von van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen dem Substrat und den aromatischen Aminosäuren in der Bindungsstelle zu drastischen Änderungen im UV/Vis- und Fluoreszenzspektrum von MBP.^[11] In Abhängigkeit von den Substratstrukturen traten Rot- oder Blauverschiebungen der Absorptionsbanden auf. Um die Bindung von Maltose in

den monomolekularen Oberflächenschichten definitiv nachzuweisen, haben wir UV/Vis-Spektren der Monoschichten der Verbindungen von **SUB2** auf Wasser und auf einer 10 mM Lösung von Maltose in Wasser aufgenommen (Abbildung 4). Wie beim MBP-Maltose-Komplex wird die von den Tyr-Resten herrührende Absorptionsbande der Monoschicht bei

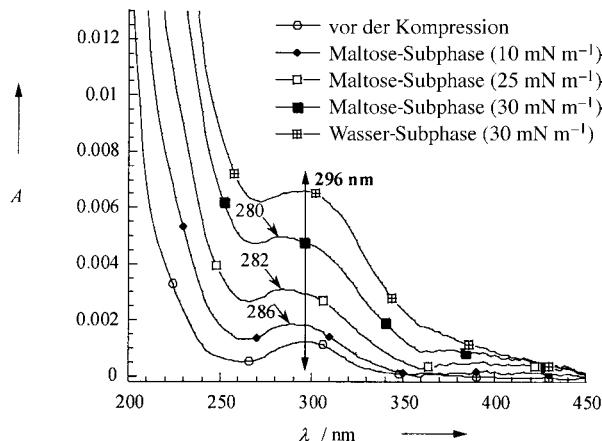


Abbildung 4. Die UV/Vis-Absorptionsspektren der Monoschicht der Komponenten von **SUB2** auf Wasser und auf einer 10 mM Lösung von Maltose in Wasser. Die Spektren der Monoschichten auf Wasser bei Oberflächendrücken $< 30 \text{ mN m}^{-1}$ sind nicht abgebildet, da sich das Absorptionsmaximum bei 296 nm beim Komprimieren nicht veränderte. (A in willkürlichen Einheiten.)

ungefähr 296 nm in Anwesenheit von Maltose deutlich blauverschoben. Vor der Komprimierung liegt das Absorptionsmaximum der Monoschicht in Wasser und in der Maltoselösung bei 296 nm. Dieses Maximum ändert sich beim kontinuierlichen Verdichten der Schicht auf reinem Wasser nicht. In der Maltoselösung dagegen verschiebt sich die Absorptionsbande nach 286, 282 und 280 nm bei einem Oberflächendruck von 10, 25 und 30 mN m^{-1} : eine schrittweise und signifikante Blauverschiebung bei Kompression. Diese Ergebnisse sowie die p - a -Isothermen sprechen dafür, dass die Maltosemoleküle infolge ausgeprägter intermolekularer Wechselwirkungen in der Monoschicht gebunden sind. Die aromatischen Tyr-Bausteine in den Peptiden von **SUB2** scheinen für die Bindung sehr wichtig zu sein. Obwohl zur Synthese der Substanzbibliothek nur eine polare und eine aromatische Aminosäure verwendet wurden, kann durch die dreidimensionale Anordnung dieser in verschiedene Positionen der Peptidkette eingebauten Aminosäuren eine effiziente Bindungsstelle entstehen.

Die Bindungsaffinität der Oberflächenschicht der Komponenten von **SUB2** zu zwei weiteren Zuckern, α -Glucose und Sucrose, haben wir ebenfalls untersucht. Die p - a -Isothermen lassen erkennen, dass sich bei Anwesenheit von Glucose oder Sucrose in der wässrigen Phase der Flächenbedarf je Molekül in der Oberflächenschicht kaum ändert (Abbildung 5). Dies ist ein deutlicher Unterschied zu den Experimenten mit Maltose. Zudem bleibt in den UV/Vis-Spektren der Mono-

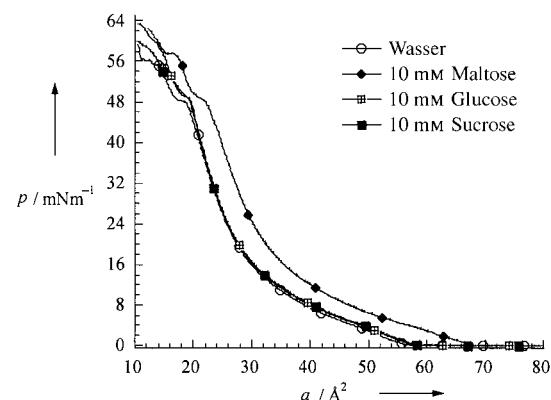


Abbildung 5. Spannungs-Flächen-Diagramm (p - a -Isothermen) für Monoschichten der Verbindungen von **SUB2** auf Wasser (pH 5.8) und auf 10 mM Lösungen von Maltose, Glucose und Sucrose in Wasser.

schicht auf einer 10 mM Lösung von Sucrose in Wasser die Absorptionsbande bei 278 nm über den gesamten Komprimierungsbereich unverändert: Die dynamischen Eigenschaften der Oberflächenschicht werden durch die Sucrose nicht beeinflusst. Die p - a -Isothermen und die UV/Vis-Spektren deuten darauf hin, dass die Monoschicht der Verbindungen von **SUB2** Sucrose weitaus weniger effizient bindet als Maltose. Dies zeigt, dass selbst die Komponenten dieser kleinen, einfachen Bibliothek **SUB2** Monoschichten mit Rezeptorspezifität bilden.

Kombinatorische Methoden können also auch in der Oberflächenchemie angewandt werden, und die „kombinatorische Oberflächenchemie“ bietet sehr einfache und viel versprechende Möglichkeiten für das Design und die Synthese künstlicher Proteine und Enzyme. Eine Peptidlipidbibliothek lässt sich bequem durch Festphasensynthese aufbauen und kann anstelle einer einzelnen Verbindung in monomolekularen Oberflächenfilmen untersucht werden. Mit der Erhöhung der Strukturvielfalt sollten auch die Chancen steigen, günstige Peptidkombinationen zu entdecken, die zu gewünschten supramolekularen Strukturen von Proteinmimetika führen.

Eingegangen am 12. August 1999,
veränderte Fassung am 7. Dezember 1999 [Z 13872]

- [1] Unzählige Publikationen zu diesem Thema sind erschienen. Ein aktueller allgemeiner Übersichtsartikel: S. Borman, *Chem. Eng. News* **1998**, 76, 47.
- [2] A. H. Hoveyda, *Chem. Biol.* **1998**, 5, R187.
- [3] I. E. Maxwell, *Nature* **1998**, 394, 325.
- [4] R. F. Service, *Science* **1998**, 280, 1670; B. Jandeleit, D. J. Schaefer, T. S. Powers, H. W. Turner, W. H. Weinberg, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 2648–2689; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 2494–2532.
- [5] Y. C. Yu, P. Berndt, M. Tirrell, G. B. Fields, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 12515.
- [6] T. Kunitake, *Pure Appl. Chem.* **1997**, 69, 1999.
- [7] K. Ariga, T. Kunitake, *Acc. Chem. Res.* **1998**, 31, 371.
- [8] G. B. Fields, R. L. Noble, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1990**, 35, 161.
- [9] J. Nielsen, *Chem. Ind.* **1994**, 902.
- [10] S. P. Spurlino, G.-Y. Lu, F. A. Quirolo, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 5202.
- [11] J. A. Hall, K. Gehring, H. Nikaido, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 17605.