

Kohlenhydrat-Arrays: Hilfsmittel für die Glycomik

Kerry R. Love und Peter H. Seeberger*

Kohlenhydrate sind wichtige Bestandteile von Glycolipiden und Glycoproteinen an der Zelloberfläche und spielen bei der Erkennung, Adhäsion und interzellulärer Signalübermittlung eine entscheidende Rolle.^[1] Diese Vorgänge sind für das normale Wachstum und die Wiederherstellung von Gewebe, das Eindringen von Bakterien und Viren in Wirtsorganismen^[2] sowie für Beweglichkeit und Progression von Tumorzellen essentiell.^[3] Eine genauere Kenntnis der Protein-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen würde erheblich zur Aufklärung der Mechanismen interzellulärer Signalübermittlung beitragen und vielleicht zu besseren diagnostischen und therapeutischen Hilfsmitteln führen.

DNA- und Protein-Mikroarrays, die durch Anknüpfen der Biopolymere an einen Träger in räumlich getrennter Anordnung hergestellt werden, ermöglichen ein kostengünstiges und leistungsfähiges Screening von Wechselwirkungen mit diesen Verbindungen. Die Oligonucleotid-Arrays wurden in situ an Glaträgern photolithographisch^[4] oder durch Aufdrucken mit Tintenstrahl-Druckern gebildet.^[5] Mit der Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) gelingt die rasche Amplifikation von Bibliotheken komplementärer DNA (cDNA), um Einblicke in die Zellvorgänge bei der Regulation der Genexpression zu ermöglichen.^[6] Protein-Arrays an Glaträgern, Mikrovertiefungen^[7] und dreidimensional modifizierten Gelpad-Chips^[8] wurden für ein leistungsfähiges Screening der Proteinaktivität und den Nachweis von Protein-Protein-, Protein-DNA- und Protein-Ligand-Wechselwirkungen eingesetzt.^[9]

Der Entwicklung von Kohlenhydrat-Biosensoren und -Arrays gilt in letzter Zeit stärkere Aufmerksamkeit. Kohlenhydrate gehören von Natur aus zu den chemisch komplizierteren Verbindungen, und bei der Herstellung von Kohlenhydrat-Arrays sind mehrere Hauptprobleme zu berücksichtigen: 1) Für eine erfolgreiche Proteinerkennung muss das nichtreduzierende Ende der Zucker zugänglich sein; 2) die vielen Hydroxygruppen sind manchmal schwer zu unterscheiden, aber Linkersysteme benötigen für die Verknüpfung des Kohlenhydrats mit dem Träger hochaffine Wechselwirkungen; 3) Kohlenhydrate einer bestimmten Struktur sind oft

nur schwer zugänglich, da sowohl ihre Isolierung als auch ihre Synthese sehr schwierig ist. Um Kohlenhydraten mit einer Trägeroberfläche zu verknüpfen, wurden zwei Linkersysteme entwickelt: Das erste nutzt die natürliche Affinität von Biotin zu Streptavidin,^[10] während das zweite auf der Bildung von Alkanthiolat-Monoschichten an einer Goldoberfläche beruht.^[11]

Biotin-Streptavidin-Linker

Erste Untersuchungen der Lectin-Kohlenhydrat-Bindung nutzten die Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung zur Präsentation der Oligosaccharide (Abbildung 1). Um die Bindungseigenschaften von sechs gängigen Lectinen zu bestimmen, wurden zwölf Glycane am anomeren Asparaginrest biotinyliert und in den 96 Vertiefungen einer mit Streptavidin beschichteten Titerplatte immobilisiert.^[12]

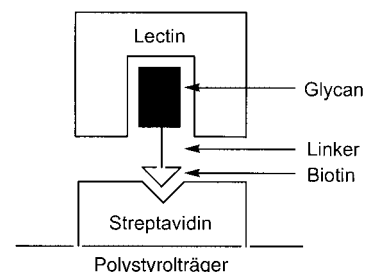
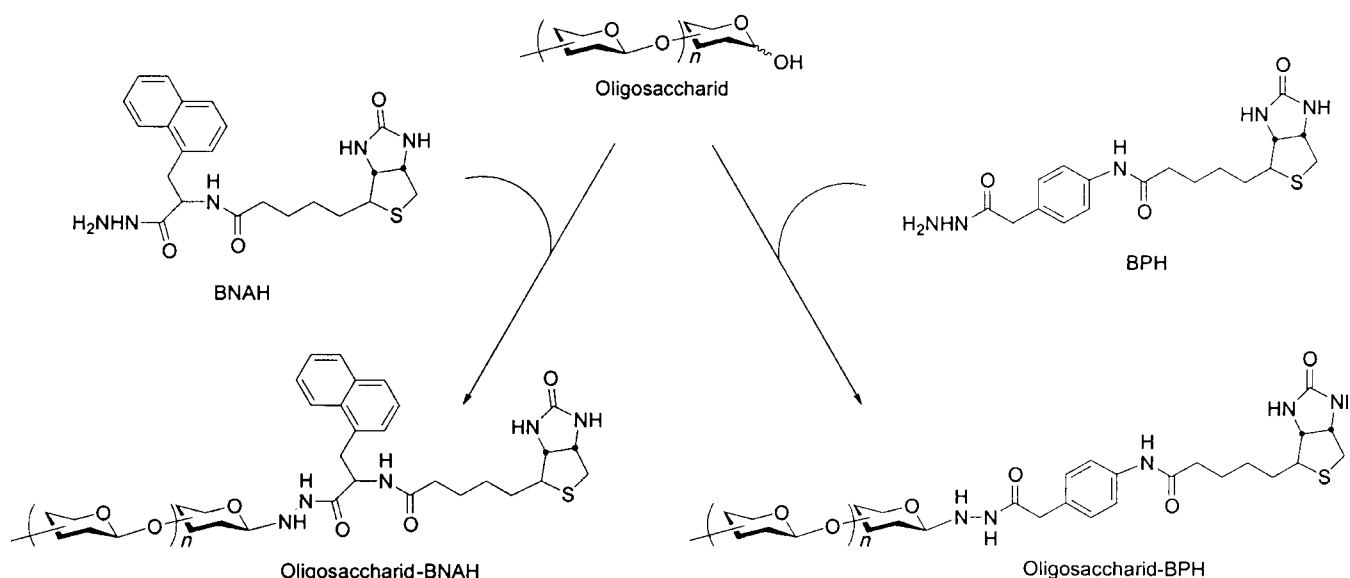


Abbildung 1. Präsentation von Kohlenhydraten für Lectin-Bindungsassays an einem Träger durch Wechselwirkung von Biotin mit Streptavidin.

Der Einbau eines 4-(Biotinamido)phenylacetylhydrazin(BPH)-Chromophors in den Linkerteil des Kohlenhydrats (Schema 1)^[13] erleichterte den Nachweis der Lectinbindung, die durch Oberflächenplasmonenresonanz(surface plasmon resonance, SPR)-Spektroskopie bestimmt wurde.^[14] Die Weiterentwicklung der Methode führte zu einem Biotinyl-L-3-(2-naphthyl)alaninhydrazid(BNAH)-Linker, der einen Chromophor mit UV-absorbierenden und fluoreszierenden Eigenschaften enthält (Schema 1).^[15] Hiermit wurde die Bindung von monoklonalen Antikörpern und Selectin an Trägergebundene Sialyl-Lewis^a(SLe^a)- und verwandte Sulfo-Le^a-Oligosaccharide kontrolliert.^[16] Die unerwartet niedrigen Signale für die Bindung zwischen den Sulfovarianten und L- und P-Selectinen unterstrichen, wie wichtig die Verwendung des richtigen Liganden an der Streptavidinmatrix ist. Die

[*] Prof. Dr. P. H. Seeberger, K. R. Love
Department of Chemistry
Massachusetts Institute of Technology
Cambridge, MA 02139 (USA)
Fax: (+1) 617-253-2979
E-mail: seeberg@mit.edu



Schema 1. Einbau von Chromophoren in einen Linker zur Präsentation von Kohlenhydraten an einem Streptavidin-beschichteten Träger. Der Biotin-terminierte Linker wird durch Hydrazidbildung unter milden Bedingungen an das reduzierende Ende eines Oligosaccharids gebunden.

Länge des Spacers zwischen der Biotinylmarkierung und dem Oligosaccharid ist entscheidend für das Bindungssignal, da sie unspezifische Ligand-Ligand- und Ligand-Träger-Wechselwirkungen einschränkt.

Biotinylierte Oligosaccharide wurden auch eingesetzt, um die noch kaum verstandenen Protein-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen zu untersuchen. Eine Bibliothek aus immobilisierten Galactosylceramid(GalCer)-Derivate wurde einzeln auf ihre Wechselwirkung mit dem HIV-Zelloberflächenglycoprotein gp 120 geprüft.^[17] Ein ähnlich immobilisiertes Heparinsulfat-Glycosaminoglycan wurde mit der 3-*O*-Sulfotransferase-Isoform-1 (3-OST-1) umgesetzt, um die Bindung von Antithrombin III zu verbessern.^[18] Diese Arbeiten veranschaulichen das Potenzial der Biotin-Streptavidin-Bindung, Zucker zu immobilisieren und so Protein-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen zu untersuchen.

Selbstorganisierte Kohlenhydratmonoschichten

Selbstorganisierte Monoschichten (self-assembled monolayers, SAMs) von Alkanthiolen an einem Gold-beschichteten Träger ermöglichen die Präsentation dicht gepackter Strukturelemente an einer Oberfläche.^[11] Die Reaktivität und die Eigenschaften einer Monoschicht hängen völlig von den exponierten funktionellen Gruppen ab, die so verändert werden können, dass bestimmte Oberflächen entstehen. Hydroxylierte Träger sind rasch derivatisierte Einheiten, um Biomoleküle wie ein Thiol-terminiertes Hexasaccharid anzuknüpfen.^[19]

Später wurden mehrere SAMs aus Thioglucose-Monosacchariden gebildet.^[20] Ihre Charakterisierung durch Reflektionsabsorptions-Infrarotspektroskopie (RAIRS) ergab,^[21] dass die Orientierung der Kohlenhydrate in jeder SAM von der anomeren Thiolgruppe abhängt. Demzufolge wurde das nichtreduzierende Ende der Mannose so präsentiert, dass die Lectine jede Monosaccharideinheit erreichen konnten. Die Wechselwirkungen zwischen dieser SAM und zwei Lectinen, Concanavalin A (Con A) und dem Lectin aus *Tetragonolobus*

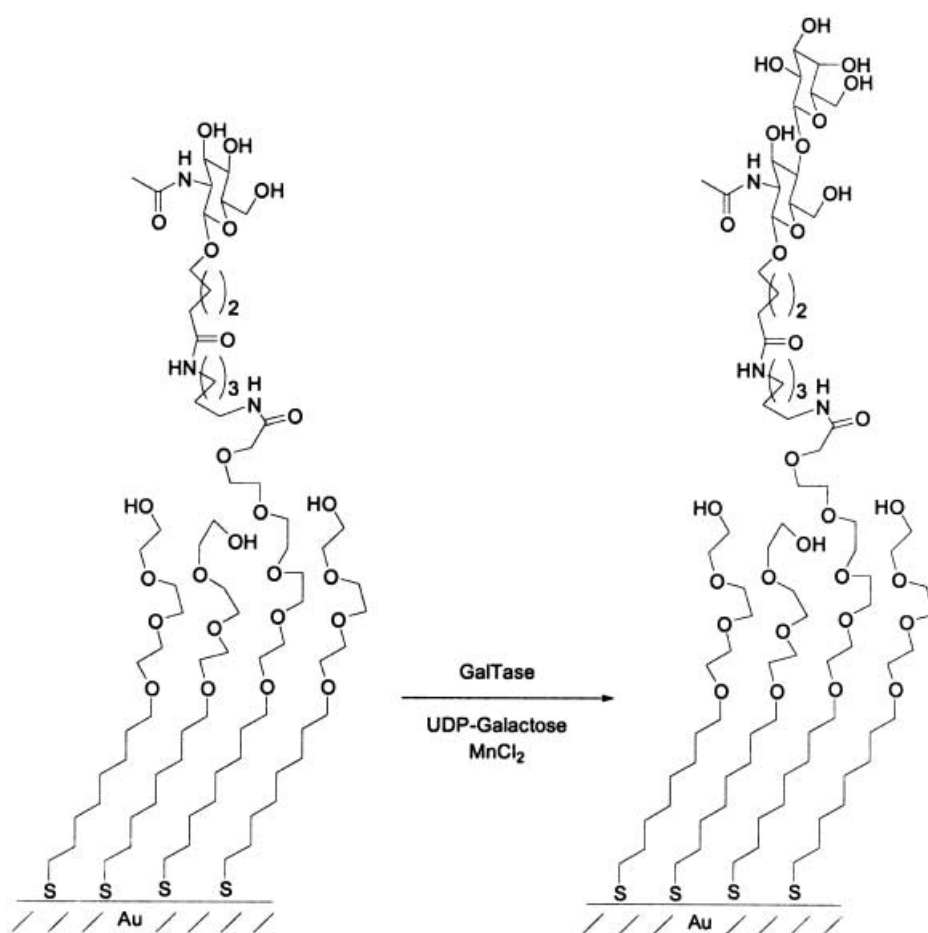
purpureas, wurden durch SPR-Spektroskopie untersucht, wobei eindeutige Selektivität von Con A für die Mannosehaltige SAM nachgewiesen wurde.^[20]

Houseman und Mrksich haben die enzymatische Modifizierung einer Kohlenhydrat-SAM beschrieben.^[22] Eine gemischte SAM mit *N*-Acetylglucosamin(GlcNAc)- und Triethylenglycol-Gruppen wurde mit Rinder- β -1,4-Galactosyltransferase (GalTase; Schema 2) behandelt. Die Übertragung von Galactose wurde durch Zugabe von [¹⁴C]Uridindiphosphogalactose ([¹⁴C]UDP-Gal) quantifiziert, wobei sich zeigte, dass die Enzymaktivität und die Dichte der Monoschicht direkt korrelieren.^[22]

Kohlenhydrat-SAMs wurden auch dazu verwendet, die Proteinspezifität und die Ligandendichte zu korrelieren. Bei der Umsetzung von drei SAMs, die eins von drei Disacchariden – einen natürlichen, einen synthetischen oder einen Kontrollliganden – präsentierten, mit dem Lectin aus *Bauhinia purpurea* änderte sich mit zunehmender Oberflächendichte die Bindungsselektivität vom natürlichen zum synthetischen Liganden.^[23] Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass ein Protein durch Bindung an mehrere Kohlenhydratligenanden mehr als eine Antwort hervorrufen kann. Änderungen in der Zusammensetzung und Dichte von Kohlenhydraten an der Zelloberfläche können daher beträchtliche Auswirkungen auf nachfolgende Regulationsmechanismen haben.

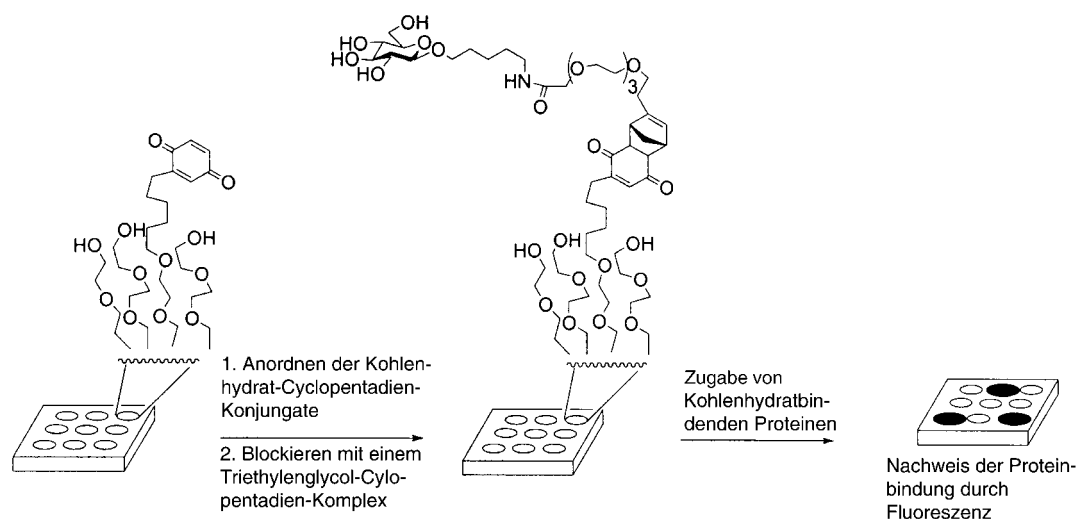
Kohlenhydrate und SAMs: Entwicklung eines Kohlenhydrat-Arrays

Da die von SAMs präsentierten Kohlenhydrate mit biologischen Mitteln nachgewiesen werden können, eignet sich das Verfahren besonders für die gleichzeitige Präsentation und Detektion von Kohlenhydratanalyten. Ein Linker mit Cyclopentadien-Terminus, der die Anknüpfung von Biomolekülen an eine SAM mit reaktiven Chinongruppen durch rasche und irreversible Diels-Alder-Reaktion ermöglicht,^[24, 25] immobilisiert die Liganden an getrennten Stellen



Schema 2. Selbstorganisierte Kohlenhydratmonoschicht. Die auf dem Träger präsentierten *N*-Acetylglucosamingruppen können durch Inkubieren mit Galactose und GalTase glycosyliert werden. Diese Glycosylierung lässt sich durch die Lectinbindung des neu gebildeten Disaccharids nachweisen.

(Schema 3).^[26] Nach der ersten Prüfung des Prinzips an einem Peptid-Chip^[27] wurde ein Kohlenhydrat-Array hergestellt, indem Lösungen der Kohlenhydrat-Cyclopentadien-Konjugate auf bestimmte Regionen einer Monoschicht mit reaktiven Benzochinongruppen aufgetragen wurden.^[28]



Schema 3. Herstellung eines Kohlenhydrat-Arrays mit selbstorganisierten Monoschichten. Cyclopentadien-funktionalisierte Monosaccharide wurden an einer SAM mit reaktiven Chinongruppen immobilisiert. Durch irreversible Diels-Alder-Reaktion zwischen dem Cyclopentadien und den Chinogruppen wird jedes Monosaccharids lokalisiert.

Dieser polyvalente Kohlenhydrat-Array enthielt zehn verschiedene Monosaccharide und wurde durch Zugabe von fünf Fluoreszenz-markierten Lectinen geprüft.^[28] Da jedes Lectin mit seinen bekannten Kohlenhydratligenanden wechselwirkte, eignet sich der Array zum selektiven Nachweis von Proteinsubstraten. Die Arrays ließen sich auch enzymatisch modifizieren, wie die Inkubation mit GalTase und ein nachfolgender Lectinbindungs-Assay belegen.^[22]

Houseman und Mrksich nutzten die von ihnen entwickelten Reaktionen an Trägern auch, um einen Kohlenhydrat-Chip zur Untersuchung der Proteininhibierung herzustellen. Eine Reihe von Lösungen mit Con A und α -Methylmannose in unterschiedlichen Konzentrationen (0–4 mM) wurden auf Monoschichten aufgebracht, die α -Mannose, β -Glucose oder α -*N*-Acetylglucosamin präsentierten.^[28] Nach der Inkubation wurde für jede Konzentration des löslichen Liganden der Lectinbindungsanteil durch Fluoreszenzspektroskopie bestimmt und so die relativen Bindungsaffinitäten jedes Kohlenhydrats für Con A festgestellt.

Kürzlich wurde ein weiterer Kohlenhydrat-Array zum Nachweis von Antikörpern gegen eine Reihe von Dextranen beschrieben.^[29] Auf Nitrocellulose-beschichteten Glasträgern waren Dextrane mit unterschiedlicher Glycosidbindung und variierender Molmasse angeordnet. Der Kohlenhydrat-Mi-

kroarray diene dazu, in menschlichem Serum Antikörper gegen mikrobielle Pathogene nachzuweisen, die Dextrane exprimieren, darunter befanden sich mehrere Stämme von *Pneumococcus*, *Meningococcus* Gruppe B und *Haemophilus influenzae*.

Vergleich der Kohlenhydrat-Mikroarrays und Ausblick

Als erfolgreiche Methode zur Präsentation von Kohlenhydraten an einem Träger erwies sich die Bindung der Biomoleküle über Biotin-Streptavidin oder an SAMs. Durch Inkubation des Trägers mit Lectinen wurden die bekannten Kohlenhydrat-bindenden Spezifitäten in jedem Fall bestätigt. Während das Potenzial von SAMs kürzlich mit der Synthese eines Kohlenhydrat-Arrays belegt wurde, beschränkte sich Präsentation von Kohlenhydraten durch Biotin-Streptavidin-Bindung auf nur ein Substrat pro Einzelträger. Um „Arrays“ herzustellen, müssen verschiedene Biomoleküle physikalisch getrennt werden, was üblicherweise durch Verwendung einer ELISA-Mikrotiterplatte (ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay) mit 96 Vertiefungen geschieht. Wegen ihrer einfachen Herstellung und erhöhten Inaktivität gegenüber einer Proteinadsorption scheinen SAMs für Biochips besonders geeignet zu sein.^[30] Zudem ist der Nutzen von SAMs in Verbindung mit Zellkulturen bereits bewiesen worden;^[31, 32] die Kohlenhydrat-Chips zukünftiger Generationen könnten in Assays mit ganzen Zellen eingesetzt werden.

Der gleichzeitige Nachweis von Kohlenhydratanalysen durch die Bindung von Lectin im Zusammenhang mit einem Monosaccharid-Array ist eine leistungsfähige Entwicklung auf dem neuen Gebiet der Glycomik. Um die Array-Technologie zur Aufklärung der komplizierten Aufgaben von Kohlenhydraten bei der zellulären Signalübermittlung einzusetzen, müssen allerdings längere und komplexere Oligosaccharide immobilisiert werden. Die Entwicklung automatisierter Synthesemethoden für Oligosaccharide^[33, 34] in Verbindung mit der Entwicklung der Mikrokontaktdrucktechnik zur Aufbringung von Liganden auf die Oberfläche einer SAM^[35, 36] ermöglicht die rasche Herstellung von Chips, die ganze Kohlenhydratklassen enthalten. Das Screening dieser Oberflächen durch systematisches Behandeln mit Fluoreszenz-markierten Proteinen, z.B. bakteriellen und viralen Toxinen, wird schließlich dazu führen, die Rolle von Kohlenhydraten in vielen Signalübermittlungsprozessen besser zu verstehen.

- [1] R. A. Dwek, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 683.
- [2] K. A. Karlsson, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, 5, 622.
- [3] S. Hakomori, Y. Zhang, *Chem. Biol.* **1997**, 4, 97.
- [4] S. P. Fodor, J. L. Read, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Lu, D. Solas, *Science* **1991**, 251, 767.
- [5] M. Schena, D. Shalon, R. W. Davis, P. O. Brown, *Science* **1995**, 270, 467.
- [6] A. Schulze, J. Downward, *Nat. Cell Biol.* **2001**, 3, E190.
- [7] H. Zhu, J. F. Klemic, S. Chang, P. Bertone, A. Casamayor, K. G. Klemic, D. Smith, M. Gerstein, M. A. Reed, M. Snyder, *Nat. Genet.* **2000**, 26, 283.
- [8] P. Arenkov, A. Kukhtin, A. Gemmell, S. Voloshchuk, V. Chupeeva, A. Mirzabekov, *Anal. Biochem.* **2000**, 278, 123.
- [9] H. Zhu, M. Snyder, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, 5, 40.
- [10] M. Wilchek, E. A. Bayer, *Anal. Biochem.* **1988**, 171, 1.
- [11] A. Ulman, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 1533.
- [12] M. C. Shao, *Anal. Biochem.* **1992**, 205, 77.
- [13] Y. Shinohara, H. Sota, M. Gotoh, M. Hasebe, M. Tosu, J. Nakao, Y. Hasegawa, M. Shiga, *Anal. Chem.* **1996**, 68, 2573.
- [14] R. J. Green, R. A. Frazier, K. M. Shakesheff, M. C. Davies, C. J. Roberts, S. J. B. Tendler, *Biomaterials* **2000**, 21, 1823.
- [15] C. Leteux, R. A. Childs, W. Chai, M. S. Stoll, H. Kogelberg, T. Feizi, *Glycobiology* **1998**, 8, 227.
- [16] C. Leteux, M. S. Stoll, R. A. Childs, W. Chai, M. Vorozhaikina, T. Feizi, *J. Immunol. Methods* **1999**, 227, 109.
- [17] K. D. McReynolds, M. J. Hadd, J. Gervay-Hague, *Bioconjugate Chem.* **1999**, 10, 1021.
- [18] M. Hernaiz, J. Liu, R. D. Rosenberg, R. J. Linhardt, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, 276, 292.
- [19] M. C. Fritz, G. Hahner, N. D. Spencer, *Langmuir* **1996**, 12, 6074.
- [20] D. J. Revell, J. R. Knight, D. J. Blyth, A. H. Haines, D. A. Russell, *Langmuir* **1998**, 14, 4517.
- [21] H. Hoffmann, U. Mayer, H. Brunner, A. Krischanitz, *Vib. Spectrosc.* **1995**, 8, 151.
- [22] B. T. Houseman, M. Mrksich, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 876; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 782.
- [23] N. Horan, L. Yan, H. Isobe, G. M. Whitesides, D. Kahne, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 11782.
- [24] M. N. Yousaf, E. Chan, M. Mrksich, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 2019; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 1943.
- [25] E. Chan, M. N. Yousaf, M. Mrksich, *J. Phys. Chem. A* **2000**, 104, 9315.
- [26] M. N. Yousaf, M. Mrksich, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 4286.
- [27] B. T. Houseman, J. H. Huh, S. J. Kron, M. Mrksich, *Nat. Biotechnol.* **2002**, 20, 270.
- [28] B. T. Houseman, M. Mrksich, *Chem. Biol.* **2002**, 9, 443.
- [29] D. Wang, S. Liu, B. J. Trummer, C. Deng, A. Wang, *Nat. Biotechnol.* **2002**, 20, 275.
- [30] M. Mrksich, *Chem. Soc. Rev.* **2000**, 29, 267.
- [31] M. N. Yousaf, B. T. Houseman, M. Mrksich, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 1127; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 1093.
- [32] M. N. Yousaf, B. T. Houseman, M. Mrksich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 5992.
- [33] O. J. Plante, E. R. Palmacci, P. H. Seeberger, *Science* **2001**, 291, 1523.
- [34] P. Sears, C. H. Wong, *Science* **2001**, 291, 2344.
- [35] M. Mrksich, G. M. Whitesides, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1996**, 25, 55.
- [36] J. Lahiri, E. Ostuni, G. M. Whitesides, *Langmuir* **1999**, 15, 2055.