

- [17] M. Gewehr, H. Kunz, *Synthesis* **1997**, 1499.
- [18] J. Habermann, H. Kunz, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 265.
- [19] L. A. Carpino, A. S. El-Faham, C. Minor, F. Albericio, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 210.
- [20] **19:** $[\alpha]_{D}^{20} = -20.8$ ($c = 1.0, \text{CH}_3\text{CN}$). FAB-MS (nba, pos.): m/z (%): 3754.4 (62.3) [$M(2 \times ^{13}\text{C}) - 4 \times (\text{tert-Butyl}) + 2 \times \text{Na}^+$], ber.: 3753.74, 3755.1 (100) [$M(3 \times ^{13}\text{C}) - 3 \times (\text{tert-Butyl}) + 2 \times \text{Na}^+$], 3755.8 (82.7) [$M(4 \times ^{13}\text{C}) - 4 \times (\text{tert-Butyl}) + 2 \times \text{Na}^+$], 3757.2 (49.1) [$M(5 \times ^{13}\text{C}) - 4 \times (\text{tert-Butyl}) + 2 \times \text{Na}^+$]; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, TMS): $\delta = 8.48 - 7.41$ (m, 1H, NH), 7.38 (m_c 5H, $\text{H}_{\text{Ar}}\text{-Bn}$), 7.28 - 7.16 (m, 5H, $\text{H}_{\text{Ar}}\text{F}$), 7.11 (d, 2H, $J = 7.9$ Hz), 7.03 (d, 2H, $J = 7.6$ Hz, 2 \times (H2-Y, H6-Y)), 6.82 - 6.76 (m, 4H, 2 \times (H3-Y, H5-Y)), 6.70, 6.55 (S_{br} , $R^{\text{NH}(e,g,\eta)}$), 5.22 - 5.14 (m, 5H, H-4, H-7, H-8', CH_2Bn), 4.92 - 4.85 (m, 2H, H-1, H-3); 4.78 - 4.69 (m, H-4'), 4.65 - 3.24 (m, 58H, $F^a, 2 \times Y^a, 2 \times V^a, 3 \times S^a, 3 \times S^b, -\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)_2=\text{CH}_2\text{CH}_2, R^a, D^a, 2 \times A^a, 4 \times P^a, 2 \times T^a, G^a, V^a, H-2, H-5, H-6', H-9', 2 \times T^b, 4 \times P^b, H-6a, H-5'), 3.22 - 2.60 (m, 10H, $F^b, 2 \times Y^b, H-6b, R^b, H-3'e$), 2.57 - 2.38 (m, 4H, $D^b, \text{CH}_2\text{CH}_2\text{Pmc}$), 2.38 - 2.35 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CONH-G-V}$), 2.49, 2.46 (s, 6H, $o, o'\text{-CH}_3\text{Pmc}$), 2.18 - 1.58 (m, 18H, 4 $\times P^b, 4 \times P^v, \text{CH}_2\text{CH}_2\text{Pmc}$), 2.03, 2.00, 1.99, 1.93, 1.91, 1.85, 1.82, 1.75, 1.71, 1.66 (10 \times s, 30H, m- CH_3Pmc , 6 $\times O\text{Ac}$, 3 $\times N\text{HAc}$), 1.53 - 1.02 (m, 9H, 2 $\times V^b, R^v, R^b, H-3'a, 2 \times A^b$), 1.35, 1.23, 1.20, 1.15, 1.11, 1.08, 1.06, 1.05, (s, 69H, 7 $\times C(\text{CH}_3)_3, C(\text{CH}_3)_2\text{Pmc}$), 0.98 - 0.90 (m, 3H, T_1^v), 0.89 - 0.83 (m, 3H, T_2^v), 0.82 - 0.78 (m, 12H, V^v); $^{13}\text{C-NMR}$ (DEPT) (100.6 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta = 98.40$ (C-1), 98.01 (C-2'), 41.18, 40.97, 38.40, 36.95, 35.87 (2 $\times Y^b, F^b, C-3', D^b, R^b, \text{CH}_2\text{CONH}$); 32.12 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Pmc}$), 19.05, 18.98, 18.75, 18.75, 18.16, 18.07, 17.95 (2 $\times V^v, T_1^v, o, o'\text{-CH}_3\text{Pmc}$), 16.77, 16.72, 16.00 ($T_2^v, 2 \times A^b$), 11.82 (m- CH_3Pmc).$
- [21] **20:** $[\alpha]_{D}^{20} = -76.9$ ($c = 1.0, \text{H}_2\text{O}$); FAB-MS (nba + LiBr, pos.): m/z (%): 2770.7 (0.62) [$M+\text{Li}^+$], ber.: 2770.30; $^1\text{H-NMR}$ ($^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$) (400 MHz, D_2O): $\delta = 7.37 - 7.24$ (m, 3H), 7.23, 7.16 (m, 2H, $\text{H}_{\text{Ar}}\text{F}$), 7.08 - 6.97 (m, 4H, 2 \times (H2-Y, H6-Y)), 6.81 - 6.72 (m, 4H, 2 \times (H3-Y, H5-Y)), 4.90 (m_c , 1H, H-1), 4.72 - 4.66 (m, 1H, D^a), 4.64 - 4.59 (m, 2H, F^a, R^a), 4.57 - 4.50 (m, 1H, A_1^a), 4.49 - 4.42 (m, 6H, $A_2^a, 2 \times S^c, 2 \times Y^a$), 4.41 - 4.33 (m, 6H, 4 $\times P^a, S_3^a, T_1^a$), 4.32 - 4.29 (m, 2H, V_1^a, T_2^a), 4.28 - 4.23 (m, 1H, T_1^b), 4.22 - 4.17 (m, 1H, T_2^b), 4.12 - 4.03 (m, 3H, H-2, V_2^a, S_1^b), 4.01 - 3.27 (m, 40H, H-3, H-4, H-5, H-6, H-4', H-5', H-6', H-7', H-8', H-9', $\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$, 2 $\times S^b, G^a, 4 \times P^b$), 3.17 (m., 2H, R^b), 3.10 - 2.99 (m, 1H, F^{1a}), 2.90 - 2.77 (m, 7H, 2 $\times Y^b, D^b, F^{1b}$), 2.67 (dd, 1H, H-3'e), 2.60 - 2.54 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CONH-G-V}$), 2.33 - 2.18 (m, 4H, 4 $\times P^{1a}$), 2.11 - 1.77 (m, 15H, 2 $\times V^b, 4 \times P^{1b}, 4 \times P^v, R^{1a}$), 2.03, 2.01, 1.93 (s, 9H, 3 $\times N\text{HAc}$), 1.76 - 1.59 (m, 4H, H-3'a, R^{1b}, R^v), 1.34 (m, 6H, $J = 6.5$ Hz, 2 $\times A^b$), 1.30 - 1.21 (m, 3H, T_1^v), 1.15 (d, 3H, $J = 6.2$ Hz, T_2^v), 0.97 - 0.85 (m, 12H, 2 $\times V^v$); $^{13}\text{C-NMR}$ (DEPT) (100.6 MHz, D_2O): $\delta = 99.62$ (C-1), 99.20 (C-2'), 22.14, 21.94, 21.49, (3 $\times N\text{HAc}$), 18.73, 18.39, 18.22, 17.54 (2 $\times T^v, 2 \times V^v$), 15.11, 14.92 (2 $\times A^b$).
- [22] Zur Bedeutung dieser Zieleigenschaft siehe Abschnitt 2 in Lit. [2a], S. 885, links.

Synthese und Membranbindungseigenschaften eines Lipopeptids der membranassoziierten Domäne des Influenza-A-Virus-Hämaggglutinins**

Frank Eisele, Jürgen Kuhlmann und Herbert Waldmann*

Zu den Schlüsselschritten einer viralen Infektion zählen die Anbindung des Virus an die Oberfläche der Wirtzelle, seine Verschmelzung mit der Zelle und die Abknospung (budding) neuer viraler Partikel. Bei diesem komplexen, mehrstufigen Prozess spielen posttranslational modifizierte Proteine, die in die Lipiddoppelschicht der Viren eingelagert sind, eine entscheidende Rolle. So ist das Hämaggglutinin des Influenza-A-Virus außerhalb der Virenmembran glycosyliert^[1, 2] und in der Nähe seiner Transmembranregion S-palmitoyliert (Abbildung 1).^[3, 4] Der Glycopeptidbereich vermittelt die selektive Bindung an die Sialinsäurerzeptoren auf der Oberfläche der Wirtzelle und ist für die Initiierung der Virusinfektion verantwortlich. Die Lipidreste werden für die Wechselwirkung der Zellmembran mit dem freien Capsid bei der Abknospung von Virus-Nachkommen benötigt^[5, 6] und vermitteln vermutlich Protein-Protein- und Protein-Lipid-Wechselwirkungen innerhalb des Virus.^[7] Darüber hinaus könnten die lipidierten Bereiche nach dem Eintritt des Viruspartikels in die Zelle bei Fusionsprozessen der viralen Membran mit dem Endosom eine wichtige Rolle spielen.^[8, 9] Dieser Vorschlag wird jedoch kontrovers diskutiert, da mehrere Untersuchungen darauf hindeuten, dass die lipidierte cytoplasmatische Domäne dieses komplexen viralen Lipoglycoproteins nicht entscheidend für seine Membranfusionsaktivität ist.^[10]

Um diese und verwandte Prozesse bis in die molekularen Details zu untersuchen, könnten sich fluoreszenzmarkierte Peptide, die die Stellen für die Anknüpfung der Lipidgruppen an das Proteinrückgrat enthalten, in biologischen Experimenten als effiziente Werkzeuge erweisen.^[11] Ihre Synthese wird jedoch durch die ausgeprägte Basenlabilität der Palmitinsäure-Thioester kompliziert, die bei $\text{pH} > 7$ spontan hydrolysieren.^[12] Für die Herstellung solcher labiler Peptidkonjugate bieten enzymatische Methoden wertvolle Alternativen zu den klassischen chemischen Verfahren.^[11] Wir berichten hier über die Entwicklung der *p*-(Phenylacetoxymethyl)-PAOB-Estergruppe, einer neuen enzymlabilen Schutzgruppe,

[*] Prof. Dr. H. Waldmann

Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie
Abteilung Chemische Biologie
Fax: (+49) 231-133-2499
und Universität Dortmund, Institut für Organische Chemie
Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)
E-mail: herbert.waldmann@mpi-dortmund.mpg.de

Dr. J. Kuhlmann
Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie
Abteilung Strukturelle Biologie
Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)

Dr. F. Eisele
Universität Karlsruhe
Institut für Organische Chemie
Richard-Willstätter-Allee 2, 76128 Karlsruhe (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie unterstützt.

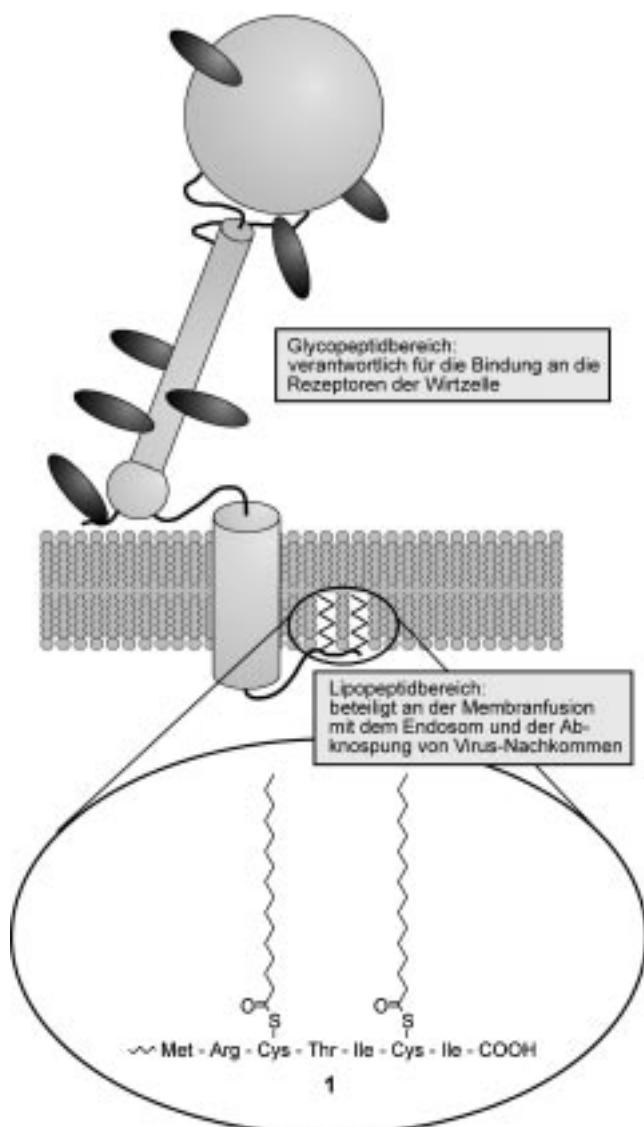
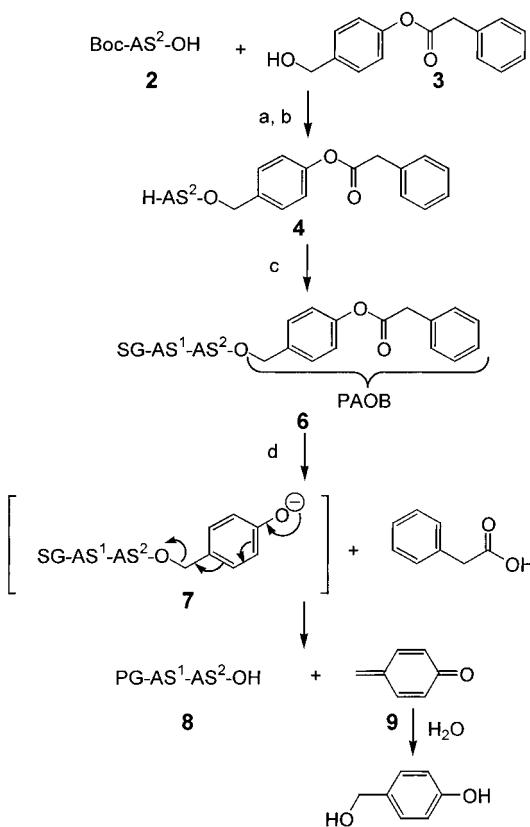


Abbildung 1. Schematische Darstellung des glycosylierten und lipidierten Influenza-A-Virus-Hämagglytinins und des doppelt palmitoylierten Zielpeptids 1.

pe für Carboxyfunktionen, und deren Verwendung beim Aufbau eines fluoreszenzmarkierten Lipopeptids des Influenza-A-Virus-Hämagglytinins.

Da die enzymlabile Estergruppe unter möglichst milden und für die Synthese von Lipopeptiden geeigneten Bedingungen entfernt sein muss, griffen wir auf ein Prinzip zurück, bei dem nach der Spaltung einer enzymlabilen Bindung eine spontane Fragmentierungsreaktion erfolgt. Zur Überprüfung dieses Deblockierungsprinzips sollten N-terminal geschützte Dipeptid-PAOB-Ester **6** hergestellt werden (Schema 1). Die PAOB-Gruppe enthält eine Phenylacetat-Funktionalität, die spezifisch von der Penicillin-G-Acylase erkannt und entfernt wird. Dadurch entsteht ein Phenolat **7**, das spontan zum Chinonmethid **9** und den gewünschten freien Carbonsäuren **8** fragmentiert. Das Chinonmethid wird durch den Angriff von Wasser oder zugegebenen Nucleophilen abgefangen. Dieses Abspaltungsprinzip der enzyminduzierten Fragmentierung wurde schon zuvor für die Entwicklung enzymlabiler Urethan-Schutzgruppen ver-



	SG	AS ¹	AS ²	Ausbeute (%)
8a	Aloc	Val	Ala	80
8b	Boc	Ser	Ile	80
8c	Boc	Thr	Phe	82
8d	Boc	Ala	Pro	82

Schema 1. Synthese und selektive enzymatische Deblockierung der Ester **6**; a) DIC/DMAP (kat.), b) HCl/Et₃O, 63–90%, 2 Stufen; c) SG-AS¹-OH 5, EEDQ, 71–87%; d) Phosphatpuffer (pH 7), 10proz. Methanol, Penicillin-G-Acylase. DIC: *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid; DMAP: 4-(Dimethylamino)pyridin; EEDQ: 2-Ethoxy-1-(ethoxycarbonyl)-1,2-dihydrochinolin.

wendet.^[13, 14] Wir weisen allerdings darauf hin, dass bereits im Falle der Urethane der erfolgreiche Verlauf der enzymvermittelten Fragmentierung bei pH-Werten von 6–8 nicht selbstverständlich war. Die entsprechende nichtenzymatische Fragmentierungsreaktion erfordert starke Basen wie flüssigen Ammoniak,^[15] während in Anwesenheit des Biokatalysators die Entschüttung bei annähernd neutralem pH-Wert ablieft. Im Unterschied zur Entfernung der Urethan-Schutzgruppen, bei denen durch die Freisetzung von CO₂ das Gleichgewicht zur Produktseite verschoben wird, fehlt diese Triebkraft bei der zu entwickelnden Esterschutzgruppe völlig. Daher erschien es fraglich, ob dieses Abspaltungsprinzip von einer Amino- auf eine Carboxy-Schutzgruppe übertragen werden kann.

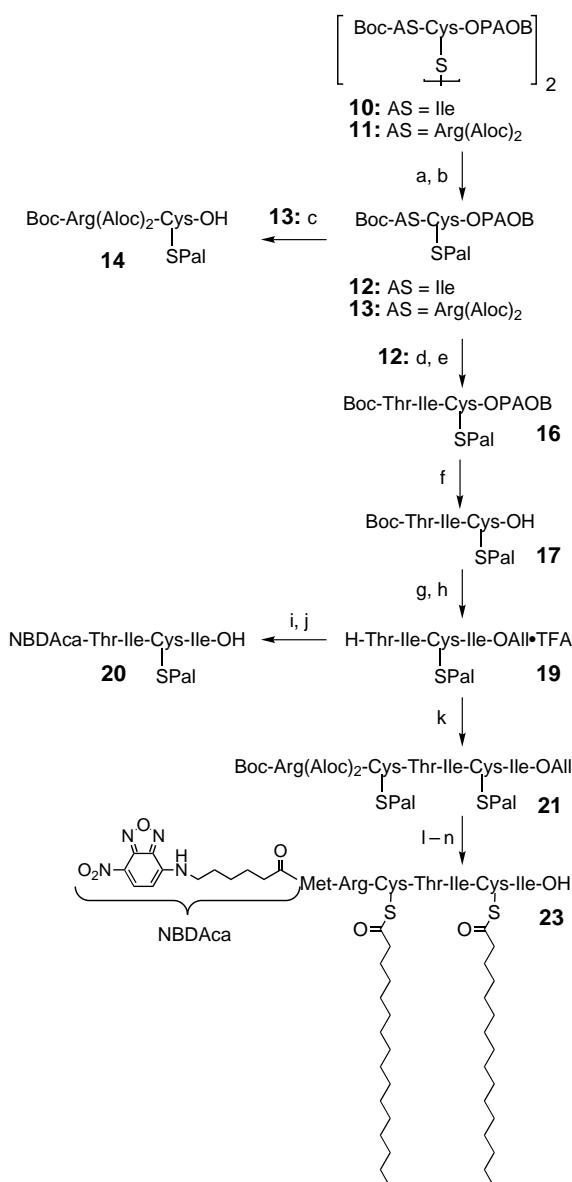
Die N-terminal geschützten Dipeptid-PAOB-Ester **6** konnten auf einfache und effektive Weise synthetisiert werden. An die Veresterung Boc-geschützter Aminosäuren **2** mit *p*-(Phenylacetoxy)benzylalkohol **3** schloss sich die Acidolyse der Boc-Gruppe und die Kupplung der resultierenden Aminosäure-PAOB-Ester **4** mit verschiedenen N-terminal geschützten Aminosäuren **5** an (Schema 1). Bei Behandlung der Dipeptid-PAOB-Ester **6** mit Penicillin-G-Acylase bei pH 7

und Raumtemperatur fand die gewünschte selektive C-terminalen Deblockierung statt. Das Enzym katalysiert die Hydrolyse des Phenylacetats, und die intermediär auftretenden Phenolate **7** gehen selbst bei pH 7 und ohne die zusätzliche Triebkraft einer CO₂-Freisetzung die Fragmentierung zu den gewünschten C-terminal entschützten Dipeptiden **8** ein. Das Chinonmethid **9** wird effektiv durch Wasser abgefangen, sodass die Zugabe stärkerer Nucleophile nicht nötig ist. Die verwendete Penicillin-G-Acylase ist ein preiswertes und in großer Menge verfügbares Enzym (in immobilisierter und nativer Form sowie als quervernetzte Enzymkristalle (CLECs)). Sie hat eine breite Substrattoleranz und greift weder Peptidbindungen noch Urethane an. Darüber hinaus liegt innerhalb der PAOB-Estergruppe die Angriffsstelle für das Enzym in ausreichender Entfernung von den C-terminalen Aminosäuren. Dadurch ist die Effektivität der enzyminduzierten Deblockierung nahezu unabhängig von deren Struktur und ihrem sterischen Anspruch (z.B. D- oder L-Aminosäure, acyclische oder cyclische Aminosäure, siehe Schema 1). Alle gewünschten Peptide **8a–8d** wurden deshalb in hoher Ausbeute isoliert.

Andererseits konnten auch die Boc- und Aloc-Gruppen selektiv von den Dipeptidestern **6** ohne Beeinträchtigung des PAOB-Esters entfernt werden, wodurch dessen Orthogonalität zu diesen N-terminalen Schutzgruppen belegt ist (siehe auch weiter unten).

Die Leistungsfähigkeit der enzymlabilen PAOB-Ester wurde bei der Synthese des fluoreszenzmarkierten Derivates des viralen Hämaggglutinin-Peptids **1** demonstriert (Schema 2). Diese Synthese wird zum einen durch die Basenlabilität der Thioester und zum anderen durch die Notwendigkeit, die Arginin-Seitenkettenfunktionalität zu schützen, kompliziert. Dadurch ist ein Satz dreier orthogonal zueinander stabiler Schutzgruppen erforderlich, wobei die Verwendung von basenlabilen und hydrogenolytisch entfernbaren Schutzgruppen ausscheidet. Dieses Problem konnte durch den Einsatz der säurelabilen Boc-Gruppe für den N-Terminus, der enzymatisch abspaltbaren PAOB-Estergruppe für den C-Terminus und der Pd⁰-katalysiert entfernbaren Aloc-Gruppe für die Guanidinofunktion des Arginins gelöst werden.

Die Synthesesequenz begann mit dem Aufbau zweier S-palmitoylierter Dipeptid-PAOB-Ester. Zu diesem Zweck wurden die Cystein-Dipeptide **10** und **11** nach den bereits oben beschriebenen Peptidknüpfungsverfahren in hoher Ausbeute hergestellt. Anschließend konnten die Disulfidbrücken mittels Dithiothreit (DTT) reduziert und die freigesetzten Cystein-Thiolfunktionen in hoher Ausbeute in die S-acylierten Dipeptide **12** und **13** überführt werden (Schema 2). Die Behandlung des Arginyl-Peptid-PAOB-Esters **13** mit Penicillin-G-Acylase bei pH 7 und 25 °C führte, ohne unerwünschte Nebenreaktionen, zur Hydrolyse der C-terminalen Schutzgruppe. Die milden Reaktionsbedingungen und die Spezifität des Biokatalysators garantierten die Unversehrtheit des Thioesters und der bisacylierten Guanidinofunktion, sodass das selektiv deblockierte S-palmitoylierte Dipeptid **14** in hoher Ausbeute isoliert werden konnte. Vom Isoleucyl-Peptid-PAOB-Ester **12** wurde hingegen zunächst die Boc-Gruppe selektiv entfernt, um dann mit Boc-Threonin die Peptidkette zum Lipotripeptid **16** zu verlängern. Auch in



Schema 2. Chemoenzymatische Synthese von **23**; a) DTT, NEt₃, b) 2 Pal-Cl, NEt₃, **12**: 83 %, **13**: 81 %, 2 Stufen; c) Penicillin-G-Acylase, Dimethyl-β-cyclodextrin, 0.05 M Phosphatpuffer (pH 7), 25 °C, 77%; d) TFA, e) Boc-Thr-OH **15**, EEDQ, NEt₃, 74 %, 2 Stufen; f) Penicillin-G-Acylase, Dimethyl-β-cyclodextrin, 0.05 M Phosphatpuffer (pH 7), 25 °C, 81%; g) H-Ile-OAll·HOTos **18**, EEDQ, NEt₃, h) TFA, 71 %, 2 Stufen; i) NBDAc-OH, EDC, HOBT, NEt₃, j) [Pd(PPh₃)₄], DMB, 69 %, 2 Stufen; k) **14**, EEDQ, NEt₃, 46%; l) TFA, m) NBDAc-Met-OH **22**, EDC, HOBT, NEt₃, n) [Pd(PPh₃)₄], DMB, 69 %, 3 Stufen. Aloc: Allyloxycarbonyl, Boc: *tert*-Butyloxycarbonyl, DMB: Dimethylbarbitursäure; EDC: *N*-Ethyl-*N*'-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimid-Hydrochlorid; HOBT: 1-Hydroxybenzotriazol; Pal: Palmitoyl; TFA: Trifluoressigsäure; Tos = 4-Toluolsulfonyl.

diesem Fall ergab die Behandlung von **16** mit der Penicillin-G-Acylase bei pH 7 und 25 °C problemlos und selektiv die Entfernung der C-terminalen enzymlabilen Schutzgruppe. Der deblockierte Tripeptidthioester **17** wurde in hoher Ausbeute isoliert. Die enzymkatalysierten Transformationen laufen allerdings nur dann ab, wenn Dimethyl-β-cyclodextrin zur Reaktionsmischung gegeben wird. Das Cyclodextrin hat eine hydrophobe Innenseite, in die sich die hydrophoben Palmitinsäurefunktionen einlagern können. Dadurch wird das

Peptid in Lösung gebracht und ist somit dem Biokatalysator zugänglich. Vermutlich schützt der gebildete Einschlusskomplex den Thioester auch vor einer Hydrolyse.

Im nächsten Syntheseschritt wurde das S-palmitoylierte Tripeptid **17** mit dem Isoleucinyl-ester **18** kondensiert und anschließend die Boc-Gruppe entfernt, wodurch das Lipotetrapeptid **19** in hoher Ausbeute erhalten wurde. Dieses enthält am C-Terminus die Allylestergruppe, um gegen Ende der Synthese die gleichzeitige Freisetzung der Arginin-Seitenkettenfunktionalität und der C-terminalen Carboxyfunktion zu ermöglichen. Im Anschluss wurde die Kondensation des C-terminal deblockierten und S-palmitoylierten Dipeptidbausteins **14** mit dem N-terminal freien Lipotetrapeptid **19** zum zweifach palmitoylierten Lipo-hexapeptid **21** durchgeführt. Nach Entfernung der Boc-Gruppe von **21** konnte der Fluoreszenzmarker 7-Nitrobenz-2-oxo-1,3-diazol (NBD) zusammen mit der N-terminalen Aminosäure Methionin angeknüpft werden. Den Abschluss der Synthese bildete die Abspaltung der drei allylischen Schutzgruppen durch Pd⁰-katalysierten Allyltransfer auf *N,N*'-Dimethylbarbitursäure als C-Nucleophil.^[16] In ähnlicher Weise erfolgte die Einführung des NBD-Markers und die Entfernung der Allylestergruppe bei der Herstellung des Lipotetrapeptids **20**. Die gesamte Synthesesequenz lieferte somit die fluoreszenzmarkierten und palmitoylierten Lipopeptide **20** und **23** des Influenza-A-Virus-Hämagglytinins in hoher Gesamtausbeute.

Diese Verbindungen eignen sich für die Bestimmung der Membranbindungseigenschaften viraler Proteine. Hierzu wurden Untersuchungen mit **20** und **23** in einem Versuchsaufbau durchgeführt, bei dem ihre Bindung an eine Liposomen-Modellmembran kinetisch charakterisiert werden konnte.^[17]

Für den Einsatz im Assay wurden Methanolösungen von **20** und **23** mit einem hundertfachen molaren Überschuss des Modellmembran-Lipids (hier: Palmitoyloleoylphosphatidylcholin, POPC) und einem zweifachen Überschuss an nichtaustauschbarem Fluoreszenzquencher (*N*-Lissaminrhodamin-sulfonyl)phosphatidylethanolamin, Rho-DHPE) vermischt. Zu diesen Mischungen wurde Pufferlösung gegeben, um eine POPC-Konzentration von 1 mM zu erhalten. Die gemischten Vesikel wurden dann durch mehrmaliges Schockgefrieren gebildet und durch Extrusion auf eine definierte Größe gebracht (ungefähr 100 nm Ø). Befindet sich der Quencher Rho-DHPE in der Nähe eines NBD-markierten Lipopeptids, wird die Fluoreszenzemission des NBD-Moleküls (535 nm) gelöscht. Bei einer Vermischung dieser Vesikel mit einem Überschuss unbeladener POPC-Vesikel können mobile Lipopeptide ihre ursprüngliche Umgebung verlassen. Nach dem Eintritt in die quencherfreien Vesikel wird ihre Fluoreszenz nicht mehr gelöscht, und ein Anstieg der Fluoreszenz bei 535 nm wird sichtbar (Abbildung 2a).

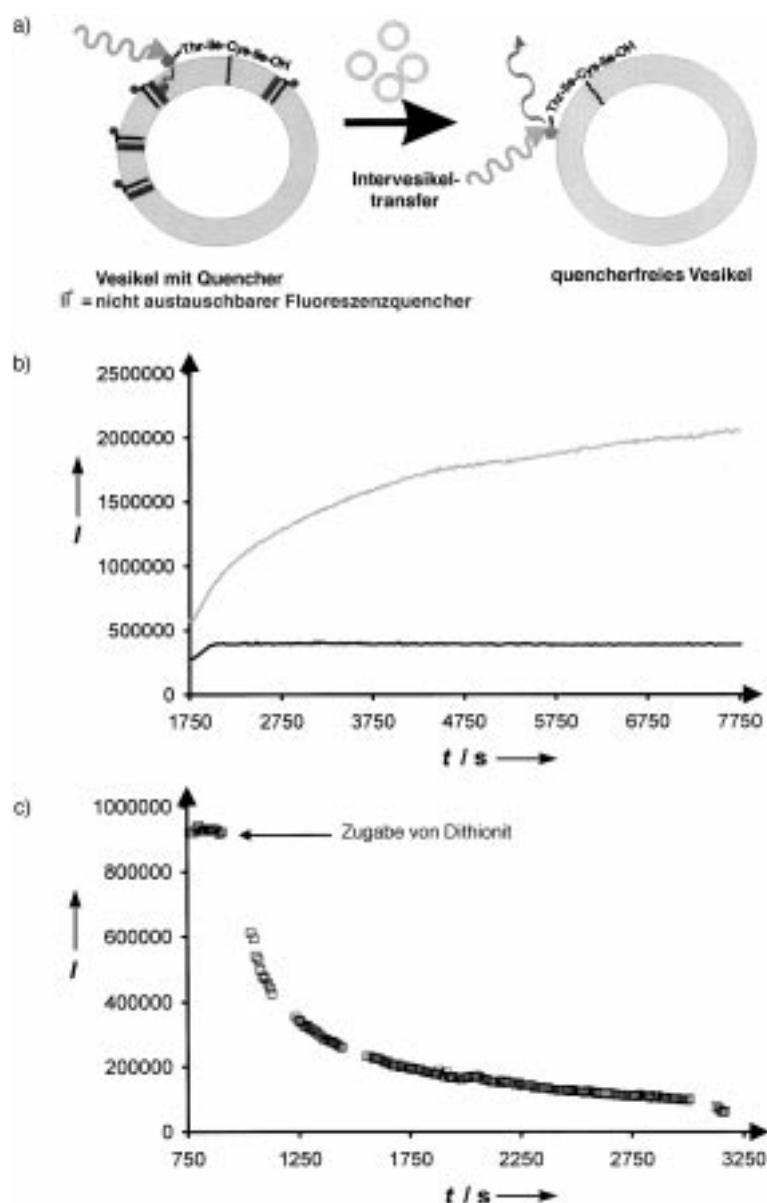


Abbildung 2. a) Prinzip des Intervesikeltransfers von Lipopeptiden und seiner fluoreszenzspektroskopischen Detektion unter Zuhilfenahme eines nichtaustauschbaren Fluoreszenzquenchers; b) Intervesikeltransfer des monopalmitoylierten Tetrapeptids **20** (hellgrau) und des doppelt palmitoylierten Heptapeptids **23** (schwarz); c) Flip-Flop des monopalmitoylierten Tetrapeptids **20**. I: rel. Fluoreszenz.

Die gemischten Vesikel wurden mit jeweils 1 Mol-% der Peptide **20** und **23** und 2 Mol-% Rho-DHPE erzeugt. Nachdem Lösungen dieser Vesikel (jeweils 5 µM an POPC) mit einem zwanzigfachen Überschuss unbeladener POPC-Vesikel gemischt worden waren, zeigte sich nur beim einfach palmitoylierten Tetrapeptid **20** ein Anstieg der Fluoreszenzemission. Dies weist auf den Übergang dieses Lipopeptids auf die Rho-DHPE-freien Vesikel hin und belegt, dass eine einzelne Lipidmodifizierung nicht für eine irreversible Membraninsertion ausreicht. Dagegen wurde die NBD-Emission des Heptapeptids **23** durch die Verdünnung mit den quencherfreien Vesikeln nicht erhöht (Abbildung 2b). Dadurch wird gezeigt, dass zwei Palmitoylreste ausreichen, um das Lipopeptid stabil in seiner ursprünglichen Umgebung zu verankern.

Der beschriebene Intervesikeltransfer des Lipopeptids **20** ist aus zwei separaten Prozessen zusammengesetzt. Lediglich die an der Außenseite der gemischten Vesikel lokalisierten Peptide können direkt durch Diffusion auf die Acceptorvesikel übergehen. Dieser Schritt kann als irreversibler Mechanismus erster Ordnung beschrieben werden, solange die Acceptorvesikel in großem Überschuss vorliegen. Die an der Innenseite gebundenen Lipopeptide hingegen müssen zusätzlich eine reversible Flip-Flop-Diffusion vollführen, um überhaupt an der Vesikeloberfläche zu erscheinen. In erster Näherung wurde deshalb die Gesamtänderung der Fluoreszenz des Tetrapeptids **20** durch eine monoexponentielle Funktion beschrieben, mit einem zusätzlichen linearen Term zur Berücksichtigung des Flip-Flop-Prozesses. Die besten Anpassungen ergaben sich für eine Geschwindigkeitskonstante von $1.3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ mit einer linearen Drift von 1.8×10^2 Fluoreszenzeinheiten pro Sekunde. Der lineare Anteil an der Gesamtamplitude belief sich dabei auf 45%.

Die getrennte Analyse des Flip-Flop-Austauschs ist durch die Zugabe von Dithionit zu Vesikeln möglich, die das Lipopeptid, aber nicht den Quencher enthalten. Die Behandlung mit Natriumdithionit hatte die schnelle Reduktion aller NBD-Fluorophore auf der Außenseite der Vesikel zur Folge. Diesem ersten Abfall des Emissionssignals folgte eine langsamere Fluoreszenzenkung, die auf den Flip-Flop-Prozess der intravesikulären Lipopeptide nach außen hindeutet (Abbildung 2c).

Die messbaren Geschwindigkeitskonstanten für den Intervesikeltransfer des Tetrapeptids **20** und des Heptapeptids **23** zwischen POPC-Modellmembranen können mit Werten verglichen werden, die für Lipopeptide mit einer einzelnen Farnesylmodifizierung oder mit zwei hydrophoben Resten (Farnesyl und Palmitoyl) ermittelt wurden.^[18] Bei diesen Messungen konnten bei 37°C Halbwertszeiten von 21 Sekunden für ein Peptid mit der Sequenz NBD-GCMGLPC(Far)-OMe und 155 Stunden für das Peptid NBD-GC(Pal)MGLPC-(Far)-OMe berechnet werden. Beim Tetrapeptid **20** ergibt sich bei 20°C eine Halbwertszeit von 9 Minuten. Dies zeigt, dass eine einzelne Palmitoylgruppe eine stärkere Membraninsertion verursacht als ein Farnesylthioether, die Desorption aus der Modellmembran aber immer noch relativ schnell erfolgt. Während die Kombination eines Farnesylthioethers und eines Palmitinsäurethioesters einen langsamen, aber immer noch messbaren Intervesikeltransfer ermöglichte, zeigte sich bei den hier durchgeföhrten Experimenten, dass sich im Beisein zweier Palmitoylreste überhaupt keine Desorption des lipidierten Peptids aus der Modellmembran detektieren lässt. Daraus kann man schließen, dass ein doppelt palmitoylierter Membrananker zu einer quasi irreversiblen Bindung eines zweifach palmitoylierten Proteins führt, die lediglich durch die Hydrolyse der Thioester aufgehoben werden könnte.

Die ermittelten Werte stehen in Einklang mit Ergebnissen, die für andere Modellpeptide aus lipidierten Proteinen (z.B. aus Rho) erhalten wurden. Diese wurden verwendet, um die Membranbindungseigenschaften des dazugehörenden Proteins vorherzusagen.^[19, 20] Es erscheint daher möglich, dass durch detaillierte biophysikalische Untersuchungen verschiedener Hämaggglutinin-Lipopeptide auch die Membranbin-

dungseigenschaften dieses viralen Lipoglycoproteins abgeleitet werden können.

Eingegangen am 10. Juli 2000 [Z 15417]

- [1] a) I. A. Wilson, J. J. Skehel, D. C. Wiley, *Nature* **1981**, *289*, 366–373; b) D. C. Wiley, J. J. Skehel, *Annu. Rev. Biochem.* **1987**, *56*, 365–394; c) P. A. Mir-Bullough, F. M. Hughson, J. J. Skehel, D. C. Wiley, *Nature* **1994**, *371*, 37–43.
- [2] a) W. Keil, R. Geyer, J. Dabrowski, U. Dabrowski, H. Niemann, S. Stirm, H.-D. Klenk, *EMBO J.* **1985**, *4*, 2711–2720; b) S. Y. Mir-Shekar, D. A. Ashford, D. J. Harvey, R. A. Dwek, I. T. Schulze, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 4027–4036.
- [3] M. F. G. Schmidt, *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, *988*, 411–426.
- [4] R. J. A. Grand, *Biochem. J.* **1989**, *258*, 625–638.
- [5] E. Ponimaskin, M. F. G. Schmidt, *Biochem. Soc. Trans.* **1995**, *23*, 565–568.
- [6] T. Zurcher, G. Luo, P. Palese, *J. Virol.* **1994**, *68*, 5748–5754.
- [7] a) J. Lazarovits, S. P. Shia, N. Ktistakis, M. S. Lee, C. Bird, M. G. Roth, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 4760–4767; b) H. Y. Naim, M. G. Roth, *J. Virol.* **1993**, *67*, 4831–4841; c) E. Fire, O. Gutman, M. G. Roth, Y. I. Henis, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 21075–21081.
- [8] B. Lambrecht, M. F. G. Schmidt, *FEBS Lett.* **1986**, *202*, 127–132.
- [9] C. W. Naeve, D. Williams, *EMBO J.* **1990**, *9*, 3857–3866.
- [10] a) D. A. Steinhauer, S. A. Wharton, D. C. Wiley, J. J. Skehel, *Virology* **1991**, *184*, 445–448; b) H. Y. Naim, B. Amarnah, N. T. Ktistakis, M. G. Roth, *J. Virol.* **1992**, *66*, 7585–7588; c) H. Jin, K. Subbarao, S. Bagai, G. P. Leser, B. R. Murphy, R. A. Lamb, *J. Virol.* **1996**, *70*, 1406–1414.
- [11] D. Kadereit, J. Kuhlmann, H. Waldmann, *ChemBioChem* **2000**, *3*, 200–203.
- [12] H. Waldmann, D. Sebastian, *Chem. Rev.* **1994**, *24*, 911–937.
- [13] E. Naegele, M. Schelhaas, N. Kuder, H. Waldmann, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6889–6902.
- [14] T. Pohl, H. Waldmann, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 6702–6710.
- [15] G. LeCorre, E. Guibé-Jampel, M. Wakselman, *Tetrahedron* **1978**, *34*, 3105–3112.
- [16] H. Kunz, J. Maerz, *Angew. Chem.* **1989**, *1424–1425*; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *37*, 1375–1377.
- [17] a) J. R. Silvius, F. l'Heureux, *Biochemistry* **1994**, *33*, 3014–3022; b) S. Shahinian, J. R. Silvius, *Biochemistry* **1995**, *34*, 3813–3822; c) für eine aktuelle Anwendung dieses Assays mit nichtpeptidischen Verbindungen siehe: A. Anikin, A. Buchynskyy, U. Kempin, K. Stembera, P. Welzel, G. Lantzsch, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 3931–3935; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 3703–3707.
- [18] R. C. Macdonald, R. I. Macdonald, B. P. Menco, K. Takeshita, N. K. Subbarao, L. R. Hu, *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1061*, 297–303.
- [19] H. Schroeder, R. Leventis, S. Rex, M. Schelhaas, E. Nägele, H. Waldmann, J. R. Silvius, *Biochemistry* **1997**, *36*, 13102–13109.
- [20] Übersichtsartikel zu biophysikalischen Experimenten: J. R. Silvius, *Liposome Res.* **1999**, *9*, 1–19.